

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA MEDICINA**



Dunja Jakovljević

**BIOLOŠKO DEJSTVO
VODENOG EKSTRAKTA PLODA ŠTAVELJA
(*RUMEX CRISPUS* L., POLYGONACEAE)**

Doktorska disertacija

Mentori:

**Prof. dr Tatjana Čebović
Prof. dr Zoran Maksimović**

Novi Sad, 2019. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU**MEDICINSKI FAKULTET****KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dunja Jakovljević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Tatjana Čebović, vanredni profesor Dr Zoran Maksimović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Biološko dejstvo vodenog ekstrakta ploda štavolja (<i>Rumex crispus</i> L., Polygonaceae)
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2019
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 7 / stranica: 248 / slika: 20 / grafikona: 40 / tabela: 95 / referenci: 183

Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	štavelj; biljni ekstrakti; flavonoidi; oksidativni stres; reaktivne kiseonične vrste; antioksidanti; hvatači slobodnih radikala; citotoksini; antiinflamatorni agensi; protektivni agensi; in vitro metode; tumorske ćelijske linije; eksperiment na životinjama; visokoefikasna tečna hromatografija
UDK	615.276/.279.07:582.657
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Štavelj (<i>Rumex crispus</i>, Polygonaceae) je višegodišnja zeljasta biljka, koja predstavlja bogat izvor fenolnih komponenti. Iako se smatra invazivnim korovom, mlado lišće štavelja je jestivo i često se koristi kao salata. Dalje, upotreba plodova štavelja opisana je u srpskoj i turskoj narodnoj medicini u lečenju gastrointestinalnih tegoba.</p> <p>Cilj ovog rada bio je procena <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> antioksidantne/prooksidantne i citotoksične aktivnosti, i određivanje eventualnog <i>in vitro</i> antiinflamatornog efekta vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i>.</p> <p>Ukupan sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom. Kvalifikacija i kvantifikacija flavonoida potvrđena je visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC). Antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta ploda štavelja procenjena je na osnovu <i>in vitro</i> testova: <i>Ferric-reducing antioxidant power</i> (FRAP), sposobnosti ekstrakta da neutrališe slobodne radikale NO•, OH• i DPPH• i uticaja na lipidnu peroksidaciju u lipozomima. Citotoksičnost ispitivanog ekstrakta je određena <i>in vitro</i> na tumorskim ćelijskim linijama: humani karcinom</p>

	<p>cerviksa (HeLa), adenokarcinom (HT-29) i adenokarcinom dojke (MCF7). Takođe, moguća <i>in vivo</i> hepatoprotektivna i antioksidantna svojstva ekstrakta određena su kod oksidativnog stresa izazvanog CCl₄ kod eksperimentalnih životinja. Pored toga, proverena je hipoteza u kojoj testiran ekstrakt pokazuje <i>in vivo</i> antiproliferativnu aktivnost kod <i>Ehrlich</i>-ovih (<i>EAC</i>) i <i>Hepatoma AS30D</i> ćelija, merenjem zapremine ascitesa, procenta vijabilnih ćelija i nivoa nekoliko antioksidantnih enzima. Optimizovan <i>in vitro</i> test za određivanje potencijala inhibicije ciklooksigenaze-1 (COX-1) i 12-lipooksigenaze (12-LOX) preduzet je u svrhu procene antiinflamatornog efekta vodenog ekstrakta ploda <i>R. crispus</i>.</p> <p>HPLC analiza otkrila je da je mikvelianin najdominantniji flavonoidni konstituent ekstrakta. Testirani ekstrakt pokazao je potencijalnu antioksidantnu aktivnost rezultujući velikom moći u neutralizaciji slobodnih radikala, i sposobnošću da smanji lipidnu peroksidaciju u lipozomima. Rezultati su ukazali na tkivno-selektivnu citotoksičnost ekstrakta ploda <i>R. crispus in vitro</i>. Najizraženija antitumorska aktivnost primećena je prema HeLa i MCF7 ćelijskim linijama. Podaci sugerišu da bi se ispitivani ekstrakt mogao smatrati potencijalnim <i>in vivo</i> hepatoprotektivnim i antioksidantnim agensom, sprečavajući oksidativna oštećenja jetre. S druge strane, pomenuti ekstrakt može pokazati <i>in vivo</i> prooksidantna svojstva, uzrokujući oksidativni stres u maligno transformisanim <i>EAC</i> i <i>AS30D</i> ćelijama i smanjujući zapreminu ascitesa i udeo vijabilnih ćelija, u poređenju sa kontrolnom grupom. Promene u aktivnosti antioksidantnih enzima su verovatno posledica indukovanog oksidativnog stresa u <i>EAC</i> i <i>AS30D</i> ćelijama, naročito kod pretretiranih životinja. Vodeni ekstrakt ploda štavolja pokazao je COX-1, kao i 12-LOX inhibitornu aktivnost,</p>
--	---

	<p>navodeći da bi ispitivani ekstrakt mogao biti antiinflamatorni agens.</p> <p>Vodeni ekstrakt ploda <i>R. crispus</i> ima potencijalnu antioksidantnu, citotoksičnu i antiinflamatornu aktivnost. Ispoljavanje prooksidantnih svojstava predstavlja mogući mehanizam antiproliferativnog efekta ekstrakta.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	26.01.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član: član: član:

UNIVERSITY OF NOVI SAD**MEDICAL FACULTY****KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Dunja Jakovljević
Mentor: MN	PhD Tatjana Ćebović, associate professor PhD Zoran Maksimović, associate profesor
Title: TI	Biological activity of aqueous extract of yellow dock fruit (<i>Rumex crispus</i> L., Polygonaceae)
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters: 7 / pages: 248 / pictures: 20 / graphicons: 40 / tables: 95 / references: 183

Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Biochemistry
Subject, Key words: SKW	Rumex; Plant Extracts; Flavonoids; Oxidative Stress; Reactive Oxygen Species; Antioxidants; Free Radical Scavengers; Cytotoxins; Anti-Inflammatory Agents; Protective Agents; In Vitro Techniques; Cell Line, Tumor; Animal Experimentation; Chromatography, High Pressure Liquid
UC	615.276/.279.07:582.657
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Curly dock (<i>Rumex crispus</i>, Polygonaceae) is a wild perennial herbaceous plant, which products are described as a rich source of phenolic compounds. Apart from being considered a seriously invasive weed, young leaves of curly dock are edible and often used as salad. Furthermore, the use of its fruits has been described in Serbian and Turkish traditional medicine against stomach complaints.</p> <p>The objectives of this study were to evaluate <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> antioxidant/prooxidant and cytotoxic activities, and to determine an eventual <i>in vitro</i> anti-inflammatory effect of the aqueous extract of <i>Rumex crispus</i> fruits.</p> <p>Total flavonoid content was determined by spectrophotometric method. Qualification and quantification of flavonoids were confirmed using <i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC). The aqueous extract of curly dock fruits was evaluated for its antioxidant activity by <i>in vitro</i> assays for <i>Ferric-reducing antioxidant power</i> (FRAP), NO•, OH• and DPPH•-free radical scavenging activities and the influence on lipid</p>

peroxidation in liposomes. The cytotoxicity of tested extract was examined *in vitro* in human cervix carcinoma (HeLa), colon adenocarcinoma (HT-29) and breast adenocarcinoma (MCF7). Also, the potential *in vivo* hepatoprotective and antioxidant properties of investigated extract were determined on CCl₄-induced oxidative stress in experimental animals. Furthermore, the hypothesis that the examined extract might show *in vivo* antiproliferative activity in *Ehrlich* carcinoma (*EAC*) and *Hepatoma AS30D* cells was tested by measuring volume of ascites, percentage of viable cells and level of several antioxidant enzymes. The optimized *in vitro* test for determination of cyclooxygenase-1 (COX-1) and 12-lipoxygenase (12-LOX) inhibition potency was undertaken in order to estimate an anti-inflammatory effect of aqueous extract of *R. crispus* fruits.

HPLC analysis revealed miquelianin as the most abundant flavonoid constituent of the extract. The tested extract might have an antioxidant activity resulting in scavenging of free radicals and ability to decrease lipid peroxidation in liposomes. The results could indicate tissue-selective cytotoxicity of *R. crispus* fruit extract *in vitro*. The most prominent antitumor activity was observed towards HeLa and MCF7 cell lines. The data suggested that investigated extract may be considered as potential *in vivo* hepatoprotective and antioxidant agent due to prevention of the liver injuries induced by oxidative damage. On the other hand, mentioned extract could exhibit *in vivo* prooxidant property, causing the oxidative stress in malignant transformed *EAC* and *AS30D* cells and reducing volume of ascites and percentage of viable cells, in comparison with control group. Changes in activities of antioxidant enzymes might be the results of induced oxidative stress in *EAC* and *AS30D* cells, especially in the pretreated animals. The aqueous extract of curly dock fruits showed

	<p>COX-1, as well as 12-LOX inhibitory activity, suggesting that tested extract might be an anti-inflammatory agent.</p> <p>It could be concluded that aqueous fruit extract of <i>R. crispus</i> might have antioxidant, cytotoxic and anti-inflammatory activities. The prooxidant properties of examined extract could be the mechanism of potential antiproliferative effect of extract.</p>
Accepted on Senate on:	26.01.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president:</p> <p>member:</p> <p>member:</p> <p>member:</p> <p>member:</p>

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Tatjani Čebović i prof. dr Zoranu Maksimoviću na predloženoj temi doktorske disertacije, velikom trudu u prenošenju znanja, dragocenoj podršci i безусловnoj pomoći tokom doktorskih studija.

Posebnu zahvalnost dugujem naučnom savetniku dr Dragani Četojević-Simin i prof. dr Ivani Beari na stručnoj pomoći oko in vitro eksperimentalnog dela, korisnim sugestijama i lepim rečima.

Zahvaljujem se i Komisiji za ocenu doktorske disertacije prof. dr Snežani Đorđević, prof. dr Veliboru Vasoviću i prof. dr Ljilji Torović na savetima i pohvalama.

Hvala divnim kolegama istraživaču saradniku dr Stevanu Samardžiću i asistentu Tatjani Majkić na korisnim savetima i pomoći tokom istraživanja.

Dragoj učiteljici Radmili Matić zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u sređivanju literature.

Veliko hvala porodici i prijateljima na beskrajnoj ljubavi, strpljenju, razumevanju, motivaciji i iskrenoj podršci.

Autor

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo.....	3
2.1. <i>Rumex crispus</i> L., Polygonaceae.....	3
2.1.1. Izgled štavolja.....	4
2.1.2. Rasprostranjenost štavolja.....	6
2.1.3. Fitohemijski sastav.....	6
2.1.3.1. Flavonoidi.....	7
2.1.4. Štavolja u tradicionalnoj medicini i gastronomiji.....	13
2.1.5. Lekovita svojstva štavolja.....	13
2.2. Antioksidantno delovanje.....	15
2.2.1. Reaktivne kiseonične vrste.....	15
2.2.2. Oksidativni stres.....	17
2.2.3. Azot-monoksid (NO), reaktivne azotne vrste i nitrozativni stres.....	18
2.2.4. Oksidativna oštećenja osnovnih biomolekula.....	23
2.2.4.1. Oksidativno oštećenje proteina.....	23
2.2.4.2. Oksidativno oštećenje lipida – lipidna peroksidacija.....	24
2.2.4.3. Oksidativno oštećenje DNK.....	25
2.3. Maligna transformacija ćelije.....	26
2.4. Antiinflamatorno delovanje.....	35
2.4.1. Arahidonska kiselina i eikozanoidi.....	35
2.4.2. Ciklooksigenazni metabolizam.....	36
2.4.3. Lipooksigenazni metabolizam.....	37
2.4.4. Epooksigenazni metabolizam.....	39
3. Ciljevi i radne hipoteze.....	40
3.1. Ciljevi.....	40
3.2. Radne hipoteze.....	40

4. Materijal i metode.....	42
4.1. Fitohemijsko ispitivanje vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	42
4.1.1. Biljni materijal.....	42
4.1.2. Priprema biljnog ekstrakta.....	43
4.1.3. Određivanje ukupnih flavonoida.....	43
4.1.4. HPLC-MS analiza ispitivanog ekstrakta.....	44
4.2. <i>In vitro</i> ispitivanje antioksidantnih svojstava vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	45
4.2.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije.....	45
4.2.1.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida.....	46
4.2.2. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH [•]).....	47
4.2.2.1. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH [•]) u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida.....	48
4.2.3. Određivanje stepena inhibicije DPPH [•] radikala.....	49
4.2.4. Određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP metodom.....	50
4.2.5. Određivanje stepena inhibicije stvaranja azot monoksida (NO).....	51
4.3. <i>In vitro</i> ispitivanje antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	52
4.3.1. Kulture ćelijskih linija.....	52
4.3.2. Određivanje intenziteta ćelijskog rasta.....	53
4.3.3. Određivanje mehanizma ćelijske smrti.....	54
4.4. <i>In vivo</i> ispitivanja antioksidantnih/prooksidantnih i citotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	55
4.4.1. Eksperimentalne životinje.....	55
4.4.2. <i>In vivo</i> ispitivanja antioksidantnih / prooksidantnih i hepatoprotektivnih / hepatotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	56

4.4.3. <i>In vivo</i> ispitivanja antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	57
4.4.4. Eksperimentalne metode u <i>in vivo</i> ispitivanjima.....	58
4.5. <i>In vitro</i> ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	65
4.5.1. Određivanje broja trombocita.....	65
4.5.2. Eksperimentalni postupak za određivanje inhibicije nastajanja metabolita arahidonske kiseline.....	66
4.6. Statistička analiza.....	69
5. Rezultati i diskusija.....	70
5.1. Fitohemijski sastav vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	70
5.2. <i>In vitro</i> antioksidantna svojstva vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	72
5.2.1. Intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma, bez prisustva i u prisustvu CCl ₄ , nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	72
5.2.2. Intenzitet produkcije hidroksil (•OH) radikala, bez prisustva i u prisustvu CCl ₄ , nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	75
5.2.3. Intenzitet inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	78
5.2.4. Ukupna antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L. merena FRAP metodom.....	82
5.2.5. Step en inhibicije azot monoksida (NO) nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	84
5.3. <i>In vitro</i> antitumorska aktivnost vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	87
5.3.1. Intenzitet ćelijskog rasta.....	87
5.3.2. Mehanizam ćelijske smrti.....	88
5.4. <i>In vivo</i> antioksidantni/prooksidantni i citotoksični efekti vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	89
5.4.1. Svojstva u sistemu <i>in vivo</i> oštećenja jetre izazvanih ugljentetrahloridom.....	89

5.4.2. Aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa izazvanog ugljentetrahloridom i nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	115
5.4.3. <i>In vivo</i> citotoksičnost vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L. za ćelije <i>Ehrlich</i> -ovog ascitnog tumora (<i>EAC</i>).....	131
5.4.3.1. Zapremina ascitesa <i>Ehrlich</i> -ovog ascitnog tumora (<i>EAC</i>) i broj i vijabilnost ćelija <i>EAC</i> nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	131
5.4.3.2. Antioksidantni status ćelija <i>Ehrlich</i> -ovog ascitnog tumora (<i>EAC</i>) nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	143
5.4.4. <i>In vivo</i> citotoksičnost vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L. za ćelije <i>AS30D</i> ascitnog karcinoma (<i>AS30D</i>).....	170
5.4.4.1. Zapremina ascitesa <i>AS30D</i> ascitnog karcinoma (<i>AS30D</i>) i broj i vijabilnost ćelija <i>AS30D</i> nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	170
5.4.4.2. Antioksidantni status ćelija <i>AS30D</i> ascitnog karcinoma (<i>AS30D</i>) nakon primene vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	181
5.5. <i>In vitro</i> antiinflamatorna aktivnost vodenog ekstrakta ploda <i>Rumex crispus</i> L.....	215
6. Zaključak.....	217
7. Literatura.....	219

1. Uvod

Štavelj (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) pripada rodu *Rumex*, koji broji oko 200 vrsta (1). Kao korovska biljka, raste uglavnom po livadama, poljima, pored jarkova i puteva, po zapuštenim područjima, i njivama, gde predstavlja ozbiljan problem po useve (2-4). Međutim, iako se smatra invazivnim korovom, podaci o upotrebi štavelja u narodnoj medicini datiraju mnogo pre nego što je nauka počela da potvrđuje lekovita svojstva ekstrakata štavelja. Koren štavelja široko je prisutan u tradicionalnoj medicini kao tonik i laksativ, a poznato je i blagotvorno delovanje kod bilijarnih poremećaja i gljivičnih infekcija (5, 6). Poznat je i kao „čistač krvi” u turskoj narodnoj medicini (5, 7, 8). Mladi listovi i izdanci su jestivi, kiselkastog ukusa i od davnina koriste se kao salata (5, 8, 9).

Fitohemijaska ispitivanja pokazala su da ekstrakti štavelja sadrže polifenolna jedinjenja, naročito flavonoide, od kojih potiču neka lekovita dejstva ove biljke: antioksidantno, antitumorsko i antiinflamatorno delovanje (7, 8, 10).

Različite studije su pokazale da je povećan unos namirnica bogatih flavonoidima usko povezan sa niskom incidencom mnogih bolesti: kardiovaskularnih, dijabetesa, malignih bolesti, i sa usporavanjem starenja (11, 12). Daljim istraživanjima utvrđeno je da su ove bolesti i starenje, između ostalog, uzrokovane povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (*reactive oxygen species* – ROS), koja prevazilazi kapacitet antioksidantnog sistema (13, 14). Takođe, brojni literaturni podaci pokazuju da flavonoidi, i uopšte polifenolna jedinjenja, deluju antioksidantno, jer imaju sposobnost neutralisanja, odnosno „hvatanja” ROS, s obzirom da imaju jednu ili više hidroksilnih grupa koje deluju kao donori protona, čime ROS prevode u stabilnije vrste (7, 8, 15). Mnoge studije su pokazale da različiti ekstrakti lista, korena i semena, kao i metanolni ekstrakt ploda *R. crispus* imaju antioksidantnu aktivnost, smanjujući koncentraciju ROS različitim mehanizmima (7, 8, 10, 16, 17). Međutim, nema dostupnih podataka o antioksidantnom delovanju vodenog ekstrakta ploda štavelja. Dosadašnja istraživanja sugerišu da metanolni ekstrakti *R. crispus* mogu imati i antitumorsko delovanje, indukujući oksidativni stres u tumorskim ćelijama, odnosno apoptozu ili nekrozu (18-20).

Flavonoidi imaju i antiinflamatornu aktivnost, inhibirajući određene enzime koji su uključeni u metabolizam arahidonske kiseline i nastajanje medijatora inflamacije (11, 15, 21). U

literaturi su opisani i drugi mehanizmi kojima flavonoidi smanjuju inflamacijski odgovor (15). Stoga, od interesa je i ispitivanje potencijalne antiinflamatorne aktivnosti ekstrakta šavelja. Komponente koje sadrži *R. crispus* deluju antiinflamatorno, utičući na nivo kalcijuma i oslobađanje histamina, pa predstavljaju i antialergijske agense (22).

2. Opšti deo

Antioksidantna i antiinflamatorna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., Polygonaceae, kao i njegov uticaj na maligno transformisane ćelije, pripisuju se flavonoidima.

2.1. *Rumex crispus* L., Polygonaceae

Sinonimi: *Rumex crispus*.

Narodna imena: štavelj, štavalj, konjštak, štavljika, šćav, šćav, šćav, kiselica, ljutika, šavije, konjsko zelje, poljsko zelje (1, 9).

Srodne vrste: *Rumex obtusifolius* – konjski štavalj, tupolisni štavelj, štavelj, štavolj, konjštak; *Rumex acetosella* – kiselica, mala kiselica, sitan kiseljak; *Rumex acetosa* – kiseli štavelj, kiseljak, velika kiselica; *Rumex aquaticus* – vodeni štavelj, štavolj, konjštak, šćavlika; *Rumex thyrsiflorus* – perasti štavelj; *Rumex palustris*; *Rumex patientia*; *Rumex pulcher* – poljsko zelje, zelje, livadsko zelje; *Rumex tenuifolius*; *Rumex stenophyllus*; *Rumex hydrolapathum* – vodeni konjštak (1, 9).

Taksonomija biljke štavelj (*Rumex crispus* L.) prikazana je u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Taksonomija biljke *Rumex crispus* L.

Regnum (carstvo):	Plantae
Divisio (razdeo):	Magnoliophyta
Clasis (klasa):	Magnoliopsida
Ordo (red):	Caryophyllales
Familia (porodica)	Polygonaceae
Genus (rod)	<i>Rumex</i>
Species (vrsta):	<i>R. crispus</i>

2.1.1. Izgled štavelja

Štavelj (*Rumex crispus* L. (1959.), Polygonaceae) pripada porodici kiseljaka (Polygonaceae), odnosno rodu *Rumex*, koji broji oko 200 vrsta (1). Štavelj je višegodišnja zeljasta dvodoma biljka sa kratkim, granatim rizomom i člankovitim stablom, visine između 40 cm i 120 cm (3, 6, 9, 10, 23, 24) (Slika 2.1.). Koren može da dostigne širinu od 4 cm, i dubinu u zemljištu od oko 150 cm, pri čemu opstaje godinama (10).



Slika 2.1. Štavelj (25).

Listovi su naizmenično raspoređeni, po obodu talasasti, po čemu je biljka i dobila ime (latinski *rumex*- talasast, kovrdžav; engl. *curly dock*) (10, 24, 26, 27) (Slika 2.2., Slika 2.3.). Listovi u donjem delu biljke formiraju rozetu (24). Donji listovi su na dršci (Slika 2.4.), kopljastog oblika, listovi na središnjem delu stabljike postepeno se sužavaju i prelaze u dršku, a gornji listovi su sedeći. Ohree štavelja su po obodu nazubljene, retko sa končastim resama (preuzeto iz 28).



Slika 2.2. Štavelj –
talasasti listovi (29).



Slika 2.3. Štavelj –
raspored listova (30).

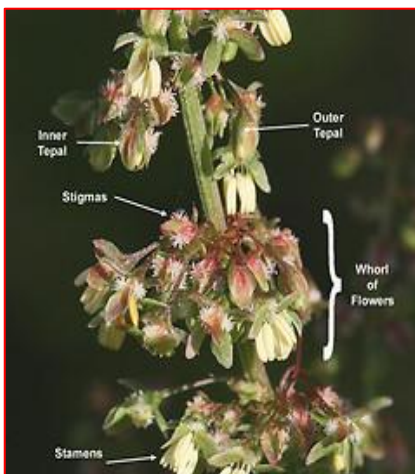


Slika 2.4. Štavelj –
držka listova (31).

Sitni crvenkasto-smeđi cvetovi su jednopolni, grupisani na vrhovima stabljika u izdužene, cimozne cvasti (u obliku metle) (10, 27). Cveta od maja do avgusta (26). Biljka obično ne cveta u godini kada je iznikla, i ima nizak mortalitet preko zime (3, 32, 33, 34) (Slika 2.5., Slika 2.6., Slika 2.7.).



Slika 2.5. Štavelj (35).



Slika 2.6. Štavelj – cvetovi
(36).



Slika 2.7. Štavelj – valve
(37).

Plod je trostrana orašica. Seme je dikotiledono, bogato endospermom i vlaknima (27). Jedna biljka godišnje može da proizvede i do 25 000 semena (3, 38), koja mogu dugo da perzistiraju u zemljištu (39). Seme klija uglavnom u proleće, a sazreva u leto (8, 17).

Po životnoj formi štavelj je hemikriptofita: zeljasti delovi biljke preko zime izumiru, dok pupoljci ostaju na samoj površini zemljišta, i iz njih naredne godine nastaju novi izdanci (2, preuzeto iz 28).

2.1.2. Rasprostranjenost štavelja

Štavelj se smatra jednom od najrasprostranjenijih nekultivisanih biljnih vrsta, raširenih po svim kontinentima (2, 40). Autohtona je vrsta u Evropi, severnoj Africi i zapadnoj Aziji, a u ostale delove sveta preneti je, uglavnom, ljudskim faktorom (2, 4, 24, 40). U flori Evrope zastupljeno je 50 vrsta, od čega je u Srbiji identifikovano 23 vrste (u Vojvodini raste 17 vrsta) (1).

Najviše mu pogoduju topla i vlažna staništa i kisela i lakša zemljišta niže plodnosti (2, 10, 28). Raste na pašnjacima, livadama, poljima, njivama, uz jarke i puteve, pod travom obraslim, zapuštenim područjima (2, 3, 4, 17, 28) i predstavlja invazivnu korovsku vrstu, ugrožavajući brojne useve (2, 3, 10, 41). Označen je kao „štetan korov” u Velikoj Britaniji, aktom iz 1959. (42). Širi se semenima, koja se raznose vetrom ili prijanjajući za krzno životinja, i na taj način zaražava semena useva, pa predstavlja ozbiljnu pretnju po poljoprivredu (2, 3).

Paralelno sa brojnim istraživanjima potencijalno lekovitih svojstava štavelja, vrše se ispitivanja u cilju pronalaženja selektivnog i visoko efikasnog hemijskog sredstva za suzbijanje korova, uključujući i štavelja, u oblastima bez useva (43, 44).

2.1.3. Fitohemijski sastav

Listovi štavelja su izuzetan izvor vitamina A i C, proteina, gvožđa, cinka i kalijuma (2, 27). U semenu su prisutne masti i proteini u niskom procentu. Od aminokiselina u većem procentu prisutan je jedino lizin (27). Vrste roda *Rumex* sadrže kristale kalcijum-oksalata (9, 27, 45). Koren ove biljke sadrži derivate antrahinona, i to 1,5-dihidroksi-3-metil antrahinon, 1,3,5-trihidroksi-6-hidroksimetil antrahinon i 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metil antrahinon, od kojih i

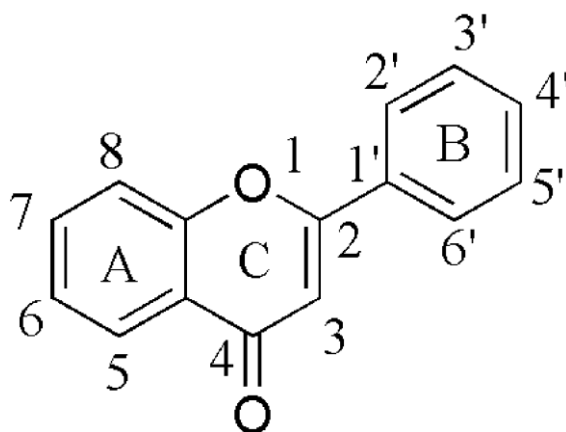
potiče gorak ukus i žuta boja korena, i naziv na engleskom jeziku „*yellow dock*” (5, 9, 26, 46). Identifikovane su tri supstance kojima se pripisuje antifungalna i antimalarična aktivnost korena štavelja: nepodin, parietin i krizofanol (41, 47). Biljka sadrži veće količine tanina, što joj daje opor ukus, naročito kad dugo stoji (9). Ekstrakti gotovo svih delova štavelja sadrže polifenolna jedinjenja, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline i procijanidini (7, 8, 10, 17, 24, 48).

Zbog potencijalno značajne uloge flavonoida, koje sadrže vrste roda *Rumex*, dalje je detaljnije izložena klasifikacija i mogući mehanizmi delovanja flavonoida.

2.1.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi, kao sekundarni metaboliti biljnih vrsta, predstavljaju najveću grupu biljnih polifenola. U prirodi se javljaju kao slobodni, ili češće u obliku glikozida (11, deo preuzet iz 49). U flavonoidnim heterozidima, aglikonsku komponentu čini molekul flavonoida, koji je hemijski vezan za šećernu komponentu (11, 21, 49). Tako na primer, kvercetin se češće javlja u obliku glikozida, dok se katehin gotovo uvek javlja slobodan (15). Flavonoidi predstavljaju biljne pigmente i odgovorni su za boju cvetova, plodova i listova biljaka (preuzeto iz 49).

Flavonoidi nastaju preko halkona, pri čemu se prsten A formira iz tri aktivirana acetata, a prsten B od derivata cimetine kiseline. Na taj način se stvara osnovni skelet koji se sastoji od 15 ugljenikovih atoma, međusobno povezanih u tri prstena (C₆-C₃-C₆). U sledećoj fazi dolazi do ciklizacije piranovog prstena i nastajanja molekule flavanona, a daljim transformacijama formiraju se različiti tipovi flavonoida. Osnovu strukture flavonoida čini flavon, odnosno 2-fenilhromon (2-fenil-benzo- γ -piron) (Slika 2.8.) (11, 49).

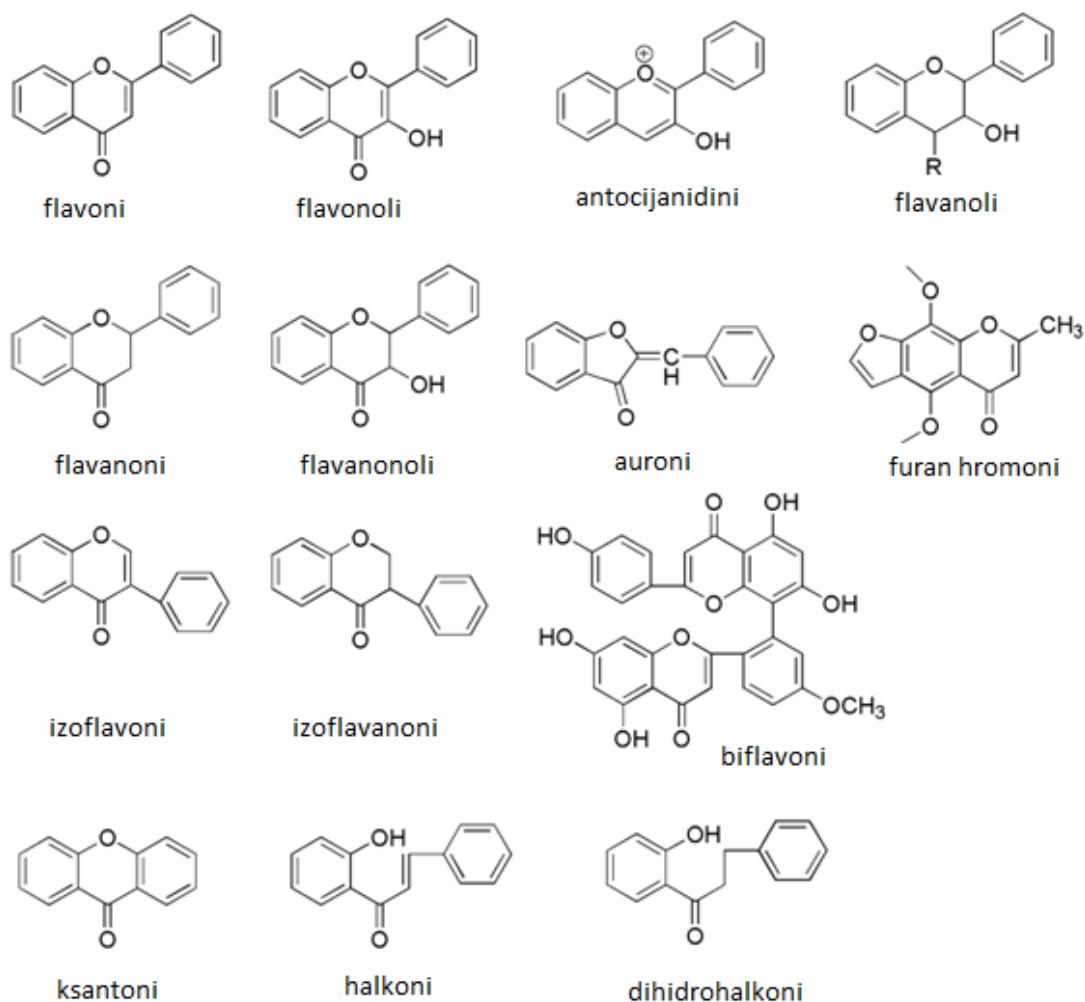


Slika 2.8. Osnovna struktura flavonoida - 2-fenilhromon (11).

Na osnovu hemijske strukture, odnosno rasporeda supstituenata, stepena oksidacije piranovog prstena i položaja fenil grupe, odnosno prstena B, moguće je izvršiti klasifikaciju flavonoida na:

- 1) flavone,
- 2) flavonole,
- 3) flavanone,
- 4) flavan-3-ole,
- 5) izoflavone, i
- 6) antocijanidine (Slika 2.9.) (12, 21).

Flavoni i flavonoli, u koje spada veliki broj jedinjenja, predstavljaju flavonoide u užem smislu. Kvercetin, jedan od često ispitivanih flavonoida, pripada flavonolskoj grupi. Flavanoni i flavanonoli imaju zasićenu dvostruku vezu između C_2 i C_3 atoma, a u biljkama se obično javljaju zajedno sa flavonima i flavonolima. Izoflavoni su derivati 3-fenilhromona. U neke klasifikacije flavonoida uvršćeni su i halkoni i auron. Halkoni imaju otvoren piranski prsten (prsten C), i prekursori su u biosintezi flavonoida. Aurone karakteriše nedostatak tipične flavonoidne strukture. Kod ove grupe molekula postoji petočlani prsten C, što ih čini derivatima benzofurana. Antocijanidini su karakteristični biljni pigmenti čija boja, u zavisnosti od pH vrednosti, varira od crvene, preko ljubičaste, do plave. U biljkama su najčešće prisutni u obliku jona (11).

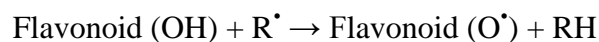


Slika 2.9. Hemijske strukture i klasifikacija flavonoida (11).

Do sada je otkriveno preko 9000 različitih flavonoida (11), koji se javljaju u voću, povrću, cveću, ali i u napicima poput čaja i crvenog vina (21). Dnevni unos, koji varira između 20 mg i 500 mg, potiče od konzumacije namirnica biljnog porekla koje obiluju flavonoidima (11). Brojne epidemiološke studije pokazale su da postoji negativna korelacija između povećanog unosa flavonoida i razvoja pojedinih bolesti, poput malignih i kardiovaskularnih bolesti. Povećan unos flavonoida deluje antibakterijski, antivirusno, antiinflamatorno, antioksidantno, antikancerogeno i kardioprotektivno. Pored toga, i mnogi drugi povoljni zdravstveni efekti se pripisuju njihovom delovanju (11, 12, 21).

Najbolje opisana karakteristika gotovo svih grupa flavonoida je njihov antioksidantni kapacitet. Flavonoli i katehini su među najpotentnijim flavonoidima koji imaju sposobnost zaštite ćelija od dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje mogu procesom lipidne peroksidacije da izvrše destrukciju ćelijske membrane i dovedu do ćelijske smrti. Flavonoidi mogu da pospeše aktivnost endogenih antioksidanata, povećavajući tako celokupan antioksidantni kapacitet (11, 15). Flavonoidi mogu da spreče oštećenja biomolekula sledećim mehanizmima: direktnim „hvatanjem” slobodnih radikala; smanjivanjem nitrozativnog stresa uzrokovanog azot(II)-oksidom; inhibicijom određenih enzima; heliranjem metala (11).

Direktno „hvatanje” slobodnih radikala odigrava se tako što visoko reaktivna hidroksilna grupa flavonoida može da stupi u reakciju sa slobodnim radikalom (R^{\bullet}), pri čemu se flavonoid oksiduje, odnosno donira atom vodonika.



Rezultat ove reakcije je stvaranje znatno stabilnijeg, a time i manje reaktivnog radikala (11, 15). Pomenutim mehanizmom flavonoidi mogu da preveniraju mnoge bolesti, koje nastaju kao posledica štetnog dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta (11, 50). Flavonoidi, takođe, mogu da inhibiraju oksidaciju lipoproteinskih čestica male gustine (LDL) *in vitro* i time teoretski preveniraju oštećenje endotelnih ćelija i razvoj ateroskleroze. Redovan unos flavonoida dovodi se u vezu sa smanjenom incidencijom koronarne bolesti i demencije, a povoljno utiče i na koncentraciju ukupnog holesterola u krvi (15).

Azot(II)-oksid, koji se normalno stvara u različitim ćelijama, može da reaguje sa slobodnim radikalima, čime nastaju peroksinitriti. Pored toga, i sam azot(II)-oksid može se posmatrati kao radikal. Flavonoidi igraju značajnu ulogu u smanjivanju nitrozativnog stresa uzrokovanog azot(II)-oksidom na dva načina:

- 1) direktnim „hvatanjem” azot(II)-oksida, i
- 2) „hvatanjem” slobodnih radikala.

Neutralisanjem slobodnih radikala, flavonoidi sprečavaju reagovanje radikala sa azot(II)-oksidom i formiranje peroksinitrita (15).

Povećana koncentracija inducibilne azot(II)-oksid sintaze dovodi do hiperprodukcije NO i oksidativnog oštećenja bioaktivnih jedinjenja. Povoljan uticaj flavonoida na ćelije ogleda se u njihovoj sposobnosti da inaktiviraju inducibilnu azot(II)-oksid sintazu (15).

Redovan unos flavonoida i njihova konjugacija u intestinalnim ćelijama i hepatocitima dovodi do smanjenja incidence kardiovaskularnih bolesti. Poluživot flavonoida u organizmu produžava se konjugacijom, čime se obezbeđuje akumulacija i dovoljna koncentracija aktivnog, slobodnog flavonoida (15).

Ksantin oksidaza je enzim odgovoran za nastajanje superoksid anjon radikala, i može biti inhibiran delovanjem flavonoida. Kvercetin i silibin mogu suzbiti aktivnost enzima ksantin oksidaze, što dalje dovodi do smanjenja oksidativnog oštećenja. Konjugovana forma kvercetina je jači inhibitor ksantin oksidaze u poređenju sa aglikonskom formom (slobodan kvercetin) (15). Flavonoid luteolin označen je kao najpotentniji inaktivator ksantin oksidaze (15, 51). Sposobnost rutina da „hvata” radikale potiče od njegovog inhibitornog delovanja prema enzimu ksantin oksidazi (15).

U prisustvu jona gvožđa, reaktivne kiseonične vrste uzrokuju lipidnu peroksidaciju, sa sledstvenom destrukcijom ćelije. Flavonoidi, a među njima najviše kvercetin, imaju sposobnost da heliraju i stabilišu jone gvožđa, čime se smanjuje mogućnost nastanka oksidativnog oštećenja (15).

Antiinflamatornu i antitrombogenu aktivnost flavonoidi ostvaruju inhibicijom enzima koji posreduju u metabolizmu arahidonske kiseline, čime se smanjuje generisanje eikozanoida: prostaglandina, tromboksana i leukotriena. Brojne studije su pokazale da flavonoidi, a naročito kvercetin, mogu da suzbijaju aktivnost enzima ciklooksigenaze i 5-lipooksigenaze, smanjujući inflamacijski odgovor (11, 15). Flavonoidi iz čaja (epigalokatehin galat i apigenin) imaju sposobnost zaustavljanja metabolizma arahidonske kiseline na određenim stupnjevima. Apigenin ima sposobnost da inhibira COX-2 enzim. Flavonoidi mogu i da blokiraju proinflamatorne proteine, i da na taj način deluju kao prirodni inhibitori inflamacije (21). Uz to, flavonoidi mogu da inhibiraju aktivaciju komplementa, i na taj način smanje adheziju inflamatornih ćelija na endotel. Dalje, flavonoidi mogu da smanje oslobađanje peroksidaze, i time ograniče generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta u neutrofilima, a pored toga, imaju i sposobnost da spreče degranulaciju neutrofila (15).

S obzirom da agregacija trombocita doprinosi razvoju ateroskleroze i pojavi trombotičnog tromba, važna je uloga flavonoida kao antitrombogenog agensa. Pojedini flavonoidi, a najviše kvercetin, kemferol i miricetin, inhibiraju agregaciju trombocita na sledeće načine:

- 1) direktno „hvataju” reaktivne kiseonične vrste, i održavaju koncentracije endotelnog prostaciklina i azot(II)-oksida unutar referentnih vrednosti, i
- 2) inhibiraju ciklooksigenazni i lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline, i ograničavaju produkciju tromboksana A₂ koji je zadužen za agregaciju trombocita (15).

Flavonoidi se, kao ksenobiotici, metabolišu putem citohrom P-450 enzima u jetri. Flavonoidi mogu da indukuju aktivnost protektivnih enzima, te igraju važnu ulogu u zaštitnoj, metaboličkoj barijeri intestinalne mukoze (21).

Flavonoidi mogu da inaktiviraju i citosolnu i membransku tirozin kinazu i na taj način smanje nekontrolisani ćelijski rast i proliferaciju. Tako se, na primer, fisetin, apigenin i luteolin smatraju potentnim inhibitorima ćelijske proliferacije. S obzirom da deluju kao antioksidanti, odnosno „hvatači” reaktivnih kiseoničnih vrsta koje uzrokuju oštećenja naslednog materijala, flavonoidi učestvuju u prevenciji karcinogeneze (15). Flavonoidi mogu da indukuju apoptozu, inhibiraju proteaze, utiču na interakciju sa receptorima ili sa karcinogenim enzimima, a ovi procesi još više ukazuju i ističu značajnost flavonoida u profilaksi malignih bolesti (11). Pored ovoga, ove bioaktivne molekule imaju sposobnost da inhibiraju angiogenezu, koja kod maligno transformisanog tkiva nije kontrolisana. Jedan od mehanizama inhibicije angiogeneze je inaktivacija protein kinaza, odnosno enzima koji, pored uloge u prenosu međućelijskih informacija, predstavljaju važan faktor u procesu angiogeneze. Brojne studije su pokazale inverznu korelaciju između unosa flavonoida i stope nastanka malignih bolesti. Kvercetin i apigenin sprečavaju rast melanoma (15).

Flavonoidi, a naročito kvercetin, imaju i antivirusno delovanje. Postoje dokazi da su flavonoidi vezani u obliku heterozida potentniji u inhibiciji infekcije izazvane rotavirusom u poređenju sa aglikonskim formama flavonoida (15). Pokazano je antivirusno i antibakterijsko dejstvo flavonoida prema virusima influence, virusu hepatitisa C i *Escherichiae coli*, pri čemu se ova delovanja dovode u vezu sa hemijskom strukturom flavonoida (11).

2.1.4. Štavelj u tradicionalnoj medicini i gastronomiji

Iako je reč o korovskoj biljci, štavelj se koristi u narodnoj medicini. Na primer, koren štavelja se primenjuje kao tonik i laksativ, a poznato je i blagotvorno delovanje kod bilijarnih poremećaja (5, 6). Takođe, štavelj se upotrebljava za lečenje kožnih i polnih bolesti, gljivičnih infekcija, i kod ublažavanja reumatskih bolova. Poznat je i kao „čistač krvi” u turskoj narodnoj medicini (5, 7, 8).

Plod se koristi protiv dijareje, dok su listovi delotvorni kod anemije jer sadrže vitamine A i C, a od minerala dosta gvožđa i fosfora. Zbog većih količina tanina i oksalne kiseline, listovi se koriste za bolje varenje i protiv hemoroida. Koren deluje kao laksativ, dok semenke imaju suprotno dejstvo i mogu da izazovu zatvor (5, 7, 9, 41).

Mladi listovi i izdanci su jestivi, kiselkastog ukusa i od davnina koriste se kao salata, kao i za pripremu variva, pita i čorbi (5, 8, 9, 52). Preterana upotreba štavelja nije preporučljiva zbog velikog sadržaja oksalne kiseline i njenih soli (5, 9). Naime, konzumacija mladih listova u većoj količini može izazvati slabija ili jača trovanja, koja su posledica toksičnog delovanja oksalne kiseline i njenih soli na organizam. Među patološkim efektima oksalne kiseline izdvajaju se hepatična nekroza i pojava kristala oksalata u jetri i bubrezima (9, 53). Oksalati učestvuju u formiranju renalnih kalkulusa, i deluju citotoksično na renalni epitel (54, 55).

2.1.5. Lekovita svojstva štavelja

Dosadašnja ispitivanja pokazala su da ekstrakti lista, korena i semena *Rumex crispus* imaju značajne farmakološko-biološke aktivnosti. Ekstrakti lista štavelja pokazali su: antioksidantnu, antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost (17, 20). Ekstrakti korena pokazali su: antimalaričnu, antimikotičnu, antioksidantnu i citotoksičnu aktivnost (19, 20, 41, 46, 47). Ekstrakt štavelja snižava glikemiju kod dijabetesa pacova izazvanog aloksanom (56). Ekstrakti semena štavelja pokazali su: antioksidantnu, antimikrobnu i antiinflamatornu aktivnost (8, 17, 57). Pregledom dostupne literature utvrđeno je da ekstrakt semena štavelja može da neutrališe reaktivne kiseonične vrste, koje oksidativnim stresom izazivaju pojavu mnogih bolesti (8, 58, 59, 60).

Zahvaljujući svom adstringentnom svojstvu, koristi se u lečenju hemoroida, krvarenja i dizenterije. Koren ove biljke koristi se kao laksativ, jer sadrži derivate antrahinona: 1,5-dihidroksi-3-metil antrahinon, 1,3,5-trihidroksi-6-hidroksimetil antrahinon i 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metil antrahinon (5, 26, 41). Flavonoidi koje sadrži *R. crispus* predstavljaju jedinjenja od interesa za dalje istraživanje potencijalnog hepatoprotektivnog i antikancerogenog dejstva ove biljke (20).

Ekstrakt korena *R. crispus* pokazuje snažnu *in vivo* antifungalnu aktivnost protiv gljivica na drugim biljnim vrstama, smanjujući razvoj bolesti, istom efikasnošću kao i sintetski fungicidi (46). Identifikovane su tri supstance kojima se pripisuje antifungalna aktivnost ekstrakta korena štavolja: nepodin, parietin i hrizofanol (47). Nepodin pokazuje snažnu antimalaričnu i antioksidantnu aktivnost, ali veoma slabo antitumorsko dejstvo prema humanim tumorskim ćelijskim linijama. Hrizofanol i parietin ispoljavaju i antitumorsku, antioksidantnu, antimutagenu, topomeraza II inhibitornu aktivnost, kao i *in vitro* antivirusno dejstvo protiv poliovirusa (41, 47).

Antimalarična aktivnost štavolja potiče od izolovane aktivne komponente nepodin. Nepodin je visoko efikasan protiv *Plasmodium falciparum* (i grupe *P. falciparum* koji je osetljiv na hlorokin i grupe *P. falciparum* koji je rezistentan na hlorokin). Nepodin pokazuje visoku selektivnost prema zdravom tkivu, uništavajući u značajno većem procentu *P. falciparum*. U istraživanju je pokazano da nakon tretmana ekstraktom *R. crispus*, dolazi do produžavanja vremena preživljavanja kod životinja obolelih od malarije i do inhibicije parazitemije (41).

Antibakterijska svojstva štavolja dobro su poznata i dokumentovana su brojnim istraživanjima. Potvrđeno je da etarski ekstrakt lista i semena štavolja, kao i etanolni ekstrakt lista štavolja, imaju antimikrobnu aktivnost na *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, dok vodeni ekstrakt nije pokazao antimikrobno dejstvo na ispitivane mikroorganizme (17).

Shiwani i saradnici (19) su u svojoj studiji ispitivali inhibiciju karbohidraze i protektivno dejstvo metanolnog ekstrakta korena štavolja na DNK i proteine. Metanolni ekstrakt korena štavolja pokazao je značajno visoku stopu inhibicije ćelijskog rasta tumora HT-29. Pored toga, pomenuti ekstrakt je značajno inhibirao α -glukozidazu i amilazu (19). Metanolni ekstrakt herbe i korena štavolja ispoljava visok stepen inhibicije ksantin oksidaze (16).

Etanolni ekstrakt korena, lista i ploda štavolja pokazao je dozno zavisnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama 1301, EOL-1 i H-9 putem apoptoze (20). Hidrosolubilne

komponente ekstrahirane iz korena štavolja ispoljile su aktivnost kod humanog kolorektalnog adenokarcinoma, pri čemu je mehanizam ćelijske smrti apoptoza (61).

2.2. Antioksidantno delovanje

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) dovode do oksidativnih oštećenja bioaktivnih molekula, odnosno do oksidativnog stresa. Oksidativni stres je označen kao etiološki faktor mnogih bolesti. S druge strane, antioksidanti imaju sposobnost da neutrališu ROS i spreče ili umanje štetna dejstva nastala u procesu oksidativnog stresa. Na ovaj način antioksidantni sistem doprinosi prevenciji malignih i kardiovaskularnih bolesti, ali i mnogih drugih patoloških stanja, u kojima ROS igra ključnu ulogu.

2.2.1. Reaktivne kiseonične vrste

Respiratorni lanac predstavlja niz reakcija u kojima se kiseonik, kao krajnji akceptor elektrona, najvećim delom potpuno redukuje do vode. Ovim procesom aerobni organizmi obezbeđuju energiju potrebnu za metabolizam (62, 63). Međutim, zbog nedovoljne biološke savršenosti, metabolički procesi, koji se kontinuirano odvijaju u ćelijama, odnosno u mitohondrijama i peroksizomima, praćeni su stvaranjem nusprodukata - proizvoda delimične redukcije molekulskog kiseonika koji su veoma štetni za ćelije (62). U elektron transportnom lancu mitohondrija, svega 2-3% molekulskog kiseonika ne redukuje se u potpunosti, pa nastali međuproizvodi: superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal (OH^{\bullet}), i drugi, predstavljaju reaktivne kiseonične vrste (*Reactive Oxygen Species* - ROS). Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) i hidroksil radikal (OH^{\bullet}) su istovremeno i slobodni radikali, budući da imaju nesparene elektrone, pa su veoma nestabilni i reaktivni (62, 63). Slobodni radikali mogu biti donori ili akceptori elektrona drugih biomolekula, čime narušavaju integritet i funkcije važnih makromolekula (lipida, proteina i nukleinskih kiselina). Na taj način ove reaktivne vrste postaju uzročnici oksidativnog stresa koji, protokom vremena, doprinosi starenju organizma i javlja se kao etiološki faktor mnogih bolesti (62, 64).

Postojanje dva nesparena elektrona sa paralelnim spinom i mogućnost vezivanja samo za strukture koje imaju elektrone sa antiparalelnim spinom, što je veoma retka pojava, čini molekul

kiseonika (O_2) slabo reaktivnim, a njegova toksičnost potiče od prooksidantnog delovanja ROS. Postepenom redukcijom kiseonika nastaju reaktivniji oblici, čime se povećava verovatnoća njegovog stupanja u reakcije sa biološkim molekulima (62, 63).

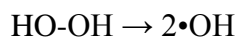
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$, nastaje na dva načina:

1. jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika,
2. jednoelektronskom oksidacijom vodonik-peroksida.

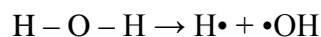
Superoksid anjon radikal $O_2^{\bullet-}$ ima visoku oksidativnu aktivnost, indukujući lipidnu peroksidaciju i time oštećujući ćelijske membrane. U fiziološkim uslovima, enzim superoksid-dismutaza (SOD) ograničava štetno dejstvo superoksid anjon radikala, prevodeći ga u manje reaktivan vodonik-peroksid (65, 66).

Vodonik-peroksid se svrstava u reaktivne vrste kiseonika, ali nije radikal, obzirom da nema nesparenih elektrona. Iako je najstabilniji i najmanje reaktivan intermedijer u procesu redukcije kiseonika, H_2O_2 ima sposobnost da oksidiše intracelularne makromolekule, jer mu ćelijska membrana ne predstavlja barijeru, a takođe može i da inaktivira enzime oksidujućim tiolne grupe (62, 66, 67). Vodonik-peroksid ima relativno dug vek trajanja (oko 1 ms), za razliku od ostalih reaktivnih kiseoničnih vrsta, čije trajanje iznosi nekoliko mikrosekundi (2-4 μ s) (62). Nastaje dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika uz prisustvo protona, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom dismutacijom, dejstvom superoksid-dismutaze. Proces stvaranja vodonik-peroksida odvija se u peroksidomima, mitohondrijama, mikrozomima i ćelijskoj membrani, u različitim biohemijskim procesima. Vodonik-peroksid lako stupa u reakciju sa metalima, npr. Fe^{2+} , pri čemu nastaju najreaktivnije toksične kiseonične vrste – hidroksil radikali Fenton-ovom reakcijom (66, 68).

Hidroksil radikal je najreaktivniji oblik delimično redukovano g kiseonika, koji nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika u toku ćelijskog metabolizma, i najodgovorniji je za toksične efekte kiseonika prema ćelijama. Takođe, hidroksil radikal može da nastane homolitičkim raskidanjem kovalentne veze između kiseonika.



Pored toga, γ -zračenjem dolazi do raskidanja jedne kovalentne veze vodonik-kiseonik u molekulu vode i formiranja dva radikala: vodonik radikala ($H\bullet$) i hidroksil radikala ($\bullet OH$).



Hidroksil radikal lako stupa u reakcije sa biomolekulima kao što su nukleinske kiseline, proteini, lipidi, ili bilo kojim drugim konstituentom ćelija, uzrokujući smrt ćelije (62, 66).

2.2.2. Oksidativni stres

Reaktivni metaboliti kiseonika se stvaraju kao sporedni proizvodi metabolizma ćelija (69). Pokazano je da veće koncentracije molekulskog kiseonika mogu delovati štetno na ćelije. Potencijalno toksično dejstvo molekulskog kiseonika potiče od nastalih kiseoničnih radikala (70). Utvrđeno je da u ćelijama postoji više izvora reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), među kojima su elektron transportni lanac i enzimi NADPH oksidaze najodgovorniji za njihov nastanak (14, 71, 72). Mitohondrije predstavljaju ćelijske organele u kojima je metabolizam najintenzivniji, pa je, stoga, u njima i produkcija ROS značajna (13, 73).

Brojne studije su pokazale da reaktivne kiseonične vrste, kada su prisutne u niskim koncentracijama, učestvuju u fiziološkim procesima: ćelijskoj proliferaciji, migraciji i apoptozi (14, 71). Slobodni radikali imaju važnu ulogu u mehanizmu enzimske katalize, fagocitoze i biosinteze prostaglandina (65, 74). Pored toga, ROS su neophodne i za adekvatan odgovor imunskog sistema, održavanje vaskularnog tonusa i u međućelijskoj komunikaciji (13).

Prekomerna produkcija reaktivnih metabolita kiseonika dovodi do oksidativnih oštećenja biomolekula (ugljeni hidrati, nukleinske kiseline, proteini i lipidi) i narušavanja njihove funkcije (14, 71, 73, 75). S druge strane, razvijen je antioksidantni sistem, koji ima zadatak da neutrališe, odnosno „hvata” reaktivne kiseonične vrste, i na taj način spreči, odloži ili umanjiti oksidativna oštećenja bioaktivnih jedinjenja i održi koncentraciju ROS unutar uskih, fizioloških granica (13, 71).

Narušavanje ravnoteže između antioksidanata i oksidanata, dovodi do oksidativnog stresa. Oksidativni stres se definiše kao stanje u kome produkcija i nagomilavanje reaktivnih metabolita kiseonika prevazilazi kapacitet antioksidantnog sistema ćelija (71, 73, 76, 77). Različiti endogeni (proces respiracije, aktivnost fagocita, inflamacija, autooksidacija biomolekula) i egzogeni (jonizujuće i UV-zračenje, kontaminirani vazduh, dim cigareta, alkohol,

pojedini lekovi i toksini, prekomerna fizička aktivnost, stres) faktori mogu indukovati hiperprodukciju reaktivnih kiseoničnih/azotnih vrsta ili smanjenje antioksidantne zaštite organizma (64, 78). Oksidativna oštećenja komponenta ćelije i njenog genetskog materijala nastaju kod prekomernog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta ili kod nedovoljno efikasne antioksidantne odbrane tkiva (75).

Ispitujući uloge oksida azota kao neurotransmitera i glasnika u ćeliji, otkriveno je postojanje nitrozativnog stresa, kao vrste oksidativnog stresa (79).

2.2.3. Azot-monoksid (NO), reaktivne azotne vrste i nitrozativni stres

Nekoliko različitih tipova ćelija, uključujući makrofage i endotelne ćelije, sintetišu azot(II)-oksid (azot-monoksid, NO) (15).

L-arginin predstavlja najvažniji prekursor za sintezu azot(II)-oksida pod dejstvom enzima azot(II)-oksid sintaze. Za produkciju NO iz L-arginina potrebno je prisustvo različitih kofaktora: tetrahidrobiopterina (BH₄), flavin adenin dinukleotida (FAD), flavin mononukleotida (FMN), kalmodulina i gvožđe protoporfirina IX (hem).

Enzim azot(II)-oksid sintaza se javlja u tri izoforme:

- neuronska NOS (nNOS ili NOS-1),
- inducibilna NOS (iNOS ili NOS-2), i
- endotelna NOS (eNOS ili NOS-3) (80, 81).

Iako sve pomenute izoforme enzima NOS katalizuju istu reakciju, međusobno se razlikuju u strukturi, distribuciji, regulaciji i kapacitetu za sintezu NO. Tako, inducibilna izoforma enzima NOS svoje dejstvo ispoljava u makrofagima, hepatocitima i plućnom epitelu, dok je endotelna NOS karakteristična za ćelije endotela krvnih sudova. Neuronska NO-sintaza fiziološki je prisutna u centralnom i perifernom nervnom sistemu (80, 81).

Neuronska i endotelna NOS predstavljaju konstitutivne kalcijum-zavisne enzime. Nasuprot njima, aktivnost inducibilne izoforme enzima azot(II)-oksid sintaze kontrolisana je drugim bioaktivnim molekulama (81).

Pod uticajem neuronske NOS produkuje se azot(II)-oksid u nervnom sistemu. Na taj način stvoren NO igra ključnu ulogu u međućelijskoj komunikaciji kao sekundarni glasnik. Pored toga, NO učestvuje u fiziološkom procesu regulacije ekscitabilnosti neurona, kao i u

procesima vezanim za učenje i pamćenje. Azot(II)-oksid sintetisan od strane nNOS odgovoran je i za kontrolisanje oslobađanja neurotransmitera: acetil-holina, serotonina i histamina (80).

Azot-monoksid se generiše u ćelijama endotela krvnih sudova posredstvom enzima eNOS. Aktivacija endotelne NOS vrši se vezivanjem acetilholina, histamina i bradikinina za odgovarajuće receptore na membranama endotelnih ćelija. Međutim, NO može nastati i mehanizmima koji su nezavisni od enzima eNOS: iz S-nitrozotiola ili iz nitrita i nitrata. Oslobođen iz endotela, NO ima fiziološku ulogu u regulaciji dijametra krvnih sudova i predstavlja potentni vazodilatator (80).

Uticaj na tonus vaskularnog zida, NO ostvaruje putem sledeća tri mehanizma:

1. Azot-monoksid stimuliše solubilnu guanilil ciklazu (sGC), koja tada dovodi do produkcije cikličnog guanozin monofosfata (cGMP). Ciklični GMP dalje aktivira protein kinazu G (PKG). Rezultat celokupnog procesa je smanjenje intracelularne koncentracije jona kalcijuma (Ca^{2+}) i sledstvena relaksacija glatke muskulature krvnih sudova.
2. U uslovima hipoksije, solubilna guanilil ciklaza proizvodi ciklični inozin 3',5'-monofosfat (cIMP) umesto cGMP. Na kraju ovog procesa dolazi do vazokonstrukcije.
3. Azot-monoksid može reagovati sa tiolnim grupama cisteina i na taj način formirati S-nitrozilovane proteine. S-nitrozilacijom proteina povećava se aktivnost kalcijum-ATPaze sarkoplazmatskog retikuluma i smanjuje se intracelularna koncentracija Ca^{2+} . Ovaj mehanizam je nezavisan od aktivacije solubilne GC i dovodi do vazodilatacije usled relaksacije mišića krvnih sudova (80).

Stanja smanjene sinteze ili bioraspoloživosti azot-monoksida, povećane razgradnje NO, ili odsustva fiziološkog regulatornog mehanizma azot-monoksida karakteristična su za bolesti kardiovaskularnog sistema: hipertenziju, aterosklerozu i poremećaje angiogeneze (80).

Ekspresija gena za iNOS minimalna je u fiziološkim uslovima. Međutim, tokom infekcije, hronične inflamacije i malignih bolesti dolazi do stimulacije ove izoforme enzima NOS. Produkcija iNOS u endotelnim ćelijama tokom inflamacije rezultuje vaskularnom disfunkcijom. Ovim se objašnjava pojava hipotenzije, kardiodepresije i vaskularne hiporeaktivnosti u septičkom šoku (80).

Azot-monoksid je ključna signalna molekula, koja ima važnu ulogu u inflamaciji i regulaciji aktivnosti neutrofila. Neutrofilni imaju fagocitnu aktivnost. Molekule NO svoju zaštitnu

funkciju ispoljavaju sprečavanjem oštećenja endotelnih ćelija od strane aktiviranih neutrofila (82).

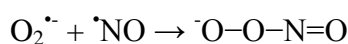
U makrofagima se metabolizam arginina odvija posredstvom dva enzima: inducibilne azot(II)-oksid sintaze (iNOS) i arginaze. L-arginin predstavlja supstrat za oba pomenuta enzima (81).

Kao sporedni proizvod metabolizma arginina pod uticajem enzima iNOS javlja se molekula citrulina. S druge strane, enzim arginaza katalizuje metabolisanje arginina u pravcu nastajanja ornitina i uree. Metabolički put u kome posreduje enzim arginaza ograničava raspoloživost arginina za enzim NOS. Iz ovoga proizilazi da su nedovoljna količina dostupnog arginina i usmeravanje metabolizma arginina ka sintezi ornitina i uree limitirajući faktori za nastanak NO (81).

Bioaktivna jedinjenja označena kao lipopolisaharid (LPS) i interferon γ (IFN- γ) vrše stimulaciju makrofaga. Aktivirani makrofagi sintetišu nitrite i nitrate, iz zajedničke prekursorske molekule arginina. Pokazano je da azot(II)-oksid predstavlja međuproizvod u procesu oksidacije arginina, dok su krajnji proizvodi ovih reakcija nitriti i nitrati. Enzim NOS katalizuje konverziju arginina u NO_2^- i NO_3^- , i neophodan je za ispoljavanje citotoksične aktivnosti makrofaga u infekcijama i malignim bolestima (81).

Mnogi proinflamatorni citokini (na primer interleukin 1β - IL- 1β , interferon γ - IFN- γ i faktor nekroze tumora α - TNF- α), produkti mikroorganizama i hipoksija mogu indukovati iNOS u makrofagima. S druge strane, citokini interleukin 4 - IL-4, interleukin 10 - IL-10 i faktor rasta tumora β - TGF- β vrše supresiju gena za sintezu iNOS (81). S tim u vezi, sinteza NO je uslovljena kako raspoloživosti arginina, tako i ekspresijom gena za iNOS (81, 83).

Izoforme enzima NOS nastaju kao monomerske jedinice. Za ispoljavanje njihove enzimske aktivnosti pri generisanju NO i vezivanje sa BH_4 , potrebno je da se formiraju dimeri ovog enzima. U odsustvu arginina, sve izoforme enzima NOS u obliku monomera dovode do sinteze superoksid anjon radikala umesto azot-monoksida (80, 81). Generisan superoksid anjon radikal može dalje stupiti u reakciju sa NO i nagraditi peroksinitrite:

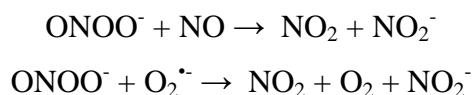


(15, 80, 81, 84). Ova reakcija se odvija brzo, a konstanta brzine iznosi $k=7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (84).

Azot-monoksid ostvaruje svoje biološke aktivnosti ne samo preko cGMP-zavisnih mehanizama, već i preko svojih sekundarnih redoks derivata: peroksinitrita (ONOO^-) i S-nitrozoglutaciona (GSNO) (85). Peroksinitriti su endogene reaktivne vrste, koje imaju značajnu ulogu u fiziološkim i patološkim procesima (86). Peroksinitriti mogu uzrokovati oksidativna oštećenja različitih biomolekula i dovesti do patoloških posledica (84). Novija istraživanja sugerišu da peroksinitriti, stupajući u reakciju sa nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima, učestvuju u patogenezi reumatoidnog artritisa, septičkog šoka, multiple skleroze, ateroskleroze, Alchajmerove bolesti, kardiovaskularnih bolesti, inflamacije i osteoporoze (86). Peroksinitriti imaju sposobnost da oštete lipoproteinske čestice male gustine (LDL) (15, 81).

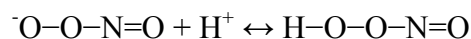
Peroksinitriti su potentni oksidativni i nitrozni agensi. Procesom ireverzibilne modifikacije tirozina (3-nitrotirozin), ONOO^- su uključeni u različite patološke puteve. S druge strane, reverzibilnim promenama tiolnih grupa proteina - S-nitrozilacijom, GSNO učestvuje u fiziološkom metabolizmu ćelije. S-nitrozoglutacion je označen kao inhibitor aktivacije trombocita i modulator inflamacije (85). Imajući u vidu dve vrste metabolita azot-monoksida, smatra se da NO ima dvojaku ulogu u regulaciji endotelne barijere: kao protektivni i kao štetni agens. Stoga je održavanje ravnoteže između metabolita azot-monoksida od izuzetne važnosti (85).

Povećane koncentracije superoksid anjon radikala i azot-monoksida smanjuju toksičnost peroksinitrita (63).



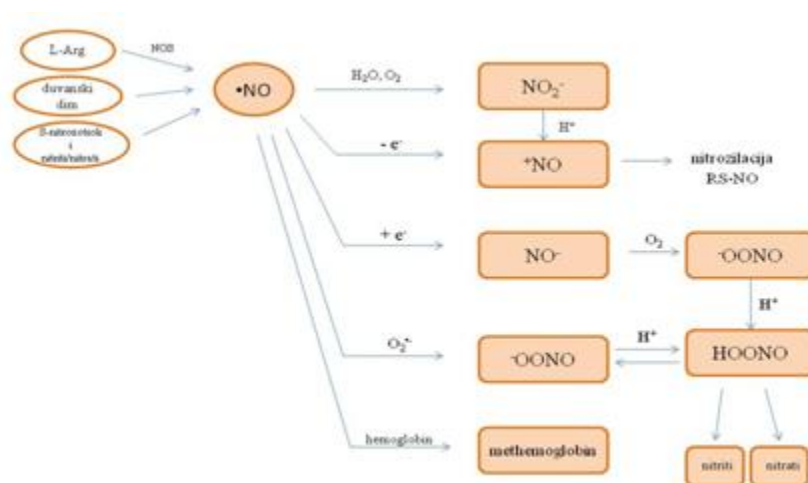
Stepen produkcije superoksid anjon radikala utiče na efekte azot-monoksida, i obrnuto. Superoksid anjon radikali mogu smanjiti efekte azot(II)-oksida, formirajući toksične peroksinitrite. S tim u vezi, „hvatači“ superoksid anjon radikala kao što su SOD i tioli mogu pojačati biološku aktivnost NO i sprečiti nastajanje toksičnih peroksinitrita. Slično, NO može imati ulogu antioksidanta, ograničavajući efekte superoksid anjon radikala (84).

Peroksinitritna kiselina (ONOOH) predstavlja protonovanu formu peroksinitrita (Slika 2.10.) (87). Peroksinitriti se nalaze u stalnoj ravnoteži sa peroksinitritnom kiselinom (84).



Pomenuta kiselina je izvor biološki aktivnih hidroksil radikala (84). Naime, ova kiselina ima sposobnost penetracije u fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane, gde podleže homolitičkom razlaganju. Homolitičkim raskidanjem veze nastaju azot-dioksid (NO_2) i hidroksil radikal ($\text{OH}\cdot$). Dalje, hidroksil radikali mogu uzrokovati oksidativna oštećenja bioaktivnih jedinjenja (87).

Azot(II)-oksid se nalazi u visokoj koncentraciji u duvanskom dimu. Pored toga, duvanski dim može inicirati proces lipidne peroksidacije i stvaranje lipid peroksi radikala. Lipid peroksi radikali mogu reagovati sa NO pri čemu se inhibira propagacija lipidne peroksidacije (84).



Slika 2.10. Reakcije azot-monoksida (84).

Međutim, i sam NO predstavlja slobodan radikal, sa veoma kratkim poluživotom (3-5 s) (15, 80, 81). Azot-monoksid može reagovati sa drugim molekulama. Ukoliko NO izreaguje sa kiseonikom ili nekom od reaktivnih kiseoničnih vrsta stvaraju se reaktivne azotne vrste (*reactive nitrogen species, RNS*):

- azot(III)-oksid (N_2O_3),
- peroksinitriti ($\text{ONOO}\cdot$),
- nitronijum jon (NO_2^+) (81).

Pored toga, neregulisana produkcija azot(II)-oksida može uzrokovati nitrozni stres, dovodeći do oksidativnih oštećenja proteina, lipida i nukleinskih kiselina (81, 88).

2.2.4. Oksidativna oštećenja osnovnih biomolekula

Ukoliko reaktivni metaboliti kiseonika nastanu u većoj količini od one koja može da se kontroliše, oni tada oštećuju ćelijske komponente stupajući u reakcije sa molekulama DNK, proteina i nezasićenih lipida. Ukoliko su nastala oštećenja letalna, dolazi do apoptoze ili nekroze (63, 65).

2.2.4.1. Oksidativno oštećenje proteina

Oksidativno oštećenje proteina predstavlja stvaranje kovalentne modifikacije proteina uzrokovanog interakcijom sa reaktivnim kiseoničnim vrstama ili sporednim produktima oksidativnog stresa. Promene na aminokiselinskim ostacima, koje tom prilikom nastaju, u većini slučajeva su ireverzibilne, i dovode do trajnog narušavanja ili gubljenja fizioloških funkcija proteina (62).

Na post-translacionom nivou, ROS mogu oksidovati različite aminokiseline. Ova oksidativna oštećenja vode strukturnim i konformacionim promenama tercijarne strukture proteina, koje mogu uzrokovati i degradaciju proteina (71).

Aminokiseline kao što su arginin, histidin, lizin, prolin, triptofan, najpodložnije su napadu slobodnih radikala. Cistein je takođe česta meta hidroksil radikala, pri čemu se formira disulfidni most između dva molekula ove aminokiseline. Dejstvom ROS na metionin gradi se metionin sulfoksidni derivat (62). Direktna karbonilacija aminokiselina, nastala oksidativnim napadom ROS, može indukovati inaktivaciju enzima (71).

Proteini mogu biti oštećeni i u reakciji sa proizvodima lipidne peroksidacije, kao što su 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) i malonildialdehid (MDA). U fiziološkim uslovima malonildialdehid (MDA), kao razgradni proizvod lipidne peroksidacije, nalazi se u obliku enolatnog jona, koji interreaguje sa proteinima, naročito pokazujući afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Malonatna kiselina, kao metabolit MDA, kompetitivni je inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze (62).

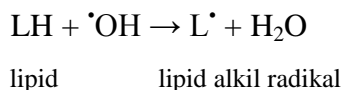
2.2.4.2. Oksidativno oštećenje lipida – lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija predstavlja oksidativno oštećenje različitih biomolekula koji sadrže lipide i jedan je od najštetnijih efekata oksidativnog stresa, odnosno slobodno-radikalnih oštećenja (62). Lipidi ćelijskih i unutarćelijskih membrana (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol), ali i lipoproteini, predstavljaju ciljne molekule za oksidativni napad, uzrokujući narušavanje membranske strukture čime se smanjuje fluidnost ćelijske membrane. Kako se peroksidacijom lipida menja afinitet i interakcija proteina sa lipidima, dolazi do remećenja velikog broja funkcija membranskih proteina (transporteri, enzimi, receptori) (62).

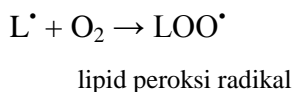
Zasićene masne kiseline i nezasićene masne kiseline sa jednom ili dve dvostruke veze, koje ulaze u sastav membranskih lipida, otpornije su na oksidativno oštećenje, od višestruko nezasićenih masnih kiselina. Tako je arahidonska kiselina, sa najvećim brojem dvostrukih veza, najpodložnija lipidnoj peroksidaciji (62).

Proces lipidne peroksidacije iniciran je reaktivnim kiseoničnim vrstama, najčešće hidroksil radikalom, iako su i superoksid anjon radikal i vodonik-peroksid takođe sposobni da otpočnu lipidnu destrukciju. Lipidna peroksidacija započinje oduzimanjem atoma vodonika iz alilne veze polinezasićene masne kiseline iz membranskog fosfolipidnog dvosloja. Na taj način lipidna molekula postaje alkil radikal, i budući da je veoma nestabilna i visoko reaktivna, nastavlja reakciju (62).

Jednom započetu reakciju inicijacije

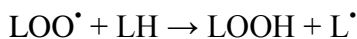


prati niz lančanih reakcija propagacije, tokom koje alkil radikal stupa u reakciju sa molekulskim kiseonikom gradeći lipid peroksil radikal (LOO•).



Lipid peroksil radikal dalje reaguje:

1. sa susednim lipidnim molekulom rezultujući formiranjem lipidnog hidroperoksida (LOOH) i novog alkil radikala, koji nastavlja propagaciju peroksidacije lipida, ili

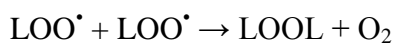
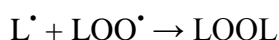


lipidni hidroperoksid

2. transformiše se u ciklične perokside i ciklične endoperokside, i dalje u izrazito toksična jedinjenja. Tokom propagacije nastali lipidni hidroperoksid LOOH u prisustvu Fe^{2+} disosuje na LO^\bullet i LOO^\bullet , koji reiniciraju peroksidaciju i dovode do nakupljanja kratkolančanih razgradnih produkata peroksidacije (lipidnih alkoksil radikala, malonildialdehida (MDA), ugljovodonika, lipidnih epoksida) (62).

Malonildialdehid (MDA), koji se stvara u malim količinama kao rezultat lipidne destrukcije usled interakcije sa ROS, pokazatelj je peroksidacije, odnosno predstavlja biomarker prilikom procene stepena oksidativnog stresa (62).

Lančane reakcije lipidne peroksidacije mogu biti prekinute ako se ugljenični ili peroksi radikali međusobno povežu i nagrade konjugovane proizvode koji nisu radikali (dimeri) (66).



2.2.4.3. Oksidativno oštećenje DNK

Koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta može se toliko povećati da se prevaziđe kapacitet antioksidantnih zaštitnih mehanizama, te dolazi do oksidativnih oštećenja većine biomolekula, uključujući DNK. Promene strukture molekula DNK dovode do mutacija, koje mogu da rezultuju malignom transformacijom ćelije ukoliko zahvate specifične protoonkogene (63).

U većini slučajeva hidroksil radikal je najodgovorniji za oštećenja strukture DNK, pri čemu dolazi do prekida lanca DNK, izmena, gubitka ili modifikacije baza, stvaranja pirimidin

dimera ili oksidativnog oštećenja deoksiriboze (62). Mutacije uzrokovane hidroksil radikalom uglavnom su povezane sa modifikacijom GC baznog para, dok AT bazni par ređe vodi mutaciji (89). Guanin u DNK je, takođe, ciljno mesto napada i malonildialdehida, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, što može dovesti do mutagenih oštećenja (62). Međutim, pored velikog broja oštećenja koja se pod dejstvom slobodnih radikala mogu dešavati na DNK, zahvaljujući reparacionim mehanizmima, kojima se smanjuje štetan efekat, ćelija u većini slučajeva uspeva da opstane i održi svoje funkcije. Izmene na molekuli DNK moguće je ukloniti isecanjem baza ili drugim mehanizmima popravke (63, 90).

2.3. Maligna transformacija ćelije

Oksidativni stres uzrokuje pojavu mnogih patoloških stanja (13, 75, 91, 92). Veliki broj studija dovodi oksidativni stres u vezu sa nastankom malignih bolesti. Pokazano je da reaktivne kiseonične vrste predstavljaju etiološki faktor karcinogeneze.

Sa molekularnog aspekta, karcinogeneza predstavlja proces nastanka malignih bolesti. Osnova malignih bolesti je postojanje maligno transformisane ćelije (93). Smatra se da maligno tkivo potiče od jedinstvenog klona kancerske stem ćelije, odnosno genetski izmenjene ćelije sa visokom proliferativnom moći (94, 95). Maligne bolesti karakteriše neravnoteža između proliferacije ćelija i apoptoze (96, 97).

Za malignu transformaciju ćelija i posledični razvoj neoplazmi, odgovorne su četiri vrste gena:

1. onkogeni – neadekvatno aktivirani normalni celularni geni (protoonkogeni), koji su uključeni u kontrolu procesa ćelijske deobe, rasta i diferencijacije ćelije;
2. tumor supresorni geni – zaustavljaju rast neoplastične ćelije ili podstiču ćelijsku smrt;
3. geni koji kontrolišu apoptozu – poremećaj ravnoteže između gena inhibitora i gena stimulatora apoptoze dovodi do izostanka programirane ćelijske smrti, čime je omogućeno preživljavanje i proliferacija maligno transformisanih ćelija;
4. geni koji imaju sposobnost reparacije oštećenja nastalih na nivou molekula DNK (93).

Morfološki, maligno transformisane ćelije se karakterišu velikim jedrom, nepravilnim oblikom i veličinom, prominentnim jedarcima, oskudnom citoplazmom koja se različito boji.

Povećan je broj atipičnih mitozâ, koje rezultuju nastankom asimetričnih struktura i abnormalnih formi hromozoma. Jedan od najvažnijih pokazatelja malignosti ćelija je gubitak diferencijacije. Odlučujući faktor u ovom procesu predstavlja redukcija ćelijskih organela, posebno endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata. Prisutan je gubitak polariteta ćelijskih organela kao i izmenjena svojstva ćelijske membrane (98). S obzirom na to da su fosfolipidi sastavni deo ćelijske membrane koji determinišu njenu strukturu, različita biološka stanja udružena sa izmenama na fosfolipidnim komponentama učestvuju u malignoj transformaciji ćelija (99). Maligne ćelije morfološki i funkcionalno poprimaju odlike fetalnih ćelija (98). Regulacija oksido-redukcionog stanja je kritična tačka za opstanak ćelije, aktivaciju, proliferaciju i funkciju organa (92). Maligno izmenjene ćelije razvijaju izvestan stepen autonomije u procesu pokretanja proliferacije i apoptoze (100).

Razvoj maligne bolesti obuhvata tri stadijuma: inicijacija, promocija i progresija, i ROS mogu učestvovati u svim ovim fazama karcinogeneze (101-103). Reaktivne kiseonične vrste nastale aktivnošću enzima NADPH oksidaze predstavljaju glavni izvor oksidativnog stresa, koji uzrokuje inicijaciju i progresiju malignih bolesti (71).

ROS kao inicijatori karcinogeneze

Karcinogeneza je kompleksan, višestepeni proces u kojem zdrave ćelije bivaju transformisane u abnormalne kao rezultat serije mutacija i promena u obrascima genske ekspresije (101-103). Progresivna akumulacija genetskih oštećenja, nastalih kao posledica delovanja različitih endogenih i egzogenih faktora, odgovorna je za razvoj malignih bolesti (93). Predisponirajući faktori maligniteta uključuju nasleđe, faktore iz spoljašnje sredine, ishranu i starost (101, 103).

Kancerogeni agensi uzrokuju nekontrolisanu ćelijsku deobu, koja vodi nastanku malignih bolesti (104). Smith i saradnici (91) su izložili ključne karakteristike kancerogenih agenasa. Reaktivne kiseonične vrste, kao potencijalni uzročnici maligne alteracije, imaju nekoliko osobina kancerogenih agenasa:

1. genotoksičnost;
2. uzročnici su epigenetskih alteracija, nestabilnosti genetskog materijala, ili sprečavaju popravke molekule DNK;

3. induktori su oksidativnog stresa i hronične inflamacije;
4. blokatori su apoptoze i stimulatori ćelijske proliferacije (91).

Dejstvo reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta uzrokuje više od 100 različitih tipova oksidativnih oštećenja molekula DNK, pri čemu genetski materijal postaje nestabilan. Oksidativna oštećenja molekule DNK mogu dovesti do tačkastih mutacija, delecija, insercija, ili hromozomskih translokacija koje mogu aktivirati onkogene ili inhibirati tumor supresorne gene. Ove promene mogu inicirati ili promovisati karcinogenezu (14, 91). Vodonik-peroksid ima najmanji afinitet prema molekuli DNK. Najveći broj oštećenja DNK potiče od dejstva hidroksil radikala (90).

Utvrđeno je da slobodni radikali interreaguju sa molekulima DNK oštećujući azotne baze i ugljeno-hidratne komponente, stvarajući mutacije na ključnim genima koji dovode do pojave maligniteta (14, 101, 105). Permanentna modifikacija genetskog materijala, nastala dejstvom slobodnih radikala, predstavlja prvi korak u mutagenezi, karcinogenezi i starenju. Oštećenja DNK rezultuju u sprečavanju ili indukciji transkripcije, greškama u replikaciji i genomskoj nestabilnosti (101, 106).

Međutim, razvijeni su mehanizmi popravki molekula DNK unutar ćelija (97). Lezije na DNK koje ćelija ne može popraviti, indukuju apoptozu, čime ćelija obezbeđuje da neće doći do prenosa mutacije na sledeću generaciju ćelija. S druge strane, neke skrivene mutacije na DNK uspešno izbegavaju apoptozu i na taj način povećavaju šansu za nastanak maligno transformisane ćelije (90). Kada intenzitet oštećenja prevaziđe reparacioni kapacitet ćelija, nastala promena na genomu bude dovoljna da se pokrene maligna transformacija ćelije (97). ROS verovatno doprinose ireverzibilnosti karcinogeneze koja se karakteriše akumulacijom dodatnih genetskih oštećenja, dovodeći do transformacije u maligne ćelije (101).

Reakcija između metabolita kiseonika i polinezasićenih masnih kiselina može inicirati proces lipidne peroksidacije. Proizvodi lipidne peroksidacije (malonildialdehid, 2-alkenali i 4-hidroksi-2-alkenali) predstavljaju genotoksične agense. Pomenuta jedinjenja se mogu koristiti kao tumor markeri za određivanje prisustva i stepena malignih bolesti. Na primer, kod pacijenata sa kolorektalnom malignom bolesti u serumu se može detektovati povišen nivo reaktivnih supstanci nastalih od tiobarbiturne kiseline. Ovaj nalaz ukazuje na intenzivnu lipidnu peroksidaciju (90).

ROS kao promoteri karcinogeneze

Maligno transformisane ćelije karakteriše intenzivniji metabolizam, povećana aktivnost enzima ksantin oksidaze, ciklooksigenaza i lipooksigenaza, kao i mitohondrijalna disfunkcija. Ove promene dovode do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih metabolita u malignim ćelijama. Pored toga, faktori rasta i citokini stimulišu stvaranje ROS u maligno izmenjenim ćelijama. Detektovana je povišena koncentracija vodonik-peroksida i azot-monoksida kao odgovor na delovanje interferona γ i faktora nekroze tumora α (TNF α) (90). Faktor rasta tumora β 1 (TGF- β 1) predstavlja jedan od najpotentnijih citokina, koji doprinosi supresiji ćelija imunskog sistema i promovise angiogenezu i elektron transportni lanac u mitohondrijama maligno izmenjenih ćelija. Potvrđeno je da TGF- β 1 stimuliše intracelularnu produkciju ROS aktivacijom enzima NADPH oksidaze-4 (NOX-4) (71). Dalje, trombocitni faktor rasta (PDGF), epidermalni faktor rasta (EGF), insulin, interleukin-1, faktor nekroze tumora α (TNF α) i angiotenzin indukuju formiranje superoksid anjon radikala (90).

Povišene koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta u maligno transformisanim ćelijama su od velikog značaja za održavanje maligne bolesti. U malignim ćelijama većine neoplastičnih tkiva detektovan je visok nivo reaktivnih kiseoničnih metabolita, koji impliciraju malignu progresiju (71). Povišen nivo ROS u maligno izmenjenim ćelijama održava onkogenetski fenotip i vodi ka progresiji maligne bolesti (90). Reaktivne kiseonične vrste su označene kao promoteri maligniteta (13). Dejstvo reaktivnih kiseoničnih vrsta omogućuje maligno izmenjenim ćelijama:

1. nekontrolisani rast i proliferaciju,
2. angiogenezu,
3. intenzivan metabolizam,
4. metaboličke adaptacije na nove uslove,
5. izbegavanje citotoksičnog delovanja makrofaga i drugih ćelija imunog sistema,
6. sprečavanje apoptoze i ćelijsko preživljavanje, i
7. stvaranje metastaza (90, 107).

Stoga, reaktivne kiseonične vrste imaju krucijalnu ulogu u različitim signalnim putevima koje se odnose na proliferaciju malignih ćelija, rezistenciju na apoptozu, neovaskularizaciju, invaziju, migraciju i rast ćelija na udaljenim metastatskim mestima (71).

Reaktivne kiseonične vrste imaju sposobnost modifikacije brojnih ćelijskih signalnih puteva. Ovo postižu izmenama molekule DNK na mestima za vezivanje redoks-osetljivih transkripcionih faktora ili oksidacijom cisteinskih rezidua ovih molekula. U transkripcione faktore se ubrajaju:

- hipoksijom inducibilni faktor-1 alfa – HIF-1 α ,
- NF κ B,
- aktivator protein-1 – AP-1, i
- p53 (71).

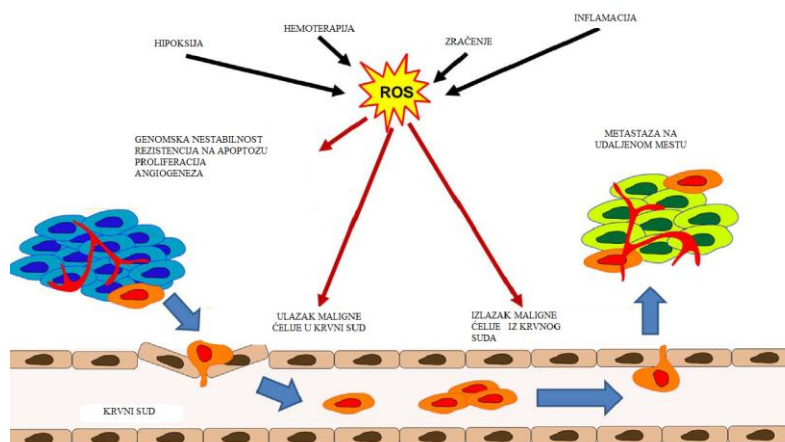
Redoks-osetljivi transkripcioni faktor protein p53 uključen je u brojne ćelijske procese, kao što su starenje i apoptoza. Pri povišenoj koncentraciji ROS, p53 ima važnu ulogu u sprečavanju propagacije oštećenja molekule DNK. U maligno izmenjenim ćelijama su česte mutacije na genu TP53, koji kodira protein p53 (71).

Maligno tkivo ima povećane potrebe za nutritijentima i kiseonikom, usled intenzivnog rasta. Međutim, dešava se da maligno transformisano tkivo bude izloženo hipoksiji zbog nedovoljnog priliva kiseonika. Da bi se održao proliferativni trend u hipoksičnim uslovima, maligno transformisane ćelije su razvile adaptacione mehanizme: mutacija pomenutog gena TP53 i aktivacija hipoksijom inducibilnog faktora-1 (HIF-1). Dalje, ovi mehanizmi, kojim se ćelije prilagođavaju na uslove sniženog priliva kiseonika i glukoze, vode ka angiogenezi i izmenama u transportu glukoze i glikolizi. Pored toga, hipoksični uslovi doprinose formiranju ROS. Naime, dolazi do oslobađanja superoksid anjon radikala, vodonik-peroksida i hidroksil radikala iz elektron transportnog lanca mitohondrija. Dodatno, ROS ima sposobnost da stabilizuje hipoksijom inducibilni faktor-1, čime se dalje vrši proces neovaskularizacije malignog tkiva (14, 71, 90).

U hipoksičnim uslovima metabolizam maligne ćelije uglavnom je usmeren ka glikolizi (Varburgov fenomen). Iz tog razloga, u malignom tkivu se stvaraju velike količine laktata, koji mogu da indukuju enzim arginazu I. Preusmeravanjem metabolizma L-arginina ka enzimu arginazi, smanjuje se produkcija azot-monoksida. S obzirom da je sinteza dovoljne količine NO odgovorna za citotoksično delovanje makrofaga, stimulacija enzima arginaze dovodi do favorizovanja rasta malignog tkiva (81, 90).

Neovaskularizacijom malignog tkiva olakšava se diseminacija maligno izmenjenih ćelija i stvaranje metastaza. Reaktivne kiseonične vrste mogu aktivirati nekoliko puteva koji su

uključeni u proces metastaziranja. Na primer, ROS može stimulisati metaloproteinaze matriksa, te dolazi do degradacije bazalne membrane. Prelaskom bazalne membrane, maligne ćelije lako migriraju u krvne sudove i formiraju metastaze na udaljenim mestima (71) (Slika 2.11.).



Slika 2.11. Izvori reaktivnih kiseoničnih vrsta, efekti ROS i posledično formiranje metastaza (71).

Vodonik-peroksid se može posmatrati kao sekundarni glasnik i učestvovati u međucelijskoj komunikaciji u malignom tkivu. Pored toga, H_2O_2 reguliše aktivnost sledećih proteina: tirozin fosfataza, tirozin kinaza, receptora tirozin kinaza i faktora transkripcije. Takođe, niske doze vodonik-peroksida i superoksid anjon radikala stimulišu proliferaciju ćelija u različitim malignim bolestima (90).

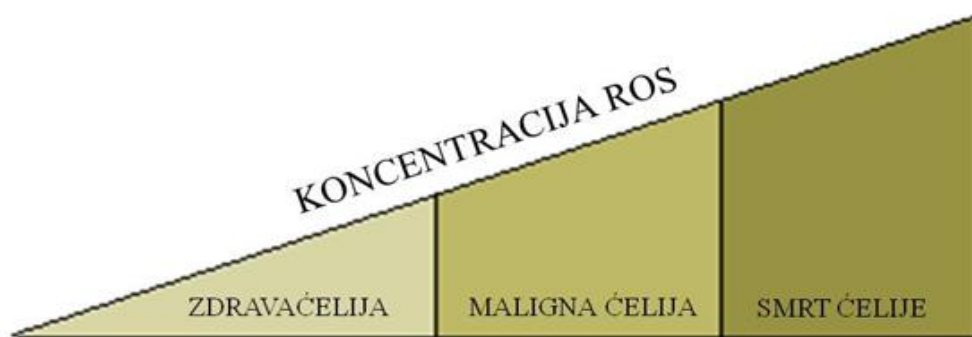
Tretman malignih bolesti

Za opstanak maligno izmenjene ćelije neophodno je održavanje koncentracije ROS na određenom nivou. U ovom procesu učestvuju brojni antioksidantni enzimi. Imajući u vidu pojačanu produkciju ROS, u malignim ćelijama je povišen nivo antioksidantnog sistema (107, 108).

Povećanje intracelularne koncentracije ROS iznad potrebnih vrednosti za maligno izmenjenu ćeliju može indukovati apoptozu maligne ćelije (Slika 2.12.). Povišen nivo ROS, koji

je toksičan za maligno izmenjene ćelije, postiže se hemoterapijom, potrošnjom antioksidantnih enzima, ili produkcijom ROS od strane ćelija imunskog sistema (90, 107). Subletalne koncentracije ROS, postignute hemoterapijom i zračenjem, deluju kao promoteri invazije i metastaziranja malignih bolesti. Ovo je razlog zašto se ROS smatraju jednim od medijatora pojave rezistencije na lekove i stvaranja metastaza malignog tkiva (71).

S tim u vezi, visok stepen oksidativnog stresa može indukovati apoptozu ili čak nekrozu, dok niži stepen oksidativnog stresa može stimulisati ćelijsku deobu i promovisati tumorski rast (101). Pojačan oksidativni stres u mitohondrijama dovodi do oslobađanja citohroma C i smrti maligne ćelije (90). Naime, dolazi do pojačane produkcije superoksid anjon radikala u mitohondrijama, oštećenja mitondrijalne membrane i prelaska citohroma C u citosol. Zatim, citohrom C formira kompleks sa apoptotičnim aktivacionim faktorom 1 (Apaf-1), te dolazi do sledstvene apoptoze. Značajno smanjenje citohroma C uzrokuje povećanu produkciju ROS (107).



Slika 2.12. Koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u zdravoj ćeliji, malignoj ćeliji i pri ćelijskoj smrti (107).

Nuklearni faktor Nrf2 je transkripcioni faktor koji indukuje ekspresiju nekoliko antioksidantnih enzima. Somatske mutacije u genu za Nrf2 dovode do aktivacije transkripcionog faktora Nrf2 i ekspresije Nrf2-ciljnih gena. Mutacije izolovane u maligno izmenjenim ćelijama pluća sugerišu da Nrf2 ima protumorogenu aktivnost. Otkriveno je nekoliko onkogeni koji indukuju Nrf2 ekspresiju. Na taj način promoviše se neutralizacija ROS dejstvom antioksidantnih enzima, stvarajući povoljnu mikro sredinu za inicijaciju i razvoj maligne bolesti.

Sve ovo ukazuje da su geni za ekspresiju antioksidantnih enzima regulisani reaktivnim kiseoničnim vrstama (13).

Već je rečeno da ROS imaju sposobnost da indukuju oštećenja molekule DNK i potencijalno dovedu do razvoja maligne bolesti. Sledstveno, antioksidanti sprečavaju napredovanje maligne bolesti tako što neutrališu ROS (13, 71). Mnogobrojni literaturni podaci pokazuju pozitivnu korelaciju između konzumacije hrane bogate antioksidantima i incidence pojave maligniteta (109, 110). Brojne studije su pokazale da suplementacija antioksidantima u profilaktičke svrhe smanjuje incidencu malignih bolesti (110).

Tretman antioksidantima kod pacijenata sa visokim rizikom od pojave maligne bolesti usled deficita tumor supresornog gena za protein p53 može imati efekta u odlaganju ili sprečavanju razvoja maligniteta (90).

Pored toga, povećana ekspresija mitohondrijalne SOD (MnSOD) suprimira određene maligne bolesti (71). Tako, više koncentracije ektopično nastale MnSOD redukuju rast maligno transformisanih ćelija pankreasa (90). Trošenje MnSOD dovodi do intenzivnije ćelijske proliferacije *in vitro*, dok u *in vivo* uslovima doprinosi agresivnosti malignih bolesti. Povišen nivo citosolne SOD (Cu-Zn SOD) smanjuje rast neoplastičnog tkiva većine malignih bolesti (71, 90). Intenzivnija ekspresija ekstracelularne SOD (SOD3) redukuje pojavu metastaza maligniteta dojki *in vivo* (107).

Međutim, sprovedene su brojne studije koje su imale za cilj proveru delotvornosti suplementacije antioksidantima (14, 71). Većina rezultata dobijena u pomenutim studijama nije bila očekivana, što je pokrenulo ideju o dvostrukoj ulozi antioksidanata kod mnogih bolesti. Pokazano je da pojedini antioksidanti dovode do pogoršavanja zdravlja, povećanja rizika od pojave malignih bolesti i smrtnosti (14, 107). Postavljeno je nekoliko pretpostavki kojima bi moglo da se objasni potencijalno štetno delovanje antioksidanata:

- Dostizanje nedovoljne koncentracije antioksidanata na mestima povećanog nivoa ROS;
- Antioksidanti mogu imati i prooksidantnu aktivnost pod određenim uslovima (vitamin C);
- Antioksidanti nemaju sposobnost sprečavanja oksidacije molekula koji imaju i suviše visok afinitet prema ROS (NO ekstremno brzo stupa u reakciju sa superoksid anjon radikalom);
- Antioksidanti mogu biti efikasni u niskim koncentracijama ROS, međutim, imaju ograničen kapacitet u smanjivanju visokih nivoa ROS;

- Različitost u hemijskoj strukturi između antioksidanata dobijenih sintetskim putem i iz prirodnih izvora;
- Neki antioksidanti su delotvorniji od drugih kod određenih bolesti (14, 71).

Oralna suplementacija antioksidantima ima ograničen apsorpcioni profil i nisku bioraspoloživost. U cilju prevazilaženja niske iskoristljivosti oralno unetih antioksidanata, istraživanja su usmerena ka razvijanju nanopartikula ovih molekula (71).

Antioksidanti mogu pokazati štetan efekat i smanjiti delovanje terapije ukoliko se koriste uz lekove čiji je mehanizam dejstva povećavanje intracelularne produkcije reaktivnih kiseoničnih metabolita. Pomenuti nepovoljan uticaj antioksidanti bi ostarili neutralizacijom nastalih ROS. Nasuprot ovome, kombinovana terapija antioksidantima i lekovima koji dovode do apoptoze nezavisno od oksidativnog stresa bi bila efikasnija, jer se na taj način smanjuje nivo ROS u malignim ćelijama (90).

Povećavanje celokupnog antioksidantnog kapaciteta ćelija u terapiji maligniteta može predstavljati promotera maligne bolesti (110). Razlog ovome leži u činjenici da maligno transformisane ćelije troše antioksidante da bi sprečile porast koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje bi za njih bile letalne. U tom slučaju pristup malignim bolestima sastoji se u suplementaciji prooksidantima ili snižavanju antioksidantnog statusa ćelija. Kombinacijom prooksidanata sa inhibitorima antioksidantnog sistema postiže se povećanje koncentracije ROS, koja tada postaje dovoljna da pokrene proces ćelijske smrti (90).

Dok antioksidanti povećavaju degradaciju već prisutnih ROS, inhibitori enzima koji dovode do nastanka ROS, smanjili bi stepen produkcije ovih reaktivnih vrsta. Međutim, stvaranje ROS se ne sme u potpunosti zaustaviti, s obzirom na mnogobrojne fiziološke uloge koje reaktivne kiseonične vrste ostvaruju u organizmu. Enzimi NADPH oksidaze su potencijalno ciljni molekuli za delovanje ovih agenasa (14). Nekoliko studija je pokazalo da inhibicija enzima NOX rezultuje smanjenjem rizika od razvoja pojedinih malignih bolesti. Suzbijanje dejstva enzima NOX-4 dovodi do apoptoze malignih ćelija pankreasa (107).

2.4. Antiinflamatorno delovanje

Povećana produkcija metabolita arahidonske kiseline jedna je od glavnih karakteristika inflamacije. Lekovi koji inhibiraju ključne enzime na putu nastanka medijatora inflamacije predstavljaju važnu grupu poznatu pod nazivom nesteroidni antiinflamatorni lekovi. Istraživanja su, takođe, usmerena i ka ispitivanju biljnih resursa sa potencijalnim antiinflamatornim delovanjem.

2.4.1. Arahidonska kiselina i eikozanoidi

Arahidonska kiselina (*cis*-5,8,11,14-eikosatetraen-kiselina) je polinezasićena masna kiselina sa 20 ugljenikovih atoma i četiri *cis* dvostruke veze (111, 112). Pomenuta kiselina se nalazi u esterifikovanom obliku inkorporirana u fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane (111, 113). Različiti stimuli mogu da aktiviraju jednu od specifičnih fosfolipaza, uglavnom fosfolipazu A₂ (PLA₂) (112, 114). Otkriveno je da citosolna fosfolipaza A₂ (cPLA₂) vrši oslobađanje arahidonske kiseline iz glicerofosfoetanolamina i glicerofosfoholina (114). Pored PLA₂, postoje još dva izoenzima fosfolipaze: fosfolipaza C (PLC) i fosfolipaza D (PLD). Ovi enzimi su aktivni u citosolu, a oslobađanje arahidonske kiseline ostvaruju u dva koraka (111).

Eikozanoidi predstavljaju važnu grupu bioaktivnih jedinjenja nastalih metabolizmom arahidonske kiseline. U eikozanoide se ubrajaju: prostaglandini, tromboksani, prostaciklini i leukotrieni (114). S obzirom da metaboliti arahidonske kiseline imaju određene fiziološke uloge, neprestano se odvija oslobađanje i metabolisanje male količine arahidonske kiseline, što je strogo kontrolisano od strane ćelije (114, 115). Eikozanoidi, kao lipidni medijatori, učestvuju u procesima prenosa informacije između ćelija. Takođe, eikozanoidi imaju nezamenljivu ulogu i u imunskom odgovoru organizma. Pod uticajem određenih stimulusa, dolazi do intenzivnijeg delovanja fosfolipaza i do sledstvenog nagomilavanja eikozanoida, koji tada učestvuju u patološkim procesima (114).

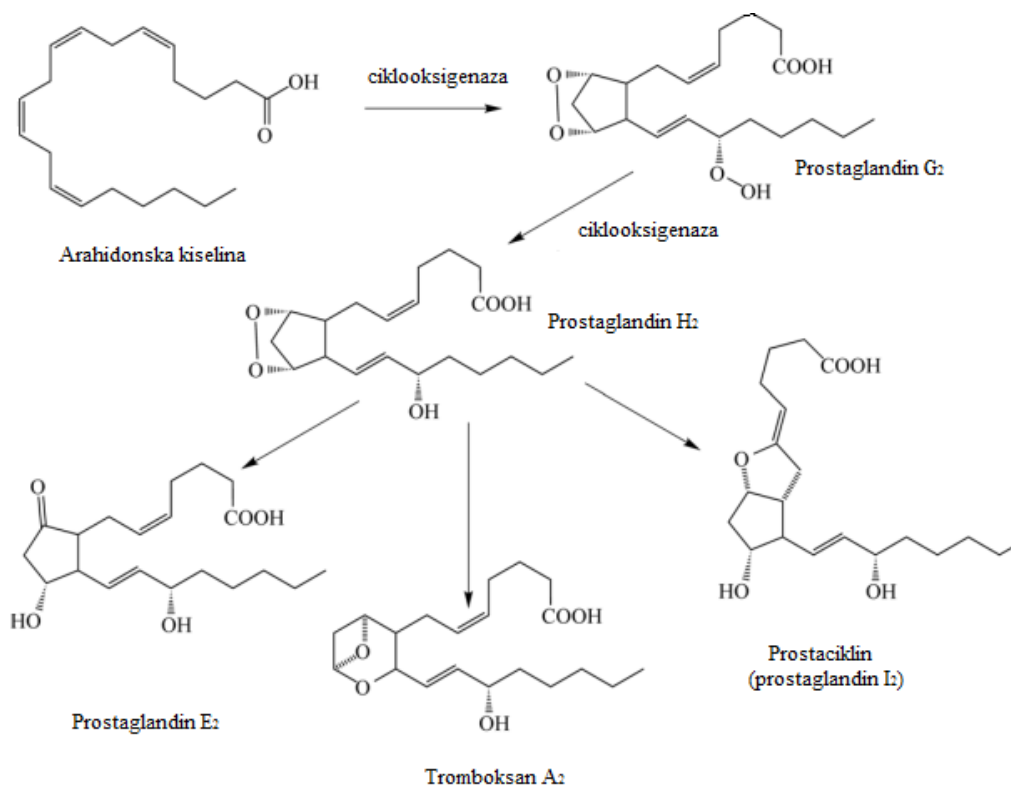
Oslobodena arahidonska kiselina, kao zajednički prekursor svih eikozanoida, dalje se metaboliše alternativnim kaskadnim putevima, nazvanim po glavnim enzimima koji katališu odgovarajuće reakcije: ciklooksigenazni, lipooksigenazni i epoksigenazni put.

2.4.2. Ciklooksigenazni metabolizam

Ciklooksigenazni put predstavlja metabolizam arahidonske kiseline koji vodi sintezi prostanoida: prostaglandina, tromboksana i prostaciklina, i posredovan je, u prvom koraku, enzimom prostaglandin H₂-sintetazom (PGH sintetaza). Drugi naziv za ovaj enzim je ciklooksigenaza (COX) i češće se upotrebljava u literaturi. Enzim ciklooksigenaza se javlja u dve izoforme: COX-1 (PGHS-1) i COX-2 (PGHS-2) (111, 114). Uvidom u trodimenzionu strukturu ovih enzima, otkriveno je da se nalaze u obliku dimera, vezani za membranu, a lokalizovani na endoplazmatskom retikulumu (114, 116).

Enzim COX-1 je konstitutivan i nalazi se u različitim tkivima, monocitima i trombocitima, i transformiše arahidonsku kiselinu u prostanoide, koji su uključeni u normalno ćelijsko funkcionisanje. S druge strane, proinflamacijski agensi indukuju aktivaciju inducibilnog enzima COX-2, koji učestvuje u procesu inflamacije i pojavi bola (111, 117).

Intermedijarni proizvod nastao iz arahidonske kiseline posredstvom enzima ciklooksigenaze (PGH sintetaze) predstavlja prostaglandin H₂, hemijski veoma reaktivno jedinjenje, koje se dalje transformiše u prostaglandine D₂, E₂, F_{2α}, tromboksan A₂ (TXA₂) i prostaciklin (PGI₂). Ovi sekundarni produkti prostaglandina H₂ predstavljaju biološki aktivne prostanoide, koji su manje reaktivni (izuzev TXA₂ i PGI₂) i rezultat su delovanja pomoćnih citosolnih enzima koji prevode PGH₂ u odgovarajući prostanoid (Slika 2.13.) (111, 114).



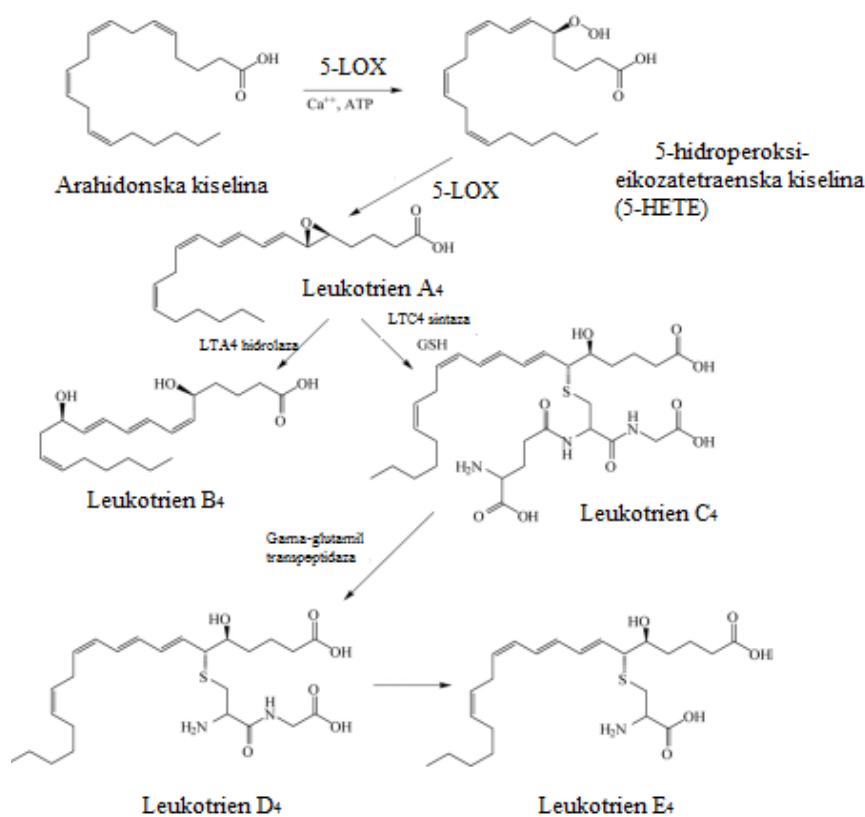
Slika 2.13. Ciklooksigenazni put (114).

2.4.3. Lipooksigenazni metabolizam

Lipooksigenazni put predstavlja metabolizam arahidonske kiseline u pravcu nastajanja leukotriena, i naziva se još i leukotrienski put. Leukotrieni su otkriveni tokom ispitivanja mešavine jedinjenja nazvanih spororeagujuća supstanca anafilakse, s obzirom da dovode do konstrikcije glatkih mišića sporije od histamina (114).

Prva reakcija u sintezi leukotriena je oksidacija u položajima C₅, C₁₂ ili C₁₅, uz posredstvo enzima lipooksigenaze, pri čemu se generiše hidroperoksieikosatetranoična kiselina (HPETE). Razlikuju se tri vrste lipooksigenaza (5-LOX, 12-LOX i 15-LOX) uključenih u lipooksigenazni put. Različiti tipovi ćelija sadrže specifične lipooksigenaze, a koji će se tip enzima aktivirati zavisi od vrste stimulusa. U trombocitima dejstvom enzima 12-lipooksigenaza nastaje glavni eikozanoid: 12-HPETE (114).

Enzim 5-lipooksigenaza (5-LOX) je prvi regulatorni enzim uključen u oksidaciju arahidonske kiseline i stvaranje leukotriena, i to najpre formiranjem hidroperoksieikosatetraoične kiseline (5-HPETE) (114). Dejstvom enzima LTA sintetaze vrši se eliminacija molekula vode iz 5-HPETE i nastaje nestabilni konjugovani epoksid leukotriena A₄ (LTA₄). Leukotrien A₄ se zatim konvertuje ili u LTB₄, dejstvom enzima LTB₄ sintetaze (LTA₄ hidrolaze), ili u LTC₄, koji nastaje u prisustvu molekula redukovano glutaciona, tako što enzim glutation-S-transferaza (LTC₄ sintetaza) prenosi –SH grupu na LTA₄. Uklanjanje glutaminske kiseline iz LTC₄ i formiranje LTD₄ vrši se posredstvom enzima γ -glutamil transferaze, dok se dejstvom dipeptidaze uklanja glicin te nastaje LTE₄. Leukotrien E₄ se ili ekskretuje urinom ili se konvertuje u LTF₄, ili druge manje aktivne metabolite (Slika 2.14.) (118).



Slika 2.14. Lipooksigenazni put (114).

U humanim trombocitima, enzimi COX-1 i 12-LOX odgovorni su za metabolisanje arahidonske kiseline i nastajanje biološki aktivnog tromboksana A₂ (TXA₂), koji se brzo transformiše u TXB₂, 12-hidroksi-5, 8, 10-heptadekatrienske kiseline (12-HHT) i 12-HETE, kao i manje količine prostaglandina F_{2α}, E₂ i D₂. Određivanje antiinflamatornog potencijala standardnih supstanci i biljnih ekstrakata, odnosno njihov inhibitorski efekat na ključne enzime u metabolisanju arahidonske kiseline, može se vršiti kvantifikacijom metabolita nastalih dejstvom enzima COX-1 i 12-LOX (12-HHT, 12-HETE, TXB₂ i PGE₂), što je opisano u nekoliko različitih testova (117).

2.4.4. Epooksigenazni metabolizam

Metabolizam arahidonske kiseline, predstavljen kao epooksigenazni put, uključuje seriju specifičnih citohrom P-450 enzima označenih kao CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2G, CYP2J, CYP2N i CYP4A, koji katališu nastajanje izomera epoksieikozatrienske kiseline (EET) (114).

3. Ciljevi i radne hipoteze

Na početku izrade doktorske disertacije postavljeni su ciljevi i radne hipoteze, koje su proverene na kraju eksperimentalnog rada.

3.1. Ciljevi

1. Ispitati hemijski sastav vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*.
2. Ispitati antioksidantnu aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus in vitro*.
3. Ispitati efekat vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* na rast tumorskih ćelija *in vitro*.
4. Ispitati citotoksičnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* na rast ćelija poreklom od zdravog tkiva *in vitro*.
5. Ispitati antioksidantnu aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus in vivo*.
6. Ispitati hepatoprotektivno ili hepatotoksično delovanje vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus in vivo*.
7. Ispitati antitumorsko delovanje vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus in vivo* prema ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC) i Hepatom-a AS30D.
8. Ispitati antiinflamatorno delovanje vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus in vitro*.

3.2. Radne hipoteze

1. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* sadrži komponente koje pokazuju antioksidantnu, hepatoprotektivnu, antitumorsku i antiinflamatornu aktivnost.
2. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajno smanjenje oksidativnog stresa *in vitro*.
3. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajnu citotoksičnu aktivnost prema tumorskim ćelijama *in vitro*.
4. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajno manju citotoksičnost prema zdravim ćelijama nego prema tumorskim ćelijama *in vitro* odnosno vodeni ekstrakt ploda *Rumex*

crispus ne pokazuje statistički značajnu citotoksičnost prema ćelijama poreklom od zdravog tkiva *in vitro*.

5. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajno smanjenje oksidativnog stresa *in vivo*.

6. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajno hepatoprotektivno, a ne pokazuje statistički značajno hepatotoksično delovanje *in vivo*.

7. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajno antitumorsko delovanje prema ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC) i Hepatom AS30D *in vivo*.

8. Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* pokazuje statistički značajnu antiinflamatornu aktivnost *in vitro*.

4. Materijal i metode

Eksperimentalni deo doktorske disertacije sastojao se iz:

1. Fitohemijskog ispitivanja vodenog ekstrakta ploda štavolja (*Rumex crispus*), koje je izvedeno na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za Farmakognoziju;
2. *In vitro* ispitivanja antitumorskog i citotoksičnog delovanja vodenog ekstrakta ploda štavolja (*R. crispus*), koje je izvršeno na Institutu za onkologiju Vojvodine, u Sremskoj Kamenici;
3. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja antioksidantne aktivnosti, kao i *in vivo* ispitivanja hepatoprotektivnog i antitumorskog delovanja vodenog ekstrakta ploda štavolja (*R. crispus*), koje je izvedeno u Kliničkom centru Vojvodine, na Samostalnom odseku za biohemiju, u Novom Sadu;
4. *In vitro* ispitivanja antiinflamatornog delovanja vodenog ekstrakta ploda štavolja (*R. crispus*), koje je urađeno na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, na Katedri za Biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda.

U nastavku ovog poglavlja date su detaljne smernice procedura koje su korišćene tokom istraživanja.

4.1. Fitohemijsko ispitivanje vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

4.1.1. Biljni materijal

Biljni materijal, čiji je biološki potencijal bio predmet ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji, predstavljaju zreli plodovi štavolja (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) sakupljeni u leto, tokom avgusta, u samoniklom livadskom pojasu u Kumodražu (Beograd, Republika Srbija). Biljni materijal je pregledan i deponovan u kolekciji primeraka jemstva (*eng. Voucher collection*) Herbarijuma Farmaceutskog fakulteta, u Beogradu. Determinaciju je izvršio prof. dr Radiša Jančić, Farmaceutski fakultet u Beogradu. Dodeljen vaučer broj je 3874.

4.1.2. Priprema biljnog ekstrakta

Zreli plodovi štavolja, osušeni na vazduhu (5 g), usitnjeni do praha, korišćeni su za pripremu vodenog ekstrakta *R. crispus*. Aktivne komponente su ekstrahovane vodom tri sata na 50°C, nakon čega je rastvarač uparen pomoću vakuum uparivača. Tako dobijen suvi ostatak sirovog vodenog ekstrakta zatim je rastvoren u toploj destilovanoj vodi (1 mL dH₂O po g suvog ostatka) kako bi se dobio čisti 5% vodeni ekstrakt plodova *R. crispus*. Pripremljen vodeni ekstrakt plodova štavolja korišćen je u *in vitro* ispitivanjima, dok je eksperimentalnim životinjama tokom *in vivo* eksperimenata davan oralno (*per os*). Suvi ostatak je, takođe, rastvoren i u dimetil-sulfoksidu (DMSO), i tako korišćen prilikom ispitivanja *in vitro* antitumorskog i antiinflamatornog delovanja.

4.1.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Za određivanje flavonoidnih heterozida korišćena je metoda koja je detaljno opisana u literaturi Petrović i saradnici (119), i predstavlja spektrofotometrijsko određivanje flavonoida u listu breze, *Betulae folium* (Ph. Eur. 6.0).

Prelije se u erlenmajeru 0,60 g droge u prašku (355) sa 20 mL acetona, doda 1 mL rastvora urotropina (5 g/L) i 2 mL hlovodonične kiseline (25 %) i zagreva do ključanja 30 min uz povratni hladnjak. Posle hlađenja, smeša se procedi preko malo vate u odmernu tikvicu od 100 mL. Ostatak droge i vata se zagrevaju još dva puta po 10 min sa po 20 mL acetona uz povratni hladnjak. Ohlađeni ekstrakti se zatim procede preko malo vate natopljene acetonom u istu odmernu tikvicu i sadržaj dopuni acetonom do 100 mL.

20 mL ovog rastvora se u levku za odvajanje pomeša sa 20 mL vode i izmučka jednom sa 15 mL i tri puta sa po 10 mL etilacetata (etilacetat je gornji sloj). Spojeni etilacetatni ekstrakti se u levku za odvajanje isperu dva puta sa po 50 mL vode, prebace u odmernu tikvicu od 50 mL i sadržaj dopuni do oznake etilacetatom. 10 mL ovog rastvora se prebaci u odmernu tikvicu od 25 mL, doda 1 mL aluminijumhlorid-reagensa i dopuni do oznake rastvorom sirćetne kiseline (5 %) u metanolu (ispitivani rastvor). Istovremeno se 10 mL ovog rastvora razblaži do 25 mL rastvorom sirćetne kiseline (5 %) u metanolu (slepa proba). Apsorbanca ispitivanog rastvora meri se posle 30 min na 425 nm u odnosu na slepu probu.

Sadržaj flavonoida se izračunava u odnosu na specifični apsorpcioni koeficijent hiperozida, $A_{1\%/1\text{cm}} = 500$, prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

A - apsorbanca ispitivanog rastvora,

m - masa droge u gramima.

4.1.4. HPLC-MS analiza ispitivanog ekstrakta

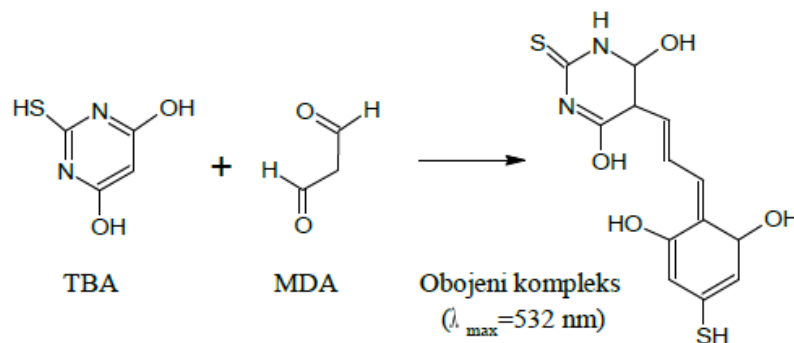
Za hemijsku karakterizaciju vodenog ekstrakta ploda štavelja primenjena je metoda visokoefikasne tečne hromatografije (*eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) na uređaju Agilent 1260 HPLC kuplovanim sa G4212B PDA detektorom i autosemplerom (Agilent, Waldbronn, Nemačka). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax SB-C18 kolona (4,6 mm × 250 mm, 5 μm) (Agilent Technologies) pri temperaturi od 25°C. Binarna mobilna faza sastojala se od rastvora A (0,1% HCOOH) i rastvora B (acetonitril). Primenjen je izokratski mod elucije (mobilna faza: 25% B, protok 0,8 mL/min). Uzorci su pripremljeni razblaživanjem ispitivanog ekstrakta vodom i filtriranjem kroz 0,45 μm membranu. Injektovana zapremina uzoraka iznosila je 10 μL. Retenciona vremena i UV spektri izolovanih komponenti upoređivali su se sa odgovarajućim podacima standarda iz baze, a sve u svrhu identifikacije komponenti. UV detekcija za hiperozid i mikvelianin bila je na 350 nm, a za (±)-katehin i galnu kiselinu na 210 nm. Kalibracione krive standarda korišćene za kvantifikaciju fenolnih komponenti prethodno su pripremljene i iznosile su: za hiperozid ($y = 5395,8 x + 88,94$, $R^2 = 1$, opseg koncentracija: 0,06–1,73 mg/mL), za mikvelianin ($y = 4354,6 x + 23,927$, $R^2 = 0,99$, opseg koncentracija: 0,10–1,00 mg/mL), za (±)-katehin ($y = 40258,0 x + 1715,2$, $R^2 = 0,9974$, opseg koncentracija: 0,00003–0,52 mg/mL), i za galnu kiselinu ($y = 8501,8 x + 90,745$, $R^2 = 1$, opseg koncentracija: 0,09–0,30 mg/mL). Uzorci su injektovani tri puta, a sadržaj analiziranih komponenti izražen je u mikrogramima (μg) po gramu (g) suvog biljnog materijala.

4.2. *In vitro* ispitivanje antioksidantnih svojstava vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Prilikom ispitivanja *in vitro* antioksidantnih svojstava vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., korištene su modifikovane metode preuzete iz Čebović (63).

4.2.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije

Intenzitet lipidne peroksidacije određen je merenjem količine malonildialdehida (MDA), nastalog u procesu peroksidacije membranskih lipida, modifikovanom metodom po Buege-Austu (120). TBA test (TBA-tiobarbiturna kiselina) je jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje intenziteta peroksidacije nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav ćelijskih membrana. Metoda se zasniva na formiranju obojenog kompleksa, koji nastaje u reakciji malonildialdehida kao produkta peroksidacije lipida, i tiobarbiturne kiseline (Slika 4.1.). Kompleks pokazuje maksimum apsorpcije na 532 nm.



Slika 4.1. TBA – test, reakcija formiranja obojenog kompleksa TBA sa MDA (63).

Kao model sistema biološke membrane korišćen je komercijalni preparat prolipozoma "PRO-LIPO S" (Lucas Meyer GmbH & Co., Hamburg, Nemačka) sa 30% fosfatidilholina soje, pH=5-7. Preparat lipozoma je dobijen tako što su "PRO-LIPO S" prolipozomi razblaženi sa demineralizovanom vodom (1:10). Rastvaranje se odvijalo u ultrazvučnom kupatilu, 20-30

minuta na sobnoj temperaturi. Dobijeni lipozomi su bili dijametra 225-250 nm sa udelom fosfolipida od 3% i korišćeni su za *in vitro* određivanje intenziteta peroksidacije lipida.

* Kontrola: suspenzija lipozoma

rastvor FeSO₄, $c=7,50 \times 10^{-2}$ mol/L

rastvor askorbinske kiseline, $c=3,50 \times 10^{-3}$ mol/L

fosfatni pufer, pH 7,4

50%-ni rastvor etanola (EtOH)

* Proba: suspenzija lipozoma

rastvor FeSO₄, $c=7,50 \times 10^{-2}$ mol/L

rastvor askorbinske kiseline, $c=3,50 \times 10^{-3}$ mol/L

fosfatni pufer, pH 7,4

biljni ekstrakt

Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 60 minuta. Po isteku vremena, reakcionoj smeši je dodat rastvor EDTA, $c=0,1$ mol/L, kao i TBA reagens. Epruvete su zatim stajale 20 minuta na ključalom vodenom kupatilu (stopiranje reakcije). Nakon hlađenja, reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min tokom 10 minuta. Apsorbanca je merena na 532 nm. Svaki uzorak je rađen u pet ponavljanja.

4.2.1.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida

* Kontrola: suspenzija lipozoma

rastvor FeSO₄, $c=7,50 \times 10^{-2}$ mol/L

rastvor askorbinske kiseline, $c=3,50 \times 10^{-3}$ mol/L

fosfatni pufer, pH 7,4

50%-ni rastvor etanola (EtOH)

rastvor CCl₄ u 50% etanolu

* Proba: suspenzija lipozoma

rastvor FeSO_4 , $c=7,50 \times 10^{-2}$ mol/L

rastvor askorbinske kiseline, $c=3,50 \times 10^{-3}$ mol/L

fosfatni pufer, pH 7,4

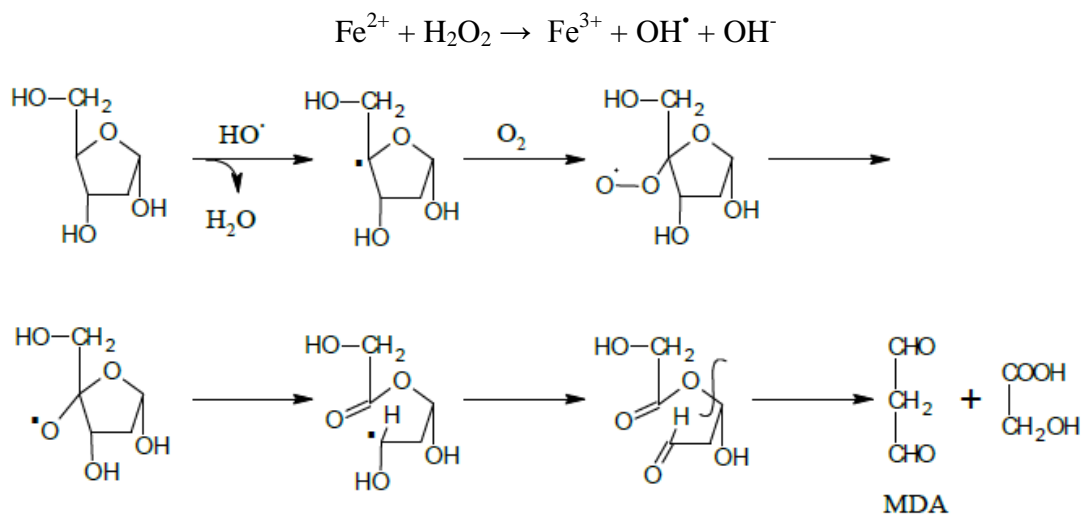
biljni ekstrakt:

rastvor CCl_4 u 50% etanolu

Dalji tok eksperimenta je bio isti kao i u prethodnom slučaju.

4.2.2. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH^\bullet)

Intenzitet produkcije hidroksil radikala (OH^\bullet) je određen praćenjem hemijske reakcije degradacije deoksiriboze. U Fentonovoj reakciji Fe^{2+} joni reaguju sa vodonik peroksidom (H_2O_2) generišući hidroksil radikal, koji je glavni pokretač razgradnje 2-deoksiriboze pri čemu nastaju proizvodi koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA-test). Nastali proizvodi, među kojima je najvažniji malonildialdehid, određuju se spektrofotometrijskom metodom po Buege-Aust-u (Slika 4.2.) (120).



Slika 4.2. Degradacija 2-deoksi-D-riboze do MDA (63).

* Kontrola: suspenzija lipozoma

rastvor vodonik peroksida, $c=9,00 \times 10^{-3}$ mol/L

rastvor FeSO_4 , $c=1,00 \cdot 10^{-2}$ mol/L

rastvor 2-deoksi-D-riboze, $c=5,00 \times 10^{-2}$ mol/L

50% rastvor etanola (EtOH)

* Proba: suspenzija lipozoma

rastvor vodonik peroksida, $c=9,00 \times 10^{-3}$ mol/L

rastvor FeSO_4 , $c=1,00 \cdot 10^{-2}$ mol/L

rastvor 2-deoksi-D-riboze, $c=5,00 \times 10^{-2}$ mol/L

biljni ekstrakt.

Dalji postupak je isti kao i kod određivanja intenziteta lipidne peroksidacije.

4.2.2.1. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH^\bullet) u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida

* Kontrola: suspenzija lipozoma

rastvor vodonik peroksida, $c=9,00 \times 10^{-3}$ mol/L

rastvor FeSO_4 , $c=1,00 \cdot 10^{-2}$ mol/L

rastvor 2-deoksi-D-riboze, $c=5,00 \times 10^{-2}$ mol/L

50% rastvor etanola (EtOH)

rastvor CCl_4 u 50% etanolu

* Proba: suspenzija lipozoma

rastvor vodonik peroksida, $c=9,00 \times 10^{-3}$ mol/L

rastvor FeSO_4 , $c=1,00 \cdot 10^{-2}$ mol/L

rastvor 2-deoksi-D-riboze, $c=5,00 \times 10^{-2}$ mol/L

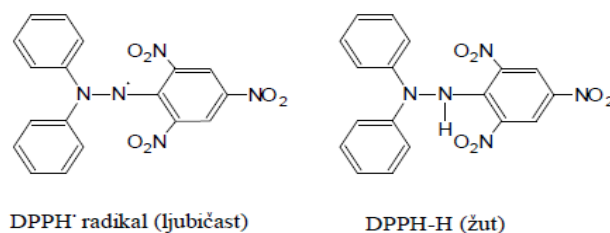
biljni ekstrakt

rastvor CCl_4 u 50% etanolu

Dalji postupak je isti kao i kod određivanja intenziteta lipidne peroksidacije.

4.2.3. Određivanje stepena inhibicije DPPH• radikala

Određivanje sposobnosti inhibicije DPPH• radikala – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala je jedna od pogodnih metoda za određivanje antioksidantnog potencijala biljnih ekstrakata u *in vitro* sistemima. Metoda se zasniva na praćenju promene ljubičaste boje stabilnog azot-centriranog DPPH• radikala u žutu boju kada je on inhibiran, odnosno „uhvaćen” od strane antioksidanata iz ispitivanog ekstrakta. Pojava žute boje potiče od sposobnosti antioksidanata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH• prelazi u redukovanu formu DPPH-H (Slika 4.3.).



Slika 4.3. DPPH• radikal (63).

U 1 mL 100%-og rastvora ispitivanog ekstrakta dodaje se 1 mL 90 $\mu\text{mol/L}$ rastvora DPPH• radikala. Rastvor se oboji ljubičasto. Intenzivno se mućka 5 minuta. Ukoliko rastvor požuti, inhibicija je 100% i pravi se razblaženiji rastvor. Razblaženje se pravi sve dok boja rastvora, tokom mućkanja ne ostane svetlo ljubičasta. Radi se sa rastvorom tako određene koncentracije i još pet razblaženija rastvora (što sa osnovnim (100%) čini šest rastvora).

- * Slepa proba: 4 mL metanola
- * Korekcija: 10 μL ispitivanog ekstrakta *Rumex crispus*
- * Kontrola: 1 mL 90 $\mu\text{mol/L}$ rastvora DPPH• radikala
3 mL metanola
- * Proba: 1 mL 90 $\mu\text{mol/L}$ rastvora DPPH• radikala
3 mL metanola
50, 20, 10 μL ispitivanog ekstrakta *Rumex crispus*.

Ovako pripremljene epruvete se ostave da odstoje 1h, a zatim se stepen inhibicije određuje spektrofotometrijski, na 515 nm. Svaki uzorak je rađen u pet ponavljanja.

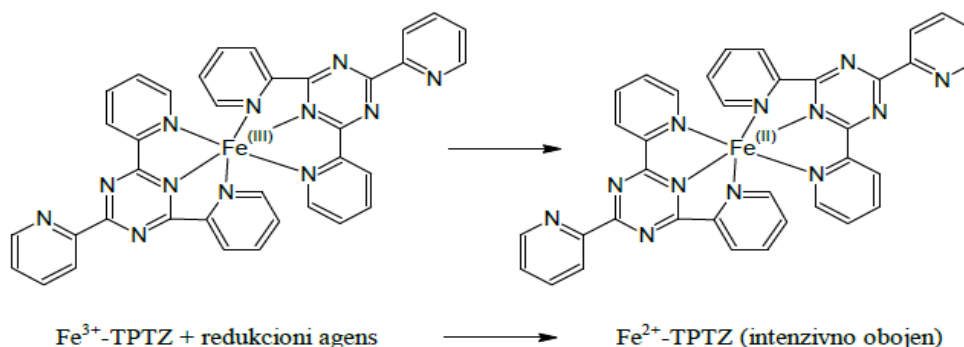
4.2.4. Određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP metodom

U cilju dobijanja potpunije informacije o antioksidantnim svojstvima ispitivanog ekstrakta *Rumex crispus*, testirana je i ukupna antioksidantna aktivnost metodom FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) (121). Ovo je spektrofotometrijska metoda zasnovana na redukciji Fe^{3+} u Fe^{2+} , pod uticajem biljnog ekstrakta. FRAP reagens (2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazin) je dobijen mešanjem tri rastvora, A, B i C u odnosu 10:1:1. Rastvor A je predstavljao 300 mmol/L acetatni pufer pH=3,6; rastvor B – 10 mmol/L TPTZ u 40 mmol/L HCl i rastvor C – 20 mmol/L FeCl_3 . U FRAP reagens je dodato 100 μl uzorka. Svi antioksidanti prisutni u ekstraktu koji imaju dovoljno nizak redoks potencijal redukuju jone Fe^{3+} . Fero-joni (Fe^{2+}), nastali na ovaj način, grade sa prisutnim ligandom plavo obojeni kompleks, Fe^{2+} -TPTZ (gvožđe-tripiridiltriazin) (Slika 4.4.).

Razvijanje plave boje, prati se 4 min na 593 nm u odnosu na destilovanu vodu. Rezultat se izražava kao koncentracija Fe^{2+} jona, u $\mu\text{mol/L}$, nastalih u reakcionom sistemu pri opisanim uslovima ili u FRAP jedinicama (1 FRAP jedinica odgovara 100 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_2).

Kontrolni rastvor predstavlja 100 $\mu\text{mol/L}$ rastvor Fe^{2+} jona.

Svaki uzorak je rađen u pet ponavljanja.



Slika 4.4. Reakcija primenjena u FRAP testu (63).

4.2.5. Određivanje stepena inhibicije stvaranja azot monoksida (NO)

Inhibicija azot monoksida je određena spektrofotometrijskim merenjem stvaranja nitritnih jona (122). Azot monoksid, nastao iz natrijum nitroprusida (SNP) u vodenom rastvoru pri fiziološkim pH, reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone koji se određuju pomoću Griess-ove reakcije.

Izvor azot monoksida bio je SNP (SNP rastvoren u fosfatnom puferu pH=7). Griess-ov reagens predstavlja smešu 1% SA (sulfanilamida) i 0,1% NEDA (N-(1-naftil)-etilendiamindihidrohlorid).

Radna proba je pripremljena mešanjem SNP-a (natrijum nitroprusid), rastvora uzorka (ispitivani ekstrakt *Rumex crispus* u fosfatnom puferu) i fosfatnog pufera pH=7.

Slepa proba je dobijena mešanjem SNP-a i fosfatnog pufera pH=7.

Radna i slepa proba su zatim inkubirane 60 minuta na svetlosti istog intenziteta. Nakon inkubacije dodat je Griess-ov reagens, u slepu i u radnu probu. Oba rastvora su razblažena sa destilovanom vodom.

Apsorbance radne i slepe probe su merene u odnosu na destilovanu vodu na 546 nm. Inhibicija NO se izražava procentualno u odnosu na slepu probu. Svaki uzorak je rađen u pet ponavljanja.

4.3. *In vitro* ispitivanje antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

4.3.1. Kulture ćelijskih linija

Suvi ostatak vodenog ekstrakta ploda štavolja rastvoren je u dimetil-sulfoksidu (DMSO), pri čemu je napravljen osnovni rastvor koncentracije 200 mg/mL i četiri dodatna dvostruka razblaženja koja su korišćena za ispitivanje antiproliferativne aktivnosti. Osnovni rastvor je sterilisan filtracijom, upotrebom 0,22 µm špic mikrofiltera (Sartorius, Nemačka).

U cilju određivanja uticaja vodenog ekstrakta ploda štavolja na rast tumorskih ćelija *in vitro* korišćene su humane tumorske ćelijske linije HeLa (epitelni karcinom cerviksa, ECACC 93021013), MCF7 (adenokarcinom dojke, ECACC 86012803) i HT-29 (adenokarcinom debelog creva, ECACC 91072201). Efekat na rast ćelija zdravog tkiva ispitan je upotrebom humane ćelijske linije MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća, ECACC 84101801). Ćelije su gajene u DMEM (Dullbeco's Modified Essential Medium) medijumu uz dodatak 100 µL/mL fetalnog telećeg seruma (FCS; NIVNS, Novi Sad, Srbija), 100 µg/mL streptomicina i 100 IU mL penicilina (Galenika, Beograd, Srbija), u flaskovima od 25 mL (Corning, Njujork, SAD), na 37°C, u atmosferi od 5% CO₂ i pri visokoj relativnoj vlažnosti. Ćelije su presađivane dva puta nedeljno upotrebom 1 mg/mL tripsina (Serva, UK) sa 0,4 mg/mL EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Suspenzije ćelija gustine $3-5 \times 10^3$ ćelija po otvoru mikrotitar ploče sa 96 otvora, (Sarstedt, Newton, SAD) dodate su u zapremini od 180 µL i preinkubirane 24 h na 37°C. Nakon toga, u svaki otvor dodato je po 1 µL ekstrakta (serija dvostrukih razblaženja u DMSO) do postizanja željenih finalnih koncentracija (0,0039–1 mg/mL). U kontrolne otvore umesto uzorka dodata je ista zapremina rastvarača. Koncentracija DMSO u ćelijskoj kulturi je ≤ 5 µL/mL. Nakon dodavanja uzoraka, ploče su inkubirane 48 h na 37°C, što je adekvatno vremenu od 2–3 generacije ćelija u kontroli. Svi tretmani su ispitani u osam ponavljanja (n=8).

4.3.2. Određivanje intenziteta ćelijskog rasta

Intenzitet ćelijskog rasta određen je merenjem ukupne količine proteina kolorimetrijskim sulforhodamin B (SRB) testom (123). Sulforhodamin B je fluorescentna anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina dajući izrazito stabilne konjugate, jarko crvene boje. Nakon vezivanja proteina i ispiranja viška boje, dodatkom slabe baze (TRIS), SRB se kvantitativno ekstrahuje iz ćelije i meri apsorbanca na specifičnoj talasnoj dužini (540 nm) na osnovu čega se određuje ćelijski rast.

Fiksiranje ćelija u mikrotitar pločama odvija se 0,5 g/mL trihlorsirćetnom kiselinom (TCA), u toku 1h na 4°C, a potom ploče su isprane automatski četiri puta (Wellwash 4, Lab systems, Helsinki, Finska) destilovanom vodom i osušene. Zatim su bojene 4 mg/mL SRB u 10 mL/L sirćetnoj kiselini (75 µL/otvoru) u toku 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga ploče su isprane automatski četiri puta 10 mL/L sirćetnom kiselinom da bi se uklonio višak boje. SRB boja je ekstrahovana iz ćelija dodatkom 10 mmol/L tris [hidroksimetil] amino metanom (TRIS) (200 µL po otvoru). Apsorbanca dobijenog rastvora merena je na 540 nm, kao specifičnoj talasnoj dužini za SRB, i na 620 nm, kao referentnoj talasnoj dužini za uklanjanje apsorbance pozadine, koristeći fotometar (Multiscan Ascent, Lab systems, Helsinki, Finska).

Antiproliferativna aktivnost ekstrakta *in vitro* izražena je kao srednja vrednost četiri određene IC₅₀ vrednosti (koncentracija ekstrakta pri kojoj je inhibicija ćelijskog rasta 50%) ± standardna devijacija (µg/mL). Ova vrednost očitana je iz krivih zavisnosti ćelijskog rasta od finalne koncentracije ekstrakta ili standarda dobijenih polinomskom regresionom analizom (upotrebom ORIGIN 8.0, OriginLab, SAD softvera).

Za ispitivani ekstrakt izračunat je i ne-tumor/tumor odnos korišćenjem IC₅₀ vrednosti dobijenih za ne-tumorsku i tumorsku ćelijsku liniju prema formuli $NT/T = IC_{50} \text{ ne-tumorske } \text{ćelijske linije} / IC_{50} \text{ tumorske } \text{ćelijske linije}$. Dobijene vrednosti NT/T iznad 1 odgovaraju većoj inhibiciji rasta tumorske ćelijske linije u odnosu na ćelijsku liniju poreklom od zdravog tkiva.

4.3.3. Određivanje mehanizma ćelijske smrti

Tip ćelijske smrti (mehanizam delovanja) određen je *in vitro* detekcijom apoptoze i nekroze ELISA tehnikom, upotrebom Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kompleta (Roche, Švajcarska), u četiri ponavljanja (n=4). Ovaj spektrofotometrijski test se koristi za specifično *in vitro* kvalitativno i kvantitativno određivanje mono- i oligonukleozoma (DNK fragmenata vezanih za histone) u citoplazmatskoj frakciji pre i posle liziranja ćelija. Zasnovan je na enzimskoj sendvič-immunoadsorpcionoj metodi, u kojoj se koriste monoklonalna antitela miša – anti-DNK i anti-histon, koja vezuju DNK i histone, respektivno. Za anti-histon antitelo vezan je biotin koji može da reaguje sa streptavidinom, proteinom koji ima izrazito visok afinitet za biotin, a kojim su obložene mikroploče. Anti-DNK antitelo sadrži enzim peroksidazu (POD), koja katalizuje oksidaciju 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonata) (ABTS radikala) i prevodi ga u zeleni ABTS⁺⁺, čiji je apsorpcioni maksimum na 405 nm. Tokom perioda inkubacije, anti-histon antitelo vezuje se za histonsku komponentu nukleozoma i simultano gradi imunokompleks sa streptavidinom putem biotinizacije. Pored toga, anti-DNK-POD antitelo reaguje sa DNK komponentom nukleozoma. Količina nukleozoma ekvivalentna je količini peroksidaze iz imunokompleksa, a ona se određuje spektrofotometrijski bojenom reakcijom sa ABTS supstratom. Anti-histonska antitela miša vezuju se za histone H1, H2A, H2B, H3 i H4 različitih organizama, dok anti-DNK-POD antitelo reaguje i sa jednostrukim i sa dvostrukim lancem DNK.

Stepen apoptoze ili nekroze izražen je kao faktor povećanja koncentracije mono- i oligonukleozoma, koji je izračunat kao AT/AC, gde je AT apsorbanca probe tretirane ekstraktom, a AC apsorbanca negativne kontrole. Takođe, izračunat je odnos apoptoza/nekroza i porast apoptoze.

4.4. *In vivo* ispitivanja antioksidantnih/prooksidantnih i citotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Prilikom ispitivanja *in vivo* antioksidantnih/prooksidantnih i citotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., korišćene su dopunjene i modifikovane metode opisane u Čebović (63).

4.4.1. Eksperimentalne životinje

Postupak rada sa životinjama i svi eksperimentalni protokoli su sprovedeni u skladu sa „Pravilnikom o uslovima za upis u registar za ogledne na životinjama i sadržini i načinu vođenja tog Registra, programu obuke o dobrobiti oglednih životinja, obrascu zahteva za odobrenje sprovođenja ogleda na životinjama, načinu nege, postupanja i lišavanju života oglednih životinja, kao i sadržini i načinu vođenja evidencije o držanju, reprodukciji, prometu, odnosno sprovođenju ogleda na životinjama” (“Službeni glasnik RS”, br. 39/10) Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu je dala pozitivno Mišljenje (broj: 01-131/3-2 od 05.05.2014. godine, broj dokumenta EK: I-2014-03), na osnovu kog je Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije dala Rešenje o odobrenju sprovođenja ogleda na životinjama broj: 323-07-00550/2015-05 od 02.02.2015. godine.

In vivo ispitivanja antioksidantnih/prooksidantnih i citotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda štavelja vršila su se na eksperimentalnim životinjama: mužjacima i ženka miševa soja *Hannover National Medical Institute* (Hann:NMRI) i mužjacima i ženka pacova soja *Sprague Dawley*. Sve životinje su dobijene iz laboratorije Samostalnog odseka za biohemiju Centra za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine (Novi Sad, Srbija). Sve eksperimentalne životinje su čuvane u odgovarajućim kavezima, u strogo kontrolisanim uslovima temperature (25°C) i vlažnosti vazduha (30-50%), pri režimu svetlo-12h/tama-12h. Eksperimentalne životinje su imale slobodan pristup odgovarajućoj standardnoj hrani za miševе (LM₂ sa 19% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Srbija), odnosno pacove (PA sa 20% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Srbija), i vodi. Eksperimenti *in vivo* rađeni su sa

Hann:NMRI miševima oba pola, starosti 6-8 nedelja, telesne mase $25 \text{ g} \pm 10\%$, i pacovima *Sprague Dawley* oba pola, starosti 7-8 nedelja, telesne mase 200 – 250 g.

4.4.2. *In vivo* ispitivanja antioksidantnih / prooksidantnih i hepatoprotektivnih / hepatotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

In vivo ispitivanja antioksidantnih/prooksidantnih i hepatoprotektivnih/hepatotoksičnih efekata vodenog ekstrakta ploda štavelja vršila su se na eksperimentalnim životinjama: mužjacima i ženka miševa soja *Hannover National Medical Institute* (Hann:NMRI). Eksperimenti su bili rađeni sa pripremljenim vodenim ekstraktom ploda štavelja. Sve životinje su jednokratno primale oralno (*per os*) odgovarajući ekstrakt, odnosno fiziološki rastvor (kontrolna grupa). Ogled je trajao 7 dana.

Postupak *in vivo* ispitivanja na miševima soja *Hannover National Medical Institute* (Hann:NMRI): miševi su slučajnim izborom podeljeni u grupe po šest (6) jedinki u svakoj ($n=6$), i to:

- Grupa CTRL – kontrolna grupa; životinje koje su primale fiziološki rastvor, 1 mL/kg telesne mase (*per os*) tokom 7 dana,
- Grupa CTRL + CCl₄ – negativna kontrolna grupa; životinje koje su primale fiziološki rastvor, 1 mL/kg telesne mase (*per os*) tokom 7 dana i rastvor ugljentetrahlorida (CCl₄), 2 mL/kg telesne mase (*i.p.*), sedmog dana, 24h pre žrtvovanja,
- Grupa A – F – životinje koje su bile tretirane ispitivanim vodenim ekstraktom ploda štavelja, koncentracije 1%, 2%, 3%, 4%, 5% ili 10% (*per os*) tokom 7 dana,
- Grupa A CCl₄ – F CCl₄ – životinje koje su bile tretirane ispitivanim vodenim ekstraktom ploda štavelja, koncentracije 1%, 2%, 3%, 4%, 5% ili 10% (*per os*) tokom 7 dana, i 2 mL/kg telesne mase (*i.p.*) CCl₄ sedmog dana, 24h pre žrtvovanja.

Na kraju eksperimenta, životinje su bile izmerene, anestetizirane izofluoranom i dekapitovane. Sakupljeni su uzorci krvi i jetre za biohemijske analize. Masa jetre je izmerena nakon uklanjanja žučne kese. Uzorci mase 1g su homogenizovani u TRIS-HCl/ saharoznom medijumu (50 mM, 0,25 M, pH 7,40), 1:3, 4°C, pomoću *Potter-Elvehjem*-ovog seta za homogenizaciju. Zatim je dobijeni homogenat centrifugovan na 3000 o/min tokom 10 min, a

koncentracija proteina je određena biuretskom metodom primenom bovinog serum albumina kao standarda (63, 124).

4.4.3. *In vivo* ispitivanja antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Postupak *in vivo* ispitivanja antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda štavolja radio se na: miševima soja *Hannover National Medical Institute* (Hann:NMRI) (model *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (*EAC*)), i na pacovima *Sprague Dawley* (model *Hepatom AS30D*). Eksperimentalni miševi i pacovi su slučajnim izborom podeljeni u grupe po šest (6) jedinki i ogled je trajao 14 dana.

Prethodnim pilot eksperimentom proverena je zavisnost uticaja vodenog ekstrakta ploda štavolja na ćelije *EAC/AS30D* od primenjene doze. Provereno je šest doza (2 mL/kg t.m., 1,5 mL/kg t.m., 1 mL/kg t.m., 0,5 mL/kg t.m., 0,2 mL/kg t.m., 0,1 mL/kg t.m.) i na osnovu toga su određene doze koje su primenjivane u eksperimentima: 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m.

Miševi (pacovi) su podeljeni u grupe po šest (6) jedinki u svakoj (n=6), i to:

- Grupa kontrolna CTRL *EAC/AS30D* – miševi (pacovi) sa implantiranim ćelijama *EAC/AS30D*, tretirane su fiziološkim rastvorom (*per os*), tokom 14 dana,
- Grupa A – F PRETRETMAN – miševi (pacovi) su pretretirane ispitivanim vodenim ekstraktom ploda štavolja, odnosno NALC, odgovarajuće doze 1 mL/kg telesne mase (t.m.), 2 mL/kg t.m. ili 5 mL/kg t.m. (*per os*), tokom 7 dana, a ćelije *EAC/AS30D* su implantirane 7. dana,
- Grupa A – F TRETMAN – miševi (pacovi) su tretirane ispitivanim vodenim ekstraktom ploda štavolja, odnosno NALC, odgovarajuće doze 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. ili 5 mL/kg t.m. (*per os*), 7 dana, a ćelije *EAC/AS30D* su implantirane 1. dana,
- Grupa A – F POSTTRETMAN – miševi (pacovi) su posttretirane ispitivanim vodenim ekstraktom ploda štavolja, odnosno NALC, odgovarajuće doze 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. ili 5 mL/kg t.m. (*per os*), tokom 7 dana, sa početkom 7 dana nakon implantacije ćelija *EAC/AS30D*.

Po završetku 14-og dana, sve životinje (i miševi i pacovi) su žrtvovane i sakupljen je ascites *EAC* i *AS30D* za dalje biohemijske analize. Da bi se proverila hipoteza da se uticaj vodenog ekstrakta ploda štavolja na rast i razvoj tumora zasniva na promeni antioksidantnog statusa u ćelijama *EAC/AS30D*, isti postupak je ponovljen i sa jednim antioksidantom, N-acetil-L-cisteinom (Sigma, 5mM), u istim dozama kao ispitivani ekstrakt.

4.4.4. Eksperimentalne metode u *in vivo* ispitivanjima

In vivo ispitivanje antioksidantnih svojstava vodenog ekstrakta ploda štavolja podrazumevalo je praćenje biohemijskih parametara (iz homogenata jetre i hemolizata krvi) oksidativnog stresa, kao i ispitivanje potencijalnog hepatoprotektivnog efekta vodenog ekstrakta ploda štavolja nakon intoksikacije sa ugljentetrahloridom (CCl_4).

Biohemijski testovi su uključivali određivanje aktivnosti nekoliko antioksidantnih enzima: superoksid dismutaze, SOD (125), ksantin oksidaze, XOD (126), katalaze, CAT (127), glutation peroksidaze, GSHPx (128), glutation reduktaze, GR (129), kao i sadržaja redukovano glutationa, GSH (130), i intenziteta lipidne peroksidacije, LPx (120). U cilju dobijanja podataka o potencijalnom hepatoprotektivnom dejstvu ispitivanog vodenog ekstrakta ploda štavolja određivani su sledeći parametri: telesna masa, masa jetre, sadržaj ukupnih proteina, AST, ALT i bilirubina, kao i sadržaj hidroksiprolina i DNK iz hepatocita.

Biohemijsko-histološki testovi u toku *in vivo* ispitivanja antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda štavolja obuhvatali su: 1) praćenje rasta tumora (volumen ascitesa), 2) određivanje broja tumorskih ćelija, 3) određivanje ćelijske vijabilnosti, i 4) određivanje aktivnosti nekoliko antioksidantnih enzima (SOD, XOD, CAT, GSHPx, GR), količine redukovano GSH i intenziteta lipidne peroksidacije (LPx) u *EAC/AS30D* ćelijama.

Superoksid dismutaza (SOD)

Sadržaj superoksid dismutaze (SOD) je određen spektrofotometrijski na osnovu promene apsorbanca na 560 nm, prema proceduri koja je detaljno opisana u radu Weydert i Cullen (125). Za generisanje superoksid anjon radikala korišćen je sistem ksantin-ksantin oksidaza. Redukcija nitroplavog tetrazolijuma je bila indikator produkcije superoksid anjon radikala. Metoda se

zasniva na kompeticiji nitroplavog tetrazolijuma i enzima SOD za superoksid anjon radikal, i merenju stepena inhibicije redukcije nitroplavog tetrazolijuma kao mere aktivnosti enzima SOD.

Ksantin oksidaza (XOD)

Sadržaj ksantin oksidaze (XOD) je određen spektrofotometrijski na osnovu promene apsorbanca na 293 nm, pri prelazu ksantina u mokraćnu kiselinu.

Na uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50 μL , dodato je 3 mL fosfatnog pufera, pH 7,5 (optimalna pH za XOD), u kome se nalazio rastvor EDTA i ksantin u koncentraciji od 1 mol/L. Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Merena je apsorbanca reakcionog produkta na 293 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,2 \times 10^4 \text{ L/mol}\times\text{cm}$).

Aktivnost enzima ksantin oksidaze se određuje i primenom komercijalnog kita Abcam (ab102522). Metoda se zasniva na prevođenju ksantina u vodonik-peroksid dejstvom enzima XOD. Nastali H_2O_2 dalje reaguje gradeći obojeni kompleks. Izmerena apsorbanca na 570 nm direktno je proporcionalna aktivnosti enzima XOD (131).

Katalaza (CAT)

Sadržaj katalaze (CAT) je određen primenom vodonik-peroksida (H_2O_2) kao supstrata.

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50 μL , dodat je u 3 mL rastvora fosfatnog pufera (KP_i), pH 7, koncentracije 0,05 mol/L, (u koji je dodato 0,075 mL 30%-nog rastvora H_2O_2 na 50 mL KP_i). Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Merena je apsorbanca na 240 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=4,36 \times 10^4 \text{ L/mol}\times\text{cm}$).

Aktivnost enzima katalaze se određuje i primenom komercijalnog kolorimetrijskog kita Abcam (ab83464). Metoda se zasniva na prevođenju vodonik-peroksida u vodu i kiseonik, dejstvom enzima katalaze iz uzorka. Količina H_2O_2 koja nije konvertovana gradi obojeni kompleks. Aktivnost enzima CAT je obrnuto proporcionalna izmerenoj apsorbanca na 570 nm (132).

Glutation peroksidaza (GSHPx)

Sadržaj glutation peroksidaze (GSHPx) je određen pomoću kumulativnog hidropoksida (α -dimetil-benzilhidropoksida) kao supstrata.

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50 μ L, pomešan je sa 0,75 mL TRIS/HCl pufera (pH 7,6), $c=5 \times 10^{-2}$ mol/L (pufer I) i termostatiran 10 minuta na 37 °C. U reakcionu smešu je zatim dodat 0,1 mL rastvora GSH, $c=2,1 \times 10^{-3}$ mol/L i 0,1 mL rastvora kumulativnog hidropoksida u metanolu, (1:200) i ponovo termostatirano 5 minuta na 37 °C. Potom je dodato 1 mL 20%-nog rastvora TCA, da bi se reakcija stopirala. Reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Zatim je u 2 mL TRIS/HCl pufera, pH 8,9 (pufer II), $c=0,4$ mol/L, dodat 1 mL supernatanta i 0,1 mL rastvora DTNB (0,02 g u 5 mL pufera II). Merena je apsorbanca na 412 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,36 \times 10^4$ L/mol \times cm).

Aktivnost enzima glutation peroksidaze se određuje i primenom komercijalnog kolorimetrijskog kita BioVision. U ovoj metodi, dejstvom enzima GSHPx kumulativni hidropoksida se redukuje, a GSH oksiduje u GSSG. Zatim se posredstvom enzima GR vrši redukcija GSSG u GSH, uz trošenje NADPH. Merenjem apsorbanca na 340 nm uočeno je sniženje koncentracije NADPH, kao mere aktivnosti enzima GSHPx (133).

Glutation reduktaza (GR)

Sadržaj glutation reduktaze je određen praćenjem enzimске reakcije redukcije oksidovanog glutationa (GSSG), u prisustvu NADPH.

Na uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50 μ L, dodato je 0,2 mL 2%-nog rastvora GSSG, 0,3 mL rastvora NADPH, $c=1 \times 10^{-3}$ mol/L, a optimalna pH vrednost je podešena dodavanjem 2 mL fosfatnog pufera (KP_i), pH 7,6. Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Zatim je merena apsorbanca nastalog produkta na 340 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon= 6,22 \times 10^3$ L/mol \times cm).

Aktivnost enzima glutation reduktaze se određuje i primenom komercijalnog kolorimetrijskog kita BioVision. Metoda se zasniva na konvertovanju GSSG u GSH dejstvom enzima GR. Nastali GSH dalje reaguje sa 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojevom kiselinom) i formira žuto obojeni kompleks, sa maksimumom apsorpcije na 405 nm (134).

Redukovani glutation (GSH)

Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) određen je na osnovu količine ne-protein sulfhidrilnih ostataka pomoću *Ellman*-ovog reagensa.

Određivanje GSH u krvi: U uzorak hemolizata krvi zapremine 2 mL, dodato je 3 mL rastvora 4%-ne sulfosalicilne kiseline i centrifugirano 10 minuta na 3000 o/min. Potom je na određenu zapreminu supernatanta dodat *Ellman*-ov reagens (smeša 0,2 mol/L rastvora DTNB i 1×10^{-3} mol/L rastvora KP_i , pH 8) u odnosu 1:4. Merena je apsorbanca nastalog obojenog proizvoda na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta ($\epsilon=1,36 \times 10^4$ L/mol \times cm), a preračunat na mL eritrocita preko hematokrita.

Određivanje GSH u homogenatu: Uzorak ćelija, zapremine 1 mL, centrifugiran je sa 2 mL rastvora 4%-ne sulfosalicilne kiseline, 10 minuta na 3000 o/min. Određena zapremina supernatanta je pomešana sa rastvorom *Ellman*-ovog reagensa u odnosu 1:40. Merena je apsorbanca na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta, a preračunat na mg proteina preko ukupnih proteina.

Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx)

Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx) određen je primenom TBA-testa. Merena je oksidacija lipida ćelijskih membrana preko reakcije lipid-peroksidnih produkata nastalih u reakcionom sistemu (malonildialdehida) sa tiobarbiturnom kiselinom.

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50 μ L, je zagrevan 15 minuta na ključalom vodenom kupatilu sa 3 mL rastvora Činidle (tiobarbiturna kiselina 0,375% u 15% TCA (3,75 g TBA + 15 g CCl_3COOH + 20,72 mL 37% HCl + jedna-dve kapi α -tokoferola na 1L rastvora)). Rastvor je zatim centrifugiran 10 minuta na 3000 o/min i merena je apsorbanca nastalog proizvoda reakcije na 535 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,56 \times 10^5$ L/mol \times cm).

Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Ukupni proteini određeni su biuretskom metodom (63, 135).

Na 50 μ L uzorka homogenata jetre i na 50 μ L standarda dodato je 2,5 mL rastvora biuretskog reagensa ($CuSO_4 \times 5H_2O$ - 0,15%, K,Na-tartarat - 0,6%, rastvor KI - 0,1% u 0,85

mol/L NaOH i deoksiholat - 1,5%), i nakon 30 minuta merena je apsorbance nastalog jedinjenja na 540 nm. Koncentracija proteina određen je iz proporcije:

$$c_t : c_s = A_t : A_s,$$

gde su:

c_s – koncentracija standarda, $c_s=50$ g/L,

c_t – koncentracija uzorka,

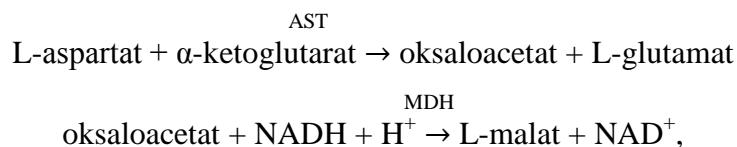
A_s – apsorbance standarda,

A_t – apsorbance uzorka.

Serumski parametri funkcije jetre – AST, ALT, bilirubin

Aktivnost serumske aspartat transaminaze (AST) i alanin transaminaze (ALT) je određena fotometrijski, po modifikovanoj metodi opisanoj u Čebović (135) i Spasić i saradnici (136).

Metoda za određivanje aktivnosti AST zasniva se na sledećim reakcijama:



gde je MDH – malat dehidrogenaza.

Posledica oksidacije NADH u NAD^+ je promena apsorbance.

Za određivanje aktivnosti AST korišćeni su serum miševa i AST kit („DIALAB” kit za enzim AST) koji se sastoji iz:

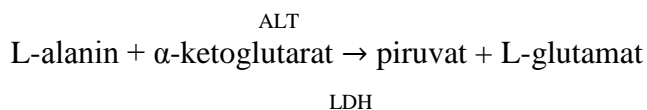
Rastvor 1: Tris pH 7,8, L- aspartat i MDH

Rastvor 2: NADH i α -ketoglutarat.

Mešanjem četiri volumena Rastvora 1 sa jednim volumenom Rastvora 2 dobijen je radni rastvor. Zatim je u kivetu preneto 1,5 mL radnog rastvora i 300 μL seruma. Merena je apsorbance na 340 nm svakog minuta (4 merenja) i određena je srednja vrednost apsorbance ($\Delta A/\text{min}$). Aktivnost AST je izračunata iz jednačine:

$$\text{AST (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times \text{faktor}; \text{faktor} = 952.$$

Metoda za određivanje aktivnosti ALT zasniva se na sledećim reakcijama:





gde je LDH – laktat dehidrogenaza.

Posledica oksidacije NADH u NAD⁺ je promena apsorbance.

Za određivanje aktivnosti ALT korišćeni su serum miševa i ALT kit („DIALAB” kit za enzim ALT) koji se sastoji iz:

Rastvor 1: Tris pH 7,5, L-alanin i LDH

Rastvor 2: NADH i α-ketoglutarat.

Mešanjem četiri volumena Rastvora 1 sa jednim volumenom Rastvora 2 dobijen je radni rastvor. Zatim je u kivetu preneto 1,5 mL radnog rastvora i 300 μL seruma. Merena je apsorbance na 340 nm svakog minuta (4 merenja) i određena je srednja vrednost apsorbance (ΔA/min). Aktivnost ALT je izračunata iz jednačine:

$$\text{ALT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times \text{faktor}; \text{faktor} = 952.$$

Sadržaj bilirubina je određen fotometrijski, primenom reakcije sa dijazo reagensom, po metodi opisanoj u Čebović (135) i Kovačević (137). Metoda se zasniva na reakciji bilirubina sa dijazo reagensom formirajući kompleks azo-bilirubina ružičaste boje sa apsorbancom na 540 nm.

Za određivanje sadržaja bilirubina korišćen je komercijalni kit („DIALAB” kit za bilirubin), odnosno serum miševa, standard bilirubina, Reagens 1 (sulfanilinska kiselina, NaCl i EDTA) i Reagens 2 (EDTA, hidrohlorna kiselina, 2,4-dihlorofenil diazonijum so).

Merena je apsorbance na 540 nm uzorka (200 μL seruma sa 2 mL Reagens 1) i standarda (200 μL standarda seruma sa 2 mL Reagens 1) prema slepoj probi (200 μL H₂O sa 2 mL Reagens 1). Izmerene apsorbance su označene kao A_{1T} za uzorak i A_{1S} za standard. Uzorku i standardu je dodato po 500 μL Reagens 2. Ponovo je izmerena apsorbance na 540 nm uzorka i standarda i označena kao A_{2T} i A_{2S}. Koncentracija uzorka je izračunata iz proporcije:

$$c_t : c_s = \Delta A_t : \Delta A_s,$$

gde su:

c_s – koncentracija standarda, c_s=6,16 μmol/L,

c_t – koncentracija uzorka,

ΔA_s – apsorbance standarda, ΔA_s=A_{2S}-A_{1S},

ΔA_t – apsorbance uzorka, ΔA_t=A_{2T}-A_{1T}.

Određivanje hidrokspiroolina

Koncentracija hidrokspiroolina u jetri je određena po modifikovanoj metodi opisanoj u Cissell i saradnici (138). Na uzorak je dodat rastvor hloramina-T u smeši 74% v/v H₂O, 26% v/v 2-propanol, 0,629 M NaOH, 0,140 M limunska kiselina (monohidrat), 0,453 M natrijum-acetat (anhidrovani), i 0,112 M glacijalna sirćetna kiselina. Zatim je dodat *Ehrlich*-ov rastvor (1 M p-dimetilaminobenzaldehid u 30% v/v HCl i 70% v/v 2-propanol) uz mućkanje na vorteksu. Nakon inkubacije na 65°C, i hlađenja, merena je apsorbanca na 550 nm.

Određivanje sadržaja DNK hepatocita

Za biohemijsko određivanje sadržaja DNK hepatocita korišćena je modifikovana metoda opisana u Čebović (135) i Schulte-Hermann i saradnici (139). Metoda se zasniva na prevođenju deoksiriboze (oslobođena iz DNK u kiseloj sredini) u furfural i merenju apsorbance na 600 nm plavog kompleksa furfurala sa difenilaminom.

Merena je apsorbanca na 600 nm uzorka (1 mL DNK uzorka sa 2 mL *Burton*-ovog reagensa) i standarda (1 mL standarda DNK sa 2 mL *Burton*-ovog reagensa) prema slepoj probi (1 mL H₂O sa 2 mL *Burton*-ovog reagensa). Izmerene apsorbance su označene kao A_t za uzorak i A_s za standard. Koncentracija uzorka je izračunata iz proporcije:

$$c_t : c_s = A_t : A_s,$$

gde su:

c_s – koncentracija standarda, $c_s=250 \mu\text{g/mL}$,

c_t – koncentracija uzorka,

A_s – apsorbanca standarda,

A_t – apsorbanca uzorka.

Određivanje broja tumorskih ćelija i ćelijske vijabilnosti

Ascites *Ehrlich*-ovog tumora i *Hepatom AS30D* je prenesen u rastvor Krebs-Ringer-ovog fosfatnog pufera (0°C, pH 7,4). Dobijena suspenzija je zatim podvrgnuta nizu centrifugiranja pri 4500 rpm (MSE HIGH SPEED centrifuga na 4°C) i 12000 rpm (Eppendorf 3200 centrifuga, 2,5 min) da bi dobili gustu suspenziju ćelija (1:1). Nakon toga, određivana je težina ćelija, kao i broj ćelija izražen kao broj ćelija/mm³ (brojanje vršeno u Neubauer-ovoj komori).

Vijabilnost ćelija je određena na primenom tripan plavog (0,4% rastvor u Krebs-Ringer-ovom fosfatnom puferu), boje koja ne ulazi u intaktne ćelije, već boji oštećene ćelije. Rezultati su izraženi kao % oštećenih ćelija.

Biohemijski testovi

Aktivnosti nekoliko antioksidantnih enzima (SOD, XOD, CAT, GSHPx, GR), količina redukovano GSH i intenzitet lipidne peroksidacije (LPx) su određivani u *EAC/AS30D* ćelijama.

4.5. *In vitro* ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

4.5.1. Određivanje broja trombocita

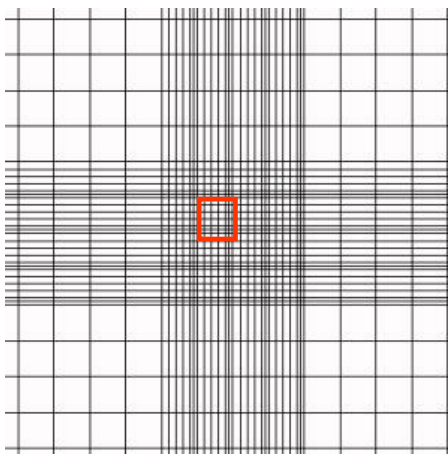
Koncentrat trombocita koji se koristio u eksperimentu dobijen je iz Instituta za transfuziju u Novom Sadu. Trombociti su bili zastareli (nakon 5 dana) za medicinsku upotrebu i bio je smanjen njihov broj, ali su i dalje bili vijabilni. Čuvani su uz neprestano blago mešanje na temperaturi od 20°C do 24°C. Nakon tretiranja trombocita 1% amonijum-oksalamatom, određen je njihov tačan broj brojanjem u Neubauer-ovoj komori (Slika 4.5.), pri čemu se pod mikroskopom vijabilni trombociti uočavaju kao svetlučave čestice.

Najpre je pripremljen rastvor trombocita za brojanje: mešanjem 10 µL koncentrata trombocita i 990 µL 1% rastvora amonijum-oksalata, pri čemu je dobijeno razblaženje od 100 puta. Nakon 10 min stajanja rastvora na sobnoj temperaturi pre brojanja, 10 µL pripremljenog rastvora nanosio se u Neubauer-ovu komoru. Kada su se trombociti „umirili“ posle nekoliko minuta, brojanje je vršeno u centralnom kvadratu u odabranim kvadratićima, najmanje četiri puta, na mikroskopskom uvećanju od 40 puta. Brojani su trombociti koji svetlucaju, pri čemu se u obzir uzimaju trombociti u samom kvadratiću i trombociti koji se nalaze na dve odabrane strane kvadratića (npr. desna i donja strana, ili leva i gornja strana). Isti princip je korišten za svaki kvadratić odabran za brojanje.

Visina komore iznosila je 0,1 mm, a površina jednog kvadratića u kom se broje trombociti 0,04 mm², tako da je zapremina u kojoj se broje trombociti 4×10^{-3} mm³ tj. 4×10^{-6} mL. Uzevši

u obzir dimenzije komore, kao i razblaženje trombocita, formirana je formula po kojoj je određen broj trombocita i ona glasi:

$$\text{broj trombocita/mL} = (\text{srednja vrednost izbrojanih trombocita} \times \text{razblaženje (100)}) / (4 \times 10^{-6})$$



Slika 4.5. Neubauer-ova komora - kvadrat u kojem se broje trombociti.

4.5.2. Eksperimentalni postupak za određivanje inhibicije nastajanja metabolita arahidonske kiseline

Za određivanje antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i standardnih jedinjenja primenjena je modifikovana metoda Safayhi i saradnika (140). Metoda je zasnovana na određivanju sposobnosti inhibicije produkcije medijatora inflamacije, odnosno produkata ciklooksigenaznog i lipoksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, 12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE, u intaktnom ćelijskom sistemu (humanim trombocitima), gde je proces inflamacije izazivan dejstvom kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin) (117, 141, 142).

Opšti postupak:

1. Preinkubacija trombocita u puferu;
2. Dodavanje ispitivanog ekstrakta ili jedinjenja – vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*;
3. Inkubacija;
4. Dodavanje dvovalentne katjonske jonofore A23184 (kalcimicin);

5. Inkubacija;
6. Dodavanje kalcijum-hlorida;
7. Inkubacija;
8. Zaustavljanje reakcije mravljom kiselinom;
9. Dodavanje internog standarda (PGB₂);
10. Izolovanje nastalih 12-HHT, 12-HETE, PGE₂ i TXB₂;
11. Kvantitativno praćenje metabolita/internog standarda pomoću LC-MS/MS tehnike.

Početne koncentracije ispitivanih uzoraka:

ektrakta ploda *R. crispus*: 1,25, 2,50, 5,00, 10,00, 25,00, 50,00 mg/mL;

standarda kvercetina: 0,156, 0,312, 0,625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/mL.

Napravljene su odgovarajuće serije razblaženja ekstrakta i standardnog jedinjenja.

Eksperimentalni postupak je prikazan u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Eksperimentalni postupak za određivanje inhibicije produkcije metabolita 12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE.

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Slepa proba
4 × 10 ⁸ trombocita u 2,0 mL pufera pH 7,2	4 × 10 ⁸ trombocita u 2,0 mL pufera pH 7,2	4 × 10 ⁸ trombocita u 2,0 mL pufera pH 7,2	4 × 10 ⁸ trombocita u 2,0 mL pufera pH 7,2
0,1 mL ekstrakt/standard	0,1 mL ekstrakt/standard	0,1 mL rastvarača	0,1 mL rastvarača
0,1 mL 125 μmol/L A23187	0,1 mL DMSO	0,1 mL 125 μmol/L A23187	0,1 mL DMSO
0,3 mL 16,66 mmol/L CaCl ₂	0,3 mL dH ₂ O	0,3 mL 16,66 mmol/L CaCl ₂	0,3 mL dH ₂ O
5,8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5,8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5,8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5,8 mL 1% HCOOH (4°C)*
50 μL 6 μg/mL PGB ₂	50 μL 6 μg/mL PGB ₂	50 μL 6 μg/mL PGB ₂	50 μL 6 μg/mL PGB ₂
8,0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)	8,0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)	8,0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)	8,0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)

* u slučaju da se formira gel, smeša se, pre dodatka 1% HCOOH, intenzivno mućka (Vortex) do tečnog stanja.

LC-MS/MS analiza je korišćena za izolovanje jedinjenja: 12-HHT, TXB₂, PGE₂, 12-HETE i PGB₂. Za hromatografsko razdvajanje koristila se Zorbax SB-C18 30 mm × 2,1 mm × 3,5 μm (Agilent Technologies) reversno-fazna kolona pri temperaturi od 65°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0,6% sirćetne kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1,0 mL/min. Primenjivao se gradijentni mod, koji podrazumeva sledeći odnos faza: 0,0 min 65% B, 2,0 min 100% B, 3,5 min 100% B, sa post-vremenom od 3,0 min. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μL. ESI parametri su bili: gas za sušenje (N₂) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi i napon na kapilari 4 kV, dok su ostali optimizovani parametri prikazani su u Tabeli 4.2. Kvantifikacija jedinjenja urađena je u negativnom MRM modu.

Tabela 4.2. Optimizovani parametri za kvantifikaciju 12-HHT, TXB₂, PGE₂, 12-HETE i PGB₂.

Jedinjenje	Mod	Polaritet jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)	Napon fragmentora (V)
12-HHT	MRM	NI	[M-H] ⁻	279	261	5	120
TXB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	369	169	15	120
PGE ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	351	271	15	120
12-HETE	MRM	NI	[M-H] ⁻	319	310	7	120
PGB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	333	315	13	120

Na osnovu odnosa površine pika metabolita (12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE) i površine pika internog standarda (PGB₂) izračunate su vrednosti R_{rp} (radna proba), R_{kor} (korekcija), R_{kon} (kontrola) i R_{sp} (slepa proba) za odgovarajuće probe, a inhibicija produkcije metabolita i enzima izračunata je sledećom jednačinom:

$$I (\%) = (1 - (R_{rp} - R_{kor}) / (R_{kon} - R_{sp})) \times 100\%$$

Na osnovu I vrednosti određene su IC₅₀ vrednosti (koncentracija pri kojoj je aktivnost produkcije metabolita/enzima inhibirana 50%) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija I (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC₅₀ vrednosti ± standardna devijacija (mg/mL).

4.6. Statistička analiza

Rezultati, dobijeni merenjem određenog broja uzoraka, izraženi su kao srednja vrednost±standardna devijacija srednje vrednosti. Urađen je Studentov *t*-test radi identifikacije statističkih razlika. *p* vrednosti 0,05 ili niže ($p < 0,05$) smatrane su statistički značajnim. Za poređenje rezultata dobijenih za različite koncentracije ekstrakta, različite načine aplikacije ekstrakata, ili razlike po dva parametra (ekstrakt/doza, odnosno ekstrakt/način aplikacije), korišćene su dve statističke metode: jednofaktorska i dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA). Značajne statističke razlike su identifikovane primenom dva post-hoc testa: Tuckey testa, i Bonferroni post-hoc testa.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Fitohemijski sastav vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

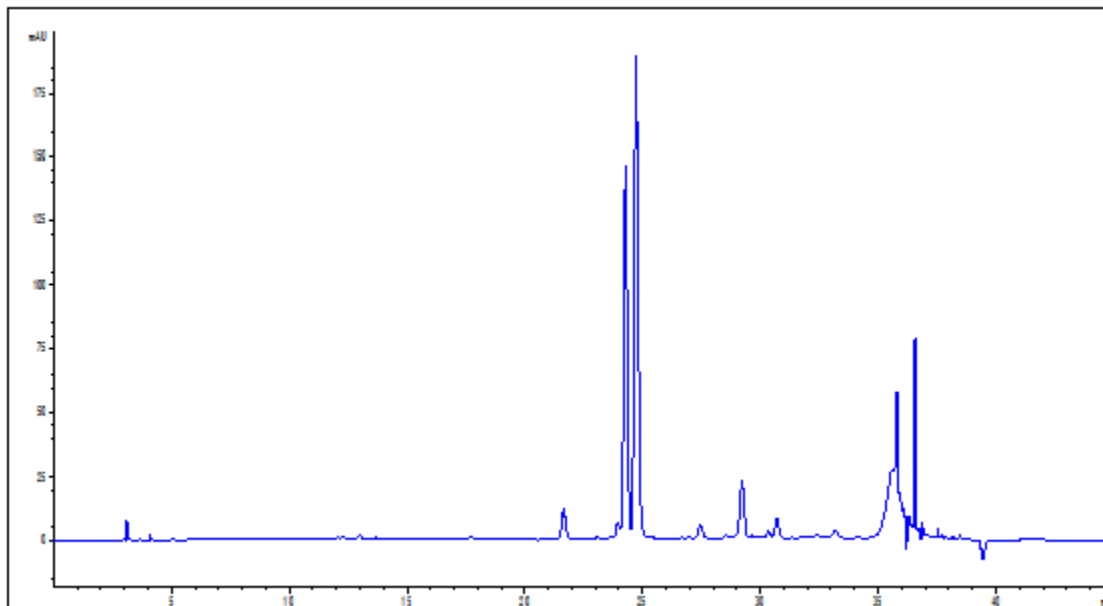
Glavni cilj fitohemijskog ispitivanja sastava vodenog ekstrakta ploda šavelja predstavljao je određivanje ukupnih flavonoida, kao i kvalitativno i kvantitativno određivanje najdominantnijih polifenolnih jedinjenja, koji su prisutni u ekstraktu vrste *R. crispus*, primenom HPLC/UV-VIS. Sadržaj ukupnih flavonoida, izračunat nakon analize čija je procedura detaljno opisana u eksperimentalnom delu disertacije, iznosio je 0,67%. U Tabeli 5.1. prikazani su rezultati ispitivanja fitohemijskog sastava ekstrakta *R. crispus*. Iz Tabele 5.1. vidi se da je mikvelianin najdominantniji flavonoidni heterozid u vodenom ekstraktu ploda šavelja, sa koncentracijom 2,41%, a zatim sledi hiperozid sa koncentracijom 0,79%. Mikvelianin i hiperozid kao aglikonsku komponentu sadrže kvercetin.

Hromatogram prečišćenog vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* snimljen je na 210 nm i 350 nm. Međutim, zbog izraženih interferencija na 210 nm, za dalju analizu i obradu odabran je hromatogram snimljen na 350 nm. Hromatogram prečišćenog vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* snimljen na 350 nm prikazan je na Slici 5.1.

Tabela 5.1. Fitohemijski sastav vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*.

Polifenolna komponenta	Sadržaj (%)
Hiperozid	0,789 ± 0,007
Katehin	0,047 ± 0,001
Mikvelianin	2,409 ± 0,020
Galna kiselina	0,300 ± 0,003

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (SD), n=3.



Slika 5.1. Hromatogram prečišćenog vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* snimljen na 350 nm.

U studiji Maksimović i saradnika (7) TLC analizom metanolnog ekstrakta ploda *R. crispus* potvrđeno je prisustvo polifenola, kao što su flavonoidi (slobodni i vezani u glikozide), fenolne kiseline i procijanidini. Takođe, brojne studije su pokazale prisustvo fenolnih jedinjenja u različitim ekstraktima *R. crispus* (8, 17). Idris i saradnici (10) su pokazali da vodeni ekstrakti lista i korena sadrže flavonoide, a njihov sadržaj je računat na kvercetin. Kvercetin pripada flavonolima, i jedan je od najčešće izučavanih flavonoida (11). Pripisuju mu se antivirusna aktivnost, antitumorska, antioksidantna, antiinflamatorna dejstva, a takođe ima i sposobnost inhibicije agregacije trombocita i lipidne peroksidacije (11, 15, 143). Sebastian i saradnici (12) merili su dnevni unos flavonoida, i došli su do zaključka da je kvercetin jedan od najviše unošenih flavonoida putem ishrane.

5.2. *In vitro* antioksidantna svojstva vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

In vitro antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* ispitivana je prema protokolu koji je detaljno opisan u eksperimentalnom delu disertacije. Ispitivanja su izvedena sa osnovnim rastvorom i pet razblaženja. Sva merenja su ponovljena šest puta.

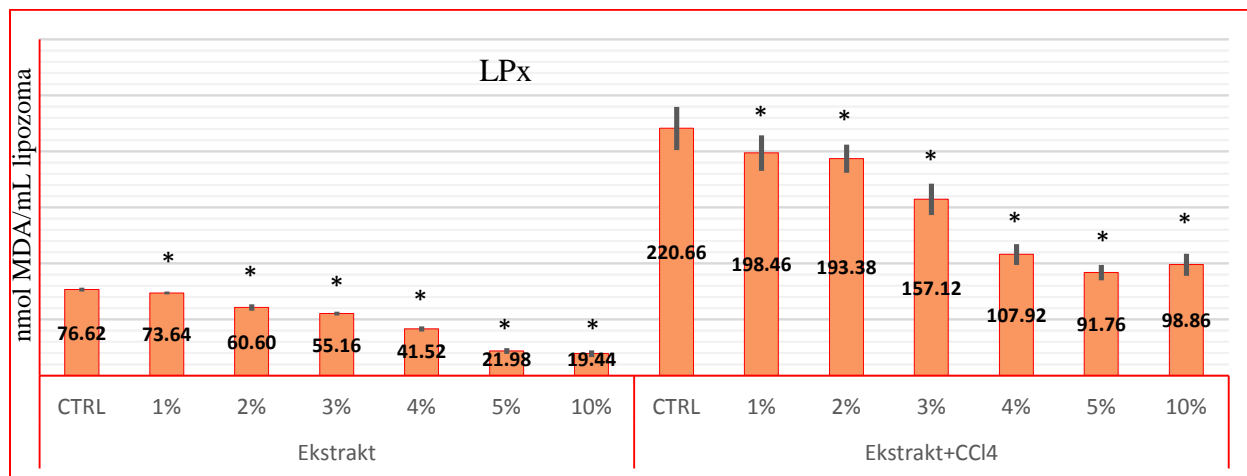
5.2.1. Intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma, bez prisustva i u prisustvu CCl₄, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma, bez prisustva i u prisustvu CCl₄, nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavelja prikazani su u Tabeli 5.2. Iz Tabele 5.2. se vidi da su sve koncentracije pomenutog ekstrakta smanjile intenzitet *in vitro* lipidne peroksidacije (LP_x) lipozoma u odnosu na kontrolu. Najjači inhibitori efekat postignut je koncentracijom 10% ekstrakta bez prisustva ugljentetrahlorida, dok je u prisustvu pomenutog jedinjenja, koncentracija 5% ekstrakta pokazala najveće smanjenje intenziteta LP_x. Utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. bez prisustva CCl₄, između kontrolne grupe i grupe sa primenjenom koncentracijom 1% ($t=3,127$, $p=0,014$), dok nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u prisustvu CCl₄ (LP_x+CCl₄) između kontrolne grupe i grupe kod koje je primenjena 1% koncentracija. Rezultati svih komparacija u odnosu na kontrolnu grupu su označeni u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.1.

Tabela 5.2. Intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma, bez prisustva i u prisustvu CCl₄, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 76,62±1,61	1%	2%	3%
		73,64±1,39*	60,60±2,79*	55,16±1,69*
		4%	5%	10%
		41,52±2,17*	21,98±2,56*	19,44±3,02*
sa CCl ₄	CTRL 220,66±18,93	1%	2%	3%
		198,46±15,75*	193,38±12,63*	157,12±14,00*
		4%	5%	10%
		107,92±9,42*	91,76±6,89*	98,86±9,84*

Intenzitet lipidne peroksidacije je izražen u nmol MDA/mL lipozoma. Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). CTRL – kontrola. *- statistički značajna razlika u odnosu na CTRL.



Grafikon 5.1. Intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma, bez prisustva i u prisustvu CCl₄, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., bez prisustva CCl₄ (LP_x), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju (ANOVA F=429,22, p<0,001). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnom intenzitetu lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., bez prisustva CCl₄, između uzastopnih koncentracija: 1% i 2% (p<0,001), 2% i 3% (p=0,014), 3% i 4%

($p < 0,001$), 4% i 5% ($p < 0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom intenzitetu LP_x između koncentracije 5% i 10% ($p = 0,537$). Ispitivani ekstrakt je u koncentraciji 5% bez prisustva ugljentetrahlorida pokazao najveći inhibitorni efekat na sintezu MDA, kao indikatora lipidne peroksidacije. Rezultati su bili uporedivi sa radom Maksimović i saradnici (7), u kome je ispitivan metanolni ekstrakt ploda štavolja, kao i kvercetin i BHT. Rezultati svih međusobnih komparacija u odnosu na nivo koncentracije (%) prikazani su u Tabeli 5.3.a).

Analiziranjem intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., u prisustvu CCl_4 ($LP_x + CCl_4$), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjenu koncentraciju (ANOVA $F = 83,174$, $p < 0,001$). Daljom post-hoc analizom (Tukey) utvrđene su značajne razlike u prosečnom intenzitetu lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., u prisustvu CCl_4 , između sledećih uzastopnih koncentracija: 2% i 3% ($p = 0,001$), i 3% i 4% ($p < 0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima $LP_x + CCl_4$ između koncentracije 1% i 2% ($p = 0,983$), 4% i 5% ($p = 0,316$), kao i 5% i 10% ($p = 0,931$). Rezultati svih ostalih međusobnih poređenja u odnosu na različite koncentracije prikazani su u Tabeli 5.3.b).

Tabela 5.3. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u odnosu na koncentraciju.

a) bez prisustva CCl_4

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	**					
3%	**	*				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

b) u prisustvu CCl_4

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	**	**				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	ns		
10%	**	**	**	ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U literaturi ne postoje rezultati za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus*. Maksimović i saradnici (7) su ispitivali intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma nakon primene metanolnog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Utvrđena je potencijalna sposobnost pomenutog ekstrakta da inhibira LP_x , „hvatanjem” hidroksil radikala, koji je produkovan u toku metode. Ovi rezultati su

bili uporedivi sa supstancama kao što su BHT i kvercetin (7). Tukappa i saradnici (144) su ispitivali metanolni ekstrakt cele biljke *Rumex vesicarius* L. i utvrdili značajan inhibitorski efekat ekstrakta na pojavu lipidne peroksidacije. Ganaie i saradnici (145) su ispitivali, takođe, metanolni ekstrakt cele biljke *Rumex vesicarius* L. i dobili rezultate koji pokazuju značajno smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije nakon primene ekstrakta. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* bili su u skladu sa pomenutim radovima.

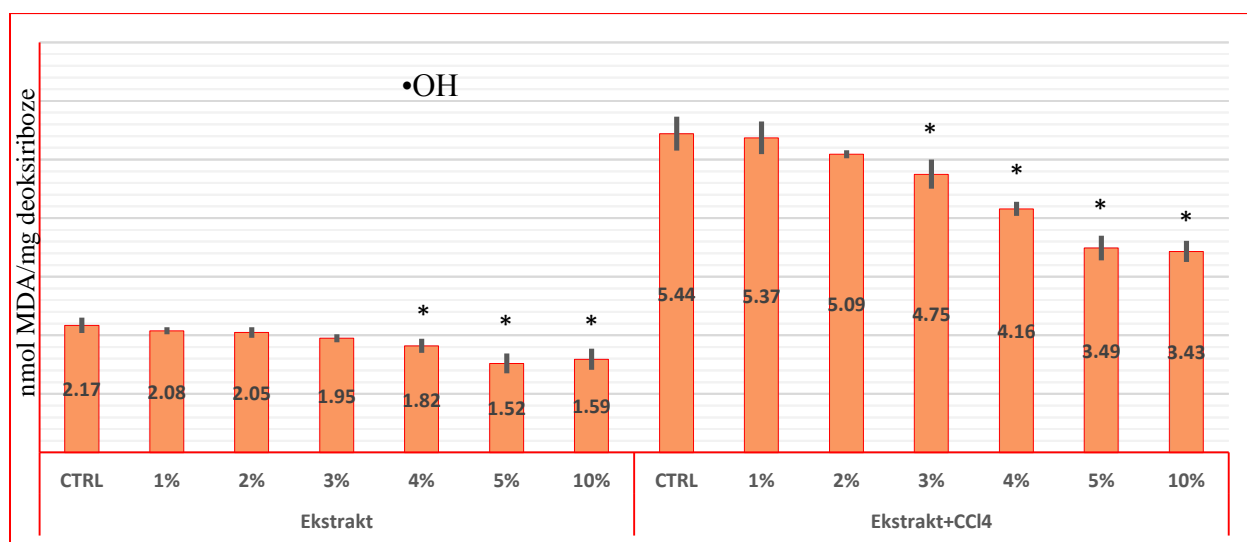
5.2.2. Intenzitet produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala, bez prisustva i u prisustvu CCl_4 , nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja intenziteta produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala, bez prisustva i u prisustvu CCl_4 , nakon primene vodenog ekstrakta ploda štafelja prikazani su u Tabeli 5.4. Iz Tabele 5.4. se vidi da su sve koncentracije pomenutog ekstrakta smanjile intenzitet *in vitro* produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala u odnosu na kontrolu. Najjači inhibitorski efekat postignut je koncentracijom 5% ekstrakta bez prisustva ugljentetrahlorida, dok je u prisustvu pomenutog jedinjenja, koncentracija 10% ekstrakta pokazala najveće smanjenje intenziteta produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala. Statističkom obradom podataka nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima intenziteta produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. ni bez prisustva CCl_4 ni u prisustvu CCl_4 , između kontrolne grupe i grupe sa primenjenom koncentracijom 1% ($p=0,224$ za grupu bez prisustva ugljentetrahlorida, i $p=0,719$ za grupu u prisustvu ugljentetrahlorida). Rezultati svih komparacija u odnosu na kontrolnu grupu su označeni u Tabeli 5.4. i na Grafikonu 5.2.

Tabela 5.4. Intenzitet produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala, bez prisustva i u prisustvu CCl_4 , nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl_4	CTRL 2,17 ± 0,13	1%	2%	3%
		2,08 ± 0,06	2,05 ± 0,09	1,95 ± 0,07
		4%	5%	10%
		1,82 ± 0,12*	1,52 ± 0,17*	1,59 ± 0,18*
sa CCl_4	5,44 ± 0,29	1%	2%	3%
		5,37 ± 0,28	5,09 ± 0,07	4,75 ± 0,25*
		4%	5%	10%
		4,16 ± 0,12*	3,49 ± 0,21*	3,43 ± 0,18*

Intenzitet produkcije \bullet OH radikala je izražen u nmol MDA/mg deoksiriboze. Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). CTRL – kontrola.



Grafikon 5.2. Intenzitet produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala, bez prisustva i u prisustvu CCl_4 , nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem intenziteta produkcije hidroksil (\bullet OH) radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na

koncentraciju ($F=18,576$, $p<0,001$). Rezultati dalje analize pokazuju značajne razlike u prosečnim vrednostima produkcije hidroksil ($\bullet\text{OH}$) radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. bez prisustva ugljentetrahlorida, između uzastopnih koncentracija 4% i 5% ($p=0,008$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između koncentracije 1% i 2% ($p=1,00$), 2% i 3% ($p=0,766$), 3% i 4% ($p=0,584$), kao i 5% i 10% ($p=0,922$). Rezultati svih ostalih međusobnih poređenja u odnosu na različite koncentracije prikazani su u Tabeli 5.5.a).

Analiziranjem intenziteta produkcije hidroksil ($\bullet\text{OH}$) radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u prisustvu CCl_4 utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjenu koncentraciju (ANOVA $F=84,554$, $p<0,001$). Daljom primenom post-hoc testa (Tukey) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između sledećih uzastopnih koncentracija: 3% i 4% ($p=0,001$) i 4% i 5% ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između koncentracija 1% i 2% ($p=0,274$), 2% i 3% ($p=0,107$), kao i 5% i 10% ($p=0,997$). Rezultati svih ostalih međusobnih poređenja prosečnih vrednosti ovog parametra u odnosu na različite koncentracije prikazani su u Tabeli 5.5.b).

Tabela 5.5. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti produkcije hidroksil ($\bullet\text{OH}$) radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u odnosu na koncentraciju.

a) bez prisustva CCl_4

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	*	ns	ns			
5%	**	**	**	*		
10%	**	**	**	ns	ns	

b) u prisustvu CCl_4

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	**	ns				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U literaturi ne postoje rezultati za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus*. Maksimović i saradnici (7) su utvrdili da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* ima potencijalnu sposobnost

neutralisanja hidroksil radikala. Jeon i saradnici (146) su ispitivali intenzitet produkcije hidroksil radikala nakon primene vodenog ekstrakta korena *Rumex crispus* i utvrdili značajno smanjenje produkcije ovog radikala, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Rhim i saradnici (147) su pokazali da etanolni ekstrakti različitih delova biljke *R. crispus* sprečavaju oštećenja DNK uzrokovana delovanjem hidroksil radikala. Eddine i saradnici (148) su ispitivali etanolni ekstrakt lista *Rumex vesicarius* i utvrdili da nakon primene ekstrakta dolazi do značajnog smanjenja koncentracije ($\bullet\text{OH}$), što je u skladu sa rezultatima ove disertacije.

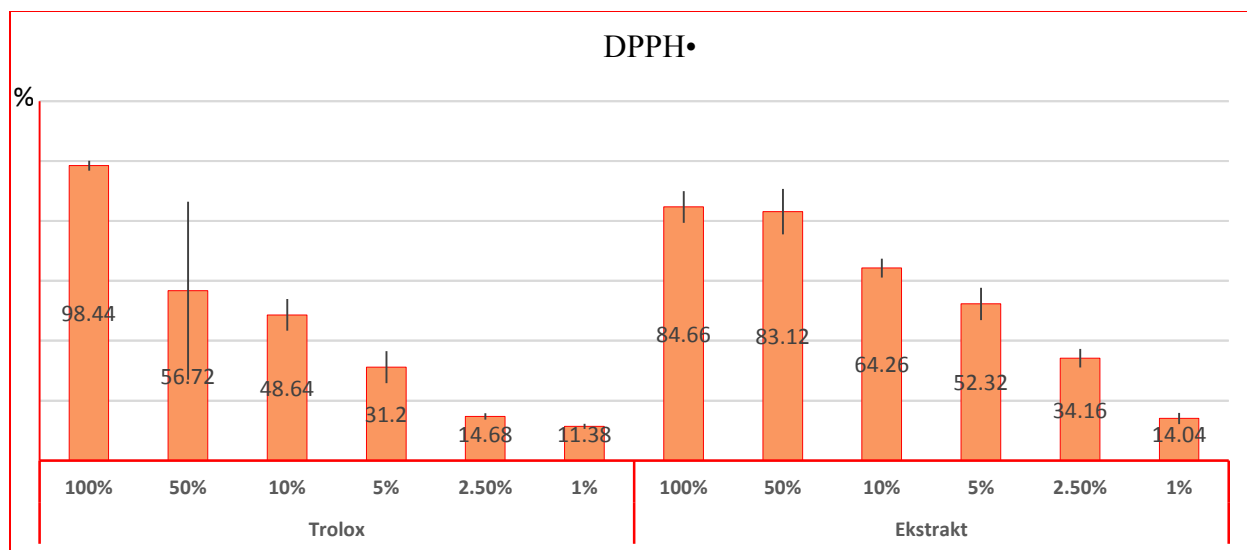
5.2.3. Intenzitet inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

In vitro antioksidantni kapacitet ispitivanog vodenog ekstrakta ploda štavolja određen je preko sposobnosti ekstrakta da „hvata” stabilni slobodni radikal – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH•). Rezultati su prikazani kao procenat „uhvaćenih”, odnosno redukovanih DPPH radikala. Određena je i IC_{50} vrednost za ispitivani ekstrakt (koncentracija ekstrakta pri kojoj dolazi do redukcije 50% DPPH• radikala). Rezultati ispitivanja intenziteta inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. prikazani su u Tabeli 5.6. i na Grafikonu 5.3., kao i vrednosti dobijene primenom standardnog rastvora Trolox-a.

Tabela 5.6. Intenzitet inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

TROLOX	100%	50%	10%
	98,44 ± 1,62	56,72 ± 29,71	48,64 ± 5,34
	5%	2,5%	1%
	31,20 ± 5,32	14,68 ± 1,06	11,38 ± 0,83
ekstrakt	100%	50%	10%
	84,66 ± 5,31	83,12 ± 7,56	64,26 ± 3,12
	5%	2,5%	1%
	52,32 ± 5,39	34,16 ± 3,09	14,04 ± 1,88

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (SD).



Grafikon 5.3. Intenzitet inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Iz Tabele 5.6. se može uočiti da je sposobnost osnovnog rastvora ispitivanog ekstrakta da inhibira DPPH• radikal bio slabiji u odnosu na osnovni rastvor standardne supstance Trolox. Razblaženja osnovnog rastvora vodenog ekstrakta ploda štavolja pokazala su znatno veću anti-DPPH aktivnost u odnosu na istovetne koncentracije standardne supstance Trolox.

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom intenzitetu inhibicije DPPH• radikala nakon primene standardne supstance Trolox u odnosu na primenjenu koncentraciju ($F=33,259$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey) utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra jedino između uzastopnih koncentracija 100% i 50% ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika između uzastopnih koncentracija 50% i 10% ($p=0,91$), 10% i 5% ($p=0,275$), 5% i 2,5% ($p=0,329$), kao i 2,5% i 1% ($p=1,00$). Rezultati svih međusobnih komparacija u odnosu na nivo koncentracije (%) su prikazane u Tabeli 5.7.a).

Analiziranjem intenziteta inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjenu koncentraciju ($F=169,504$, $p<0,001$). Daljom post-hoc analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih koncentracija: 50% i 10% ($p<0,001$), 10% i 5% ($p=0,007$), 5% i 2,5% ($p<0,001$), i 2,5% i 1% ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj inhibiciji DPPH• radikala nakon primene vodenog

ekstrakta ploda *R. crispus* L. za koncentracije 100% i 50% ($p=0,995$). Rezultati svih međusobnih komparacija u odnosu na nivo koncentracije (%) su prikazane u Tabeli 5.7.b).

Tabela 5.7. Post-hoc analiza: poređenje prosečnog intenziteta inhibicije DPPH• radikala u odnosu na koncentraciju, nakon primene:

a) standardne supstance Trolox

b) vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

	100%	50%	10%	5%	2,5%	1%
100%						
50%	**					
10%	**	ns				
5%	**	*	ns			
2,5%	**	**	**	ns		
1%	**	**	**	ns	ns	

	100%	50%	10%	5%	2,5%	1%
100%						
50%	1.00					
10%	**	**				
5%	**	*	*			
2,5%	**	**	**	**		
1%	**	**	**	**	**	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

Upoređivanjem inhibicije DPPH• radikala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., odnosno standardne supstance Trolox utvrđena je značajna razlika za koncentraciju 1% ($t=2,889$, $p=0,020$), 2,5% ($t=13,332$, $p<0,001$), 5% ($t=6,238$, $p<0,001$), 10% ($t=5,648$, $p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima nakon primene standardne supstance Trolox. Utvrđena je značajna razlika i za nivo koncentracije 100% ($t=5,550$, $p=0,001$), ali sa značajno višim vrednostima za Trolox. Nije utvrđena značajna razlika za koncentraciju 50% ($p=0,090$). Upoređivanjem inhibicije DPPH• radikala nakon primene 2,5% vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. sa inhibicijom DPPH• radikala nakon primene 1% supstance Trolox, utvrđena je značajna razlika ($t=15,92$, $p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima za 1% DPPH• Trolox (149). Nivo značajnosti razlike (p) za sva moguća poređenja prosečnog intenziteta inhibicije DPPH• radikala između ekstrakta i Trolox-a, prikazan je u Tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Poređenje prosečnog intenziteta inhibicije DPPH• radikala nakon primene Trolox-a i vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. (DPPH ekstrakt, DPPH Trolox) u odnosu na koncentraciju.

		DPPH• Trolox					
		100%	50%	10%	5%	2,5%	1%
DPPH• ekstrakt	100%	**	ns	**	**	**	**
	50%	**	ns	**	**	**	**
	10%	**	ns	**	**	**	**
	5%	**	ns	ns	**	**	**
	2,5%	**	ns	**	ns	**	**
	1%	**	*	**	**	ns	*

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti (p) za Studentov t-test.

* p<0,05, ** p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

Kako bi uporedili sposobnost ispitivanog ekstrakta i standardne supstance Trolox da inhibiraju DPPH• radikal, približno su određene IC₅₀ vrednosti i za ekstrakt i za Trolox. Približna IC₅₀ vrednost za standardni rastvor Trolox-a, koji je korišćen kao kontrola, iznosila je 216 µg/mL (21,6%), dok je koncentracija ekstrakta pri kojoj dolazi do inhibicije 50% ukupne količine DPPH• radikala iznosila 46 µg/mL (4,6%). Ponašanje ovog ekstrakta značajno se razlikovalo od ponašanja standardnog rastvora Trolox-a. Iz svega navedenog, može se zaključiti da ispitivani ekstrakt ima veći antioksidantni kapacitet, izračunat na osnovu inibicije DPPH• radikala, u odnosu na Trolox, jer je potrebna manja koncentracija ekstrakta u odnosu na Trolox za postizanje istog efekta (149).

U literaturi ne postoje rezultati za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus*. Literaturni podaci pokazuju da je IC₅₀ vrednost za askorbinsku kiselinu 9,51 µg/mL, što ukazuje da je ispitivani ekstrakt (IC₅₀=46 µg/mL) manje potentan u odnosu na askorbinsku kiselinu (150). U radu Maksimović i saradnika (7) prikazano je da je IC₅₀ vrednost za askorbinsku kiselinu 4,1 µg/mL, što još jednom potvrđuje da je ispitivani vodeni ekstrakt ploda štavolja slabije antioksidantne sposobnosti u odnosu na askorbinsku kiselinu, dok je metanolni rastvor ploda štavolja neznatno potentniji od askorbinske kiseline sa IC₅₀ 3,7 µg/mL. Moguće je da sposobnost štavolja da „hvata” DPPH• radikale potiče od flavonoida kvercetina, čija IC₅₀ vrednost iznosi 2,75 µg/mL (7). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji za vodeni ekstrakt ploda štavolja su uporedivi sa supstancama koje se koriste kao pozitivna kontrola (askorbinska kiselina, rutin,

BHT, kvercetin), iako je ispitivani ekstrakt slabije antioksidantne sposobnosti. Takođe, rezultati za ispitivani ekstrakt su u skladu i sa drugim, prethodno dobijenim rezultatima za različite ekstrakte štavolja (8, 10, 17, 19). Yildirim i saradnici (17) su pokazali da etanolni i vodeni ekstrakti semena štavolja pokazuju veću moć neutralisanja DPPH• radikala, za razliku od istih ekstrakata listova *R. crispus*. Utvrđeno je i da su količina fenolnih jedinjenja, prisutnih u odgovarajućim ekstraktima, kao i redukcione sposobnosti u značajnoj korelaciji sa procentom „uhvaćenih” DPPH• radikala (17). Kim i saradnici (151) su pokazali da etanolni ekstrakt biljke *R. crispus* ima visok antioksidantni kapacitet. Naime, pomenuti ekstrakt, kao redukciono sredstvo, ima sposobnost da direktno „hvata” DPPH• radikal (151). Shiwani i saradnici (19) su odredili IC₅₀ vrednost za ekstrakte korena štavolja, i rezultati su u skladu sa vrednostima iz ove disertacije. Idris i saradnici (10) su utvrdili da značajna antioksidantna aktivnost postoji kod ekstrakta korena (aceton, IC₅₀=14 µg/mL), i da je ova vrednost uporediva sa IC₅₀ dobijene kod galne kiseline (IC₅₀=5 µg/mL), a galna kiselina je, takođe, prisutna i u ispitivanom vodenom ekstraktu ploda štavolja.

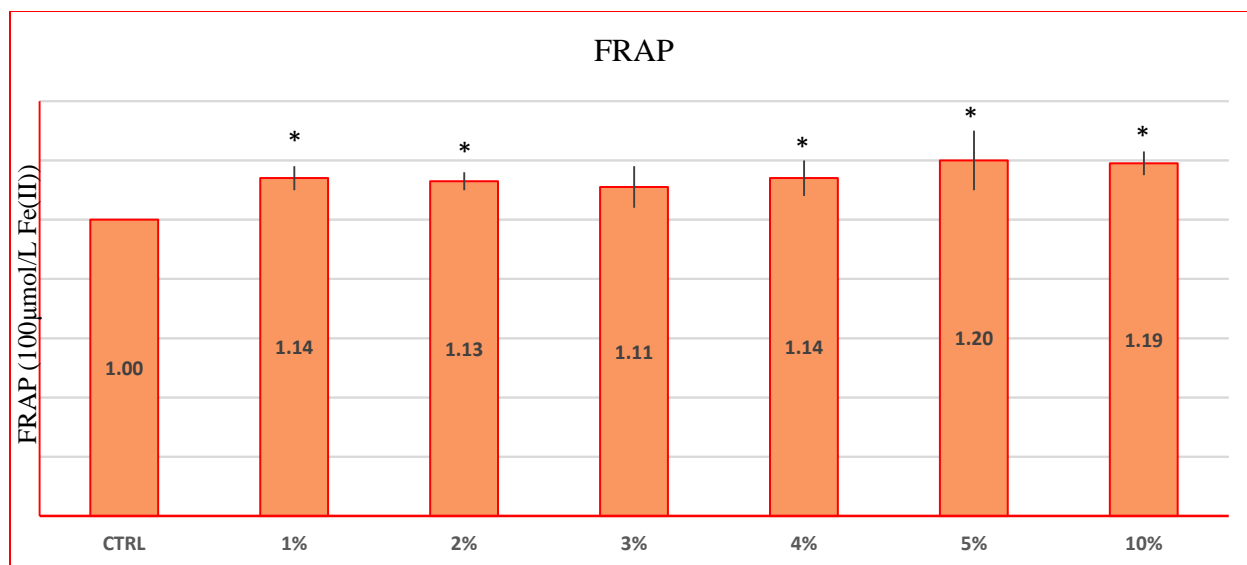
5.2.4. Ukupna antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. merena FRAP metodom

U cilju dobijanja potpunije informacije o antioksidantnoj sposobnosti vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., ispitivana je i ukupna antioksidantna aktivnost primenom FRAP metode (*Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*). Rezultati su prikazani u jedinicama FRAP, što odgovara 100 µmol/L Fe²⁺ (Tabela 5.9. i Grafikon 5.4.).

Tabela 5.9. Ukupna antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. merena FRAP metodom.

ekstrakt	CTRL	1%	2%	3%
FRAP (100µmol/L Fe(II))	1,00 ± 0,00	1,14 ± 0,04*	1,13 ± 0,03*	1,11 ± 0,07
		4%	5%	10%
		1,14 ± 0,06*	1,20 ± 0,10*	1,19 ± 0,04*

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu.



Grafikon 5.4. Ukupna antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. merena FRAP metodom.

Do povećanja FRAP vrednosti došlo je kod svih primenjenih koncentracija ispitivanog ekstrakta. Uočena je značajna razlika u prosečnim vrednostima FRAP između kontrolne i grupe sa primenjenom koncentracijom 1%, 2%, 4%, 5% i 10% ($p < 0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ukupne antioksidantne aktivnosti vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjene koncentracije ($F=1,511$, $p=0,224$), tako da je već koncentracija ekstrakta 1% donela dovoljno benefita u odnosu na kontrolnu grupu. Najveću FRAP vrednost imala je koncentracija 5%, ali ne postoji značajna razlika između koncentracija ekstrakta 1% i 5% (149).

Određivanje ukupnog antioksidantnog kapaciteta vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* vrši se merenjem FRAP vrednosti. FRAP vrednost za ispitivani ekstrakt pri koncentraciji 5% iznosio je 1,20 FRAP jedinice (120 μg/mL Fe(II)), i bio je uporediv sa podacima dobijenim iz literature za FRAP test za askorbinsku kiselinu i vitamin E, poznate antioksidante, koji iznose 2,62 FRAP jedinice (14,61 μg/mL Fe(II)) i 2,22 FRAP jedinice (12,39 μg/mL Fe(II)), redom (149, 152). U literaturi ne postoje podaci za FRAP vrednost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. FRAP vrednosti za ispitivani ekstrakt ploda bile su u skladu sa drugim, prethodnim rezultatima, koji su dobijeni ispitivanjem različitih ekstrakata lista, korena i semena *Rumex crispus* (7, 10, 17). Antioksidantni kapacitet ekstrakta potiče iz redukcionih sposobnosti,

odnosno sposobnosti najčešće polifenola, flavonoida, da doniraju protone i time „uhvate” slobodne radikale (10). Abidi i saradnici (153) su ispitivali vodeno-metanolne ekstrakte stabljika i cvetova *Rumex tunetanus* i utvrdili da ekstrakti sadrže flavonoide, kojima se pripisuje antioksidantna aktivnost. Pomenuti ekstrakt cvetova je pokazao jače antioksidantno dejstvo u poređenju sa ekstraktom stabljika. Pokazano je da postoji pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i FRAP vrednosti. Porast sadržaja flavonoida i ukupnih fenola dovodi se u vezu sa porastom FRAP antioksidantnog kapaciteta (153).

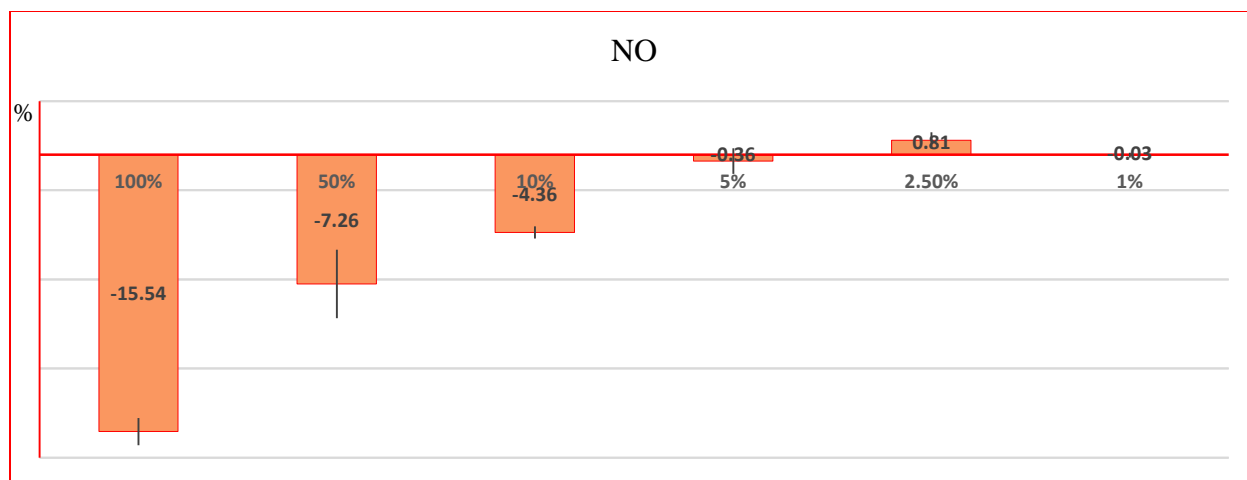
5.2.5. Stepen inhibicije azot monoksida (NO) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati određivanja stepena inhibicije azot monoksida (NO) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. merenjem stvaranja nitritnih jona, prikazani su u Tabeli 5.10. i na Grafikonu 5.5. Određivanja su rađena za osnovni rastvor (100%) i pet razblaženja (50%, 10%, 5%, 2,5% i 1%).

Tabela 5.10. Stepen inhibicije azot monoksida (NO) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

100%	50%	10%	5%	2,5%	1%
-15,54 ± 0,77	-7,26 ± 1,92	-4,36 ± 0,34	-0,36 ± 0,72	0,81 ± 0,45	-0,03 ± 0,14

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD).



Grafikon 5.5. Stepen inhibicije azot monoksida (NO) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem stepena inhibicije azot monoksida nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjenu koncentraciju ($F=220,891$, $p<0,001$). Daljom post-hoc analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih koncentracija: 100% i 50% ($p<0,001$), 50% i 10% ($p<0,001$), 10% i 5% ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u stepenu inhibicije azot monoksida nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za koncentracije 5% i 2,5% ($p=0,383$), kao i 2,5% i 1% ($p=0,699$) (149). Rezultati svih međusobnih komparacija prosečnih vrednosti ovog parametra u odnosu na koncentracije (%) su prikazane u Tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Post-hoc analiza: poređenje prosečnog intenziteta inhibicije azot monoksida nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u odnosu na primenjenu koncentraciju.

	100%	50%	10%	5%	2,5%	1%
100%						
50%	ns					
10%	**	**				
5%	**	**	**			
2,5%	**	**	**	ns		
1%	**	**	**	ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

** $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

Vodeni ekstrakt ploda štavolja u koncentraciji 2,5% je inhibirao nastanak NO, dok je u drugim koncentracijama doveo do povećanja produkcije NO. Porastom koncentracije vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* povećava se sposobnost ekstrakta da stimuliše sintezu azot-monoksida (149). Niske koncentracije azot-monoksida imaju fiziološke uloge u organizmu (80, 81). Međutim, porast koncentracije NO povezuje se sa citotoksičnim delovanjem makrofaga u infekcijama i malignim bolestima (81, 154). Isto tako, NO se može posmatrati kao slobodni radikal, koji stupa u reakciju sa superoksid anjon radikalom i gradi veoma toksične peroksinitrite (15, 81, 86).

Imajući sve ovo u vidu, ekstrakt štavolja, koji je bio predmet istraživanja ove disertacije, mogao bi da ima povoljne efekte i u koncentracijama u kojima je promovisao i u kojima je inhibirao stvaranje azot-monoksida. Suzbijanje produkcije NO povezuje se sa smanjenjem reaktanta za formiranje štetnog peroksinitrita. Pored toga, inhibicija prekomerne produkcije azot(II)-oksida može sprečiti nitrozativni stres, odnosno oksidativna oštećenja bioaktivnih molekula (81, 88). S druge strane, stimulacija proizvodnje NO bi mogla biti mehanizam antitumorskog delovanja vodenog ekstrakta ploda štavolja, jer je poznato da NO može u većim koncentracijama da dovede do apoptoze (154).

U literaturi ne postoje rezultati za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus*. Izvestan je nedostatak podataka u literaturi o ovom testu za druge ekstrakte štavolja. Jedino su Idris i saradnici (10) koristili ovaj test i rezultati su uporedivi sa onima prikazanim u ovoj disertaciji. Vrednosti apsorbance ekstrakta su u inverznoj relaciji sa sposobnošću inhibicije azot monoksida (10). Hiransai i saradnici (155) su ispitivali vodeni ekstrakt lista biljke *Tithonia diversifolia* i utvrdili da pomenuti ekstrakt ima sposobnost inhibicije produkcije NO inaktivirajući transkripciju enzima iNOS. Kim i saradnici (156) su utvrdili da ekstrakt *Zostera asiatica* sadrži flavonoidne molekule i poseduje antioksidantna svojstva pokazana kroz sposobnost smanjenja sinteze NO.

5.3. *In vitro* antitumorska aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

5.3.1. Intenzitet ćelijskog rasta

U ovoj disertaciji ispitivan je citotoksičan efekat vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. i njegov potencijal da inhibira ćelijski rast. Rezultati određivanja intenziteta inhibicije ćelijskog rasta prikazani su u Tabeli 5.12. Efekat ispitivanog ekstrakta na ćelijsku liniju poreklom iz zdravog tkiva (MRC-5) bio je slab ($IC_{50}=25,98 \mu\text{g/mL}$), sugerišući nisku toksičnost prema zdravom tkivu. Antiproliferativni efekat vodenog ekstrakta ploda štavolja bio je najizraženiji prema tumorskim ćelijama grlića materice HeLa, sa $IC_{50} 16,88 \mu\text{g/mL}$, i prema ćelijama adenokarcinoma dojke MCF7, sa $IC_{50} 19,26 \mu\text{g/mL}$. Vrednost IC_{50} kod adenokarcinoma kolona HT-29 nije određena, ali vrednost IC_{30} je nađena kao veoma niska koncentracija ($IC_{32}=62,50 \mu\text{g/mL}$), upućujući na aktivnost ispitivanog ekstrakta i prema ovoj tumorskoj ćelijskoj liniji. Dobijeni rezultati pokazuju visoku selektivnost prema tumorskim tkivima *in vitro*. Potvrđena je dozna zavisnost kod svih korišćenih ćelijskih linija. Izračunat je i odnos netumor/tumor IC_{50} za HeLa, MCF-7 i HT-29 ćelijske linije i oni su iznosili $NT/T= 1,54$, $NT/T= 1,35$, $NT/T<0,42$, respektivno (Tabela 5.13.). Najveći netumor/tumor IC_{50} odnos nađen je kod HeLa ćelijske linije, sugerišući visoku efikasnost prema ovom tumorskom tipu u poređenju sa netumorskim ćelijama. Kod HT-29 tumorske linije, odnos NT/T bio je manji od 1, što ukazuje na veću aktivnost ekstrakta prema zdravom nego prema tumorskom tkivu.

Tabela 5.12. Intenzitet ćelijskog rasta odabranih ćelijskih linija nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

ekstrakt ploda	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*			
	HeLa	MCF7	MRC-5	HT-29
<i>Rumex crispus</i> L.	16,88±3,08	19,26±3,45	25,98±5,38	n.a. ($IC_{32}=62,50$)
Doksorubicin	0.25±0.09**	0.26±0.02**	0.40±0.03**	0.38±0.04**

n.a. – nije određeno.

* Vrednosti predstavljaju srednja vrednost \pm standardna devijacija osam merenja ($n=8$) u koncentracijskom opsegu 3,91 - 1000 $\mu\text{g/mL}$.

** Četojević-Simin (157), Četojević-Simin i sar. (158)

Tabela 5.13. Odnos netumor/tumor IC₅₀ (NT/T) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

ekstrakt ploda	NT/T		
	HeLa	MCF7	HT-29
<i>Rumex crispus</i> L.	1,54	1,35	<0,42

5.3.2. Mehanizam ćelijske smrti

Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* L. neznatno je smanjio apoptozu i značajno povećao nekrozu kod obe ćelijske linije: MCF7 (EFA=0,77; EFN=2) i HeLa (EFA=0,97; EFN=4) dajući ukupno smanjenje odnosa apoptoza/nekroza u poređenju sa kontrolom (EF A/N= 0,24 – 0,39) (Tabela 5.14.).

Tabela 5.14. Apoptoza i nekroza nakon tretmana odabranih humanih ćelijskih linija vodenim ekstraktom ploda *Rumex crispus* L.

ekstrakt ploda	HeLa			MCF7		
	EFA	EFN	EF A/N	EFA	EFN	EF A/N
<i>Rumex crispus</i> L.	0,97	4,00	0,24	0,77	2,00	0,39

EF A – faktor za apoptozu (EF za kontrolu je 1)

EF N – faktor za nekrozu (EF za kontrolu je 1)

EF A/N – EF A/ EF N

U studiji Wegiera i saradnika (20) ispitivana je citotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata korena, lista i ploda odabranih vrsta roda *Rumex*, među kojima je bio i *R. crispus*. Citotoksična aktivnost bila je ispitivana prema dve ćelijske linije leukemije: 1301 (humane T limfoblastne ćelije) i EOL-1 (humana eozinofilna leukemija), kao i prema zdravim T limfocitima (H-9). Rezultati su bili međusobno uporedivi jer su izraženi kao IC₅₀ vrednost, odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% odgovarajuće ćelijske linije. Ekstrakti *R. crispus* pokazali su citotoksičnu aktivnost prema obe tumorske linije, indukujući apoptozu u tumorskim ćelijama. Izvesna antitumorska aktivnost primećena je i kod metanolnog ekstrakta korena štavolja prema HT-29 tumorskim ćelijama (19).

5.4. *In vivo* antioksidantni/prooksidantni i citotoksični efekti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Za ispitivanje hepatoprotektivnih svojstava vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* upotrebljeno je šest različitih koncentracija ekstrakta. Koncentracija ispitivanog ekstrakta koja je pokazala najveće protektivno dejstvo dalje je korišćena za proučavanje antioksidantnih/prooksidantnih i citotoksičnih efekata pomenutog ekstrakta.

5.4.1. Svojstva vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u sistemu *in vivo* oštećenja jetre izazvanih ugljentetrahloridom

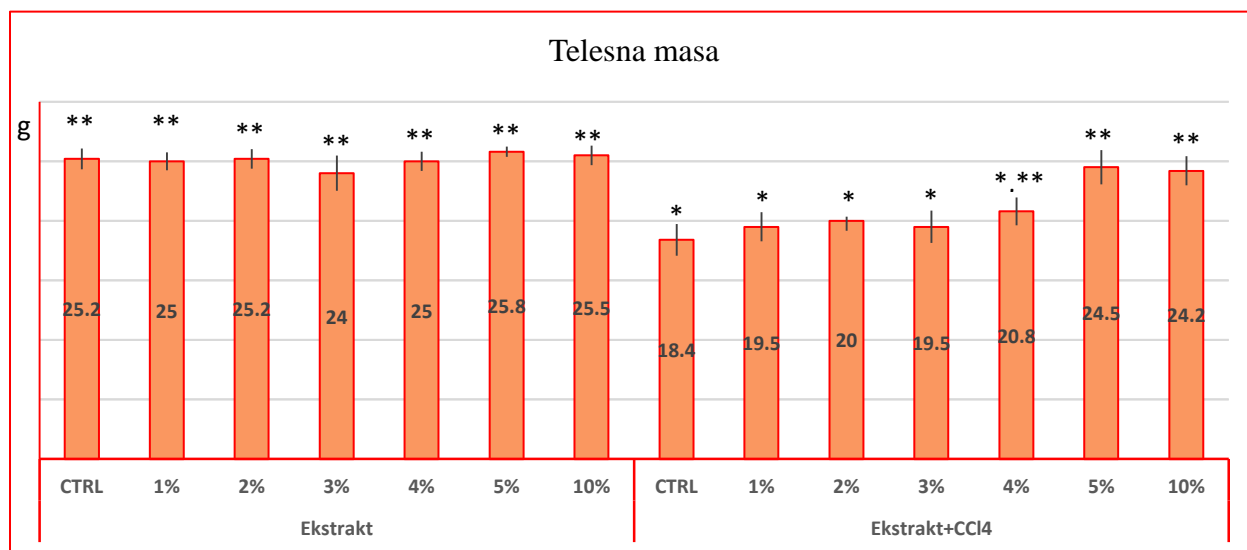
Hepatotoksičnost ugljentetrahlorida izazvana reakcijama u koje stupaju slobodni radikali često je korišćena kao model za proučavanje oštećenja jetre (63, 145, 159). U ovoj tezi takođe, ugljentetrahlorid je upotrebljen prilikom izučavanja hepatoprotektivnih svojstava vodenog ekstrakta ploda štavelja, pre i posle administracije CCl₄.

Rezultati ispitivanja uticaja vodenog ekstrakta ploda štavelja na telesnu masu eksperimentalnih životinja pre i nakon intoksikacije ugljentetrahloridom prikazani su u Tabeli 5.15. i na Grafikonu 5.6. Intoksikacija ugljentetrahloridom dovela je do značajnog smanjenja telesne mase miševa u odnosu na netretiranu grupu, za oko 27% (poređenje kontrolne grupe CTRL i kontrolne grupe CTRL+CCl₄), odnosno utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnoj telesnoj masi životinja između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe (t=10,480, p<0,001), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi.

Tabela 5.15. Telesna masa životinja (g) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 25,2±0,87 ^{**}	1%	2%	3%
		25,0±0,76 ^{**}	25,2±0,81 ^{**}	24,0±1,49 ^{**}
		4%	5%	10%
		25,0±0,80 ^{**}	25,8±0,44 ^{**}	25,5±0,82 ^{**}
sa CCl ₄	CTRL 18,4±1,34 [*]	1%	2%	3%
		19,5±1,22 [*]	20,0±0,84 [*]	19,5±1,35 [*]
		4%	5%	10%
		20,8±1,17 ^{*,**}	24,5±1,43 ^{**}	24,2±1,22 ^{**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.6. Telesna masa životinja (g) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem telesne mase životinja nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl₄, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta (ANOVA F=2,817, p=0,033). Daljom komparacijom (Tukey post hoc) telesne mase životinja u odnosu na koncentraciju ekstrakta (bez prisustva CCl₄), utvrđena je značajna razlika između koncentracija ekstrakta 3% i 5% (p=0,020), sa značajno

većom vrednosti za koncentraciju ekstrakta 5%. Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj telesnoj masi za uzastopne koncentracije ekstrakta: 1% i 2% ($p=0,997$), 2% i 3% ($p=0,184$), 3% i 4% ($p=0,365$), 4% i 5% ($p=0,709$), i 5% i 10% ($p=0,997$). Nameće se zaključak da koncentracija ekstrakta 5% pokazuje najznačajniji hepatoprotektivni efekat kada je telesna masa u pitanju, iako ne postoji značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL grupe.

Upoređivanjem telesne mase životinja za različite koncentracije ekstrakta (sa CCl_4) utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 : 4% i CTRL+ CCl_4 ($p=0,023$), 5% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), i 10% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), dok istovremeno nije utvrđena značajna razlika u telesnoj masi za koncentracije ekstrakta 5% i 10% (sa CCl_4) u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

Postoji značajna razlika u telesnoj masi životinja nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl_4) u odnosu na nivo koncentracije ekstrakta ($F=21,664$, $p<0,001$). Daljom primenom Tukey post hoc testa utvrđena je značajna razlika u telesnoj masi životinja u odnosu na sledeće koncentracije ekstrakta: 1% i 5% ($p<0,001$), 2% i 5% ($p<0,001$), 3% i 5% ($p<0,001$), kao i 4% i 5% ($p<0,001$), sa značajno višim vrednostima telesne mase za koncentraciju 5%. Utvrđena je i značajna razlika u telesnoj masi životinja za koncentracije ekstrakta 1% i 10% ($p<0,001$), 2% i 10% ($p<0,001$), 3% i 10% ($p<0,001$), kao i 4% i 10% ($p=0,001$), sa značajno višim vrednostima za nivo koncentracije 10%. Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj telesnoj masi za uzastopne koncentracije ekstrakta: 1% i 2% ($p=0,979$), 2% i 3% ($p=0,964$), 3% i 4% ($p=0,424$), kao ni između 5% i 10% ($p=0,997$). Podaci su prikazani u Tabeli 5.16. Nameće se zaključak da s obzirom na to da postoji statistički značajna razlika između koncentracija manjih od 5% (1%, 2%, 3% i 4%) i 5% i 10%, a da ne postoji značajna razlika između 5% i 10%, da je upravo koncentracija ekstrakta od 5% pokazala najveći hepatoprotektivni potencijal u smislu poništavanja negativnog efekta ugljentetrahlorida, održavajući telesnu masu u okviru kontrolnih vrednosti, jer ne postoji statistički značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL grupe, a istovremeno postoji značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe.

Tabela 5.16. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti telesne mase životinja nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., uz prisustvo CCl₄, u odnosu na koncentraciju.

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	ns	ns	ns			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

** p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

Za određivanje potencijalnih hepatoprotektivnih svojstava vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* upotrebljen je hepatotoksin ugljentetrahlorid. Ovaj toksin deluje štetno na jetru proizvodnjom slobodno radikalskih metabolita. Treba naglasiti da sam CCl₄ nije toksičan prema jetri, već hepatotoksičnost ugljentetrahlorida potiče od njegovih metaboliti (MDA i 4-hidroksi-2-nonenal) (159). Pored toga, ugljentetrahlorid dovodi i do stimulacije proizvodnje inflamatornih citokina i inflamacije tkiva (160).

U literaturi ne postoje rezultati za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus*. Tukapa i saradnici (144) su ispitivali hepatoprotektivni efekat metanolnog ekstrakta cele biljke *Rumex vesicarius* i utvrdili da pomenuti ekstrakt sprečava gubitak mase eksperimentalnih životinja nakon indukcije oštećenja jetre ugljentetrahloridom, što je bilo u skladu sa rezultatima ove disertacije. Pan i saradnici (160) su ispitivali hepatoprotektivni efekat polifenolnih jedinjenja iz Liubao čaja - vrste crnog čaja koji ima dokazana antioksidantna svojstva. Ustanovili su da je pomenuti čaj doveo do smanjenja mase eksperimentalnih životinja, moguće zbog antilipidemijskog efekta. Čaj je nezatno sprečio pad mase životinja usled administracije CCl₄ (160). Ogunlana i saradnici (161) su utvrdili da ekstrakt semena biljke *Hunteria umbellata* (Hallier F.) ima hepatoprotektivna svojstva i da dovodi do poboljšanja lipidnog statusa i mase životinja nakon intoksikacije ugljentetrahloridom, što je bilo u skladu sa rezultatima ove disertacije.

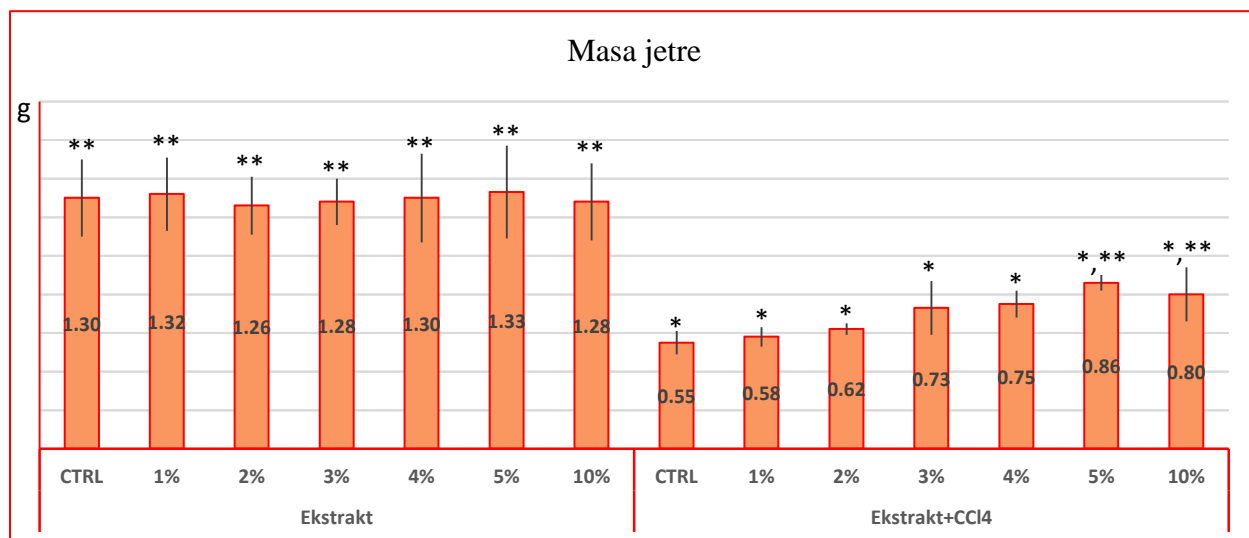
U Tabeli 5.17. i na Grafikonu 5.7. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodenog ekstrakta ploda štafelja na masu jetre miševa pre i nakon intoksikacije ugljentetrahloridom.

Nakon administracije CCl_4 došlo je do smanjenja mase jetre eksperimentalnih životinja u odnosu na netretiranu grupu, za više od 60% (poređenje CTRL i CTRL+ CCl_4), odnosno utvrđena je značajna razlika u prosečnoj masi jetre životinja između kontrolne CTRL grupe i CTRL+ CCl_4 grupe ($t=8,642$, $p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+ CCl_4 grupi.

Tabela 5.17. Masa jetre životinja (g) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl_4	CTRL 1,30±0,20 ^{**}	1%	2%	3%
		1,32±0,19 ^{**}	1,26±0,15 ^{**}	1,28±0,12 ^{**}
		4%	5%	10%
		1,30±0,23 ^{**}	1,33±0,24 ^{**}	1,28±0,20 ^{**}
sa CCl_4	CTRL 0,55±0,06 [*]	1%	2%	3%
		0,58±0,05 [*]	0,62±0,03 [*]	0,73±0,14 [*]
		4%	5%	10%
		0,75±0,07 [*]	0,86±0,04 ^{*,**}	0,80±0,14 ^{*,**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+ CCl_4 grupu



Grafikon 5.7. Masa jetre životinja (g) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem mase jetre nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($p=0,993$).

Upoređivanjem mase jetre životinja nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , za različite primenjene koncentracije ekstrakta utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 : 5% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), i 10% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), uz istovremeno postojanje značajne razlike između svih primenjenih koncentracija ekstrakta u prisustvu ugljentetrahlorida i kontrolne CTRL grupe ($p<0,001$).

Analiziranjem mase jetre nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=8,552$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđene su značajno niže vrednosti mase jetre životinja (uz prisustvo CCl_4) za koncentracije ekstrakta 1% u odnosu na koncentraciju 4% ($p=0,026$), značajno niže vrednosti za koncentracije ekstrakta 1% i 2% u odnosu na koncentraciju 5% (redom $p<0,001$, $p<0,001$). Utvrđene su i značajno niže vrednosti mase jetre za koncentracije 1% i 2% u odnosu na koncentraciju 10% (redom $p=0,002$, $p=0,015$). Nisu utvrđene značajne razlike u masi jetre životinja između uzastopnih koncentracija ekstrakta (uz prisustvo CCl_4): 1% i 2% ($p=0,977$), 2% i 3% ($p=0,261$), 3% i 4% ($p=0,999$), 4% i 5% ($p=0,321$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p=0,861$). Podaci su prikazani u Tabeli 5.18. Nameće se zaključak da je koncentracija ekstrakta od 5% u najvećoj meri pokazala hepatoprotektivna svojstva i neutralisala štetan efekat ugljentetrahlorida, odnosno sprečila gubitak u masi jetre kod eksperimentalnih životinja, jer postoji značajna razlika između koncentracije ekstrakta 5% i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe, ali nedovoljno, jer, takođe, postoji i značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL grupe. Ovaj efekat je pokazala i koncentracija 10%, ali s obzirom da nije utvrđena značajna razlika između koncentracija ekstrakta 5% i 10%, koncentracija ekstrakta 5% je korišćena za dalja ispitivanja.

Tabela 5.18. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti mase jetre životinja nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., uz prisustvo CCl₄, u odnosu na koncentraciju.

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	*	ns	ns			
5%	**	**	ns	ns		
10%	**	*	ns	ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,05, ** p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

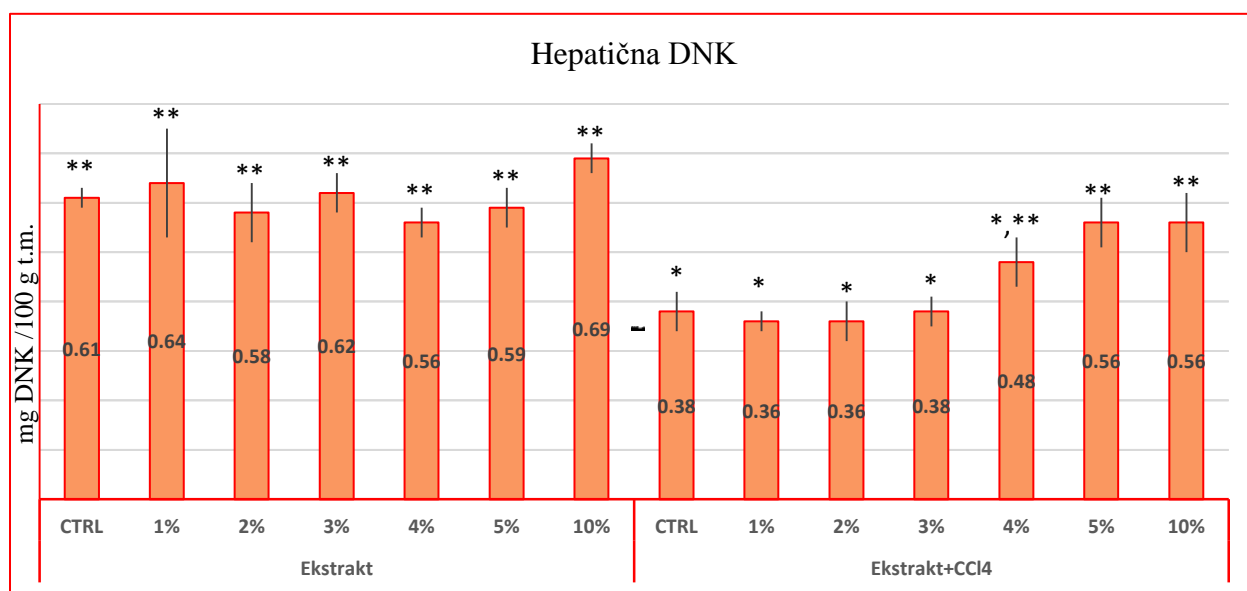
Za evaluaciju hepatoprotektivnih efekata vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* korišćen je model oštećenja jetre izazvan administracijom ugljentetrahlorida. Često se masa organa (jetre ili bubrega) koristi kao indikator hepatotoksičnih i hepatoprotektivnih svojstava nekog agensa (144). U literaturi nema dostupnih podataka za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* u pogledu efekata na masu jetre nakon intoksikacije CCl₄. Alkushi (162) je utvrdio da vodeni ekstrakt korena *Rumex acetosella* dovodi do smanjenja gubitka mase jetre kod CCl₄-tretiranih eksperimentalnih životinja. Tukappa i saradnici (144) su utvrdili smanjenje mase jetre nakon primene ugljentetrahlorida, ali i značajno sprečavanje gubitka mase jetre eksperimentalnih životinja nakon pretretmana metanolnim ekstraktom cele biljke *Rumex vesicarius*, što je bilo uporedivo sa efektima silimarina. Rezultati rada Tukappa i saradnika (144) su bili u skladu sa vrednostima dobijenim u ovoj disertaciji. Hepatoprotektivnost *Rumex vesicarius* potiče od potencijalne antioksidantne aktivnosti i sadržaja flavonoida, jer ugljentetrahlorida stimuliše produkciju ROS i RNS (144). Pan i saradnici (160) su utvrdili da primena Liubao čaja, slično silimarinu, dovodi do smanjenja gubitka mase jetre eksperimentalnih životinja nakon administracije ugljentetrahlorida.

Tretman ugljentetrahloridom značajno je smanjio količinu hepatične DNK kod miševa u odnosu na netretiranu grupu, za oko 40% (poređenje CTRL i CTRL+CCl₄) (Tabela 5.19. i Grafikon 5.8.), odnosno utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe (t=11,534, p<0,001), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi.

Tabela 5.19. Sadržaj hepatične DNK (mg DNK /100 g t.m.) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 0,61±0,02 ^{**}	1%	2%	3%
		0,64±0,11 ^{**}	0,58±0,06 ^{**}	0,62±0,04 ^{**}
		4%	5%	10%
		0,56±0,03 ^{**}	0,59±0,04 ^{**}	0,69±0,03 ^{**}
sa CCl ₄	CTRL 0,38±0,04 [*]	1%	2%	3%
		0,36±0,02 [*]	0,36±0,04 [*]	0,38±0,03 [*]
		4%	5%	10%
		0,48±0,05 ^{*,**}	0,56±0,05 ^{**}	0,56±0,06 ^{**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.8. Sadržaj hepatične DNK (mg DNK /100 g t.m.) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem sadržaja hepatične DNK nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl₄, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta (F=3,896, p=0,008). Daljim međusobnim poređenjem sadržaja hepatične DNK, utvrđena je značajna razlika između koncentracija ekstrakta 2% i 10% (p=0,043), kao i 4% i 10% (p=0,006), sa značajno višim vrednostima za

koncentraciju ekstrakta 10%. Nisu utvrđene značajne razlike u sadržaju hepatične DNK (bez prisustva CCl_4) između uzastopnih koncentracija 1% i 2% ($p=0,478$), 2% i 3% ($p=0,876$), 3% i 4% ($p=0,419$), 4% i 5% ($p=0,855$), kao i 5% i 10% ($p=0,993$).

Upoređivanjem sadržaja hepatične DNK za različite koncentracije ekstrakta (uz prisustvo CCl_4) utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 : 4% i CTRL+ CCl_4 ($p=0,006$), 5% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), i 10% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), dok istovremeno nije utvrđena značajna razlika za koncentracije ekstrakta 5% i 10% (sa CCl_4) u odnosu na CTRL.

Analiziranjem sadržaja hepatične DNK nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=29,293$, $p<0,001$). Međusobnim poređenjem sadržaja hepatične DNK u odnosu na koncentraciju ekstrakta (uz prisustvo CCl_4), utvrđene su značajno niže vrednosti za koncentraciju ekstrakta 3% u odnosu na 4% ($p=0,009$) i značajno niže vrednosti za koncentraciju ekstrakta 4% u odnosu na 5% ($p=0,029$). Nisu utvrđene značajne razlike u sadržaju hepatične DNK između uzastopnih koncentracija ekstrakta (uz prisustvo CCl_4) 1% i 2% ($p=1,000$), 2% i 3% ($p=0,965$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p=1,000$). Utvrđene su značajno niže vrednosti za koncentracije 1% i 2% u odnosu na koncentraciju 4% (redom $p=0,001$, $p=0,001$). Utvrđene su značajno niže vrednosti sadržaja hepatične DNK za koncentracije ekstrakta 1%, 2% i 3% u odnosu na koncentraciju ekstrakta 5% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Utvrđene su i značajno niže vrednosti sadržaja hepatične DNK za koncentracije ekstrakta 1%, 2%, 3%, 4% u odnosu na koncentraciju ekstrakta 10% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,018$) (Tabela 5.20.). Koncentracije ekstrakta 5% i 10% su se izdvojile kao jedine koje su imale sposobnost da zaustave pad količine hepatične DNK uzrokovan tretmanom ugljentetrahloridom, odnosno utvrđena je značajna razlika između ovih koncentracija ekstrakta i CTRL+ CCl_4 kontrolne grupe, a nije utvrđena značajna razlika između koncentracija ekstrakta 5% i 10% i CTRL kontrolne grupe. Kako ne postoji značajna međusobna razlika između koncentracija ekstrakta 5% i 10%, nameće se zaključak da ponovo koncentracija 5% ekstrakta pokazuje potencijalni hepatoprotektivni efekat, poništavajući negativne efekte ugljentetrahlorida, i održavajući ispitivani parametar u okviru kontrolnih vrednosti.

Tabela 5.20. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti sadržaja hepaticne DNK nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., uz prisustvo CCl_4 , u odnosu na koncentraciju.

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	*		
10%	**	**	**	*	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

Ugljentetrahlorid je potentan liposolubilni hepatotoksin koji se često koristi za proučavanje hepatoprotektivnih osobina biljnih ekstrakata. Intoksikacija CCl_4 dovodi do intenzivnije produkcije slobodno radikalskih intermedijera kao što su trihlorometil radikal ($\text{CCl}_3\bullet$) i trihlorometil peroksil radikal ($\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$), koji dalje oštećuju bioaktivna jedinjenja ćelije (163).

Ne postoje dostupni literaturni podaci za efekat vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* na sadržaj DNK nakon dejstva CCl_4 . Rhim i saradnici (147) su utvrdili da etanolni ekstrakt *Rumex crispus* može da spreči oštećenja molekula DNK izazvanih slobodnim radikalima: hidroksil i peroksil radikalom, zahvaljujući polifenolnim jedinjenjima koji su prisutni u ekstraktima vrsta roda *Rumex*. Kober i saradnici (163) su ispitivali genoprotektivne i hepatoprotektivne efekte praha *Paullinia cupana* (guarana) i utvrdili da pomenuta biljka ima sposobnost da spreči oštećenja DNK molekule izazvana dejstvom ugljentetrahlorida. Mainak i saradnici (164) su ispitivali DNK-protektivni efekat flavonoida iz biljke *Campylandra aurantiaca* i utvrdili da flavonoidi „hvatanjem” slobodnih radikala dovode do smanjenja oksidativnih oštećenja DNK molekula uzrokovanih administracijom hepatotoksina CCl_4 . Rezultati iz ove disertacije su bili u skladu sa podacima iz pomenutih radova, pa se može pretpostaviti da flavonoidna jedinjenja vodenog ekstrakta ploda štavelja deluju kao „hvatači” ROS i da na taj način sprečavaju oksidativna oštećenja DNK i stabilizuju genom ćelija.

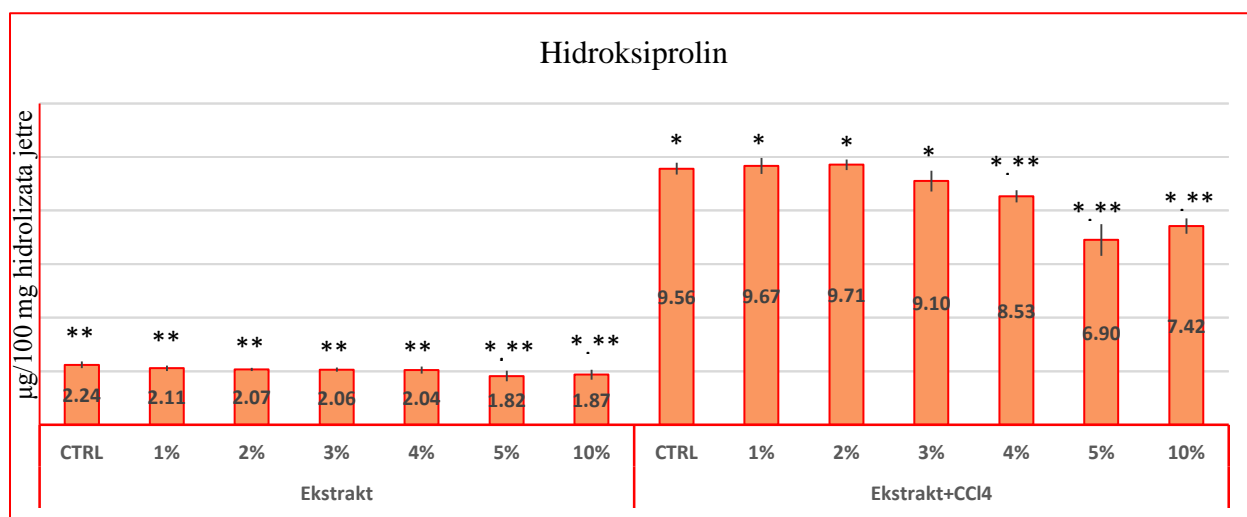
Hidroksiprolin je određivan u hidrolizatu tkiva jetre svih eksperimentalnih životinja, kao jedan od indikatora oštećenja jetre, a rezultati su prikazani u Tabeli 5.21. i na Grafikonu 5.9.

Nakon tretmana ugljentetrahloridom, sadržaj hepatičnog hidroksiprolina značajno se povećao, i bio je oko četiri puta veći kod CCl₄-tretiranih miševa nego kod kontrolne grupe (poređenje CTRL i CTRL+CCl₄), odnosno utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe (t=71,309, p<0,001), sa značajno većim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi.

Tabela 5.21. Sadržaj hidroksiprolina u hidrolizatu jetre (µg/100 mg hidrolizata jetre) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 2,24±0,12 ^{**}	1%	2%	3%
		2,11±0,10 ^{**}	2,07±0,06 ^{**}	2,06±0,08 ^{**}
		4%	5%	10%
sa CCl ₄	CTRL 9,56±0,22 [*]	1%	2%	3%
		9,67±0,30 [*]	9,71±0,20 [*]	9,10±0,39 [*]
		4%	5%	10%
		8,53±0,23 ^{*,**}	6,90±0,59 ^{*,**}	7,42±0,29 ^{*,**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.9. Sadržaj hidroksiprolina u hidrolizatu jetre (µg/100 mg hidrolizata jetre) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem sadržaja hidroksiprolina u hidrolizatu jetre nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=4,689$, $p=0,003$). Daljom komparacijom (Tukey post hoc), utvrđena je značajna razlika između koncentracija ekstrakta 1% i 5% ($p=0,011$), 2% i 5% ($p=0,035$), kao i 3% i 5% ($p=0,039$). Nisu utvrđene značajne razlike u sadržaju hidroksiprolina u hidrolizatu jetre između uzastopnih koncentracija ekstrakta: 1% i 2% ($p=0,996$), 2% i 3% ($p=1,000$), 3% i 4% ($p=0,999$), 4% i 5% ($p=0,999$), kao ni između koncentracija ekstrakta 5% i 10% ($p=0,987$). Jedino su koncentracije ekstrakta 5% ($p<0,001$) i 10% ($p<0,001$) pokazale značajnu razliku u odnosu na kontrolnu CTRL grupu, bez međusobne razlike, tako da se može zaključiti da je sam dodatak ekstrakta u koncentraciji 5%, ispoljio najveći potencijalni hepatoprotektivni efekat kada je sadržaj hidroksiprolina u pitanju.

Upoređivanjem sadržaja hidroksiprolina u hidrolizatu jetre za različite koncentracije ekstrakta (uz prisustvo CCl_4) utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 : 4% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), 5% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), i 10% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), uz istovremeno postojanje značajne razlike između svih primenjenih koncentracija u prisustvu ugljentetrahlorida i kontrolne CTRL grupe ($p<0,001$).

Analiziranjem sadržaja hidroksiprolina u hidrolizatu jetre nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=64,251$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post hoc), utvrđene su značajno više vrednosti za koncentracije ekstrakta 1% i 2% u odnosu na koncentraciju ekstrakta 4% (redom $p<0,001$, $p<0,001$), zatim značajno više vrednosti za koncentracije 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 5% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Utvrđene su i značajno više vrednosti sadržaja hidroksiprolina u hidrolizatu jetre za koncentracije 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 10% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Nisu utvrđene značajne razlike između uzastopnih koncentracija ekstrakta: 1% i 2% ($p=1,000$), 2% i 3% ($p=0,063$), 3% i 4% ($p=0,097$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p=0,157$). Podaci su prikazani u Tabeli 5.22. Može se zaključiti da je koncentracija 5% ekstrakta pokazala najveći hepatoprotektivni efekat i u velikoj meri poništila negativan efekat CCl_4 , približavajući vrednost sadržaja hidroksiprolina vrednosti iz kontrolne CTRL grupe, ali ne u potpunosti, jer postoji značajna razlika među njima. Slično je i sa koncentracijama 4% i 10%, ali postoji značajna razlika između koncentracija ekstrakta 4% i 5%,

pri čemu ekstrakt koncentracije 5% ima nižu vrednost ovog parametra, a istovremeno ne postoji značajna razlika između 5% i 10%, a cilj je da se odredi najniža koncentracija ekstrakta koja ima najznačajniji pozitivan efekat.

Tabela 5.22. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti hidroksiprolina u hidrolizatu jetre nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., uz prisustvo CCl₄, u odnosu na koncentraciju.

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	**	**	ns			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,05, ** p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

Oksidativni stres i inflamacija su važni patološki mehanizmi toksičnog delovanja ugljentetrahlorida (165). U literaturi nema dostupnih podataka za sadržaj hepatičnog hidroksiprolina nakon tretmana vodenim ekstraktom ploda *Rumex crispus*. Zhang i saradnici (165) su ispitivali sadržaj hidroksiprolina kod ugljentetrahloridom indukovano oštećenja jetre i utvrdili značajno smanjenje sadržaja hidroksiprolina nakon primene ulja semena *Silybum marianum*. Ovim su pokazali potencijalno hepatoprotektivno delovanje semena *Silybum marianum* smanjivanjem oksidativnog stresa i inflamacije (165). Liu i saradnici (166) su ispitivali hepatoprotektivna svojstva antioksidantima obogaćenih probiotika. Kao antioksidanti su korišćeni selen i glutation. Ustanovljeno je smanjenje sadržaja hidroksiprolina kao indikatora smanjenja oksidativnog stresa izazvanog administracijom ugljentetrahlorida (166). Rezultati ove disertacije su u skladu sa pomenutim radovima i ukazuju da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao imati antioksidantna svojstva smanjujući sadržaj hidroksiprolina nakon intoksikacije ugljentetrahloridom.

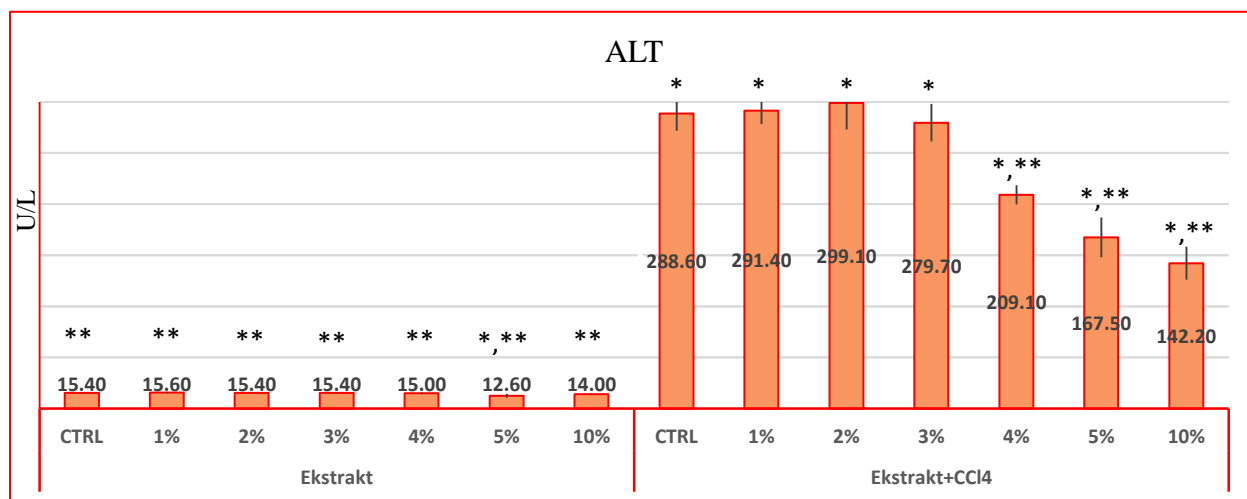
U Tabelama 5.23. i 5.25., i na Grafikonima 5.10. i 5.11. prikazani su rezultati ispitivanja efekata vodenog ekstrakta ploda štafelja na aktivnost ALT i AST, pre i nakon intoksikacije ugljentetrahloridom. Očekivano, administracija ugljentetrahlorida dovela je do višestrukog

povećanja aktivnosti ALT i AST, a izmerene srednje vrednosti su bile oko 19 puta veće za aktivnost ALT i oko šest puta veće za aktivnost AST kod CCl₄-tretirane grupe u odnosu na netretirane miševe (poređenje odgovarajućih CTRL i CTRL+CCl₄), odnosno utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima aktivnosti ALT između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe (t=39,632, p<0,001), sa značajno većim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, i značajna razlika u prosečnim vrednostima AST između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe (t=96,400, p<0,001), sa značajno većim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi.

Tabela 5.23. Aktivnost ALT (U/L) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 15,4±0,19 ^{**}	1%	2%	3%
		15,6±0,68 ^{**}	15,4±0,35 ^{**}	15,4±0,32 ^{**}
		4%	5%	10%
		15,0±0,81 ^{**}	12,6±1,86 ^{*,**}	14,0±0,63 ^{**}
sa CCl ₄	CTRL 288,6±16,88 [*]	1%	2%	3%
		291,4±13,02 [*]	299,1±26,14 [*]	279,7±18,42 [*]
		4%	5%	10%
		209,1±9,38 ^{*,**}	167,5±19,46 ^{*,**}	142,2±16,1 ^{*,**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.10. Aktivnost ALT (U/L) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem aktivnosti ALT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=9,259$, $p=0,033$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika u odnosu na koncentracije ekstrakta 1% i 5% ($p<0,001$), 2% i 5% ($p<0,001$), 3% i 5% ($p<0,001$), kao i 4% i 5% ($p=0,001$), sa značajno nižim vrednostima za koncentraciju 5%. Nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti ALT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , između uzastopnih koncentracija ekstrakta: 1% i 2% ($p=0,998$), 2% i 3% ($p=1,000$), 3% i 4% ($p=0,986$), kao ni između koncentracija ekstrakta 5% i 10% ($p=0,154$). Podaci su prikazani u Tabeli 5.24.a). Upoređivanjem aktivnosti ALT značajna razlika je utvrđena jedino između kontrolne grupe CTRL i koncentracije ekstrakta 5% bez CCl_4 ($p<0,001$). Iz svega izloženog, može se zaključiti da je jedino koncentracija ekstrakta 5% pokazala značajan pozitivan efekat, snižavajući aktivnost ALT u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

Upoređivanjem aktivnosti ALT za različite koncentracije ekstrakta (sa CCl_4) utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 : 4% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), 5% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), i 10% i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), uz istovremeno postojanje značajne razlike između svih primenjenih koncentracija ekstrakta u prisustvu ugljentetrahlorida i kontrolne CTRL grupe ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti ALT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=86,529$, $p<0,001$). Daljom primenom Tukey post hoc testa, utvrđene su značajno više vrednosti za koncentracije ekstrakta 1%, 2% i 3% u odnosu na koncentraciju 4% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), zatim značajno više vrednosti za koncentracije ekstrakta 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 5% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,004$). Utvrđene su i značajno više vrednosti aktivnosti ALT za koncentracije ekstrakta 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 10% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti ALT između uzastopnih koncentracija ekstrakta (sa CCl_4) 1% i 2% ($p=0,973$), 2% i 3% ($p=0,430$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p=0,171$). Podaci su prikazani u Tabeli 5.24.b). Može se zaključiti da je koncentracija 5% u najvećoj meri poništila štetan efekat ugljentetrahlorida, ali s obzirom da postoji značajna razlika između ove koncentracije i CTRL kontrolne grupe, nije u potpunosti održana vrednost ALT primenom 5% ekstrakta. Slično je i za koncentraciju 4% i

10%, ali s obzirom da postoji značajna razlika između 4% i 5%, sa značajno nižom vrednosti kod 5%, a da ne postoji značajna razlika između 5% i 10%, nameće se zaključak da koncentracija 5% pokazuje potencijalno najznačajniji pozitivan efekat.

Tabela 5.24. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti aktivnosti ALT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u odnosu na koncentraciju.

a) bez prisustva CCl₄

b) uz prisustvo CCl₄

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	ns	ns	ns			
5%	**	**	**	**		
10%	ns	ns	ns	ns	ns	

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

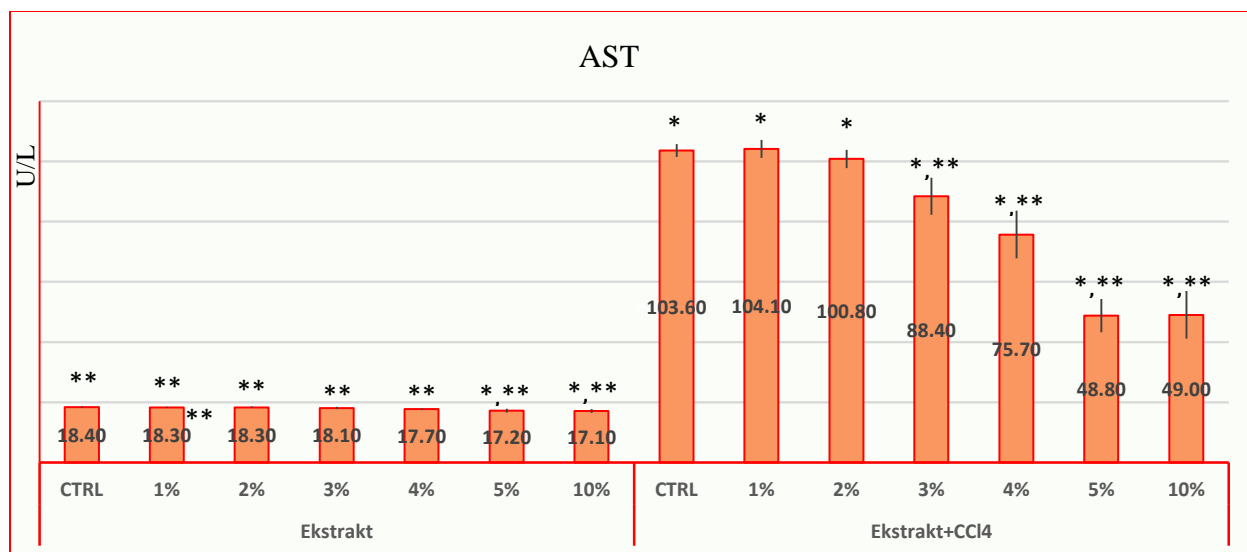
Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,05, ** p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

Tabela 5.25. Aktivnost AST (U/L) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 18,4±0,21**	1%	2%	3%
		18,3±0,15**	18,3±0,26**	18,1±0,37**
		4%	5%	10%
		17,7±0,29**	17,2±0,60**	17,1±0,62**
sa CCl ₄	CTRL 103,6±2,16*	1%	2%	3%
		104,1±2,97*	100,8±3,06*	88,4±6,19**
		4%	5%	10%
		75,7±7,96**	48,8±5,53**	49,0±7,92**

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.11. Aktivnost AST (U/L) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem aktivnosti AST nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl₄, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta (F=10,016, p<0,001). Međusobnim poređenjem aktivnosti AST u odnosu na koncentraciju ekstrakta (bez prisustva CCl₄), utvrđena je značajna razlika između koncentracija ekstrakta 1%, 2% i 3% u odnosu na 5% (redom p=0,002, p=0,002, p=0,012), kao i za 1%, 2% i 3% u odnosu na 10% (redom p<0,001, p<0,001, p=0,002). Nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti AST između uzastopnih koncentracija ekstrakta (bez CCl₄) 1% i 2% (p=1,000), 2% i 3% (p=0,982), 3% i 4% (p=0,574), 4% i 5% (p=0,370), kao ni između koncentracija 5% i 10% (p=0,973) (Tabela 5.26.a). Upoređivanjem aktivnosti AST utvrđena je značajna razlika između kontrolne grupe CTRL i koncentracije ekstrakta 5% bez prisustva CCl₄ (p<0,001), kao i koncentracije ekstrakta 10% (p<0,001). Imajući u vidu da ne postoji značajna razlika između koncentracija ekstrakta 5% i 10%, a da postoji značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu, može se zaključiti da je koncentracija 5% ekstrakta pokazala najveći hepatoprotektivni efekat u pogledu aktivnosti AST.

Upoređivanjem aktivnosti AST za različite koncentracije ekstrakta (sa CCl₄) utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+CCl₄: 3% i CTRL+CCl₄ (p<0,001), 4% i CTRL+CCl₄ (p<0,001), 5% i CTRL+CCl₄ (p<0,001), i 10% i CTRL+CCl₄ (p<0,001), uz istovremeno postojanje značajne razlike između svih primenjenih koncentracija ekstrakta u prisustvu ugljentetrahlorida i kontrolne CTRL grupe (p<0,001).

Analiziranjem aktivnosti AST nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=101,43$, $p<0,001$). Međusobnim poređenjem aktivnosti AST u odnosu na koncentraciju ekstrakta (uz prisustvo CCl_4), uočena je statistički značajna dozna zavisnost: utvrđene su značajno više vrednosti za koncentracije 1% i 2% u odnosu na koncentraciju 3% (redom $p=0,001$, $p=0,013$), značajno više vrednosti za koncentracije 1%, 2% i 3% u odnosu na koncentraciju 4% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,011$), kao i značajno više vrednosti za koncentracije 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 5% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,004$). Utvrđene su i značajno više vrednosti aktivnosti AST za koncentracije 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 10% (redom $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti AST između uzastopnih koncentracija ekstrakta (uz prisustvo CCl_4) 1% i 2% ($p=0,929$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p=1,000$) (Tabela 5.26.b)). S obzirom da su utvrđene značajne razlike između svih koncentracija manjih od 5% i koncentracija 5% i 10%, a da ne postoji značajna razlika između 5% i 10%, može se zaključiti da se ponovo koncentracija 5% ekstrakta izdvojila kao najbolja mera za sprečavanje rasta aktivnosti AST, ali ipak ne dostižući kontrolne vrednosti CTRL grupe, jer postoji značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i CTRL kontrolne grupe.

Tabela 5.26. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti aktivnosti AST nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u odnosu na koncentraciju.

a) bez prisustva CCl_4

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	ns	ns	ns			
5%	**	**	*	ns		
10%	**	**	**	ns	ns	

b) uz prisustvo CCl_4

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	**	*				
4%	**	**	*			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

Nivo serumskih transaminaza ALT i AST predstavlja važan indikator stanja jetre i često su ovi enzimi korišćeni kao biomarkeri hepatotoksičnog i hepatoprotektivnog dejstva različitih agenasa. Merenje nivoa serumskih transaminaza ALT i AST je često u kliničkoj praksi u cilju procene funkcije jetre (135). Intoksikacija ugljentetrahloridom dovodi do povećanja aktivnosti ALT i AST kod eksperimentalnih životinja kao posledica oksidativnog oštećenja jetre (167). Potvrđeno je da flavonoidni molekuli imaju hepatoprotektivno dejstvo (168). Biljni ekstrakti i njihovi aktivni principi imaju važnu ulogu u prevenciji oštećenja nastalih hepatotoksinom CCl₄ (167).

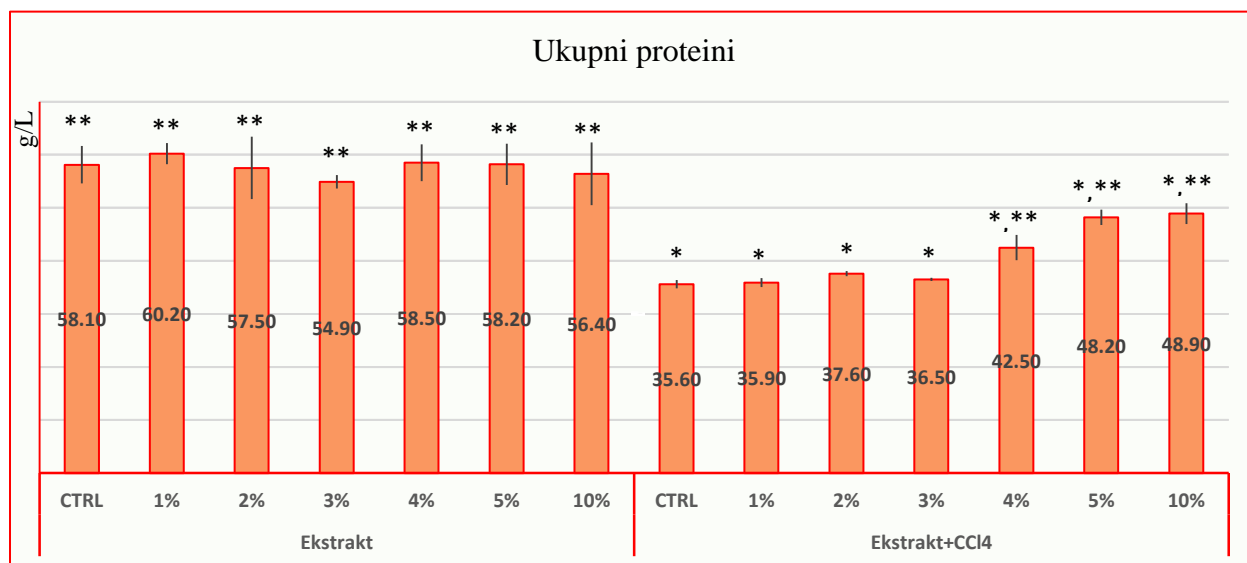
Postoji nedostatak podataka za aktivnost ALT i AST za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus*. Aghajanyan i saradnici (169) su utvrdili da etanolni ekstrakt semena *Rumex obtusifolius* dovodi do smanjenja nivoa ALT i AST kod ekstraktom tretiranih životinja. Naseri i saradnici (170) su ustanovili niže vrednosti za aktivnost ALT i AST nakon primene vodeno-alkoholnog ekstrakta *Rumex alveollatus* kod životinja intoksiciranih CCl₄. Ganaie i saradnici (145) su ispitivali metanolni ekstrakt herbe *Rumex vesicarius* i potvrdili da pomenuti ekstrakt snižava aktivnost ALT i AST, uporedivo sa silimarinom. Sahreen i saradnici (167) su pokazali da ekstrakt korena *Rumex hastatus* dovodi do smanjenja nivoa ALT i AST u serumu životinja tretiranih ugljentetrahloridom. Ovo ukazuje na potencijalna hepatoprotektivna svojstva vrsta roda *Rumex* (145). Rezultati ove disertacije su u skladu sa pomenutim radovima, što ukazuje da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao biti hepatoprotektivni agens.

U Tabeli 5.27. i na Grafikonu 5.12. prikazani su rezultati određivanja još jednog serumskog parametra ugljentetrahloridom-indukovanog oksidativnog oštećenja jetre: ukupnih proteina, kao i uticaj vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* na ovaj parametar pre i nakon intoksikacije ugljentetrahloridom. S obzirom na visoku hepatotoksičnost ugljentetrahlorida, dodatak CCl₄ značajno je smanjio sadržaj ukupnih proteina, za oko 40% u odnosu na netretirane životinje (poređenje CTRL i CTRL+CCl₄), odnosno prosečna vrednost ukupnih proteina značajno se razlikovala između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe (t=15,299, p<0,001), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi.

Tabela 5.27. Količina ukupnih proteina (g/L) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 58,1±3,53 ^{**}	1%	2%	3%
		60,2±1,99 ^{**}	57,5±5,88 ^{**}	54,9±1,26 ^{**}
		4%	5%	10%
		58,5±3,47 ^{**}	58,2±3,90 ^{**}	56,4±5,93 ^{**}
sa CCl ₄	CTRL 35,6±0,76 [*]	1%	2%	3%
		35,9±0,85 [*]	37,6±0,48 [*]	36,5±0,30 [*]
		4%	5%	10%
		42,5±2,37 ^{*,**}	48,2±1,47 ^{*,**}	48,9±1,98 ^{*,**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.12. Količina ukupnih proteina (g/L) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Međusobnim poređenjem količine ukupnih proteina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* bez prisustva CCl₄, nije utvrđena značajna razlika (p=0,340) u odnosu na različite primenjene koncentracije ekstrakta.

Upoređivanjem količine ukupnih proteina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 za sledeće koncentracije ekstrakta: 4% i CTRL+ CCl_4 ($p < 0,001$), 5% i CTRL+ CCl_4 ($p < 0,001$), i 10% i CTRL+ CCl_4 ($p < 0,001$), uz istovremeno postojanje značajne razlike između svih primenjenih koncentracija ekstrakta u prisustvu ugljentetrahlorida i kontrolne CTRL grupe ($p < 0,001$).

Analiziranjem količine ukupnih proteina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=97,686$, $p < 0,001$). Međusobnim poređenjem količine ukupnih proteina u odnosu na koncentracije ekstrakta (uz prisustvo CCl_4), uočena je statistički značajna dozna zavisnost. Nisu utvrđene značajne razlike u sadržaju ukupnih proteina između uzastopnih koncentracija ekstrakta 1% i 2% ($p=0,375$), 2% i 3% ($p=0,799$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p=0,959$) (Tabela 5.28.). Postoji značajna razlika između koncentracija ekstrakta 4%, 5% i 10% i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe, ali iako postoji značajna razlika između 4% i 5%, koncentracija od 5% ima značajno više vrednosti ovog parametra. S obzirom da ne postoji značajna razlika između koncentracija 5% i 10%, koncentracija 5% ekstrakta je pokazala najveći potencijalni hepatoprotektivni efekat, jer je najviše sprečila pad količine ukupnih proteina izazvan dodatkom CCl_4 , ali ipak ne u potpunosti: postoji značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL grupe.

Tabela 5.28. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti ukupnih proteina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L., uz prisustvo CCl_4 , u odnosu na koncentraciju.

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

Ugljentetrahloridom indukovano oštećenje jetre često se koristi kao model za ispitivanje hepatoprotektivnog svojstva nekog agensa. Administracija CCl_4 uzrokuje brojne nepovoljne efekte u hepatocitima. Hepatotoksin CCl_4 metabolički se aktivira posredstvom citohroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu i dovodi do produkcije trihlorometil radikala. Nastali slobodni radikali dalje stupaju u reakciju sa proteinima i na taj način remete strukturu i funkciju proteinskih molekula. Tretman ugljentetrahloridom rezultuje redukcijom sinteze proteina (144).

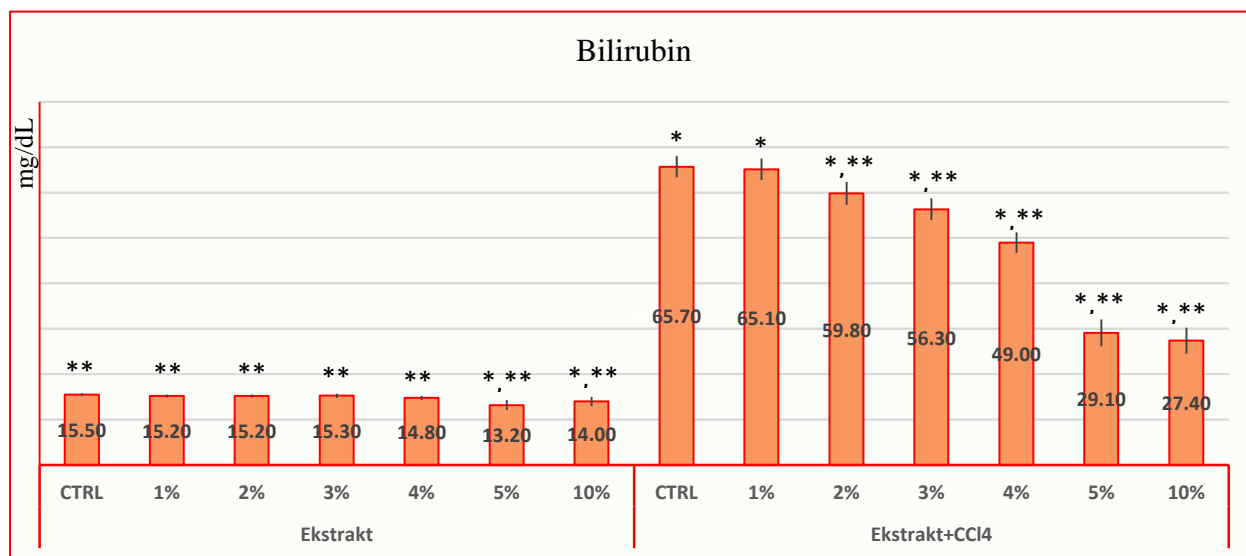
U literaturi ne postoje podaci za sadržaj ukupnih proteina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Alkushi (162) je pokazao da vodeni ekstrakt korena *Rumex acetosella* povećava nivo ukupnih proteina kod CCl_4 -tretiranih životinja. Tukappa i saradnici (144) su ispitivali potencijalno hepatoprotektivno dejstvo metanolnog ekstrakta herbe *Rumex vesicarius* i utvrdili da pomenuti ekstrakt, slično silimarinu, povećava količinu ukupnih proteina kod eksperimentalnih životinja tretiranih ugljentetrahloridom. Povišen nivo ukupnih proteina sugeriše da je ispitivani ekstrakt omogućio stabilizaciju endoplazmatskog retikuluma, a time i povećanu sintezu proteina i regeneraciju hepatocita. Hepatoprotektivna svojstva ekstrakta *Rumex vesicarius* dovode se u vezu sa sadržajem fenolnih jedinjenja i flavonoida (144). Venkatakishore i saradnici (171) su ustanovili da etanolni ekstrakt herbe *Gymnema sylvestre* povećava sadržaj ukupnih proteina kod životinja tretiranih ugljentetrahloridom, što ukazuje na zaštitna dejstva ekstrakta. Rezultati ove disertacije su u skladu sa pomenutim radovima što ukazuje na potencijalna hepatoprotektivna svojstva vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*.

Rezultati određivanja količine bilirubina u serumu, pre i nakon intoksikacije ugljentetrahloridom, prikazani su u Tabeli 5.29. i na Grafikonu 5.13. Administracija ovog agensa dovela je do značajnog povećanja količine bilirubina u serumu, a izmerene vrednosti su bile više od četiri puta veće u odnosu na netretirane životinje (poređenje CTRL i CTRL+ CCl_4), odnosno prosečna količina bilirubina u serumu značajno se razlikovala između kontrolne CTRL grupe i CTRL+ CCl_4 grupe ($t=52,036$, $p<0,001$), sa značajno većim vrednostima u CTRL+ CCl_4 grupi.

Tabela 5.29. Količina bilirubina u serumu (mg/dL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

bez CCl ₄	CTRL 15,5±0,33 ^{**}	1%	2%	3%
		15,2±0,33 ^{**}	15,2±0,29 ^{**}	15,3±0,46 ^{**}
		4%	5%	10%
		14,8±0,45 ^{**}	13,2±1,09 ^{*,**}	14,0±1,02 ^{*,**}
sa CCl ₄	CTRL 65,7±2,34 [*]	1%	2%	3%
		65,1±2,41 [*]	59,8±2,54 ^{*,**}	56,3±2,38 ^{*,**}
		4%	5%	10%
		49,0±2,25 ^{*,**}	29,1±2,96 ^{*,**}	27,4±2,84 ^{*,**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) od šest miševa; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ grupu.



Grafikon 5.13. Količina bilirubina u serumu (mg/dL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Analiziranjem količine bilirubina u serumu nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl₄, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F=9,027$, $p<0,001$). Međusobnim poređenjem količine bilirubina u odnosu na koncentraciju ekstrakta (bez prisustva CCl₄), utvrđena je značajna razlika između koncentracija ekstrakta 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na 5% (redom

$p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,007$), sa značajno nižim vrednostima za nivo 5%, kao i za 1%, 2% i 3% u odnosu na 10% (redom $p = 0,044$, $p = 0,040$, $p = 0,024$). Nisu utvrđene značajne razlike u količini bilirubina u serumu između uzastopnih koncentracija ekstrakta (bez prisustva CCl_4) 1% i 2% ($p = 1,000$), 2% i 3% ($p = 1,000$), 3% i 4% ($p = 0,736$), kao ni između koncentracija 5% i 10% ($p = 0,429$). Podaci su prikazani u Tabeli 5.30.a). Utvrđena je značajna razlika između kontrolne CTRL grupe i koncentracija ekstrakta 5% ($p < 0,001$) i 10% ($p = 0,005$), bez međusobne razlike, tako da se izdvojila koncentracija ekstrakta 5% sa najvećim potencijalnim hepatoprotektivnim dejstvom, jer je pri toj koncentraciji ekstrakta došlo do značajnog smanjenja količine bilirubina u serumu eksperimentalnih životinja.

Upoređivanjem količine bilirubina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , za različite koncentracije utvrđena je značajna razlika za sve primenjene koncentracije ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 , uz istovremeno postojanje značajne razlike između svih primenjenih koncentracija ekstrakta u prisustvu ugljentetrahlorida i kontrolne CTRL grupe ($p < 0,001$).

Analiziranjem količine bilirubina u serumu nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na koncentraciju ekstrakta ($F = 231,54$, $p < 0,001$). Daljom analizom, utvrđene su značajno više vrednosti za koncentraciju ekstrakta 1% u odnosu na 2% ($p = 0,014$) i 3% ($p < 0,001$). Utvrđene su i značajno više vrednosti ovog parametra za koncentracije ekstrakta 1%, 2% i 3% u odnosu na koncentraciju 4% (redom $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$), zatim značajno više vrednosti za koncentracije 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 5% (redom $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$). Utvrđene su i značajno više vrednosti količina bilirubina u serumu za koncentracije ekstrakta 1%, 2%, 3% i 4% u odnosu na koncentraciju 10% (redom $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$). Nisu utvrđene značajne razlike između uzastopnih koncentracija ekstrakta 2% i 3% ($p = 0,214$), kao ni između koncentracija ekstrakta 5% i 10% ($p = 0,860$) (Tabela 5.30.b)). I kod ovog parametra, koncentracija 5% je pokazala najznačajniji hepatoprotektivni efekat jer je najviše poništila štetan efekat CCl_4 , ali nije u potpunosti s obzirom da postoji značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL grupe.

Tabela 5.30. Post-hoc analiza: poređenje prosečnih vrednosti bilirubina nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. u odnosu na koncentraciju.

a) bez prisustva CCl₄

b) uz prisustvo CCl₄

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	ns					
3%	ns	ns				
4%	ns	ns	ns			
5%	**	**	**	**		
10%	*	*	*	ns	ns	

	1%	2%	3%	4%	5%	10%
1%						
2%	*					
3%	**	ns				
4%	**	**	**			
5%	**	**	**	**		
10%	**	**	**	**	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,05, ** p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

Intoksikacija ugljentetrahloridom izaziva pojačanu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje dovode do oksidativnog oštećenja hepatocita. Administracija ugljentetrahlorida uzrokuje porast količine bilirubina u serumu. Stabilizacija ćelijske membrane i zaštita hepatocita od delovanja ROS, kao i snižavanje novoa bilirubina u serumu ukazuje na hepatoprotektivnost ispitivanog agensa i težnju ka očuvanju fiziološke funkcije bilijarnog sistema (144, 162).

U literaturi ne postoje podaci za nivo bilirubina u serumu nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Tukappa i saradnici (144) su ispitivali potencijalno hepatoprotektivno delovanje metanolnog ekstrakta herbe *Rumex vesicarius*. Utvrđeno je da ispitivani ekstrakt snižava koncentraciju bilirubina kod CCl₄-tretiranih eksperimentalnih životinja. Rezultati su bili uporedivi sa silimarinom (144). Silimarin, kao poznati hepatoprotektivni agens, često se koristi za poređenje efekata drugih ekstrakata (162). Sheela i Udhayakumari (172) su ispitivali zaštitna svojstva metanolnog ekstrakta cele biljke *Sauropus bacciformis* prema jetri i ustanovili da ispitivani ekstrakt značajno snižava nivo bilirubina kod tretiranih pacova, slično silimarinu. Rezultati ove disertacije su u skladu sa pomenutim radovima što ukazuje na potencijalna hepatoprotektivna svojstva vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*.

Kod svih pomenutih parametara, utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne CTRL grupe i CTRL+CCl₄ grupe, čime smo potvrdili hepatotoksičnost ugljentetrahlorida. Takođe, utvrđena je značajna razlika između svih koncentracija ekstrakta, bez prisustva ugljentetrahlorida, i kontrolne CTRL+CCl₄ grupe, kod svih ispitivanih parametara, čime je

dokazano da vodeni ekstrakt ploda štavelja nije hepatotoksičan. Daljom analizom rezultata, pokazano je, ne samo odsustvo hepatotoksičnosti ekstrakta, već i to da ekstrakt, bez prisustva CCl_4 , pri koncentraciji 5% pokazuje hepatoprotektivan efekat kada su u pitanju sledeći parametri: sadržaj hidroksiprolina, aktivnost ALT i AST, i količina bilirubina u serumu, snižavajući značajno ove vrednosti u odnosu na kontrolnu CTRL grupu (za te parametre postoji značajna razlika između koncentracije ekstrakta 5% bez CCl_4 i kontrolne CTRL grupe).

S obzirom da kod svih parametara ne postoji statistički značajna razlika između koncentracija ekstrakta 5% i 10% u prisustvu ugljentetrahlorida, zaključujemo da koncentracija ekstrakta 5% sa CCl_4 ima najveće hepatoprotektivno dejstvo za eksperimentalne životinje (postoji značajna razlika između ove koncentracije ekstrakta i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe). Koncentracija ekstrakta 5% u prisustvu ugljentetrahlorida je u najvećoj meri poništila negativne efekte CCl_4 , održavajući vrednosti u okviru kontrolnih za parametre: telesna masa životinja i sadržaj hepatične DNK, jer postoji značajna razlika između ove koncentracije i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe, a ne postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu. Za ostale parametre, koncentracija ekstrakta 5% nije u potpunosti sprečila štetno delovanje ugljentetrahlorida, jer i dalje postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

5.4.2. Aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa izazvanog ugljentetrahloridom i nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja različitih parametara oksidativnog stresa izazvanog ugljentetrahloridom i nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* prikazani su u Tabeli 5.31. i na Grafikonima 5.14.-5.20.

Tabela 5.31. Aktivnost antioksidantnih enzima nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

		kontrola	primenjena doza 5% ekstrakta		
		CTRL	1 mL/kg t.m.	2 mL/kg t.m.	3 mL/kg t.m.
SOD (U/mg proteina)	ekstrakt	21,25 ± 0,62 ^{**}	21,42 ± 0,61 ^{**}	22,23 ± 0,36 ^{**}	28,38 ± 1,71 ^{*,**}
	ekstrakt+CCl ₄	5,69 ± 0,16 [*]	6,57 ± 0,20 [*]	10,45 ± 1,42 ^{*,**}	15,62 ± 0,28 ^{*,**}
XOD (nmol/mg proteina)	ekstrakt	1,95 ± 0,07 ^{**}	1,94 ± 0,03 ^{**}	1,81 ± 0,12 ^{*,**}	1,69 ± 0,05 ^{*,**}
	ekstrakt+CCl ₄	2,81 ± 0,09 [*]	3,16 ± 0,07 ^{*,**}	2,51 ± 0,10 ^{*,**}	2,04 ± 0,07 ^{**}
CAT (nmol/mg proteina)	ekstrakt	9,54 ± 0,09 ^{**}	9,60 ± 0,27 ^{**}	9,73 ± 0,37 ^{**}	10,28 ± 0,29 ^{*,**}
	ekstrakt+CCl ₄	3,40 ± 0,28 [*]	6,68 ± 0,33 ^{*,**}	7,11 ± 0,36 ^{*,**}	7,64 ± 0,33 ^{*,**}
GSHPx (nmol/mg proteina)	ekstrakt	8,48 ± 0,07 ^{**}	9,57 ± 0,13 ^{*,**}	11,17 ± 0,52 ^{*,**}	11,58 ± 0,50 ^{*,**}
	ekstrakt+CCl ₄	21,37 ± 0,23 [*]	18,32 ± 0,71 ^{*,**}	16,40 ± 0,21 ^{*,**}	16,88 ± 0,66 ^{*,**}
GR (nmol/mg proteina)	ekstrakt	6,11 ± 0,03 ^{**}	6,22 ± 0,15 ^{**}	5,45 ± 0,28 ^{*,**}	6,11 ± 0,02 ^{**}
	ekstrakt+CCl ₄	1,24 ± 0,02 [*]	3,23 ± 0,13 ^{*,**}	4,31 ± 0,22 ^{*,**}	4,46 ± 0,17 ^{*,**}
GSH (nmol/mg proteina)	ekstrakt	4,95 ± 0,08 ^{**}	4,94 ± 0,02 ^{**}	4,99 ± 0,08 ^{**}	4,67 ± 0,21 ^{*,**}
	ekstrakt+CCl ₄	0,73 ± 0,03 [*]	3,08 ± 0,46 ^{*,**}	4,67 ± 0,24 ^{**}	4,55 ± 0,09 ^{**}
LPx (nmol MDA/mg proteina)	ekstrakt	2,96 ± 0,04 ^{**}	2,83 ± 0,09 ^{*,**}	2,57 ± 0,02 ^{*,**}	2,98 ± 0,07 ^{**}
	ekstrakt+CCl ₄	9,84 ± 0,08 [*]	8,02 ± 0,06 ^{*,**}	6,14 ± 0,09 ^{*,**}	4,20 ± 0,09 ^{*,**}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest životinja; * - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; ** - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL+CCl₄ kontrolnu grupu.

Između kontrolne CTRL grupe i kontrolne CTRL+CCl₄ grupe utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima sledećih antioksidantnih enzima: SOD (t=59,434, p<0,001), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, XOD (t=18,891, p<0,001), sa značajno višim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, CAT (t=50,613, p<0,001), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, kao i GSHPx (t=133,756, p<0,001), sa značajno višim vrednostima u

CTRL+CCl₄ grupi, GR ($t=326,690$, $p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, GSH ($t=120,504$, $p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, LPx ($t=186,112$, $p<0,001$), sa značajno višim vrednostima u CTRL+CCl₄ grupi, čime je potvrđeno prooksidantno delovanje ugljentetrahlorida. Naime, administracija ugljentetrahlorida uzrokovala je stimulaciju produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i snižavanje aktivnosti antioksidantnih enzima. Rezultat ovakvog dejstva ugljentetrahlorida na hepatocite je oksidativan stres, koji se manifestuje, između ostalog, intenziviranom lipidnom peroksidacijom u ćelijama.

Za sve analizirane parametre utvrđena je značajna razlika između svih primenjenih doza ekstrakta (1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m.) bez prisustva CCl₄ i kontrolne CTRL+CCl₄ grupe, čime je dokazano da ekstrakt ne pokazuje prooksidantnu aktivnost kao ugljentetrahlorid. Ekstrakt je u određenim primenjenim dozama bez prisustva CCl₄ delovao pozitivno za enzime SOD, XOD i CAT, kao i za parametar LPx, jer postoji značajna razlika između primenjenih doza ekstrakta i kontrolne CTRL grupe, s tim što su se vrednosti ovih parametara menjale suprotno od promena pod uticajem CCl₄. Ekstrakt je u određenim primenjenim dozama bez prisustva CCl₄ delovao na isti način kao i CCl₄ za parametre GSHPx, GR i GSH, ali ne u meri kao ugljentetrahlorid. Postoji značajna razlika između ovih primenjenih doza ekstrakta i kontrolne CTRL+CCl₄ grupe, kao i u odnosu na kontrolnu CTRL grupu, s tim što su se vrednosti ovih parametara pomerale u istom smeru kao i pod uticajem CCl₄. U primenjenoj dozi 1 mL/kg t.m. ekstrakt je ipak pružio benefit u pogledu aktivnosti GR i količine GSH, dok je u toj istoj koncentraciji izazvao najmanje štetnih efekata kod aktivnosti GSHPx.

Ekstrakt u dozi 3 mL/kg t.m. u prisustvu CCl₄ je u najvećoj meri pokazao mogući zaštitni efekat kada su u pitanju aktivnosti SOD, XOD i CAT, i intenzitet LPx, jer postoji značajna razlika između ove doze ekstrakta i kontrolne CTRL+CCl₄ grupe (jedino je aktivnost XOD u potpunosti održana u okviru kontrolne vrednosti, jer ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na CTRL grupu). Doza 2 mL/kg t.m. u prisustvu CCl₄ je u najvećoj meri poništila štetne efekte ugljentetrahlorida kada su aktivnosti GSHPx i GR, i sadržaj GSH u pitanju, jer postoji značajna razlika između ove doze ekstrakta i kontrolne CTRL+CCl₄ grupe (jedino je sadržaj GSH u potpunosti održan u okviru kontrolne vrednosti, jer ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na CTRL grupu).

Superoksid dismutaza (SOD)

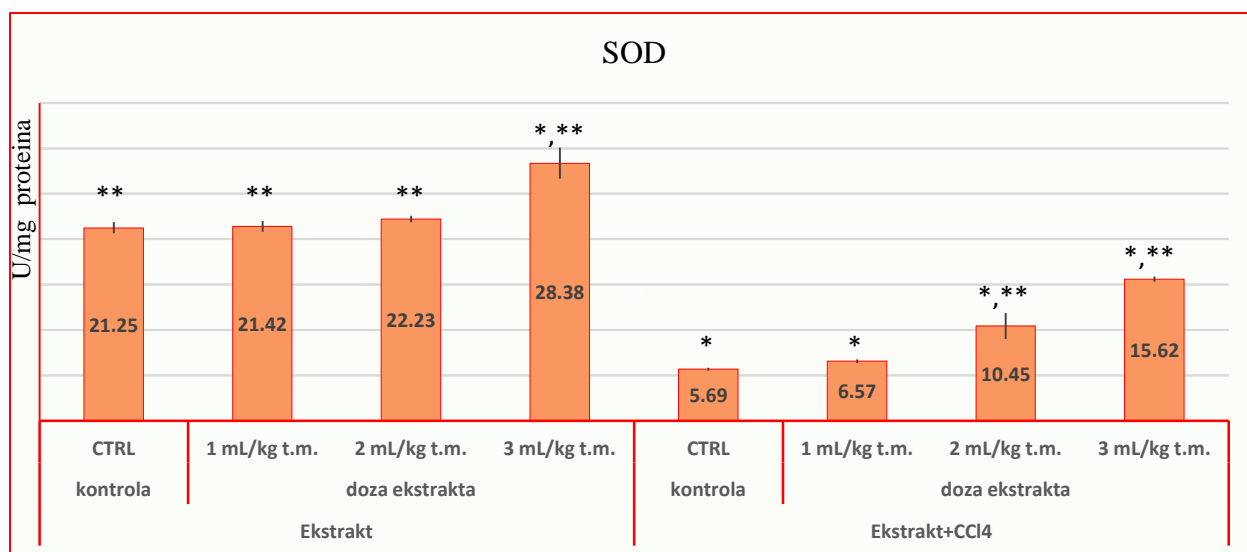
Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti SOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u odnosu na dozu ekstrakta ($F=76,561$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), sa značajno višim vrednostima za dozu ekstrakta 3 mL/kg t.m., bez međusobne razlike između 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,403$). Ovim se može zaključiti da je doza ekstrakta 3 mL/kg t.m. (bez CCl_4) pokazala mogući antioksidantni efekat, značajno povećavajući aktivnost SOD u odnosu na kontrolnu CTRL grupu ($p<0,001$).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti aktivnosti SOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , za različite primenjene doze utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+ CCl_4 : 2 mL/kg t.m. i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), i 3 mL/kg t.m. i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$), uz istovremeno postojanje značajne razlike između kontrolne grupe CTRL i svih primenjenih doza ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima aktivnosti SOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl_4) u odnosu na dozu ekstrakta ($F=174,255$, $p<0,001$). Daljom primenom Tukey post hoc testa utvrđena je značajna razlika između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), kao i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), pri čemu su više vrednosti za aktivnost SOD za veće doze. Može se zaključiti da je doza ekstrakta 3 mL/kg t.m. (sa CCl_4) u najvećoj meri poništila negativne efekte ugljentetrahlorida, jer postoji značajna razlika između ove doze ekstrakta i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe, ali nije u potpunosti sprečila pad aktivnosti SOD, jer i dalje postoji značajna razlika između doze ekstrakta 3 mL/kg t.m. i kontrolne CTRL grupe.

U literaturi nema podataka o aktivnosti enzima SOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* kod ugljentetrahloridom tretiranih eksperimentalnih životinja. Abdel-Sattar i saradnici (173) su utvrdili da metanolni ekstrakt herbe *Rumex nervosus* dovodi do *in vivo* snižavanja aktivnosti enzima SOD kod CCl_4 -tretirane grupe, kao posledica smanjenja oksidativnog stresa. Rezultati disertacije nisu u skladu sa ovim podacima, ukazujući da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao imati sposobnost povećanja antioksidantnog statusa hepatocita. Tukappa i saradnici (144) su utvrdili da je došlo do povećanja aktivnosti enzima SOD

nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Rumex vesicarius* kod ugljentetrahloridom tretirane grupe, u poređenju sa CCl₄-kontrolnom grupom. Rezultati istog parametra nakon administracije vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* bili su u skladu sa pomenutim radom, sugerišući na povećanje aktivnosti antioksidantnog sistema nakon primene ekstrakta vrsta *Rumex*.



Grafikon 5.14. Aktivnost SOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

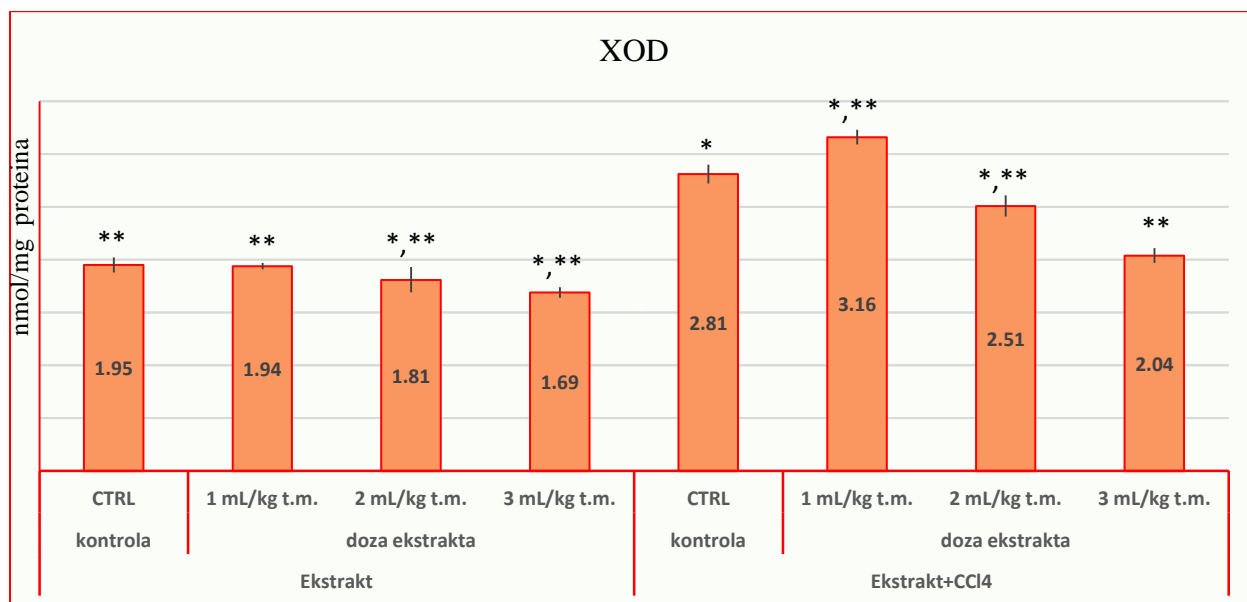
Ksantin oksidaza (XOD)

Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti XOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl₄, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjenu dozu ekstrakta ($F=16,403$, $p<0,001$). Daljom komparacijom (Tukey post hoc), utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,030$), 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,030$), i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima aktivnosti XOD sa povećanjem doze, čime se može zaključiti da je doza ekstrakta 3 mL/kg t.m. (bez CCl₄) pokazala najniži mogući prooksidantni efekat, značajno snižavajući aktivnost XOD u odnosu na kontrolnu CTRL grupu ($p<0,001$, za dozu 3 mL/kg t.m., dok je za 2 mL/kg t.m. $p=0,028$).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti aktivnosti XOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl₄, utvrđena je značajna razlika za sve primenjene doze u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+CCl₄ (p<0,001), dok samo kod doze 3 mL/kg t.m. nije utvrđena značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima aktivnosti XOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl₄) u odnosu na dozu ekstrakta (F=291,195, p<0,001). Daljom analizom utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u odnosu na uzastopne doze: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. (p<0,001), i 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p<0,001), kao i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p<0,001). Nameće se zaključak da je doza ekstrakta 3 mL/kg t.m. jedina koja je uspela da poništi negativno delovanje ugljentetrahlorida, održavajući vrednosti ovog parametra u okviru kontrolnih vrednosti (ne postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu).

U literaturi nema dostupnih podataka vezanih za *in vivo* aktivnost enzima XOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* kod ugljentetrahloridom izazvanog oksidativnog stresa. Maksimović i saradnici (7) su utvrdili da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* uzrokuje statistički značajno povećanje aktivnosti XOD nakon primenjenih različitih doza ispitivanog ekstrakta u odnosu na grupu koja je primila samo CCl₄. Ovo ukazuje na potencijalno prooksidantno delovanje pomenutog ekstrakta (7). Rezultati u disertaciji nisu u skladu sa ovim radom, budući da je tretman vodenim ekstraktom ploda štavolja uzrokovao supresiju aktivnosti XOD, približavajući vrednosti aktivnosti XOD kontrolnoj grupi (CTRL). Khan i Sultana (174) su utvrdili statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima XOD kod CCl₄-tretirane grupe nakon primene metanalnog ekstrakta cele biljke *Aegle marmelos* u odnosu na kontrolnu grupu. Kod CCl₄-indukovanog oksidativnog stresa primećena je pojačana aktivnost enzima XOD (174). Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, sugerisući da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao imati hepatoprotektivna svojstva, snižavajući aktivnost enzima XOD.



Grafikon 5.15. Aktivnost XOD nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Katalaza (CAT)

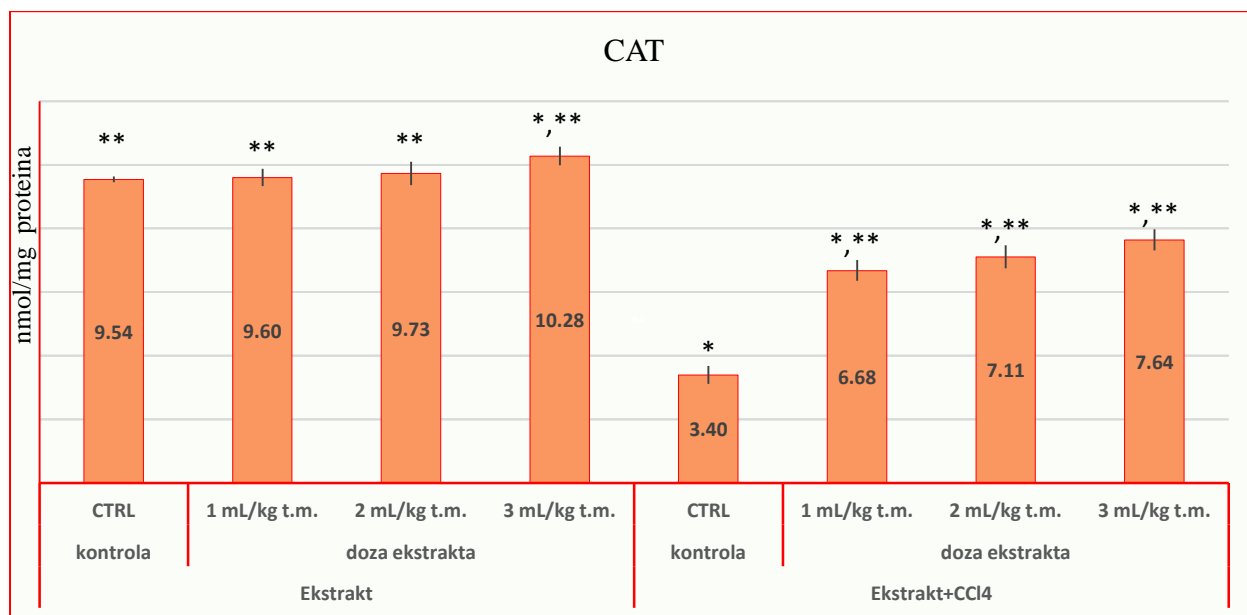
Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti CAT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ekstrakta ($F=7,948$, $p=0,004$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,005$), i 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,022$), sa značajno višim vrednostima za dozu 3 mL/kg t.m., bez međusobne razlike između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,751$). Može se zaključiti da je doza ekstrakta 3 mL/kg t.m. (bez CCl_4) pokazala najveću antioksidantnu aktivnost, i da pri ovoj dozi ekstrakta dolazi do značajnog povećanja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu CTRL grupu ($p=0,028$).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti aktivnosti CAT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika za sve primenjene doze u odnosu na obe kontrolne grupe: CTRL i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima aktivnosti CAT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl_4) u odnosu na dozu ekstrakta ($F=11,855$, $p=0,001$). Daljom primenom Tukey post hoc testa utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT

u odnosu na doze 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p = 0,043$), sa značajno višim vrednostima za 3 mL/kg t.m., bez međusobne razlike između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,107$). Nameće se zaključak da je doza ekstrakta 3 mL/kg t.m. u najvećoj meri anulirala negativne efekte ugljentetrahlorida, ali ne u potpunosti, s obzirom da postoji značajna razlika u odnosu na obe kontrolne grupe: CTRL i CTRL+CCl₄.

U literaturi nema podataka o aktivnosti enzima CAT uzrokovane aplikacijom CCl₄ nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Maksimović i saradnici (7) su uočili da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* dovodi do značajnog povećanja aktivnosti CAT u poređenju sa kontrolnom grupom koja je bila tretirana samo ugljentetrahloridom. Naime, aplikacija hepatotoksina CCl₄ je uzrokovala oksidativni stres u hepatocitima i snižavanje antioksidantnog sistema ćelija. Ekstrakt je delovao antioksidantno i stimulisao aktivnost enzima CAT, koji katališe reakcije detoksikacije ROS (7). Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom. Tukappa i saradnici (144) su utvrdili da je došlo do povećanja aktivnosti enzima CAT nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Rumex vesicarius* kod ugljentetrahloridom tretirane grupe, u poređenju sa CCl₄-kontrolnom grupom. Rezultati ovog parametra nakon administracije vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* bili su u skladu sa pomenutim radom, sugerišući na povećanu aktivnost antioksidantnog enzima CAT i posledično intenzivnije „hvatanje” ROS nakon primene ekstrakta vrsta *Rumex*. Khan i Sultana (174) su utvrdili statistički značajno povećanje aktivnosti enzima CAT kod CCl₄-tretirane grupe nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Aegle marmelos* u odnosu na kontrolnu grupu. Kod CCl₄-indukovanog oksidativnog stresa primećena je snižena aktivnost enzima CAT (174). Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, sugerišući da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao imati hepatoprotektivna svojstva, stimulišući aktivnost enzima CAT.



Grafikon 5.16. Aktivnost CAT nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

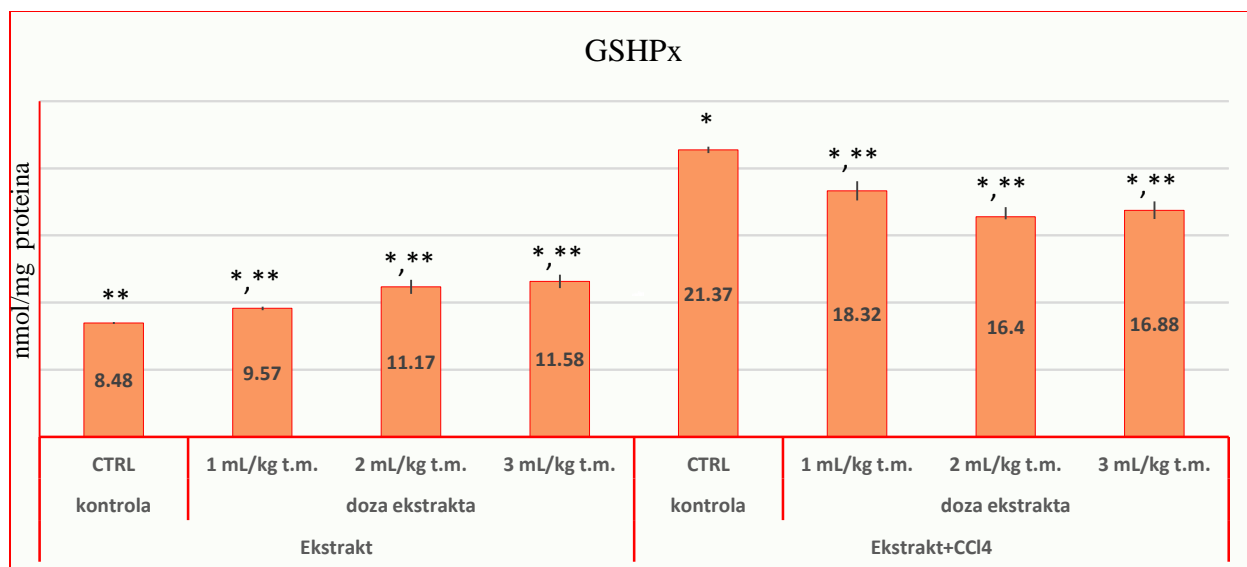
Glutation peroksidaza (GSHPx)

Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti GSHPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ekstrakta ($F=38,099$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), bez međusobne razlike između doza 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,235$), ali sa značajno nižom vrednosti pri dozi 1 mL/kg t.m., tako da je upravo doza ekstrakta 1 mL/kg t.m. pokazala najjači mogući antioksidantni efekat, s obzirom na značajno veću vrednost aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu CTRL grupu (za sve primenjene doze $p<0,001$). Ugljentetrahlorid ima značajno veću prooksidantnu aktivnost u poređenju sa dozom ekstrakta 1 mL/kg t.m., jer postoji značajna razlika između ove doze i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe.

Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti GSHPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika za sve primenjene doze u odnosu na obe kontrolne grupe: CTRL i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima aktivnosti GSHPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl₄) u odnosu na primenjenu dozu ekstrakta (F=18,041, p<0,001). Primenom Tukey post hoc testa utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSHPx u odnosu na doze 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. (p<0,001), i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p=0,002), sa značajno višim vrednostima za dozu 1 mL/kg t.m., bez međusobne razlike između doza 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p=0,339), tako da je doza ekstrakta 2 mL/kg t.m. u najvećoj meri neutralisala štetne efekte ugljentetrahlorida, ali ne u potpunosti, jer postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

Pregledom dostupne literature utvrđeno je da nema podataka o aktivnosti enzima GSHPx uzrokovane aplikacijom CCl₄ nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Maksimović i saradnici (7) su pokazali da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* dovodi do značajnog i dozno zavisnog smanjenja aktivnosti GSHPx u poređenju sa kontrolnom grupom koja je bila tretirana samo ugljentetrahloridom. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, ukazujući da je vodeni ekstrakt ploda štavelja mogao imati sposobnost umanjavanja štetnih efekata ugljentetrahlorida. Abdel-Sattar i saradnici (173) su utvrdili da metanolni ekstrakt herbe *Rumex nervosus* dovodi do *in vivo* značajnog smanjenja aktivnosti enzima GSHPx u odnosu na CCl₄-kontrolnu grupu. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom. Khan i Sultana (174) su uočili statistički značajno povećanje aktivnosti enzima GSHPx kod CCl₄-tretirane grupe nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Aegle marmelos* u odnosu na kontrolnu grupu. Kod CCl₄-indukovanog oksidativnog stresa utvrđena je smanjena aktivnost enzima GSHPx (174). Rezultati disertacije su u skladu sa navedenim radom, sugerišući da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao imati hepatoprotektivna svojstva, povećavajući aktivnost enzima GSHPx.



Grafikon 5.17. Aktivnost GSHPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

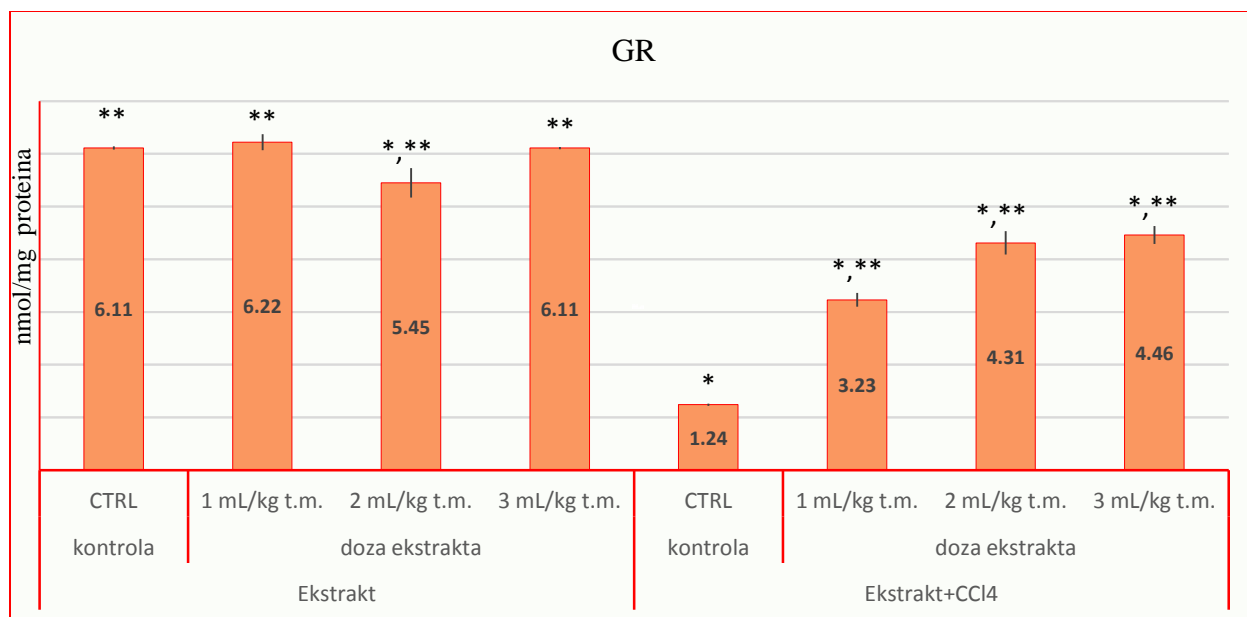
Glutation reduktaza (GR)

Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti GR nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ekstrakta ($F=31,553$, $p<0,001$). Daljom komparacijom (Tukey post hoc), utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), sa značajno nižom vrednosti aktivnosti GR za 2 mL/kg t.m., dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,552$). Može se zaključiti da ekstrakt pri dozi 1 mL/kg t.m. ne pokazuje mogući značajan prooksidantni efekat, iako povećava aktivnost GR, neznatno u odnosu na kontrolnu CTRL grupu. Ekstrakt u dozi 2 mL/kg t.m. pokazuje najslabiji mogući antioksidantni efekat, jer pri ovoj dozi dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu CTRL grupu ($p<0,001$), ali i dalje postoji značajna razlika između ove primenjene doze ekstrakta i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe.

Analiziranjem prosečnih vrednosti aktivnosti GR nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika za sve primenjene doze u odnosu na obe kontrolne grupe: CTRL i CTRL+ CCl_4 ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima aktivnosti GR nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl_4) u odnosu na dozu ekstrakta ($F=88,748$, $p<0,001$). Primenom Tukey post hoc testa utvrđena je značajna razlika u vrednostima aktivnosti GR u odnosu na doze 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p<0,001$), sa značajno nižim vrednostima za dozu 1 mL/kg t.m.. S obzirom na nepostojanje razlike između doza 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,342$), može se zaključiti da je doza ekstrakta 2 mL/kg t.m. u najvećoj meri sprečila negativan uticaj ugljentetrahlorida, ali ne u potpunosti, jer i dalje postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

U literaturi nema podataka o aktivnosti enzima GR uzrokovane aplikacijom CCl_4 nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Maksimović i saradnici (7) su pokazali da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* dovodi do značajnog povećanja aktivnosti GR u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom samo ugljentetrahloridom. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, sugerišući da vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* ima potencijalna antioksidantna svojstva i sposobnost da umanja oksidativna oštećenja nastala administracijom ugljentetrahlorida. Abdel-Sattar i saradnici (173) su utvrdili da metanolni ekstrakt herbe *Rumex nervosus* dovodi do *in vivo* povećanja aktivnosti enzima GR u odnosu na CCl_4 -kontrolnu grupu. Rezultati disertacije nisu u potpunosti u skladu sa ovim radom, jer je nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* kod CCl_4 -tretirane grupe došlo do značajno veće stimulacije aktivnosti enzima GR. Khan i Sultana (174) su utvrdili statistički značajno povećanje aktivnosti enzima GR kod CCl_4 -tretirane grupe nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Aegle marmelos* u odnosu na kontrolnu grupu. Kod CCl_4 -indukovanog oksidativnog stresa primećena je smanjena aktivnost enzima GR (174). Rezultati disertacije su u skladu sa navedenim radom, sugerišući da bi vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao imati hepatoprotektivna svojstva, povećavajući aktivnost enzima GR.



Grafikon 5.18. Aktivnost GR nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Glutation (GSH)

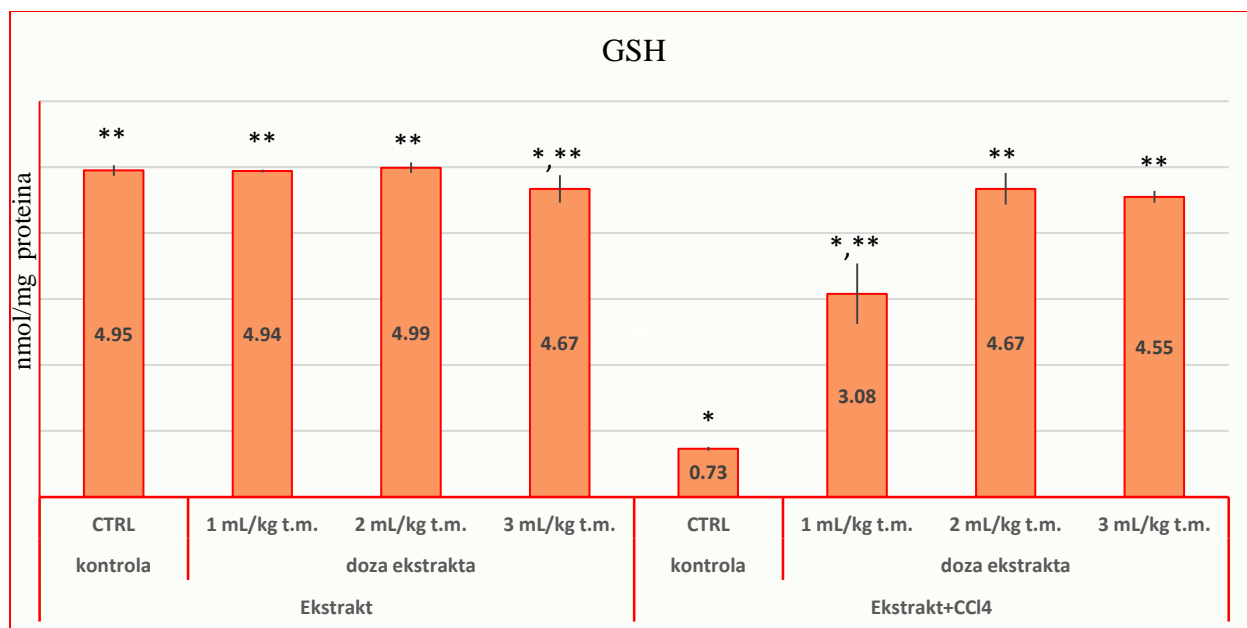
Analiziranjem prosečnih vrednosti količine GSH nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl_4 , utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ekstrakta ($F=10,239$, $p=0,002$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,008$), i 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,003$), sa značajno nižom vrednosti za dozu 3 mL/kg t.m., dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,780$). Nameće se zaključak da je najjači potencijalni antioksidantni efekat uočen nakon primene ekstrakta u dozi 1 mL/kg t.m., iako ne postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu. Ekstrakt u dozi 3 mL/kg t.m. deluje potencijalno prooksidantno u pogledu sadržaja GSH, jer pri ovoj koncentraciji dolazi do značajnog smanjenja količine GSH u odnosu na kontrolnu CTRL grupu ($p=0,004$), ali i dalje postoji značajna razlika između ove primenjene doze ekstrakta i kontrolne CTRL+ CCl_4 grupe.

Analiziranjem prosečnih vrednosti sadržaja GSH nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl_4 , utvrđena je značajna razlika za sve primenjene doze ekstrakta u

odnosu na kontrolnu grupu CTRL+CCl₄ ($p < 0,001$), dok za doze 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. nije utvrđena značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima sadržaja GSH nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl₄) u odnosu na dozu ekstrakta ($F=50,357$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđena je značajna razlika u količini GSH u odnosu na doze ekstrakta 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,002$), sa značajno nižim vrednostima za dozu ekstrakta 1 mL/kg t.m.. S obzirom da nije utvrđena značajna razlika između doza ekstrakta 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. ($p=0,763$), može se zaključiti da je ekstrakt u dozi 2 mL/kg t.m. u potpunosti sprečio negativan efekat ugljentetrahlorida, održavajući sadržaj GSH u okviru kontrolnih vrednosti (ne postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu).

Ne postoje literaturni podaci o sadržaju GSH nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* kod CCl₄-tretiranih eksperimentalnih životinja. Maksimović i saradnici (7) su pokazali da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* dovodi do statistički značajnog povećanja sadržaja GSH u poređenju sa kontrolnom CCl₄-tretiranom grupom. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, pokazujući da bi vodeni ekstrakt ploda štavolja mogao dovesti do povećanja antioksidantnog kapaciteta hepatocita i anuliranja prooksidantnog delovanja ugljentetrahlorida. Abdel-Sattar i saradnici (173) su uočili izrazito povećanje sadržaja GSH kod CCl₄-tretirane grupe nakon primene metanolnog ekstrakta herbe *Rumex nervosus* u odnosu na CCl₄-kontrolnu grupu. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, sugerišući da bi vrste *Rumex* mogle imati antioksidantna svojstva, povećavajući antioksidantni kapacitet hepatocita nakon CCl₄-indukovanog oksidativnog stresa. Ganaie i saradnici (145) su utvrdili da je došlo do povećanja sadržaja GSH kod CCl₄-tretirane grupe nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Rumex vesicarius* u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom.



Grafikon 5.19. Sadržaj GSH nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

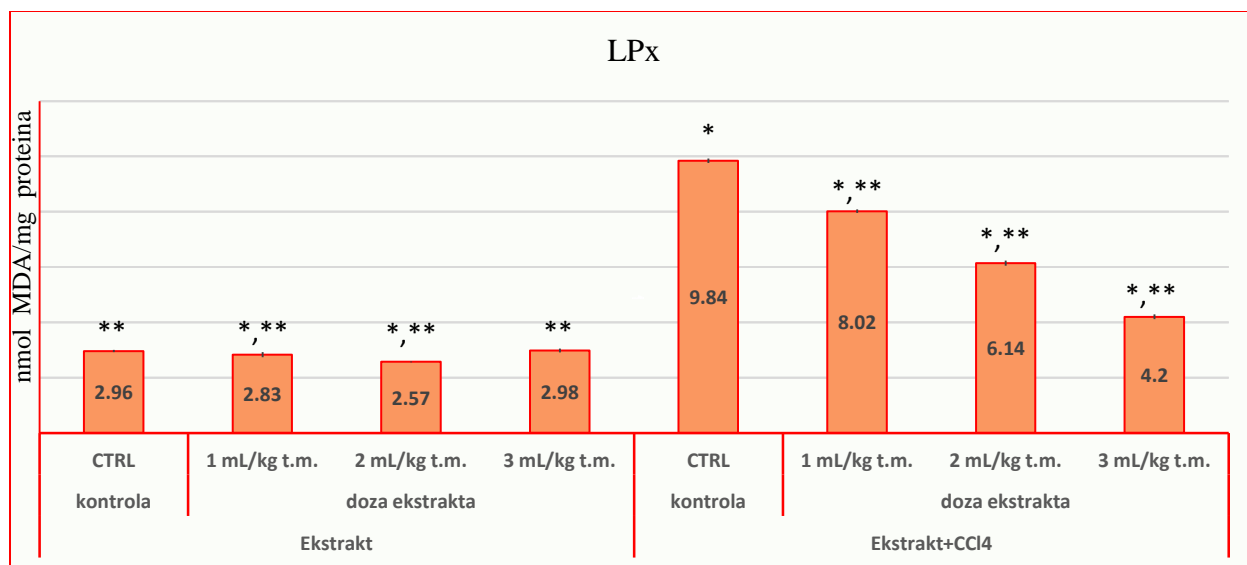
Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx)

Analiziranjem prosečnih vrednosti intenziteta LPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, bez prisustva CCl₄, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ekstrakta (F=60,721, p<0,001). Daljom komparacijom (Tukey post hoc), utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. (p<0,001), 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p<0,001), i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p=0,004), sa značajno nižim vrednostima za dozu ekstrakta 2 mL/kg t.m., čime se može zaključiti da je doza ekstrakta 2 mL/kg t.m. (bez CCl₄) pokazala potencijalno najjači mogući antioksidantni efekat, značajno snižavajući LPx u odnosu na kontrolnu CTRL grupu (p<0,001, za dozu 2 mL/kg t.m., dok je za 1 mL/kg t.m. p=0,009).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti intenziteta LPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus*, uz prisustvo CCl₄, za različite primenjene doze utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu CTRL+CCl₄: 1 mL/kg t.m. i CTRL+CCl₄ (p<0,001), 2 mL/kg t.m. i CTRL+CCl₄ (p=0,004), i 3 mL/kg t.m. i CTRL+CCl₄ (p<0,001), uz istovremeno postojanje značajne razlike između kontrolne grupe CTRL i svih primenjenih doza (p<0,001).

Postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima intenziteta LPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* (u prisustvu CCl₄) u odnosu na dozu ekstrakta (F=3308,437, p<0,001). Daljom primenom Tukey post hoc testa utvrđena je značajna razlika između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. (p<0,001), 2 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p<0,001), kao i 1 mL/kg t.m. i 3 mL/kg t.m. (p<0,001), tako da je vrednost intenziteta LPx obrnuto proporcionalna dozi, iz čega se može zaključiti da je ekstrakt u dozi 3 mL/kg t.m. u najvećoj meri sprečio negativan uticaj ugljentetrahlorida, ali ne u potpunosti, jer i dalje postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu.

Pregledom dostupne literature utvrđeno je da nema podataka o intenzitetu lipidne peroksidacije uzrokovane aplikacijom CCl₄ nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Maksimović i saradnici (7) su pokazali da metanolni ekstrakt ploda *Rumex crispus* dovodi do snižavanja intenziteta LPx u odnosu na kontrolnu grupu koja je bila tretirana samo ugljentetrahloridom. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, sugerišući da bi vodeni ekstrakt ploda štavolja mogao imati antioksidantna svojstva i time sposobnost da snizi intenzitet peroksidacije lipida. Abdel-Sattar i saradnici (173) su izmerili statistički značajno smanjenje koncentracije krajnjeg produkta lipidne peroksidacije – MDA kod ugljentetrahloridom tretirane grupe nakon primene metanolnog ekstrakta herbe *Rumex nervosus* u odnosu na CCl₄-kontrolnu grupu. Ovi podaci ukazuju na potencijalno antioksidantno dejstvo ispitivanog ekstrakta, odnosno da je došlo do značajnog smanjenja intenziteta peroksidacije lipida (173). Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, pokazujući da bi ekstrakti vrsta *Rumex* mogli imati sposobnost umanjenja intenziteta oksidativnog stresa indukovano administracijom hepatotoksina ugljentetrahlorida. Tukappa i saradnici (144) su utvrdili da je došlo do smanjenja količine MDA nakon primene metanolnog ekstrakta cele biljke *Rumex vesicarius* kod ugljentetrahloridom tretirane grupe, u poređenju sa CCl₄-kontrolnom grupom. Rezultati ovog parametra nakon administracije vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* bili su u skladu sa pomenutim radom, ukazujući da bi ekstrakti vrsta *Rumex* mogli dovesti do snižavanja oksidativnog stresa u hepatocitima, odnosno do suzbijanja prooksidantnog delovanja ugljentetrahlorida.



Grafikon 5.20. Intenzitet LPx nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

5.4.3. *In vivo* citotoksičnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. za ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)

S obzirom da je koncentracija ekstrakta 5% pokazala najizraženija hepatoprotektivna svojstva, dalje je upotrebljena u različitim dozama za ispitivanje potencijalne citotoksičnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* na eksperimentalnim životinjama.

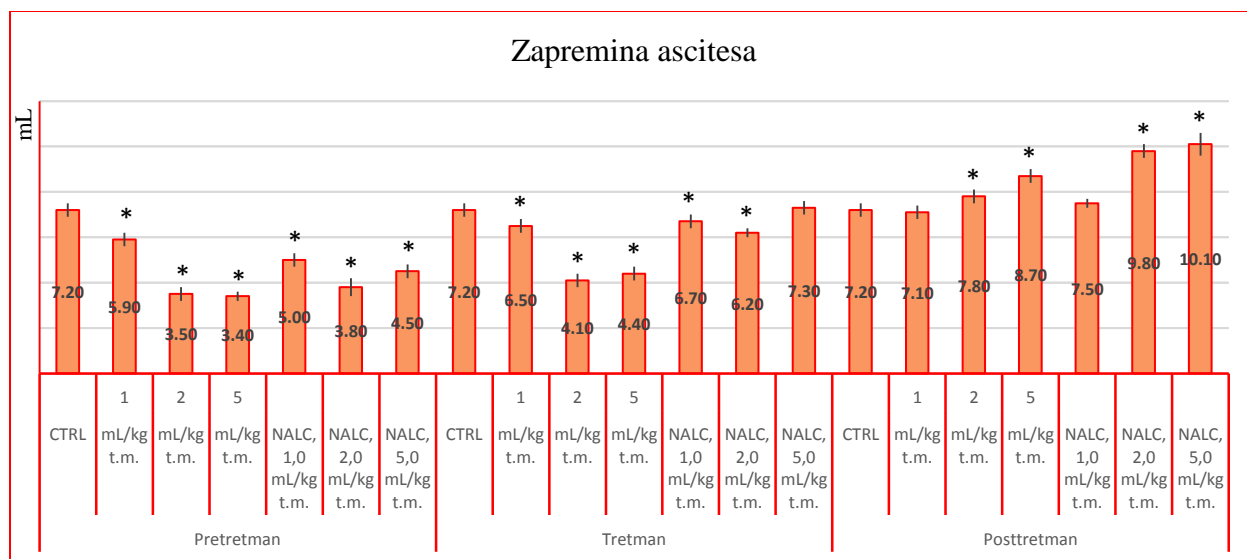
5.4.3.1. Zapremina ascitesa Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC) i broj i vijabilnost ćelija EAC nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja promene zapremine ascitesa EAC (rast tumora) nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavelja prikazani su u Tabeli 5.32. i na Grafikonu 5.21.

Tabela 5.32. Zapremina ascitesa EAC (rast tumora) (mL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, mL	Pretretman	7,2 ± 0,3	5,9 ± 0,3*	3,5 ± 0,3*	3,4 ± 0,2*
	Tretman		6,5 ± 0,3*	4,1 ± 0,3*	4,4 ± 0,3*
	Posttretman		7,1 ± 0,3	7,8 ± 0,3*	8,7 ± 0,3*
NALC	Pretretman		5,0 ± 0,3*	3,8 ± 0,4*	4,5 ± 0,3*
	Tretman		6,7 ± 0,3*	6,2 ± 0,2*	7,3 ± 0,3
	Posttretman		7,5 ± 0,2	9,8 ± 0,3*	10,1 ± 0,5*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu EAC grupu.



Grafikon 5.21. Zapremina ascitesa *EAC* (rast tumora) (mL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem zapremine ascitesa *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=146,4$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,984$).

Analiziranjem zapremine ascitesa *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=120,355$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,282$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=48,447$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,003$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,998$), kao i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa *EAC* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=18,149$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,011$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,067$).

Analiziranjem zapremine ascitesa *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=26,011$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,036$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,004$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa *EAC* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=101,804$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,223$) (Tabela 5.33.a)).

Analiziranjem zapremine ascitesa *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=25,044$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,007$), tretmana i posttretmana ($p=0,009$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u zapremini ascitesa *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=355,048$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,008$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u zapremini ascitesa *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=693,992$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u zapremini ascitesa *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=164,400$, $p<0,001$). Daljom komparacijom,

utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Analiziranjem zapremine ascitesa *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=488,220$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u zapremini ascitesa *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=353,202$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$) (Tabela 5.33.b).

Tabela 5.33. Poređenje zapremine ascitesa *EAC* (rast tumora) (mL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC			
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman	
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman							
	2	*			*			*			tretman	*			*			
	5	*	ns		*	ns		*	*		posttretman	*	*		*	*		
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman						
		1	2	5	1	2	5	1	2	5		tretman	*			*		
	1											posttretman	*	*		*	*	
	2	*			*			*			pretretman							
	5	ns	*		*	*		*	ns		tretman	*			*			
											posttretman	*	*		*	*		

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.34. prikazana su poređenja zapremine ascitesa *EAC* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.34. Poređenje zapremine ascitesa *EAC* (rast tumora) (mL) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

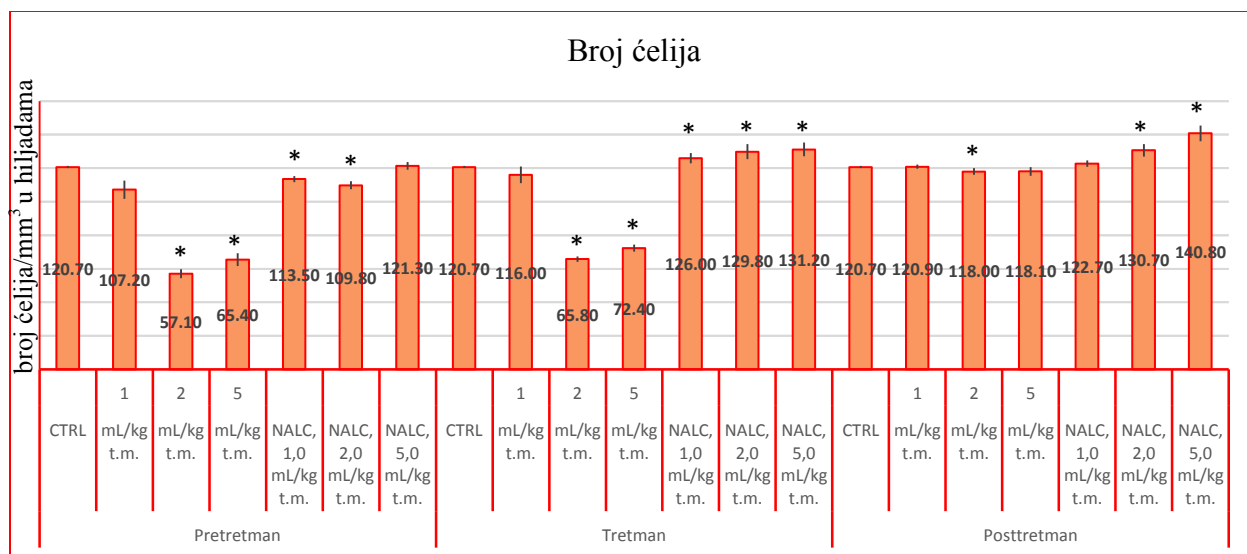
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,001		
	Tretman		0,294	
	Posttretman			0,005
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,119		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Rezultati ispitivanja broja ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.35. i na Grafikonu 5.22.

Tabela 5.35. Broj ćelija *EAC* (broj ćelija/mm³), izraženo u hiljadama, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, broj ćelija/mm ³ u hiljadama	Pretretman	120,7 ± 0,7	107,2 ± 5,4	57,1 ± 2,7*	65,4 ± 3,8*
	Tretman		116,0 ± 5,0	65,8 ± 1,6*	72,4 ± 2,1*
	Posttretman		120,9 ± 1,3	118,0 ± 2,0*	118,1 ± 2,6
NALC	Pretretman		113,5 ± 1,8*	109,8 ± 2,4*	121,3 ± 2,3
	Tretman		126,0 ± 3,1*	129,8 ± 4,5*	131,2 ± 4,1*
	Posttretman		122,7 ± 1,9	130,7 ± 3,7*	140,8 ± 4,7*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.22. Broj ćelija *EAC* (broj ćelija/mm³), izraženo u hiljadama, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom broju ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=23,08$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom broju ćelija *EAC* između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,998$).

Analiziranjem broja ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=21,311$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,935$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom broju ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=3,975$, $p=0,041$). Utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,049$), dok nije utvrđena za koncentracije 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=1,000$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,058$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom broju ćelija *EAC* nakon primene NALC (pretretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=41,894$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,081$).

Ne postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima broja ćelija *EAC* nakon primene NALC (tretman) u odnosu na dozu ($p=0,096$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom broju ćelija *EAC* nakon primene NALC (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=37,410$, $p<0,001$). Utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.36.a).

Analiziranjem broja ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=15,657$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,008$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,153$).

Postoji značajna razlika u broju ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=1375,009$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u broju ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=15,391$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p=0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,910$).

Utvrđena je značajna razlika u broju ćelija *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=49,59$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Analiziranjem broja ćelija *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=63,140$, $p<0,001$). Daljom komparacijom,

utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,914$).

Utvrđena je značajna razlika u broju ćelija *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 38,270$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,001$), tretmana i posttretmana ($p = 0,002$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$) (Tabela 5.36.b).

Tabela 5.36. Poređenje broja ćelija *EAC* (broj ćelija/mm³) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	*			*		
	5	*	ns		*	ns		ns	ns		posttretman	*	ns		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
		1	2	5	1	2	5	1	2	5		tretman	*			*	
	1											posttretman	*	*		*	ns
	2	ns			ns			*				pretretman					
	5	*	*		ns	ns		*	*			tretman	ns			*	
												posttretman	*	*		*	*

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.37. prikazana su poređenja broja ćelija *EAC* (broj ćelija/mm³) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.37. Poređenje broja ćelija *EAC* (broj ćelija/mm³) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

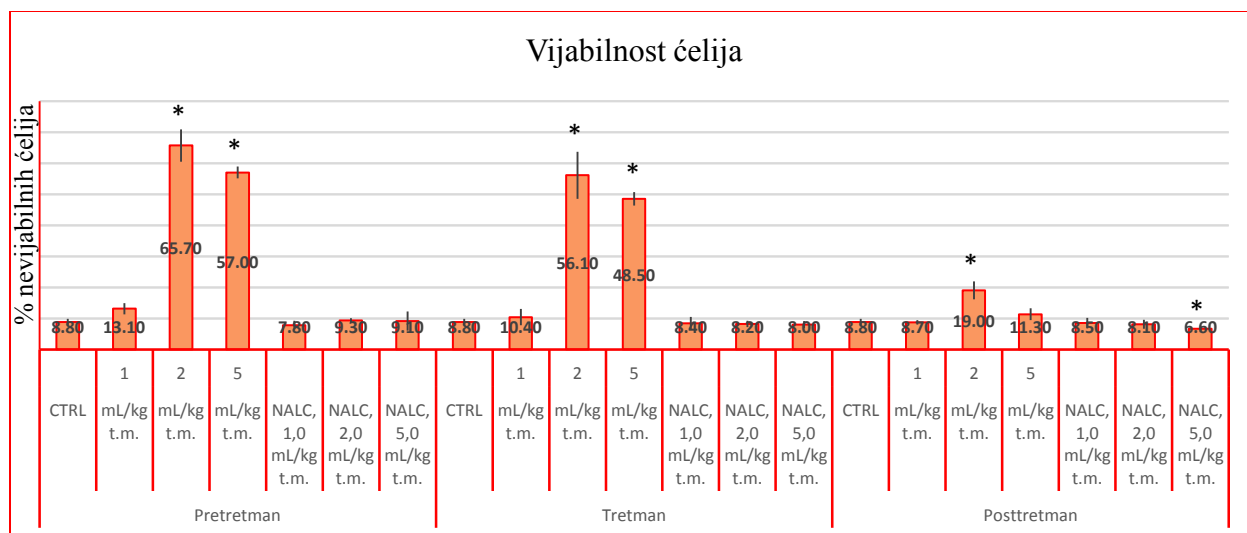
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,039		
	Tretman		0,002	
	Posttretman			0,092
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Rezultati ispitivanja vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.38. i na Grafikonu 5.23.

Tabela 5.38. Vijabilnost ćelija *EAC* (% nevijabilnih ćelija) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, % nevijabilnih ćelija	Pretretman	8,8 ± 1,0	13,1 ± 1,8	65,7 ± 5,2*	57,0 ± 1,9*
	Tretman		10,4 ± 2,6	56,1 ± 7,6*	48,5 ± 2,2*
	Posttretman		8,7 ± 0,7	19,0 ± 2,9*	11,3 ± 1,9
NALC	Pretretman		7,8 ± 1,4	9,3 ± 0,8	9,1 ± 3,1
	Tretman		8,4 ± 2,1	8,2 ± 1,0	8,0 ± 1,1
	Posttretman		8,5 ± 1,7	8,1 ± 1,4	6,6 ± 1,1*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.23. Vijabilnost ćelija *EAC* (% nevijabilnih ćelija) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=420,0$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=154,303$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=40,399$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,120$).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene NALC (pretretman, tretman i posttretman), nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (redom $p=0,387$, $p=0,912$ i $p=0,077$) (Tabela 5.39.a)).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=8,182$, $p=0,004$). Utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p=0,003$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,061$), i tretmana i posttretmana ($p=0,315$).

Postoji značajna razlika u vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=116,023$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,026$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretremana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=875,045$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), kao i tretmana i posttretmana ($p<0,001$), pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene NALC za doze 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m., nije utvrđena značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman (redom $p=0,769$, $p=0,131$ i $p=0,118$) (Tabela 5.39.b)).

Tabela 5.39. Poređenje vijabilnosti ćelija *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5
1									
2	*			*			*		
5	*	*		*	*		ns	*	

doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
1 mL/kg t.m.	pretretman						
	tretman	ns			ns		
	posttretman	*	ns		ns	ns	
2 mL/kg t.m.	pretretman						
	tretman	*			ns		
	posttretman	*	*		ns	ns	
5 mL/kg t.m.	pretretman						
	tretman	*			ns		
	posttretman	*	*		ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.40. prikazana su poređenja vijabilnosti ćelija *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.40. Poređenje vijabilnosti ćelija (% nevijabilnih ćelija) *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,177	
	Posttretman			0,712
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

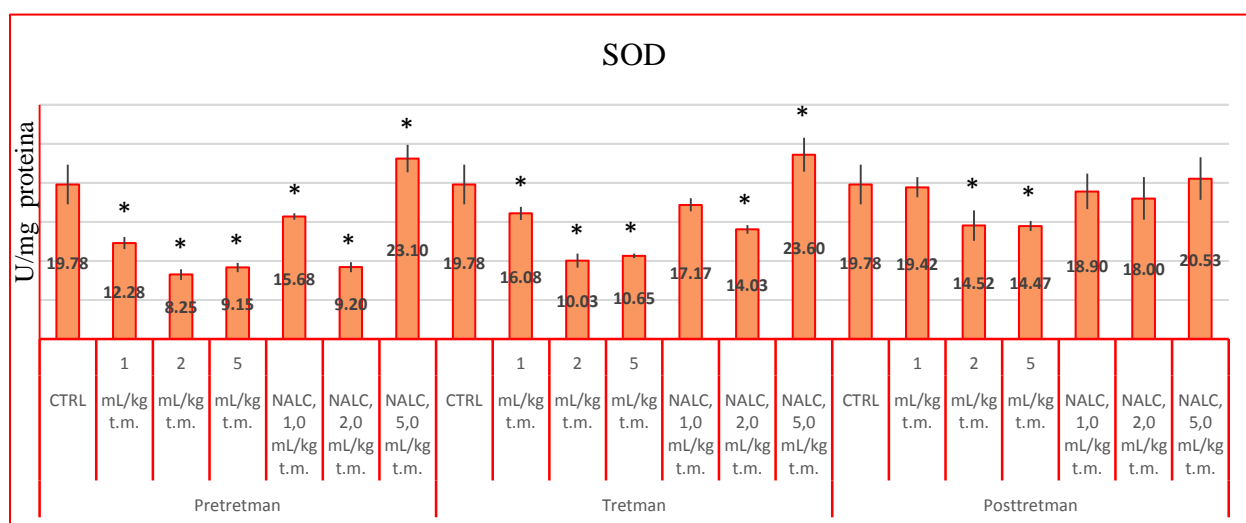
5.4.3.2. Antioksidantni status ćelija *Ehrlich*-ovog ascitnog tumora (*EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.41. i na Grafikonu 5.24.

Tabela 5.41. Aktivnost SOD u ćelijama *EAC* (U/mg proteina) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, U/mg proteina	Pretretman	19,78±2,53	12,28±0,78*	8,25±0,67*	9,15±0,58*
	Tretman		16,08±0,84*	10,03±0,89*	10,65±0,29*
	Posttretman		19,42±1,29	14,52±1,96*	14,47±0,63*
NALC	Pretretman		15,68±0,40*	9,20±0,64*	23,10±1,77*
	Tretman		17,17±0,84	14,03±0,54*	23,60±2,17*
	Posttretman		18,90±2,28	18,00±2,74	20,53±2,72

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.24. Aktivnost SOD u ćelijama *EAC* (U/mg proteina) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* (pretretman) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjenu dozu ($F=57,81$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,005$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,684$).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=126,647$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,873$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjenu dozu ($F=24,644$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=1,000$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=234,978$, $p<0,001$). Uvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), kao i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=75,260$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,025$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), kao i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Ne postoji značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($p=0,260$) (Tabela 5.42.a)).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog

parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=76,717$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,007$), tretmana i posttretmana ($p=0,009$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=37,003$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,076$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=165,614$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=7,673$, $p=0,005$). Daljom analizom, nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,202$), i tretmana i posttretmana ($p=0,122$), a utvrđena je između pretretmana i posttretmana ($p=0,004$).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=42,704$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,002$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($p=0,070$) (Tabela 5.42.b)).

Tabela 5.42. Poređenje aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	*			ns		
	5	*	ns		*	ns		*	ns		posttretman	*	*		*	ns	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		ns			*		
	2	*			*			ns		posttretman		*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman					
	2	*			*			ns		tretman		*			ns		
	5	*	*		*	*		ns	ns	posttretman		*	*		ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.43. prikazana su poređenja aktivnosti SOD u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.43. Poređenje aktivnosti SOD (U/mg proteina) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

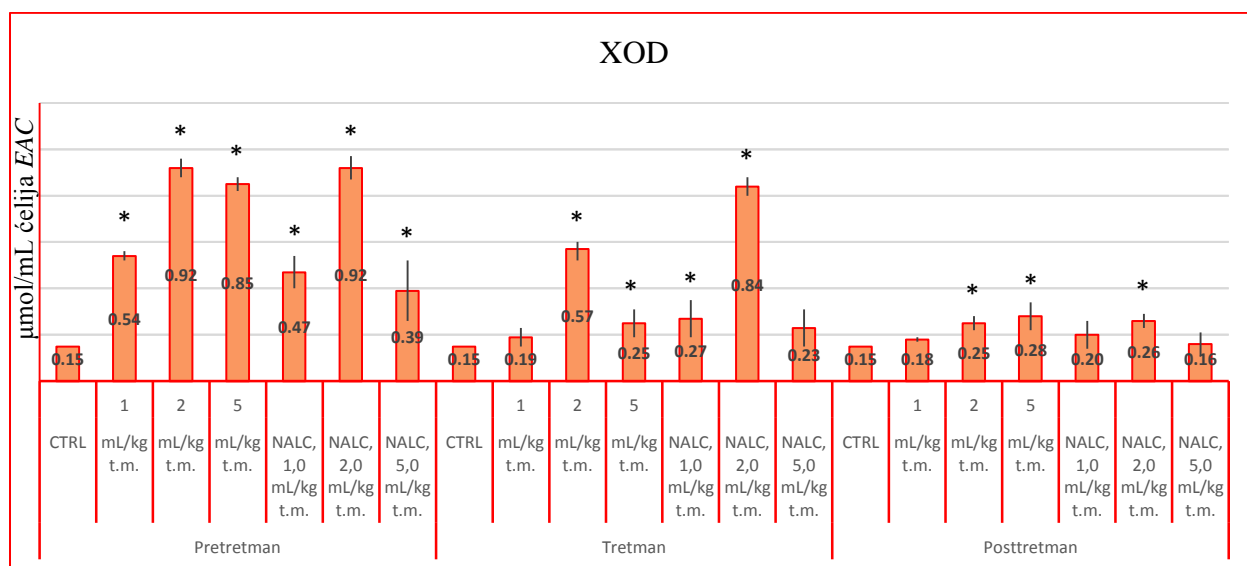
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,049	
	Posttretman			0,640
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,031		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,030
	Doza 5 mL/kg t.m.			
Pretretman	<0,001			
Tretman		<0,001		
Posttretman			0,030	

Rezultati ispitivanja aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.44. i na Grafikonu 5.25.

Tabela 5.44. Aktivnost XOD u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>EAC</i>	Pretretman	0,15 \pm 0,00	0,54 \pm 0,02*	0,92 \pm 0,04*	0,85 \pm 0,03*
	Tretman		0,19 \pm 0,04	0,57 \pm 0,03*	0,25 \pm 0,06*
	Posttretman		0,18 \pm 0,01	0,25 \pm 0,03*	0,28 \pm 0,06*
NALC	Pretretman		0,47 \pm 0,07*	0,92 \pm 0,05*	0,39 \pm 0,13*
	Tretman		0,27 \pm 0,08*	0,84 \pm 0,04*	0,23 \pm 0,08
	Posttretman		0,20 \pm 0,06	0,26 \pm 0,03*	0,16 \pm 0,05

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.25. Aktivnost XOD u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=214,1$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima između doza:

1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,003$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F = 131,086$, $p < 0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,056$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F = 10,773$, $p = 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,006$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,496$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (pretretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F = 62,586$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,003$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,359$).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F = 137,59$, $p < 0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,587$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F = 7,012$, $p = 0,007$). Daljom analizom utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,002$), a nije utvrđena značajna razlika za koncentracije 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,084$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,324$) (Tabela 5.45.a)).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog

parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=420,755$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,702$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=533,716$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i tretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=270,280$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,658$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=21,79$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,001$), pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,262$).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=437,460$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,010$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=10,074$, $p=0,002$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,018$), i pretretmana i posttretmana ($p=0,002$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,460$) (Tabela 5.45.b)).

Tabela 5.45. Poređenje aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.				NALC				
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman		pretretman	tretman	posttretman		
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman									
	2	*			*			*			tretman	*			*			*		
	5	*	*		ns	*		*	ns		posttretman	*	ns		*	ns		*	ns	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman				NALC	pretretman			
	1									tretman		*			*			*		
	2	*			*				ns	posttretman		*	*		*		*	*	*	
		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman					pretretman			
5	ns	*		ns	*			ns	*	posttretman		*	ns		*	ns	*	ns		

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.46. prikazana su poređenja aktivnosti XOD u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.46. Poređenje aktivnosti XOD ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

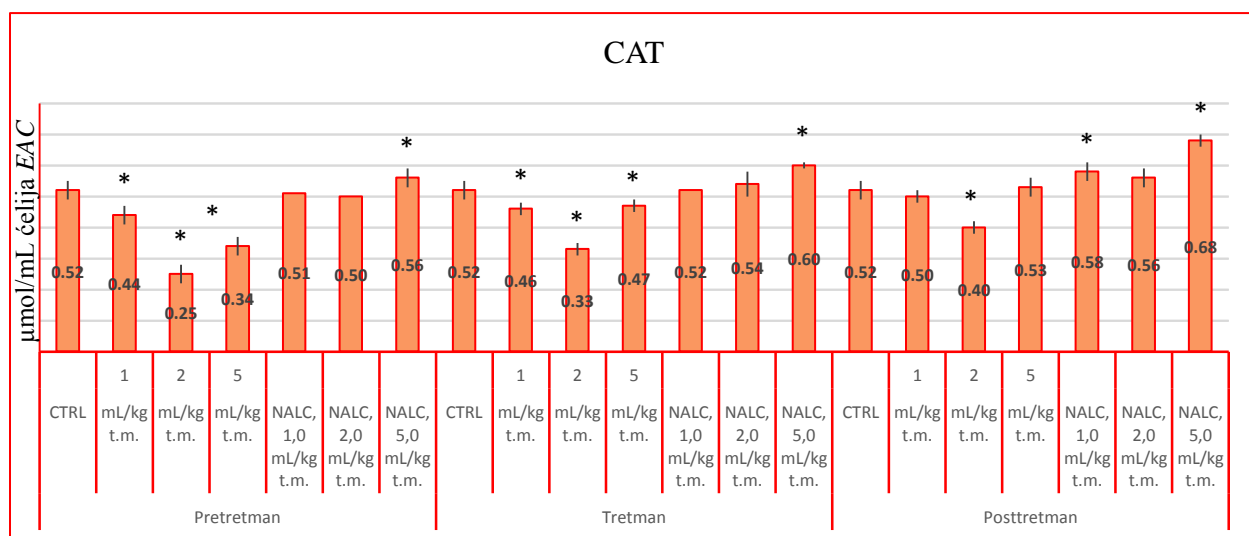
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,028		
	Tretman		0,069	
	Posttretman			0,415
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,991 NS		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,440
	Doza 5 mL/kg t.m.			
Pretretman	<0,001			
Tretman		0,498		
Posttretman			0,440	

Rezultati ispitivanja aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda šavelja prikazani su u Tabeli 5.47. i na Grafikonu 5.26.

Tabela 5.47. Aktivnost CAT u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>EAC</i>	Pretretman	0,52 \pm 0,03	0,44 \pm 0,03*	0,25 \pm 0,03*	0,34 \pm 0,03*
	Tretman		0,46 \pm 0,02*	0,33 \pm 0,02*	0,47 \pm 0,02*
	Posttretman		0,50 \pm 0,02	0,40 \pm 0,02*	0,53 \pm 0,03
NALC	Pretretman		0,51 \pm 0,00	0,50 \pm 0,00	0,56 \pm 0,03*
	Tretman		0,52 \pm 0,00	0,54 \pm 0,04	0,60 \pm 0,01*
	Posttretman		0,58 \pm 0,03*	0,56 \pm 0,03	0,68 \pm 0,02*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.26. Aktivnost CAT u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* (pretretman) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjenu dozu ($F=55,36$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=87,639$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,780$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjenu dozu ($F=56,116$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,177$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=14,719$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,009$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,833$).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=17,245$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,005$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,549$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=31,541$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,663$) (Tabela 5.48.a)).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=13,182$, $p<0,001$). Utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p=0,001$), i tretmana i posttretmana ($p=0,005$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,481$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=49,415$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=73,453$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,003$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=18,06$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), i tretmana i posttretmana ($p=0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,790$).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=5,396$, $p=0,017$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p=0,016$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,093$), kao i tretmana i posttretmana ($p=0,631$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=39,451$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), i tretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,064$) (Tabela 5.48.b)).

Tabela 5.48. Poređenje aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	ns			ns		
	5	*	*		ns	*		ns	*		posttretman	*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			ns		
	2	ns			ns			ns		posttretman		*	*		*	ns	
NALC	1									5 mL/kg t.m.	pretretman						
	2										tretman	*			ns		
	5	*	*		*	*		*	*		posttretman	*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.49. prikazana su poređenja aktivnosti CAT u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.49. Poređenje aktivnosti CAT ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

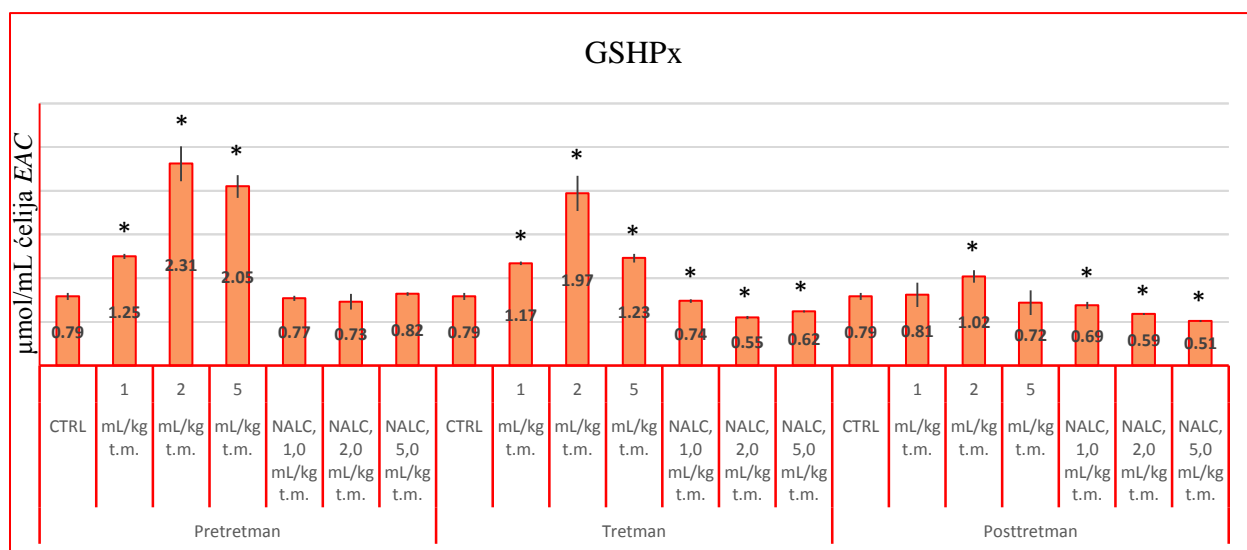
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,001
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
Pretretman	<0,001			
Tretman		<0,001		
Posttretman			<0,001	

Rezultati ispitivanja aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.50. i na Grafikonu 5.27.

Tabela 5.50. Aktivnost GSHPx u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>EAC</i>	Pretretman	0,79 \pm 0,04	1,25 \pm 0,03*	2,31 \pm 0,20*	2,05 \pm 0,13*
	Tretman		1,17 \pm 0,02*	1,97 \pm 0,20*	1,23 \pm 0,05*
	Posttretman		0,81 \pm 0,14	1,02 \pm 0,07*	0,72 \pm 0,14
NALC	Pretretman		0,77 \pm 0,03	0,73 \pm 0,09	0,82 \pm 0,02
	Tretman		0,74 \pm 0,02*	0,55 \pm 0,02*	0,62 \pm 0,01*
	Posttretman		0,69 \pm 0,04*	0,59 \pm 0,01*	0,51 \pm 0,01*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.27. Aktivnost GSHPx u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=94,70$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,006$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=81,381$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,779$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjenu dozu ($F=9,480$, $p=0,002$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,016$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,464$).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=4,295$, $p=0,034$). Daljom analizom utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,029$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,708$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,228$).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=274,85$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=104,095$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.51.a)).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjenu tretman ($F=46,125$, $p<0,001$). Utvrđena je značajna razlika

između tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,481$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti GSPHx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 94,351$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,007$), tretmana i posttretmana ($p = 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSPHx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 198,769$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSPHx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 10,051$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,021$), i pretretmana i posttretmana ($p = 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,351$).

Analiziranjem aktivnosti GSPHx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F = 22,722$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), pretretmana i posttretmana ($p = 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,281$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSPHx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 808,452$, $p < 0,001$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$) (Tabela 5.51.b)).

Tabela 5.51. Poređenje aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	ns			ns		
	5	*	*		ns	*		ns	*		posttretman	*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			*		
	2	ns			*			*		posttretman		*	*		*	ns	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman					
	2	ns			*			*		tretman		*			*		
	5	ns	*		*	*		*	*	posttretman		*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.52. prikazana su poređenja aktivnosti GSHPx u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.52. Poređenje aktivnosti GSHPx ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

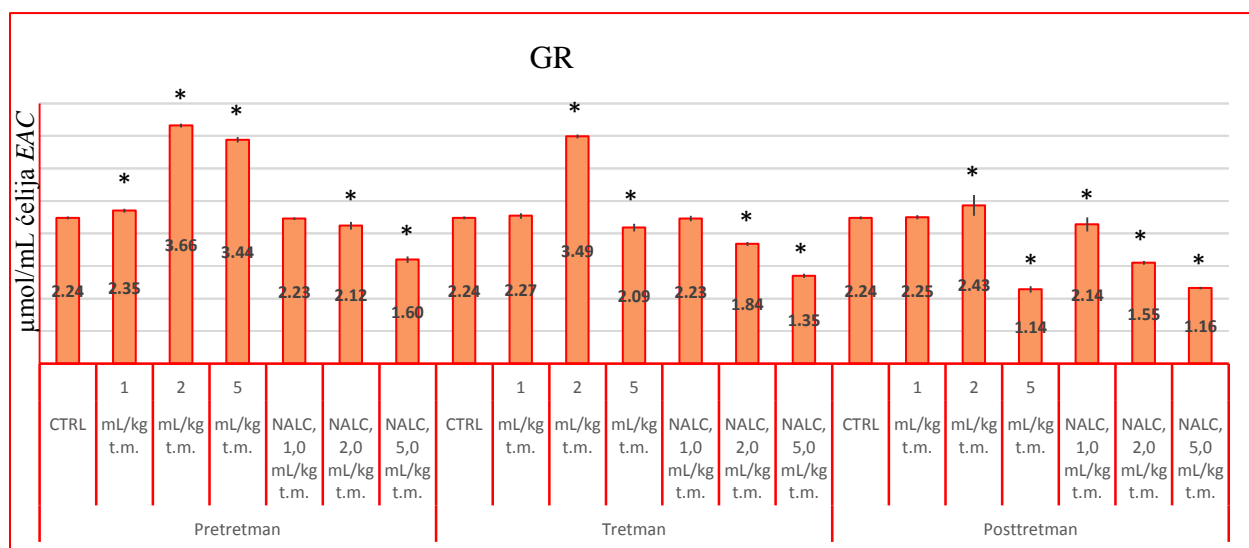
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,066
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
Pretretman	<0,001			
Tretman		<0,001		
Posttretman			<0,001	

Rezultati ispitivanja aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.53. i na Grafikonu 5.28.

Tabela 5.53. Aktivnost GR u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>EAC</i>	Pretretman	2,24 \pm 0,02	2,35 \pm 0,03*	3,66 \pm 0,03*	3,44 \pm 0,04*
	Tretman		2,27 \pm 0,04	3,49 \pm 0,03*	2,09 \pm 0,06*
	Posttretman		2,25 \pm 0,03	2,43 \pm 0,16*	1,14 \pm 0,05*
NALC	Pretretman		2,23 \pm 0,02	2,12 \pm 0,06*	1,60 \pm 0,05*
	Tretman		2,23 \pm 0,04	1,84 \pm 0,03*	1,35 \pm 0,03*
	Posttretman		2,14 \pm 0,11*	1,55 \pm 0,03*	1,16 \pm 0,02*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.28. Aktivnost GR u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=3053$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=1480,18$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GR u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. u odnosu na primenjenu dozu ($F=302,96$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,007$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za pretretman, utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=303,492$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=1043,9$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GR u ćelijama *EAC* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=356,143$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.54.a)).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=16,300$, $p<0,001$). Utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,628$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=282,296$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,024$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=3242,61$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($p=0,050$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=255,673$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=211,216$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$) (Tabela 5.54.b).

Tabela 5.54. Poređenje aktivnosti GR u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC									
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman													
	2	*			*			*			tretman	*			ns									
	5	*	*		*	*		*	*		posttretman	*	ns		ns	ns								
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
	1																							
	2	*			*			*										tretman	*			*	*	
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
	1																							
	2	*			*			*										tretman	*			*	*	
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
	1																							
	5	*	*		*	*		*	*									posttretman	*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.55. prikazana su poređenja aktivnosti GR u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.55. Poređenje aktivnosti GR ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

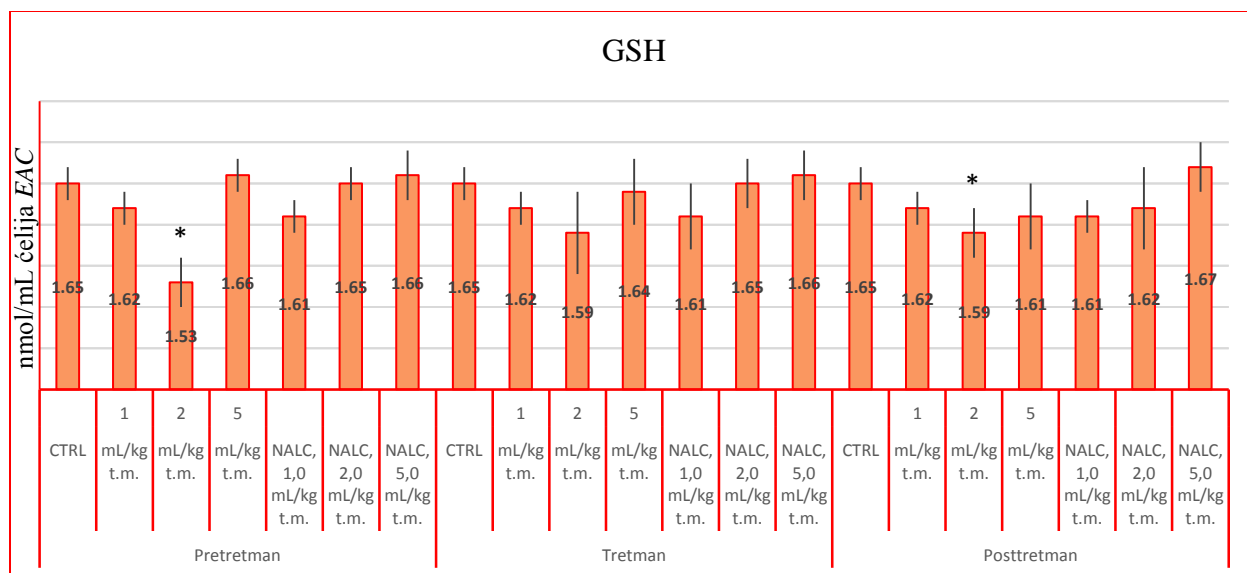
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,111	
	Posttretman			0,040
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Rezultati ispitivanja sadržaja GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.56. i na Grafikonu 5.29.

Tabela 5.56. Sadržaj GSH u ćelijama *EAC* (nmol GSH/mL ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, nmol/mL ćelija <i>EAC</i>	Pretretman	1,65 ± 0,02	1,62 ± 0,02	1,53 ± 0,03*	1,66 ± 0,02
	Tretman		1,62 ± 0,02	1,59 ± 0,05	1,64 ± 0,04
	Posttretman		1,62 ± 0,02	1,59 ± 0,03*	1,61 ± 0,04
NALC	Pretretman		1,61 ± 0,02	1,65 ± 0,02	1,66 ± 0,03
	Tretman		1,61 ± 0,04	1,65 ± 0,03	1,66 ± 0,03
	Posttretman		1,61 ± 0,02	1,62 ± 0,05	1,67 ± 0,03

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.29. Sadržaj GSH u ćelijama *EAC* (nmol GSH/mL ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=45,30$, $p<0,001$). Daljom analizom, utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,085$).

Analiziranjem sadržaja GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($p=0,125$).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($p=0,312$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (pretretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=6,862$, $p=0,008$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,034$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,012$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,967$).

Analiziranjem sadržaja GSH u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=4,558$, $p=0,028$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,096$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,946$), a utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,032$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=4,330$, $p=0,033$). Daljom analizom nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,236$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,106$), dok je utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,033$) (Tabela 5.57.a)).

Analiziranjem sadržaja GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjeni tretman ($p=0,916$).

Postoji značajna razlika u sadržaju GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=4,309$, $p=0,033$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p=0,045$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,069$), kao ni između tretmana i posttretmana ($p=0,972$).

Nije utvrđena značajna razlika u sadržaju GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($p=0,099$).

Analiziranjem sadržaja GSH u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za doze 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m., nije utvrđena značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman (redom $p=0,993$, $p=0,268$ i $p=0,885$) (Tabela 5.57.b)).

Tabela 5.57. Poređenje sadržaja GSH u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.				NALC			
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman		pretretman	tretman	posttretman	
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman				NALC	pretretman			
	2	*			ns			ns			tretman	ns				ns			
	5	ns	*		ns	ns		ns	ns		posttretman	ns	ns			ns	ns		
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman			NALC	pretretman			
		1	2	5	1	2	5	1	2	5		tretman	ns				ns		
	1									posttretman		*	ns			ns	ns		
	2	*			ns			ns		pretretman									
	5	*	ns		*	ns		*	ns	tretman	ns			ns					
										posttretman	ns	ns				ns	ns		

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.58. prikazana su poređenja sadržaja GSH u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.58. Poređenje sadržaja GSH (nmol GSH/mL ćelija *EAC*) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

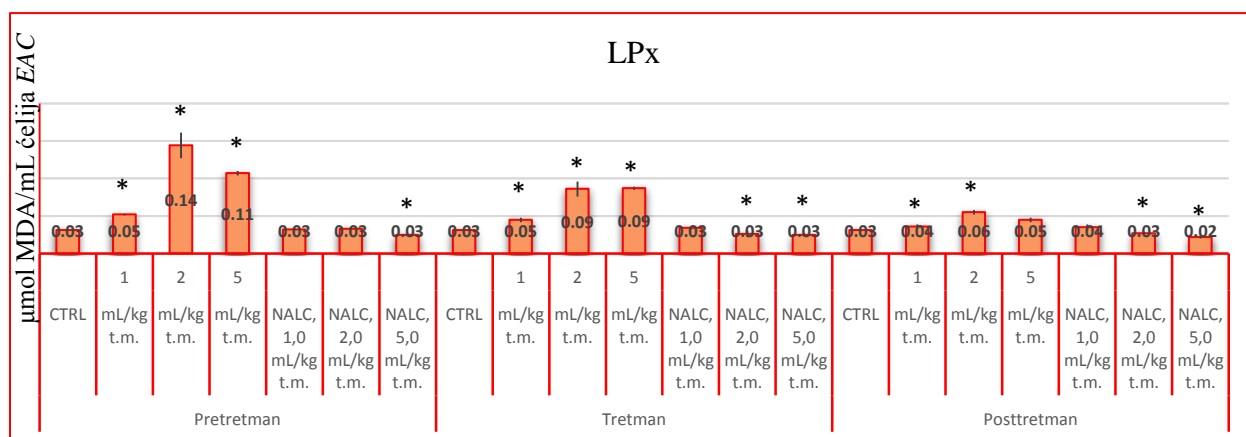
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,192		
	Tretman		0,434 ns	
	Posttretman			0,265 ns
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,029	
	Posttretman			0,313 ns
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,918		
	Tretman		0,294 ns	
	Posttretman			0,313

Rezultati ispitivanja intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.59. i na Grafikonu 5.30.

Tabela 5.59. Intenzitet LPx u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol MDA/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol MDA/mL}$ ćelija <i>EAC</i>	Pretretman	0,031±0,001	0,052±0,001*	0,144±0,017*	0,107±0,003*
	Tretman		0,045±0,003*	0,086±0,010*	0,087±0,002*
	Posttretman		0,036±0,003*	0,055±0,003*	0,045±0,003
NALC	Pretretman		0,032±0,002	0,033±0,002	0,025±0,002*
	Tretman		0,034±0,002	0,026±0,004*	0,025±0,002*
	Posttretman		0,035±0,004	0,027±0,002*	0,022±0,002*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest miševa; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *EAC* grupu.



Grafikon 5.30. Intenzitet LPx u ćelijama *EAC* ($\mu\text{mol MDA/mL}$ ćelija *EAC*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=120,7$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=92,562$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u

prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,998$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom intenzitetu LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F = 60,247$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F = 40,895$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,714$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F = 13,022$, $p = 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,002$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,684$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom intenzitetu LPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F = 38,146$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,004$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$) (Tabela 5.60.a)).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F = 62,447$, $p < 0,001$). Utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Postoji značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 87,720$,

$p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p = 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 846,197$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Nije utvrđena značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($p = 0,292$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F = 9,829$, $p = 0,002$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,003$), i pretretmana i posttretmana ($p = 0,007$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,923$).

Utvrđena je značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *EAC* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 4,027$, $p = 0,040$). Daljom analizom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$) (Tabela 5.60.b)).

Tabela 5.60. Poređenje intenziteta LPx u ćelijama *EAC* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	*			ns		
	5	*	*		*	ns		*	*		posttretman	*	*		ns	ns	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
		1	2	5	1	2	5	1	2	5		tretman	*			*	
	1											posttretman	*	*		*	ns
	2	ns			*			*			pretretman						
	5	*	*		*	ns		*	*		tretman	*			*		
											posttretman	*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.61. prikazana su poređenja intenziteta LPx u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.61. Poređenje intenziteta LPx ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *EAC*) u ćelijama *EAC* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,577
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

5.4.4. *In vivo* citotoksičnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. za ćelije AS30D ascitnog karcinoma (AS30D)

Nakon ispitivanja potencijalne citotoksičnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* na miševima soja *Hannover National Medical Institute* (Hann:NMRI) (model *Ehrlich*- ovog ascitnog karcinoma (EAC)), isti postupak eksperimenta je ponovljen na pacovima *Sprague Dawley* (model *Hepatom AS30D*).

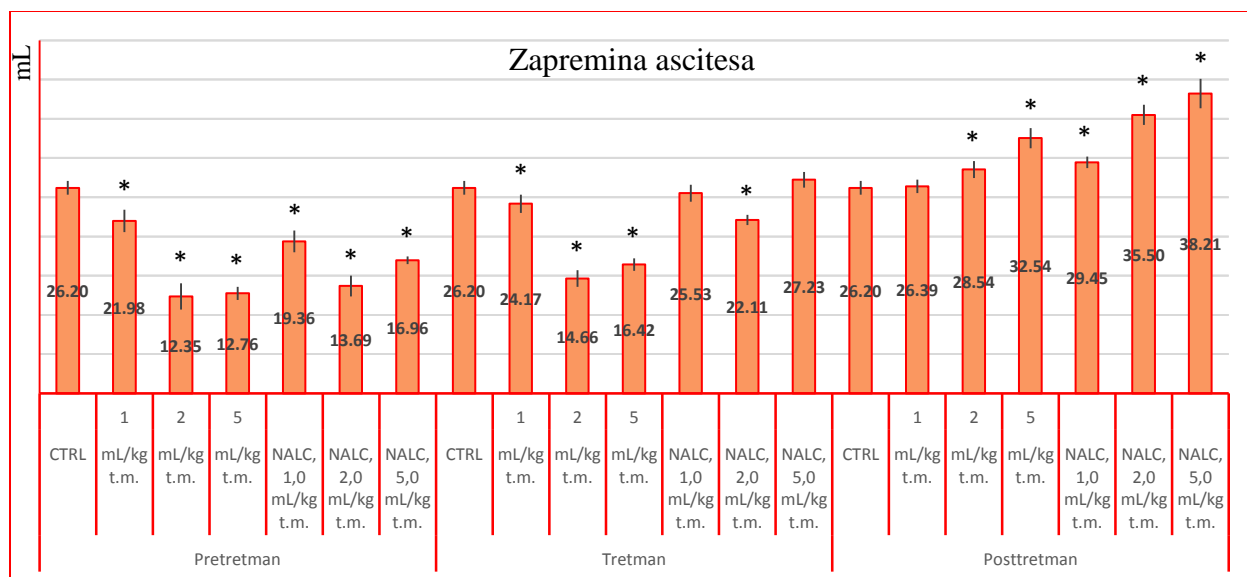
5.4.4.1. Zapremina ascitesa AS30D ascitnog karcinoma (AS30D) i broj i vijabilnost ćelija AS30D nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja promene zapremine ascitesa AS30D (rast tumora) nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.62. i na Grafikonu 5.31.

Tabela 5.62. Zapremina ascitesa AS30D (rast tumora) (mL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, mL	Pretretman	26,20±0,88	21,98±1,42*	12,35±1,66*	12,76±0,84*
	Tretman		24,17±1,17*	14,66±1,06*	16,42±0,81*
	Posttretman		26,39±0,86	28,54±1,09*	32,54±1,29*
NALC	Pretretman		19,36±1,38*	13,69±1,33*	16,96±0,50*
	Tretman		25,53±1,08	22,11±0,65*	27,23±1,01
	Posttretman		29,45±0,75*	35,50±1,28*	38,21±1,88*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu AS30D grupu.



Grafikon 5.31. Zapremina ascitesa *AS30D* (rast tumora) (mL) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem zapremine ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=97,201$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa između doza 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,938$).

Analiziranjem zapremine ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=146,693$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,032$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=48,870$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p=0,011$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=37,309$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem zapremine ascitesa *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=47,030$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,022$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=64,187$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,007$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,223$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.63.a).

Analiziranjem zapremine ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=20,919$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,016$), tretmana i posttretmana ($p=0,013$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u zapremini ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=270,660$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,019$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u zapremini ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=662,871$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u zapremini ascitesa *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=128,577$, $p<0,001$). Daljom komparacijom,

utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Analiziranjem zapremine ascitesa *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=571,990$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u zapremini ascitesa *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=424,172$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$) (Tabela 5.63.b)).

Tabela 5.63. Poređenje zapremine ascitesa *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	*			*		
	5	*	ns		*	*		*	*		posttretman	*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			*		
	2	*			*			*		posttretman		*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			*		
	5	*	*		*	*		*	*	posttretman		*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.64. prikazana su poređenja zapremine ascitesa *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.64. Poređenje zapremine ascitesa *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

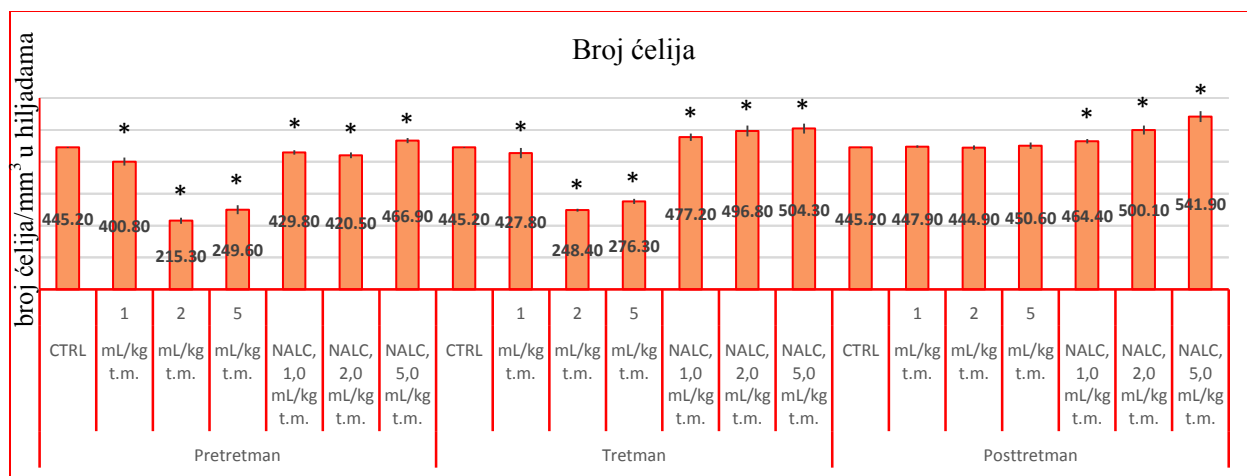
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,010		
	Tretman		0,056	
	Posttretman			<0,001
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,151		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Rezultati ispitivanja broja ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.65. i na Grafikonu 5.32.

Tabela 5.65. Broj ćelija *AS30D* (broj ćelija/mm³), izraženo u hiljadama, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, broj ćelija/mm ³ u hiljadama	Pretretman	445,2±1,8	400,8±12,8*	215,3±9,4*	249,6±14,0*
	Tretman		427,8±16,0*	248,4±4,5*	276,3±8,0*
	Posttretman		447,9±3,6	444,9±7,1	450,6±10,0
NALC	Pretretman		429,8±6,9*	420,5±8,9*	466,9±8,0*
	Tretman		477,2±11,7*	496,8±16,9*	504,3±15,4*
	Posttretman		464,4±7,2*	500,1±14,0*	541,9±16,8*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.32. Broj ćelija *AS30D* (broj ćelija/mm³), izraženo u hiljadama, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem broja ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=392,30$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem broja ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=493,091$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom broju ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($p=0,429$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom broju ćelija *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=56,042$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj zapremini ascitesa između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,128$).

Analiziranjem broja ćelija *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=5,336$, $p=0,018$). Daljom

analizom nisu utvrđene značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,070$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,743$), a utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,008$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom broju ćelija *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=51,201$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.66.a)).

Analiziranjem broja ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjeni tretman ($F=23,356$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,004$), tretmana i posttretmana ($p=0,013$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u broju ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=1731,06$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u broju ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=597,162$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,002$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u broju ćelija *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=45,895$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,061$).

Analiziranjem broja ćelija *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=64,925$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,061$).

Utvrđena je značajna razlika u broju ćelija *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=43,252$, $p<0,001$). Daljom komparacijom,

utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$) (Tabela 5.66.b).

Tabela 5.66. Poređenje broja ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*		ns		tretman		*			*			
	5	*	*		*	*	ns	ns	posttretman		*	*		*	ns		
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman						
	1								tretman		*			*			
	2	ns			ns		*		posttretman		*	*		*	ns		
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman						
	1								tretman		*			*			
	2	ns	*		*	ns	*	*	posttretman		*	*		*	*		

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.67. prikazana su poređenja broja ćelija *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.67. Poređenje prosečnog broja ćelija *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

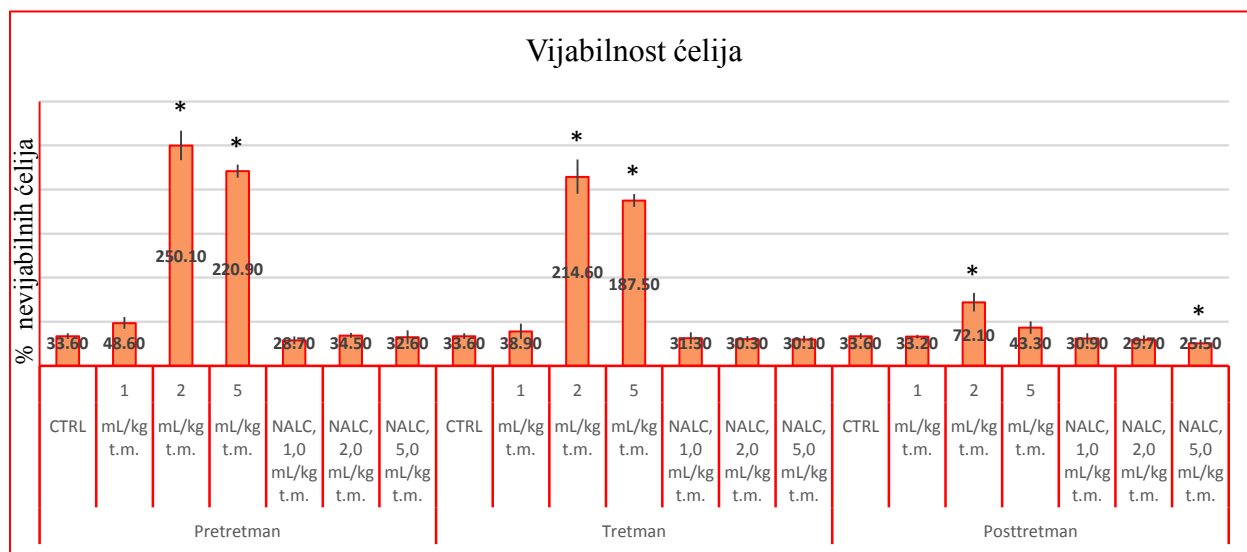
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,001
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Rezultati ispitivanja vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.68. i na Grafikonu 5.33.

Tabela 5.68. Vijabilnost ćelija *AS30D* (% nevijabilnih ćelija) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, % nevijabilnih ćelija	Pretretman	33,6±3,3	48,6±6,7	250,1±16,8*	220,9±7,4*
	Tretman		38,9±8,7	214,6±19,4*	187,5±7,3*
	Posttretman		33,2±2,0	72,1±10,5*	43,3±7,1
NALC	Pretretman		28,7±4,5	34,5±2,7	32,6±7,6
	Tretman		31,3±6,8	30,3±3,4	30,1±3,8
	Posttretman		30,9±5,9	29,7±4,7	25,5±4,1*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.33. Vijabilnost ćelija *AS30D* (% nevijabilnih ćelija) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=558,80$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene

su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=318,190$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,003$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=44,876$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p=0,003$), i 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,003$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,068$).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj vijabilnosti ćelija *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($p=0,196$).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene NALC (tretman), nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($p=0,903$).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj vijabilnosti ćelija *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($p=0,177$) (Tabela 5.69.a)).

Analiziranjem vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjeni tretman ($F=8,757$, $p=0,003$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,049$), i pretretmana i posttretmana ($p=0,002$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,308$).

Postoji značajna razlika u vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=207,867$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,004$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=1004,734$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Nije utvrđena značajna razlika u vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman (redom $p=0,720$, $p=0,720$ i $p=0,109$) (Tabela 5.69.b)).

Tabela 5.69. Poređenje vijabilnosti ćelija *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			1 mL/kg t.m.	pretretman						
	1								tretman		*				ns		
	2	*			*			*	posttretman		*	ns			ns	ns	
	5	*	*		*	*		ns	*								
	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman						
	1								tretman		*				ns		
	2	ns			ns			ns	posttretman		*	*			ns	ns	
	5	ns	ns		ns	ns		ns	ns					ns	ns		
	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman						
1								tretman	*					ns			
2	ns			ns			ns	posttretman	*		*			ns	ns		
5	ns	ns		ns	ns		ns	ns					ns	ns			

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.70. prikazana su poređenja vijabilnosti ćelija *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.70. Poređenje vijabilnosti ćelija *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,124	
	Posttretman			0,381
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

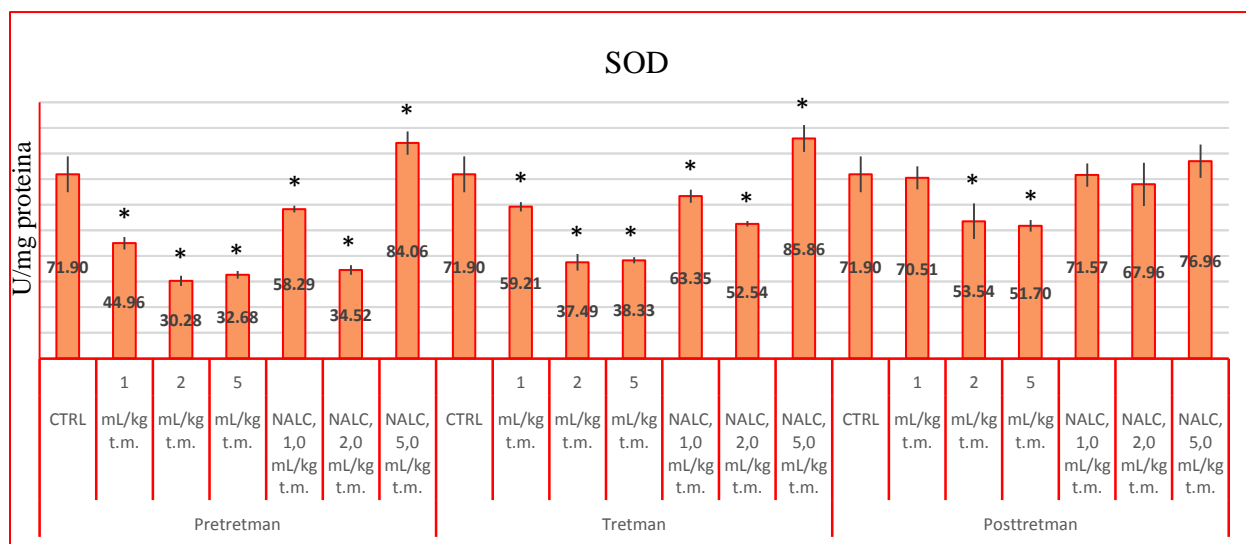
5.4.4.2. Antioksidantni status ćelija *AS30D* ascitnog karcinoma (*AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

Rezultati ispitivanja aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.71. i na Grafikonu 5.34.

Tabela 5.71. Aktivnost SOD u ćelijama *AS30D* (U/mg proteina) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, U/mg proteina	Pretretman	71,90±6,98	44,96±2,38*	30,28±1,96*	32,68±1,52*
	Tretman		59,21±1,77*	37,49±3,23*	38,33±1,16*
	Posttretman		70,51±4,46	53,54±6,94*	51,70±2,25*
NALC	Pretretman		58,29±1,31*	34,52±1,86*	84,06±4,54*
	Tretman		63,35±2,57*	52,54±1,06*	85,86±5,21*
	Posttretman		71,57±4,57	67,96±8,45	76,96±6,50

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.34. Aktivnost SOD u ćelijama *AS30D* (U/mg proteina) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=94,296$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,711$).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=182,774$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=26,515$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika između doza 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,938$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=428,03$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=148,8$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,002$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Ne postoji značajna razlika u prosečnoj aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($p=0,097$) (Tabela 5.72.a)).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na primenjenu dozu ($F=102,90$, $p<0,001$). Daljom komparacijom,

utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=40,930$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,038$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=197,609$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=27,690$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,034$), tretmana i posttretmana ($p=0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Analiziranjem aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=66,262$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=4,427$, $p=0,031$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p < 0,001$). Nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,838$), kao i pretretmana i posttretmana ($p=0,096$) (Tabela 5.72.b)).

Tabela 5.72. Poređenje aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC					
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman			
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman									
	2	*			*			*			tretman	*			*					
	5	*	ns		*	*		*	ns		posttretman	*	*		*	*				
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.		<i>Rumex crispus</i> L.	NALC							
	1	2	5	1	2	5	1	2	5					pretretman						
	2	*			*			ns						tretman	*			*		
	5	*	*		*	*		ns	ns	posttretman	*			*		ns	*			
	1									pretretman										
	2	*			*			ns		tretman	*					ns				
	5	*	*		*	*		ns	ns	posttretman	*			*		ns	*			

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.73. prikazana su poređenja aktivnosti SOD u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.73. Poređenje SOD u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

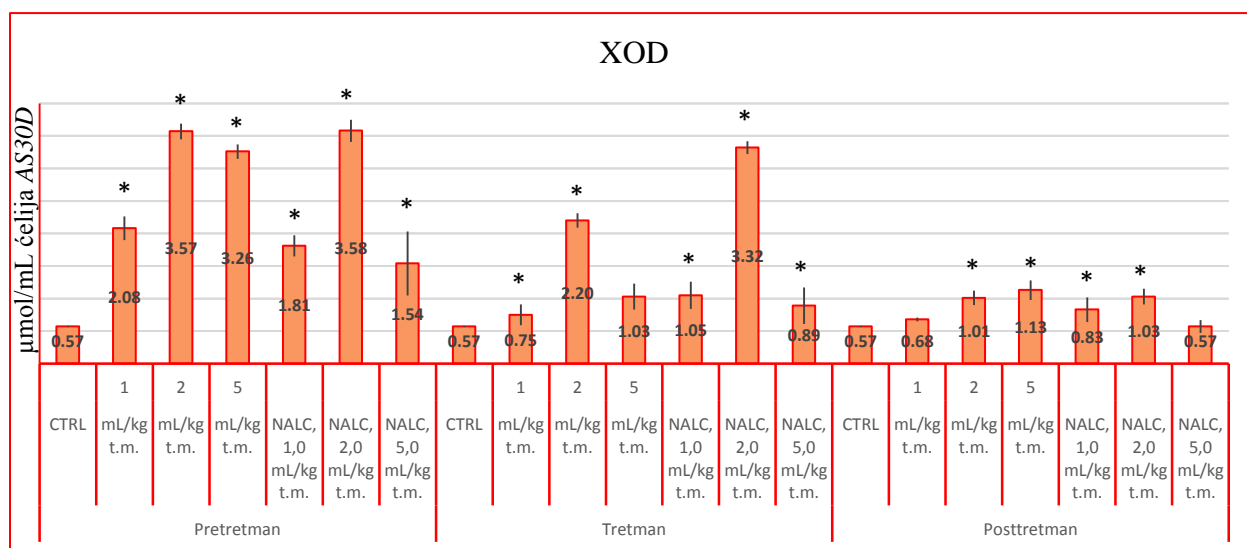
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,009	
	Posttretman			0,691
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,003		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,009
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Rezultati ispitivanja aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavelja prikazani su u Tabeli 5.74. i na Grafikonu 5.35.

Tabela 5.74. Aktivnost XOD u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>AS30D</i>	Pretretman	0,57±0,01	2,08±0,18*	3,57±0,12*	3,26±0,11*
	Tretman		0,75±0,16*	2,20±0,11*	1,03±0,20
	Posttretman		0,68±0,03	1,01±0,11*	1,13±0,15*
NALC	Pretretman		1,81±0,16*	3,58±0,17*	1,54±0,49*
	Tretman		1,05±0,21*	3,32±0,10*	0,89±0,28*
	Posttretman		0,83±0,19*	1,03±0,12*	0,57±0,10

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.35. Aktivnost XOD u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=197,77$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=137,725$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,013$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=27,106$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* između koncentracije 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,194$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=74,867$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,317$).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=253,800$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,465$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=15,892$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,047$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,008$) (Tabela 5.75.a)).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjenu tretman ($F=191,54$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je

značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,654$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 775,830$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 396,385$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,520$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 47,047$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p < 0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$), a nije utvrđena razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,128$).

Analiziranjem aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F = 684,899$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,011$), tretmana i posttretmana ($p < 0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F = 13,242$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p = 0,011$), i pretretmana i posttretmana ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p = 0,236$) (Tabela 5.75.b)).

Tabela 5.75. Poređenje aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC			
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman	
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman							
	2	*			*			*			tretman	*			*			
	5	*	*		*	*		*	ns		posttretman	*	ns		*	ns		
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman						
	1									tretman		*			*			
	2	*			*			*		posttretman		*	*		*	*		
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman						
	1									tretman		*			*			
	5	ns	*		ns	*		*	*	posttretman		*	ns		*	ns		

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* p<0,01, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.76. prikazana su poređenja aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.76. Poređenje aktivnosti XOD u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

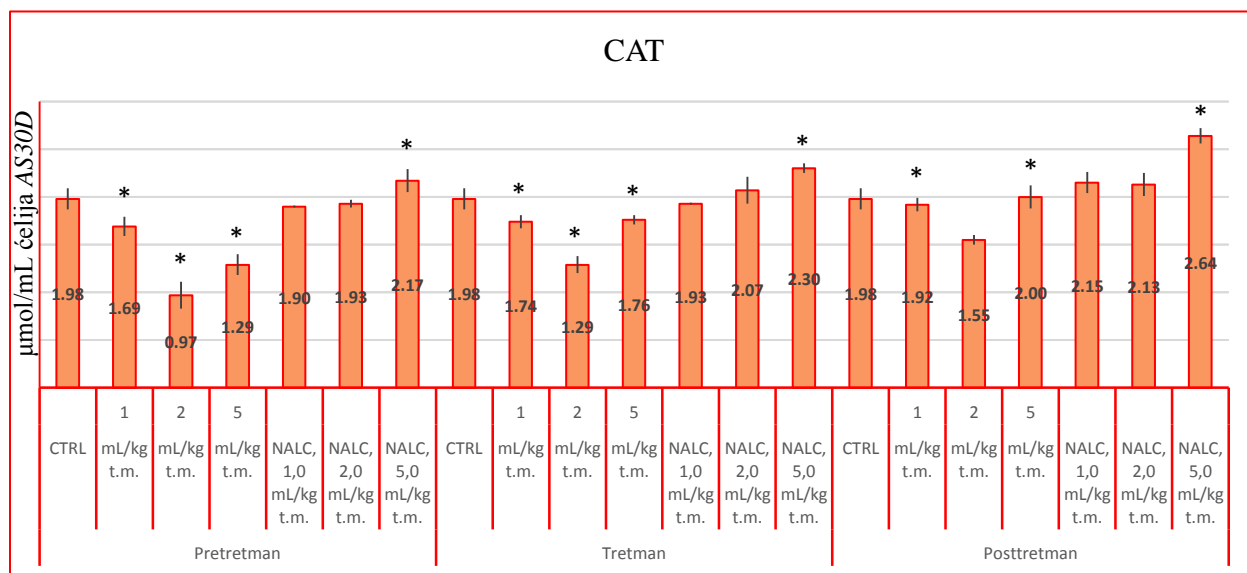
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,020		
	Tretman		0,020	
	Posttretman			0,090
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,953		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,825
	Doza 5 mL/kg t.m.			
Pretretman	<0,001			
Tretman		0,360		
Posttretman			<0,001	

Rezultati ispitivanja aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.77. i na Grafikonu 5.36.

Tabela 5.77. Aktivnost CAT u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>AS30D</i>	Pretretman	1,98 \pm 0,11	1,69 \pm 0,10*	0,97 \pm 0,14*	1,29 \pm 0,11*
	Tretman		1,74 \pm 0,07*	1,29 \pm 0,09*	1,76 \pm 0,05*
	Posttretman		1,92 \pm 0,07*	1,55 \pm 0,05	2,00 \pm 0,12*
NALC	Pretretman		1,90 \pm 0,01	1,93 \pm 0,04	2,17 \pm 0,12*
	Tretman		1,93 \pm 0,01	2,07 \pm 0,14	2,30 \pm 0,05*
	Posttretman		2,15 \pm 0,11	2,13 \pm 0,12	2,64 \pm 0,08*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.36. Aktivnost CAT u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=54,626$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u

prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p = 0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F = 82,049$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p = 0,994$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F = 45,143$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p = 0,420$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F = 24,767$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,923$).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F = 29,23$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,092$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F = 46,763$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,994$) (Tabela 5.78.a)).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u

odnosu na primenjeni tretman ($F=13,375$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,005$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,469$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=52,025$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=74,424$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,002$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=25,078$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,656$).

Analiziranjem aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=5,552$, $p=0,016$). Daljom analizom utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,107$), i tretmana i posttretmana ($p=0,534$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=43,073$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,066$) (Tabela 5.78.b)).

Tabela 5.78. Poređenje aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	ns			ns		
	5	*	*		ns	*		ns	*		posttretman	*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			ns		
	2	ns			ns			ns		posttretman		*	*		*	ns	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman					
	2									tretman		*			ns		
	5	*	*		*	*		*	*	posttretman		*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.79. prikazana su poređenja aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.79. Poređenje aktivnosti CAT u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

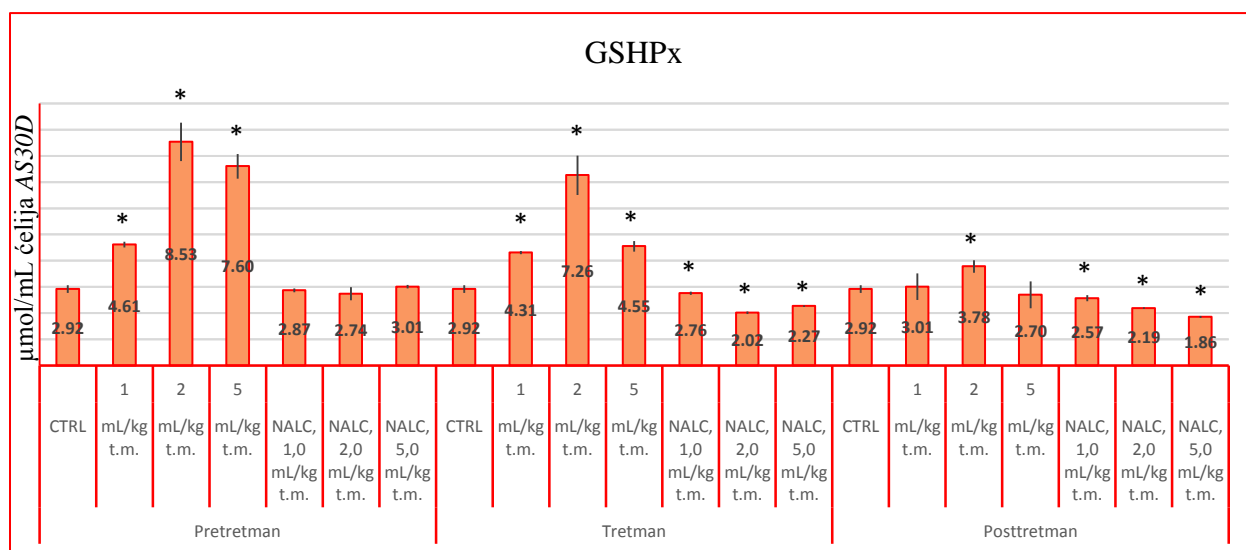
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,002
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
Pretretman	<0,001			
Tretman		<0,001		
Posttretman			<0,001	

Rezultati ispitivanja aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.80. i na Grafikonu 5.37.

Tabela 5.80. Aktivnost GSHPx u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>AS30D</i>	Pretretman	2,92±0,15	4,61±0,11*	8,53±0,73*	7,60±0,47*
	Tretman		4,31±0,06*	7,26±0,75*	4,55±0,20*
	Posttretman		3,01±0,51	3,78±0,24*	2,70±0,51
NALC	Pretretman		2,87±0,07	2,74±0,25	3,01±0,07
	Tretman		2,76±0,06*	2,02±0,05*	2,27±0,03*
	Posttretman		2,57±0,12*	2,19±0,03*	1,86±0,04*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.37. Aktivnost GSHPx u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=98,382$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,009$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=80,346$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,708$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=9,516$, $p=0,002$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p=0,013$), i 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,001$), a nije utvrđena razlika između doza 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,545$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=4,528$, $p=0,029$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,029$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,473$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,411$).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=372,2$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=133,28$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.81.a).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjeni tretman ($F=47,311$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,222$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=95,057$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,008$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=211,344$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=17,869$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,005$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,119$).

Analiziranjem aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=37,242$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,178$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=880,983$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$) (Tabela 5.81.b)).

Tabela 5.81. Poređenje aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC									
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman													
	2	*			*			*			tretman	*			ns									
	5	*	*		ns	*		ns	*		posttretman	*	*		*	*								
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.		<i>Rumex crispus</i> L.		NALC										
	1								pretretman															
	2	ns			*			*							tretman	*			*	ns				
	5	ns	*		*	*		*	*	posttretman	*				*		*	*						
	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.														
	1								pretretman															
	2	ns			*			*									tretman	*			*			
	5	ns	*		*	*		*	*	posttretman	*				*		*	*						

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.82. prikazana su poređenja aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.82. Poređenje aktivnosti GSHPx u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

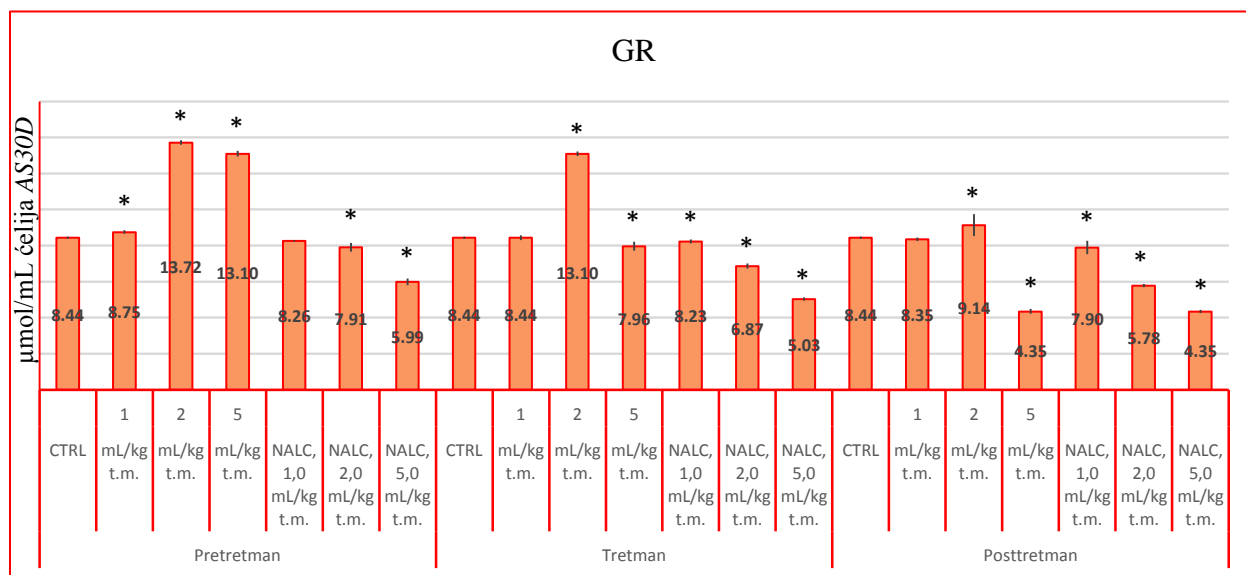
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,071
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,002

Rezultati ispitivanja aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.83. i na Grafikonu 5.38.

Tabela 5.83. Aktivnost GR u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol/mL}$ ćelija <i>AS30D</i>	Pretretman	8,44 \pm 0,06	8,75 \pm 0,10*	13,72 \pm 0,12*	13,10 \pm 0,16*
	Tretman		8,44 \pm 0,13	13,10 \pm 0,12*	7,96 \pm 0,25*
	Posttretman		8,35 \pm 0,10	9,14 \pm 0,60*	4,35 \pm 0,14*
NALC	Pretretman		8,26 \pm 0,05	7,91 \pm 0,24*	5,99 \pm 0,19*
	Tretman		8,23 \pm 0,11*	6,87 \pm 0,14*	5,03 \pm 0,09*
	Posttretman		7,90 \pm 0,37*	5,78 \pm 0,09*	4,35 \pm 0,09*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.38. Aktivnost GR u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=2575,9$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u

prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=1513,648$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=307,877$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p=0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=281,63$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,004$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=1162$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnoj aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=369,74$, $p < 0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p < 0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$) i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p < 0,001$) (Tabela 5.84.a)).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjeni tretman ($F=20,200$, $p < 0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna

razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,001$), i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,375$).

Postoji značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=288,013$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,024$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=3147,003$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=4,590$, $p=0,028$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i posttretmana ($p=0,038$), a nije utvrđena značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,968$), i tretmana i posttretmana ($p=0,061$).

Analiziranjem aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=235,559$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=242,479$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$) (Tabela 5.84.b)).

Tabela 5.84. Poređenje aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman						
	2	*			*			*			tretman	*			ns		
	5	*	*		*	*		*	*		posttretman	*	ns		*	ns	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			*	*	
	2	*			*			*		posttretman		*	*		*	*	
NALC		PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.	pretretman					
	1									tretman		*			*	*	
	5	*	*		*	*		*	*	posttretman		*	*		*	*	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.85. prikazana su poređenja aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.85. Poređenje aktivnosti GR u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

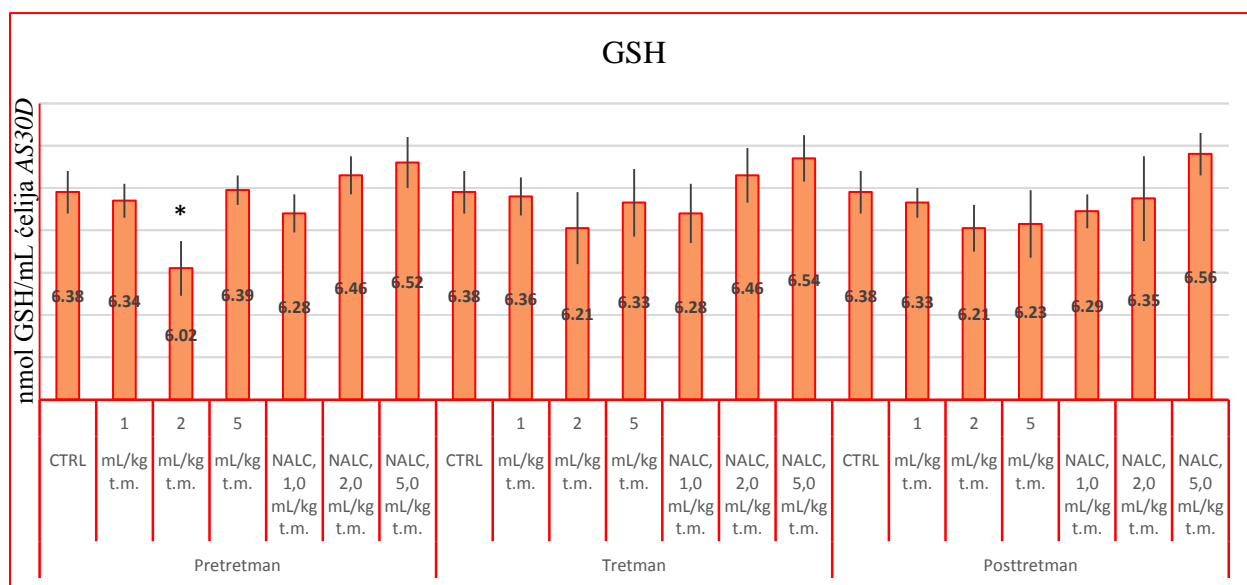
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,013	
	Posttretman			0,018
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			0,981

Rezultati ispitivanja sadržaja GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.86. i na Grafikonu 5.39.

Tabela 5.86. Sadržaj GSH u ćelijama *AS30D* (nmol GSH/mL ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, nmol/mL ćelija <i>AS30D</i>	Pretretman	6,38±0,10	6,34±0,08	6,02±0,13*	6,39±0,07
	Tretman		6,36±0,09	6,21±0,17	6,33±0,16
	Posttretman		6,33±0,07	6,21±0,11	6,23±0,16
NALC	Pretretman		6,28±0,09	6,46±0,09	6,52±0,12
	Tretman		6,28±0,14	6,46±0,13	6,54±0,11
	Posttretman		6,29±0,08	6,35±0,20	6,56±0,10

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.39. Sadržaj GSH u ćelijama *AS30D* (nmol GSH/mL ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem sadržaja GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu (ANOVA $F=23,883$, $p<0,001$). Daljom analizom (Tukey post-hoc test) utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m.

i 2 ml/kg t.m ($p < 0,001$), i 2 ml/kg t.m i 5 ml/kg t.m ($p < 0,001$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p = 0,802$).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman i posttretman) u odnosu na dozu (redom $p = 0,193$ i $p = 0,179$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F = 9,096$, $p = 0,003$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,022$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,003$), dok nije utvrđena značajna razlika između doza 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,802$).

Analiziranjem sadržaja GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F = 6,921$, $p = 0,007$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,058$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,702$), a utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,005$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F = 6,467$, $p = 0,009$). Nije utvrđena značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p = 0,805$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,051$), a utvrđena je značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p = 0,007$) (Tabela 5.87.a)).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za doze 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman (redom $p = 0,808$, $p = 0,064$ i $p = 0,137$).

Nije utvrđena značajna razlika u prosečnom sadržaju GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za doze 1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman (redom $p = 0,981$, $p = 0,352$ i $p = 0,788$) (Tabela 5.87.b)).

Tabela 5.87. Poređenje sadržaja GSH u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC									
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman													
	2	*			ns			ns			tretman	ns			ns									
	5	ns	*		ns	ns		ns	ns		posttretman	ns	ns		ns	ns								
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
	1																							
	2	*			ns			ns										tretman	ns			ns		
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
	1																							
	2	*			ns			ns										tretman	ns			ns		
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			5 mL/kg t.m.		pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman							
	1																							
	2	*	ns		*	ns		*	ns									posttretman	ns	ns		ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p < 0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.88. prikazana su poređenja sadržaja GSH u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.88. Poređenje sadržaja GSH u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

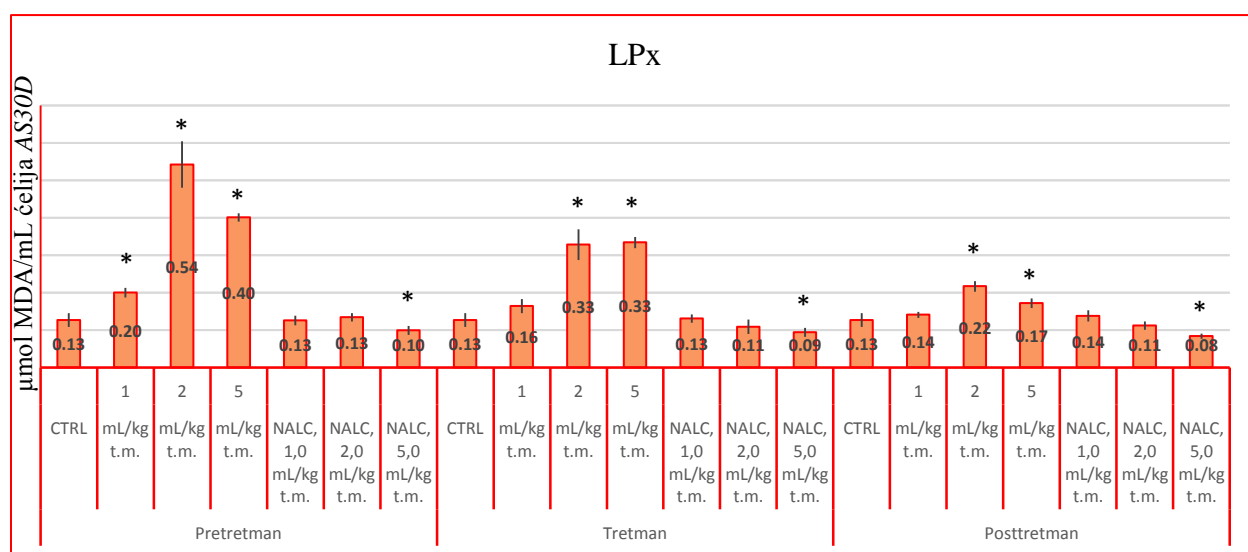
		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	0,259		
	Tretman		0,223	
	Posttretman			0,293
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,017	
	Posttretman			0,158
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,050		
	Tretman		0,020	
	Posttretman			0,001

Rezultati ispitivanja intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda štavolja prikazani su u Tabeli 5.89. i na Grafikonu 5.40.

Tabela 5.89. Intenzitet LPx u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol MDA/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

		CTRL	1,0 mL/kg t.m.	2,0 mL/kg t.m.	5,0 mL/kg t.m.
5% ekstrakt, $\mu\text{mol MDA/mL}$ ćelija <i>AS30D</i>	Pretretman	0,127±0,018	0,200±0,013*	0,542±0,062*	0,401±0,011*
	Tretman		0,164±0,019	0,328±0,041*	0,334±0,015*
	Posttretman		0,141±0,008	0,217±0,014*	0,172±0,013*
NALC	Pretretman		0,126±0,013	0,134±0,011	0,099±0,012*
	Tretman		0,131±0,011	0,109±0,019	0,094±0,012*
	Posttretman		0,138±0,015	0,112±0,011	0,084±0,007*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD od šest pacova; *- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu *AS30D* grupu.



Grafikon 5.40. Intenzitet LPx u ćelijama *AS30D* ($\mu\text{mol MDA/mL}$ ćelija *AS30D*) nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-L-cisteina (NALC).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (pretretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=128,90$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p<0,001$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=72,840$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p=0,977$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. (posttretman) u odnosu na primenjenu dozu ($F=65,423$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 ml/kg t.m. i 2 ml/kg t.m. ($p<0,001$), 2 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$), i 1 ml/kg t.m. i 5 ml/kg t.m. ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* (pretretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=14,664$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,001$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,011$), a nije utvrđena značajna razlika između doza 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,772$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC (tretman), utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra u odnosu na dozu ($F=9,426$, $p=0,002$). Ne postoji značajna razlika u prosečnim vrednostima ovog parametra između uzastopnih doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,112$), i 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,364$), a postoji između 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,003$).

Utvrđena je značajna razlika u prosečnom intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* (posttretman) nakon primene NALC u odnosu na primenjenu dozu ($F=32,489$, $p<0,001$). Daljom analizom utvrđene su značajne razlike u prosečnim vrednostima ovog parametra između doza: 1 mL/kg t.m. i 2 mL/kg t.m. ($p=0,017$), 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p=0,010$), i 1 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. ($p<0,001$) (Tabela 5.90.a).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 1 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u prosečnim vrednostima u odnosu na primenjenu tretman ($F=26,933$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,001$), tretmana i posttretmana ($p=0,027$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Postoji značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 2 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=85,861$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,019$), tretmana i posttretmana ($p=0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Utvrđena je značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* L. za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($F=504,450$, $p<0,001$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p<0,001$), tretmana i posttretmana ($p<0,001$), kao i pretretmana i posttretmana ($p<0,001$).

Nije utvrđena značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 1 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($p=0,362$).

Analiziranjem intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 2 mL/kg t.m., utvrđena je značajna razlika u odnosu na primenjeni tretman ($F=5,593$, $p=0,015$). Daljom komparacijom, utvrđena je značajna razlika između pretretmana i tretmana ($p=0,021$), i pretretmana i posttretmana ($p=0,040$), a nije utvrđena značajna razlika između tretmana i posttretmana ($p=0,937$).

Nije utvrđena značajna razlika u intenzitetu LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene NALC za dozu 5 mL/kg t.m. u odnosu na primenjeni tretman ($p=0,088$) (tabela 5.90.b)).

Tabela 5.90. Poređenje intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i N-acetil-cisteina (NALC).

a) između različitih doza

b) između pretretmana, tretmana i posttretmana

EKSTRAKT	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			doza		<i>Rumex crispus</i> L.			NALC										
	1	2	5	1	2	5	1	2	5			pretretman	tretman	posttretman	pretretman	tretman	posttretman								
EKSTRAKT	1									1 mL/kg t.m.	pretretman														
	2	*			*			*			tretman	*			ns										
	5	*	*		*	ns		*	*		posttretman	*	*		ns	ns									
NALC	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN			2 mL/kg t.m.		pretretman													
	1																	tretman	*			*			
	5																	posttretman	*	*		*	ns		
	5 mL/kg t.m.	PRETRETMAN			TRETMAN			POSTTRETMAN					pretretman												
		1																	tretman	*			ns		
		5	*	*		*	ns		*	*									posttretman	*	*		ns	ns	

Vrednosti u tabeli predstavljaju nivo značajnosti za Tukey post-hoc test

* $p<0,01$, ns - razlika nije statistički značajna.

U Tabeli 5.91. prikazana su poređenja intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

Tabela 5.91. Poređenje intenziteta LPx u ćelijama *AS30D* (rast tumora) za istu primenjenu dozu kod vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L. i kod N-acetil-cisteina (NALC).

		<i>Rumex crispus</i> L.		
		Pretretman	Tretman	Posttretman
NALC	Doza 1 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		0,004	
	Posttretman			0,669
	Doza 2 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001
	Doza 5 mL/kg t.m.			
	Pretretman	<0,001		
	Tretman		<0,001	
	Posttretman			<0,001

Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* u pretretmanu i tretmanu eksperimentalnih životinja ispoljio je statistički značajan citotoksičan efekat prema ćelijama *EAC* i *AS30D*. Pretretman i tretman vodenim ekstraktom ploda štavolja pri najvišoj dozi značajno je smanjio zapreminu ascitesa *EAC* i *AS30D*, dok je ista doza ekstrakta primenjena u posttretmanu značajno povećala volumen ascitesa *EAC* i *AS30D* u poređenju sa kontrolnom grupom (CTRL).

Pretretman najvišom dozom ispitivanog ekstrakta doveo je do smanjenja broja *EAC*, odnosno *AS30D* ćelija za oko 50%, odnosno 45%, redom, u odnosu na CTRL grupu. Srednja ispitivana doza (2 mL/kg t.m.) vodenog ekstrakta ploda štavolja bila je delotvornija od najviše doze kod *AS30D* ćelija. Rezultati su pokazali da je referentni antioksidant NALC u najvišoj dozi delovao kao promotor porasta broja malignih ćelija.

Određen je i procenat nevijabilnih ćelija kod oba tumora: *EAC* i *AS30D*. Najizraženiji porast udela nevijabilnih ćelija *EAC* i *AS30D* uočen je kod pretretmana i tretmana životinja srednjom ispitivanom dozom ekstrakta (2 mL/kg t.m.). N-acetil-L-cistein je imao slab efekat na maligne ćelije, a u određenim slučajevima je podržavao rast malignog tkiva.

U literaturi nema podataka vezanih za *in vivo* citotoksičan efekat vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Antonyan i saradnici (175) su pokazali da etanolni ekstrakta lista *Rumex confertus* dovodi do značajne inhibicije rasta *EAC* ćelija u *in vitro* uslovima. Međutim, Hawas i

saradnici (176) su ispitivali potencijalnu *in vivo* citotoksičnu aktivnost metanolnog ekstrakta *Rumex dentatus* prema ćelijama *EAC* i utvrdili da je pomenuti ekstrakt ispoljio slabu antitumorsku aktivnost. Naime, ispitivani ekstrakt je u najvišoj koncentraciji doveo do apoptoze kod oko 20% malignih *EAC* ćelija (176). Čebović i saradnici (177) su ispitivali potencijalno antiproliferativno *in vivo* dejstvo vodenog ekstrakta herbe *Thymus pannonicus* i utvrdili da pomenuti ekstrakt smanjuje broj *EAC* ćelija u poređenju sa netretiranom grupom. Najveće smanjenje broja malignih ćelija primećeno je kod pretretmana ispitivanim ekstraktom. Paralelno sa brojem ćelija, ispitivan je i procenat oštećenih malignih ćelija. Utvrđen je porast procenta oštećenih *EAC* ćelija kod svih tretiranih životinja. Efekat je bio najizraženiji kod pretretirane grupe. Pored ovoga, određivan je i volumen ascitesa i uočeno je smanjenje zapremine ascitesa, naročito kod pretretiranih životinja. Ovi rezultati su bili u skladu sa podacima iz disertacije (177). Talaviya i saradnici (178) su pokazali da metanolni ekstrakt korena *Crotalaria Burhia* pokazuje dozno zavisnu antitumorsku aktivnost. Rezultati ukazuju da je *in vivo* administracija ispitivanog ekstrakta dovela do smanjenja ukupnog broja malignih *EAC* ćelija, zatim do smanjenja broja vijabilnih ćelija, kao i do niže vrednosti zapremine ascitesa u odnosu na netretirane životinje, što je bilo u skladu sa podacima za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* (178).

U toku *in vivo* ispitivanja potencijalne citotoksičnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* određen je antioksidantni status ćelija *EAC* i *AS30D*, nakon pretretmana, tretmana i posttretmana različitim dozama 5% ispitivanog ekstrakta.

Enzim superoksid dismutaza (SOD) vrši konverziju superoksid anjon radikala u H_2O_2 i O_2 i time neutrališe $O_2^{\cdot-}$ (69, 179). Prevođenjem superoksid anjon radikala smanjuje se njegovo štetno delovanje i umanjuje se količina reaktanta za nastajanje toksičnih peroksinitrita (80, 81, 180). Pored toga, „hvatanjem” $O_2^{\cdot-}$ se smanjuje mogućnost nastanka hidroksil radikala Haber-Weiss-ovom reakcijom (62). S druge strane, inhibicija aktivnosti SOD uzrokuje porast koncentracije ROS.

Implantacija ćelija *EAC* i *AS30D* životinjama uzrokovala je porast enzima SOD. Najizraženije smanjenje aktivnosti SOD, u odnosu na kontrolnu grupu, uočeno je kod pretretmana i tretmana dozama 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Nasuprot tome, primena referentnog antioksidanta NALC uzrokovala je u najvišoj dozi

porast aktivnosti SOD, dok je u srednjoj ispitivanoj dozi dovela do snižavanja aktivnosti SOD u odnosu na CTRL, ali sa višim vrednostima u odnosu na istu dozu ekstrakta.

Ne postoje dostupni literaturni podaci u vezi sa nivoom SOD u malignim ćelijama nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Yi i saradnici (181) su ispitivali potencijalnu *in vivo* antitumorsku aktivnost etanolnog rastvora prečišćenih polifenola dobijenih iz šišarki *Pinus koraiensis*. Utvrđena je pojačana aktivnost enzima SOD u malignim *S180* ćelijama eksperimentalnih životinja u odnosu na netretiranu grupu. Povišene koncentracije enzima SOD ukazuju da je polifenolni tretman uzrokovao povećanje antioksidantnog kapaciteta malignih ćelija i da bi to mogao biti mehanizam potencijalne antitumorske aktivnosti polifenola (181). Rezultati iz disertacije nisu u skladu sa pomenutim radom, što sugerise da bi vodeni ekstrakt ploda štavelja mogao imati drugačiji mehanizam ispoljavanja citotoksičnog dejstva. Badr i saradnici (180) su svoja istraživanja usmerili na ispitivanje potencijalnih citotoksičnih svojstava ekstrakta korena *Zingiber officinale*. Kao rastvarač je korišćena smeša etanola, heksana i etil acetata. Uočena je viša aktivnost enzima SOD u *EAC* ćelijama nakon primene ispitivanog ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati ove disertacije nisu u skladu sa navedenim radom (180). Benlloch i saradnici (182) su ispitivali *in vivo* antitumorsku aktivnost pterostilbena i uočili da administracija ovog polifenolnog jedinjenja dovodi do snižavanja aktivnosti SOD u različitim malignim ćelijama. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima disertacije, ukazujući da citotoksično delovanje polifenolnih jedinjenja može poticati od snižavanja aktivnosti antioksidantnih enzima i sledstvenog nagomilavanja reaktivnih kiseoničnih vrsta koje dalje mogu delovati letalno na maligne ćelije.

Dejstvom enzima SOD nastaje vodonik-peroksid, koji se dalje prevodi u vodu i kiseonik posredstvom enzima katalaze (CAT) (180, 183). Na ovaj način se smanjuju štetna dejstva izazvana prekomernom produkcijom H_2O_2 (69, 183).

Nezavisno od momenta aplikacije vodenog ekstrakta ploda štavelja u dozi od 2 mL/kg t.m. došlo je do smanjenja aktivnosti enzima CAT u *EAC* i *AS30D* ćelijama u odnosu na kontrolnu grupu. Najizraženiji pad koncentracije CAT uočen je kod grupe koja je ispitivani ekstrakt primala kao pretretman. Jedino kod primene ekstrakta kao posttretman nije došlo do statistički značajnog smanjenja nivoa enzima CAT u poređenju sa CTRL. Administracija NALC je u svim slučajevima uzrokovala povećanu aktivnost CAT. Ovim je pokazano da je vodeni

ekstrakt ploda štavolja snizio antioksidantnu aktivnost, dovodeći do povećanja koncentracije vodonik-peroksida, koji tada deluje toksično za maligne ćelije.

Pregledom literature nisu uočeni podaci vezani za aktivnost enzima CAT u malignim ćelijama u *in vivo* sistemu nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Vulić i saradnici (108) su ispitivali potencijalna *in vivo* citotoksična svojstva vodeno-etanolnog ekstrakta *Beta vulgaris* i utvrdili sniženu aktivnost enzima CAT u malignim EAC ćelijama nakon pretretmana pomenutim ekstraktom. Vodeni ekstrakt ploda štavolja je imao iste efekte na maligne ćelije. Badr i saradnici (180) su ispitivali potencijalna citotoksična svojstva ekstrakta korena *Zingiber officinale*. Uočena je povišena aktivnost enzima CAT u EAC ćelijama nakon primene ispitivanog ekstrakta u odnosu na CTRL. Rezultati ove disertacije nisu u skladu sa navedenim radom ukazujući na drugačiji mehanizam citotoksičnog delovanja ekstrakta štavolja (180). Međutim, u radu Benlloch i saradnika (182) izmerena je niža *in vivo* aktivnost enzima CAT kod grupe tretirane pterostilbenom u odnosu na CTRL grupu. Čebović i saradnici (177) su ispitivanjem potencijalne *in vivo* citotoksične aktivnosti vodenog ekstrakta herbe *Thymus pannonicus* uočili da je došlo do statistički značajnog snižavanja aktivnosti enzima CAT jedino kod grupe životinja koje su pomenuti ekstrakt primale kao pretretman. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim podacima, s tim što je vodeni ekstrakt ploda štavolja pokazao izraženije antitumorsko delovanje u svim grupama, jer su vrednosti aktivnosti enzima CAT bile znatno niže u poređenju sa CTRL grupom.

Ksantin oksidaza (XOD) predstavlja izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta. Ovaj enzim katališe prevođenje molekuskog kiseonika u superoksid anjon radikal. Flavonoidi kao što su kvercetin i silibin inhibiraju aktivnost XOD, čime sprečavaju generisanje superoksid anjon radikala i smanjuju oksidativna oštećenja (15). Enzim XOD se smatra indikatorom prooksidantnog delovanja u ćelijama (177).

Aktivnost enzima ksantin oksidaze u ćelijama EAC i AS30D statistički se bitno menjala nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* u poređenju sa kontrolnom grupom. Administracija pomenutog ekstrakta je u svim ispitivanim dozama nezavisno od momenta primene uzrokovala povećanu aktivnost XOD u ćelijama EAC i AS30D u odnosu na netretiranu grupu. Najizraženiji efekat povišenja nivoa XOD uočen je pri dozi od 2 mL/kg t.m., i to naročito kad je ekstrakt primenjen kao pretretman. Ovo ukazuje da bi ispitivani ekstrakt mogao imati prooksidantnu aktivnost, odnosno da bi mogao, indukujući oksidativni stres u malignim ćelijama,

delovati kao potencijalni antitumorski agens. Sličnu aktivnost je ispoljio i referentni antioksidant NALC. S druge strane, niska aktivnost enzima XOD kod kontrolne grupe ukazuje na suprimiranu produkciju ROS u malignim ćelijama.

U literaturi nema podataka vezanih za *in vivo* određivanje aktivnosti enzima XOD u malignim ćelijama nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Čebović i saradnici (177) su ispitivali potencijalnu *in vivo* citotoksičnu aktivnost vodenog ekstrakta herbe *Thymus pannonicus* i uočili značajno povećanje aktivnosti enzima XOD kod svih grupa u poređenju sa kontrolnom grupom. Najizraženije povećanje nivoa XOD primećeno je nakon pretretmana ispitivanim ekstraktom (177). Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, ukazujući na potencijalno prooksidantno delovanje vodenog ekstrakta ploda štavolja. Vulić i saradnici (108) su ispitivali potencijalna *in vivo* citotoksična svojstva vodeno-etanolnog ekstrakta *Beta vulgaris* i utvrdili povišenu aktivnost enzima XOD u malignim EAC ćelijama nakon primene pomenutog ekstrakta. Vodeni ekstrakt ploda štavolja je imao iste efekte na maligne ćelije, povećavajući time nivo ROS u EAC ćelijama.

Glutation peroksidaza (GSHPx) katalizuje redukciju vodonik-peroksida i drugih hidroperoksida, i pri tome koristi glutation (GSH). Na taj način enzim GSHPx učestvuje u antioksidantnoj odbrani ćelija od oksidativnih oštećenja (62, 69, 90). Stimulacija ovog enzima dovodi do pojačanog neutralisanja ROS, dok se suprotan efekat ostvaruje inaktivacijom GSHPx, čime se favorizuje oksidativni stres u ćelijama.

Tokom ispitivanja potencijalne *in vivo* citotoksičnosti vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* izmerena je aktivnost enzima GSHPx u ćelijama EAC i AS30D. Statistički značajan porast aktivnosti GSHPx u pomenutim ćelijama uočen je nakon pretretmana i tretmana ispitivanim ekstraktom pri svim dozama (1 mL/kg t.m., 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m.), i nakon posttretmana pri srednjoj korišćenoj dozi, u poređenju sa CTRL. Najizraženije povećanje nivoa GSHPx nastalo je nakon pretretmana i tretmana ekstraktom u dozi od 2 mL/kg t.m. Ovo ukazuje na kompenzatorni mehanizam malignih ćelija kao odgovor na povećanje obima oksidativnog stresa, indukovano administracijom ispitivanog ekstrakta. Referentni antioksidant NALC nije doveo do statistički značajne promene aktivnosti ovog enzima pri pretretmanu ekstraktom, dok je kod tretmana i posttretmana uzrokovao značajno smanjenje nivoa GSHPx u odnosu na netretiranu grupu.

Pregledom literature nisu uočeni podaci vezani za aktivnost GSHPx u malignim ćelijama u *in vivo* sistemu nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Čebović i saradnici (177) su ispitivali potencijalnu *in vivo* citotoksičnu aktivnost vodenog ekstrakta herbe *Thymus pannonicus* i određivali aktivnost enzima GSHPx. Uočeno je da ispitivani ekstrakt uzrokuje povećanje aktivnosti GSHPx kod svih tretiranih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom (177). Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom. Postoji mogućnost da indukcija oksidativnog stresa u malignim ćelijama ima značajnu ulogu u antitumorskoj aktivnosti oba ekstrakta (177). Yi i saradnici (181) su ispitivali potencijalnu *in vivo* antitumorsku aktivnost etanolnog rastvora prečišćenih polifenola dobijenih iz šišarki *Pinus koraiensis*. Utvrđena je pojačana aktivnost enzima GSHPx u malignim *S180* ćelijama eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu (181). Rezultati iz disertacije su u skladu sa pomenutim radom. Vulić i saradnici (108) su ispitivali potencijalna *in vivo* citotoksična svojstva vodeno-etanolnog ekstrakta *Beta vulgaris* i utvrdili značajno povećanje aktivnosti enzima GSHPx u malignim *EAC* ćelijama nakon tretmana pomenutim ekstraktom. Rezultati disertacije su u skladu sa navedenim radom, sugerišući da je u malignim ćelijama došlo do indukcije oksidativnog stresa.

Glutation reduktaza (GR) predstavlja enzim koji katalizuje NADPH-zavisnu reakciju stvaranja, odnosno obnavljanja glutaciona (GSH) iz GSSG. Enzim GR ima ključnu ulogu u sistemu odbrane od ROS održavajući nivo redukovano glutaciona (GSH) (62, 90). Aktivacija ovog enzima dovodi do povećanja antioksidantne zaštite ćelija. S druge strane, inhibicija enzima GR uzrokuje snižavanje antioksidantnog kapaciteta ćelija, čime se promoviše održavanje oksidativnog stresa.

Aktivnost enzima GR u ćelijama *EAC* i *AS30D* statistički se najznačajnije povećala tokom pretretmana i tretmana vodenim ekstraktom ploda *Rumex crispus* pri dozi 2 mL/kg t.m. u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Statistički značajno snižavanje aktivnosti ovog enzima u pomenutim ćelijama nakon primene ispitivanog ekstrakta uočeno je jedino kod posttretmana u dozi 5 mL/kg t.m. Administracija referentnog antioksidanta NALC uzrokovala je u gotovo svim slučajevima statistički značajno smanjenje nivoa enzima GR.

Ne postoje dostupni literaturni podaci u vezi sa *in vivo* određivanjem nivoa GR u malignim ćelijama nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Čebović i saradnici (177) su utvrdili značajno povećanje aktivnosti enzima GR nakon *in vivo* primene vodenog ekstrakta herbe *Thymus pannonicus*, i rezultati su bili u skladu sa podacima iz disertacije. Vulić i

saradnici (108) su ispitivali potencijalna *in vivo* citotoksična dejstva vodeno-etanolnog ekstrakta *Beta vulgaris* i utvrdili značajno povećanje aktivnosti enzima GR u malignim *EAC* ćelijama nakon tretmana pomenutim ekstraktom. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz disertacije.

Tripeptid glutation (GSH) predstavlja jedan od najvažnijih antioksidanata, koji sprečava ROS-uzrokovana oksidativna oštećenja bioaktivnih molekula (62, 71). GSH je *scavenger* hidroksil i superoksid anjon radikala (62). Pored toga, ključna uloga u detoksikaciji ćelija od vodonik-peroksida pripada glutationu (69). Kao redukcionni agens, GSH ima ključnu ulogu u regeneraciji drugih antioksidanata: askorbinske kiseline i tokoferola (71).

Sadržaj GSH u ćelijama *EAC* i *AS30D* se jedino statistički značajno menjao (smanjio), u odnosu na CTRL, nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* u dozi 2 mL/kg t.m. U ostalim slučajevima, kao i nakon administracije poznatog antioksidanta NALC, sadržaj GSH se nije statistički značajno menjao u ćelijama *EAC* i *AS30D*, u odnosu na netretiranu grupu.

Pregledom literature nisu uočeni podaci vezani za sadržaj GSH u malignim ćelijama u *in vivo* sistemu nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Čebović i saradnici (177) su uočili značajno povećanje sadržaja GSH nakon *in vivo* primene vodenog ekstrakta herbe *Thymus pannonicus* u poređenju sa CTRL. Rezultati nisu bili u potpunosti u skladu sa podacima iz disertacije, jer vodeni ekstrakt ploda štavelja uglavnom nije značajno menjao sadržaj GSH u malignim ćelijama u odnosu na kontrolnu grupu (izuzev u primenjenoj dozi 2 mL/kg t.m.). Yi i saradnici (181) su ispitivali potencijalnu *in vivo* antitumorsku aktivnost etanolnog rastvora prečišćenih polifenola dobijenih iz šišarki *Pinus koraiensis*. Utvrđen je povišen sadržaj GSH u malignim *S180* ćelijama eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu (181). Rezultati iz disertacije nisu u skladu sa pomenutim radom, jer je administracija vodenog ekstrakta ploda štavelja dovela do neznatnog smanjenja sadržaja glutationa. Vulić i saradnici (108) su ispitivali potencijalna *in vivo* citotoksična svojstva vodeno-etanolnog ekstrakta *Beta vulgaris* i utvrdili značajno snižen sadržaj GSH u malignim *EAC* ćelijama nakon pretretmana pomenutim ekstraktom. Ovi podaci nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima disertacije, budući da vodeni ekstrakt ploda štavelja nije bitno menjao *in vivo* sadržaj GSH u malignim ćelijama.

Lipidna peroksidacija (LPx) predstavlja proces oštećenja membranskih lipida ćelija i mitohondrija. Pomenuta peroksidacija je uzrokovana reakcijom između lipidnih molekula i različitih reaktivnih kiseoničnih vrsta. Proces LPx najčešće započinje napadom hidroksil, a nekad i superoksid anjon radikala, na polinezasićene masne kiseline. Lipidna peroksidacija,

dalje, teče po principu lančane reakcije. Merenje krajnjih produkata LPx – MDA najčešće predstavlja indikator stepena lipidne peroksidacije i izloženosti ćelija reaktivnim metabolitima kiseonika (62, 177).

Vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* je nezavisno od momenta primene i doze uzrokovao statistički značajno povećanje intenziteta lipidne peroksidacije (LPx) u ćelijama *EAC* i *AS30D*, u odnosu na CTRL, što se manifestovalo povećanom koncentracijom krajnjeg produkta peroksidacije lipida – MDA. Ovaj efekat je bio najizraženiji pri pretretmanu i tretmanu ekstraktom u dozi 2 mL/kg t.m. i 5 mL/kg t.m. Nakon aplikacije NALC došlo je uglavnom do značajnog sniženja intenziteta LPx, ili ređe do statistički neznačajnog povećanja ili smanjenja intenziteta LPx, u odnosu na kontrolnu grupu.

Ne postoje dostupni podaci u literaturi u vezi sa *in vivo* određivanjem intenziteta lipidne peroksidacije u malignim ćelijama nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus*. Čebović i saradnici (177) su utvrdili značajno povećanje sadržaja MDA, a time i intenziteta lipidne peroksidacije, jedino kod grupe pretretirane vodenim ekstraktom herbe *Thymus pannonicus*. Rezultati disertacije su u skladu sa ovim radom, s tim što je vodeni ekstrakt ploda štavolja bio potentniji, dovodeći do stimulacije lipidne peroksidacije nezavisno od momenta primene ekstrakta. Yi i saradnici (181) su ispitivali potencijalnu *in vivo* antitumorsku aktivnost etanolnog rastvora prečišćenih polifenola dobijenih iz šiškarki *Pinus koraiensis*. Utvrđeno je smanjenje koncentracije MDA u malignim *S180* ćelijama eksperimentalnih životinja u odnosu na netretiranu grupu. Smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije ukazuje da je polifenolni tretman uzrokovao povećanje antioksidantnog kapaciteta malignih ćelija i da bi to mogao biti mehanizam potencijalne antitumorske aktivnosti polifenola (181). Rezultati ove disertacije nisu u skladu sa pomenutim radom. Badr i saradnici (180) su ispitivali potencijalna citotoksična svojstva ekstrakta korena *Zingiber officinale*. Uočena je snižena koncentracija MDA u *EAC* ćelijama nakon primene ispitivanog ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati ove disertacije nisu u skladu sa navedenim radom, imajući u vidu da je ekstrakt korena *Zingiber officinale* suprimirao lipidnu peroksidaciju malignih ćelija (180). Vulić i saradnici (108) su ispitivali potencijalna *in vivo* citotoksična svojstva vodeno-etanolnog ekstrakta *Beta vulgaris* i utvrdili povećan nivo krajnjeg produkta lipidne peroksidacije – MDA u malignim *EAC* ćelijama nakon pretretmana pomenutim ekstraktom. Vodeni ekstrakt ploda štavolja je imao iste efekte na maligne ćelije, indukujući oštećenja membranskih lipida *EAC* i *AS30D* ćelija.

Znatno smanjenje maligne progresije nakon primene vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* ogleda se u smanjenom volumenu ascitesa, kao i sniženom broju ćelija *EAC* i *AS30D*, i povećanom procentu nevijabilnih ćelija u odnosu na netretiranu, kontrolnu grupu. Vodeni ekstrakt ploda štavolja je nakon *in vivo* primene kod životinja sa *EAC* i *AS30D* malignim ćelijama uzrokovao snižavanje aktivnosti enzima SOD i CAT, uz istovremeno povećanje nivoa enzima XOD i krajnjeg produkta peroksidacije lipida – MDA. Pored toga, administracija vodenog ekstrakta ploda štavolja dovela je do neznatnog sniženja sadržaja GSH i statistički značajne aktivacije enzima GR i GSHPx u malignim ćelijama. Najizraženiji pomenuti markeri uočeni su nakon pretretmana ekstraktom. Ovi rezultati sugerišu da su maligne ćelije bile izložene snažnom oksidativnom stresu nakon primene ispitivanog ekstrakta, i da je moguće da je to uzrok citotoksičnog delovanja ekstrakta.

5.5. *In vitro* antiinflamatorna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* L.

U cilju izbegavanja *in vivo* ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti biljnih ekstrakata, dobro je razvijena *in vitro* metoda za određivanje antiinflamatornog potencijala biljnih vrsta, čija procedura je detaljno izložena u eksperimentalnom delu disertacije (117). Određivanje antiinflamatorne aktivnosti vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* urađeno je u saradnji sa Laboratorijom za ispitivanje prirodnih resursa farmakološki i biološki aktivnih jedinjenja (LAFIB), Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine PMF-a u Novom Sadu. Kao izvor enzima COX-1 i 12-LOX izabrani su intaktni trombociti, dok je proces inflamacije izazivan dejstvom kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin). Upotrebom intaktnog ćelijskog sistema izbegnuto je dodavanje egzogene arahidonske kiseline, čime je omogućeno nastajanje, i kasnije praćenje, medijatora inflamacije koji potiču od endogene arahidonske kiseline. Dodavanjem internog standarda prostaglandin B₂ izbegnuto je pravljenje kalibracione krive. Glavni metaboliti arahidonske kiseline koji su ovom metodom praćeni su 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*E*,10*E*)-heptadekatrienska kiselina (12-HHT), thromboksan B₂ (TXB₂), prostaglandin E₂ (PGE₂) i 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*Z*,10*E*,14*Z*)-eikozatetraenska kiselina (12-HETE). Determinisani medijatori inflamacije deo su COX-1 i 12-LOX metaboličkog puta arahidonske kiseline, a detektovani su i kvantifikovani upotrebom LC-MS/MS analize (Agilent Technologies).

Procenat inhibicije u COX-1 i 12-LOX testu, dobijene upotrebom nekoliko različitih koncentracija ekstrakta, određivane su iz sledeće jednačine: $I (\%) = 100 \times (R_0 - R)/R_0$, gde su R_0 i R odnosi (površina pika metabolita/ površina pika internog standarda) u kontroli i u uzorcima, redom. R i R_0 su korigovane slepom probom. Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrednosti, koje predstavljaju koncentracije ekstrakta pri kojim inhibicija stvaranja metabolita COX-1 i 12-LOX iznosi 50% (Tabela 5.92.).

Tabela 5.92. IC_{50} Vrednosti za COX-1 i 12-LOX testove za vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* i standardne supstance.

	IC_{50} vrednosti (mg/mL)			
	COX-1 put			12-LOX put
	12-HHT	TXB ₂	PGE ₂	12-HETE
ekstrakt <i>R. crispus</i>	4,96 ± 0,72	n.a (IC ₃₀ =8,00)	n.a. (IC ₃₀ =4,00)	2,06 ± 0,22
aspirin	4,98 ± 0,43 x 10 ⁻³ *	4,98 ± 0,06 x 10 ⁻³ *	5,58 ± 0,53 x 10 ⁻³ *	n.a.
kvercetin	22,45 ± 2,12 x 10 ⁻³ *	53,69 ± 2,47 x 10 ⁻³ *	12,75 ± 0,26 x 10 ⁻³ *	7,44 ± 0,65 x 10 ⁻³ *

n.a. – 50% inhibicije nije određeno u primenjenom koncentracijskom opsegu.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od tri merenja.

* Lesjak i sar. (142)

Inflamacija je uobičajena u kliničkoj praksi i veruje se da je hronična inflamacija osnova mnogih degenerativnih poremećaja kao što su kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, reumatski poremećaji i osteoartritis. S obzirom da mogu da inhibiraju određene reakcije u metabolizmu arahidonske kiseline, flavonoidi deluju kao prirodni inhibitori inflamacijskog procesa, redukujući štetne posledice inflamatornog odgovora organizma (21). Rezultati radova Lesjak i saradnika (142) i Beara i saradnika (117) sugerišu da bi potencijalna antiinflamatorna aktivnost vodenog ekstrakta ploda *R. crispus* mogla poticati od sadržaja flavonoida, naročito kvercetina. Kvercetin predstavlja aglikonsku komponentu najdominantnijih flavonoidnih heterozida u ispitivanom ekstraktu. Jeong i saradnici (22) su pokazali da ekstrakt *R. crispus* ima antiinflamatornu aktivnost, i da predstavlja antialergijski agens, jer ima sposobnost da smanji intracelularni nivo kalcijuma i suprimira oslobađanje histamina.

6. Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata i njihove interpretacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U fitohemijski sastav vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* ulaze polifenolna jedinjenja – flavonoidi. Najdominantniji flavonoidni heterozid je mikvelianin, a zatim sledi hiperozid. Mikvelianin i hiperozid kao aglikonsku komponentu sadrže kvercetin.

2. Ispitivanjem *in vitro* antioksidantnih svojstava vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* uočeno je da je ispitivani ekstrakt pokazao izražen potencijalni antioksidantni efekat, značajno snižavajući intenzitet lipidne peroksidacije i produkcije hidroksil radikala, u poređenju sa kontrolnom grupom. Pored toga, vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* značajno je inhibirao DPPH• radikal u odnosu na referentnu supstancu Trolox. Merenje ukupne antioksidantne aktivnosti izražene preko FRAP jedinice pokazalo je da bi se vodeni ekstrakt ploda *Rumex crispus* mogao smatrati potencijalnim antioksidantnim agensom. Vodeni ekstrakt ploda štavelja u koncentraciji 2,5% je inhibirao nastanak azot-monoksida, dok je u drugim koncentracijama doveo do povećanja produkcije NO. Stimulacija proizvodnje NO bi mogla biti mehanizam antitumorskog dejstva vodenog ekstrakta ploda štavelja.

3. *In vitro* istraživanja antitumorske aktivnosti vodenog ekstrakta ploda štavelja prema ćelijskim linijama HeLa, MCF7 i HT-29, pokazala su značajna moguća citotoksična svojstva ispitivanog ekstrakta. Najizraženija antitumorska aktivnost ekstrakta uočena je prema ćelijskoj liniji HeLa.

4. U *in vivo* ispitivanju hepatotoksičnih/hepatoprotektivnih efekata vodenog ekstrakta ploda štavelja uočeno je da je koncentracija ekstrakta 5% u prisustvu ugljentetrahlorida u najvećoj mogućoj meri poništila negativne efekte ugljentetrahlorida, održavajući vrednosti u okviru kontrolnih za parametre: telesna masa životinja i sadržaj hepaticne DNK, jer postoji značajna razlika između ove koncentracije i kontrolne CTRL+CCL₄ grupe, a ne postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu. Za ostale parametre (masa jetre, sadržaj ukupnih proteina i hidroksiprolina, aktivnosti AST i ALT, i količina bilirubina), koncentracija ekstrakta 5% nije u potpunosti sprečila prooksidantno delovanje ugljentetrahlorida, jer i dalje postoji značajna razlika u odnosu na kontrolnu CTRL grupu. Međutim, i kod ovih parametara vodeni ekstrakt ploda štavelja pokazao je potencijalni hepatoprotektivni i antioksidantni efekat.

5. *In vivo* ispitivanja aktivnosti antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa izazvanog ugljentetrahloridom i nakon primene ispitivanog ekstrakta pokazala su da je vodeni ekstrakt ploda štavolja uzrokovao porast aktivnosti enzima SOD, CAT i GR, sniženje aktivnosti enzima XOD i GSHPx, zatim povećanje sadržaja GSH i smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije, izraženog preko količine MDA. Ovi rezultati ukazuju na povećan antioksidantni status ćelija nakon primene ispitivanog ekstrakta kod CCl₄-tretirane grupe.

6. Ispitivanje *in vivo* uticaja vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* na EAC/AS30D maligno transformisane ćelije ukazalo je na potencijalnu citotoksičnu aktivnost prema ovim ćelijama. Ekstrakt je pokazao sposobnost smanjenja zapremine ascitesa i broja malignih ćelija EAC/AS30D, kao i povećanja procenta nevijabilnih ćelija, u odnosu na kontrolnu grupu. Dalje, primena vodenog ekstrakta ploda *Rumex crispus* uzrokovala je snižavanje aktivnosti enzima SOD i CAT, povećanje aktivnosti enzima XOD, GSHPx i GR, bez promena sadržaja GSH, uz intenzivniju lipidnu peroksidaciju u malignim ćelijama EAC/AS30D. Ovi efekti su bili najizraženiji nakon pretretmana ekstraktom, u dozi 2 mL/kg t.m. Rezultati ukazuju da bi citotoksičnost ekstrakta mogla poticati od prooksidantne aktivnosti koju ispoljava, snižavajući antioksidantni kapacitet malignih ćelija EAC/AS30D.

7. *In vitro* ispitivanja potencijalne antiinflamatorne aktivnosti vodenog ekstrakta ploda štavolja ukazuju da bi se ispitivani ekstrakt mogao posmatrati kao mogući antiinflamatorni agens. Ekstrakt je pokazao potencijalan inhibitorni efekat na enzime COX-1 (12-HHT) i 12-LOX (12-HETE), a ova svojstva verovatno potiču od sadržaja flavonoida u ekstraktu.

7. Literatura

1. Boža P, Igić R, Bajramović Ž, Anačkov G, Radić J, Vukov D. Pregled rasprostranjenja vrsta roda *Rumex* L. u Vojvodini. Zb rad ser biol PMF. 2000;29:30-47.
2. Zahirnejad M, Ziarati P, Asgarpanah J. The efficiency of bio-adsorption of heavy metals from pharmaceutical effluent by *Rumex crispus* L. Seed. J Pharm Health Sci. 2017;5(3):231-43.
3. Hujerova R, Pavlu L, Pavlu V, Hejzman M, Gaisler J. Dynamics of above-ground and below-ground biomass of *Rumex crispus*, *Rumex obtusifolius* and the new weedy species *Rumex* hybrid cv. OK-2 (*R. patientia* x *R. tianschanicus*) in the seeding year. Weed Res. 2017;57(2):81-90.
4. Zaller JG. Ecology and non-chemical control of *Rumex crispus* and *R. obtusifolius* (Polygonaceae): a review. Weed Res. 2004;44(6):414-32.
5. Baskan S, Daut-Ozdemir A, Gunaydin K, Erim FB. Analysis of anthraquinones in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. Talanta. 2007;71(2):747-50.
6. Slavnić Ž. Polygonales - Polygonaceae. In: Josifović M, editor. Flora of SR Serbia. Vol. III. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts; 1972. p. 68-86.
7. Maksimović Z, Kovačević N, Lakušić B, Čebović T. Antioxidant activity of yellow dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. Phytother Res. 2011;25(1):101-5.
8. Suh HJ, Lee KS, Kim SR, Shin MH, Park S, Park S. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. J Photochem Photobiol B. 2011;102(2):102-7.
9. Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: Vulkan; 2014. p. 527-8.
10. Idris OA, Wintola OA, Afolayan AJ. Phytochemical and antioxidant activities of *Rumex crispus* L. in treatment of gastrointestinal helminths in Eastern Cape Province, South Africa. Asian Pac J Trop Biomed. 2017;7(12):1071-8.
11. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. Asian J Pharm Sci. 2018;13(1):12-23.

12. Sebastian R, Wilkinson Enns C, Goldman J, Steinfeldt L, Martin C, Clemens J, et al. New, publicly available flavonoid data products: valuable resources for emerging science. *J Food Comp Anal.* 2017;64:68-72.
13. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotech.* 2012;2012:936486.
14. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659.
15. Nijveldt R, Nood E, Hoorn D, Boelens P, Norren K, Leeuwen P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):418-25.
16. Orban-Gyapai O, Lajter I, Hohmann J, Jakab G, Vasas A. Xanthine oxidase inhibitory activity of extracts prepared from Polygonaceae species. *Phytother Res.* 2015;29(3):459-65.
17. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem.* 2001;49(8):4083-9.
18. Shim KS, Lee B, Ma JY. Water extract of *Rumex crispus* prevents bone loss by inhibiting osteoclastogenesis and inducing osteoblast mineralization. *BMC Complem Altern Med.* 2017;17:483-91.
19. Shiwani S, Singh NK, Wang MH. Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr Res Pract.* 2012;6(5):389-95.
20. Wegiera M, Smolarz H, Bogucka-Kocka A. *Rumex* L. species induce apoptosis in 1301, EOL-1 and H-9 cell lines. *Acta Pol Pharm.* 2012;69(3):487-99.
21. Hoensch H, Oertel R. The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clin Nutr Exp.* 2015;3:8-14.
22. Jeong HJ, Kim HY, Kim HM. Molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of chrysophanol, an active component of AST2017-1 on atopic dermatitis *in vitro* models. *Int Immunopharmacol.* 2018;54:238-44.
23. Hejny S, Slavik B. Kvetena České Republiky (Flora of the Czech Republic). Praha: Academia, Praha; 1990.

24. Agha IH. Contribution study to the chemical composition of the *Rumex crispus* L. family Polygonaceae, wide spread in Euphrat region in Syria, and determination of the anti-protozoa activity. Eur J Pharm Med Res. 2018;5(9):81-4.
25. Agroklub [homepage on the Internet]. Štavelj - korov, lekovita biljka i insekticid [cited 2018 Dec 23]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=yzM6XNu3HvKgrgTYiIBo&q=stavelj&oq=stavelj&gs_l=img.3..0i19.12850.16644..17283...0.0..0.166.1006.0j8.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i67j0j0i30.wc9LWSlm3q0#imgrc=SfnYQ5D3itOKnM:
26. Mertoglu-Elmas G, Gunaydin K, Ozden O. Environmental friendly alkaline sulfite anthraquinone-methanol (ASAM) pulping with *Rumex crispus* plant extract of woody materials. J Environ Biol. 2012;33(5):941-4.
27. Kallas J, Curly Dock. In: Kallas J, editor. Edible wild plants. Layton: Gibbs Smith; 2010. p. 143-65.
28. Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet [homepage on the Internet]. Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine "Dr Pavle Vukasović": Laboratorija za invazivne korove [cited 2018 Dec 26]. Available from: http://polj.uns.ac.rs/~korovi/rumex_crispus.html
29. Go Botany [homepage on the Internet]. New England Wild Flower Society. *Rumex crispus* (curly dock) [cited 2018 Nov 28]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=_S46XMnoL_qo1fAPmtOQ4AI&q=rumex+crispus+flower&oq=rumex+crispus+flower&gs_l=img.3..442931.444531..445226...0.0..0.318.1166.0j4j1j1.....0....1..gws-wiz-img.id4c_v9bcgI#imgrc=zs9NELNxtnCH3M:
30. Go Botany [homepage on the Internet]. New England Wild Flower Society. *Rumex crispus* (curly dock) [cited 2018 Dec 14]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=ATY6XOj8BerPrgTLMqygBg&q=rumex+crispus+&oq=rumex+crispus+&gs_l=img.3..0i1913j0i30i1912.2044.2044..5500...0.0..0.112.112.0j1.....0....1..gws-wiz-img.OopxEj_NZSA#imgrc=F1TZNoNNB6JLjM:

31. Go Botany [homepage on the Internet]. New England Wild Flower Society. *Rumex crispus* (curly dock) [cited 2018 Dec 14]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=CDY6XJa2CqTNrgTgh5KoBg&q=rumex+crispus+go+botany&oq=rumex+crispus+go+botany&gs_l=img.3...152059.156317..156817...1.0..0.190.1420.0j11.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i30i19.C3wpVEBknA0#imgrc=qOfgpuxysAAVMM:
32. Strnad L, Hejcman M, Hejcmanova P, Kristalova V, Pavlu V. Performance and mortality of *Rumex obtusifolius* and *R. crispus* in managed grasslands are affected by nutrient availability. *Folia Geobotanica*. 2012;47:293-304.
33. Krištalova V, Hejcman M, Červena K, Pavlu V. Effect of nitrogen and phosphorus availability on the emergence, growth and over-wintering of *Rumex crispus* and *Rumex obtusifolius*. *Grass Forage Sci*. 2011;66(3):361-9.
34. Hongo A. Survival and growth of seedlings of *Rumex obtusifolius* L. and *Rumex crispus* L. in newly sown grassland. *Weed Res*. 1989;29(1):7-12.
35. Plants for a Future [homepage on the Internet]. *Rumex crispus* Curled Dock, Curly dock [cited 2018 Dec 12]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=vDA6XO2kD8aj1fAPs62V0AY&q=rumex+crispus+&oq=rumex+crispus+&gs_l=img.3..0i19i3j0i30i19i2.436550.436550..437039...0.0..0.152.152.0j1.....0....1..gws-wiz-img.8jpXpRPs-yw#imgrc=v6IRwYNcuz6XAM:
36. Go Botany [homepage on the Internet]. New England Wild Flower Society. *Rumex crispus* (curly dock) [cited 2018 Nov 28]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=_S46XMnoL_qo1fAPmtOQ4AI&q=rumex+crispus+flower&oq=rumex+crispus+flower&gs_l=img.3..442931.444531..445226...0.0..0.318.1166.0j4j1j1.....0....1..gws-wiz-img.id4c_v9bcgI#imgrc=4FczoBcXmnpfmM:
37. Wikipedia [homepage on the Internet]. *Rumex crispus* [cited 2019 Jan 28]. Available from: https://www.google.rs/search?hl=sr&biw=1366&bih=636&tbm=isch&sa=1&ei=qy46XM_sBYuU1fAPhdKx2AE&q=rumex+crispus+fruit&oq=rumex+crispus+fruit&gs_l=img.3...77732.80847..81217...0.0..0.162.816.0j6.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i30i19.yqAV5rm1q-s#imgrc=iYQuIWgs8bk_MM:

38. Hejcman M, Kristalova V, Červena K, Hrdličkova J, Pavlu V. Effect of nitrogen, phosphorus and potassium availability on mother plant size, seed production and germination ability of *Rumex crispus*. *Weed Res.* 2012;52(3):260-8.
39. Honek A, Martinkova Z. Effect of individual plant phenology on dormancy of *Rumex obtusifolius* seeds at dispersal. *Weed Res.* 2002;42(2):148-55.
40. United States Department of Agriculture - USDA [homepage on the Internet]. *Rumex crispus* L. curly dock. The PLANTS Database National Plant Data Center, Baton Rouge, USA [cited 2018 Dec 17]. Available from: <http://plants.usda.gov>.
41. Lee KH, Rhee KH. Antimalarial activity of nepodin isolated from *Rumex crispus*. *Arch Pharm Res.* 2013;36(4):430-5.
42. Crofts A, Jefferson RG. The lowland grassland management handbook. 2nd ed. Peterborough: English Nature/The Wildlife Trusts; 1999.
43. Mink R, Dutta A, Peteinatos G, Sokefeld M, Engels JJ, Hahn M, et al. Multi-temporal site-specific weed control of *Cirsium arvense* (L.) Scop. and *Rumex crispus* L. in maize and sugar beet using unmanned aerial vehicle based mapping. *Agriculture.* 2018;8:65.
44. Dimitrova T, Marinov-Serafimov P. Chemical control of curled dock (*Rumex crispus* L.) and other weeds in noncropped areas. *Pestic Phytomed.* 2008;23(2):123-6.
45. Jančić R. Botanika farmaceutika. Beograd: Službeni list SCG; 2004.
46. Kim JC, Choi GJ, Lee SW, Kim JS, Chung KY, Cho KY. Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew. *Pest Manag Sci.* 2004;60(8):803-8.
47. Choi GJ, Lee SW, Jang KS, Kim JS, Cho KY, Kim JC. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Protection.* 2004;23(12):1215-21.
48. Park ES, Song GH, Lee SM, Kim TY. Increased anti-inflammatory effects of processed curly dock (*Rumex crispus* L.) in *ex vivo* LPS-induced mice splenocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018;47(5):599-604.
49. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga; 2004.
50. Verma AK, Singh H, Satyanarayana M, Srivastava SP, Tiwari P, Singh AB, et al. Flavone-based novel antidiabetic and antidyslipidemic agents. *J Med Chem.* 2012;55(10):4551-67.

51. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.* 1998;61(1):71-6.
52. Dorneles KR, Lamego FP, Caratti FC, Victoria AA, Pazdiora P, Dallagnol LJ. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* on curly dock (*Rumex crispus*) in Brazil. *Plant Dis.* In press. DOI: 10.1094/PDIS-09-18-1565-PDN.
53. Guil JL, Rodriguez-Garcia I, Torija E. Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. *Plant Foods Human Nutr.* 1997;51(2):99-107.
54. Sun XY, Zhang CY, Bhadja P, Ouyang JM. Preparation, properties, formation mechanisms, and cytotoxicity of calcium oxalate monohydrate with various morphologies. *Cryst Eng Comm.* 2018;20:75-87.
55. Sun XY, Gan QZ, Ouyang JM. Calcium oxalate toxicity in renal epithelial cells: the mediation of crystal size on cell death mode. *Cell Death Dis.* 2015;1:15055.
56. Muselin F, Brezovan D, Savici J, Cristina RT, Dumitrescu E, Doma A, et al. The use of yellow dock (*Rumex crispus* L.) and goji berry (*Lycium barbarum* L.) in Alloxan induced diabetes mellitus in rats. *Animal Sci Biotechnol.* 2015;48(1):373-6.
57. Lee S, Kim D, Yim D, Lee S. Anti-inflammatory, analgesic and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. *Korean J Pharmacogn.* 2007;38(4):334-8.
58. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(9):2709-29.
59. Gorrini C, Harris I, Mak T. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-47.
60. Gandhi S, Abramov A. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:1-11.
61. Bhandari M, Clack B. Extraction of anti-cancer water soluble compounds from *Rumex crispus*. *FASEB J.* 2015;29 Suppl 1:S33-4.
62. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48(12):909-30.
63. Čebović T. Uticaj ekstrakata imele (*Viscum album* L.) sa različitih domaćina na stvaranje slobodnih radikala kiseonika i aktivnost antioksidantnih enzima [dissertation]. Beograd: Farmaceutski fakultet; 2008.

64. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-26.
65. Zhou Y, Ding J, Liang T, Abdel-Halim ES, Jiang L, Zhu JJ. FITC doped rattle-type silica colloidal particle-based ratiometric fluorescent sensor for biosensing and imaging of superoxide anion. *ACS Appl Mater Inter.* 2016;8(10):6423-30.
66. Čebović T. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja antioksidantnih svojstava *Viscum album* L. i *Allium cepa* L. [M.S. thesis]. Novi Sad: Prirodno-matematički fakultet; 2003.
67. Groves TJ. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol.* 1999;3(2):226-35.
68. Mandal C, Ghosh N, Adak MK, Dey N. Interaction of polyamine on oxidative stress induced by exogenously applied hydrogen peroxide in *Salvinia natans* Linn. *Theor Exp Plant Phys.* 2013;25(3):203-12.
69. Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav.* 2013;8(4):e23681.
70. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen: boon yet bane - introducing oxygen toxicity and reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge MC, editors. 5th ed. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Oxford University Press; 2015. p. 1-29.
71. Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biol.* 2017;11:240-53.
72. Brown G, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion.* 2012;12(1):1-4.
73. Serra A, Prokić M, Vasconsuelo A, Pinto JR. Oxidative stress in muscle diseases: current and future therapy. *Oxid Med Cell Longev.* In press. DOI: 10.1155/2018/6439138.
74. Basu S. F2-isoprostane induced prostaglandin formation in the rabbit. *Free Radic Res.* 2006;40(3):273-7.
75. Kumar V, Abbas A, Aster J. Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. In: Kumar V, Abbas A, Aster J. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014. p. 3-42.
76. Yang J. The role of reactive oxygen species in angiogenesis and preventing tissue injury after brain ischemia. *Microvasc Res.* 2019;123:62-7.

77. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Bio Med Res Int.* 2014;2014:1-19.
78. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:373-99.
79. Niziolek M, Korytowski W, Girotti AW. Nitric oxide inhibition of free radical mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(8):997-1005.
80. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83-94.
81. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs IE, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol.* 2014;5:532.
82. Galkina S, Golenkina E, Viryasova G, Romanova Y, Sud'ina G. Nitric oxide in life and death of neutrophils. *Curr Med Chem.* In press. DOI: 10.2174/0929867326666181213093152.
83. El-Gayar S, Thuring-Nahler H, Pfeilschifter J, Rollinghoff M, Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol.* 2003;171(9):4561-8.
84. Pryor W, Squadrito G. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995;268:L699-722.
85. Choi S, Saxena N, Dhammu T, Khan M, Singh A, Singh I, et al. Regulation of endothelial barrier integrity by redox-dependent nitric oxide signaling: implication in traumatic and inflammatory brain injuries. *Nitric Oxide.* 2019;83:51-64.
86. Hou T, Zhang K, Kang X, Guo X, Du L, Chen X, et al. Sensitive detection and imaging of endogenous peroxynitrite using a benzo[d]thiazole derived cyanine probe. *Talanta.* 2019;196:345-51.
87. Cordeiro RM. Reactive oxygen and nitrogen species at phospholipid bilayers: peroxynitrous acid and its homolysis products. *J Phys Chem B.* 2018;122(34):8211-9.
88. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors.* 2003;3:276-84.
89. Retel J, Hoebee B, Braun JEF, Lutgerink JT, Akker E, Wanamarta HA, et al. Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 1993;299(3-4):165-82.

90. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44(5):479-96.
91. Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, et al. Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 2016;124:713-21.
92. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
93. Knežević-Ušaj S. Patologija tumora. In: Budakov P, Eri Ž, editors. *Patologija*. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2011. p. 92-141.
94. Krstić M, Stojnev S. Kancerske stem ćelije - aktuelni koncepti, terapijske implikacije i izazovi. *Materia medica.* 2014;30(2):1140-6.
95. Colić Z. Rast i maligna transformacija ćelija. *Opšta medicina.* 2005;11(1-2):67-71.
96. Pandurangan AK, Divya T, Kumar K, Dineshbabu V, Velavan B, Sudhandiran G. Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: a review. *World J Gastrointest Oncol.* 2018;10(9):244-59.
97. Bebington BD. Concepts in malignant transformation. *S Afr J Surg.* 2015;53(3-4):2-4.
98. Baba AI, Catoi C. Tumor cell morphology. In: Baba AI, Catoi C, editors. *Comparative oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
99. Szachowicz-Petelska B, Dobrzynska I, Sulkowski S, Figaszewski ZA. Characterization of the cell membrane during cancer transformation. In: Ettarh R, editor. *Colorectal cancer biology - from genes to tumor*. Shanghai: In Tech; 2012. p. 241-56.
100. Hejmadi M. How cancer arises. In: Hejmadi M, editor. *Introduction to cancer biology*. 2nd ed. London: Bookboon; 2010.
101. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Inter Aging.* 2007;2(2):219-36.
102. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:239-67.
103. Weedon D, Strutton G. Tumors of the epidermis. In: Weedon D, editor. *Skin pathology*. London: Churchill Livingstone; 2002. p. 753-802.
104. Tennant RW. Mutagens and carcinogens. *Biol Biomed.* In press. DOI: 10.1036/1097-8542.441100.

105. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodrigues H. Free-radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1102-15.
106. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17(10):1195-214.
107. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:50-64.
108. Vulić J, Čebović T, Čanadanović V, Četković G, Đilas S, Čanadanović-Brunet J, et al. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food Funct.* 2013;4(5):713-21.
109. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017;387:95-105.
110. Gill GJ, Piskounova E, Morrison S. Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2016;81:163-75.
111. Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: a review. *J Adv Res.* 2018;11:23-32.
112. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija.* Beograd: Data status; 2005.
113. Tallima H, Ridi ER. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - a review. *J Adv Res.* 2018;11:33-41.
114. Curtis-Prior P. *The eicosanoids.* Cambridge: John Wiley and Sons; 2004.
115. Das U. Arachidonic acid in health and disease with focus on hypertension and diabetes mellitus: a review. *J Adv Res.* 2018;11:43-55.
116. Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL, Garavito RM. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science.* 2000;289(5486):1933-7.
117. Beara IN, Orčić DZ, Lesjak MM, Mimica-Dukić NM, Peković BA, Popović MR. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago L.*) species. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52(5):701-6.
118. Aleksić E, Tomin J, Stanković S, Živanov-Čurlis J, Bašić D, Jevrić M. Leukotrieni kao medijatori alergijske inflamacije. *Opšta medicina.* 2005;11(1-2):33-8.
119. Petrović S, Maksimović Z, Kundaković T. *Hemijska analiza biljnih droga i sastojaka.* Beograd: Farmaceutski fakultet; 2009.

120. Buege AL, Aust DS. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleisher S, Parker L, editors. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press; 1978.
121. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999;299:15-27.
122. Harald SHW, Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the griess reaction. In: Feelisch M, Stamler JS, editors. *Methods in nitric oxide research*. Chichester: Wiley-Blackwell; 1996. p. 491-7.
123. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-12.
124. Wood EJ. *Practical biochemistry for colleges*. Oxford: Pergamon Press; 1989.
125. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010;5(1):51-66.
126. Bergmayer UH. *Methoden der enzymatischen analyse*. Weinheim: Chemie; 1970. p. 483-4.
127. Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1950;195:133-40.
128. Chin DT, Stults FH, Tappel AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1976;445(3):558-660.
129. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 33. Basel: Chemie; 1983.
130. Beuthler E, Duron O, Kelly B. Improved methods for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1983;61:882-9.
131. Abcam [homepage on the Internet]. Xanthine Oxidase Activity Assay Kit (ab102522) [cited 2019 Jan 26]. Available from: www.abcam.com/xanthine-oxidase-activity-assay-kit-ab102522.html
132. Abcam [homepage on the Internet]. Catalase Activity Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab83464) [cited 2019 Jan 26]. Available from: www.abcam.com/catalase-activity-assay-kit-colorimetricfluorometric-ab83464.html

133. BioVision [homepage on the Internet]. Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit [cited 2019 Jan 26]. Available from: www.biovision.com/glutathione-peroxidase-activity-colorimetric-assay-kit.html
134. BioVision [homepage on the Internet]. Glutathione Reductase Activity Colorimetric Assay Kit [cited 2019 Jan 26]. Available from: www.biovision.com/glutathione-reductase-activity-colorimetric-assay-kit.html
135. Ćebović T. Practical manual in biochemistry. Novi Sad: Faculty of Medicine; 2016.
136. Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. Uputstva za vežbe iz medicinske biohemije za studente farmaceutskog fakulteta. Beograd: Farmaceutski fakultet; 2000. p. 147-57.
137. Kovačević Z. Praktična biohemija i molekularna biologija. Novi Sad: Medicinski fakultet; 1994.
138. Cissell DD, Link JM, Hu JC, Athanasiou KA. A modified hydroxyproline assay based on hydrochloric acid in Ehrlich's solution accurately measures tissue collagen content. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23(4):243-50.
139. Schulte-Hermann R, Ochs H, Bursch W, Parzefall W. Quantitative structure-activity studies on effects of 16 different steroids on growth and monooxygenases of rat liver. *Cancer Res*. 1988;48(9):2462-8.
140. Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo M I, Subramanian LR, Ammon HP. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261(3):1143-6.
141. Nađpal JD, Lesjak MM, Mrkonjić ZO, Majkić TM, Četojević-Simin DD, Mimica-Dukić NM, et al. Phytochemical composition and *in vitro* functional properties of three wild rose hips and their traditional preserves. *Food Chem*. 2018;241:290-300.
142. Lesjak MM, Beara IN, Orčić DZ, Ristić JD, Anačkov GT, Božin BN, et al. Chemical characterization and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Sci Technol*. 2013;53(2):530-9.
143. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Tabassum Chaudhry M, Wang S, et al. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*. 2016;8(3):167-80.
144. Tukappa NK, Londonkar R, Nayaka H, Kumar S. Cytotoxicity and hepatoprotective attributes of methanolic extract of *Rumex vesicarius* L. *Biol Res*. 2015;48(1):19.

145. Ganaie MA, Khan TH, Siddiqui NA, Ansari MN. Ameliorative effect of methanol extract of *Rumex vesicarius* on CCl₄-induced liver damage in *Wistar* albino rats. *Pharm Biol.* 2015;53(8):1163-7.
146. Jeon MH, Kim SH, Yoo DJ, Yoo SJ, Kim CE. Antioxidant and inhibitory activity on nitric oxide production of *Rumex crispus* and mix medicinal plants by extract of hot water. *Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015;8:360-1.
147. Rhim TJ, Choi MY, Park HJ. Antioxidative activity of *Rumex crispus* L. extract. *Korean J Plant Res.* 2012;25(5):568-77.
148. Eddine LS, Segni L, Redha OM, Nouredine G. Free radical scavenging activity of leaf extract of *Rumex vesicarius* L. obtained by different methods. *Int J Toxicol Pharm Res.* 2015;7(3):140-6.
149. Ćebović T, Jakovljević D, Maksimović Z, Đorđević S, Jakovljević S, Četojević-Simin D. Antioxidant and cytotoxic activities of curly dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. *Vojnosanit Pregl.* In press. DOI: 10.2298/VSP170713084C.
150. Awotunde OS, Dhanabal SP, Rajeshkumar R, Chasitainya MVNL. Antioxidant activities of Hydro-ethanol and Saponin extracts of *Terminalia schimeperiana* root. *Der Pharmacia Lettre.* 2017;9(11):47-53.
151. Kim HJ, Hwang EY, Im NK, Park SK, Lee IS. Antioxidant activities of *Rumex crispus* extracts and effects on quality characteristics of seasoned pork. *Korean J Food Sci Tech.* 2010;42(4):445-51.
152. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
153. Abidi J, Ammar S, Brahim SB, Skalicka-Wozniak K, Ghrabi-Gammar Z, Bouaziz M. Use of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry system as valuable tool for an untargeted metabolomic profiling of *Rumex tunetanus* flowers and stems and contribution to the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;162:66-81.
154. Brune B, Knethen A, Sandau K. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Different.* 1999;6:969-75.
155. Hiransai P, Tangpong J, Kumbuar C, Hoonheang N, Rodpech O, Sangsuk P, et al. Anti-nitric oxide production, anti-proliferation and antioxidant effects of the aqueous extract from *Tithonia diversifolia*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016;6(11):950-6.

156. Kim H, Jeong H, Hong JW, Ju E, Kong CS, Seo Y. Evaluation of flavonoids from *Zostera asiatica* as antioxidants and nitric oxid inhibitors. *Biotechnol Bioproc Eng.* 2016;21(6):823-9.
157. Četojević-Simin D. Bioaktivnost prirodnih proizvoda – antitumorsko delovanje - *in vitro*. Novi Sad: Univerzitet, Naučni institut za prehrambene tehnologije; 2015.
158. Četojević-Simin D, Velićanski A, Cvetković D, Markov S, Četković G, Tumbas Šaponjac V, et al. Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chem.* 2015;166:407-13.
159. Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄-induced liver injury in low-protein fed rats. *Phytother Res.* 2005;19(4):341-5.
160. Pan Y, Long X, Yi R, Zhao X. Polyphenols in Liubao Tea Can Prevent CCl₄-Induced Hepatic Damage in Mice through Its Antioxidant Capacities. *Nutrients.* 2018;10(9):1280-96.
161. Ogunlana OO, Ogunlana OE, Adelani BI, Adebayo AOI, Opetoritse LD, Oluwaseye JA, et al. Assessment of the hepatoprotective activity of the seeds of *Hunteria umbellata* (Hallier F.) on carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver damage in *Wistar* albino rats. *AIP Conf Proc.* 2018;1954(1):23.
162. Alkushi AG. Protective effect of sorrel extract on adult rats treated by carbon tetrachloride. *Pharmacognosy Res.* 2017;9(2):200-7.
163. Kober H, Tatsch E, Dorneles Torbitz V, Peruzzolo Cargin L, Borges Sangoi M, Vargas Bochi G, et al. Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2016;39(1):48-52.
164. Mainak C, Asis B, Pallab KH. Flavonoid enriched fraction of *Campylandra aurantiaca* attenuates carbon tetrachloride induced oxidative DNA damage in mouse peritoneal macrophages in animal model. *Curr Drug Dis Technol.* 2017;14(4):270-6.
165. Zhang Q, Xu F, Li Y, Zheng M, Xi X, Han C. *Silybum marianum* seeds oil attenuates CCl₄-induced hepatic fibrosis via regulation of inflammatory response and oxidative stress. *Curr Nutr Food Sci.* 2018;14(3):197-203.

166. Liu Y, Liu Q, Hesketh J, Huang D, Gan F, Hao S, et al. Protective effects of selenium-glutathione-enriched probiotics on CCl₄-induced liver fibrosis. *J Nutr Biochem*. 2018;58:138-49.
167. Sahreen S, Khan MR, Khan RA. Ameliorating effect of various fractions of *Rumex hastatus* roots against hepato- and testicular toxicity caused by CCl₄. *Oxid Med Cell Longev*. 2013. In press. DOI: 10.1155/2013/325406.
168. Dey P, Saha MR, Sen A. Hepatotoxicity and the present herbal hepatoprotective scenario. *Int J Green Pharm*. 2013;7:265-73.
169. Aghajanyan A, Nikoyan A, Trchounian A. Biochemical Activity and Hypoglycemic Effects of *Rumex obtusifolius* L. Seeds Used in Armenian Traditional Medicine. *BioMed Res Int*. 2018;2018:4526352.
170. Naseri L, Khazaei M, Ghanbari E, Bazm MA. *Rumex alveollatus* hydroalcoholic extract protects CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. *Comp Clin Pathol*. 2018. In press. DOI: 10.1007/s00580-018-2846-7.
171. Venkatakishore T, Prasad Rao M, Thulasi B, Kanchana Durga P, Harikrishna B, Sai Prasanth S. Hepatoprotective activity of ethanolic extract of aerial part of *Gymnema sylvestre* against CCl₄ and paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *World J Pharm Pharmaceut Sci*. 2016;5(12):1007-16.
172. Sheela D, Udhayakumari F. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Sauropus bacciformis* whole plant methanolic extracts against CCl₄: Induced liver injury in rats. *Int J Res Pharm Pharmac Sci*. 2018;3(1):51-5.
173. Abdel-Sattar E, Shehab N, Harraz F, Ghareib S. Antioxidant and hepatoprotective activities of some Saudi medicinal plants. *Int J Pharm Biol Chem Sci*. 2014;3(4):24-36.
174. Khan TH, Sultana S. Antioxidant and hepatoprotective potential of *Aegle marmelos* Correa. against CCl₄-induced oxidative stress and early tumor events. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009;24(2):320-7.
175. Antonyan A, Sharoyan S, Harutyunyan H, Barboni L, Lupidi G, Mardanyan S. Protection of hippocampal and islet beta cells *in vitro* by emodin from leaves of *Rumex confertus*. *Int J Pharmacogn*. 2016;3(10):437-44.

176. Hawas WU, Ahmed FE, Abdelkader FA, Taie AAAH. Biological activity of flavonol glycosides from *Rumex dentatus* plant, an Egyptian Xerophyte. *J Med Plant Res.* 2011;5(17):4239-43.
177. Ćebović T, Arsenijević J, Drobac M, Živković J, Šoštarić I, Maksimović Z. Potential use of deodorised water extracts: polyphenol-rich extract of *Thymus pannonicus* All. as a chemopreventive agent. *J Food Sci Technol.* 2018;55(2):560-7.
178. Talaviya P, Vyas BM, Rao SK, Patel V, Ghadiya S. Evaluation of antitumor activity of *Crotalaria Burhia* Buch.-Ham. Roots against *Ehrlich's* ascites carcinoma treated mice. *Indian J Phys Pharm.* 2018;62(2):259-66.
179. Ourique F, Kwiecinski MR, Zirbel G, Castro LSEPW, Jhonatan A, Castro G, et al. *In vivo* inhibition of tumor progression by 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;477(4):640-6.
180. Badr OM, Sakr SA, Abd-Eltawab HM. Ameliorative effect of ginger extract against pathological alterations induced in mice bearing solid tumors. *J Biosci Appl Res.* 2016;2(3):185-96.
181. Yi J, Qu H, Wu Y, Wang Z, Wang L. Study on antitumor, antioxidant and immunoregulatory activities of the purified polyphenols from pinecone of *Pinus koraiensis* on tumor-bearing S180 mice *in vivo*. *Int J Biol Macromol.* 2017;94:735-44.
182. Benlloch M, Obrador E, Valles SL, Rodriguez ML, Sirerol AJ, Alcacer J, et al. Pterostilbene decreases the antioxidant defenses of aggressive cancer cells *in vivo*: a physiological glucocorticoids and Nrf2-dependent mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(17):974-90.
183. Aliakbari F, Gilani MAS, Yazdekhasti H, Koruji M, Asgari HR, Baazm M, et al. Effects of antioxidants, catalase and α -tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(1):63-8.