



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**Određivanje antitumorske i
hepatoprotektivne aktivnosti rena
in vitro i *in vivo***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Tatjana Čebović

Dr sci. Dragana Četojević - Simin, naučni savetnik

Kandidat:

Vidosava Petrović

Novi Sad, 2022. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Видосава Петровић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	проф. др Татјана Ђебовић, редовни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду др сци. Драгана Четојевић-Симин, научни саветник, Институт за онкологију Војводине
Наслов рада:	Одређивање антитуморске и хепатопротективне активности рена <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 153 Поглавља 9 Референци 319 Табела 12 Слика 13 Графикона 49 Прилога 2
Научна област:	Медицинске науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Биохемија
Кључне речи / предметна одредница:	полифеноли; ћелијска пролиферација; ћелијска смрт; <i>in vitro</i> методе; апоптоза; некроза; антинеопластички агенси; антиоксиданти; протективни агенси; експеримент на животињама; Ehrlich-ов асцитни карцином; хемикалијама и лековима изазвана оштећења јетре; угљентетрахлорид
Резиме на језику рада:	Рен (<i>Armoracia rusticana</i> , G. Gaertn, B. Mey. and Scherb.) је отпорна вишегодишња биљка која се узгаја због специфичног интензивног и љутог укуса. Циљ овог рада био је испитивање антитуморске и хепатопротективне активности екстраката и сока корена рена <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> . Применом течно-течне екстракције изоловане су и раздвојене поларне од неполарних компоненти, а HPLC методом идентификована су и квантификована полифенолна једињења у добијеним екстрактима и соку корена рена. Антипролиферативна активност екстраката и сока корена рена испитана је <i>in vitro</i> на туморским ћелијским линијама: карцинома грлића материце (HeLa), аденокарцинома дојке (MCF7 и MDA-MB-231), аденокарцинома дебелог црева (HT-29), аденокарцинома плућа (A549), аденокарцинома простате (PC-3), карцинома коже (Hs 294T), карцинома јетре (Hep G2), као и на ћелијским линијама карцинома јетре пацова (H-4-II-E) и нормалним феталним ћелијским линијама плућа (MPC-5) употребом Сулфородамин Б теста. Механизам ћелијске смрти одређен је

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>детекцијом апоптозе и некрозе употребом <i>Cell Death Detection</i> ELISA^{PLUS} комплета.</p> <p><i>In vivo</i> је испитана антитуморска активности екстраката и сока корена рена на ћелијама <i>Ehrlich</i>-овог асцитног карцинома (ЕАК) имплантираних NMRI мишевима, као и антиоксидантна и хепатопротективна активност код интоксикације јетре индуковане угљен-тертрахлоридом (CCl₄) код мишева.</p> <p>Испитана је активност осам екстраката корена рена и то из пулпе: дихлорметански (Е1), хлороформски (Е2), бутанолни (Е8) и водени (Е7) и из сока: дихлорметански (Е3), хлороформски (Е4), бутанолни (Е6) и водени (Е5) и сок корена рена (Ј9).</p> <p>Дихлорметански екстракти корена рена имали су највећи садржај катехина, <i>m</i>-хидроксибензоеве, сиригинске и галне киселине (пулпа, Е1) и епикатехина (сок, Е3). Хлороформски екстракт пулпе (Е2) имао је висок садржај кверцетина и кемферола, док је сок корена рена садржао веће концентрације катехина и галне киселине.</p> <p>Резултати су показали снажну и неселективну антипролиферативну активност хлороформских и дихлорметанских екстраката и сока корена рена, са најснажнијим деловањем на ћелијске линије јетре, дојке и плућа. Добијене IC₅₀ вредности биле су при ниским концентрацијама (IC₅₀ = 3,49-28,46 µg/mL) и високим разблажењима (IC₅₀ = 418-1590). Сок (Ј9) и хлороформски екстракт сока рена (Е4) показали су снажну, непожељну способност индукције некрозе.</p> <p>Екстракти и сок корена рена утицали су на повећање оксидативног стреса у ћелијама <i>Ehrlich</i>-овог асцитног карцинома (ЕАК). Код животиња које су претретиране соком корена рена (Ј9) и посттретиране хлороформским екстрактом пулпе (Е2) и дихлорметанским екстрактом сока (Е3) постојало је значајно повећање активности супероксид дисмутазе (SOD), ксантин оксидазе (XOD), глутатион пероксидазе (GSHPx), глутатион редуктазе (GR), интензитета липидне пероксидације (LPx), као и смањење активности каталазе (CAT) и нивоа глутатиона (GSH) у ћелијама ЕАК.</p> <p>Ефекти екстраката и сока корена рена на оксидативни стрес код хепатотоксичног оштећења јетре индукованог угљен-тетрахлоридом били су процењени мерењем параметара антиоксидантне активности, као и биохемијских параметара функције јетре. Претретмани соком корена рена, хлороформским екстрактом пулпе (Е2) и дихлорметанским екстрактом сока (Е3), пре апликације CCl₄, утицали су на значајно повећање активности CAT, SOD, GR и нивоа GSH, као и на значајно смањење активности XOD, GSHPx и интензитета LPx, у односу на групу животиња интоксиковану CCl₄-ом. Такође, претретмани са соком корена рена, као и хлороформским и дихлорметанским екстрактима пре апликације CCl₄ утицали су на значајно смањење активности ALT/AST и концентрације хидроксипролина, које су биле повишене код животиња након интоксикације CCl₄-ом.</p> <p>Може се закључити да је детектовано снажно и неселективно антипролиферативно дејство <i>in vitro</i> хлороформских и дихлорметанских екстраката и сока корена рена, са некрозом као основним механизмом индуковане ћелијске смрти. Резултати добијени у <i>in vivo</i> испитивањима указали су да сок корена рена (Ј9), хлороформски екстракт пулпе (Е2) и дихлорметански екстракти сока (Е3) испољавају потенцијалну антитуморску активност према ћелијама ЕАК, као и потенцијалну антиоксидантну и хепатопротективну активност превенирајући оштећења јетре индукована хепатотоксичним CCl₄-ом.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	17.11.2015.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	

Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	Нема

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Vidosava Petrović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	PhD Tatjana Čebović, full professor, Medical faculty of Novi Sad PhD Dragana Četojević- Simin, senior research associate, Institute of oncology of Vojvodina
Thesis title:	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antitumour and hepatoprotective activity of horseradish
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 153 Chapters 9 References 319 Tables 12 Illustrations 13 Graphs 49 Appendices 2
Scientific field:	Medical science
Scientific subfield (scientific discipline):	Biochemistry
Subject, Key words:	Armoracia; Polyphenols; Cell Proliferation; Cell Death; In Vitro Techniques; Apoptosis; Necrosis; Antineoplastic Agents; Antioxidants; Protective Agents; Animal Experimentation; Carcinoma, Ehrlich Tumor; Chemical and Drug Induced Liver Injury; Carbon Tetrachloride
Abstract in English language:	<p>Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>, G. Gaertn, B. Mey. and Scherb.) is a hardy perennial herb, cultivated for its delicious, pungency and cooling taste. The aim of this study was to investigate antitumour and hepatoprotective activity of horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>, <i>Brassicaceae</i>) root juice and extracts <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>.</p> <p>Liquid-liquid extraction of polar and non-polar compounds was used and polyphenolic compounds were identified and quantified by HPLC analysis. Antiproliferative activity was examined <i>in vitro</i> on human cervix carcinoma (HeLa), breast adenocarcinoma (MCF7, MDA-MB-231), colon adenocarcinoma (HT-29), lung adenocarcinoma (A549), prostate adenocarcinoma (PC-3), melanocyte carcinoma (Hs 294T), hepatocyte carcinoma (Hep G2), as well as rat hepatocyte carcinoma (H-4-II-E), and normal human fetal lung (MRC-5) cell line using Sulforhodamine B assay. The mechanism of cell-death in cell line was determined using <i>Cell Death Detection ELISA^{PLUS}</i> kit.</p> <p>The antiproliferative activity of horseradish root juice and extracts against Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in Hannover National Medical Institute (Hann:NMRI) mice, as well as antioxidant and hepatoprotective activity against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice were examined <i>in vivo</i>.</p>

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>This investigation was performed by use of dichloromethane (E1), chloroform (E2), butanol (E8) and aqueous (E7) extracts of horseradish pulp; dichloromethane (E3), chloroform (E4), butanol (E6) and aqueous (E5) extracts of horseradish juice, and unaltered horseradish juice (J9). Dichloromethane extracts had the highest content of catechin, <i>p</i>-hydroxybenzoic, syringic and gallic acid (pulp, E1), and epicatechin (juice, E3). Chloroform pulp extract (E2) contained quercetin and kaempferol while gallic acid and catechin were mostly found in the juice (J9). The results showed strong and non-selective antiproliferative activity of chloroform and dichloromethane extracts and root juice - highest being towards liver, breast and lung tissue cells. IC₅₀ values of extracts and juice were obtained in low range of concentrations (IC₅₀ = 3,49-28,46 µg/mL) and high range of dilutions (IC₅₀ = 418-1590). High and unfavorable potential of horseradish juice (J9) and chloroform juice extract (E4) to induce necrotic cell death was detected.</p> <p>Both the extracts and juice caused an increase of oxidative stress in EAC cells. Animals pre-treated with horseradish root juice (J9) and post-treated with chloroform pulp (E2) or dichloromethane juice (E3) extracts showed increased activities of superoxide dismutase (SOD), xanthine oxidase (XOD), glutathione peroxidase (GSHPx), glutathione reductase (GR) and the intensity of lipid peroxidation (LPx). On the other hand, catalase (CAT) activity and the amount of glutathione (GSH) significantly decreased in EAC cells.</p> <p>Effects of horseradish root juice and extracts on CCl₄-induced oxidative stress were evaluated by measuring stress parameters and biochemical parameters of liver function. Pre-treatment with horseradish root juice, pulp chloroform (E2) and dichloromethane juice (E3) extracts, before application of CCl₄, led to a significant increase in CAT, SOD, GR and GSH levels, and significantly decreased XOD, GSHPx and LPx levels, bringing them closer to the values of the EAC control group. Also, pre-treatment with horseradish root juice and chloroform and dichloromethane extracts, before application of CCl₄ led to significant decrease in ALT/AST activities and hydroxyproline concentration, which were elevated in CCl₄-intoxicated animals.</p> <p>It could be conclude that strong and non-selective <i>in vitro</i> antiproliferative activity of chloroform and dichloromethane extracts and root juice of horseradish was detected, with necrosis as a main mechanism of induced cell death. Obtained results suggest that the horseradish root juice (J9), as well as pulp chloroform (E2) and dichloromethane juice (E3) extracts exert antitumour effects on <i>Ehrlich</i> ascites carcinoma (EAC) and antioxidant and hepatoprotective effects against CCl₄-induced liver toxicity <i>in vivo</i>.</p>
Accepted on Scientific Board on:	17.11.2015.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	None

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujem mentorima prof. dr Tatjani Čebović i naučnom savetniku dr sci. Dragani Četojević-Simin na pomoći tokom doktorskih studija i izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Nataši Milić i docentu dr Maji Milanović sa Zavoda za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, na stručnoj pomoći oko pripreme i ekstrakcije uzoraka.

Zahvaljujem se docentu dr Jeleni Vulić sa Katedre za primenjene i inženjerske hemije Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na pomoći kod fitohemijskog ispitivanja uzoraka.

Veliku zahvalnost dugujem prijateljima na neizmernoj podršci.

Neizmernu zahvalnost dugujem ćerki Sonji i sestri Živki na ljubavi i beskrajnoj veri u uspeh.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo.....	3
2.1. Ren, <i>Armoracia rusticana</i> (G. Gaertn, B. Mey & Scherb.).....	3
2.1.1. Botanički opis	3
2.1.2. Fitohemijski sastav	5
2.1.2.1. Glukozinolati (GLS)	5
2.1.2.2. Polifenoli.....	8
2.2. Reaktivne kiseonične i azotne vrste.....	14
2.2.1. Produkcija ROS i RNS	14
2.3. Oksidativni stres	16
2.4. Mehanizmi antioksidantne zaštite i antioksidantni sistemi.....	18
2.5. Maligna transformacija ćelija	22
2.5.1. Reaktivne kiseonične vrste i maligna transformacija ćelija.....	24
2.6. Apoptoza.....	25
2.6.1. Mehanizmi apoptoze.....	26
3. Ciljevi i hipoteze istraživanja	30
3.1. Ciljevi istraživanja	30
3.2. Hipoteze istraživanja.....	30
4. Materijal i metode	32
4.1. Hemikalije i standardi	32
4.2. Fitohemijsko ispitivanje ekstrakata i soka korena rena	32
4.2.1. Biljni materijal, priprema ekstrakata i soka korena rena	32
4.2.2. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktima i soku korena rena primenom HPLC metode.....	33
4.3. <i>In vitro</i> ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena.....	33

4.3.1. Ćelijske linije za <i>in vitro</i> ispitivanja	33
4.3.2. Priprema uzoraka	34
4.3.3. Određivanje intenziteta ćelijskog rasta Sulforodamin B (SRB) testom	35
4.3.4. Određivanje mehanizma ćelijske smrti	36
4.4. <i>In vivo</i> ispitivanje antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena	37
4.4.1. Eksperimentalne životinje i tretmani	37
4.4.2. Postupak <i>in vivo</i> ispitivanja antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena	38
4.4.3. Postupak <i>in vivo</i> ispitivanja antioksidantne/prooksidantne i hepatoprotektivne/hepatotoksične aktivnosti ekstrakata i soka korena rena	39
4.4.4. Eksperimentalne metode primenjene u <i>in vivo</i> ispitivanjima	40
4.5. Statistička obrada podataka	44
5. Rezultati	45
5.1. Rezultati fitohemijskog ispitivanja ekstrakata i soka korena rena	45
5.1.1. Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih jedinjenja u ekstraktima i soku korena rena	45
5.2. <i>In vitro</i> antitumorska aktivnost ekstrakata i soka korena rena	48
5.2.1. Rezultati ispitivanja ćelijskog rasta (SRB test) nakon 48 h izlaganja ekstraktima i soku korena rena	48
5.2.2. Ne-tumor/tumor IC ₅₀ odnos (NT/T) ekstrakata i recipročni T/NT odnos (u jedinicama razblaženja) za delovanje soka korena rena	53
5.2.3. Rezultati ispitivanja mehanizma ćelijske smrti	54
5.3. <i>In vivo</i> antitumorska i hepatoprotektivna aktivnost ekstrakata i soka korena rena ..	55
5.3.1. <i>In vivo</i> antitumorska aktivnost ekstrakata i soka korena rena prema ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK)	55
5.3.1.1. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na zapreminu ascita Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) i broj i vijabilnost ćelija EAK	55
5.3.1.2. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na antioksidantni status ćelija Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK)	59
5.3.2. Ispitivanje hepatoprotektivne/hepatotoksične aktivnosti ekstrakata i soka korena rena kod <i>in vivo</i> oštećenja jetre indukovanog ugljen-tetrahloridom	69

5.3.2.1. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na telesnu masu i masu jetre životinja, sadržaj hepatične DNK i hidroksprolina u homogenatu jetre životinja, pre i nakon intoksikacije CCl ₄ -om	70
5.3.2.2. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na biohemijske parametre funkcije jetre, pre i nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom	75
5.3.2.3. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na parametre antioksidantne aktivnosti kod oksidativnog stresa indukovano ugljentetrahloridom.....	80
6. Diskusija.....	88
6.1. Polifenolni sastav ekstrakata i soka korena rena	88
6.2. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata i soka korena rena <i>in vitro</i>	90
6.3. Antitumorska i hepatoprotektivna aktivnost ekstrakata i soka korena rena <i>in vivo</i> ..	99
6.3.1. <i>In vivo</i> citotoksični i antioksidantni/prooksidantni efekti ekstrakata i soka korena rena prema ćelijama <i>Ehrlich</i> -ovog ascitnog karcinoma (EAK)	99
6.3.1.1. Citotoksični efekti ekstrakata i soka korena rena <i>in vivo</i>	99
6.3.1.2. Antioksidantni status ćelija <i>Ehrlich</i> -ovog ascitnog karcinoma (EAK) nakon primene ekstrakata i soka korena rena	101
6.3.2. Antioksidantna aktivnost i hepatoprotektivno delovanje ekstrakata i soka korena rena <i>in vivo</i>	108
6.3.2.1. Biohemijski parametri funkcije jetre nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom	110
6.3.2.2. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i soka korena rena ispitivana <i>in vivo</i> nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom.....	112
7. Zaključci.....	119
8. Literatura	121
9. Prilozi	143

1. Uvod

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena prema većem broju ćelijskih linija. Za *in vivo* ispitivanja antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti upotrebljeni su ekstrakti korena rena koji su u *in vitro* ispitivanjima pokazali nabolje efekte, kao i sok korena rena. Primenom tečno-tečne ekstrakcije izolovane su i razdvojene polarne od nepolarnih komponenti, a HPLC metodom su identifikovana i kvantifikovana polifenolna jedinjenja prisutna u ekstraktima i soku korena rena. Dobijeni rezultati su pokazali prisustvo različitih polifenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima i soku korena rena. Dihlormetanski ekstrakti korena rena imali su najveći sadržaj katehina, *p*-hidroksibenzoeve, siringinske i galne kiseline (pulpa, E1) i epikatehina (sok, E3). Proverena je hipoteza u kojoj ekstrakti i sok rena ispoljavaju antitumorsku aktivnost *in vitro*, a određen je takođe i mehanizam ćelijske smrti. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata i soka korena rena ispitana je *in vitro* na tumorskim ćelijskim linijama karcinoma grlića materice (HeLa), adenokarcinoma dojke (MCF7 i MDA-MB-231), adenokarcinoma debelog creva (HT-29), adenokarcinoma pluća (A549), adenokarcinoma prostate (PC-3), karcinoma kože (Hs 294T), karcinoma jetre (HepG2), kao i na ćelijskim linijama karcinoma jetre pacova (H-4-II-E) i zdravim fetalnim ćelijskim linijama pluća (MRC-5). Rezultati su pokazali snažnu i neselektivnu antiproliferativnu aktivnost hloroformskih i dihlormetanskih ekstrakata i soka korena rena, sa najsnažnijim delovanjem na ćelijske linije jetre, dojke i pluća. Sok i hloroformski ekstrakt soka rena (E4) pokazali su snažnu, nepoželjnu sposobnost indukcije nekroze. Proverena je hipoteza u kojoj ekstrakti i sok korena rena ispoljavaju hepatoprotektivnu aktivnost *in vitro* na ćelijskoj liniji karcinoma jetre (HepG2) i ćelijskoj liniji karcinoma jetre pacova (H-4-II-E). Hloroformski ekstrakt pulpe korena rena (E2) i hloroformski ekstrakt soka korena rena (E4) ispoljili su citotoksično delovanje prema ćelijskoj liniji karcinoma jetre (HepG2), dok su ekstrakti E1, E2, E3 i E4 delovali citotoksično na ćelijsku liniju karcinoma jetre pacova (H-4-II-E). Proverena je, takođe, i hipoteza u kojoj ekstrakti i sok korena rena ispoljavaju citotoksičnu aktivnost u ćelijama *Erlich*-ovog ascitnog karcinoma *in vivo*. Ekstrakti i sok korena rena su davani eksperimentalnim životinjama kao pretretman, tretman i posttretman. Ekstrakti i sok korena rena ispoljili su različite efekte na rast tumora. Najveće smanjenje broja ćelija tumora uočeno je u grupama životinja koje su kao posttretman dobijale hloroformski ekstrakt pulpe korena rena (E2) i dihlormetanski ekstrakt soka korena rena (E3). Navedeni ekstrakti uticali su na promene aktivnosti antioksidantnih enzima, što može biti posledica indukcije oksidativnog stresa u ćelijama EAK. Pretretman sa sokom korena (J9) sprečio

je rast tumora i uticao na promenu antioksidantnog statusa ćelija EAK. Proverena je hipoteza u kojoj ekstrakti i sok korena rena ispoljavaju antioksidantnu i hepatoprotektivnu aktivnost u *in vivo* oksidativnom stresu indukovanom CCl₄-om kod eksperimentalnih životinja. Hloroformski ekstrakt pulpe korena rena (E2), dihlormetanski ekstrakt soka korena rena (E3) i sok korena rena (J9) su pokazali da mogu da preveniraju oštećenja jetre smanjenjem oksidativnog stresa idukovanog hepatotoksičnim CCl₄-om.

2. Opšti deo

U ovom poglavlju biće predstavljeni: botanički opis rena, sekundarni meraboliti biljaka – glukozinolati (specifični za familiju *Brassicaceae*) i polifenolna jedinjenja, oksidativni stres i antioksidantna zaštita i proces apoptoze.

2.1. Ren, *Armoracia rusticana* (G. Gaertn, B. Mey & Scherb.)

Ren je snažna višegodišnja biljka koja se koristi više od 2.000 godina. Jedan od prvih naziva za ren po Dioskoridu je bio *Sinapi persicum* ili *Persicum sinapi* (1, 2). Tokom XVI i XVII veka koristili su se sledeći nazivi: *Raphanus vulgaris*, *Raphanus rusticanus* i *Raphanus sylvestris*. Carl Line (XVIII vek) je u upotrebu uveo naziv *Cochlearia armoracia* (2), dok je naučno ime rena – koje je i danas u upotrebi – izvedeno iz generičkog naziva *Armoracia*, bilo *Armoracia rusticana*, uvedeno od strane Gaertnera, Meyera i Scherbiusa (1800. godina) (3).

Marcus Porcius Cato u delu *De Agri Cultura* opisuje gajenje „rotkve”, koja se koristila kao hrana i lek kod romanskih naroda. Gajus Plinius Secundus preporučuje upotrebu sveže rendanog rena kao digestiva posle teškog obroka. Grčki filozof Dioskorid u delu *De Materia Medica* spominje biljku *Sinapis persicum* ili divlju rotkvu, čiji se tanak i dugačak koren koristio kao diuretik (1), a sveže rendan kao digestiv posle teškog jela (4, 5). U XII veku, u nemačkim knjigama o lekovitom bilju, preporučuje se ren pomešan sa toplim vinom ili vodom za tretman bolesti pluća, kao i za lečenje bolesti srca (6). Pominje se, takođe, da je ren dobar lek za temperaturu, bolove, zubobolju i za snižavanje visokog krvnog pritiska, a preporučuje se i za tretman digestivnih problema, infekciju urinarnog trakta, bronhitisa, i kao baktericid (6). U XVII veku najčešća upotreba rena kao leka je bila protiv skorbuta, jer je veoma bogat vitaminom C (6), kada počinje da se koristi i kao dodatak jelima (7). Jak ukus rena je danas veoma cenjen kao začim za meso i ribu, a koristi se i kao zamena za veoma skup vasabi (wasabi) (6).

2.1.1. Botanički opis

Rod *Armoracia* pripada familiji *Brassicaceae*, koju čini oko 340 rodova sa više od 3.350 vrsta (8). Rodu *Armoracia* pripadaju tri vrste: *A. Macrocarpa*, *A. Rusticana* i *A. Sisymbrioides*, koje imaju afinitet prema vlažnim staništima i razmnožavaju se rizomima. Nisu pronađena prirodna staništa rena, tako da se danas može naći samo u uzgoju (9).

Ren (Slika 2.1.) je višegodišnja izdržljiva biljka, koja raste u visinu do 120 cm. Listovi su dugi, ovalno izduženi, uži pri osnovi i rastu do dužine od 30 do 100 cm. (3, 9). Stablo rena je jako i iz njega direktno rastu listovi, talasastog oboda, pri dnu sakupljeni u rozetu. Niži listovi imaju kratke drške sa celim ili nazubljenim obodom, dok su viši listovi kopljastog oblika sa tupim vrhom, često nazubljenog oboda. Najviši listovi su linearni sa celim obodom (10). U prirodnom okruženju ren veoma obilato cveta do sredine avgusta (11). Shehata i saradnici su uočili da ren stvara brojne mirisne beložute cvetove, koji su smešteni na 5–7 cm dugim peteljka, skupljeni u racemozne cvasti. Cvetovi rena imaju po 4 čašična i krunična listića i 6 prašnika. Beli čašični listići su dugi oko 3 mm, sa belim membranoznim ivicama, a krunični listići su dugi 5–7 mm. Unutrašnji prašnici su dugi 2,5 mm, a spoljašnji 1,5 mm, žig je širok, okrugao i dvodelni. Plod rena čine parne i uspravne ljuške, dužine 4–6 mm (3). Ren ne stvara ili stvara vrlo malo semena (najviše 6 po kapsuli) (9). Seme je glatko, braon boje (3). Većina botaničara je uočila da ren veoma retko stvara živa semena i sve do ranog XX veka smatralo se da je biljka visoko sterilna (2). Ren se bespolno razmnožava sađenjem adventivnih pupoljaka korena, od roda prethodne godine (12). Korenski sistem rena (Slika 2.2.) čini dug, cilindrični glavni koren, koji se sužava i raste do dubine oko 60 cm (može i do 3–4 metra) i bočno u širinu do 1 metar sa nekoliko tankih bočnih korenova formiranih oko glavnog korena (3).



Slika 2.1. Ren



Slika 2.2. Ren – koren

Ukusa je ljutog i toplog i izaziva osećaj pečenja na jeziku. Bez mirisa je, ali prilikom struganja razvija poseban ljut miris koji izaziva jako suzenje (13).

Ren se uglavnom gaji u Severnoj Americi i Evropi, najviše u Nemačkoj, Mađarskoj i Poljskoj (3). U Srbiji, naročito u Vojvodini, odavno se sakupljao divlji ren, posebno ekotip zvani

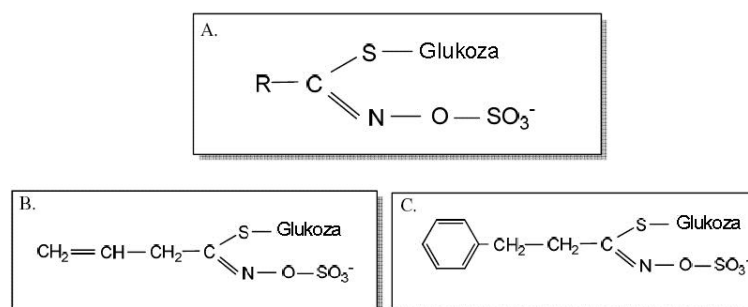
„Novosadski”, koji je bio veoma tražen i cenjen na Austrougarskom dvoru, zbog svog izuzetnog kvaliteta (14).

2.1.2. Fitohemijski sastav

Ispitivanja fitohemijskog sastava rena upućuju na prisustvo glukozinolata i polifenolnih jedinjenja u ekstraktima i soku korena rena.

2.1.2.1. Glukozinolati (GLS)

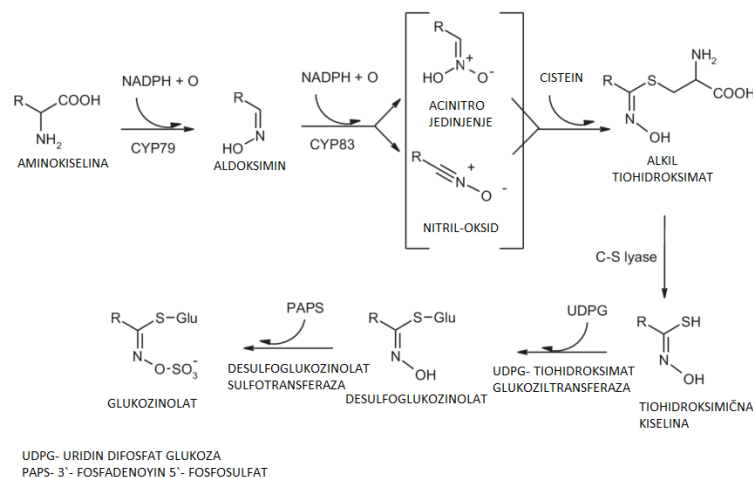
Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka i zastupljeni su u šesnaest botaničkih porodica reda *Capparales*, od kojih je za ishranu ljudi najznačajnija porodica *Brassicaceae* (15). Po hemijskoj strukturi, glukozinolati su β -tioglukozid-N-hidroksisulfati, kod kojih su glukoza i sulfatna grupa vezane na aglikon, koji se sintetiše iz amino-kiselina (Slika 2.3.) (16, 17, 18). Do sada je identifikovano oko dve stotine različitih glukozinolata, koji su klasifikovani u tri grupe, na osnovu razlika u strukturi amino kiselinskih prekursora: alifatični, aromatični i indolni glukozinolati (19).



Slika 2.3. Osnovna struktura glukozinolata (A), sinigrin (B) i glukonasturtiin (C). R, promenljivi bočni lanac.

Alifatični glukozinolati vode poreklo od alanina, leucina, izoleucina, valina i metionina, dok indolni i aromatični glukozinolati potiču od triptofana i fenilalanina ili tirozina. Biosinteza

glukozinolata se odvija u tri nezavisna stepena: produžavanje bočnog lanca, formiranje glukozinolatnog jezgra i sekundarne modifikacije (Slika 2.4.) (20, 21, 22).



Slika 2.4. Biosinteza glukozinolata

Produžavanje lanaca alifatičnih i aromatičnih amino-kiselina počinje dodavanjem metilenske grupe u njihove lance. Početna amino-kiselina podleže transaminaciji, dajući odgovarajuću α -keto kiselinu. Ona se zatim kondenzuje sa acetil-CoA, podleže izomerizaciji i oksidativnoj dekarboksilaciji, pri čemu nastaje α -keto kiselina, sa jednom metilenskom grupom više u odnosu na početnu amino-kiselinu (23).

Formiranje glukozinolatnog jezgra počinje konverzijom amino-kiseline u aldoksim, uz aktivnost citohroma P450 (CYP79 familija) (24). Aldoksim prelazi u aktiviranu komponentu, uz aktivnost enzima CYP83 familije (25), koja se zatim konjuguje sa glutathionom i nastaje S-alkil-tiohidroksimat (26). On uz aktivnost C-S lijaze daje tiohidroksimat (27), iz koga u reakcijama glikozilacije i sulfatacije nastaje osnovna glukozinolatna struktura.

Sekundarna modifikacija osnovne glukozinolatne strukture se dešava na bočnom lancu i uključuje reakcije oksidacije, hidroksilacije, metoksilacije, desaturacije, sulfatacije i glikozilacije (28).

Glukozinolati su biološki inertni glukozidi, ali u situaciji kada dođe do oštećenja biljnog tkiva tokom branja, mehaničkog oštećenja, žvakanja, ili pod uticajem štetoina, glukozinolati hidrolizuju pod dejstvom enzima mirozinaze do izotiocijanata, tiocijanata, nitrila, goitrina i epitionitrila, u zavisnosti od pH vrednosti i drugih faktora (29). Izotiocijanati su glavni produkti hidrolize mirozinazom koji daju specifičan opor ukus i miris biljkama familije *Brassicaceae* (16, 30). Glukozinolati uneti u organizam putem hrane brzo hidrolizuju pod dejstvom mirozinaze u

tankom crevu čoveka. Ukoliko kuvanjem dođe do deaktivacije mirozinaze u hrani, glukozinolati hidrolizuju u debelom crevu pod uticajem bakterijskih enzima (30).

GSL profil rena

Studije su pokazale da upotreba glukozinolata i njihovih razgradnih produkata izotiocijanata (ITC) u ishrani može da smanji rizik od nastanka malignih i drugih bolesti kod ljudi (31). Fitohemijski sastav rena je slabo poznat (32). Redovniković i saradnici su analizom listova rena RP-HPLC metodom (engl. *reversed phase high performance liquid chromatography*) pokazali da alifatični GSL (sinigrin) čini više od 80% ukupnih GSL (33), dok su glukonasturtiin, glukobrazicin, 4-metoksiglukobrazicin i 4-hidroksiglukobrazicin, nađeni u manjoj količini. Li i Kushad su takođe metodom RP-HPLC utvrdili da se u korenu i listovima rena koncentracija GSL kretala od 2 do 296 $\mu\text{mol/g}$ suve mase, pri čemu je sinigrin činio oko 83% ukupnih GSL, glukonasturtiin 11% i glukobrazicin 1%. (32). Agneta i saradnici su upotrebom LC-ESI-FTICR-MS (engl. *liquid chromatography (LC) with electrospray ionization (EIS) and fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICRM)*) metode, u soku rena identifikovali šesnaest različitih pikova, koji odgovaraju različitim glukozinolatima: glucoiberin, sinigrin, glukonapin, glukokohlearin, glukokonringianin, glukosativin, glucoibarin, 4-hidroksiglukobrazicin, 5-hidroksiglukobrazicin, glukobrazikanapin, glukotropeolin, glukobrazicin, glukonasturtiin, 4-metoksiglukobrazicin i glucoarabisirsutain, kao tipične GSL koji se spominju u literaturi (34). Povrće iz familije *Brassicaceae* sadrži 0,5–28 μmol alifatičnih/aromatičnih GSL/g suve mase i 0,7–8 μmol indolnih GSL/g suve mase (35). Smatra da su alilizotiocijanat (AITC) i 2-feniletil ITC (PEITC) najzastupljenije ITC komponente u korenu rena, te da je dnevni unos AITC manji od 1 mg/dan (približno 10 $\mu\text{g/kg}$ telesne mase).

Izotiocijanati

Najznačajniji produkti hidrolize GSL su izotiocijanati (R-N-C-S), koji sadrže –NCS grupu i bočni lanac –R (36). Zbog –NCS grupe, a posebno njenog C atoma, izotiocijanati imaju elektrofilna svojstva i veoma lako reaguju sa nukleofilnim molekulima, što može biti osnova njihovog farmakološkog delovanja. Na elektrofilnost ITC utiče i bočni lanac (–R), koji može uticati na sterne efekte elektrofilnog C atoma (37). Izotiocijanati su stabilniji u kiseloj sredini nego u neutralnoj ili baznoj sredini, zbog reakcije sa hidroksilnom grupom vode (38).

Kada se unesu u organizam, ITC se iz gastrointestinalnog trakta apsorbuju u krv pasivnom difuzijom (reverzibilno se vezuju za slobodne tiolske grupe proteina plazme). Izotiocijanati brzo

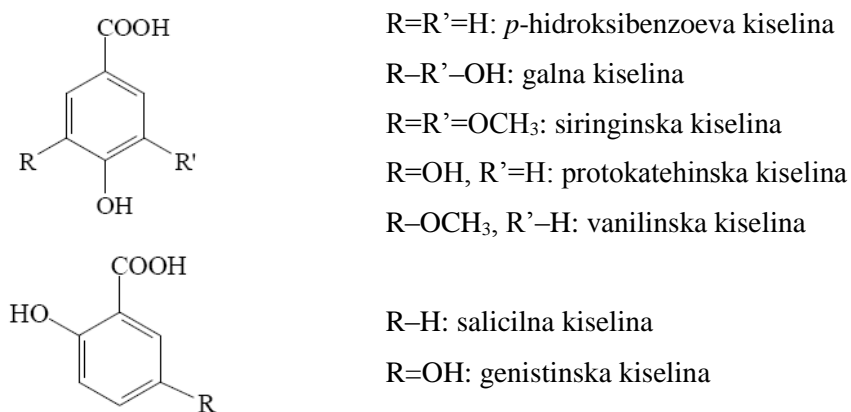
difunduju kroz ćelijsku membranu u ćeliju, gde se konjuguju sa intraćelijskim tiolima, kao što je glutation (GSH), putem –NCS grupe, uz aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST). Farmakološki efekat ITC zavisi od njihove intracelularne koncentracije (39), koja ne zavisi samo od količine difundovanog ITC u ćeliju, nego i od količine ITC konjugata koji izlaze iz ćelije (40). Izotiocijanati se primarno metabolišu merkapturinsko kiselinskim putem. Posle konjugacije sa GSH, enzimskom modifikacijom nastaju ITC metaboliti kao što su: ITC-N-acetilcistein, ITC-cistein, ITC-cisteinilglicin, koji se ekskretuju iz organizma putem urina (41).

2.1.2.2. Polifenoli

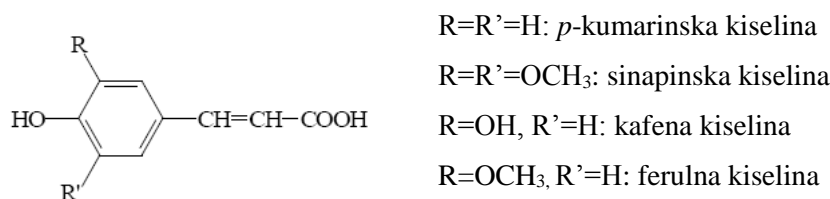
Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka i čine veliku grupu od preko 8.000 jedinjenja (42). Poseduju aromatični prsten na kome se nalazi jedan ili više hidroksilnih supstituenata. Mada je hidrofobna fenolna grupa zajednička svim polifenolima, glikozilacija sa šećerima kao što su glukoza, ramnoza, galaktoza i arabinoza ih čini vodorastvornim (43). Polifenoli se sintetišu poluacetatnim i fenilpropanoidnim putem sa šikimi kiselinom kao intermedijerom (44). Polifenolne komponente su podeljene u više od deset tipova u zavisnosti od njihove hemijske strukture.

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su jedinjenja koja sadrže najmanje jednu fenolnu i jednu karboksilnu grupu. Mogu biti derivati benzoeve (*p*-hidroksibenzoeva, galna, vanilinska, prokatehinska i siringinska) (Slika 2.5.) i cimetine (*p*-kumarinska, sinapinska, kafena i ferulna) kiseline (Slika 2.6.).



Slika 2.5. Hemijske formule derivata benzoeve kiseline



Slika 2.6. Hemijske formule derivate cimetne kiseline

One nastaju kondenzacijom šikimi kiseline sa fosfoenolpiruvatom, pri čemu nastaje horizminska kiselina. Daljim reakcijama dekarboksilacije, transaminacije i deaminacije nastaju cimetna i hidroksicimetna kiselina. Reakcijama hidroksilacije i metoksilacije nastaju derivati cimetne kiseline (45). Unos fenolnih kiselina u organizam putem hrane kreće se oko 210 mg/dan, pri čemu oko 90% čini kafena kiselina. Kafena kiselina je najznačajniji predstavnik hidroksibenzojevih kiselina i uglavnom je prisutna u formi hlorogenske kiseline, kao estar kafene i kininske kiseline (46). Brojne *in vitro* studije ukazuju na potencijalnu antikarcinogenu aktivnost polifenolskih kiselina. Kafena kiselina se može ponašati i kao hemosenzibilizator, koji povećava osetljivost maligno transformisanih ćelija prema hemoterapeutskom agensu (47). Mehanizam delovanja kafene kiseline može se ispoljiti kao inhibicija enzimske aktivnosti (glutation-S-transferaza, ksantin oksidaza (XOD)), antitumorska aktivnost, antiinflamacijska aktivnost, promena ćelijskog odgovora na slobodne radikale i dr. (48, 49). *In vivo* studije su pokazale da fenolne kiseline mogu posedovati i antikarcinogenu i karcinogenu aktivnost. Unos kafene kiseline tokom dužeg perioda je pokazao karcinogeni efekat, pri čemu je karcinogena/antikarcinogena aktivnost kafene kiseline dozno zavisna. Kafena kiselina može da ošteti DNK putem produkcije H_2O_2 (50).

Derivati galne kiseline – galati, deluju kao antioksidanti (neutrališu reaktivne kiseonične vrste (ROS)) i moćni hvatači peroksinitrila. Alkil-galati mogu da inhibiraju neke prooksidantne enzime uključene u produkciju ROS: XOD, lipoksigenazu-1, superoksid dismutazu (SOD) i dr. Galati takođe mogu selektivno da inhibiraju proliferaciju, nastanak metastaza i anti-apoptotske i angiogene procese u maligno transformisanim ćelijama (51, 52).

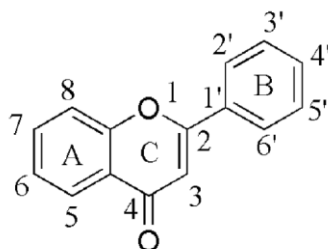
Ferulna kiselina je prirodni antioksidant i hemopreventivni agens, što je pokazano u brojnim *in vivo* studijama (53, 54). Ferulna kiselina davana u dozi od 100 mg/kg mužjacima pacova soja F344 povezana je sa značajnim povećanjem aktivnosti glutacion-S-transferaze i hinon reduktaze u jetri i mukozi kolona, ukazujući na indukciju detoksikujućih enzima i blokiranje karcinogena (55). Hlorogenska kiselina može da inhibira potencijalne mutagene i karcinogene reakcije *in vivo*.

Takođe, može da inhibira *in vitro* formiranje DNK adukta, 8-hidroksideoksigvanozina indukovano lipidnom peroksidacijom (56).

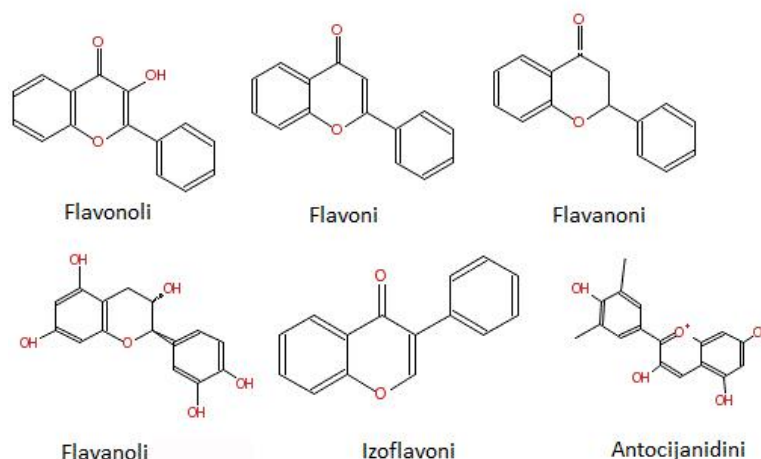
Antioksidantni potencijal fenolnih kiselina značajno varira u zavisnosti od broja hidroksilnih grupa u benzenovom prstenu, a proporcionalan je broju elektron-donorskih supstituenata, kao i stepenu stabilizacije (broju rezonantnih struktura) nastalih slobodno-radikalnih intermedijera. Antioksidantni kapacitet hidroksicimetnih kiselina, meren *in vivo*, pokazao je sledeći odnos: kafena>ferulna>*p*-kumarinska kiselina (57). Hidroksicimetne kiseline poseduju sposobnost hvatanja reaktivnih azotnih vrsta (58). Fenolne kiseline mogu uticati na apoptozu tumorskih ćelija, tako kafena kiselina indukuje apoptozu ćelija humanog karcinoma dojke MCF-7, aktivacijom proapoptotskih faktora, kao što su Fas, Bax protein i kaspaze (59). Polifenolne kiseline poseduju antimetastatski efekat, tako fenetil ester kafeine kiseline suprimira mobilizaciju kod ćelijske linije adenokarcinoma pluća A549 (60).

Flavonoidi

Flavonoidi su podklasa fenola, sa preko 4.000 različitih jedinjenja. Osnovu strukture flavonoida čini flavonsko jezgro, odnosno 2-fenilhromon (2-feni-benzo- γ -piron) (Slika 2.7.) sa 15 ugljenikovih atoma postavljenih u tri prstena (C6-C3-C6), koji su označeni kao A, B i C. Veliki broj flavonoida nastao je različitim kombinacijama multiplih hidroksilnih, metoksi ili O-glikozidnih supstituenata na flavonskom jezgru. Flavonoidi su podeljeni u šest grupa: flavoni, flavonoli (kvercetin, kemferol i miricetin), flavanoni, flavanoli (katehin, epikatehin, epigalokatehin, epikatehin galat, epigalokatehin galat), izoflavoni, antocijanidini, u zavisnosti od oksidacionog stanja centralnog (C) piranskog prstena, rasporeda supstituenata i položaja fenil grupe (Slika 2.8.) (61, 62).



Slika 2.7. Osnovna struktura flavonoida



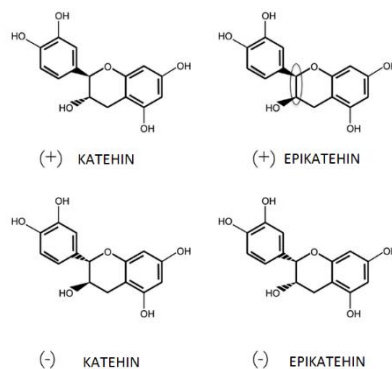
Slika 2.8. Hemijske strukture flavonoida

Kontrola ćelijskog ciklusa, ćelijskog rasta i ćelijske proliferacije od strane flavonola je važan antikarcinogeni mehanizam. Kvercetin primenjen u opsegu koncentracija 50 -200 μM inhibira ćelijsku vijabilnost, blokira ćelijski ciklus u S fazi i indukuje apoptozu kod HT-29 i drugih humanih ćelijskih linija karcinoma kolona (63). Kvercetin poseduje i karcinogeni efekat; tako davan u dozi od 2,5 g/kg hrane u ishrani ženki pacova soja AIC, tokom osam meseci, doveo je do nastanka karcinoma dojke i pokazao trend povećanja incidence tumora (64). Nasuprot ovim studijama, druge su pokazale da je kvercetin nekarcinogen u fazama inicijacije i promocije karcinoma mokraćovoda kod mužjaka pacova soja F344 (55).

Izoramnetin (3'-metoksi-3,4',5,7-tetrahidroksiflavon) je najčešći metabolit kvercetina, takođe poznat i kao 3'-*O*-metilkvercetin, koji ispoljava antiinflamacijsku i antiproliferativnu aktivnost prema brojnim karcinomima, kao što je karcinom želuca, kože i pluća (65, 66). Rezultati Kima i saradnika pokazali su da izoramnetin ispoljava antikarcinogeni efekat na ćelijama karcinoma kože, inhibirajući epidermalni faktor rasta (EGF) nastao malignom transformacijom ćelija (67). Brojne studije ukazuju da izoramnetin ispoljava hemopreventivni efekat prema tumorima, kardiovaskularnim bolestima, Alchajmerovoj bolesti, itd. Pomenute studije su potvrdile da je antioksidantni efekat najznačajniji mehanizam hemopreventivnog delovanja izoramnetina (68). Izoramnetin je *in vitro* pokazao citostatski efekat prema ćelijskim linijama ezofagealnog skvamoznog karcinoma, pri čemu je IC_{50} vrednost iznosila $40 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ izoramnetina tokom 48 sati (69).

Katehini

Strukturu katehina čine dva benzenova prstena i heterociklus 3-OH-dihidropiran sa dva hiralna centra na C2 i C3, tako da postoje 4 diastereoizomera: dva u trans konfiguraciji – katehin i epikatehin (Slika 2.9.), koji su u biljci konjugovani sa galnom kiselinom.



Slika 2.9. Struktura katehina i epikatehina

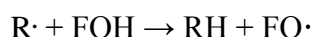
Katehini poseduju antimikrobnu aktivnost i inhibiraju karcinogenezu u koži, plućima, ezofagusu, želucu, jetri, tankom crevu, kolonu, mokraćnoj bešici i dojci (70). Rezultati *in vivo* studija sa katehinima slični su onima iz *in vitro* studija, kada su u pitanju prevencija ili kontrola maligne transformacije. Studija na pacovima soja F344 pokazala je da katehin davan u koncentraciji od 1% u hrani, smanjuje incidencu karcinoma tankog creva za 1%, ali povećava incidencu karcinoma jetre za 0,1% (71). Najčešći oblik katehina, epigalokatehin, poseduje antioksidantnu, imunomodulišuću i antimikrobnu aktivnost (72, 73, 74). Katehini interreaguju sa ROS.

Polifenolna jedinjenja ispoljavaju antiinflamacijske, antioksidantne, antimutagene, antikarcinogene efekte, a dovode i do promene aktivnosti enzima (75). Veliki interes za ispitivanje efekata polifenolnih jedinjenja bazira se na njihovoj antioksidantnoj i antikarcinogenoj aktivnosti. Veruje se da su polifenoli antikancerogeni agensi zbog toga što su antioksidanti, ali direktna povezanost još uvek nije dokazana. Antioksidantna aktivnost polifenola bi se mogla objasniti činjenicom da mogu da doniraju vodonikove atome i uklanjaju slobodne radikale, pri čemu nastaje fenoksi radikal, koji je rezonantno stabilizovan i manje reaktivan (76). Smatra se da polifenoli mogu delovati i kao indirektni antioksidanti putem inhibicije redoks osetljivih transkripcionih faktora kao što su NF- κ B i aktivator-1 protein (AP-1), inhibicijom prooksidantnih enzima kao što su azot oksid sintaza, lipoksigenaza, ciklooksigenaza i XOD, ili indukcijom antioksidantnih enzima faze II, kao što su glutation-S-transferaza i SOD (77). Hemopreventivna uloga polifenola,

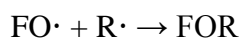
posebno epigalokatehin-galata (EGCG), ostvaruje se putem indukcije apoptoze. *In vitro* apoptotska aktivnost polifenola može biti upotrebljena kao skrining za procenu potencijalne antikarcinogene aktivnosti polifenola (78).

Mehanizmi antioksidantne aktivnosti fenolnih jedinjenja zasnivaju se na uklanjanju slobodnih radikala, suprimiranju formiranja slobodnih radikala inhibicijom nekih enzima ili heliranjem metala prisutnih u tragovima uključenih u nastanak slobodnih radikala (79).

Fenolna jedinjenja (FOH) deluju kao akceptori slobodnih radikala, a lančane reakcije oksidacije lipida i drugih molekula prekidaju doniranjem atoma vodonika radikalima (R·):



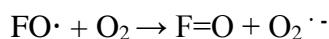
Intermedijerni fenoksi radikal (FO·) je relativno stabilan zbog rezonantne strukture, ali može reagovati sa drugim slobodnim radikalima i zaustaviti lančanu reakciju:



Fenolne kiseline derivati cimetine kiseline imaju bolju antioksidantnu aktivnost od fenolnih kiselina koje su derivati benzojeve kiseline, jer postoji direktna veza između strukture fenolnih kiselina i njihove antioksidantne sposobnosti (80).

Pored antioksidantne sposobnosti, pojedine fenolne komponente sa dihidroksilnom grupom mogu konjugovati prelazne metale i tako prevenirati formiranje slobodnih radikala. Joni metala Cu^{2+} i Fe^{2+} mogu da reaguju sa vodonik-peroksidom i Fentonovom reakcijom formiraju hidroksil radikal. Kateholi i galati mogu da inhibiraju formiranje kiseoničnih radikala indukovanih metalima putem koordinativnog vezivanja Fe^{2+} ili stvaranjem neaktivnog kompleksa sa jonima Cu^{2+} i Fe^{2+} (81).

Neki fenolni antioksidanti mogu pokrenuti proces autooksidacije i ponašati se kao prooksidanti (82) pod određenim uslovima. Umesto da prekine lančanu reakciju slobodnih radikala reagujući sa drugim radikalom, fenoksi radikal može da stupi u interakciju sa kiseonikom i da proizvede hinon (F=O) i superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$) (79).



Fenolni antioksidanti se mogu ponašati kao prooksidanti pod uslovima koji favorizuju njihovu autooksidaciju (visok pH sa visokim koncentracijama jona prelaznih metala u prisustvu molekula kiseonika). Mali fenoli, poput kvercetina i galne kiseline, mogu lako da oksiduju i ispolje prooksidantnu aktivnost (83).

2.2. Reaktivne kiseonične i azotne vrste

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) i reaktivne azotne vrste (RNS) mogu biti hemijske strukture koje su sposobne da nezavisno egzistiraju, mogu da poseduju jedan ili više nesparenih elektrona i mogu veoma lako da reaguju sa drugim molekulima, kao i sa kiseonikom. Uopšteno, ROS/RNS nastaju kao nusprodukti ćelijskog metabolizma i jonizujućeg zračenja, i to uglavnom sledeće četiri vrste: superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal (OH^{\cdot}), i singletni kiseonik (1O_2). Ostale biološki važne ROS su lipidni hidroperoksid (ROOH), lipidni peroksi radikal (ROO^{\cdot}) i lipidni alkoksi radikal (RO^{\cdot}), koji su povezani sa membranskim lipidima. Azot monoksid (NO), azot dioksid (NO_2), i peroksinitril (ONOO-) pripadaju grupi reaktivnih azotnih jedinjenja. Tiol radikal (RS^{\cdot}) sa nesparenim elektronom na atomu sumpora po svojim svojstvima se može uvrstiti u ove grupe jedinjenja (84, 85). Ove reaktivne vrste regulišu mnoge puteve prenošenja signala, direktno ili modifikacijom strukture proteina, transkripcionih faktora i gena, menjajući njihovu funkciju. ROS su uključene u signalizaciju ćelijskog rasta i diferencijacije, regulaciju aktivnosti enzima, medijatori su inflamacije putem stimulacije produkcije citokina i eliminacije patogena i stranih čestica. Najvažnije reaktivne vrste u većini bolesti su derivati kiseonika, naročito superoksid anjon radikal i hidroksil radikal, koji mogu nastati endogenim ili egzogenim putem. Oni su veoma reaktivni i mogu dovesti do oštećenja ćelija i narušavanja homeostaze, delujući na DNK, proteine, ugljene hidrate i lipide (86).

2.2.1. Produkcija ROS i RNS

ROS i RNS nastaju u toku osnovnih metaboličkih procesa u organizmu ili pod dejstvom spoljnih izvora (87). ROS i RNS mogu nastati u ćelijskoj membrani (lipoksigenaza, ciklooksigenaza i NADPH oksidaza), mitohondrijama (elektron transportni lanac, koenzim Q, NADPH dehidrogenaza), mikrozomima (elektron transportni lanac, citohrom P450, citohrom b_5), peroksizomima (oksidaze, flavoproteini) ili aktivnošću i/ili modifikacijom nekih drugih ćelijskih komponenti (hemoglobin, ksantin oksidaza, flavin) (88). Mitohondrije predstavljaju najvažniji intracelularni izvor ROS. Od ukupnog kiseonika koji mitohondrije koriste, 0,2–2% se usmerava na formiranje ROS, uglavnom na nivou kompleksa I i III respiratornog lanca (89).

Spoljni izvori nastanka ROS mogu biti: zračenje (UV, X-zraci, mikrotalasi) i zagađenje (vazduh – usled prisustva azbesta, hlora, toluena; voda – prisustvo hloroforma, sagorevanje organskih materija, prisustvo rastvarača). Ishrana takođe može biti uzrok nastanka ROS zbog prisustva aditiva, kao i alkohol, pesticidi, unos lekova i toksina.

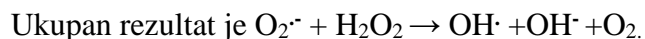
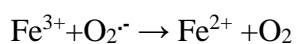
Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) nastaje dodavanjem jednog elektrona kiseoniku, i to na više načina: u prisustvu prelaznih metala kao što su gvožđe i bakar, u elektron transportnom sistemu na unutrašnjoj membrani mitohondrija (90), od strane ćelija vaskularnog endotela, kao i od strane fagocitnih ćelija.

Vodonik-peroksid (H_2O_2) sam po sebi nije slobodan radikal pošto nema nesparenih elektrona, ali je prekursor slobodnih radikala kao što je peroksi radikal, hidoksil radikal i superoksid anjon radikal. Vodonik-peroksid nastaje auto-oksidacijom redoks ksenobiotika, kao i nekompletnom oksidacijom u elektron transportnom sistemu putem dismutacije superoksid anjon radikala superoksid dismutazom (91). H_2O_2 može slobodno da prolazi kroz ćelijske membrane i ima sposobnost da oksidiše intracelularne molekule. U prisustvu vodonik-peroksida, mijeloperoksidaze stvaraju hipohlornu kiselinu i singletni kiseonik, koji igraju važnu ulogu u eliminaciji bakterija od strane fagocita (92).

Hidrosil radikal (OH^{\cdot}) je verovatno finalni medijator mnogih tkivnih oštećenja nastalih pod dejstvom ROS (93). Hidroksil radikal nastaje na mnogo načina, ali najznačajniji mehanizam njegovog nastanka *in vivo* je razgradnja superoksid anjon radikala i vodonik-peroksida katalizovana prelaznim metalima, kao što su Fe^{2+} i Cu^{2+} (94). Reakciju je prvi opisao Fenton:



Pošto je superoksid anjon radikal takođe prisutan, ukupan rezultat dat je Haber-Vajsovom reakcijom:



Azot monoksid (NO) je mali molekul sa nesparenim elektronom, koji u tkivima nastaje iz L-arginina pod dejstvom azot-oksida sintetaze (NOS) (95). On je važan biološki signalni molekul u mnogim fiziološkim procesima, kao što su neurotransmisija, regulacija krvnog pritiska, mehanizmi odbrane i imunske regulacije. Pošto se rastvara i u vodenim i u lipidnim medijumima, lako difunduje kroz citoplazmu i ćelijske membrane, što mu omogućava pristup unutrašnjosti makromolekula. Azot-monoksid reaguje sa superoksid anjon radikalom, pri čemu se stvara veoma reaktivan produkt – peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$). Smatra se da je $ONOO^{\cdot-}$ odgovoran za oksidativni stres izazvan azot-monoksidom (96). Mitohondrije su verovatno najvažniji izvor $ONOO^{\cdot-}$ u ćeliji, zbog

nastanka superoksid anjon radikala u procesu respiracije. Najvažniju ulogu u kontroli formiranja ONOO^- u mitohondrijama igra mangan zavisna superoksid dismutaza SOD (Mn-SOD). Ekstracelularna SOD snižava koncentraciju O_2^- , a time i ONOO^- u vanćelijskom prostoru, dok se koncentracija NO povećava (97). Ako je prisutan u malim koncentracijama, azot-monoksid može da reaguje sa intermedijerima lipidne peroksidacije (alkil, alkoksi i peroksi radikali) i tako zaustavi propagaciju ove reakcije.

2.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres se javlja kod aerobnih organizama. On nastaje pod dejstvom egzogenih i endogenih faktora koji dovode do stvaranja previše ROS/RNS. Medijator je oštećenja ćelijskih struktura, kao što su membranski lipidi, proteini i DNK. ROS/RNS su produkti koji imaju dvojaku ulogu. Ako su prisutni u malim/umerenim količinama, oni su signalni molekuli mnogih fizioloških procesa, kao što su odbrana od infektivnih agenasa, održavanje vaskularnog tonusa, kontrola ventilacije i produkcije eritropoetina i signalna transdukcija putem membranskih receptora (98). Mnogi odgovori posredovani ROS štite ćeliju od oksidativnog stresa i održavaju „redoks homeostazu“. Povećani nivo oksidativnog stresa nastaje kada je antioksidantna odbrana nedovoljna da potpuno inaktivira ROS sintetisane u visokim koncentracijama, kada je antioksidantna odbrana smanjena ili kada su prisutna oba procesa zajedno (99).

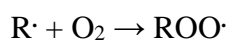
Pošto su ROS/RNS male molekulske mase mogu penetrirati kroz membranu i direktno promeniti katalitički domen transmembranskih receptora ili citosolne enzime prenosiocce signala, dovodeći tako do abnormalne aktivacije transkripcionih faktora. Inicijacijom ekspresije gena i sintezom odgovarajućih funkcionalnih i strukturnih proteina, ROS/RNS utiču na adaptaciju i preživljavanje ćelija ili – u zavisnosti od intenziteta i dužine trajanja signal – na aktivaciju procesa odgovornog za ćelijsku smrt (100).

Oksidativna oštećenja lipida

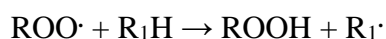
Lipidna peroksidacija predstavlja oksidativno oštećenje lipida kako kod ljudi tako i u biljnom i životinjskom svetu. Usled visoke zastupljenosti lipida, membrane ćelija i subćelijskih organela predstavljaju mesto na kojem otpočinje oksidativno oštećenje lipida, tj. lipidna peroksidacija. Lipidno oštećenje membrane ima za posledicu smanjenje fluidnosti, povećanu propustljivost za jednovalentne ili dvovalentne jone, inaktivaciju membranskih enzima, gubitak integriteta membrane, dok ruptura lizozomskih membrana oslobađa hidrolitičke enzime, što sveukupno dovodi do vitalnih ćelijskih poremećaja i na kraju do smrti ćelije (101).

Masne kiseline predstavljaju metu napada slobodnih radikala. Tri različita mehanizma mogu da indukuju lipidnu peroksidaciju – autooksidacija, fotooksidacija i enzimaska aktivnost. Nezavisno od načina indukcije, lipidna peroksidacija se odvija kroz sledeće tri faze: inicijalnu, propagacionu i terminalnu fazu.

Proces inicijacije podrazumeva pokretanje lančanih reakcija, oduzimanje protona uz istovremeni transfer elektrona sa metilenske grupe polinezasićenih masnih kiselina, delovanjem HO·, kada se generiše lipidni radikal (R·). Propagaciona faza podrazumeva reakciju lipidnog radikala (R·) sa molekulskim kiseonikom O₂, pri čemu nastaje peroksil radikal (ROO·), najvažniji radikal propagacione faze lipidne peroksidacije.



ROO· reaguje sa okolnim lipidima (R₁H), oduzima im H⁺, pri čemu nastaje lipidni hidroperoksid (ROOH) i novi lipidni radikal R₁·. Na ovaj način peroksi radikal doprinosi širenju procesa lipidne peroksidacije (5).



Peroksi radikal dalje nastavlja lanac reakcija, jedineći se sa drugim lipidima, ili specifično reaguje sa drugim biomolekulima. Tokom procesa lipidne peroksidacije, iz jedne inicijacije slobodnim radikalom može rezultirati od četiri do dvadeset propagacionih puteva, što ukazuje na veliku progresiju stvaranja slobodnih radikala i širenja procesa oksidativnog oštećenja lipida (102).

Terminalna faza podrazumeva reakcije ROOH i reakcije intramolekularne reorganizacije ROO· (1,3-ciklizaciju), uz istovremeni transfer elektrona, kada nastaju endoperoksidi. Sekundarni produkti lipidne peroksidacije, ROOH i endoperoksidi, podležu dekompoziciji do monohidroperoksida, tj. dolazi do spontane fragmentacije, kada se oslobađaju niskomolekularni aldehidi poput malondialdehida (MDA). Malondialdehid, terminalni produkt oksidativnog oštećenja polinezasićenih masnih kiselina, preko *Shiffovih* baza se unakrsno vezuje za proteine i fosfolipide membrane, čime se produbljuje oksidativno oštećenje biomolekula (103, 104). Lipidna peroksidacija stvara mnogo relativno stabilnih krajnjih produkata, uglavnom α, β-nezasićenih reaktivnih aldehida, kao što su malonildialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal, 2-propenal i izoprostrani. Iako su stabilniji od slobodnih radikala, mogu da deluju i kao „sekundarni citotoksični glasnici” primarnih reakcija (85).

Oksidativna oštećenja proteina

Oksidativna modifikacija proteina, odnosno aminokiselina od strane ROS podrazumeva promenu primarne strukture usled reakcija na bočnim lancima aminokiselinskih ostataka, njihovog otcepljenja, konverziju proteina u proteine veće molekulske mase (unakrsno protein-protein vezivanje), kao i fragmentaciju polipeptidnih lanaca (105). Oksidativna modifikacija proteina može biti indukovana ROS/RNS. Na aminokiselinama se pod dejstvom slobodnih radikala odigravaju sledeći tipovi oksidativne modifikacije proteina: oksidacija sumpora, stvaranje proteinskih karbonila, tirozin unakrsno vezivanje, triptofanil modifikacija, stvaranje hidro(pero)ksi derivata alifatičnih aminokiselina, interkonverzija aminokiselina, aminokiselinski oksidisani adukti, unakrsno vezivanje, agregacija, kidanje peptidnih veza. Sekvence poput histidin-cistein-histidin u proteinima predstavljaju ciljno mesto za delovanje slobodnih radikala, zbog toga što poseduju snažna nukleofilna svojstva te su donori elektrona, a time i ciljna mesta delovanja slobodnih radikala. Biohemijske posledice oksidativne modifikacije proteina odnose se na gubitak ili povećanje enzimske aktivnosti, aktivaciju proteaza, proteinsku agregaciju, modifikovanu gensku transkripciju (106).

Oksidativna oštećenja DNK

Oksidativna modifikacija DNK dovodi do promene strukture DNK što predstavlja osnovu genetskog oštećenja. Oksidativno oštećenje praktično menja strukturu dvospiralnog lanca. Može doći do prekidanja, interakcije unutar DNK azotnih baza jedne spirale ili između dve spirale, izmene ili otcepljenja baza, modifikacija baze ili oksidativne modifikacije deoksiriboze. Visoka reaktivnost hidroksil radikala HO \cdot deluje na S-S veze, pri čemu dolazi do fragmentacije DNK. Hidroksil radikal se odlikuje visokom elektrofilnošću, tako da može apstrahovati H $^+$ sa šećera DNK i dodati ga bazi DNK, dovodeći na taj način do cepanja jednostrukih veza i oksidacije nukleobaza (107). Adicija HO \cdot na DNK baze, kao što je guanine, dovodi do nastanka 8-hidroksideoksigvanozina, koji se smatra indikatorom oksidativnog oštećenja nukleobaza. 8-hidroksideoksigvanozin se smatra najmutagenijim produktom oksidativnih oštećenja na DNK (108).

2.4. Mehanizmi antioksidantne zaštite i antioksidantni sistemi

U cilju sprečavanja oksidativnog stresa, ćelija mora da odgovori na prekomerno stvaranje ROS aktivacijom antioksidantnog odbrambenog sistema. Smatra se da je nekoliko mehanizama uključeno u aktivaciju antioksidantnog sistema.

1. Aktivacija Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) transkripcionog faktora putem ROS

Redoks regulacija transkripcionih faktora je značajna u određivanju genske ekspresije i ćelijskog odgovora na oksidativni stres. Aktivacija transkripcionog faktora Nrf2, koji menja nivo antioksidantnih enzima i detoksikujućih enzima faze II, može biti jedan od načina za smanjivanje oksidativnog stresa. Antioksidantni enzimi učestvuju u neutralizaciji slobodnih radikala, dok detoksikujući enzimi faze II uklanjaju potencijalne karcinogene konverzijom u neaktivne metabolite, koji se eliminišu iz organizma (109). Potvrđeno je da Keap-1/Nrf2/ARE redoks osetljivi signalni put ima centralnu ulogu u ćelijskom mehanizmu zaštite od oksidativnog stresa (110).

2. Aktivacija jedarnog transkripcionog faktora κ B (NF- κ B) (engl. *nuclear factor kappa B*) putem ROS

Aktivacija NF- κ B je stimulisana prooksidantnim statusom ćelije, posebno povećanim prisustvom vodonik-peroksida, a blokirana je tiolskim jedinjenjima, kao što je N-acetil-L-cisteini, i antioksidantima. Niska koncentracija tiolskih molekula u ćeliji, kao što je GSH, ima ulogu u pozitivnoj regulaciji aktivnosti NF- κ B, koji deluje uglavnom na gene enzima uključenih u antioksidantni odgovor, posebno na SOD (111).

3. Aktivacija mikroribonukleinske kiseline (miRNK) putem ROS

Postoje indikacije da je ekspresija miRNK osetljiva na prisustvo intraćelijskog vodonik-peroksida. Disfunkcija mitohondrija kao posledica povećanja koncentracije ROS, akumulacija oštećenja mitohondrijalne DNK, progresivne alteracije respiratornog lanca i alteracije ekspresije miRNK su prisutne u mnogim bolestima (112).

Antioksidanti

Antioksidanti su supstance, prisutne u ćeliji u maloj koncentraciji, koje mogu da interreaguju sa ROS/RNS, prekidaju lančane reakcije i time značajno redukuju ili preveniraju oksidativna oštećenja. Humani organizam je razvio složene sisteme antioksidantne – zaštite enzimske i neenzimske, koji funkcionišu sinergetski u cilju zaštite ćelije i sistema organa od oštećenja izazvanih ROS/RNS. Antioksidanti mogu biti endogeni ili egzogeni (sastavni deo dijeta ili dijetetskih suplemenata). Najefikasniji enzimski antioksidanti su glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza. Ne-enzimski antioksidanti mogu biti hidrosolubilni, poput vitamina C, tiolski

antioksidanti (glutation, tioredoksin i lipoična kiselina) i mokraćna kiselina, i liposolubilni, kao što su vitamin E, karotenoidi, ubihinon (85).

Antioksidanti svoju antioksidantnu aktivnost ostvaruju na različite načine:

- enzimskim sistemima koji neutrališu ROS;
- vezivanjem/inaktivacijom metalnih jona čime se sprečava nastanak ROS u *Haber Weiss*-ovoj reakciji;
- molekulima hvatačima (engl. *scavengers*);
- prekidanjem lančanih reakcija (vitamini C i E, mokraćna kiselina, glutation, flavonoidi);
- gašenjem ROS hemijskim “hvatanjem” u cilju apsorbovanja energije (karotenoidi, antocijani) (113).

Antioksidanti mogu biti direktni i indirektni. Direktni antioksidanti su kratko živeće redukujuće vrste koje se troše u toku oksidacije i moraju da se regenerišu. Indirektni antioksidanti svoju aktivnost ispoljavaju putem regulacije aktivnosti različitih citoprotektivnih jedinjenja i proteina, kao što su NAD(P)H, NAD(P)H: hinonoksidoreduktaza1 (NQOR1), superoksid dismutaza (SOD), glutation-S-transferaza (GST), glutation peroksidaza (GSHPx), hem oksigenaza-1 (HO-1), glutamat-cistein ligaza (GCL), katalaza (CAT) i tioredoksin (Tix). Ovi citoprotektivni proteini se još nazivaju i “ultimativnim antioksidantima”, jer imaju relativno dug poluživot, ne troše se tokom antioksidantne aktivnosti, mogu da katalizuju različite reakcije detoksikacije i učestvuju u regeneraciji nekih antioksidanata (114).

Enzimski antioksidanti

Glutation peroksidaza GSHPx

Glutation peroksidaza (GSHPx, EC 1.11.1.19) katalizuje redukciju vodonik-peroksida ili organskih hidroperoksida, koristeći redukovani glutation kao donor vodonika H_2O_2 (ROOH) + 2GSH \rightarrow GSSG + (ROH) H_2O . GSSG se zatim redukuje nazad do glutaciona pomoću glutation reduktaze uz utrošak NADPH: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$. Glutation peroksidaza je prisutna u citosolu ćelije, kao i u mitohondrijima, a kod nekih ćelija i u peroksizomima. Veći deo glutaciona u ćeliji prisutan je u redukovanom obliku kao GSH, a manji u oksidovanom obliku kao GSSG. Glutation peroksidaza je tetramerni enzim, a svaka subjedinica u aktivnom centru sadrži po jedan jon Se u obliku selenocisteina, čija je količina istovremeno faktor regulacije aktivnosti enzima. Glutation peroksidaza koja sadrži selen (GSHPx) redukuje sve organske lipidne perokside, uz prisustvo glutaciona kao donora vodonika (115).

Katalaza (CAT)

Katalaza (EC 1.11.1.6) je prvi identifikovani antioksidantni enzim koji katalizuje konverziju vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Katalaza sadrži četiri identične subjedinice, od kojih svaka sadrži feri-protoporfirinski prsten koji ulazi u sastav aktivnog centra. Pošto ima veoma visoku konstantu brzine reakcije ($\sim 10^7$ M₂/sec), praktično ju je nemoguće zasiti *in vivo*. Jedan molekul katalaze može da konvertuje oko šest miliona molekula vodonik-peroksida do vode u svakom minutu. Katalaza je prisutna u peroksizomima aerobnih ćelija. Najveću aktivnost ispoljava u jetri i eritrocitima, dok se u mozgu, srcu i skeletnim mišićima beleži mala aktivnost (116).

Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (EC 1.15.1.1) jedan je od najmoćnijih intracelularnih enzimskih antioksidanata, koji katalizuju dismutaciju superoksid anjon radikala do vodonik-peroksida i molekuskog kiseonika $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Vodonik-peroksid biva uklonjen od strane katalaze ili glutation peroksidaze. Kod čoveka su prisutne tri izoforme SOD:

– citosolna (bakar, cink zavisna SOD) Cu, Zn-SOD je homodimer i sastoji se od dve subjedinice, a svaka od njih ima aktivni centar, dinuklearni metalni klaster u kome se nalaze jedan jon bakra i jedan jon cinka. Katalitička aktivnost enzima vezana je za Cu^{2+} , dok Zn^{2+} stabilizuje konformaciju enzima;

– mitohondrijalna (mangan zavisna SOD) Mn-SOD je homotetramer koji u svom aktivnom centru sadrži Mn i lokalizovan je u matriksu mitohondrija;

– ekstracelularna SOD (EC-SOD) je tetramerni sekretorni glikoprotein sa po jednim jonom bakra i cinka, prisutna u međućelijskom prostoru i ekstracelularnoj tečnosti (117).

Ne-enzimski antioksidanti

Glutation (GSH)

Glutation je najzastupljeniji slobodni tiol kod eukariotskih ćelija, koji pod optimalnim uslovima održava intraćelijski redoks sistem, neophodan za pravilno funkcionisanje ćelije. Redukovani GSH je biološki aktivna forma, koja se oksiduje do glutation disulfida (GSSG) tokom oksidativnog stresa. Antioksidantna aktivnost tiolnih jedinjenja zasniva se na svojstvu atoma

sumpora da gubi jedan elektron. U oksidativnom stresu se akumulira oksidovani oblik glutationa (GSSG), te je odnos GSH/GSSG dobra mera intenziteta ovog procesa u organizmu (118). Intracelularni GSH se nalazi u citosolu, mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i jedru, i najznačajniji je solubilni antioksidant. U oksidativnom stresu glutation deluje kao kofaktor mnogih detoksikujućih enzima, učestvuje u aminokiselinskom transportu kroz membranu, direktno vezuje hidroksil radikal i singletni kiseonik i regeneriše vitamine C i E, vraćajući ih u njihovu aktivnu formu. Zaključeno je da smanjenje koncentracije GSH može biti povezano sa starenjem i patogenezom mnogih bolesti (119). Apoptotska signalizacija posredovana ROS povezana je sa smanjenjem ćelijskog nivoa GSH i gubitkom ćelijskog redoks balansa. Sniženje ćelijskog GSH nastaje zbog oksidacije GSH izazvane ROS ili izlaskom GSH iz ćelije. Oksidacija GSH je najvažniji doprinos apoptozi koja je indukovana oksidantima (120).

Tioredoksin

Tioredoksin (TRX) sistem je protein koji ima sposobnost da redukuje ROS, uključujući i vodonik-peroksid. U redukovanom obliku sadrži dve susedne – SH grupe koje se oksiduju do disulfidne grupe, dajući oksidovanu formu TRX. Nivo tioredoksina je značajno niži od GSH, ali TRX i GSH imaju komplementarnu funkciju u regulaciji aktivnosti transkripcionih faktora (121).

N-acetil-L-cistein (NAC)

N-acetil-L-cistein (NAC) je tiolski antioksidant koji smanjuje oksidativni stres i može delovati citoprotektivno. Antioksidantnu aktivnost ispoljava direktno preko svoje tiolne grupe i uklanjanja ROS. Sa druge strane, indirektno, NALC predstavlja izvor cisteina za sintezu glutationa u ćelijama koji direktno deluje antioksidantno. NALC može biti i supstrat za sintezu antioksidantnih enzima (122). NALC smanjuje oštećenja jetre nastala pod dejstvom toksične doze paracetamola kod čoveka, smanjuje oštećenja jetre i štiti jetreno i plazmatsko sniženje GSH kod miševa. Njegova antioksidantna aktivnost se ogleda u sposobnosti da stimuliše sintezu GSH, održava intracelularni nivo GSH i uklanja ROS (123).

2.5. Maligna transformacija ćelija

Maligna transformacija normalnih ćelija u tumorske ćelije uključuje poremećaje ključnih ćelijskih procesa: tokom regulacije ćelijskog ciklusa, apoptoze i starenja (124). Ćelije tumora u toku maligne transformacije stiču određene karakteristike: imaju karakteristično izmenjenu morfologiju, ne odgovaraju na regulatorne signale odgovorne za normalan rast, stiču različite antigene u odnosu na normalne ćelije istog tkiva i autonomnost, invazivno rastu preko granica

tkiva kome pripadaju, metastaziraju u okolinu i udaljene organe i imaju monoklonalno poreklo (125).

Karcinogeni su oni faktori koji mogu da iniciraju malignu transformaciju ćelije u procesu nastanka maligne neoplazije (karcinogeneza). Karcinogeneza predstavlja proces koji uključuje veći broj molekularnih i ćelijskih promena, dovodi do transformacije normalne u maligno transformisanu ćeliju, a obuhvata najmanje tri stadijuma – inicijaciju, promociju i progresiju (126).

Tokom inicijacije u normalnoj ćeliji dolazi do ireverzibilnog oštećenja molekula DNK, dok pri replikaciji DNK dolazi do fiksiranja nastale mutacije u iniciranoj ćeliji (127). Do inicijacije može doći tokom interakcije ćelije sa fizičkim, hemijskim i biološkim karcinogenima koji poseduju sposobnost oštećenja i izazivanja mutacija u DNK (genotoksični agensi). Pored toga, utvrđeno je da tokom ćelijske proliferacije mutacije mogu nastati i spontano – usled pogrešne reparacije oštećene DNK, što predstavlja spontanu inicijaciju mutacije ćelije (126). Promocija je stadijum selektivne klonske ekspanzije inicirane ćelije stimulacijom ćelijske deobe i/ili inhibicijom ćelijske apoptoze u ćelijskoj populaciji. Ova faza je dozno zavisna i reverzibilna u slučaju prestanka dejstva promotora (128). Treći stadijum jeste progresija, koja obuhvata dodatna oštećenja i mutacije genoma i, za razliku od stadijuma promocije, ovaj stadijum je ireverzibilan (126).

Karcinogeneza može biti inicirana delovanjem hemijskih, fizičkih i bioloških karcinogena. Može takođe nastati i usled naslednih predispozicija, hronične inflamacije i replikativne nestabilnosti genoma (129). Karcinogeni se prema mehanizmu dejstva mogu podeliti na genotoksične i negenotoksične (epigenetske). Genotoksični karcinogeni se odlikuju direktnom interakcijom (karcinogena ili njegovog metabolite) sa molekulom DNK, što dovodi do njegovog oštećenja i mutacija. Negenotoksični (epigenetski) karcinogeni ne deluju direktno na molekul DNK, već ispoljavaju citotoksični efekat, utičući na procese uslovljene interakcijom sa receptorima. Karcinogen se veže i aktivira receptore. Na taj način karcinogen deluje u fazi promocije stimulišući ćelijsku proliferaciju i ostvaruju mitogene efekte (127).

Za proces karcinogeneze odgovorni su onkogeni, tumor supresorski geni i geni koji održavaju stabilnost genoma. Geni koji utiču na autonomnost ćelijskog rasta su onkogeni, a normalni geni koji pravilno regulišu proces ćelijskog rasta se zovu proto-onkogeni (koji čine normalni deo genoma). Proto-onkogeni se mogu konvertovati u onkogene – tačkastom mutacijom, fuzijom gena i amplifikacijom gena kada dolazi do prekomerne produkcije faktora rasta,

neprekidne stimulacije ćelija replikativnim signalima, nekontrolisane stimulacije intermedijernih puteva, kao i do povećanja ćelijskog rasta zbog visoke aktivnosti transkripcionih faktora (130).

Tumor supresorski geni imaju ulogu u inhibiciji ćelijske proliferacije. Oni su negativni regulatori ćelijskog ciklusa u procesu progresije, negativni regulatori signalnih mehanizama (puteva) rasta, kontrolni protein (engl. *check-point*) koji zaustavljaju ćelijski ciklus (ukoliko je DNK oštećena) i proteini promotor, stimulatori apoptoze (131). Tumor supresorski geni na osnovu svoje uloge mogu biti geni čuvari i geni vratari.

Geni čuvari su odgovorni za očuvanje integriteta genoma, putem reparacije DNK, dok njihova mutacija negativno utiče na sposobnost reparacije oštećenja drugih gena, kao što su proto-onkogeni, geni koji regulišu apoptozu, kao i samih tumor supresornih gena. To može biti predispozicija za malignu transformaciju ćelija (132). Najčešće mutirani geni iz ove familije jesu BRCA1 i BRCA2 geni (124).

Geni vratari, supresorni geni, uključeni su u kontrolu ćelijske proliferacije. Protein p53 se smatra "čuvarem genoma", jer ima najznačajniju ulogu u održanju integriteta genetskog koda (133). U zavisnosti od veličine oštećenja DNK molekula, p53 može da stopira ćelijski ciklus aktiviranjem ćelijskog mirovanja i apoptoze (134).

Karcinogeni mogu da indukuju oksidativni stres povećanjem stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (iz endogenih ili egzogenih izvora), smanjenjem dejstva antioksidanata ili dovode do grešaka u mehanizmima popravke oštećene DNK. Oksidativni stres nastao usled produkcije ROS: a) endogeno u mitohondrijama, peroksisomima i inflamatornim ćelijama (135), kao i b) egzogeno (jonizujuće i ultravioletno zračenje, agensi iz okoline, zračenje, lekovi i industrijske hemikalije) može prouzrokovati oštećenje DNK, proteina i lipida i dovesti do promena u vidu nestabilnosti hromozoma i genetskih mutacija (127).

2.5.1. Reaktivne kiseonične vrste i maligna transformacija ćelija

Maligno transformisane ćelije odlikuje poremećen ćelijski redoks status i povećani nastanak ROS. One sadrže brojne genetske izmene i visok oksidativni stres (136). Pored toga, u malignim ćelijama uočen je smanjen klirens glukoze, ali i visoka glikolitička aktivnost i produkcija laktata što ukazuje na činjenicu da su prooksidativne promene posredovane izmenjenom dostupnošću mitohondrijalnog energetskeg supstrata (137). ROS mogu uticati na procese mutacije gena, promocije i progresije karcinoma, jer mogu da indukuju oštećenje DNK i proteina, oštećenje tumor-supresorskih gena i povećaju ekspresiju protoonkogeni (138). Najznačajniji uzrok nastanka

karcinoma je ROS indukovano oštećenje DNK. Mutacije izazvane ROS deluju na specifičnu oksidaciju purinskih i pirimidinskih baza, raskidanje jednog lanca DNK ili dovode do nestabilnosti procesa reparacije (139). ROS mogu da oksiduju guanin iz DNK i RNK, pri čemu nastaje 8-hidroksiguanin koji je povezan sa karcinogenezom (140).

Utvrđena je veza između onkogene signalizacije i oksidativnog stresa, kojom onkogeni povećavaju nivo ROS. Ras aktivacija povećava generisanje superoksida. BCR-ABL transformisane ćelije pokazuju povećanje intracelularnog ROS, kao i oksidativno oštećenje DNK i fragmentaciju hromozoma. Povećana c-Myc ekspresija takođe povećava nivo ROS, oštećenje DNK i nestabilnost genoma i progresiju karcinoma (141). Polazeći od ideje da ROS mogu biti promoteri inicijacije maligne transformacije putem promocije mutagenosti, ali i da mogu smanjiti progresiju karcinoma putem oksidantnih oštećenja, antioksidantni enzimi imaju bimodalni efekat na inicijaciju i progresiju malignih transformacija ćelija (142). NADPH je centralni molekul rezistencije ćelije na oksidativni stres. U ćelijama u kojima su potrošeni GSH i TiX tokom oksidativnog stresa, NADPH mora biti preusmeren na njihovu regeneraciju. Ćelije karcinoma koriste brojne metaboličke puteve da generišu NADPH, uključujući pentoza fosfatne, folatne i maleične enzimske puteve (143).

Nastanak ROS predstavlja deo mehanizma kojim većina hemoterapeutskih agenasa i jonizujuće zračenje deluju na tumorske ćelije. Modifikacija genske ekspresije pomoću ROS utiče na ćelijsku proliferaciju i apoptozu putem aktivacije transkripcionih faktora uključujući MAPK, AP-1, i NF- κ B puteve (144).

2.6. Apoptoza

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt jeste deo homeostaznog mehanizma tkiva koji održava ravnotežu između proliferacije i ćelijskog rasta sa jedne strane, i ćelijske smrti sa druge strane (145). Važan je deo funkcionisanja ćelija, razvoja i funkcionisanja imunog sistema, hormonski zavisne atrofije, razvoja embriona i hemijski izazvane ćelijske smrti (146).

Morfologija apoptoze

Apoptoza je morfološki okarakterisana bubrenjem membrane, skupljanjem ćelije, kondenzacijom hromatina i fragmentacijom hromozoma DNK (147), što je posledica unutrašnje proteolitičke digestije (148). Apoptozu pokreću različiti signali: oštećenja DNK, određeni faktori rasta ili prisustvo signalnih proteina smrti u okruženju ćelije (149). Za apoptozu je karakteristična pojava piknoze (kondenzacija hromatina), posle koje dolazi do invaginacije plazma membrane,

keriorekse i formiranja apoptotičkih tela, koja bivaju fagocitovana od strane makrofaga (146). Proces apoptozu ne dovodi do nastanka inflamacije pošto ne dolazi do oslobađanja ćelijskog sadržaja u okolna tkiva, dok brza fagocitoza sprečava pojavu sekundarne nekroze, a digestivne ćelije ne proizvode inflamatorne citokine (150, 151).

Razlika između apoptoze i nekroze

Alternativa apoptotskoj ćelijskoj smrti jeste nekroza, koja se smatra toksičnim procesom u kom su ćelije pasivne žrtve i prati ih energetski nezavisan način smrti. Biohemijski posmatrano, u toku nekroze dolazi do velikog utroška energije i formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, što vodi ka narušavanju homeostaznih jonskih pumpi i oštećenja membranskih lipida, bubrenja i pucanja ćelijske membrane (152). Dolazi, takođe, i do porasta intracelularne koncentracije kalcijuma, koja uzrokuje preopterećenje mitohondrija kalcijumom, depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija i prestanak produkcije ATP (153). Povećanje koncentracije kalcijuma, trošenje ATP i oksidativni stres dovode do intenzivne ćelijske smrti.

U nekrotičnim ćelijama se uočava bubrenje citoplazme i vakuolizacija, ruptura ćelijske membrane, dilatacija organela i umerena kondenzacija hromatina. Gubitak integriteta ćelijske membrane dovodi do oslobađanja citoplazmatskog sadržaja u okolno tkivo, slanja hemotaktičkih signala i privlačenja inflamacijskih ćelija (151, 154). Nekroza kao pasivan proces zahvata veliko područje ćelija, dok apoptoza kao kontrolisan – energetski zavisna proces – deluje na pojedinačne ćelije ili klastere ćelija (155). Nekroza i apoptoza su morfološko-biološki povezane putem “apoptoza-nekroza kontinuuma” (156). Dva faktora koja mogu da prevedu apoptotički u nekrotički proces jesu smanjeno prisustvo kaspaza i intracelularnog ATP (157).

2.6.1. Mehanizmi apoptoze

Mehanizam apoptoze čine dva razičita signalna puta: ekstrinzični ili ekstracelularni put (put receptora smrti) i intrinzični ili mitohondrijama posredovan put (158, 159).

Kaspaze

Kaspaze su široko rasprostranjene u obliku proenzima u većini ćelija, a po aktivaciji mogu aktivirati druge kaspaze, inicirajući tako proteaznu kaskadu. Kaspaze poseduju proteolitičku aktivnost i mogu da cepaju peptidne veze sa ostacima asparaginske kiseline. Do sada je identifikovano četrnaest različitih kaspaza u ćelijama sisara. Kaspaze su, u zavisnosti od njihove strukture i uloge, u putu ćelijske smrti podeljene na inicijatore i efektore apoptoze. Efektorske

kaspaze (kaspaza-3, -6 i -7) sadrže kratak prodomen i deluju na različite ćelijske supstrate, dok inicijatorske kaspaze (kaspaza-2, -8, -9 i -10) imaju dugačak prodomen i aktiviraju efektorske kaspaze (160). Jednom aktivirane efektorske kaspaze mogu delovati na oko 400 supstrata (161). Inflamatorne kaspaze su kaspaza -1, -4 i -5. Ostale identifikovane kaspaze su: kaspaza -11, -12, -13 i -14 (162-165).

Ekstrinzični put

Ekstrinzični signalni put apoptoze je posredovan transmembranskim receptorima (receptori smrti), koji pripadaju superporodici receptora gena faktora nekroze tumora (TNF) (146). Svi receptori smrti poseduju citoplazmatski domen sa oko 80 aminokiselina, poznat kao „domen smrti”, koji je značajan za transmisiju apoptotičkog signala. Posle vezivanja liganda, receptori smrti preko svog domena smrti reaguju sa adaptivnim proteinom, koji olakšava vezivanje inicijatorske kaspaze -8 za domen. Sve ove komponente zajedno čine indukujući signalni kompleks smrti (DISC), koji aktivira kaspazu-8, a zatim dolazi do autokatalitičke aktivacije efektorskih kaspaza (166, 167). Aktivirana kaspaza-8 može direktno da aktivira izvršnu kaspazu-3 (168), a takođe može i da poveća permeabilitet spoljašnje membrane mitohondrija, što dovodi do oslobađanja citohroma c u citoplazmu (169).

Intrinzični put

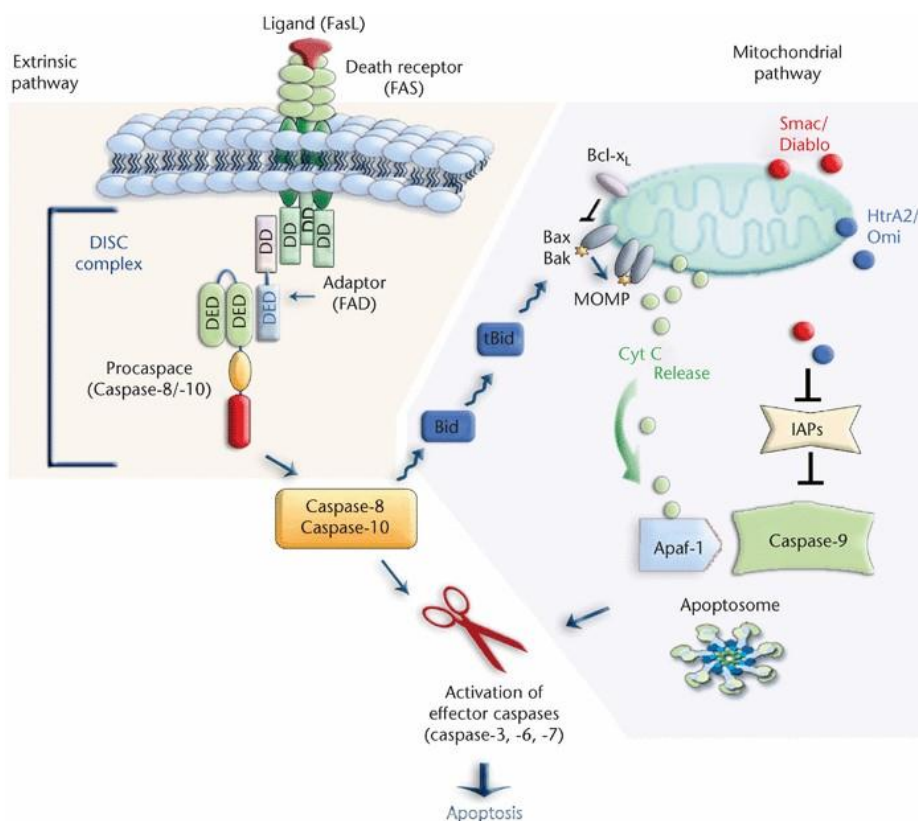
Intrinzični signalni put apoptoze uključuje različite ne-receptorske stimulse koji stvaraju negativne/pozitivne intracelularne signale. Oni deluju direktno na ciljne ćelije. Negativni signali su odsustvo faktora rasta, hormona i citokina, što utiče na aktivaciju apoptoze. Pozitivni stimulusi su: zračenje, toksini, hipoksija, virusne infekcije i slobodni radikali (146). Navedeni stimulusi deluju na promenu unutrašnje membrane mitohondrija i otvaranje njenih transmisionih kanala, gubitak transmembranskog potencijala i oslobađanje dve grupe pro-apoptotskih proteina u citosol (170). Prvu grupu čine citohrom c, (Smac)/DIABLO i serinska proteaza HtrA2/Omi (171). Drugu grupu pro-apoptotskih proteina čine AIF, endonukleaze A i CAD, koje se oslobađaju iz mitohondrija tokom apoptoze (172).

Citohrom c normalno učestvuje u procesu transporta elektrona u respiratornom lancu pri nastanku ATP. U citosolu ćelija tokom apoptoze, on predstavlja kofaktor za adaptivni protein Apaf-1 (173). Oslobođeni citohrom c u citosolu dovodi do aktivacije kaspaze-3, putem formiranja velikog citosolskog kompleksa, koji se zove apoptozom i sastoji se od citohroma c, Apaf-1 i kaspaze-9 (174).

Intrinzični signalni put posredovan je putem članova Bcl-2 familije proteina, koji mogu biti pro-apoptotski i anti-apoptotski proteini, a nalaze se na spoljašnjoj membrani mitohondrija (175). Oni mogu biti aktivirani oštećenjem DNK, faktorima rasta i onkogenim aktivatorima (176, 177). Pro-apoptotski proteini, Bax i Bak, direktno dovode do permeabilizacije spoljne membrane mitohondrija (MOMP), što je kritični stupanj apoptoze. Citohrom c, koji je oslobođen posle MOMP, dovodi do aktivacije kaspaza i progresivno do rastvaranja ćelija (178). Posle MOMP, mitohondrije gube sposobnost da proizvode ATP i ne mogu više da održe ćelijsku homeostazu (179), pa se MOMP smatra tačkom bez povratka u mitohondrijskoj apoptozu (180). Balans između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih Bcl-2 proteina je najznačajniji faktor koji određuje da li će ćelija ući u apoptozu kao odgovor na ćelijski stres (181).

Izvršna faza

Izvršna faza predstavlja finalnu fazu apoptoze koja povezuje ekstrinzični i intrinzični put. U toku ove faze dolazi do aktivacije izvršnih kaspaza, koje dalje aktiviraju citoplazmatske endonukleaze (razgrađuju jedarni materijal) i proteaze (razgrađuju jedarne i citoskeletne proteine). Kaspaza-3 se smatra najvažnijom izvršnom kaspazom i nju mogu aktivirati sve inicijatorske kaspaze (Slika 2.10.) (182).



Slika 2.10. Šematski prikaz apoptoze

Rezistencija ćelija na apoptozu može da dovede do tumorske progresije i otpornosti na antitumorsku terapiju (183). Tumorske ćelije ostvaruju rezistenciju na apoptozu putem ekspresije anti-apoptotskih proteina, kao što je Bcl-2, ili supresijom ili mutacijom pro-apoptotskih proteina, kao što je Bax. Ekspresija oba proteina, i Bcl-2 i Bax, regulisana je putem p53 tumor supresornog gena (184). Protein p53 se smatra “čuvarem genoma” i ima značajnu ulogu u održavanju integriteta genetskog koda (133). U zavisnosti od veličine oštećenja DNK molekula, p53 može ili privremeno da stopira ćelijski ciklus (ćelijsko mirovanje), ili da permanentno stopira ćelijski ciklus aktivacijom procesa apoptoze (134).

3. Ciljevi i hipoteze istraživanja

3.1. Ciljevi istraživanja

Osnovni ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati efekat soka i ekstrakata korena rena na rast tumorskih ćelija *in vitro*.
2. Ispitati potencijalno hepatotoksično delovanje soka i ekstrakata korena rena *in vitro*.
3. Ispitati antitumorsko delovanje soka i ekstrakata korena rena *in vivo*.
4. Ispitati hepatoprotektivno delovanje soka i ekstrakata korena rena *in vivo*.

3.2. Hipoteze istraživanja

Naša istraživanja zasnovali smo na sledećim hipotezama:

1. Ekstrakti i/ili sok korena rena ispoljavaju antitumorsko delovanje *in vitro*.
2. Ekstrakti i/ili sok korena rena ne ispoljavaju hepatotoksično delovanje *in vitro*.
3. Ekstrakti i/ili sok korena rena ispoljavaju antitumorsko delovanje *in vivo*.
4. Ekstrakti i/ili sok korena rena ispoljavaju hepatoprotektivno delovanje *in vivo*.

Da bi se realizovao cilj i proverile postavljene hipoteze:

1. Urađena je ekstrakcija soka i pulpe korena rena;
2. Identifikovana su i kvantifikovana polifenolna jedinjenja u ekstraktima i soku korena rena;
2. U *in vitro* uslovima ispitana je antiproliferativna aktivnost ekstrakata i soka korena rena
3. U *in vivo* uslovima ispitana je antitumorska aktivnost ekstrakata i soka korena rena na ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma implantiranog NMRI miševima.
4. U *in vivo* uslovima ispitana je hepatoprotektivna aktivnost ekstrakata i soka korena rena kod oštećenja jetre miševa indukovano hepatotoksičnim CCl₄.

Za cilj/hipotezu 1:

- 1) Određen je intenzitet ćelijskog rasta ćelijskih linija karcinoma Sulforodaminom B (SRB) testom.
- 2) Određen je mehanizam ćelijske smrti.

Za cilj/hipotezu 2:

- 1) Određen je intenzitet ćelijskog rasta ćelijske linije humanog karcinoma jetre i ćelijske linije karcinoma jetre pacova Sulforodaminom B (SRB) testom.
- 2) Određen je mehanizam ćelijske smrti.

Za cilj/hipotezu 3:

- 1) ispitana je aktivnost ekstrakata soka i korena rena na rast ćelija *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma implantiranog NMRI miševima.
- 2) ispitana je aktivnost ekstrakata soka i korena rena na biohemijske parametre oksidativnog stresa (antioksidantni enzimi: SOD, XOD, CAT, GSHP_x, GR, količinu GSH i intenzitet LP_x) u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK).

Za cilj/hipotezu 4:

- 1) ispitana je aktivnost ekstrakata soka i korena rena na serumske parametre funkcije jetre kod hepatotoksičnog oštećenja jetre indukovano sa CCl₄.
- 2) ispitana je aktivnost ekstrakata soka i korena rena na biohemijske parametre oksidativnog stresa (antioksidantni enzimi: SOD, XOD, CAT, GSHP_x, GR, količinu GSH i intenzitet LP_x) kod hepatotoksičnog oštećenja jetre indukovano sa CCl₄.

4. Materijal i metode

4.1. Hemikalije i standardi

Referentni standardi čistoće $\geq 98\%$ kupljeni su od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sve korišćene hemikalije i rastvarači bili su analitičkog stepena čistoće isporučeni od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD), Acros Organics (New Jersey, SAD), Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Češka), Zorka Pharma (Šabac, Srbija), J.T. Baker (Deventer, Holandija), AppliChem Panreac, (Darmstadt, Nemačka), Carlo Erba Reagenti (Milan, Italija) i Promochem (Wessel, Nemačka).

4.2. Fitohemijsko ispitivanje ekstrakata i soka korena rena

4.2.1. Biljni materijal, priprema ekstrakata i soka korena rena

Predmet ispitivanja antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti u ovoj doktorskoj disertaciji bio je biljni materijal, koji je predstavljao svež koren rena iz Bačkog Petrovca, Srbija (45°21'5.32"N 19°37'21.65"E) u januaru 2016. godine. Koren rena (2,64 kg) je oljušten, usitnjen i samleven u sokovniku Philips juicer (HR1858/55/BD,650W). Od 1,475 kg oljuštenog rena dobijeno je 200 ml soka i 1,25 kg suve pulpe. Sok i pulpa su podeljeni u manje porcije i čuvani zamrznuti (-20 °C) do ekstrakcije.

Uzorci soka i pulpe korena rena ekstrahovani su modifikovanom Kupchan-ovom i Sarker-ovom metodom (185, 186), koja se zasniva na principu tečno-tečne ekstrakcije i omogućava izolaciju i razdvajanje polarnih od nepolarnih komponenti. Pulpa korena rena, mase 5 g, podvrgnuta je ekstrakciji sa 250 ml 70% metanola tokom 45 minuta u ultrazvučnom kupatilu, a zatim je posle 24 h profiltrirana kroz gazu. Metanolni deo je ekstrahovan sa 250 ml hloroforma, tokom 45 minuta na magnetnoj mešalici, nakon čega je hloroformski sloj profiltriran i uparen do suva. Metanolni ostatak je nakon toga ekstrahovan sa 250 ml dihlormetana, tokom 45 minuta na mešalici. Nakon ekstrakcije dihlormetanski ekstrakt je uparen do suva. Nakon uparavanja metanola vodeni ostatak je ekstrahovan sa 50 m butanola tokom 45 minuta.

Butanolni i vodeni ekstrakti su nakon razdvajanja upareni do suva. Isti postupak ekstrakcije ponovljen je i sa 25 ml soka korena rena. Suvi ekstrakti su čuvani na 4 °C do upotrebe.

Za ispitivanje hemijskog sastava *in vitro* antiproliferativne aktivnosti i tipa ćelijske smrti upotrebljeno je osam ekstrakata rena:

- iz pulpe: E1 (dihlormetanski), E2 (hloroformski), E7 (vodeni) i E8 (butanolni),
- iz soka: E3 (dihlormetanski), E4 (hloroformski), E5 (vodeni) i E6 (butanolni),
- sok rena J9.

4.2.2. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktima i soku korena rena primenom HPLC metode

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktima soka i pulpe korena rena, kao i u soku korena rena, izvršena je tačnom hromatografijom visoke rezolucije (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) na uređaju Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kioto, Japan), koji sadrži LC-20AT binarnu pumpu, CTO-20A termostat i SIL-20A automatski dozator povezan sa SPD-20AV UV/Vis detektorom.

Razdvajanje fenolnih jedinjenja izvršeno je na Luna C18 RP koloni, (250 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 µm; Phenomenex, „Torens”, Kalifornija, SAD), koja je zaštićena pretkolonom C18, 4 x 30 mm (Phenomenex, „Torens”, Kalifornija, SAD). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (acetonitril) i B (1% mravlja kiselina) pri protoku od 1 mL/min i primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0–10 min od 10 do 25% A; 10–20 min linearan porast do 60% A, od 20 do 30 min linearan porast do 70% A. Kolona je uravnotežena na početne uslove, 10% A, 10 min uz dodatnih 5 min za stabilizaciju. Standardi polifenolnih jedinjenja su rastvarani u 50% metanolu. Hromatogrami su snimljeni pri različitim talasnim dužinama: 280 nm za derivate hidroksibenzoeve kiseline, katehin i epikatehin, 320 nm za derivate hidroksicimetne kiseline i 360 nm za flavonoide. Na osnovu dobijenih hromatograma i kalibracionih dijagrama standardnih rastvora fenolnih jedinjenja, izračunate su koncentracije identifikovanih fenolnih kiselina i flavonoida (mg/g suvog ekstrakta i mg/L – uzorak J9).

4.3. *In vitro* ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena

4.3.1. Ćelijske linije za *in vitro* ispitivanja

Za procenu antiproliferativne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena korišćene su sledeće ćelijske linije: karcinom grlića materice (HeLa), adenokarcinom dojke (MCF7 iMDA-MB-231), adenokarcinom debelog creva (HT-29), adenokarcinom pluća (A549), adenokarcinom prostate

(PC-3), karcinom kože – melanoma (Hs 294T), karcinom jetre – hepatom (Hep G2), kao i karcinom jetre pacova-hepatom (H-4-II-E) i normalne (zdrave) fetalne ćelije pluća (MRC-5) (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Karakteristike odabranih ćelijskih linija

Kolekcija ćelijskih linija	Ime	Kataloški broj	Vrsta	Tkivo	Histološki tip	Tip rasta	Opis
ECACC*	MRC-5	05090501	Čovek (<i>Homo sapiens</i>)	Pluća	Fibroblasti	Adhere-ntne	Normalne fetalne ćelije pluća
	A549	86012804		Pluća	Epitelne		Karcinom pluća
	Hep G2	85011430		Jetra			Karcinom jetre, hepatom
	MDA-MB-231	92020424		Dojka			Adenokarcinom dojke
	MCF7	86012803		Prostata			Adenokarcinom prostate
	PC-3	90112714		Grlić materice			Karcinom grlića materice
	HeLa	93021013		Debelo crevo			Adenokarcinom debelog creva
	HT-29	91072201		Koža			Karcinom kože, melanom
ATCC**	Hs 294T	HTB-140	Pacov (<i>Ratus norvegicus</i>)	Jetra		Karcinom jetre pacova, hepatom	
	H-4-II-E	CRL-1548					

*European Collection of Cell Cultures

**American Type of Cell Cultures

Ćelijske linije su gajene u *Dulbecco*-vom i *Eagle*-ovom modifikovanom medijumu (*Dulbecco*'s modified *Eagle*'s mediumu-DMEM; PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria) sa dodatkom 4,5% glukoze, 10% grejanjem inaktivisanog fetalnog telećeg seruma (FTS; PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria), 100 IU mL⁻¹ penicilina i 100 µg mL⁻¹ streptomcina (Galenika, Belgrade, Serbia). Ćelijske linije su gajene u flakovima od 25 cm³ (Corning, New York, USA) na 37 °C, u atmosferi od 95% vazduha i 5% CO₂, pri visokoj vlažnosti i presađivane dva puta nedeljno. Suspenzije pojedinačnih ćelija dobijene su upotrebom 0,1% tripsina (Serva, UK) sa 0,04 % EDTA.

4.3.2. Priprema uzoraka

Ekstrakti korena rena rastvoreni su i razređeni u DMSO (dobijeno je pet radnih koncentracija) i hranljivom medijumu (1 µL radne koncentracije + 199 µL medijuma; a = 200), radi postizanja potrebnih finalnih koncentracija. Opsezi finalnih koncentracija zavisili su od

prinosa ekstrakta i bili su u opsegu od 0,0625 do 1 mg/mL. Finalna koncentracija DMSO je bila \leq 0,05 % (v/v).

Sok korena rena je razblažen u 0,9% NaCl (dobijeno je pet radnih koncentracija), a zatim u medijumu (1 μ L radne koncentracije + 199 μ L medijuma; $a=200$) radi postizanja finalnih razblaženja u opsegu od 200 do 3200.

4.3.3. Određivanje intenziteta ćelijskog rasta Sulforodamin B (SRB) testom

Suspenzije ćelija gustine 4-8 x 10³ ćelija/otvoru, zavisno od vremena udvajanja ćelijske linije, zasejane su u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Sarstedt, Newton, NC, SAD), u zapremini od 199 μ L i preinkubirane u kompletnom medijumu obogaćenom 5% FTS, na 37 °C tokom 24 h. Radne koncentracije ekstrakata, soka ili rastvarača (1 μ L) dodate su u odgovarajuće otvore. Mikroploče su zatim inkubirane na 37 °C tokom 48 h. Ćelije su fiksirane *in situ* hladnom 50% trihlorsirćetnom kiselinom (TSK) (50 μ L/otvoru 96 well ploče) (finalna koncentracija TSK iznosila je 12,5%) 1 h na temperaturi od 4 °C. Ploče su isprane destilovanom vodom (4 puta) automatski (Wellwash4, Labsystems) da bi se uklonili TSK, medijum, niskomolekularni metaboliti i proteini seruma. Nakon sušenja, ploče su bojene sulforodaminom B (0,4% u 1% sirćetnoj kiselini) (w/v) (50 μ L/otvoru) 30 minuta na sobnoj temperaturi. Boja je isprana 1% sirćetnom kiselinom (4 puta) automatski, a ploče ponovo osušene. Vezana boja ekstrahovana je sa 10 mM TRIS bazom (tris hidroksimetil aminometan; 200 μ L/otvoru).

Ukupna količina proteina merena je Sulforodamin B (SRB) kvantitativnom kolorimetrijskom metodom po *Skehan*-u (187). Sulforodamin B (C₂₇H₂₉O₇T₂Na) (Sigma, SAD) je anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina. U blago baznoj sredini SRB je moguće rastvoriti, kvantitativno ekstrahovati i optički izmeriti da bi se utvrdio relativni ćelijski rast ili vijabilnost u tretiranim i netretiranim ćelijama.

Fotometrijsko očitavanje ukupnih proteina vršeno je na *Multiscan Ascent*, Labsystems filter fotometru sa jednokanalnim vertikalnim izvorom svetlosti. Korišćen je koncept vertikalne fotometrije pri kome snop svetlosti prolazi kroz ceo uzorak. Izvor svetlosti je kvarc-halogen lampa. Talasna dužina se dobija izborom jednog od osam filtera interferencije. Kvarcno optičko vlakno i sočiva daju visoko fokusiran svetlosni snop, koji prolazi kroz kivetu do detektora. Detektorsko kućište sastoji se od silikonskog fotodetektora, amplifikatora i optičkih sočiva.

Apsorpcija svetlosti je u vertikalnoj fotometriji proporcionalna količini supstance u otvoru. Apsorbanca (A) se izražava kao:

$A = a \times S \times m$, gde je a – molarni ekstinkcioni koeficijent, S – poprečni presek površine upravne na izvor svetlosti, a m – masa ispitivane supstance.

Mikrotitar ploče su očitane na talasnim dužinama: $\lambda_1 = 540$ nm (test talasna dužina; oblast zelene svetlosti 500–580 nm) i $\lambda_2 = 620$ nm (referentna talasna dužina za uklanjanje apsorbance pozadine; oblast crevene svetlosti 620–750 nm).

Apsorbanca je dobijena kao: $A = A_{540 \text{ nm}} - A_{620 \text{ nm}}$.

Aktivnost ćelijskog rasta izražena je kao % od kontrole (%K) i izračunata je u odnosu na kontrolu, po formuli:

$\%K = (AT/AC) \times 100$, gde je AT – apsorbanca test uzorka, AC – apsorbanca kontrolnog uzorka.

Krive zavisnosti koncentracije i ćelijskog rasta (dozni efekat) konstruisane su za svaki tretman, a vrednost IC_{50} (koncentracija koja inhibira ćelijski rast za 50%) određena je upotrebom OriginPro 8 SRO (Origin-Lab Corporation, Northampton, SAD) softvera. U cilju identifikacije selektivnosti prema tumorskim ćelijama u odnosu na zdravo tkivo izračunati su ne-tumor/tumor IC_{50} odnosi po formuli: $NT/T = IC_{50}^{MRC-5}/IC_{50}^{\text{odgovarajuća tumorska ćelijska linija}}$ (188) za ekstrakte i kao $1/NT/T$ za sok.

4.3.4. Određivanje mehanizma ćelijske smrti

Za najaktivnije ekstrakte na odabranim ćelijskim linijama određen je *in vitro* tip ćelijske smrti detekcijom apoptoze i nekroze ELISA tehnikom, upotrebom *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* komplet (Roshe, Version 11.0). Ovaj spektrofotometrijski komplet 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 ćelije. Princip se bazira na enzimskoj sendvič-immunoadsorpcionoj metodi u kojoj se koriste monoklonalna antitela miša: anti-DNK antitela i anti-histon antitela, koja se vezuju za DNK i histone. 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), koji 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, dok anti-DNK-POD antitelo reaguje sa jednostrukim i dvostrukim lancem DNK. Kriterijum za izbor uzoraka za detekciju tipa ćelijske smrti je bila vrednost $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, prilikom ispitivanja uticaja soka i ekstrakata na rast ispitivanih ćelijskih linija. Detekcija tipa ćelijske smrti određena je na ćelijskim linijama: HeLa, MCF7 i HT-29 za najaktivnije ekstrakte (E4 i J9), po proceduri opisanoj po Četojević-Simin (189).

U saglasnosti sa radom Četojević-Simin i saradnika (188), suspenzija ćelija gustine (1×10^4 ćelija) zasejana je u mikrotitar ploče sa 96 otvora i preinkubirana 24 h. U zavisnosti od ćelijske linije, korišćene koncentracije ekstrakata bile su $10 \mu\text{g/mL}$ (E4 na HeLa i MCF7) i $20 \mu\text{g/mL}$ (E4 na HT-29), dok je razblaženje soka bilo $a=20$ (J9 na HeLa i HT-29). Posle dodatka soka/ekstrakata rena i rastvarača (negativna kontrola) i inkubacije (oko 2 h, precizno vreme je određeno posmatranjem pod mikroskopom) ploče su centrifugirane, a ukupni volumen supernatanta ćelijskih kultura ($n=4$) za svaki tretman je korišćen za ispitivanje nekroze. Nakon toga ćelije su lizirane, centrifugirane, a ukupni volumen lizata ($n = 4$) korišćen je za ispitivanje apoptoze (189). Supernatant ćelijskih linija (za određivanje nekroze) i frakcija nakon lize ćelija (za određivanje apoptoze) koje su sadržale citoplazmatske fragmente histona i DNK, tretirane su anti-histon antitelima i anti-DNK antitelima, za koje je vezana peroksidaza i inkubirane 2 h. Mikrotitar ploče su zatim isprane, dodat je supstrat peroksidaze, a intenzitet razvijene boje izmeren je upotrebom *Multiscan Ascent* (Labsystems; Helsinki, Finska) fotometra na 405 nm i 495 nm (za uklanjanje apsorbance pozadine) (189).

4.4. *In vivo* ispitivanje antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena

Za *in vivo* ispitivanje antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti korišćeni su ekstrakti korena rena: E1, E2, E3, E4 i E8, koji su pokazali najbolje antiproliferativno delovanje na ispitivane tumorske ćelijske linije *in vitro*, i sok korena rena J9.

4.4.1. Eksperimentalne životinje i tretmani

Postupak rada sa životinjama i sve eksperimentalne procedure sprovedeni su u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dala je saglasnost za sve eksperimentalne protokole na ogleđnim životinjama u Mišljenju pod

brojem: 01-90/4 od 6. 4. 2015. godine, broj dokumenta EK: I-2015-01. Na osnovu toga je Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Uprav za veterinu, izdala Rešenje o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama pod brojem: 323-07-09304/2015-05 od 30. 10. 2015. godine.

Za *in vivo* ispitivanja u okviru doktorske disertacije korišćeni su mužjaci i ženke miševa soja *Hannover National Medical Institute* (Hann: NMRI), dobijeni iz laboratorije Samostalnog odseka za biohemiju Centra za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine (Novi Sad, Vojvodina, Srbija). Sve eksperimentalne životinje čuvane su u strogo kontrolisanim uslovima temperature (25 °C) i vlažnosti vazduha (30–50 %), uz režim svetlo-12h/tama-12h. Eksperimentalne životinje su imale slobodan pristup odgovarajućoj standardnoj hrani za miševu (LM₂ sa 19% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Vojvodina, Srbija) i vodi.

4.4.2. Postupak *in vivo* ispitivanja antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena

In vivo ispitivanja antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena vršena su na miševima soja Hann:NMRI (model *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)), starosti od 6 do 8 nedelja i telesne mase 25 g ± 10%, koji su slučajnim izborom podeljeni u grupe od po šest (6) jedinki u svakoj (n=6) i podvrgnuti su tretmanima po sledećem programu:

- Grupa kontrolna EAK – miševi sa implantiranim ćelijama EAK, tretirani su sa po 2 mL/kg t.m. fiziološkog rastvora (*per os*), tokom 14 dana;
- Grupa E1, E2, E3, E4, E8, J9, NALC pretretman – miševi su pretretirani odgovarajućim ekstraktima E1, E2, E3, E4 i E8, sokom korena rena J9, odnosno NALC, sa po 2 mL/kg t.m. (*per os*), tokom 7 dana, a zatim su implantirane (*i.p.*) ćelije EAK, 7. dana;
- Grupa E1, E2, E3, E4, E8, J9, NALC tretman – miševi su tretirani odgovarajućim ekstraktima E1, E2, E3 E4 i E8, sokom korena rena J9, odnosno NALC, sa po 2 mL/kg t.m. (*per os*), tokom 7 dana, sa početkom od dana implantacije (*i.p.*) ćelija EAK;
- Grupa E1, E2, E3, E4, E8, J9, NALC posttretman – miševi su posttretirani odgovarajućim ekstraktima od E1, E2, E3, E4, E8, sokom korena rena S9, odnosno NALC, sa po 2 mL/kg t.m. (*per os*), tokom 7 dana, sa početkom 7. dana nakon implantacije (*i.p.*) ćelija EAK.

Po završetku četrnaestog dana životinje su žrtvovane i sakupljen je ascit EAK za dalja biohemijska ispitivanja. Da bi se proverila hipoteza da se uticaj ekstrakata i soka korena rena na rast i razvoj tumora zasniva na promeni antioksidantnog statusa u ćelijama EAK, postupak je ponovljen na isti način sa jednim antioksidansom, N-acetil-L-cisteinom (NALC) (*Sigma*, 5mM), (2 mL/kg t.m. (*per os*)).

Napomena: Za eksperimente je uzeta standardna doza ekstrakata i soka korena rena od 2 mL/kg telesne mase, što je bilo u skladu sa opštim postupkom opisanim u literaturi (190). Eksperiment je vršen na ženkama miševa, polazeći od pretpostavke da rast EAK, može biti propagiran sa hormonskim statusom ženki (190).

4.4.3. Postupak *in vivo* ispitivanja antioksidantne/prooksidantne i hepatoprotektivne/hepatotoksične aktivnosti ekstrakata i soka korena rena

In vivo ispitivanje antioksidantne/prooksidantne i hepatoprotektivne/hepatotoksične aktivnosti ekstrakata i soka rena kod oksidativnog oštećenja jetre indukovano sa CCL₄-om vršeno je na miševima soja Han:NMRI. Ekstrakti i sok korena rena, odnosno fiziološki rastvor (kontrolna grupa) aplikovani su jednokratno oralno (*per os*), (2 mL/kg telesne mase) tokom 7 dana. Ugljen-tetrahlorid (CCL₄) aplikovan je intraperitonealno (*i.p.*) (2 mL/kg telesne mase) sedmog dana, 24h pre eutanazije. Miševi starosti 6–8 nedelja i telesne mase 25 g±10%, su nasumično podeljeni u 14 grupa po šest (6) jedinki u svakoj (n=6) i podvrgnuti su sledećem tretmanu:

- Grupa Kontrola – kontrolna grupa; životinje koje su primale fiziološki rastvor, 2 mL/kg t.m. (*per os*) tokom 7 dana;
- Grupa Kontrola+CCL₄ – negativna kontrolna grupa; životinje koje su primale fiziološki rastvor 2 mL/kg t.m. (*per os*) tokom 7 dana i rastvor CCL₄, 2 mL/kg t.m. (*i.p.*), sedmog dana, 24h pre žrtvovanja;
- Grupa E1–E4, E8, J9 – eksperimentalne grupe; životinje koje su tretirane ispitivanim ekstraktima korena rena: E1, E2, E3, E4, E8 ili sokom korena rena J9, 2 mL/kg t.m. (*per os*) tokom 7 dana;
- Grupa E1+CCL₄–E4+CCL₄, E8+CCL₄, J9+CCL₄ – eksperimentalne grupe; životinje koje su tretirane ispitivanim ekstraktima korena rena: E1, E2, E3, E4, E8, ili sokom korena rena J9, 2 mL/kg t.m. (*per os*), tokom 7 dana, i rastvorom CCL₄, 2 mL/kg t.m. (*i.p.*) sedmog dana, 24h pre žrtvovanja.

Na kraju eksperimenta (dan 8), životinje su izmerene, anestetizirane izofluoranom i dekapitovane. Sakupljeni su uzorci krvi i jetre za biohemijska ispitivanja. Masa jetre je izmerena posle uklanjanja žučne kese. Uzorci jetre mase 1g homogenizovani su u TRIS-HCl/saharoznom rastvoru (50 mmol/L, 0,25 mol/L, pH 7,40), 1:3, na 4 °C, *Potter-Elvehjem*-ovim homogenizujućim setom. Dobijeni homogenat je centrifugiran na 3000 o/min, tokom 10 minuta, a koncentracija proteina je određena biuretskom metodom, sa albuminom bovinog seruma kao standardom (190, 191).

4.4.4. Eksperimentalne metode primenjene u *in vivo* ispitivanjima

In vivo ispitivanja antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena bazirala su se na:

- 1) praćenju rasta tumora (volumen ascita EAK);
- 2) određivanju broja tumorskih ćelija EAK;
- 3) određivanju ćelijske vijabilnosti EAK i
- 4) praćenju promene biohemijskih parametara oksidativnog stresa u ćelijama EAK.

In vivo ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena praćeno je na osnovu promene biohemijskih parametara oksidativnog stresa (iz homogenate jetre i hemolizata krvi), dok je ispitivanje potencijalne hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena nakon intoksikacije sa ugljen-tetrahloridom praćeno na osnovu promene biohemijskih parametara funkcije jetre.

Određivanje broja tumorskih ćelija (EAK) i ćelijske vijabilnosti

Ascit EAK je iz abdomena prenet u rastvor Krebs-Ringer-ovog fosfatnog pufera (0⁰ C, pH 7,4). Dobijena suspenzija je zatim podvrgnuta nizu centrifugiranja pri 4500 rpm (MSE HIGH SPEED centrifuga na 4⁰C) i 12000 rpm (Eppendorf 3200 centrifuga 2,5 min) da bi se dobila gusta suspenzija ćelija (1:1). Nakon toga je u suspenziji određena masa ćelija, kao i broj ćelija izražen kao broj ćelija na mm³ (brojanje je vršeno u *Neubauer*-ovoj komori). Vijabilnost ćelija je određena metodom sa Tripan plavim (Trypan blue), (0,4% rastvor u Krebs-Ringer-ovom fosfatnom puferu) koji boji samo oštećene ćelije. Rezultati su izraženi kao % oštećenih ćelija.

Biohemijski testovi oksidativnog stresa

U cilju *in vivo* procene oksidativnog stresa određivane su aktivnosti nekoliko antioksidantnih enzima, sadržaj redukovanog glutationa i intenzitet lipidne peroksidacije standardnim laboratorijskim procedurama. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) određena je metodom Weydert i Cullen (192), ksantin oksidaze (XOD) metodom Bergmayer-a i saradnika (193), katalaze (CAT) metodom Beer-a i Sizer-a (194), glutation peroksidaze (GSHPx) prema Chin-u i saradnicima (195) i glutation reduktaze (GR) metodom Goldberg-a i Spooner-a (196). Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) određen je metodom po Beuthler-u (197), dok je intenzitet lipidne peroksidacije (LPx) određen metodom Buege-a i Aust-a (198). Pomenuti biohemijski testovi oksidativnog stresa rađeni su u oba eksperimenta kod *in vivo* ispitivanja (u ćelijama EAK i u sistemu oštećenja indukovanih sa CCl₄)

Superoksid dismutaza (SOD)

Sadržaj superoksid dismutaze (SOD) određen je spektrofotometrijski na osnovu promene apsorbanca na 560 nm prema proceduri opisanoj u radu Weydert i Cullen (192). Sistem ksantin-ksantin oksidaza koristi se za stvaranje superoksid anjon radikala, dok je redukcija nitroplavog tetrazolijuma indikator produkcije superoksid anjon radikala. Metoda se bazira na kompeticiji nitroplavog tetrazolijuma i enzima SOD prema superoksid anjon radikalu, a stepen inhibicije redukcije nitroplavog tetrazolijuma je mera aktivnosti enzima SOD. Rezultati se izražavaju u U/mg proteina.

Ksantin oksidaza (XOD)

Sadržaj ksantin oksidaze (XOD) određen je 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 1 M ksantin. Posle određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Apsorbanca reakcionog produkta je očitana na 293 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,2 \cdot 10^4 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$) (193).

Katalaza (CAT)

Sadržaj katalaze (CAT) određen je primenom vodonik-peroksida (H_2O_2) kao supstrata. U uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20–50 μL , dodato je 3 mL 0,05 M fosfatnog pufera (KPi) pH 7 (u koji je dodato 0,075 mL 30%-nog rastvora H_2O_2 na 50 mL KPi). Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Očitana je apsorbanca na 240 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=4,36 \cdot 10^4 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$) (194).

Glutation peroksidaza (GSHPx)

Sadržaj glutacion peroksidaze (GSHPx) određen je pomoću kumol hidroperoksida (α -dimetil-benzilhidroperoksid) kao supstrata. Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20–50 μL , pomešan je sa 0,75 mL TRIS/HCl pufera (pH 7,6), $c=5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ (puffer I) i termostatiran 10 minuta na 37 $^\circ\text{C}$. U reakcionu smešu je zatim dodat 0,1 mL rastvora GSH ($c=2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$) i 0,1 mL rastvora kumolhidroperoksida u metanolu (1:200) i ponovo termostatirano 5 minuta na 37 $^\circ\text{C}$. Nakon toga je dodat 1 mL 20%-nog rastvora TSK da bi se reakcija stopirala. Reakciona smeša je

centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. U 2 mL TRIS/HCl pufera, pH 8 (pufer II), $c=0,4$ mol/L, dodat je 1 mL supernatanta i 0,1 mL rastvora DTNB (0,02g u 5 mL pufera II). Očitana je apsorbanca reakcionog produkta na 412 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,36 \cdot 10^4$ L/mol·cm) (195).

Glutation reduktaza (GR)

Sadržaj glutacione reduktaze određen je praćenjem enzimske 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, $c=1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, a optimalna pH vrednost je podešena dodavanjem 2 mL fosfatnog pufera (KPi), pH 7,6. Nakon određenog vremena reakcija je stopirana, reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Očitana je apsorbanca reakcionog produkta na 340 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=6,22 \cdot 10^3$ L/mol·cm) (196).

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. Zatim je na određenu zapreminu supernatanta dodat *Ellman*-ov reagens* (*Ellman*-ov reagens predstavlja smešu 0,2 mL rastvora DTNB i $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L rastvora KPi, pH 8) u odnosu 1:4. Očitana je apsorbanca reakcionog produkta na 412 nm. Sadržaj GSH je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta ($\epsilon=1,36 \cdot 10^4$ L/mol·cm), 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 pomešana je sa rastvorom *Ellman*-ovog reagensa u odnosu 1:40. Očitana je apsorbanca na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta, a preračunat na mg proteina preko ukupnih proteina (197).

Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx)

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

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi), zapremine 20–50 μL , zagrevan je 15 minuta u ključalom vodenom kupatilu sa 3 mL rastvora Činidle (tiobarbiturna kiselina 0,375% u 15% TSK (3,75 g TBA + 15 g CCl_3COOH + 20,72 mL 37% HCl + jedna-dve kapi α -tokoferola na 1 l rastvora). Rastvor je centrifugiran 10 minuta na 3000 o/min, a apsorbance nastalog proizvoda reakcije očitana je na 535 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,56 \cdot 10^5 \text{L/mol}\cdot\text{cm}$) (198).

Biohemijski parametri funkcije jetre

Potencijalna hepatoprotektivna aktivnost ekstrakata i soka korena rena praćena je na osnovu promene sledećih biohemijskih parametara: aktivnosti enzima AST i ALT, koncentracije ukupnog bilirubina, koncentracije ukupnih proteina, kao i sadržaja hidroksiprolina i DNK iz hepatocita.

Aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) određena je fotometrijski merenjem količine nastalog hidrazona na 546 nm po Reitmann-u i Wotton-u, kao što je opisano u Spasić i saradnici (199).

Sadržaj ukupnog bilirubina određen je fotometrijski u reakciji sa diazo reagensom, po metodi opisanoj u Čebović (200) i Kovačević (201). Metoda se zasniva na reakciji bilirubina sa dijazo reagensom, pri čemu se formira kompleks azo-bilirubin ružičaste boje sa apsorbancom na 540 nm.

Koncentracija ukupnih proteina određena je biuretskom metodom opisanoj u Čebović (200). Na uzorak hemolizata krvi 20–50 μL , dodato je 3 mL rastvora biuretskog reagensa ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 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 očitana je apsorbance nastalog jedinjenja na 540 nm. Sadržaj proteina određen je na osnovu kalibracione krive dobijene primenom različitih koncentracije BSA (5–50mg/L).

Za biohemijsko određivanje sadržaja DNK hepatocita postupilo se po proceduri opisanoj u Čebović (200) i Shulte-Hermann i saradnici (202). Metoda se zasniva na prevođenju deoksiriboze (oslobođena iz DNK u kiseloj sredini) u furfural, koji sa difenilaminom formira kompleks plave boje sa apsorbancom na 600 nm.

Sadržaj hidroksiprolina u jetri određen je metodom po Woessner-u (203).

4.5. Statistička obrada podataka

Eksperimentalne grupe ispitane su u četiri (n=4; testovi *in vitro*) ili šest (n=6; testovi *in vivo*) ponavljanja. Svi podaci uneseni su u posebno kreiranu bazu podataka u *Microsoft Excel*-u 10. Korišćene su mere deskriptivne statistike: aritmetička sredina, standardna devijacija, frekvence i procenti. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno, kao srednja vrednost \pm SD. Statistička obrada podataka urađena je u programskom paketu za statistiku IBM SPSS (verzija 17) i to: t-test (za poređenje dve populacije), ANOVA (za poređenje više populacija) i post-hoc test (LSD and Bonferonni). Nivo značajnosti je bio $p < 0,05$.

5. Rezultati

5.1. Rezultati fitohemijskog ispitivanja ekstrakata i soka korena rena

5.1.1. Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih jedinjenja u ekstraktima i soku korena rena

U ispitivanim ekstraktima i soku korena rena, primenom HPLC metode identifikovana su i kvantifikovana sledeća polifenolna jedinjenja: fenolne kiseline (galna, protokatehinska, kafena, ferulna, izoferulna, hlorogenska, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarinska, siringinska i sinapinska kiselina) i flavonoidi (katehin, epikatehin, kvercetin, kemferol, luteolin, apigenin i izoramnetin). Rezultati su prikazani u Tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Polifenolna jedinjenja i njihov sadržaj u ekstraktima i soku korena rena dobijeni HPLC metodom

Polifenolna jedinjenja	Uzorci rena								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	J9
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/L
Galna kiselina	3,338 ±0,167	1,867 ±0,092	1,993 ±0,091	0,213 ±0,010	0,321 ±0,013	0,529 ±0,024	0,183 ±0,008	0,597 ±0,026	1,381 ±0,063
Protokatehinska kiselina	0	0	0	0	0,029 ±0,001	0,029 ±0,001	0,360 ±0,017	0	0,067 ±0,002
Epikatehin	0	0	2,797 ±0,135	0	0,063 ±0,003	0	0,048 ±0,002	0	0
Katehin	33,172 ±1,659	8,363 ±0,416	12,444 ±0,620	1,237 ±0,059	1,632 ±0,076	0,752 ±0,032	1,230 ±0,059	1,066 ±0,052	7,097 ±0,351
Ferulna kiselina	0,012 ±0,001	0	0,449 ±0,020	0,031 ±0,001	0	0	0	0,004 ±0,001	0,009 ±0,003
Kafena kiselina	0,142 ±0,006	0	0,013 ±0,001	0	0	0	0	0,003 ±0,001	0,007 ±0,002
Siringinska kiselina	3,647 ±0,182	0,436 ±0,020	0	0,103 ±0,004	0,117 ±0,004	0,058 ±0,002	0,021 ±0,001	0,081 ±0,003	0,158 ±0,006
Sinapinska kiselina	0,651 ±0,032	0	0,107 ±0,003	0	0	0	0	0,005 ±0,001	0,002 ±0,001
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,658 ±0,081	0	0,088 ±0,004	0,013 ±0,001	0	0	0	0,006 ±0,002	0,009 ±0,002
Hlorogenska kiselina	0,036 ±0,001	0	0,196 ±0,008	0	0	0,015 ±0,001	0,003 ±0,001	0	0,017 ±0,001
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	6,684 ±0,333	0,261 ±0,012	0	0,107 ±0,004	0,153 ±0,006	0	0,140 ±0,006	0	0,635 ±0,029
Izoferulna kiselina	0,024 ±0,001	0	0	0,041 ±0,002	0	0,020 ±0,002	0	0,011 ±0,001	0
Kvercetin	0,226 ±0,011	0,016 ±0,001	0	0,042 ±0,001	0	0,002 ±0,001	0	0	0
Kempferol	0	0,089 ±0,003	0	0,017 ±0,001	0	0	0	0	0
Luteolin	0,007 ±0,001	0	0	0	0	0	0	0	0
Apigenin	0,022 ±0,001	0	0	0	0	0	0	0	0
Izoramnetin	0,020 ±0,001	0	0	0,003 ±0,001	0	0	0	0	0
Total	49,64	11,34	18,08	1,81	2,31	1,40	1,98	1,77	9,38

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD.

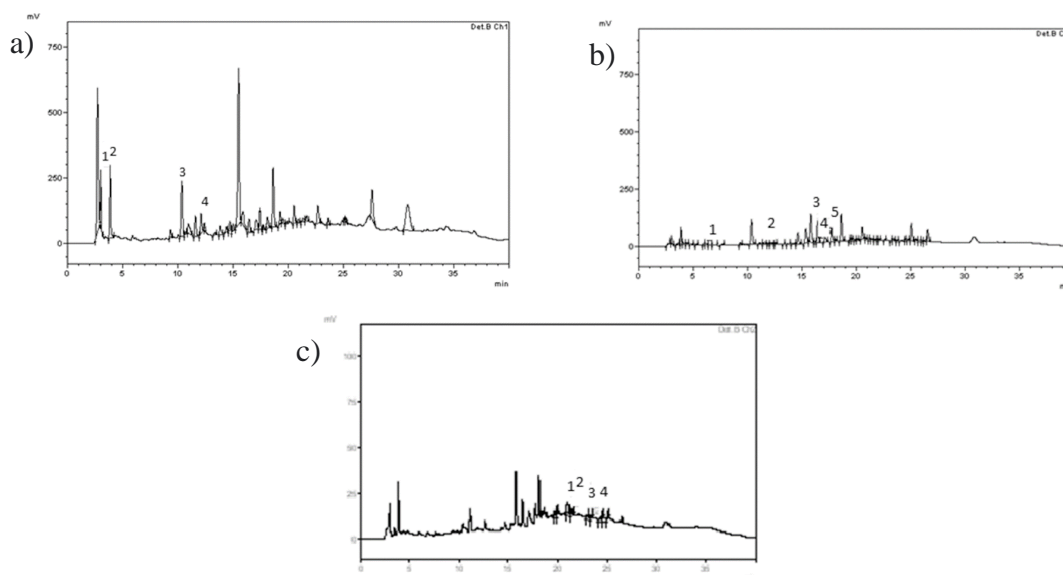
Svi ekstrakti korena rena sadržali su katehin (0,75–33,17 mg/g) i galnu kiselinu (0,18–3,34 mg/g). Najveći sadržaj polifenola bio je prisutan u dihlormetanskom ekstraktu pulpe korena rena E1 (49,64 mg/g) i dihlormetanskom ekstraktu soka korena rena E3 (18,09 mg/g).

Najveći sadržaj katehina (8,36–33,17 mg/g) i galne kiseline (1,87–3,34 mg/g) izmeren je u ekstraktima E1, E2 i E3. Ekstrakt E1 je sadržao i veće koncentracije (>1) *p*-hidroksibenzojeve (6,68 mg/g), siringinske (3,65 mg/g) i *p*-kumarinske kiseline (1,66 mg/g), dok je ekstrakt E3 sadržao veće koncentracije epikatehina (2,80 mg/g).

Najveći sadržaj sinapinske kiseline (0,65 mg/g), kvercetina (0,23 mg/g), kafene kiseline (0,14 mg/g), izoramnetina (0,02 mg/g), apigenina (0,02 mg/g) i luteolina (0,01 mg/g) izmeren je u ekstraktu E1, a ferulne (0,45 mg/g) i hlorogenske kiseline (0,20 mg/g) u ekstraktu E3, protokatehinske kiseline (0,36 mg/g) u ekstraktu E7, kemferola (0,09 mg/g) u ekstraktu E2, a izoferulne kiseline (0,04 mg/g) u ekstraktu E4. (Tabela 5.1.)

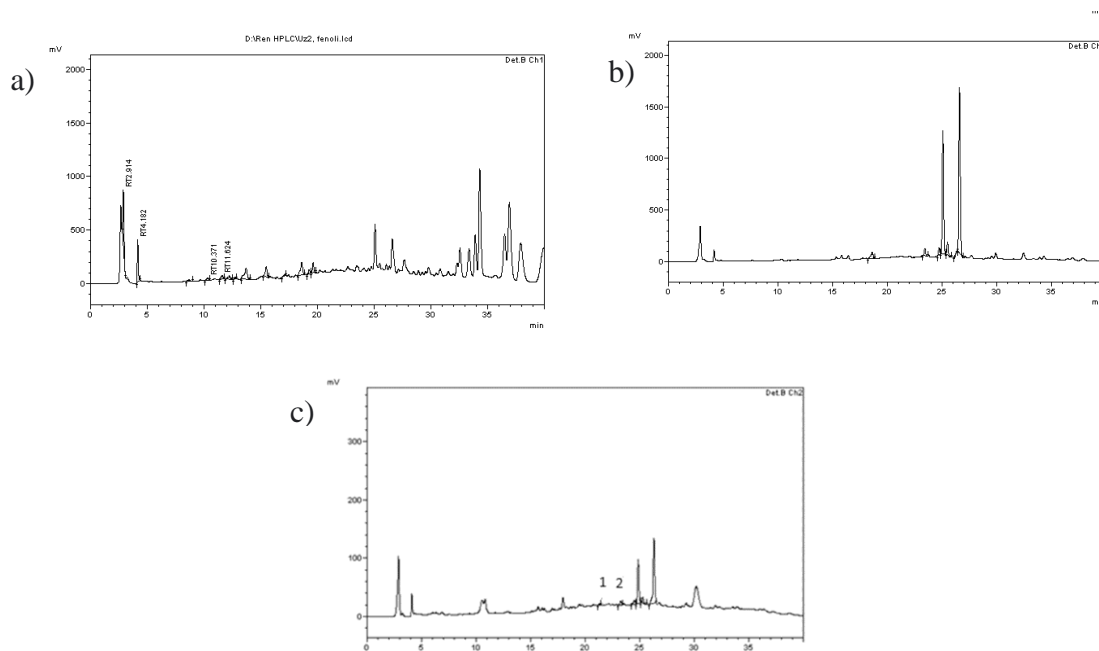
Sok korena rena J9, sadržao je veće koncentracije katehina (7,10 mg/L) i galne kiseline (1,38 mg/L), dok su *p*-hidroksibenzojeva (0,64 mg/L), siringinska (0,16 mg/L), protokatehinska (0,07 mg/L), hlorogenska (0,02 mg/L), *p*-kumarinska (0,01 mg/L), ferulna (0,01 mg/L), kafena (0,01 mg/L) i sinapinska kiselina (0,02 mg/L) bile prisutne u manjim količinama. (Tabela 5.1.)

Sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenti, kvantifikovan na 280, 320 ili na 360 nm, u zavisnosti od njihovog maksimalnog odgovora, prikazan je na HPLC hromatogramima za ekstrakte korena rena: E1, E2 i E4 (Slika 5.1., Slika 5.2. i Slika 5.3.)

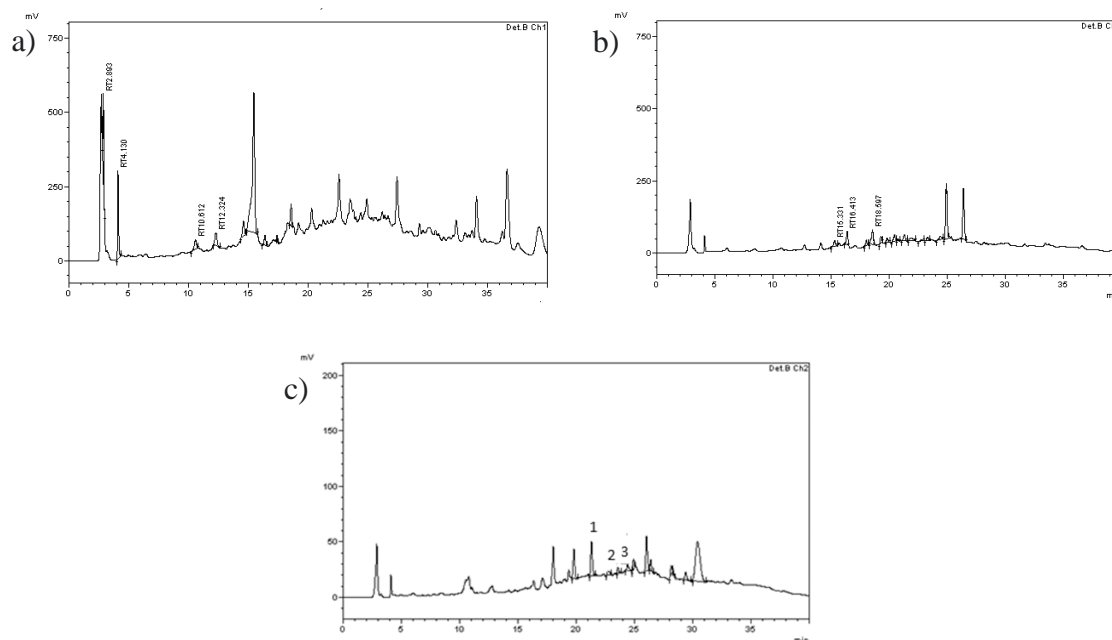


Slika 5.1. Hromatogrami ekstrakta E1 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm (1 – galna kiselina; 2 – katehin; 3 – *p*-hidroksibenzojeva kiselina; 4 – siringinska kiselina) b) 320 nm (1 – hlorogenska kiselina; 2 – kafena kiselina; 3 – *p*-

kumarinska kiselina; 4 – ferulna kiselina; 5 – sinapinska kiselina) i c) 360 nm (1 – kvercetin; 2 – luteolin; 3 – apigenin; 4 – izoramnetin)



Slika 5.2. Hromatogrami ekstrakta E2 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm (1 – kvercetin; 2 – kemferol)



Slika 5.3. Hromatogrami ekstrakta E4 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm (1 – kvercetin; 2 – kemferol; 3 – izoramnetin)

5.2. *In vitro* antitumorska aktivnost ekstrakata i soka korena rena

5.2.1. Rezultati ispitivanja ćelijskog rasta (SRB test) nakon 48 h izlaganja ekstraktima i soku korena rena

U cilju ispitivanja potencijalne antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena, određivali smo njihov antiproliferativni efekat na sledećim ćelijskim linijama: HeLa, MCF7, HT-29, MRC-5, A549, H-4-II-E, MDA-MB-231, Hs249T, HepG2 i PC-3, po dizajnu *in vitro* eksperimenta, opisanog u materijalu i metodama. Efekat delovanja ispitivanih ekstrakata i soka korena rena na rast ćelijskih linija prikazan je u Tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Efekat delovanja ekstrakata i soka rena na rast odabranih ćelijskih linija nakon 48h (SRB test)

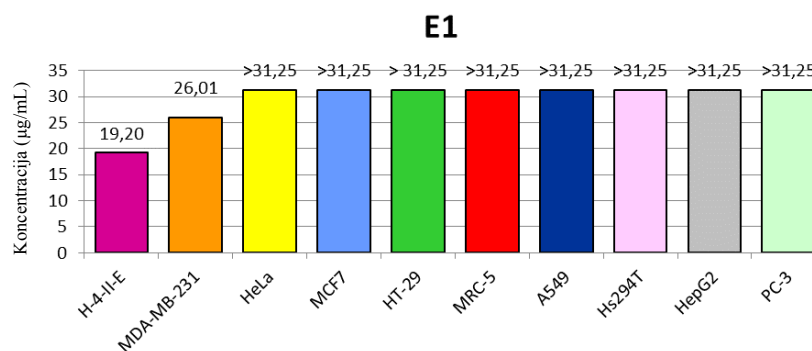
	HeLa	MCF7	HT-29	MRC-5	A549	H-4-II-E	MDA-MB-231	Hs294T	HepG2	PC-3
Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/mL)									
E1	>31,25 ^c	>31,25 ^c	>31,25 ^b	>31,25 ^c	>31,25 ^b	19,19 ±3,51 ^b	26,01 ±2,45 ^c	>31,25 ^c	>31,25 ^c	>31,25 ^b
E2	21,31 ±4,30 ^b	16,54 ±1,2 ^b	28,46 ±0,54 ^b	18,80 ±3,88 ^b	28,11 ±3,57 ^b	17,63 ±0,88 ^b	19,44 ±3,82 ^b	20,66 ±3,00 ^b	15,42 ±0,46 ^b	>31,25 ^b
E3	>31,25 ^c	18,52 ±2,19 ^b	>31,25 ^b	16,74 ±0,3 ^b 3	>31,25 ^b	19,41 ±3,45 ^b	26,50 ±4,15 ^c	>31,25 ^c	>31,25 ^c	>31,25 ^b
E4	4,66 ±1,09 ^a	6,54 ±0,66 ^a	12,17 ±2,84 ^a	7,10 ±1,87 ^a	11,43 ±3,77 ^a	3,49 ±1,24 ^a	5,52 ±1,47 ^a	6,70 ±1,81 ^a	5,68 ±1,54 ^a	9,01 ±1,89 ^a
E5	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^e	>500 ^g	>500 ^e	>500 ^e	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^d
E6	239,86 ±81,98 ^e	146,97 ±4,3 ^e	460,97 ±11,28 ^e	240,34 ±40,2 ^e	354,7±1 1,0 ^d	>500 ^e	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^d
E7	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^e	>500 ^g	>500 ^e	>500 ^e	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^f	>500 ^d
E8	>125 ^d	>125 ^d	>125 ^c	>125 ^d	>125 ^c	>125 ^c	114,52 ±0,28 ^d	>125 ^d	109,76 ±9,7 ^d	>125 ^c
J9 ^e	241,72 ^e	494,76 ^f	348,43 ^d	286,23 ^f	923,28 ^f	275,26 ^d	317,93 ^e	437,52 ^e	411,80 ^e	799,52 ^e
Sok	IC ₅₀ (razblaženje)									
J9 ^d	1596,04 ±386,77	779,77 ±67,48	1140,26 ±135,54	1347,86 ±63,72	417,86 ±3,61	1401,57 ±240,37	1213,49 ±97,68	881,79 ±161,8	936,86 ±79,22	482,54 ±33,47

Ispitivanja sa koncentracijama u nivou od 1,95–31,25^a, 7,81–125^b i 31,25–500^c µg/mL

Ispitivanja sa razblaženjima u nivou od 200–3200^d ili sa koncentracijama u nivou od 0,12–19,33^e mg/mL (računato na suhu masu soka, koncentracija soka korena rena bila je 385,80 mg/mL). Srednje vrednosti označene različitim slovima (a-g) za nivo značajnosti ($p < 0,05$). Računato za masenu koncentraciju ekstrakata i soka korena rena

Najsnažniju antiproliferativnu aktivnost ispoljili su ekstrakti korena rena E4, E2, E3 i E1, a dobijene IC₅₀ vrednosti bile su u uskom opsegu koncentracija (IC₅₀ = 3,49–28,46 µg/mL).

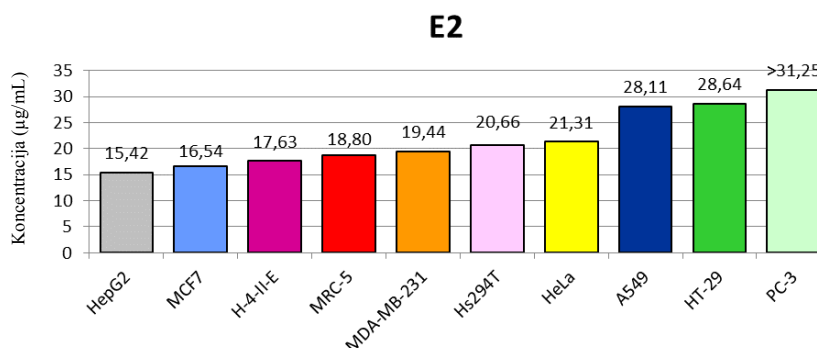
Rezultati uticaja ekstrakta E1 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.1.



Grafikon 5.1. Koncentracije ekstrakta E1 (µg/mL) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

Ekstrakt E1 je naj snažnije delovao na ćelijske linije karcinoma jetre pacova ($IC_{50}^{H-4-II-E} = 19,19 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma dojke ($IC_{50}^{MDA-MB-25} = 26,01 \mu\text{g/mL}$).

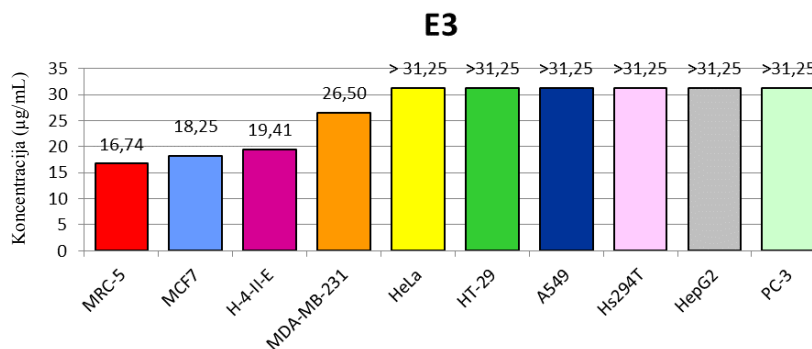
Rezultati uticaja ekstrakta E2 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.2.



Grafikon 5.2. Koncentracije ekstrakta E2 (µg/mL) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

U ispitivanom opsegu koncentracija ekstrakt E2 je delovao citotoksično na sve ćelijske linije ($IC_{50} = 15,42 - 28,46 \mu\text{g/mL}$), osim na ćelije karcinoma prostate (PC-3; $IC_{50} > 31,25 \mu\text{g/mL}$). Najniže IC_{50} vrednosti dobijene delovanjem ekstrakta E2 bile su prema ćelijskim linijama karcinoma jetre ($IC_{50}^{HepG2} = 15,42 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma dojke ($IC_{50}^{MCF7} = 16,54 \mu\text{g/mL}$).

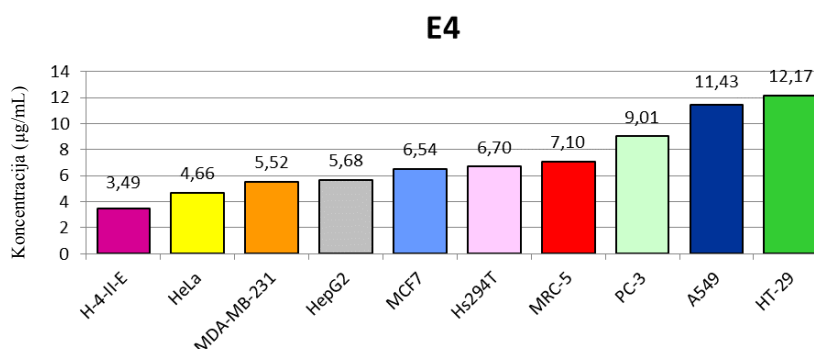
Rezultati uticaja ekstrakta E3 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.3.



Grafikon 5.3. Koncentracije ekstrakta E3 ($\mu\text{g/mL}$) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

Ekstrakt E3 je najsnažnije delovao na ćelijske linije zdravih pluća ($\text{IC}_{50}^{\text{MRC-5}} = 16,74 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma dojke ($\text{IC}_{50}^{\text{MCF7}} = 18,52 \mu\text{g/mL}$).

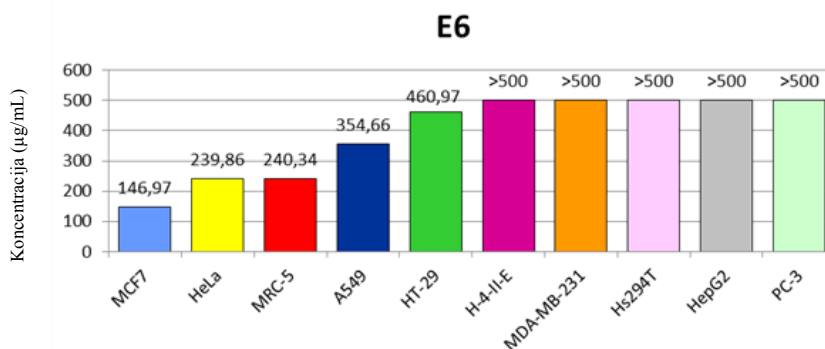
Rezultati uticaja ekstrakta E3 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.4.



Grafikon 5.4. Koncentracije ekstrakta E4 ($\mu\text{g/mL}$) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

Ekstrakt E4 je ispoljio najsnažnije i neselektivno citotoksično delovanje prema svim ispitivanim ćelijskim linijama ($\text{IC}_{50} = 3,49\text{--}12,17 \mu\text{g/mL}$), sa najsnažnijim delovanjem na ćelijsku liniju karcinoma jetre pacova ($\text{IC}_{50}^{\text{H4-II-E}} = 3,49 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma grlića materice ($\text{IC}_{50}^{\text{HeLa}} = 4,66 \mu\text{g/mL}$).

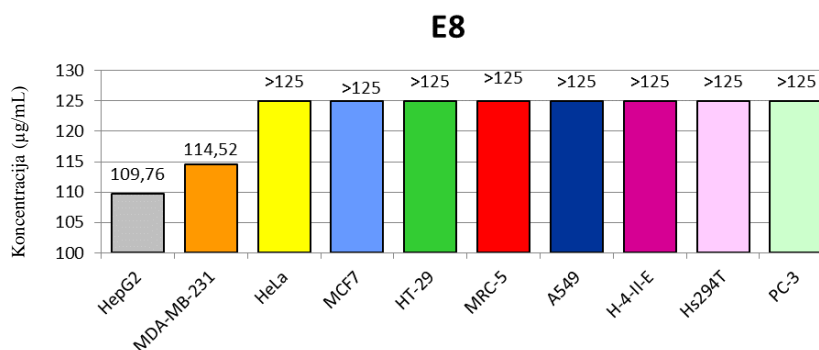
Rezultati uticaja ekstrakta E6 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.5.



Grafikon 5.5. Koncentracije ekstrakta E6 (µg/mL) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

Ekstrakt E6 je najbolji efekat ispoljio prema ćelijskoj liniji karcinoma grlića materice ($IC_{50}^{HeLa} = 239,86 \mu\text{g/mL}$).

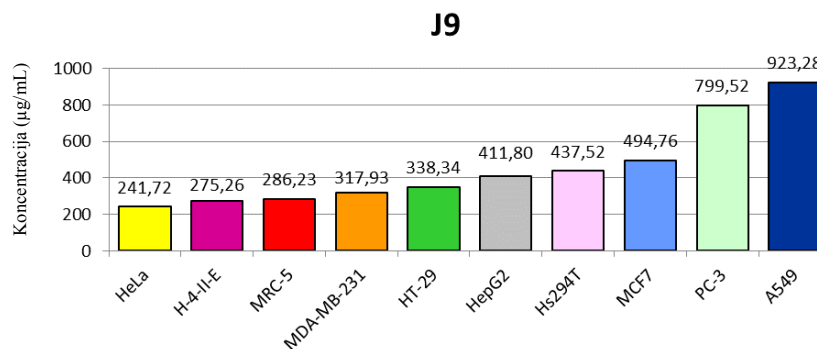
Rezultati uticaja ekstrakta E8 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonu 5.6.



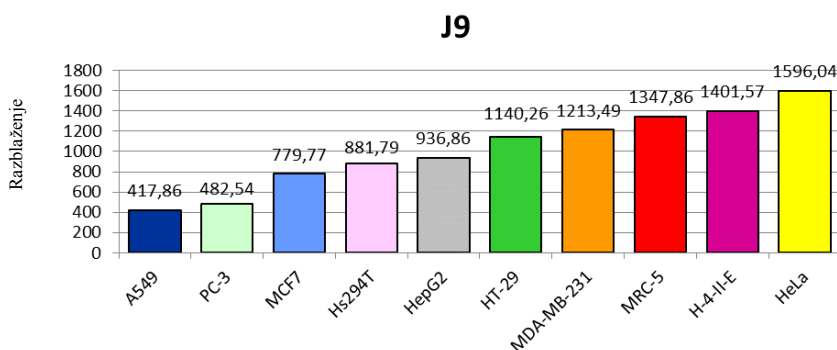
Grafikon 5.6. Koncentracije ekstrakta E8 (µg/mL) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

Ekstrakt E8 je najbolji efekat ispoljio prema ćelijskoj liniji karcinoma jetre ($IC_{50}^{HepG2} = 109,76 \mu\text{g/mL}$).

Rezultati uticaja soka korena rena J9 na rast ispitivanih ćelijskih linija prikazani su u Tabeli 5.2. i na Grafikonima 5.7. i 5.8.



Grafikon 5.7. Koncentracije soka J9 (µg/mL) koje dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija



Grafikon 5.8. Razblaženja soka J9 koja dovode do 50% inhibicije rasta (IC_{50}) ispitanih ćelijskih linija

Delovanjem soka korena rena J9, dobijene su IC_{50} vrednosti na svim ispitivanim ćelijskim linijama u opsegu razblaženja od 418 do 1600. Najsnažnije antiproliferativno delovanje soka korena rena J9 (u jedinicama razblaženja) zabeleženo je prema karcinomu grlića materice ($IC_{50}^{HeLa} = 1596,04$), karcinomu jetre pacova ($IC_{50}^{H-4-II-E} = 1401,57$), ali i prema ćelijama izvedenim od zdravog tkiva ($IC_{50}^{MRC-5} = 1347,86$).

Ekstrakti korena rena E5 i E7 u ispitivanom opsegu koncentracija nisu doveli do 50% inhibicije ćelijskog rasta (IC_{50}) kod ispitivanih ćelijskih linija.

5.2.2. Ne-tumor/tumor IC₅₀ odnos (NT/T) ekstrakata i recipročni T/NT odnos (u jedinicama razblaženja) za delovanje soka korena rena

U cilju utvrđivanja razlika u delovanju ekstrakata i soka korena prema tumorskim i ćelijama izvedenim od zdravog tkiva, i njihove eventualne primene u antitumorskoj terapiji, izračunati su ne-tumor/tumor IC₅₀ odnosi (NT/T) za ekstrakte i recipročni T/NTodnosi (u jedinicama razblaženja) za delovanje soka korena rena. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.3. koja sledi.

Tabela 5.3. Ne tumor/tumor (NT/T) odnos za ekstrakte i sok (1/NT/T) nakon 48h delovanja na različite ćelijske linije

Ekstrakt/Ćelijske linije	HeLa	MCF7	HT-29	A549	H-4-II-E	MDA-MB-231	Hs294T	HepG2	PC-3
Ekstrakt					NT/T				
E1		1	1	1	1,63	1,2	1	1	1
E2	0,88	1,14	0,66	0,67	1,07	0,97	0,91	1,22	<0,6
E3	<0,54	0,9	<0,54	<0,54	0,86	0,63	<0,54	<0,54	<0,54
E4	0,21	1,08	0,58	0,62	2,03	1,29	1,06	1,25	0,79
E5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E6	1	1,64	0,52	0,68	<0,48	<0,48	<0,48	<0,48	<0,48
E7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E8	1	1	1	1	1	>1,09	1	>1,14	1
Sok					1/NT/T*				
J9	1,18	0,58	0,85	0,31	1,04	0,90	0,65	0,69	0,36

* Računato za razblaženje soka

Ekstrakti korena rena E1, E2, E4, E8, i soka korena rena J9, pokazali su povoljne odnose delovanja NT/T i T/NT (>1) prema određenim ćelijskim linijama.

Povoljni odnosi dobijeni su delovanjem ekstrakta E1 na ćelijske linije karcinoma jetre pacova ($NT/T^{H-4-II-E} = 1,63$) i karcinoma dojke ($NT/T^{MDA-MB-231} = 1,2$).

Ekstrakt E2 pokazao je povoljne odnose delovanja na ćelijske linije karcinoma dojke ($NT/T^{MCF7} = 1,14$) i karcinoma jetre pacova ($NT/T^{H-4-II-E} = 1,07$ i $NT/T^{HepG2} = 1,22$).

Povoljni odnosi dobijeni su delovanjem ekstrakta E4 na ćelijske linije: karcinoma dojke ($NT/T^{MDA-MB-231} = 1,29$ i $NT/T^{MCF7} = 1,08$), karcinoma jetre pacova ($NT/T^{H-4-II-E} = 2,03$ i $NT/T^{HepG2} = 1,25$) i karcinoma kože ($NT/T^{Hs294T} = 1,06$).

Ekstrakt E6 je pokazao povoljan odnos delovanja samo na ćelijskoj liniji karcinoma dojke ($NT/T^{MCF7} = 1,64$).

Povoljni odnosi dobijeni su delovanjem ekstrakta E8 na ćelijske linije karcinoma dojke ($NT/T^{MDA-MB-231} = 1,09$) i karcinoma jetre ($NT/T^{HepG2} = 1,14$).

Sok J9 pokazao je povoljan odnos delovanja samo na ćelijskoj liniji karcinoma cerviksa ($T/NT^{HeLa} = 1,18$).

Prema većem broju ćelijskih linija ekstrakti i sok korena rena pokazali su nepovoljne NT/T i T/NT odnose (<1), ukazujući na njihovo snažnije delovanje prema ćelijama izvedenim od zdravog tkiva nego prema ćelijama tumora.

5.2.3. Rezultati ispitivanja mehanizma ćelijske smrti

Ekstrakt korena rena E4 i sok korena rena J9 pokazali su najbolje antiproliferativne aktivnosti prema ispitivanim ćelijskim linijama, pa je određivan i mehanizam njihovog delovanja, tako da su testirani na sposobnost indukcije apoptoze i nekroze ELISA tehnikom, *in vitro*. Ukoliko je odnos $efA/efN > 1$, mehanizam ćelijske smrti ide u pravcu apoptoze, dok ukoliko je odnos $efA/efN < 1$, to upućuje na nekrozu kao mehanizam ćelijske smrti. Rezultati su prikazani u Tabelama 5.4. i 5.5.

Tabela 5.4. Indukcija apoptoze i nekroze delovanjem ekstrakta E4

Ćelijska linija	Uzorak	APOPTOZA			NEKROZA			efA/efN
		AVG (apsorbanca)	AVG-blank	efA (AVG test/AVG kontrole)	AVG (apsorbanca)	AVG-blank	efN (AVG test/AVG kontrole)	
HeLa	E4	0,361	0,304	0,738	0,058	0,001	1	0,74
	Kontrola (DMSO)	0,468	0,411		0,058	0,001		
MCF7	E4	0,351	0,294	0,995	0,062	0,005	5	0,20
	Kontrola (DMSO)	0,352	0,295		0,058	0,001		
HT-29	E4	0,807	0,750	0,986	0,066	0,009	4,5	0,22
	Kontrola (DMSO)	0,818	0,761		0,059	0,002		

efA – faktor apoptoze

efN – faktor nekroze

Ekstrakt korena rena E4 pokazao je smanjenu sposobnost indukcije apoptoze ($efA = 0,74-1$), dok je indukcija nekroze bila visoka ($efN = 1-4,5$), pa je vrednost indeksa efikasnosti apoptoze bila niska ($efA/efN = 0,22-0,74$) na ćelijskim linijama karcinoma cerviksa (HeLa), adenokarcinoma dojke (MCF7) i adenokarcinoma debelog creva (HT-29).

Tabela 5.5. Indukcija apoptoze i nekroze delovanjem soka J9 korena rena

Ćelijska linija	Uzorak	APOPTOZA			NEKROZA			efA/efN
		AVG (apsorb anca)	AVG-blank	efA (AVG test/AVG kontrole)	AVG (apsorb anca)	AVG-blank	efN (AVG test/AVG kontrole)	
HeLa	J9	1,503	1,446	4,732	0,088	0,031	4,428	1,07
	Kontrola (0,9% NaCl)	0,363	0,306		0,064	0,007		
HT-29	J9	1,807	1,750	2,587	0,079	0,022	2,750	0,94
	Kontrola (0,9% NaCl)	0,734	0,677		0,065	0,008		

efA – faktor apoptoze

efN – faktor nekroze

Sok korena rena J9 pokazao je visoku indukciju apoptoze ($efA = 2,59-4,73$), ali je i indukcija nekroze bila jednako izražena ($efN = 2,75-4,43$), što je kao rezultat dovelo do niskih vrednosti indeksa efikasnosti apoptoze ($efA/efN = 0,94-1,07$) na ćelijskim linijama karcinoma cerviksa (HeLa) i adenokarcinoma debelog creva (HT-29).

5.3. *In vivo* antitumorska i hepatoprotektivna aktivnost ekstrakata i soka korena rena

In vivo ispitivanja u disertaciji rađena su sa ekstraktima korena rena koji su pokazali najbolje antitumorsko delovanje prilikom *in vitro* ispitivanja: E1, E2, E3, E4 i E8, i sa sokom korena rena J9.

5.3.1. *In vivo* antitumorska aktivnost ekstrakata i soka korena rena prema ćelijama

Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

U ovom poglavlju su prikazani rezultati *in vivo* ispitivanja citotoksičnih, antioksidantnih/prooksidantnih i hepatoprotektivnih/hepatotoksičnih efekata ekstrakata E1, E2, E3, E4, E8 i soka korena rena J9.

5.3.1.1. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na zapreminu ascita

Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) i broj i vijabilnost ćelija EAK

Promena u zapremini ascita EAK, broju ćelija i vijabilnosti ćelija EAK, praćene su pre, tokom i posle primene ekstrakata i soka korena rena u odnosu na momenat implantacije EAK, a dobijeni rezultati su poređeni sa vrednostima ovih parametara u netretiranim ćelijama EAK, kao i

u ćelijama EAK nakon njihovog tretmana antioksidansom N-acetil-L-cisteinom (NALC). Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na zpreminu ascita *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK), na broj ćelija EAK i vijabilnost ćelija EAK

Ekstrakt, sok ili kontrola	Zapremina ascita EAK (mL)			Broj ćelija EAK ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			Vijabilnost ćelija EAK (% oštećenih ćelija EAK)		
	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman
EAK kontrola	7,17 \pm 0,28			120,65 \pm 0,62			8,78 \pm 0,91		
E1	1,90 \pm 0,49 ^{*#b}	2,00 \pm 0,57 ^{*#c}	15,93 \pm 0,34 ^{*#bc}	98,60 \pm 8,21 ^{ab}	133,92 \pm 3,79 ^a	164,67 \pm 7,73 ^{*#b}	5,20 \pm 1,17 ^{*#}	4,08 \pm 1,10 ^{*#}	4,40 \pm 0,56
E2	2,24 \pm 0,48 ^{*#b}	1,98 \pm 0,31 ^{*#c}	5,33 \pm 0,33 ^{*#bc}	110,20 \pm 6,93	111,42 \pm 4,82	82,63 \pm 5,76 ^{*#}	5,40 \pm 1,02 ^{*#b}	4,17 \pm 1,07 ^{*#c}	25,23 \pm 11,21 ^{*#bc}
E3	1,92 \pm 0,48 ^{*#b}	1,76 \pm 0,31 ^{*#}	0,90 \pm 0,40 ^{*#b}	98,60 \pm 8,21 ^b	109,41 \pm 13,65 ^c	67,75 \pm 7,25 ^{*#bc}	5,20 \pm 1,17 ^{*#b}	5,40 \pm 1,02 ^{*#c}	45,00 \pm 11,00 ^{*#bc}
E4	1,95 \pm 0,58 ^{*#ab}	3,18 \pm 0,21 ^{*#ac}	5,43 \pm 0,57 ^{*#bc}	97,30 \pm 14,59	117,33 \pm 17,81	126,83 \pm 6,20	7,00 \pm 1,58 ^{*#}	6,67 \pm 1,02 [#]	9,07 \pm 1,92
E8	1,27 \pm 0,50 ^{*#b}	2,10 \pm 0,52 ^{*#c}	6,50 \pm 2,18 ^{#bc}	104,83 \pm 15,51 ^b	124,13 \pm 5,41	144,83 \pm 25,07 ^{*b}	7,00 \pm 1,41 ^{*#}	6,00 \pm 0,71 ^{*#}	6,33 \pm 1,53
J9	1,40 \pm 0,34 ^{*#b}	2,18 \pm 0,59 ^{*#bc}	4,30 \pm 1,02 ^{*#c}	86,41 \pm 13,15 ^{*b}	106,33 \pm 12,87	134,38 \pm 6,46 ^b	6,67 \pm 1,21 ^{*#}	5,50 \pm 1,22 ^{*#}	8,50 \pm 2,01
NALC ¹	3,82 \pm 0,39 ^{*#ab}	6,20 \pm 0,22 ^{*#ac}	9,75 \pm 0,28 ^{*#bc}	109,83 \pm 2,15	129,83 \pm 4,13	130,68 \pm 3,37	9,28 \pm 0,76	8,15 \pm 0,98	8,08 \pm 1,24

¹N-acetil-L-cistein

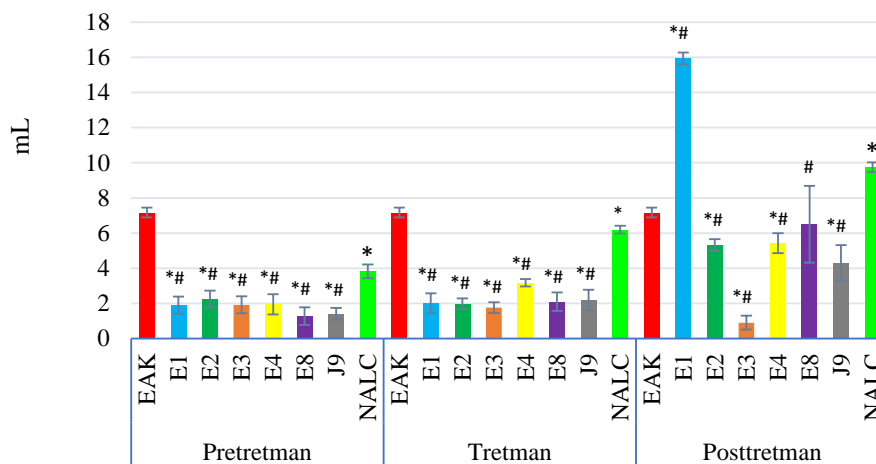
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n=6)

* Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu EAK (p<0,05)

Statistički značajna razlika u odnosu NALC grupu (p<0,05)

Različita slova (a-c) u svakom redu označavaju statistički značajnu razliku između grupa (pretretman, posttretman ili tretman) (p < 0,05)

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na zapreminu ascita *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.6. i na Grafikonu 5.9.

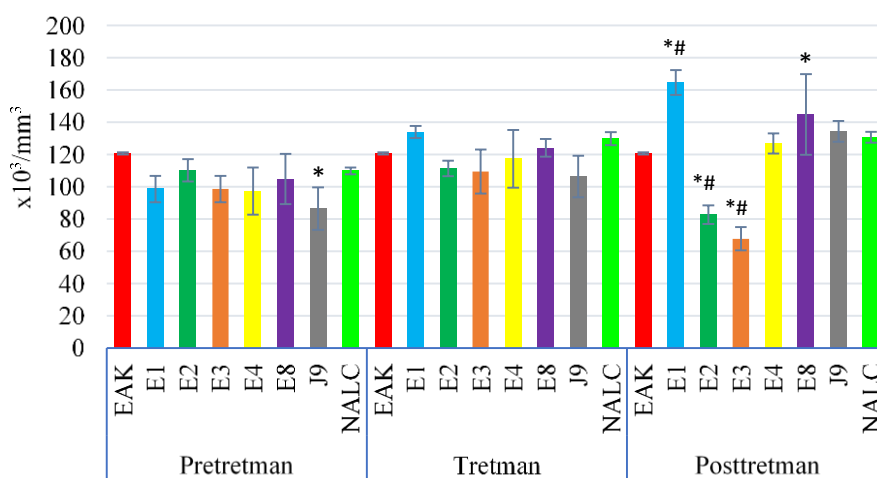


Grafikon 5.9. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na zapreminu ascita *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Prilikom pretretmana životinja sa ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 pre aplikacije EAK došlo je do značajnog smanjenja zapremine ascita EAK, u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Značajno smanjenje zapremine ascita EAK postojalo je prilikom primene antioksidansa NALC kao pretretmana ($p < 0,0005$) i tretmana ($p = 0,033$), u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Međutim, prilikom posttretmana životinja antioksidansom NALC došlo je do značajnog povećanja zapremine ascita EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Značajno smanjenje zapremine ascita EAK uočeno je kod tretmana ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 u odnosu na vrednosti dobijene u EAK kontrolnoj grupi ($p < 0,0005$). Prilikom posttretmana životinja ekstraktima E2 ($p = 0,006$), E3 ($p < 0,0005$) i E4 ($p = 0,017$) i sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$), postojalo je značajno smanjenje zapremine ascita EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Takođe, u posttretmanu životinja, ekstrakti E2–E8 i sok korena rena J9, pokazali su značajno smanjenje zapremine ascita EAK, u odnosu na NALC grupu ($p < 0,0005$). Najbolje efekte na smanjenje zapremine ascita EAK ispoljili su ekstrakt korena rena E3 i sok korena rena J9 – bilo da su primenjeni kao pretretman, tretman ili posttretman, u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

Nije postojala razlika u efektima ekstrakata i soka rena između pretretmana i tretmana (osim za E4 i E8). Postojala je razlika u efektima ekstrakata i soka rena između pretretmana i posttretmana (osim za E3). Postojala je, takođe, i razlika u efektima ekstrakata i soka rena između tretmana i posttretmana (osim za E3) (Tabela 5.6.).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na broj ćelija Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.6. i na Grafikonu 5.10.

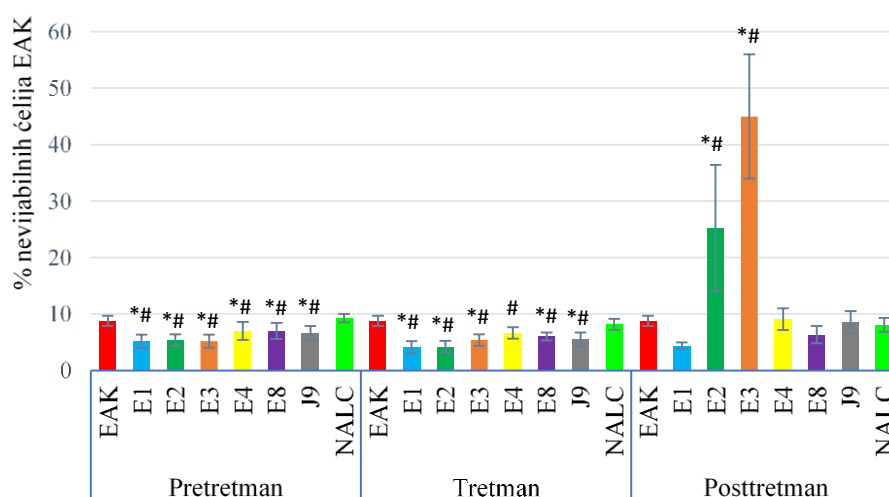


Grafikon 5.10. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na broj ćelija EAK

NALC kao antioksidans – bilo da je primenjen kao pretretman, tretman ili posttretman – nije značajno uticao na smanjenje broja ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu. U grupama životinja pretretiranih ekstraktima korena rena E1–E8 nije postojalo značajno smanjenje broja ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p = 0,472$). Takođe, prilikom tretmana životinja ekstraktima E1–E8 nije došlo do značajne promene broja ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p = 0,842$). Pretretman životinja sa sokom korena rena J9 uticao je na značajno smanjenje broja ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu ($p < 0,026$). Značajno smanjenje broja ćelija EAK postojalo je u posttretmanu životinja ekstraktima korena rena E2 ($p = 0,001$) i E3 ($p < 0,0005$) u odnosu na EAK kontrolu. Posttretmani ekstraktima E1 i E8 uticali su na povećanje broja ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu ($p < 0,0005$). Nije postojala razlika u efektima ekstrakata i soka rena između pretretmana i tretmana.

Zabeležena je razlika u efektima ekstrakata i soka korena rena J9 između pretretmana i posttretmana (osim za E4). Postojala je razlika u efektima ekstrakata korena rena između tretmana i posttretmana (osim za E4).

Rezultati uticaja ekstrakata i soka korena rena na vijabilnost ćelija Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.6. i na Grafikonu 5.11.



Grafikon 5.11. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na vijabilnost ćelija EAK

Primena antioksidansa NALC nije značajno menjala vijabilnost ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu, bez obzira na vreme njegove aplikacije. U grupama životinja koje su pre aplikacije EAK bile pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 postojao je efekat smanjenja procenta oštećenih ćelija EAK u odnosu na vrednosti EAK kontrole. Sličan efekat uočen je i u grupama životinja koje su istovremeno sa implantacijom EAK bile tretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9. Kod posttretmana, postojalo je značajno povećanje procenta nevijabilnih ćelija EAK, kada su primenjeni ekstrakti korena rena E2 ($p < 0,0005$) i E3 ($p < 0,0005$) u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Nije postojala razlika u efektima ekstrakata i soka korena rena između pretretmana i tretmana, kao ni između pretretmana i posttretmana (osim za E2 i E3). Nije postojala razlika u efektima ekstrakata i soka rena između tretmana i posttretmana (osim za E2, E3).

5.3.1.2. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na antioksidantni status ćelija *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Promene antioksidantnog statusa ćelija EAK praćene su merenjem promena aktivnosti antioksidantnih enzima superoksid dismutaze (SOD), ksantin oksidaze (XOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSHPx) i glutation reduktaze (GR), kao i merenjem promena količine redukovanog glutationa (GSH) i intenziteta lipidne peroksidacije (LPx). Promene navedenih parametara praćene su pre, tokom i posle tretmana ekstraktima i sokom korena rena, u odnosu na momenat implantacije EAK. Dobijeni rezultati su poređeni sa vrednostima ovih parametara u netretiranim ćelijama EAK, kao i u ćelijama EAK nakon njihovog tretmana antioksidansom, NALC.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost SOD, XOD i CAT u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost SOD, XOD i CAT u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Ekstrakt, sok ili kontrola	SOD			XOD			CAT		
	(U/mg proteina)			(μmol/mL ćelija EAK)					
	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman
EAK kontrola	19,78±2,53			0,15±0,004			0,52±0,03		
E1	35,14±1,46 ^{*#ab}	12,95±1,88 ^{*a}	9,92±0,45 ^{*#b}	0,70±0,10 ^{*#ab}	0,22±0,02 ^{*#a}	0,14±0,02 ^b	0,22±0,01 ^{*#ab}	0,36±0,03 ^{*#ac}	0,55±0,01 ^{bc}
E2	23,52±1,40 ^{*#b}	21,82±0,99 ^{#c}	31,10±2,33 ^{*#bc}	0,35±0,03 ^{*#ab}	0,43±0,02 ^{*#ac}	0,95±0,03 ^{*#bc}	0,43±0,03 ^{*#ab}	0,20±0,05 ^{*#a}	0,16±0,03 ^{*#b}
E3	33,74±4,21 ^{*#ab}	19,88±0,96 ^{#ac}	47,95±0,49 ^{*#bc}	0,79±0,06 ^{*#a}	0,15±0,01 ^{#ac}	0,89±0,02 ^{*#c}	0,14±0,03 ^{*#ab}	0,49±0,01 ^{ac}	0,31±0,003 ^{*#bc}
E4	13,35±0,83 ^{*#ab}	9,76±0,88 ^{*#ac}	20,23±1,39 ^{#bc}	0,35±0,03 ^{*#ab}	0,15±0,01 ^{#a}	0,15±0,003 ^b	0,37±0,01 ^{*#ab}	0,47±0,01 ^a	0,49±0,01 ^b
E8	28,33±1,22 ^{*#ab}	15,04±0,50 ^{*#ac}	11,63±6,84 ^{*#bc}	0,36±0,03 ^{*#a}	0,16±0,005 ^{#ac}	0,31±0,32 ^{*#c}	0,39±0,01 ^{*#ab}	0,48±0,02 ^{ac}	0,57±0,29 ^{bc}
J9	28,00±2,57 ^{*#ab}	20,44±2,73 ^{#ac}	14,03±1,08 ^{*#bc}	0,62±0,05 ^{*#ab}	0,19±0,08 ^{#a}	0,15±0,01 ^b	0,13±0,02 ^{*#ab}	0,47±0,14 ^a	0,54±0,03 ^b
NALC ¹	9,20±0,64 ^{*#ab}	14,03±0,54 ^{*#ac}	18,00±2,74 ^{*#bc}	0,92±0,05 ^{*#ab}	0,84±0,04 ^{*#ac}	0,26±0,03 ^{bc}	0,50±0,004	0,54±0,04	0,56±0,03

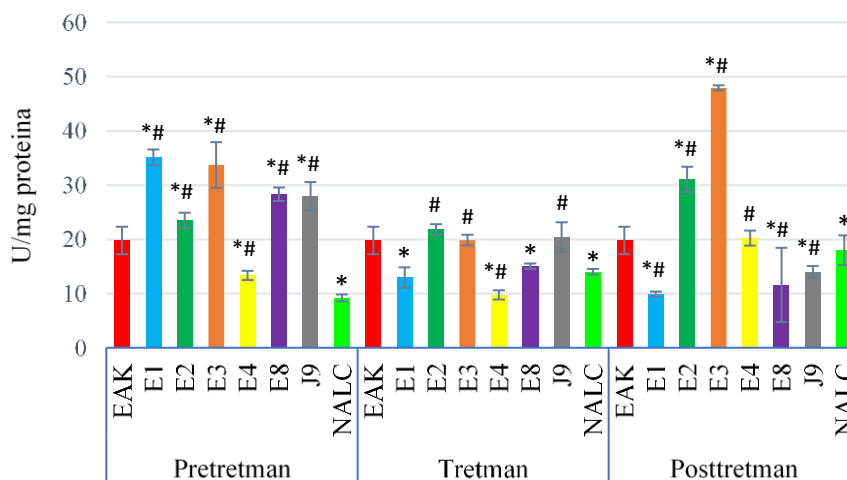
¹N-acetil-L-cistein

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n=6)

* Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu EAK (p<0,05)

Statistički značajna razlika u odnosu NALC grupu (p<0,05)

Različita slova (a-c) u svakom redu označavaju statistički značajnu razliku između grupa (pretretman, posttretman ili tretman) (p < 0,05)

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost SOD, u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.7. i na Grafikonu 5.12.**Grafikon 5.12.** Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost SOD u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

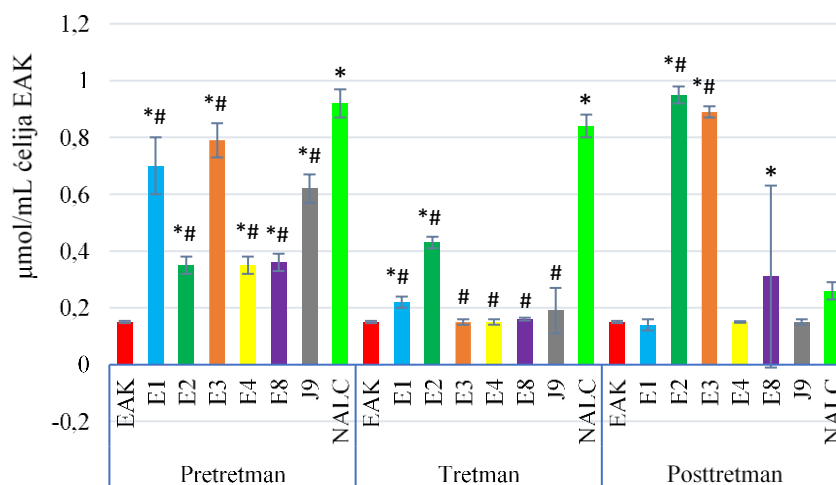
Kod pretretmana životinja ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p = 0,007$), E3 ($p < 0,0005$) i E8 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$), pre implantacije EAK, uočeno je značajno povećanje aktivnosti SOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Kod grupa životinja pretretiranih ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 došlo je do značajnog povećanja aktivnosti SOD u ćelijama EAK u odnosu na NALC grupu ($p < 0,0005$). Aktivnost SOD u ćelijama EAK značajno je smanjena u grupama životinja pretretiranih sa NALC i ekstraktom korena rena E4, u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$).

Aktivnost SOD u ćelijama EAK kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p < 0,0005$), kao i sa NALC ($p < 0,0005$) bila je značajno snižena, dok ekstrakti E2 i E3 i sok korena rena J9 nisu značajno uticali na promenu aktivnosti enzima u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Utvrđena je značajno povećana aktivnost SOD u ćelijama EAK u grupama životinja tretiranih ekstraktima E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$) u odnosu na grupu tretiranu sa NALC, dok ekstrakti E1 i E8 nisu značajno uticali na promenu aktivnosti enzima u odnosu na NALC grupu. Značajno smanjenje aktivnosti SOD pokazao je tretman ekstraktom E4 ($p < 0,0005$) u odnosu na grupu tretiranu sa NALC.

Kod posttretmana životinja ekstraktima E1 ($p < 0,0005$) i E8 ($p = 0,001$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,005$) postojalo je značajno sniženje aktivnosti SOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Značajno povećanje aktivnosti SOD u ćelijama EAK uočeno je u grupama životinja posttretiranih ekstraktima E2 i E3 u odnosu na odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Do značajnog smanjenja aktivnosti SOD u ćelijama EAK došlo je prilikom posttretmana ekstraktima E1 ($p = 0,001$) i E8 ($p = 0,007$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,050$) u odnosu na grupu posttretiranu sa NALC.

Utvrđena je razlika u efektima ekstrakata i soka korena rena, između pretretmana i tretmana (osim za E2). Utvrđena je, takođe, i razlika u efektima svih ekstrakata i soka korena rena, između pretretmana i posttretmana, kao i između tretmana i posttretmana.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost XOD u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.7. i Grafikonu 5.13.



Grafikon 5.13. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost XOD u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Svi ekstrakti, sok korena rena i NALC prilikom pretretmana, značajno su povećali aktivnost XOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Najveći porast aktivnosti XOD u ćelijama EAK ispoljio se prilikom pretretmana sa NALC ($0,92 \pm 0,05$; $p < 0,0005$) i tretmana sa NALC ($0,84 \pm 0,04$; $p < 0,0005$) u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Najveći porast aktivnosti XOD u ćelijama EAK u pretretmanu ispoljio je ekstrakt E3 ($0,79 \pm 0,06$; $p < 0,0005$), dok je pretretman ekstraktom E2 ($0,35 \pm 0,03$; $p < 0,0005$) najmanje uticao na porast aktivnosti XOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

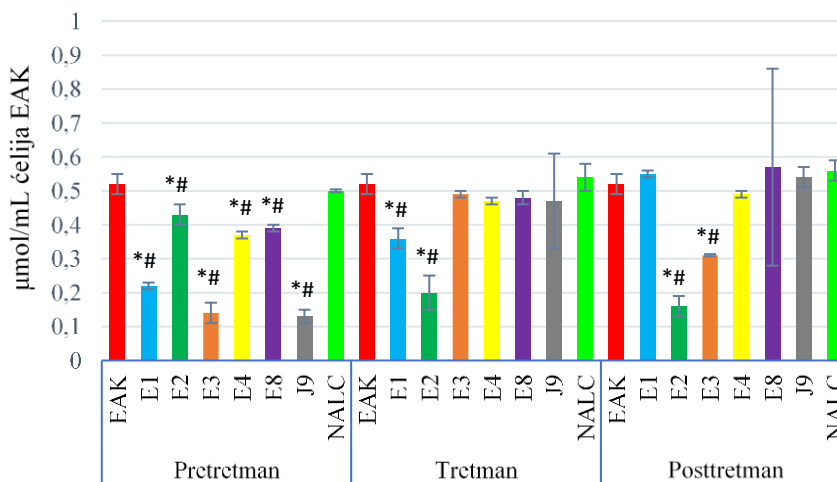
Tretmani ekstraktima E1 ($p < 0,0005$) i E2 ($p < 0,0005$) značajno su povećali aktivnost XOD u ćelijama EAK, dok tretmani ostalim ekstraktima i sokom korena rena nisu značajno uticali na promene aktivnosti XOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

Veliko povećanje aktivnosti XOD u ćelijama EAK registrovano je u grupama posttretiranim ekstraktima E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$) i E8 ($p = 0,001$), dok ostali ekstrakti i sok korena rena J9 nisu uticali na značajnu promenu aktivnosti XOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Takođe, veliko povećanje aktivnosti XOD u ćelijama EAK registrovano je u grupama posttretiranim ekstraktima E2 i E3 u odnosu na NALC grupu ($p < 0,0005$).

Popostojala je razlika u efektima svih ekstrakata i soka korena rena, između pretretmana i tretmana. Postojala je, takođe, i razlika u efektima ekstrakata (osim za E3 i E8) i soka korena rena

J9, između pretretmana i posttretmana. Uočena je značajna razlika u efektima ekstrakata (osim za E1 i E4) i soka korena rena J9 između tretmana i posttretmana.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost CAT u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.7. i na Grafikonu 5.14.



Grafikon 5.14. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost CAT u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Pretretmani životinja svim ekstraktima i sokom korena rena značajno su smanjili aktivnost CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$) i grupu pretretiranu sa NALC ($p < 0,0005$). Pretretman sa NALC ($p = 0,236$) nije uticao na promenu aktivnosti CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. Najveće smanjenje aktivnosti CAT u ćelijama EAK, tokom pretretmana pokazali su ekstrakt korena rena E3 i sok korena rena J9 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$).

Prilikom tretmana životinja ekstraktima i sokom korena rena uočeno je značajno smanjenje aktivnosti CAT u ćelijama EAK sa ekstraktima korena rena E1 i E2 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Ostali ekstrakti (E3, E4, E8), sok korena rena i NALC, nisu uticali na značajnu promenu aktivnosti CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu, pri čemu se njihove vrednosti nisu međusobno značajno razlikovale.

U posttretmanu značajno smanjenje aktivnosti CAT u ćelijama EAK pokazali su ekstrakti korena rena E2 i E3 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($< 0,0005$). Ostali ekstrakti (E1, E4, E8), sok korena rena, kao i NALC primenjeni kao posttretman nisu značajno menjali aktivnost CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu, pri čemu se njihove vrednosti nisu međusobno značajno razlikovale.

Postojala je razlika u efektima ekstrakata i soka korena rena između pretretmana i tretmana, kao i između pretretmana i posttretmana. Takođe, postojala je razlika u efektima ekstrakata (osim za E2, E4) i soka korena rena J9 između tretmana i posttretmana.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na intenzitet lipidne peroksidacije LPx, aktivnost enzima GSHPx i GR, i sadržaj GSH u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na intenzitet LPx i antioksidantnu aktivnost u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma

Eks-trakt, sok, NALC ili kontrola	LPx			GSHPx			GR			GSH		
	(µmol MDA/mL ćelija EAK)			(µmol/mL ćelija EAK)			(µmol/mL ćelija EAK)			(nmol GSH/mL ćelija EAK)		
	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman	Pre-tretman	Tretman	Post-tretman
EAK kontrola	0,031±0,001			0,79±0,04			2,24±0,02			1,64±0,02		
E1	0,051±0,00 3*#	0,052±0,00 9*#	0,056±0,006*#	1,00±0,03*#	0,89±0,1 1# ^c	1,04±0,0 1*# ^c	3,12±0,0 5*# ^{ab}	2,64±0,2 7*# ^{ac}	2,43±0,3 2# ^{bc}	1,44±0,0 5*#	1,44±0,0 8*#	1,48±0,15*#
E2	0,040±0,01 2*# ^b	0,037±0,00 3*# ^c	0,062±0,008*# bc	1,38±0,18*# ^a b	0,94±0,0 8*# ^a	1,04±0,0 4*# ^b	2,78±0,0 7*# ^{ab}	2,40±0,1 8# ^a	2,44±0,1 1*# ^b	1,30±0,0 4*# ^b	1,30±0,0 6*# ^c	1,408±0,11 *# ^{bc}
E3	0,048±0,00 6*# ^{ab}	0,039±0,00 4*# ^{ac}	0,032±0,003 bc	0,81±0,13 ^{ab}	0,63±0,2 1*# ^{ac}	1,05±0,1 4*# ^{bc}	3,42±0,2 1*# ^{ab}	3,02±0,1 2*# ^{ac}	2,46±0,3 0# ^{bc}	1,42±0,0 6*# ^b	1,42±0,1 4*# ^c	1,12±0,11*# bc
E4	0,074±0,01 5*# ^{ab}	0,053±0,00 4*# ^a	0,046±0,016*# b	1,43±0,16*# ^a b	1,22±0,1 6*# ^{ac}	0,86±0,0 5# ^{bc}	4,09±0,1 5*# ^{ab}	3,58±0,2 5*# ^{ac}	3,03±0,0 9*# ^{bc}	1,07±0,0 2*# ^{ab}	1,30±0,0 6*# ^{ac}	1,43±0,06*# bc
E8	0,031±0,00 3	0,030±0,00 5	0,032±0,007	1,05±0,15*# b	1,04±0,1 3*# ^c	0,77±0,1 0# ^{bc}	2,16±0,0 9	2,22±0,0 7#	2,16±0,0 8#	1,57±0,0 3*#	1,60±0,0 4	1,62±0,03
J9	0,028±0,00 6	0,028±0,00 5	0,028±0,001	0,74±0,03	0,75±0,0 4#	0,77±0,0 7#	1,56±0,0 6*# ^{ab}	1,81±0,2 0*# ^{ac}	2,08±0,1 3# ^{bc}	1,66±0,0 3 ^{ab}	1,54±0,0 7*# ^{ac}	1,44±0,08*# bc
NALC ¹	0,033±0,00 2	0,026±0,00 5	0,027±0,002	0,73±0,08 ^{ab}	0,55±0,0 2*# ^a	0,59±0,0 1*# ^b	2,12±0,0 6 ^{ab}	1,84±0,0 3*# ^{ac}	1,55±0,0 3*# ^{bc}	1,65±0,0 2	1,65±0,0 3	1,62±0,05

¹N-acetil-L-cistein

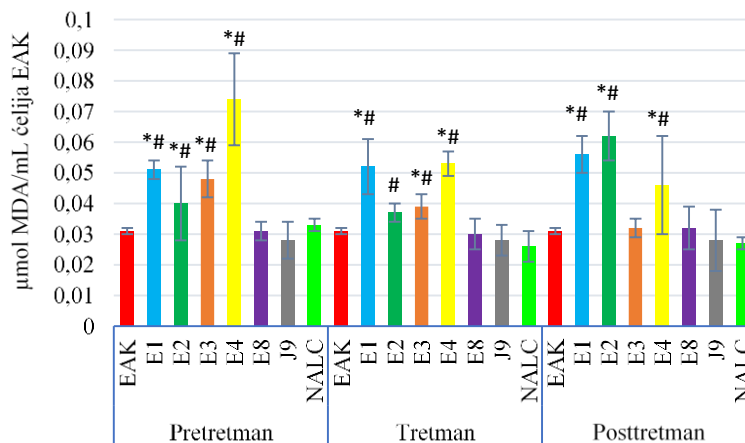
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n=6)

* Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu EAK ($p < 0,05$)

Statistički značajna razlika u odnosu NALC grupu ($p < 0,05$)

Različita slova (a-c) u svakom redu označavaju statistički značajnu razliku između grupa (pretretman, posttretman ili tretman) ($p < 0,05$)

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na intenzitet lipidne peroksidacije LPx u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.8. i na Grafikonu 5.15.



Grafikon 5.15. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na intenzitet LPx u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Kod pretretmana životinja na povećanje intenziteta lipidne peroksidacije LPx ćelija EAK delovali su ekstrakti korena rena E1–E4 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Kod životinja pretretiranih sa NALC kao antioksidansom nije došlo do povećanja intenziteta oksidativnog oštećenja, nego su vrednosti LPx ostale u granicama bliskim EAK kontrolnoj grupi ($p = 0,619$). Pretretmani životinja ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p = 0,046$), E3 ($p < 0,0005$) i E4 ($p < 0,0005$) uticali su na povećanje intenziteta LPx u ćelijama EAK u odnosu na grupu pretretiranu sa NALC.

Tokom tretmana životinja ekstrakti korena rena E1 ($p < 0,0005$), E3 ($p = 0,019$) i E4 ($p < 0,0005$) izazvali su značajno viši stepen oksidativnog oštećenja membranskih lipida ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Kod životinja tretiranih ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p = 0,002$), E3 ($p = 0,001$) i E4 ($p < 0,0005$) stepen oksidativnog oštećenja membranskih lipida ćelija EAK bio je značajno viši u odnosu na grupu tretiranu antioksidansom NALC.

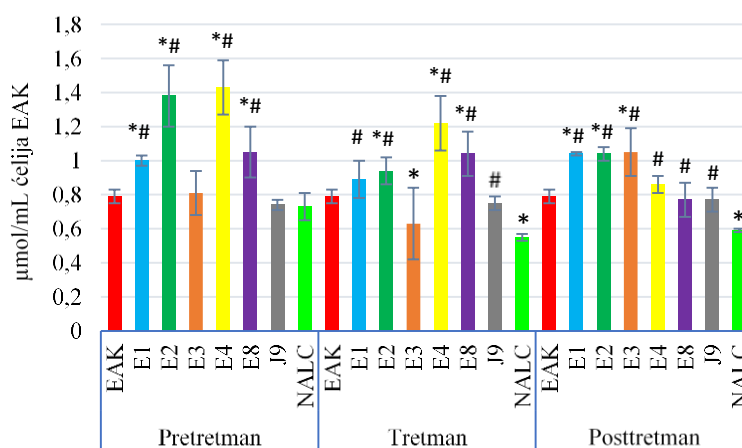
Značajno povećanje intenziteta LPx u ćelijama EAK prilikom posttretmana pokazali su ekstrakti korena rena E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$) i E4 ($p = 0,004$) u odnosu na EAK kontrolnu grupu. U posttretmanu su takođe značajno povećanje intenziteta LPx u ćelijama EAK ispoljili

ekstrakti korena rena E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$) i E4 ($p = 0,002$) u odnosu na antioksidans NALC.

Sok korena rena J9 – bilo da je primenjen na životinje kao pretretman, tretman ili posttretman – nije uticao na značajnu promenu intenziteta lipidne peroksidacije LPx u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu i NALC grupu.

Postojala je razlika u efektima ekstrakata E3 i E4 između pretretmana i tretmana. Postojala je razlika u efektima ekstrakata E2–E4 između pretretmana i posttretmana. Postojala je razlika u efektima ekstrakata E2 i E3 između tretmana i posttretmana.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost enzima GSHPx u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.8. i na na Grafikonu 5.16.



Grafikon 5.16. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost GSH-Px u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Kod pretretmana životinja postojalo je značajno povećanje aktivnosti GSHPx u ćelijama EAK ekstraktima korena rena E1 ($p = 0,005$), E2 ($p < 0,0005$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p < 0,0005$) u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Takođe, kod pretretmana životinja došlo je do značajnog povećanja aktivnosti GSHPx u ćelijama EAK ekstraktima: E1 ($p = 0,001$), E2 ($p < 0,0005$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p < 0,0005$) u odnosu na NALC grupu. Pretretman životinja sa NALC nije doveo do značajnog povećanja aktivnosti enzima, čije su vrednosti ostale u granicama EAK kontrolne grupe ($p = 0,392$).

Aktivnost GSHPx u ćelijama EAK nakon tretmana životinja ekstraktima korena rena E2 ($p = 0,030$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p = 0,001$) značajno se povećala u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Aktivnost GSHPx u ćelijama EAK nakon tretmana životinja ekstraktima korena rena E1

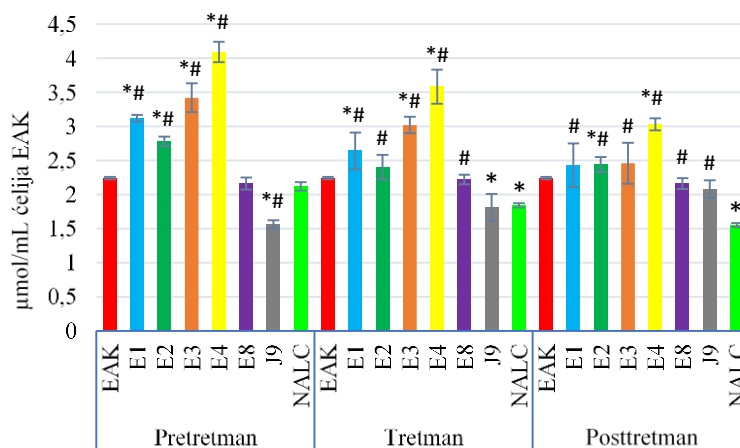
($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$), E4 ($p < 0,0005$), E8 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,006$) značajno se povećala u odnosu na NALC grupu.

Kod posttretmana životinja postojalo je značajno povećanje aktivnosti GSHPx u ćelijama EAK ekstraktima korena rena E1–E3 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Svi ekstrakti korena rena i sok korena rena u posttretmanu životinja značajno su povećali aktivnost GSHPx u ćelijama EAK u odnosu na grupu posttretiranu sa NALC ($p < 0,0005$).

Sok korena rena J9 – bilo da je primenjen kao pretretman, tretman ili posttretman – nije značajno uticao na promenu aktivnosti GSHPx u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

Postojala je razlika u efektima ekstrakata (osim za E1 i E8) između pretretmana i tretmana. Postojala je, takođe, i razlika u efektima ekstrakata (osim za E1) između pretretmana i posttretmana. Postojala je razlika u efektima ekstrakata (osim za E2) između tretmana i posttretmana.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost enzima GR u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.8. i na na Grafikonu 5.17.



Grafikon 5.17. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost enzima GR u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Aktivnost GR u ćelijama EAK bila je značajno povećana u grupama životinja pretretiranih ekstraktima korena rena E1–E4 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Isti ekstrakti korena rena E1–E4 u pretretmanu su takođe pokazali značajno višu aktivnost GR u ćelijama EAK u odnosu na grupu pretretiranu sa NALC ($p < 0,0005$).

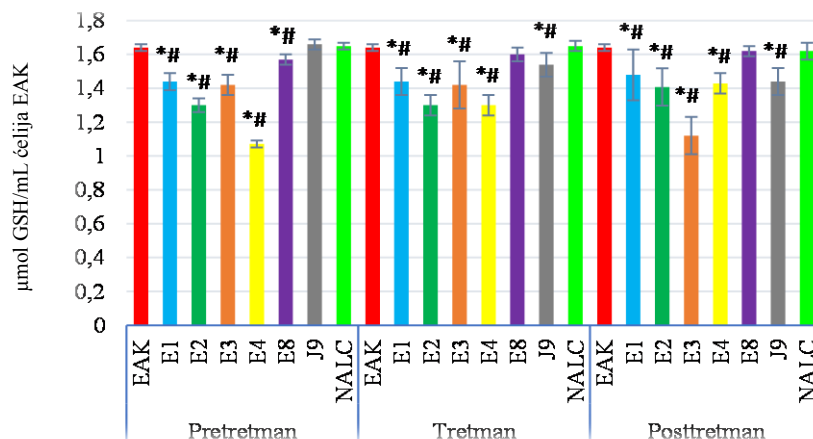
Kod grupa tretiranih životinja je takođe došlo do značajnog povećanja aktivnosti GR u ćelijama EAK ekstraktima korena rena E1–E4 u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Prilikom tretmana životinja svim ekstraktima korena rena došlo je do značajnog povećanja aktivnosti GR u ćelijama EAK u odnosu na grupu tretiranu sa NALC ($p < 0,0005$).

Do značajnog povećanja aktivnosti enzima GR u ćelijama EAK došlo je samo kod grupa životinja posttretiranih ekstraktima E2 ($p = 0,024$) i E4 ($p < 0,0005$), za razliku od ostalih ekstrakata i soka korena rena, čiji se efekti nisu razlikovali u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

Postojala je razlika u efektima ekstrakata (osim za E8) između pretretmana i tretmana. Isti trend je postojao i između pretretmana i posttretmana. Zabeležena je i razlika u efektima ekstrakata (osim za E2 i E8) između tretmana i posttretmana.

Smanjenje aktivnosti GR u ćelijama EAK nastalo je delovanjem soka korena rena J9 kada je aplikovan kao pretretman i tretman u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p < 0,005$). Tretman životinja sokom korena rena J9 nije menjao aktivnost GR u ćelijama EAK u odnosu na NALC grupu ($p = 0,787$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na sadržaj GSH u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK) prikazani su u Tabeli 5.8. i na Grafikonu 5.18.



Grafikon 5.18. Uticaj ekstrakata i soka korena rena i N-acetil-L-cisteina (NALC) na sadržaj GSH u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

Količine redukovano glutationa GSH bile su značajno niže u ćelijama EAK kod grupa životinja pretretiranih svim ekstraktima korena rena: E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p = 0,002$) u odnosu na njegove vrednosti u EAK kontrolnoj grupi. Došlo je, takođe, i do značajnog sniženja nivoa redukovano glutationa GSH u ćelijama

EAK kod grupa životinja pretretiranih svim ekstraktima korena rena: E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p = 0,002$), u odnosu na grupu pretretiranu sa antioksidansom NALC. Pretretman životinja sokom korena rena J9 nije doveo do promene količine GSH u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu ($p = 0,582$) i NALC grupu ($p = 0,747$).

Značajno smanjenje količine GSH u ćelijama EAK nastalo je kod grupa životinja tretiranih ekstraktima korena rena E1–E4 u odnosu na vrednosti EAK kontrolne grupe ($p < 0,0005$). Značajno smanjenje količine GSH u ćelijama EAK postojalo je kod grupa životinja tretiranih ekstraktima korena rena E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$) i E4 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,024$) u odnosu na NALC grupu.

Prilikom posttretmana životinja došlo je do značajnog sniženja nivoa redukovanog glutaciona GSH u ćelijama EAK ekstraktima korena rena E1 ($p = 0,005$), E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$) i E4 ($p = 0,001$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,001$) u odnosu na EAK kontrolnu grupu. Kod grupa životinja posttretiranih ekstraktima korena rena E1 ($p = 0,035$), E2 ($p = 0,001$), E3 ($p < 0,0005$) i E4 ($p = 0,008$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,006$) došlo je do značajnog sniženja nivoa redukovanog glutaciona GSH u ćelijama EAK u odnosu na grupu posttretiranu sa NALC.

Samo je za ekstrakt E4 i sok korena rena J9 postojala razlika u efektima između pretretmana i tretmana. Postojala je razlika u efektima ekstrakata E2–E4 i soka korena rena J9 između pretretmana i posttretmana, kao i razlika u efektima ekstrakata (osim za E1 i E8) i soka korena rena J9 između tretmana i posttretmana.

5.3.2. Ispitivanje hepatoprotektivne/hepatotoksične aktivnosti ekstrakata i soka korena rena kod *in vivo* oštećenja jetre indukovanog ugljen-tetrahloridom

Ispitivanje potencijalnih hepatoprotektivnih efekata ekstrakata i soka korena rena rađeno je *in vivo*, pre i posle administracije hepatotoksičnog ugljen-tetrahlorida. Ispitivani su samo efekti ekstrakata korena rena koji su pokazali najbolje efekte prilikom *in vitro* ispitivanja: E1, E2, E3, E4 i E8 i sok korena rena J9.

5.3.2.1. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na telesnu masu i masu jetre životinja, sadržaj hepatične DNK i hidroksiprolina u homogenatu jetre životinja, pre i nakon intoksikacije CCl₄-om

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu telesne mase i mase jetre ispitivanih životinja, kao i na promenu količine hepatične DNK i hidroksiprolina u hidrolizatu jetre pre i nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom prikazani su u Tabeli 5.9.

Tabela 5.9. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄ na telesnu masu i masu jetre životinja, na sadržaj hepatične DNK i hidroksiprolina u hidrolizatu jetre miša

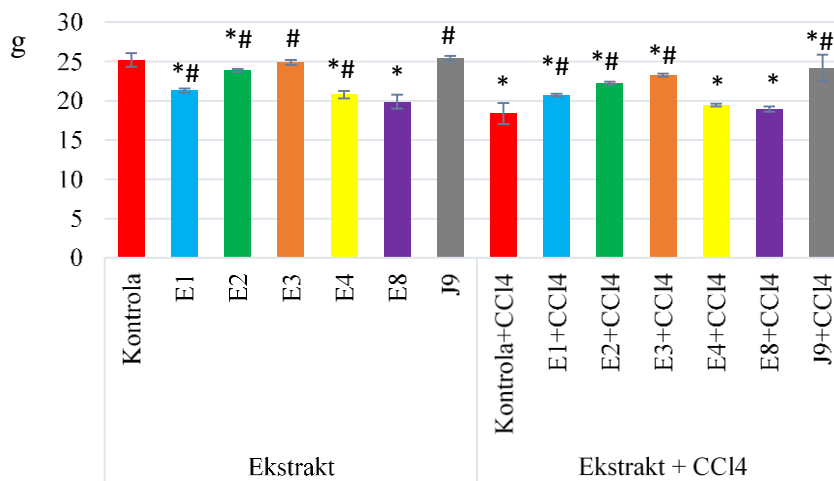
Uzorak	Telesna masa	Masa jetre	DNK	Hidroksiprolin
	(g)		(mg DNK/10 g t.m.)	(µg/100 mg hidrolizata jetre)
Kontrola	25,20±0,87	1,30±0,20	0,61±0,03	2,24±0,12
E1	21,28±0,28 ^{*,#}	0,93±0,02 ^{*,#}	0,43±0,02 [*]	7,27±0,02 ^{*,#}
E2	23,85±0,19 ^{*,#}	1,11±0,02 ^{*,#}	0,53±0,02 ^{*,#}	3,22±0,06 ^{*,#}
E3	24,88±0,33 [#]	1,11±0,03 ^{*,#}	0,69±0,04 ^{*,#}	2,98±0,20 ^{*,#}
E4	20,77±0,48 ^{*,#}	0,84±0,02 ^{*,#}	0,29±0,05 ^{*,#}	7,91±0,22 ^{*,#}
E8	19,87±0,89 [*]	0,73±0,02 ^{*,#}	0,35±0,02 [*]	6,66±0,37 ^{*,#}
J9	25,38±0,32 [#]	1,20±0,04 [#]	0,67±0,02 ^{*,#}	1,95±0,13 ^{*,#}
Kontrola+CCl ₄	18,37±1,34 [*]	0,55±0,06 [*]	0,38±0,04 [*]	9,56±0,22 [*]
E1+CCl ₄	20,70±0,18 ^{*,#}	0,85±0,02 ^{*,#}	0,40±0,04 [*]	7,87±0,17 ^{*,#}
E2+CCl ₄	22,23±0,20 ^{*,#}	1,15±0,02 ^{*,#}	0,46±0,05 ^{*,#}	5,24±0,03 ^{*,#}
E3+CCl ₄	23,25±0,19 ^{*,#}	1,23±0,02 [#]	0,56±0,02 ^{*,#}	4,35±0,18 ^{*,#}
E4+CCl ₄	19,45±0,19 [*]	0,73±0,03 ^{*,#}	0,29±0,04 ^{*,#}	8,88±0,23 ^{*,#}
E8+CCl ₄	18,95±0,33 [*]	0,50±0,05 [*]	0,35±0,03 [*]	8,51±0,03 ^{*,#}
J9+CCl ₄	24,17±1,71 ^{*,#}	1,20±0,10 ^{*,#}	0,65±0,03 ^{*,#}	3,76±0,20 ^{*,#}

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± SD (n=6)

^{*} Statistički značajno različito u odnosu na grupu Kontrola (p<0,05)

[#] Statistički značajno različito u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄ (p<0,05)

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu telesne mase životinja pre i nakon intoksikacije CCl_4 -om prikazani su u Tabeli 5.9. i na Grafikonu 5.19.

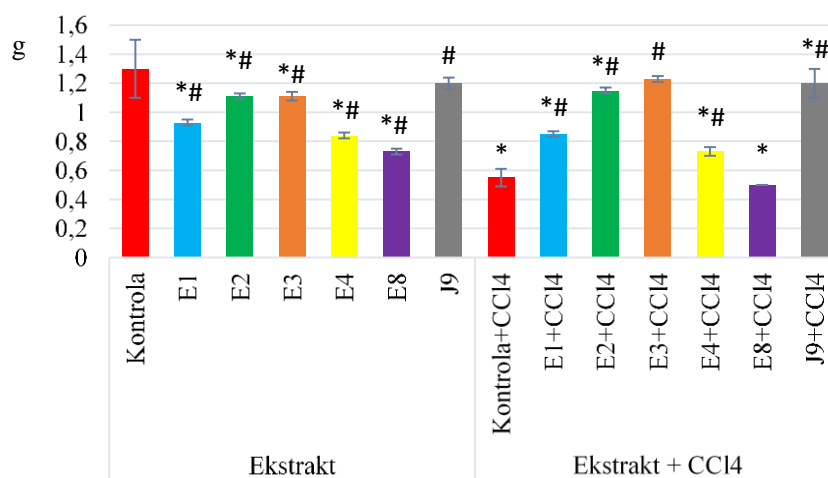


Grafikon 5.19. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl_4 -a na telesnu masu životinja

Telesna masa životinja bila je statistički značajno snižena u grupama tretiranim sa ekstraktima E1, E2, E4 i E8 u odnosu na kontrolnu grupu – Kontrola. U grupama životinja tretiranim ekstraktom E3 ($p = 0,325$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,567$) nije došlo do statistički značajne promene telesne mase životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl_4 -om pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 postojalo je statistički značajno sniženje mase životinja u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$), ali je uočena tendencija porasta vrednosti ka vrednosti kontrolne grupe. U grupi životinja tretiranim CCl_4 -om došlo je do značajnog smanjenja telesne mase u odnosu na netretirane životinje u kontrolnoj grupi ($p < 0,0005$).

Kod grupa životinja tretiranih svim ekstraktima (osim E8) i sokom korena rena J9 postojalo je statistički značajno povećanje telesne mase životinja u odnosu na kontrolnu grupu Kontrola+ CCl_4 ($p < 0,0005$). U grupama životinja koje su bile pretretirane ekstraktima E1, E2 i E3 i sokom korena rena J9 pre administracije CCl_4 -om uočeno je značajno povećanje telesne mase životinja u odnosu na kontrolnu grupu sa CCl_4 ($p < 0,0005$). Posebno su se istakli pretretmani ekstraktom E3 i sokom korena rena J9, koji su uspeli da ponište negativan efekat CCl_4 -a i održe telesnu masu životinja blisku vrednostima kontrolne grupe ($23,25 \pm 0,19$ i $24,17 \pm 1,71$ vs $25,20 \pm 0,87$, $p < 0,0005$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu mase jetre životinja pre i nakon intoksikacije CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.9. i na Grafikonu 5.20.

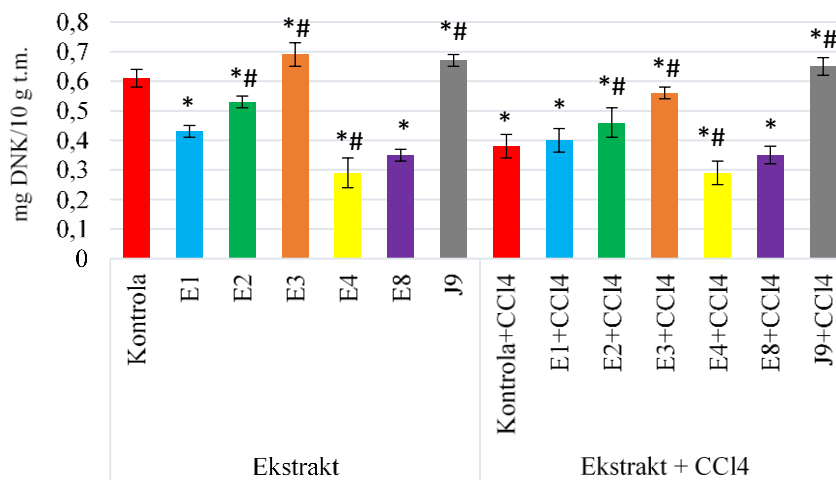


Grafikon 5.20. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na masu jetre životinja

U grupama životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 uočeno je značajno smanjenje mase jetre u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Tretman sokom korena rena J9 nije uticao na promenu mase jetre životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman ugljen-tetrahloridom je uticao na značajno smanjenje mase jetre kod tretiranih životinja u odnosu na netretirane životinje u kontrolnoj grupi ($p < 0,0005$). U grupama životinja koje su pre intoksikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1, E2, E4 i E8 uočeno je značajno smanjenje mase jetre u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Posebno su se izdvojili ekstrakt E3 ($p = 0,153$) i sok korena rena J9 ($p = 0,045$), koji su prilikom pretretmana uspeli da ponište negativan efekat hepatotoksičnog CCl₄ na masu jetre, čije vrednosti su ostale bliske vrednostima kontrolne grupe.

Kod grupa životinja tretiranih svim ekstraktima i sokom korena rena J9 postojalo je statistički značajno povećanje mase jetre životinja u odnosu na kontrolnu grupu sa CCl₄-om ($p < 0,0005$). Međutim, pretretmani ekstraktima E1–E4 i sokom korena rena J9 sprečili su značajno smanjenje mase jetre indukovano CCl₄-om (vrednosti su bile više) u odnosu na kontrolnu grupu sa CCl₄-om ($p < 0,0005$). Pretretman ekstraktom E8 uticao je na smanjenje mase jetre u odnosu na kontrolnu grupu sa CCl₄-om ($p < 0,0005$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na sadržaj hepatične DNK u homogenate jetre pre i nakon intoksikacije CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.9. i na Grafikonu 5.21.

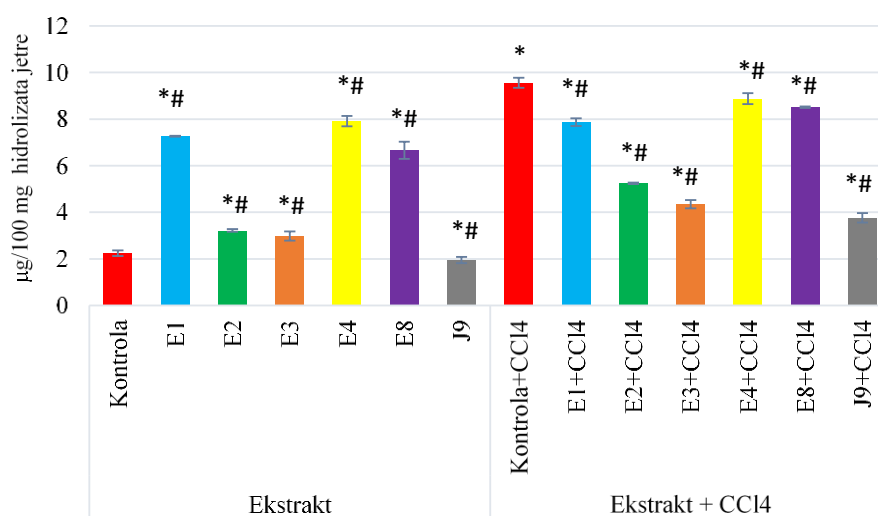


Grafikon 5.21. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na sadržaj hepatične DNK

Aplikacija hepatotoksičnog CCl₄-a dovela je do značajnog smanjenja količine hepatične DNK ($p < 0,0005$) kod tretiranih životinja u odnosu na vrednost u kontrolnoj grupi. Tretmani ekstraktima i sokom korena rena pokazali su različite efekte na promenu količine hepatične DNK u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Tretmani ekstraktom E3 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,002$) uticali su sna povećanje količine hepatične DNK u odnosu na kontrolnu grupu. Tretmani životinja ekstraktima E1–E3 i sokom korena rena J9 pokazali su sposobnost očuvanja količine hepatične DNK, dok su ekstrakti E4 i E8 uticali na smanjenje količine hepatične DNK u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 postojalo je statistički značajno povećanje količine hepatične DNK u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). U grupama životinja koje su pre intoksikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E2 i E3, ekstrakti su uspeli da kompenzuju toksičnost CCl₄ i spreče pad količine hepatične DNK u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. Pretretman sokom korena rena J9 pokazao je značajnu sposobnost očuvanja količine hepatične DNK, nasuprot toksičnom delovanju aplikovanog CCl₄-a u odnosu na kontrolnu grupu ($0,65 \pm 0,03$ vs $0,61 \pm 0,03$, $p < 0,0005$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena na sadržaj hidroksiprolina u hidrolizatu jetre pre i nakon intoksikacije CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.9. i na Grafikonu 5.22.



Grafikon 5.22. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na sadržaj hidroksiprolina u hidrolizatu jetre

Sadržaj hepatičnog hidroksiprolina, kao jednog od markera oštećenja jetre, značajno se povećao kod grupe životinja tretiranih CCl₄-om. Bio je 4,2 puta veći u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja tretiranih ekstraktima korena rena E1–E8 došlo je do povećanja sadržaja hidroksiprolina u homogenatu jetre, kao rezultata oštećenja jetre, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$), pri čemu je najmanji porast sadržaja hidroksiprolina uočeno u grupi tretiranoj ekstraktom E3. Tretman sokom korena rena J9 ($p = 0,015$) uspeo je da održi sadržaj hepatičnog nivoa hidroksiprolina bliskom vrednostima kontrolne grupe. U grupama životinja koje su pre intoksikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1–E8 došlo je do povećanja sadržaja hidroksiprolina u homogenatu jetre u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Pretretman sokom korena rena J9 ($3,76 \pm 0,20$; $p < 0,0005$) pre aplikacije CCl₄-a uspeo je donekle da kompenzuje toksičnost CCl₄-a i uticao je na najmanje povećanje sadržaja hidroksiprolina u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1–E3 i sokom korena rena J9 postojale su statistički značajno niže vrednosti hepatičnog hidroksiprolina u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). U grupama životinja koje su pre intoksikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena J9 postojalo je značajano sniženje sadržaja hidroksiprolina u homogenatu jetre u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

5.3.2.2. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na bihemijske parametre funkcije jetre, pre i nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom

Rezultati ispitivanja delovanja ekstrakata i soka korena rena na promenu aktivnosti enzima jetre ALT i AST, kao i na promenu koncentracije proteina i ukupnog bilirubina u krvi miševa, pre i posle oštećenja jetre indukovano CCl_4 -om prikazani su u Tabeli 5.10.

Tabela 5.10. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl_4 -a na bihemijske parametre funkcije jetre

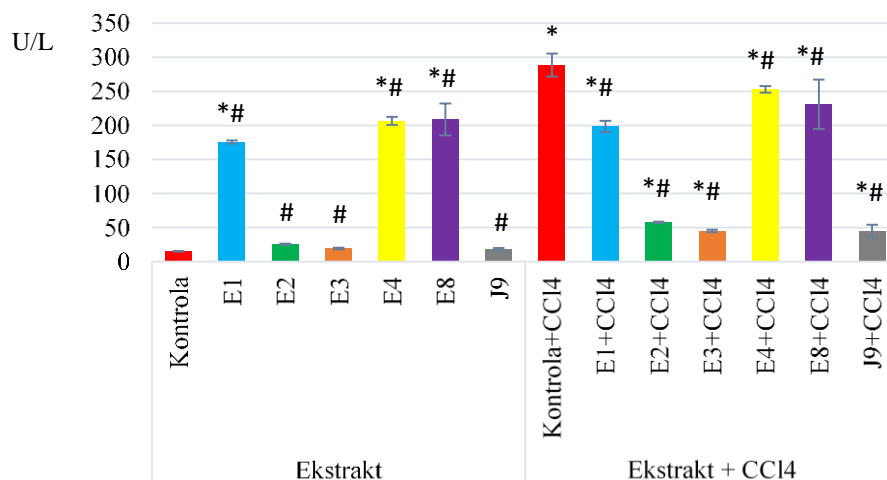
Grupe životinja	ALT	AST	Proteini	Ukupni bilirubin
	(U/L)		(g/L)	($\mu\text{g/L}$)
Kontrola	15,42±0,19	18,38±0,21	58,12±3,53	15,50±0,33
E1	175,77±2,19 ^{*,#}	60,32±3,22 ^{*,#}	40,02±0,52 ^{*,#}	55,77±0,67 ^{*,#}
E2	25,43±0,97 [#]	24,30±2,79 ^{*,#}	51,73±0,68 ^{*,#}	20,80±0,65 ^{*,#}
E3	19,17±1,21 [#]	19,07±2,85 [#]	55,20±1,01 ^{*,#}	17,03±1,94 ^{*,#}
E4	206,70±6,04 ^{*,#}	86,37±2,83 ^{*,#}	42,32±0,35 ^{*,#}	30,52±0,28 ^{*,#}
E8	208,62±23,63 ^{*,#}	85,92±4,62 ^{*,#}	39,42±0,29 ^{*,#}	44,38±2,41 ^{*,#}
J9	17,75±2,10 [#]	19,10±2,34 [#]	56,33±0,27 ^{*,#}	14,03±0,90 [#]
Kontrola+ CCl_4	288,62±16,88 [*]	103,63±2,16	35,58±0,76 [*]	65,70±2,34 [*]
E1+ CCl_4	198,47±8,13 ^{*,#}	70,45±0,56 ^{*,#}	39,82±0,37 [*]	56,82±2,07 ^{*,#}
E2+ CCl_4	57,52±1,26 ^{*,#}	43,47±1,39 ^{*,#}	48,43±0,30 ^{*,#}	46,63±1,19 ^{*,#}
E3+ CCl_4	44,87±1,83 ^{*,#}	40,80±3,71 ^{*,#}	50,48±0,26 ^{*,#}	40,12±0,44 ^{*,#}
E4+ CCl_4	252,95±4,83 ^{*,#}	92,13±1,67 ^{*,#}	38,10±1,00 ^{*,#}	40,42±0,26 ^{*,#}
E8+ CCl_4	230,97±36,17 ^{*,#}	97,07±2,76 ^{*,#}	35,77±0,60 [*]	59,63±0,57 ^{*,#}
J9+ CCl_4	44,72±9,24 ^{*,#}	22,02±2,86 ^{*,#}	53,87±2,60 ^{*,#}	29,48±2,67 ^{*,#}

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD (n=6)

* Statistički značajno različito u odnosu na grupu Kontrola ($p < 0,05$)

Statistički značajno različito u odnosu na grupu Kontrola+ CCl_4 ($p < 0,05$)

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu aktivnosti enzima jetre ALT u krvi, pre i posle oštećenja jetre indukovanog CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.10. i na Grafikonu 5.23.

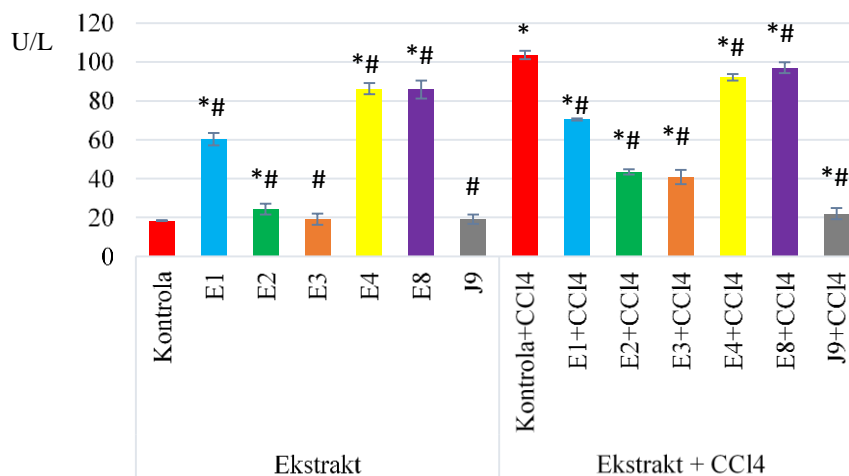


Grafikon 5.23. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na aktivnost ALT

U grupama životinja tretiranih ekstraktima E1, E4 i E8 aktivnost ALT se statistički značajno povećala u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). U grupama životinja tretiranih ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 sprečen je značajan porast aktivnosti ALT u odnosu na kontrolnu grupu ($25,43 \pm 0,97$; $19,17 \pm 1,21$; $17,75 \pm 2,10$; vs $15,42 \pm 0,19$, $p = 0,071$, $p = 0,490$, $p = 0,667$ redom). Tretman životinja CCl₄-om doveo je do velikog povećanja aktivnosti ALT (18,7 puta) u odnosu na kontrolnu grupu. Povećanje aktivnosti ALT u odnosu na kontrolnu grupu, sa postizanjem statističke značajnosti, ispoljeno je u grupama koje su pre intoksikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9. Pretretmani ekstraktima E2, E3 i sokom korena rena J9 uspeali su delimično da suprimiraju štetno delovanje CCl₄-a, mada je postojalo povećanje aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 postojale su statistički značajno niže aktivnosti ALT u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Takođe, u svim grupama životinja koje su bile pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 pre administracije CCl₄-om aktivnost ALT se statistički značajno smanjila u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu aktivnosti enzima jetre AST u krvi, pre i posle oštećenja jetre indukovanog CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.10. i na Grafikonu 5.24.

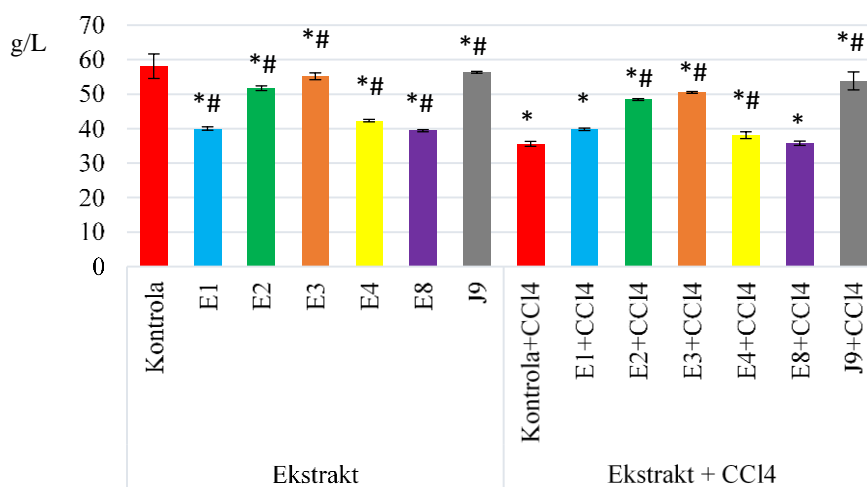


Grafikon 5.24. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na aktivnost AST

Tretmani životinja ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p = 0,001$), E4 ($p < 0,0005$) i E8 ($p < 0,0005$) uticali su na značajno povećanje aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Kod grupa životinja tretiranih ekstraktom E3 ($p = 0,691$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,677$) aktivnost AST ostala je u granicama bliskim kontrolnoj grupi. Tretman CCl₄-om doveo je do velikog povećanja aktivnosti AST, koja je bila pet puta veća od vrednosti kontrolne grupe. Povećanje aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu, sa postizanjem statističke značajnosti, ispoljeno je u grupama koje su pre intoksikacije CCl₄-om preteretirane ekstraktima E1–E8. Pretretman sokom korena rena J9 pre aplikacije CCl₄-om u velikoj meri je sprečio štetno dejstvo CCl₄-a i najmanje je uticao na promenu aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu ($22,02 \pm 2,86$ vs $18,38 \pm 0,21$, $p = 0,008$).

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima i sokom korena rena J9 postojale su statistički značajno niže aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Takođe, u grupama životinja koje su bile pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 pre administracije CCl₄-om aktivnost AST se statistički značajno smanjila u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Uočeno je postojanje korelacije između efekata ekstrakata i soka korena rena na aktivnost ALT sa efekima na aktivnost AST.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu koncentracije proteina krvi pre i posle oštećenja jetre indukovanog CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.10. i na Grafikonu 5.25.

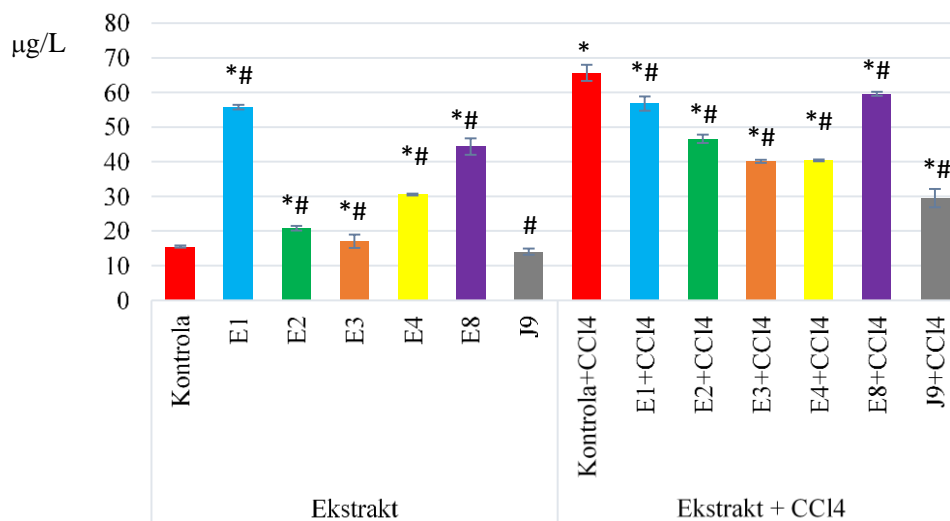


Grafikon 5.25. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na koncentraciju proteina

Statistički značajno sniženje koncentracije proteina postojalo je u grupama tretiranim ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). U grupama životinja tretiranih ekstraktom E3 i sokom korena rena J9 uočeno je najmanje smanjenje koncentracije proteina i izračunata koncentracija je bila bliska vrednosti kontrolne grupe ($55,20 \pm 1,0$ i $56,33 \pm 0,27$ vs $58,12 \pm 3,53$, $p < 0,0005$). U grupi životinja sa aplikovanim CCl₄-om (Kontrola+CCl₄) došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih proteina za 16% u odnosu na kontrolnu grupu. Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 postojalo je statistički značajno sniženje koncentracije proteina u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). U grupi životinja pretretiranih sokom korena rena J9 pre administracije CCl₄-om sprečeno je smanjenje koncentracije ukupnih proteina, a određena koncentracija proteina bila je bliska vrednostima kontrolne grupe ($53,87 \pm 2,60$ vs $58,12 \pm 3,53$, $p < 0,0005$).

Povećanje koncentracije proteina u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄, sa postizanjem statističke značajnosti, ispoljeno je u grupama tretiranim ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9. Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$), E4 ($p = 0,001$) i sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$) došlo je do značajnog povećanja koncentracije proteina u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na promenu koncentracije ukupnog bilirubina u krvi, pre i posle oštećenja jetre indukovanog CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.10. i na Grafikonu 5.26.



Grafikon 5.26. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na koncentraciju ukupnog bilirubina

U grupama životinja tretiranih ekstraktima korena rena E1–E8 uočen je značajan porast koncentracije ukupnog bilirubina u serumu u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija ukupnog bilirubina se prilikom tretmana ekstraktom E3 najmanje menjala u odnosu na kontrolnu grupu ($17,03 \pm 1,94$ vs $15,50 \pm 0,33$; $p = 0,045$). Međutim, prilikom tretmana sokom korena rena J9 ($p = 0,055$), koncentracija ukupnog bilirubina se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu. Administracija hepatotoksičnog CCl₄-a životinjama dovela je do značajnog porasta koncentracije ukupnog bilirubina u serumu u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om bile pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 došlo je do značajnog porasta koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$).

Smanjenje koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄, sa postizanjem statističke značajnosti, ispoljeno je u grupama tretiranim ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9. U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om bile pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 uočeno je značajno sniženje koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Pretretman sokom korena rena J9 doveo je do najvećeg sniženja koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

5.3.2.3. Uticaj ekstrakata i soka korena rena na parametre antioksidantne aktivnosti kod oksidativnog stresa indukovano ugljentetrahloridom

Uticaj ekstrakata i soka korena rena na parametre antioksidantne aktivnosti su ispitivani u krvi miševa tretiranih sa CCl_4 , koji dovodi do nastanka slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Ispitivana je aktivnost enzima: GSHPx, GR, XOD, CAT i SOD, intenzitet lipidne peroksidacije LPx i sadržaj GSH. Dobijeni rezultati su predstavljeni u Tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Uticaj ekstrakata, soka korena rena i CCl_4 na parametre oksidativnog stresa

Uzorak	GSHPx	GR	GSH	LPx	XOD	CAT	SOD
Kontrola	8,48±0,07	6,11±0,03	4,95±0,08	2,96±0,04	1,95±0,07	9,54±0,09	21,25±0,62
E1	15,67±0,32*.#	3,09±0,04*.#	3,36±0,03*.#	7,71±0,04*.#	2,35±0,02*.#	4,28±0,02*.#	6,63±0,09*
E2	15,00±0,22*.#	5,53±0,11*.#	4,45±0,18*.#	3,17±0,09*.#	1,86±0,03#	10,30±0,14*.#	15,47±0,53*.#
E3	10,50±0,28*.#	5,85±0,05*.#	5,02±0,23#	2,96±0,09#	1,75±0,03*.#	10,95±0,19*.#	15,42±1,77*.#
E4	18,42±1,25*.#	3,80±0,33*.#	2,32±0,19*.#	6,57±0,11*.#	2,35±0,03*.#	4,85±0,31*.#	11,62±1,05*.#
E8	20,10±0,49*.#	4,08±0,05*.#	2,14±0,04*.#	7,99±0,17*.#	1,89±0,04#	4,08±0,06*.#	19,47±2,59*.#
J9	8,23±0,14#	6,96±0,24*.#	5,18±0,11*.#	2,90±0,22#	1,50±0,04*.#	13,12±0,48*.#	20,23±1,39#
Kontrola+CCl₄	21,37±0,22*	1,24±0,02*	0,73±0,03*	9,84±0,08*	2,81±0,09*	3,40±0,28*	5,68±0,16*
E1+CCl₄	18,32±0,23*.#	2,86±0,34*.#	2,54±0,02*.#	8,08±0,03*.#	3,03±0,04*.#	3,04±0,42*.#	6,04±0,02*
E2+CCl₄	14,70±0,42*.#	4,97±0,15*.#	3,20±0,04*.#	5,26±0,03*.#	2,08±0,03*.#	6,64±0,06*.#	10,45±0,24*.#
E3+CCl₄	12,53±1,57*.#	6,03±0,15#	4,55±0,08*.#	4,95±0,03*.#	1,89±0,05#	7,15±0,08*.#	9,86±0,08*.#
E4+CCl₄	20,50±0,2*	2,24±0,43*.#	1,61±0,05*.#	8,66±0,05*.#	2,78±0,17*	2,18±0,04*.#	8,20±0,06*.#
E8+CCl₄	18,90±0,60*.#	3,16±0,10*.#	1,20±0,10*.#	9,20±0,04*.#	2,83±0,05*	3,32±0,06*	15,10±1,05*.#
J9+CCl₄	11,42±0,26*.#	6,25±0,03#	4,65±0,03*.#	3,05±0,11*.#	1,87±0,15#	9,26±0,12*.#	13,08±0,76*.#

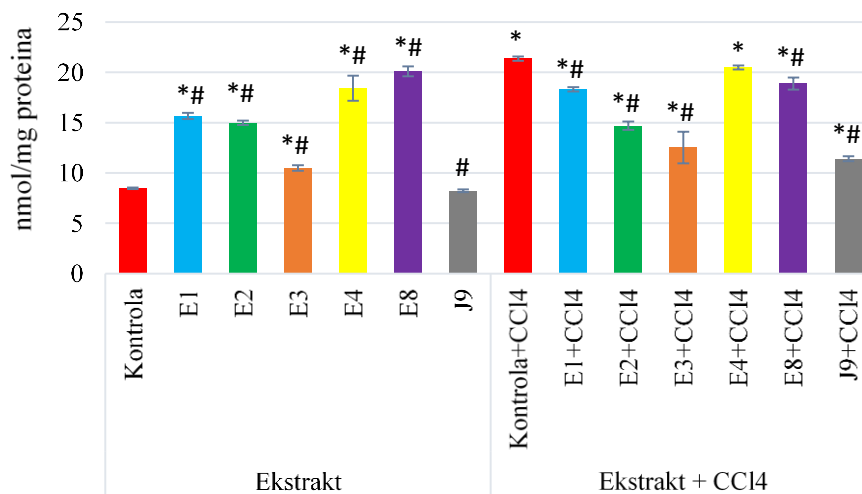
Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD ($n=6$)

* Statistički značajno različito u odnosu na grupu Kontrola ($p<0,0005$)

Statistički značajno različito u odnosu na grupu Kontrola+ CCl_4 ($p<0,0005$)

GSHPx (nmol/mg proteina), GR (nmol/mg proteina), GSH (nmolGSH/mg proteina), LPx (nmol MDA/mg proteina), SOD (U/mg proteina), XOD (nmol/mg proteina), CAT (nmol/mg proteina)

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost enzima GSHPx u krvi miševa tretiranih sa CCl₄, prikazani su Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.27.

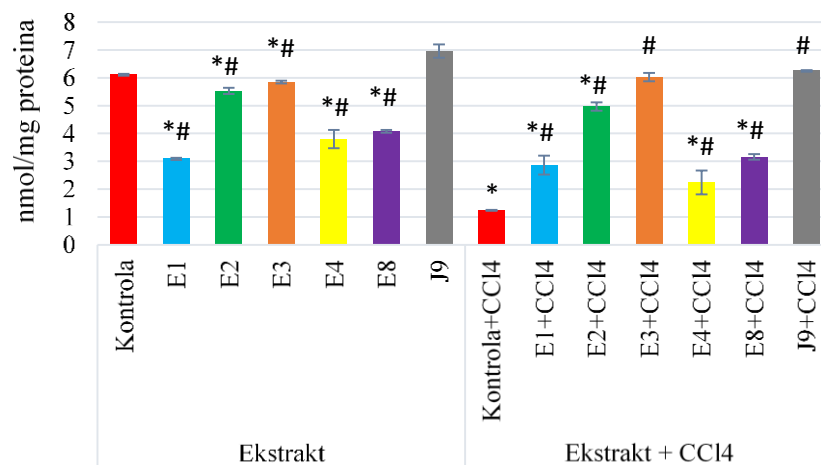


Grafikon 5.27. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na aktivnost GSHPx

Tretmani eksperimentalnih životinja ekstraktima korena rena E1–E8 uticali su na značajno povećanje aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Aktivnost GSHPx se jedino nakon tretmana sokom korena rena J9 ($p = 0,438$) nije značajno menjala u odnosu na kontrolnu grupu. Aplikacija CCl₄-om je kod životinja za oko 2,5 puta povećala aktivnost GSHPx ($p < 0,0005$) u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om bile pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 uočeno je značajno povećanje aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$).

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1–E4 i sokom korena rena J9 uočene su statistički značajno niže aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu grupu Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om bile pretretirane ekstraktima E1–E3, E8 i sokom korena rena J9 došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Pretretman sokom korena rena J9 doveo je do najvećeg smanjenja aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost enzima GR u krvi miševa, tretiranih sa CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.28.

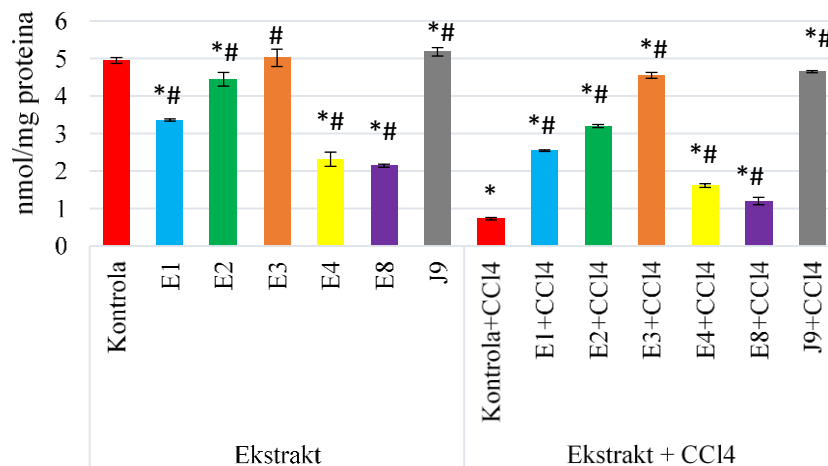


Grafikon 5.28. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na aktivnost GR

Tretmani eksperimentalnih životinja ekstraktima korena rena E1–E8 uticali su na značajno smanjenje aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). U grupi životinja tretiranih sokom korena rena J9 utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$), kao i u odnosu na sve ostale grupe tretirane ekstraktima korena rena ($p < 0,0005$). Administracija ugljen-tetrahlorida značajno je smanjila aktivnost GR u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Kod grupa životinja pretretiranih ekstraktima E1, E2, E4 i E8, uočeno je značajno sniženje aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu grupu. Najbolji efekti zabeleženi su prilikom pretretmana ekstraktom E3 i sokom korena rena J9, koji su uspeli da održe aktivnost GR u granicama fizioloških vrednosti, bliskih kontrolnoj grupi ($6,03 \pm 0,14$; $6,25 \pm 0,14$ vs $6,11 \pm 0,03$, $p = 0,544$ i $p = 0,314$ redom).

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 aktivnosti GR su bile statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om pretretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 došlo je do značajnog povećanja aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na sadržaj GSH u krvi miševa, tretiranih CCl₄-om prikazani su su Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.29.

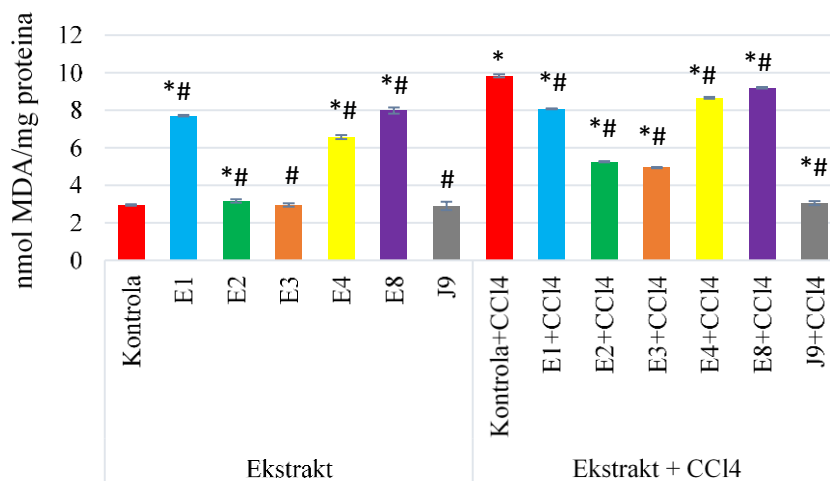


Grafikon 5.29. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na sadržaj GSH

Ekstrakti i sok korena rena kojima su životinje tretirane različito su uticali na promenu količine glutationa (GSH), tako da je među njima bilo značajne razlike ($p < 0,0005$). U grupama životinja tretiranih ekstraktima korena rena E1, E2, E4 i E8 došlo je do značajnog smanjenja količine glutationa, najvažnijeg endogenog antioksidansa u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Tretman ekstraktom E3 ($p = 0,375$) nije uticao na promenu količine GSH u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman sokom korena rena J9 ($p = 0,009$), međutim, doveo je do značajnog povećanja količine GSH u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman životinja CCl₄-om izazvao je značajno smanjenje sadržaja GSH, oko sedam puta u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om bile tretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 postojao je značajan trend oporavka pula GSH, mada su vrednosti ostale značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0005$). Pretretmani ekstraktom E3 i sokom korena rena J9 pokazali su najbolji efekat na oporavljanje pula GSH u odnosu na kontrolnu grupu.

Sadržaj GSH u grupama životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 ostao je značajno viši u odnosu na Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). U svim grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-a bile tretirane ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 značajno se smanjio štetan uticaj CCl₄-a na sadržaj GSH, tako da je došlo do povećanja količine GSH u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na intenzitet lipidne peroksidacije LPx u krvi miševa, tretiranih CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.30.

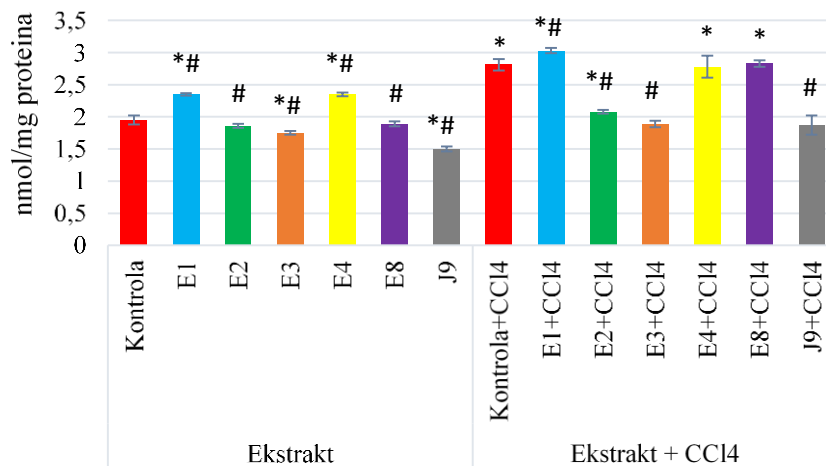


Grafikon 5.30. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na intenzitet lipidne peroksidacije LPx

Intenzitet lipidne peroksidacije meren kao koncentracija malondialdehida (MDA) bio je statistički značajno povišen u grupama životinja tretiranih ekstraktima E1 ($p < 0,0005$), E2 ($p = 0,002$), E4 ($p < 0,0005$), i E8 ($p < 0,0005$) u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama tretiranim ekstraktom E3 ($p = 0,980$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,370$) nije došlo do statistički značajne promene intenziteta lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu. Aplikacija CCl₄-a indukovala je oko tri puta povećanje intenziteta LPx ($p < 0,0005$) u odnosu na kontrolnu grupu. Pretretmani ekstraktima korena rena E1–E8 pre aplikacije CCl₄-a pokazali su statistički značajno veći intenzitet lipidne peroksidacije indukovane CCl₄-om u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 postojao je statistički značajno niži intenzitet lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu Kontrola+CCl₄ ($p < 0,0005$). Pretretmani ekstraktima korena rena E1–E8 uspeali su značajno da smanje intenzitet lipidne peroksidacije indukovane CCl₄-om u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. Pretretman sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$), međutim, pokazao je najznačajniji supresivni efekat na intenzitet LPx, nastale dejstvom CCl₄-a u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄, pri čemu je dobijena vrednost LPx bila bliska vrednostima LPx kontrolne grupe ($p = 0,004$).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost enzima XOD u krvi miševa, tretiranih CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.31.

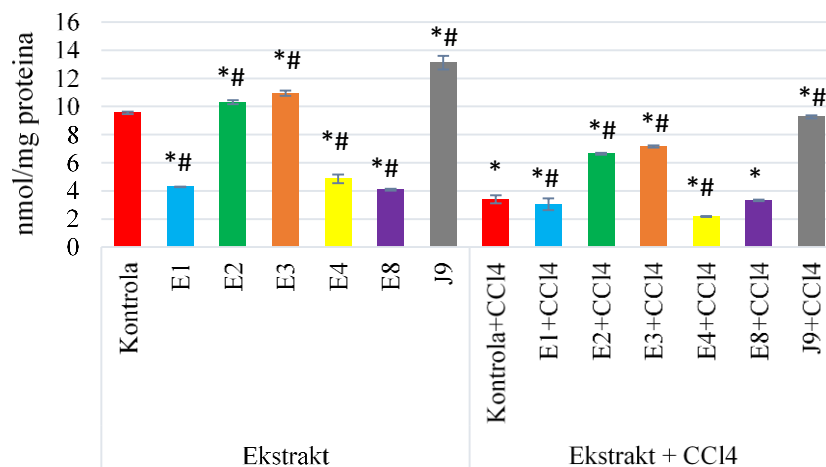


Grafikon 5.31. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na aktivnost XOD

Ekstrakti i sok korena rena kojima su životinje bile tretirane različito su uticali na aktivnost XOD i među njima je zabeležena značajna razlika ($p < 0,0005$). Smanjenje aktivnosti XOD postojalo je u grupama životinja tretiranih ekstraktom E3 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$) u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja tretiranih ekstraktima korena rena E2 i E8 aktivnost ksantinoksidaze je bila bliska vrednosti kontrolne grupe. Primena tretmana eksperimentalnih životinja ekstraktima E1 ($p < 0,0005$) i E4 ($p < 0,0005$) uticala je na značajno povećanje aktivnosti XOD u odnosu na kontrolnu grupu. Administracija ugljen-tetrahlorida značajno je povećala aktivnost XOD ($p < 0,0005$) u odnosu na kontrolnu grupu. Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-a pretretirane ekstraktom E3 ($p = 0,299$) i sokom korena rena J9 ($p = 0,157$) aktivnost XOD je ostala na nivou fizioloških vrednosti kontrolne grupe.

U grupama životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 aktivnost XOD je bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. Pretretman ekstraktom E1 (pre intoksikacije CCl₄-om) uticao je na povećanje aktivnosti XOD u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-a pretretirane ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 aktivnost XOD je bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost enzima CAT u krvi miševa, tretiranih CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.32.

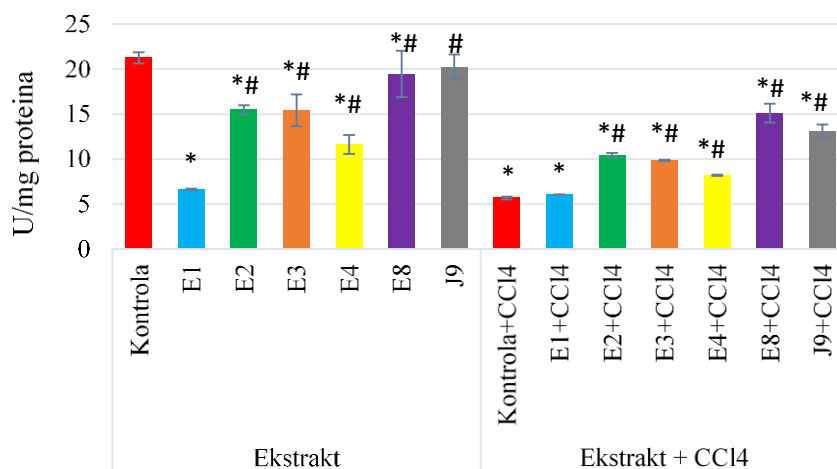


Grafikon 5.32. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-a na aktivnost CAT

Ekstrakti i sok korena rena kojima su životinje tretirane različito su uticali na aktivnost CAT i među njima je bilo značajne razlike ($p < 0,0005$). U grupama životinja tretiranih ekstraktima E2 ($p < 0,0005$), E3 ($p < 0,0005$) i sokom korena rena J9 ($p < 0,0005$) došlo je do povećanja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama tretiranim ekstraktima E1, E4 i E8 došlo je do smanjenja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola. Pretretmani životinja ekstraktima korena rena E1–E8 pre aplikacije CCl₄-a uticali su na značajno smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu. Aplikacija CCl₄-a uticala je na značajno smanjenje aktivnosti CAT (za oko 65%) u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, tretman životinja ekstraktom E3 pre aplikacije CCl₄-a donekle je uspeo da spreči značajan pad aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu. Pretretman životinja sokom korena rena J9 takođe je doveo do sniženja aktivnosti CAT, ali je ona bila bliska fiziološkim vrednostima kontrolne grupe ($9,26 \pm 0,12$ vs $9,54 \pm 0,09$; $p = 0,008$).

U grupama životinja tretiranih ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 aktivnost CAT je bila značajno povećana u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. Tretmani životinja ekstraktima E1, E4 i E8 pre aplikacije CCl₄-a uticali su na značajno smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. Međutim, pretretmani životinja ekstraktima E2, E3 i sokom korena rena J9 uticali su na značajno povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata i soka korena rena na aktivnost enzima SOD u krvi miševa, tretiranih CCl₄-om prikazani su u Tabeli 5.11. i na Grafikonu 5.33.



Grafikon 5.33. Uticaj ekstrakata korena rena, soka korena rena i CCl₄-om-a na aktivnost SOD

Tretmani eksperimentalnih životinjaekstraktima korena rena različito su uticali na aktivnost SOD i među njima je bilo značajne razlike ($p < 0,0005$). Smanjenje aktivnosti SOD postojalo je u grupama životinja tretiranih ekstraktima E1–E8, sa najvećim smanjenjem u grupi tretiranoj ekstraktom E1 ($p < 0,0005$) u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman životinja sokom korena rena J9 ($p = 0,214$) nije uticao na promenu aktivnosti SOD u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja pretretiranim ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 uočena je značajno niža aktivnost SOD u odnosu na kontrolnu grupu. Aplikacija hepatotoksina CCl₄ uticala je na značajno smanjenje aktivnosti SOD (73%) u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu životinja.

Aktivnost SOD kod tretmana ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 ostala je značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄. Pretretmani ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 doveli su do značajnog povećanja aktivnosti SOD u odnosu na kontrolnu grupu, Kontrola+CCl₄.

6. Diskusija

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena, proizvedenog na teritoriji Vojvodine *in vitro* i *in vivo*. U cilju *in vitro* određivanja potencijalne antitumorske aktivnosti ispitano je antiproliferativno delovanje ekstrakata i soka korena rena prema većem broju ćelijskih linija. Citotoksični, antioksidantni/prooksidantni i hepatoprotektivni/hepatotoksični efekti ekstrakata i soka korena rena ispitivani su *in vivo* u eksperimentima na životinjama. Mehanizam antitumorskog delovanja najaktivnijih ekstrakata i soka korena rena određen je *in vitro*. U cilju detekcije aktivnih antitumorskih i hepatoprotektivnih komponenata ispitan je hemijski sastav (polifenolna jedinjenja) ekstrakata i soka korena rena. Postavljene su hipoteze da ekstrakti i sok korena rena ispoljavaju antitumorsko, ali ne i hepatotoksično delovanje *in vitro*, i da ispoljavaju antitumorsko i hepatoprotektivno delovanje *in vivo*.

U disertaciji je za ispitivanje hemijskog sastava *in vitro* antiproliferativne aktivnosti i tipa ćelijske smrti upotrebljeno osam ekstrakata korena rena i to iz pulpe: E2 (hloroformski), E1 (dihlormetanski), E8 (butanolni) i E7 (vodeni) i iz soka: E4 (hloroformski), E3 (dihlormetanski), E6 (butanolni) i E5 (vodeni), i sok korena rena J9. Za *in vivo* ispitivanja antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti upotrebljeni su ekstrakti korena rena koji su u *in vitro* ispitivanjima pokazali najbolje efekte: E1, E2, E3, E4 i E8, kao i sok korena rena J9.

6.1. Polifenolni sastav ekstrakata i soka korena rena

Ren, *Armoracia rusticana* (G. Gaertn, B. Mey & Scherb.), je biljka iz porodice *Brassicaceae* (3, 204), koja se gaji zbog svog belog, debelog i mesnatog korena, intenzivnog oporog ukusa koji nastaje zbog prisustva sumpornih jedinjenja, glukozinolata (204). Ren privlači pažnju naučnika, jer se smatra da produkti hidrolize glukozinolata, izotiocijanati poseduju potencijalnu antikarcinogenu aktivnost (205). GSL jedinjenja su nađena kod biljaka nekih vrsta familije *Brassicaceae* (rotkvica, kupus, karfiol, brokoli, senf, repa, uljana repica i ren) (16, 206). Do sada je registrovano približno 200 GSL (207). Koncentracija GSL u biljkama veoma varira i kreće se oko 1% suve težine, kod *Brassicaceae* biljaka (207, 208), sa koncentracijom 0,5–28 μmol alifatičnih/aromatičnih GSL/g suve težine i 0,7–8 μmol indolnih GSL/g suve težine (35). Kod biljaka familije *Brassicaceae* najveće koncentracije GSL nalaze se u semenu crnog senfa (*Brassica nigra*) i u korenu rena (preko 10% na suhu težinu) (32). Studija Herz-a i saradnika pokazala je da vodeni ekstrakt korena rena sadrži: aminokiseline (arginin i prolin), limunsku kiselinu, fenolne komponente (kafena kiselina i derivati kemferola), GSL i derivate masnih kiselina (209).

Kumarini (eskuletin, skopoletin), fenolne kiseline, askorbinska kiselina, asparagin i rezin su takođe nađeni u renu (3). Nutritivnu vrednost 100 g korena rena čine: 3,3 g dijetetskih vlakana, 11,29 g ugljenih hidrata, 56 mg kalcijuma, 314 mg natrijuma, 246 mg kalijuma, 27 mg magnezijuma, 31 mg fosfora, 24,9 mg vitamina C, i 57 µg folata (210).

Poznato je da polifenoli biljaka poseduju antikancerogenu, antioksidantnu, antimutagenu i antivirusnu aktivnost (211). Neki fenoli poseduju snažnu antioksidantnu i antikancerogenu aktivnost, kao što su fenolne kiseline (hlorogenska, kafena, ferulna), flavonoidi (kvercetin, genistein, katehin, izoflavoni), kumarini, stilbeni, itd. (43, 75, 212–215). Najvažnije fenolne komponente prisutne kod biljaka familije *Brassicaceae* su flavonoidi: kemferol, kvercetin i njihovi derivati u kombinaciji sa sinapinskom kiselinom (216, 217). Do sada nisu sprovedena ispitivanja u cilju proučavanja polifenolnog sastava ekstrakata ili soka rena, kao i mehanizma njihovog delovanja.

Rezultati disertacije pokazali su da su, primenom HPLC metode, u ekstraktima i soku korena rena identifikovane i kvantifikovane sledeće polifenolne komponente: fenolne kiseline (galna, protokatehinska, kafena, ferulna, izoferulna, hlorogena, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarinska, siringinska i sinapinska kiselina) i flavonoidi (katehin, epikatehin, kvercetin, kemferol, luteolin, apigenin i izoramnetin). Najveći sadržaj polifenola bio je prisutan u dihlormetanskom ekstraktu pulpe korena rena E1 (49,64 mg/g) i dihlormetanskom ekstraktu soka korena rena E3 (18,09 mg/g). Svi ekstrakti korena rena sadržali su katehin (0,75-33,17 mg/g) i galnu kiselinu (0,18-3,34 mg/g). Ekstrakti E2 i E4 sadržali su kemferol, dok je u ekstraktima E1, E2, E4 i E6 pronađen kvercetin. Ekstrakti E3, E5 i E7 sadržali su epikatehin, dok je u ekstraktima E1 i E4 pronađen izoramnetin. Ovo je bilo prvo ispitivanje u kome je dobijen polifenolni profil različitih ekstrakata i soka korena rena.

U studiji Calabrone-a i saradnika (218) spektrofotometrijski je određen sadržaj polifenola u metanolnom, metanol/vodenom (70/30, v/v) i metanol/vodenom (50/50, v/v) ekstraktu korena rena $1,80 \pm 0,17$; $2,36 \pm 0,14$ i $2,61 \pm 0,20$ mg/g suve mase redom. Slični rezultati dobijeni su i u studiji Tomsone-a i sradnika (219), gde je ukupni sadržaj polifenola u ekstraktima korena rena, dobijen klasičnom Soxhlet-ovom metodom, bio 334,29 -985,87 mg GAE/100 g suve mase, u zavisnosti od rastvarača. Razlike u sadržaju ukupnih polifenola dobijene poredeći HPLC i Folin-Ciocalteau-ovu metodu, mogle bi se objasniti time što spektrofotometrijska metoda nije apsolutna mera za polifenole, pošto i druge supstance poput organskih kiselina, rezidualnih šećera, aminokiselina, proteina i drugih hidrofилnih komponenti mogu interferirati sa ovim određivanjem. Takođe,

različite klase fenola, zbog reakcije sa Folin–Ciocalteu-ovim reagensom, mogu uticati na apsorbanču prilikom određivanja galne kiseline (220).

Postoji veoma malo radova o polifenolima u soku korena rena. Rezultati rada Fursa i saradnika (221) pokazali su da se u soku korena rena nalazi mala količina flavonoida (kemferol i kvercetin). Studija Cirimbei i saradnika (222) ukazala je na veliki potencijal vodenog ekstrakta rena i njegovih najzastupljenijih flavonoida: kemferola i kvercetina u sprečavanju oštećenja DNK humanih limfocita oksidativnim agensom H_2O_2 . Rezultati disertacije su u saglasnosti sa pomenutim radovima, pri čemu je u disertaciji dobijen kompletan polifenolni sastav ekstrakata i soka korena rena.

Manach i saradnici (223) su u brokolima identifikovali 22 derivata kemferola, ferulne i sinapinske kiseline. Derivati hidroksibenzojeve kiseline kod biljaka prisutni su u veoma niskim koncentracijama, dok je *p*-hidroksibenzojeva kiselina dominantna komponenta. Nićiforović i saradnici (224) su u raštanu identifikovali sledeće fenolne kiseline: galnu, protokatehinsku, *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, siringinsku, salicilnu, *p*-kumarinsku, kafenu, ferulnu i sinapinsku kiselinu. Rezultati dobijeni u našem istraživanju slični su rezultatima navedenih radova, što bi se moglo objasniti time da brokoli i raštan pripadaju porodici biljaka *Brassicaceae*, kojoj pripada i ren. Moglo bi se očekivati da biljne vrste iste porodice mogu imati sličan polifenolni sastav.

U literaturi nema radova koji se bave ispitivanjem povezanosti antiproliferativne, antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena sa njegovim polifenolnim sastavom. Zbog toga će se u diskusiji koristiti dostupna literatura, koja se uglavnom odnosi na povezanost antiproliferativne, antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti rena, sa efektima GSL prisutnim u renu, i kod ostalih biljaka porodice *Brassicaceae*. Koristiće se, takođe, i literatura koja se odnosi na povezanost antiproliferativne, antitumorske i hepatoprotektivne aktivnosti rena sa efektima polifenolnih komponenti prisutnih kod drugih biljnih porodica.

6.2. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata i soka korena rena *in vitro*

Rezultati disertacije pokazali su da su najsnažniju antiproliferativnu aktivnost ispoljili ekstrakti korena rena E1–E4, a dobijene IC_{50} vrednosti bile su u uskom opsegu koncentracija ($IC_{50} = 3,49-28,46 \mu\text{g/mL}$). Ekstrakt E4 je ispoljio najizraženije i neselektivno citotoksično delovanje prema svim ispitivanim ćelijskim linijama ($IC_{50} = 3,49-12,17 \mu\text{g/mL}$), sa najsnažnijim delovanjem na ćelijsku liniju karcinoma jetre pacova ($IC_{50}^{H-4-II-E} = 3,49 \mu\text{g/mL}$). Sličan efekat pokazao je i ekstrakt E2, koji je delovao citotoksično na sve ćelijske linije ($IC_{50} = 15,42-28,46 \mu\text{g/mL}$), osim

karcinoma prostate (PC-3). Ekstrakt E3 je najsnažnije delovao na ćelijsku liniju zdravih pluća ($IC_{50}^{MRC-6} = 16,74 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma dojke ($IC_{50}^{MCF7} = 18,52 \mu\text{g/mL}$). Ekstrakt E1 je najsnažnije delovao na ćelijske linije karcinoma jetre pacova ($IC_{50}^{H-4-II-E} = 19,19 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma dojke ($IC_{50}^{MDA-MB-231} = 26,01 \mu\text{g/mL}$).

Sok korena rena J9 je pokazao značajan antiproliferativni efekat na sve ispitivane ćelijske linije sa IC_{50} u opsegu razblaženja od 418 do 1600. Najsnažnije antiproliferativno delovanje soka korena rena J9 (u jedinicama razblaženja) bilo je prema karcinomu grlića materice ($IC_{50}^{HeLa} = 1596,04$), karcinomu jetre pacova ($IC_{50}^{H-4-II-E} = 1401,57$), ali i prema ćelijama izvedenim od zdravog tkiva ($IC_{50}^{MRC-5} = 1347,86$).

U ranijim ispitivanjima antiproliferativne aktivnosti utvrđena je visoka aktivnost kemferola, galne kiseline, kvercetina i kafene kiseline (225), dok katehin, epikatehin, *p*-kumarinska, siringinska, sinapinska, hlorogenska i ferulna kiselina nemaju značajnu antiproliferativnu aktivnost (189).

Antiproliferativna aktivnost ekstrakta E1 mogla bi se pripisati prisustvu galne i kafene kiseline i kvercetina u ekstraktu. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata E2 i E4 mogla bi se objasniti prisustvom galne kiseline, kvercetina i kemferola, a ekstrakta E3 i soka korena rena J9 prisustvom galne i kafene kiseline. Tako je ukupna aktivnost svakog ekstrakta posledica sinergističkog delovanja većeg broja njegovih aktivnih komponenti i najverovatnije zavisna od njihovih koncentracija.

Saglasno tome, brojni radovi su ukazali na potencijalnu antikarcinogenu i antiproliferativnu aktivnost galne kiseline prema karcinomu cerviksa (226), karcinomu želuca, prostate, pluća i dr. (227). Alkil derivati galne kiseline indukuju apoptozu u ćelijskim linijama tumora, uglavnom aktivacijom mitohondrija-zavisnog apoptotskog puta, putem alteracije mitohondrijalnog oksidativnog metabolizma i povećanjem intracelularne koncentracije jona kalcijuma. N-alkil galat smanjuje mitohondrijalni membranski potencijal, utiče na oslobađanje citohroma-c, AIF i nekih prokaspaza, vrši ushodnu regulaciju Bcl-2-vezanog proteina X (BAX), kaspaze-4, kaspaze-9 i kaspaze -3, kao i oštećenje DNK (228, 229).

In vitro studije su pokazale da kvercetin može da deluje kao antiproliferativni agens inhibirajući ćelijsku proliferaciju i rast i zaustavljajući ćelijski ciklus. Nekoliko studija na ljudima sa kvercetinom ukazalo je na njegov antikarcinogeni efekat na karcinome dojke, pluća i prostate, ali ne i na karcinom kolona. Epidemiološka studija u Finskoj pokazala je povezanost između visokog unosa kvercetina i male incidence karcinoma dojke i pluća (230). Studija slučaja na ljudima u Španiji pokazala je povezanost unosa kvercetina i kemferola hranom sa niskom

incidencom karcinoma želuca (231). Kvercetin je takođe pokazao sposobnost da inhibira proliferaciju ćelija karcinoma, barem delimično, smanjenjem broja i funkcije ćelijskih mikrotubula (232).

Mada je ekstrakt E1 imao najbogatiji sastav i najveće koncentracije polifenolnih kiselina (galne i kafene kiseline), i flavonoida (najveće koncentracije kvercetina), on nije imao najizraženije antiproliferativno delovanje. Ekstrakti E2 i E4, koji su pokazali najvišu antiproliferativnu aktivnost, imali su sličan sastav polifenolnih jedinjenja, a za razliku od ekstrakta E1 sadržali su i kemferol. Tako se izuzetna antiproliferativna aktivnost ekstrakata E2 i E4 može pripisati prisustvu kemferola.

Rezultati studije Nguyen-a i saradnika (233) ukazuju da kemferol može da indukuje apoptozu indukcijom kaspaze-3 i prokaspaze-9, povećanjem ROS i oslobađanjem mitohondrijalnog citohroma-c, kod leukemijskih ćelija HL-60 u koncentraciji od 60 μM . Kemferol povećava ćelijski nivo pro-apoptotskih proteina Bax i Bad i smanjuje nivo anti-apoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-xl. Sposobnost flavonoida da indukuju apoptozu zavisi od broja prisutnih hidroksilnih grupa u 2-fenil grupi (apigenin>kvercetin>miricetin>kemferol) (234).

Snažnije delovanje ekstrakta E4 u odnosu na ekstrakt E2 moglo bi se pripisati i prisustvu izoramnetina sa dokazanim snažnim antiproliferativnim delovanjem (69, 235). Rad Teng-a i saradnika (235) pokazao je da je citotoksični efekat izoramnetina dozno i vremenski zavisen u odnosu na ćelije humanog hepatocelularnog karcinoma (BEL-7402), sa $\text{IC}_{50}^{\text{BEL-7402}} = 74,4 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$, posle 72 sata. Izoramnetin je *in vitro* pokazao citostatski efekat prema ćelijskim linijama ezofagealnog skvamoznog karcinoma, sa IC_{50} vrednošću koncentracije $40 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$, posle 48 sati (69).

Takođe, najsnažnije antiproliferativno delovanje ekstrakta E4, u odnosu na sve ispitivane ekstrakte, moglo bi se pripisati i aktivnim komponentama koje su prisutne, ali nisu bile predmet ovog istraživanja (za koje nisu primenjeni HPLC standardi). Snažnije antiproliferativno delovanje ekstrakta E3 u odnosu na ekstrakt E1 (koji je bogatiji po sastavu i koncentraciji polifenolnih jedinjenja) je verovatno posledica aktivnih komponenti koje nisu bile predmet našeg istraživanja – verovatno GSL, a koje bi pri izuzetno niskim koncentracijama mogle doprineti ukupnoj antiproliferativnoj aktivnosti.

Ukoliko se uporede dobijeni rezultati antiproliferativnog delovanja soka korena rena J9 i ekstrakata dobijenih iz soka (E3, E4, E5 i E6) uočavaju se razlike u njihovom delovanju prema ćelijskim linijama. Navedena činjenica može se objasniti razlikama u hemijskom sastavu soka

korena rena i njegovih ekstrakata, i povezanim sinergističkim delovanjem svih aktivnih polifenolnih komponenti soka i jedinjenja (verovatno GSL), koja nisu detektovana u ovom istraživanju.

Delovanjem ispitivanih ekstrakata (E1–E8) i soka korena rena (J9) uočeno je selektivno citotoksično delovanje prema ćelijama jetre, dojke i pluća. Uočen je i snažan potencijal delovanja ekstrakata i soka korena rena prema karcinomu grlića materice, ali i prema veoma rezistentnim ćelijskim linijama melanoma, karcinoma prostate, karcinoma pluća i adenokarcinoma debelog creva. Ekstrakt korena rena E4 pokazao je najveći, neselektivni citotoksični potencijal. Uočeno je, međutim, i snažno citotoksično delovanje ekstrakata E4, E3, E2 i soka korena rena J9 prema ćelijama izvedenim iz zdravog tkiva (MRC-5).

Da bi se utvrdile razlike u delovanju ekstrakata prema tumorskim i ćelijama izvedenim od zdravog tkiva i njihove eventualne primene u antitumorskoj terapiji izračunati su NT/T odnosi (189) i recipročni T/NT odnosi (u jedinicama razblaženja) za delovanje soka (Tabela 5.3.). Povoljni odnosi (> 1) dobijeni su delovanjem ekstrakata E1, E2, E4 i E8 na ćelijske linije karcinoma jetre (HepG2) i karcinoma dojke (MCF7 i MDA-MB-231), kao i delovanjem soka korena rena J9 na ćelijske linije karcinoma cerviksa (HeLa) i karcinoma jetre pacova (H-II-4-E). Najpovoljniji odnos dobijen je delovanjem ekstrakta E4 na ćelijsku liniju karcinoma jetre pacova ($NT/T^{H-4-II-E} = 2,03$), ekstrakta E6 na adenokarcinom dojke ($NT/T^{MCF7} = 1,64$) i ekstrakta E1 na karcinom jetre pacova ($NT/T^{H-4-II-E} = 1,63$). Prema većem broju ćelijskih linija ekstrakti i sok korena rena pokazali su nepovoljne NT/T i T/NT odnose, ukazujući na njihovo snažnije delovanje prema ćelijama izvedenim od zdravog tkiva nego prema ćelijama tumora.

U ovoj disertaciji, a u cilju određivanja mehanizma delovanja, ekstrakti E4 i sok korena rena J9 testirani su na sposobnost indukcije apoptoze i nekroze. Mada je sok korena rena J9 pokazao visoku indukciju apoptoze i indukcija nekroze je bila jednako izražena, tako da je indeks efikasnosti apoptoze ($efA/efN = 0,94-1,07$) bio nizak i na ćelijskim linijama karcinoma cerviksa (HeLa) i adenokarcinoma debelog creva (HT-29). Navedeno ukazuje na slab potencijal soka korena rena J9 da izazove ćelijsku smrt tumorskih ćelija mehanizmom ćelijske apoptoze, bez štetnih posledica koje nastupaju nakon nekroze. Ekstrakt E4 je pokazao smanjenu sposobnost indukcije apoptoze, dok je indukcija nekroze bila visoka u ćelijskim linijama karcinoma cerviksa (HeLa), adenokarcinoma dojke (MCF7) i adenokarcinoma debelog creva (HT-29), ukazujući na slab potencijal ekstrakta E4 da izazove ćelijsku smrt mehanizmom apoptoze, bez nastupanja nekroze ($efA/efN = 0,22-0,74$).

Rezultati disertacije pokazali su da antiproliferativni efekat ekstrakata i soka korena rena zavisi od porekla tumorskih ćelijskih linija na koje deluju.

Ćelijska linija karcinoma humanog cerviksa (HeLa)

Ćelijska linija karcinoma humanog cerviksa (HeLa) bila je najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću koncentracije od 4,66 $\mu\text{g/mL}$, dok je ekstrakt E2 isti efekat postigao sa četiri puta višom koncentracijom, a sok korena rena J9 pri najvećem razblaženju (1/1600).

Rezultati Hasegawa-e i saradnika (236) pokazali su da tretman ćelijske linije karcinoma cerviksa (HeLa) sa 10 μM AITC i 2,5 μM benzil ITC ili fenetil ITC, posle 16 sati inhibira ćelijski rast za 41%, odnosno 79% u odnosu na kontrolu, zaustavljajući ga u fazi G2M. Konić-Ristić i saradnici (237) pokazali su da BITC na HeLa ćelijskoj liniji ostvaruje IC_{50} vrednost sa koncentracijom 5,04 μM . Brojni radovi su takođe ukazali na potencijalnu antikancerogenu i antiproliferativnu aktivnost galne kiseline prema karcinomu cerviksa (238). Rezultati disertacije su u saglasnosti sa pomenutim rezultatima navedenih radova.

U disertaciji ekstrakt E4 nije pokazao selektivnost antiproliferativnog delovanja na ćelijskoj liniji karcinoma grlića materice (HeLa) (NT/T=0,21), dok je sok korena rena J9 ispoljio slabu selektivnost (T/NT=1,18). Rezultati Konić-Ristića i saradnika (237) pokazuju visoku selektivnost antiproliferativnog delovanja BITC na HeLa ćelijskoj liniji (NT/T=9,07). Razlog za ovako velike razlike može biti to što ekstrakt E4 i sok korena rena J9, pored aktivnih polifenolnih komponenti (galne kiseline, kvercetin, kemferol i izoramnetin), sadrži i druge aktivne komponente koje nisu bile ispitane u ovoj disertaciji, a koje možda poseduju jači antiproliferativni efekat prema ćelijama izvedenim iz zdravog tkiva u odnosu na ćelije karcinoma grlića materice (HeLa).

Rezultati disertacije su pokazali da ekstrakt E4 indukuje nekrozu (eFA/eFN = 0,74), a sok korena rena J9 slab fekat apoptoze (eFA/eFN = 1,07) u ćelijskoj liniji karcinoma grlića materice (HeLa). Rezultati Yu-a i saradnika (239) pokazali su da tretman sa 10 μM PEITC ili AITC utiče na indukciju apoptoze na dozno-zavisan način u ćelijskoj liniji HeLa, aktivacijom kaspaza-3 zavisnog mahanizma. To ukazuje na njihovu moguću antikancerogenu aktivnost, što nije u saglasnosti sa rezultatima disertacije.

Ćelijska linija adenokarcinoma dojke (MCF7)

Ćelijska linija adenokarcinoma dojke (MCF7) bila je najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću koncentracije 6,54 $\mu\text{g/mL}$, dok su ekstrakti E2 i E3 pokazali iste efekte, ali sa dva puta višom koncentracijom.

Tseng i saradnici (240) su pokazali da se posle 48-satnog tretmana ćelijske linije karcinoma dojke (MCF7) sa BITC, PEITC i NITC (1-naftil ITC), postiže IC_{50} vrednost sa koncentracijama 5,95 μ M, 7,32 μ M i 13,7 μ M, redom. Ispitali su i citotoksičnost antikancerogenih hemoterapeutika daunomicina ($IC_{50}^{MCF7} = 7,12 \pm 0,42 \mu$ M) i vinblastina ($IC_{50}^{MCF7} = 0,106 \pm 0,004 \mu$ M). Došli su do zaključka da BITC i PEITC inhibiraju rast ćelija humanog karcinoma dojke u koncentracijama bliskim koncentracijama daunomicina. Rezultati rada Ahn i saradnika (48) ukazuju da kafena kiselina u koncentraciji 10 μ M povećava osetljivost rezistentnih ćelija humanog karcinoma dojke (MCF7) prema doksorubicinu, pri čemu se IC_{50} vrednost za doksorubicin smanjila sa 10,8 μ M na 0,83 μ M. Kvercetin indukuje inhibiciju rasta ćelijske linije karcinoma dojke na dozno zavisani način (241). Kemferol u koncentracijama od 35,0 i 70,0 μ M značajno smanjuje broj vijabilnih estrogen pozitivnih receptora ćelija karcinoma dojke (MCF7) (242), dok u koncentracijama od 20 do 90 μ M menja sintezu DNK i rast ćelija karcinoma dojke (MCF7) (243). Rezultati disertacije su slični rezultatima pomenutih radova, ukazujući na potencijalnu antitumorsku aktivnost ekstrakta E4 i soka korena rena prema ćelijama karcinoma dojke (MCF7).

Ekstrakt E4 je pokazao selektivnost antiproliferativnog delovanja prema ćelijskoj liniji karcinoma dojke (MCF7) u odnosu na zdravo tkivo ($NT/T = 1,08$), ali on indukuje nekrozu kod ćelija karcinoma dojke (MCF7). Rezultati Miyoshi-a i saradnika (244) pokazali su da BITC intrinzičnim putem indukuju apoptozu na ćelijskim linijama karcinoma dojke (MCF7). Kafena kiselina indukuje apoptozu kod ćelija humanog karcinoma dojke (MCF7) aktivacijom proapoptotskih faktora, kao što su Fas, Bax protein i kaspaze (245). Kvercetin inhibira progresiju ćelijskog ciklusa kod karcinoma dojke (MCF7), zaustavljajući ga u G2 fazi i indukuje apoptozu ćelija MCF7 (241). Naši rezultati su u suprotnosti sa rezultatima ovih istraživača, što može ukazati na činjenicu da se u ekstraktu E4 nalaze i neidentifikovane aktivne komponente sa različitim mehanizmom indukcije ćelijske smrti kod MCF7 ćelija.

Ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

Ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva (HT-29) bila je najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću koncentracije od 12,17 μ g/mL. Isti efekat postigli su i ekstrakt E2 (sa dva puta većom koncentracijom) i sok S9 u razblaženju od 1/1200.

U radu Renelletti-ja i saradnika (246) kvercetin je pokazao dozno zavisni inhibitorni efekat na proliferaciju humanih ćelijskih linija karcinoma kolona (HT-29), (COLO-201) i (LS-174T), u koncentracijama od 10 nM do 10 μ M, putem vezivanja za tip-II estrogen-vezujuće mesto. Li i

saradnici (247) su pokazali da izoramnetin suprimira proliferaciju humanih ćelijskih linija karcinoma kolona (HT-29), indukujući zaustavljanje ćelijskog rasta u fazi G2/M. Rezultati disertacije su u saglasnosti sa rezultatima navedenih radova.

Ekstrakti i sok korena rena J9 nisu pokazali selektivnost antiproliferativnog delovanja prema HT-29 ćelijskoj liniji u odnosu na zdrave ćelije.

Musk i Johnson (248) su ispitivali citotoksični i citostatski efekat AITC iz humane hrane, na ćelije humanog kolorektalnog karcinoma *in vitro*. Pokazali su da je AITC pri dnevnoj dozi od 1,6 µg/mL tokom nedelju dana doveo do smanjenja rasta zdravih ćelija za <25%, dok je rast ćelijske kulture karcinoma bio smanjen za >60%. Dobijena povećana osetljivost malignih ćelija na AITC sugeriše da upotreba AITC u humanoj ishrani može činiti odbranu protiv razvoja kolorektalnog karcinoma, putem selektivne inhibicije rasta transformisanih ćelija kolona u odnosu na gastrointestinalnu mukozu. Rezultati disertacije nisu u saglasnosti sa ovim radom, što može ukazati činjenicu da se u ekstraktu E4 i soku korena rena J9 nalaze i neidentifikovane aktivne komponente sa različitim mehanizmima delovanja.

Rezultati disertacije su pokazali da ekstrakt E4 indukuje nekrozu u ćelijskoj liniji HT-29. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Smith-a i saradnika (249), koji su uočili da AITC slabo indukuje apoptozu kod ćelijske linije HT-29, ne više od 5%. Nasuprot tome, rezultati Gamet-Payrastre-a i saradnika su po prvi put pokazali da SFN u koncentraciji 10–30 µM indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i posrednu apoptotsku smrt kod HT-29 ćelja (250).

Ćelijska linija karcinoma pluća (A549)

Ćelijska linija karcinoma pluća (A549) bila je najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC₅₀ vrednošću koncentracije od 11,43 µg/mL. Ekstrakt E2, sa dva puta većom koncentracijom, i sok korena rena J9, u razblaženju od 1/400, postigli su isti efekat. Rezultati Nguyen-a i saradnika (233) pokazali su da tretman ćelijske linije humanog karcinoma pluća (A549) sa različitim dozama kemferola (0-70 µM) indukuje dozno i vremenski zavisno smanjenje ćelijske vijabilnosti i sinteze DNK. Kuang i Chen (251) su pokazali da, nakon tretmana ćelijske linije A549 sa 10 µM PEITC i BITC, dolazi do indukcije apoptoze, dok sa višim koncentracijama od 25 µM dolazi do indukcije nekroze.

Ćelijska linija adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231)

Rezultati disertacije su pokazali da je ćelijska linija adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231) bila najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću koncentracije od 5,52 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakti E2, E1 i E3, sa četiri puta višim koncentracijama, i sok korena rena J9, u razblaženju od 1/1200, postigli su isti efekat. Selektivnost antiproliferativnog delovanja prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231) ostvarili su ekstrakti E4 (NT/T = 1,29), E1 (NT/T = 1,2) i E8 (NT/T = 1,09).

Tsai i saradnici (252) su pokazali da tokom 24-satnog tretmana sa AITC dolazi do smanjenja ćelijske vijabilnosti, sa vrednostima koncentracija za $IC_{50}^{MCF7} = 17,96 \pm 2,58 \mu\text{M}$, $IC_{50}^{MDA-MB-231} = 11,26 \pm 1,29 \mu\text{M}$ i $IC_{50}^{MDA-MB-468} = 10,26 \pm 1,31 \mu\text{M}$. Uzrok različitog uticaja AITC na inhibiciju rasta ćelijskih linija MCF7, MDA-MB231 i MDA-MB468 može biti različita genska ekspresija za različite ćelijske tipove (253). Rezultati disertacije su u saglasnosti sa rezultatima ovoga rada.

Ćelijska linija melanoma (Hs294T)

Ćelijska linija melanoma (Hs294T) bila je najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću od 6,70 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakt E2 (sa tri puta većom koncentracijom) i sok korena rena J9, u razblaženju od 1/881, postigli su isti efekat.

Ćelijska linija adenokarcinoma prostate (PC-3)

Ćelijska linija adenokarcinoma prostate (PC-3) bila je osetljiva samo na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću koncentracije 9,01 $\mu\text{g/mL}$. Sok korena rena J9, u razblaženju od 1/482, postigao je isti efekat. Studija Nair-a (254) je pokazala da kvercetin u koncentracijama od 25 μM i 50 μM značajno inhibira rast visoko agresivne ćelijske linije karcinoma prostate (PC-3). Xu i saradnici (255) su utvrdili da 100 μM AITC utiče na značajnu inhibiciju ćelijskog rasta PC-3, tako da je vijabilnost posle 24 sata bila 64%. AITC ostvaruje citotoksičan efekat na ćelijsku liniju adenokarcinoma prostate (PC-3), sa IC_{50} vrednošću koncentracije od 2,2 μM (256). Rezultati disertacije su u saglasnosti sa rezultatima navedenih radova.

Dobijeni i prezentovani rezultati pokazuju da je postignut prvi cilj i potvrđena prva hipoteza. Naime, ekstrakti E4, E2, E3 i E1 i sok korena rena J9 ispoljavaju selektivno antitumorsko delovanje indukujući nekrozu kao mehanizam ćelijske smrti *in vitro* na većini ispitivanih ćelijskih linija karcinoma.

Ćelijska linija karcinoma jetre (hepatoma) (HepG2)

Rezultati disertacije su pokazali da je na ćelijskoj liniji karcinoma jetre (hepatoma) (HepG2) ekstrakt korena rena E4 postigao IC_{50} pri koncentracije 5,68 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakt E2 u tri puta većoj koncentraciji, i sok korena rena J9, pri razblaženju od 1/937, postigli su isti efekat. Selektivnost antiproliferativnog delovanja prema ćelijskoj liniji karcinoma jetre (HepG2), ostvarili su ekstrakti E4 (NT/T = 1,25), E2 (NT/T = 1,22) i E8 (NT/T = 1,14).

Različite studije (257, 258) su pokazale da je indukcija detoksikujućih enzima faze II posredovana AITC rezultat delimične aktivacije Nrf2, važnog aktivatora transkripcije gena enzima faze II. AITC u koncentraciji 25 μM su brzo povećali nivo Nrf2 i njegovu transkripcionu aktivnost kod ćelija humanog hepatoma (HepG2), čime su ostvarili svoju antitumorsku aktivnost. Kvercetin i kemferol takođe poseduju sposobnost indukcije antikarcinogenih enzima faze II kod ćelijske linije karcinoma jetre (HepG2) (259). PEITC u dozi od 20 μM indukuje nastanak DNK adukata, uključujući i nastanak 8-oksodG (8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozin) kao markera oksidativnog oštećenja kod ćelija humanog hepatoma (HepG2) (260), dok do raskidanja lanca DNK dolazi sa 2,5–10 μM ITC (261). Citotoksični efekat izoramnetina je pokazao doznu i vremensku zavisnost u odnosu na ćelije humanog hepatocelularnog karcinoma (BEL-7402), sa IC_{50} vrednošću od $74,4 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$ (posle 72-satnog tretmana) (262). Rezultati disertacije su slični rezultatima navedenih radova, što može da ukaže na potencijalnu citotoksičnost ekstrakata E4 i E2 i soka korena rena J9 prema ćelijskoj liniji karcinoma jetre (HepG2).

Ćelijska linija karcinoma jetre pacova (H-4-II-E)

Ćelijska linija karcinoma jetre pacova (H-4-II-E) (u odnosu na ostale ćelijske linije) bila je najosetljivija na dejstvo ekstrakta E4, sa IC_{50} vrednošću koncentracije od 3,49 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakti pulpe korena rena E1 i E2, sa pet puta većom koncentracijom, i sok korena rena J9, u razblaženju od 1/1400 postigli su isti efekat. U našoj studiji selektivnost antiproliferativnog delovanja prema ćelijskoj liniji karcinoma jetre pacova (H-4-II-E) ostvarili su ekstrakti E4 (NT/T = 2,03), E2 (NT/T = 1,07), E1 (NT/T = 1,63) i sok korena S9 (T/NT = 1,04).

Navedeni rezultati dokazuju da je postignut drugi cilj i potvrđena druga hipoteza. Naime, *in vitro* ispitivanja su pokazala da citotoksično delovanje na ćelijskoj liniji karcinoma jetre (HepG2) ispoljavaju ekstrakti E4 i E2 i sok korena rena J9, a na ćelijskoj liniji karcinoma jetre pacova (H-4-II-E) ispoljavaju ekstrakti E4, E2, E3 i E1 i sok korena rena J9.

6.3. Antitumorska i hepatoprotektivna aktivnost ekstrakata i soka korena rena *in vivo*

6.3.1. *In vivo* citotoksični i antioksidantni/prooksidantni efekti ekstrakata i soka korena rena prema ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK)

6.3.1.1. Citotoksični efekti ekstrakata i soka korena rena *in vivo*

Poremećaj ćelijskog redoks statusa i povećani nastanak ROS uočen je kod maligno transformisanih ćelija, posebno kod ćelija sa uznapredovalim tumorom, koje pokazuju multiple genetske alteracije i visok nivo oksidativnog stresa u ćelijama. ROS nastaju kao nusprodukti aerobnog metabolizma, kao sekundarni glasnici u raznim putevima prenosa signala ili kao odgovor na stres iz okruženja (263). Oksidativni mehanizmi imaju ulogu u inicijaciji, promociji i progresiji karcinogeneze. Iako se smatra da su ROS uključene i u hemijsku karcinogenezu, različiti eksperimentalni modeli pokazuju veoma različite, pa i kontradiktorne rezultate. Relativno mali broj istraživanja iz ove oblasti pokazao je da postoji veza između maligne transformacije ćelija i ravnoteže između antioksidanasa i oksidanasa. Povećanje ROS je povezano sa abnormalnim rastom maligno transformisanih ćelija, koje dovodi do narušavanja redoks homeostaze ili zbog povećane produkcije ROS, ili zbog smanjenog uklanjanja ROS. Redoks sistem ćelija reguliše način njihovog rasta (264.) Nastanak ROS predstavlja deo mehanizma kojim većina hemoterapeutskih aganasa ili jonizujućeg zračenja dovodi do smrti maligno transformisane ćelije (265, 266).

Ehrlich-ov ascitni karcinom (EAK) je slabo diferenciran maligni tumor, koji vodi poreklo od spontanog adenokarcinoma dojke, koji može da raste kao solidan tumor i u ascitnoj formi. On je karcinom epitelnog tkiva žlezdanog porekla. Pošto veoma brzo raste u ascitnoj formi, koristi se kao tumorski model za ispitivanje antitumorske aktivnosti mnogih prirodnih i sintetskih hemijskih supstanci (267). Karcinom je patološko stanje tokom koga dolazi do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija. Kod miševa dolazi do brzog povećanja volumena ascita i ascitne tečnosti EAK, koja je nutritivni izvor za ove ćelije. Povećanje volumena ascita EAK povezano je sa povećanjem ukupnog broja ćelija EAK. Efekat tretmana različitim ekstraktima na broj ćelija EAK je indirektna metoda za procenu njihovog inhibitornog efekta na rast tumora (268).

Rezultati naše disertacije su pokazali da su pretretmani i tretmani životinja ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 uticali na značajno smanjenje zapremine ascita EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu i NALC grupu. Ekstrakt E3 – bilo da je aplikovan kao pretretman, tretman ili posttretman u odnosu na momenat implantacije EAK – uticao je na značajno smanjenje zapremine

ascita EAK u odnosu na EAK kontrolu. Najveće smanjenje zapremine ascita EAK postojalo je prilikom pretretmana sa ekstraktom E8 i sokom korena rena J9 u odnosu na EAK kontrolu. Prilikom pretretmana sokom korena rena J9 došlo je do smanjenja broja ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu, dok sličan efekat nije pokazao nijedan ekstrakt korena rena. Posttretmani ekstraktima E2 i E3 uticali su na smanjenje broja ćelija EAK. Pretretmni i tretmani životinja sa ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 uticali su na značajno smanjenje procenta nevijabilnih ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu. Posttretmani sa ekstraktima E2 i E3 uticali su na povećanje procenta oštećenih ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu.

U literaturi nema podataka o citotoksičnim efektima ekstrakata i soka korena rena u *in vivo* ispitivanjima. Rezultati Bhattacharya i saradnika pokazali su da antitumorska aktivnost vodenoholnog ekstrakta *Trichosanthes dioica* (TDA) može imati direktni inhibitorski efekat na proliferaciju tumorskih ćelija EAK, dovodeći do gubitka ćelijske vijabilnosti i smrti ćelija tretiranih sa ekstraktom TDA. Antitumorska aktivnost ekstrakta pripisuje se triterpenima i kukurbitacinu (269). Hossain i saradnici su u *in vivo* ispitivanjima antitumorskog delovanja metanolnog ekstrakta lista *Dregea volubilis* (MEVD) pokazali da on, u dozama od 50 do 200 mg/kg, utiče na značajno smanjenje zapremine ascita EAK i broja tumorskih ćelija EAK, odnosno povećanje broja nevijabilnih ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu. Antitumorski efekat ekstrakta se može pripisati njegovim aktivnim komponentama flavonoidima, terpenoidima, taninima i saponinima (270). U radu Vulić i saradnika (271) ispitivana je antimikrobna i citotoksična aktivnost ekstrakta pulpe cvekle *in vivo*, na modelu Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAK). Rezultati ispitivanja su pokazali da je ekstrakt delovao citotoksično prema ćelijama EAK, putem indukcije oksidativnog stresa, verovatno zbog značajnog sadržaja fenola, flavonoida i betalaina. Ekstrakt primenjen kao pretretman pokazao je najbolje efekte, jer je doveo do značajnog smanjenja zapremine EAK, broja i vijabilnosti ćelija EAK u odnosu na kontrolu. Slični rezultati uočeni su i kod pretretmana i tretmana životinja ovim ekstraktom. Rezultati disertacije se slažu sa rezultatima navedenih studija. Ekstrakti E2 i E3, primenjeni u posttretmanu, doveli su do zaustavljanja rasta tumora, putem smanjenja zapremine hranljive tečnosti EAK, delovali su citotoksično smanjujući broj ćelija EAK, povećali su procenat nevijabilnih ćelija EAK, što može ukazati na njihovo potencijalno antitumorsko delovanje. Pretretman sokom korena rena J9 pokazao je slične efekte, što može ukazati na njegovo potencijalno hemopreventivno delovanje. Ostali ekstrakti nisu uticali na značajne promene ispitivanih parametara.

6.3.1.2. Antioksidantni status ćelija *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma (EAK) nakon primene ekstrakata i soka korena rena

Brojna istraživanja ukazuju da EAK indukuje oksidativni stres kod miševa kod kojih je aplikovan (272). Dostupna literatura o povezanosti karcinoma i aktivnosti antioksidantnih enzima okarakterisana je kontradiktornošću. Dok mnoge studije ukazuju na smanjenu aktivnost antioksidantnih enzima u jetri kod ćelija karcinoma (272), druge ukazuju na povećanu aktivnost ovih enzima (273), mada neke studije ukazuju da u zavisnosti od vrste enzima dolazi do povećanja ili smanjenja njihove aktivnosti (274). U protekciji tkiva od oksidativnog stresa važnu ulogu ima enzimski antioksidantni mehanizam koji učestvuje u eliminaciji slobodnih radikala. SOD i CAT učestvuju u uklanjanju superoksid anjon radikala i H_2O_2 . Uočeno je da je aktivnost SOD inhibirana kod ćelija karcinoma (275). Smanjenje aktivnosti SOD i CAT može biti rezultat rasta tumora (276).

Studija Bhattacharya i saradnika (269) pokazala je da je smanjenje aktivnosti hepatične SOD i CAT uočeno kod miševa sa *Ehrlich*-ovim ascitnim karcinomom. Njihovi rezultati su takođe pokazali da tretman sa ekstraktom *Trichosanthes dioica* (TDA) utiče na značajno oporavljanje od oksidativnog stresa indukovanog tumorom, putem nekoliko mehanizama, uključujući modulaciju lipidne peroksidacije LPx, kao i modulaciju endogenog ne-enzimskog antioksidansa GSH i enzimskog (SOD i CAT) detoksikujućeg sistema. Smanjenje aktivnosti SOD u ćelijama EAK možda nastaje zbog gubitka jona Mg^{2+} iz aktivnog enzima SOD u ćelijama EAK i usled gubitka mitohondrija, što dovodi do ukupnog smanjenja aktivnosti SOD u jetri (277). Interesantno je da je ćelijska malignost ili transformacija uvek udružena sa smanjenjem aktivnosti antioksidantnih enzima kao što su SOD, CAT i GSHPx, što ćelije čini osjetljivijim na dejstvo karcinogena (278). Naime, studija Rengarajan-a i saradnika je pokazala smanjenje aktivnosti enzimskih antioksidanasa kao što su SOD, CAT, GSHPx i ne-enzimskog antioksidansa GSH kod miševa kod kojih je indukovana maligna transformacija ćelija dojke sa 7,12-dimetilbenz(a)antracenom (DMBA). Nakon administracije AITC miševima koji su tretirani sa DMBA, uočeno je popravljanje antioksidantnog statusa, što ide u prilog činjenici da antioksidantni efekat AITC ima bar delimičan uticaj na karcinogenezu (278).

U literaturi ne postoje podaci o uticaju ekstrakata i soka korena rena na parametre antioksidantnog statusa u maligno transformisanim ćelijama kod *in vivo* ispitivanja.

Rezultati ove disertacije pokazali su prisustvo oksidativnog stresa različitog intenziteta u ćelijama EAK u zavisnosti od vrste aplikovanog ekstrakta, odnosno soka korena rena, i vremena

njihove aplikacije (pretretman, tretman i posttretman) u odnosu na EAK kontrolnu grupu i NALC grupu.

Kod grupa životinja koje su bile podvrgnute pretretmanu ekstraktima E1, E2, E3, E8 i sokom korena rena J9, i posttretmanu ekstraktima E2 i E3 došlo je do značajnog povećanja aktivnosti SOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. Bez obzira na vreme aplikacije, antioksidans NALC je uticao na smanjenje aktivnosti SOD u ćelijama EAK u odnosu na kontrolu. Pretretman, tretman i posttretman sa ostalim ekstraktima korena rena uticali su na smanjenje aktivnosti SOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu.

Pretretmani životinja ekstraktima E1–E8 i sokom korena rena J9 uticali su na značajno povećanje aktivnosti XOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu, pri čemu je najveći porast aktivnosti ispoljen sa ekstraktima E1 i E3, i sokom korena rena J9. Tretman ekstraktima E1 i E2 i posttretman ekstraktima E2, E3 i E8 doveli su do značajnog povećanja aktivnosti XOD u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. Antioksidans NALC je uticao na značajno povećanje aktivnosti XOD u ćelijama EAK, bez obzira na vreme njegove aplikacije.

Pretretmani životinja svim ispitivanim ekstraktima i sokom korena rena J9 značajno su smanjili aktivnost CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. Tretman ekstraktima E1, E2 i posttretman ekstraktima E2 i E3, takođe su uticali na značajno smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu. Najbolje efekte na smanjenje aktivnosti CAT u ćelijama EAK pokazali su pretretmani ekstraktom E3 i sokom korena rena J9, tretman ekstraktom E2 i posttretman ekstraktom E2 u odnosu na EAK kontrolu. Antioksidans NALC nije uticao na promenu aktivnosti CAT, bez obzira na vreme aplikacije.

Čanadanović-Brunet i saradnici (279) ispitivali su *in vivo* potencijalnu antioksidantnu i antitumorsku aktivnost ekstrakata pulpe maline, sa značajnim sadržajem fenolnih kiselina i flavonoida. Njihovi rezultati su pokazali da je kod grupe životinja pretretiranih ovim ekstraktima došlo do vrlo značajnog povećanja aktivnosti XOD i značajnog smanjenja aktivnosti CAT u ćelijama EAK u odnosu na kontrolnu EAK grupu, dok kod grupa tretiranih i posttretiranih životinja nisu postojale značajne promene aktivnosti CAT u ćelijama EAK u odnosu na kontrolnu EAK grupu.

Ćebović i saradnici (274) su ispitivali potencijalnu hemopreventivnu aktivnost vodenog ekstrakta herbe *Thymus panonicus in vivo*. Rezultati njihovog rada pokazali su značajno povećanje aktivnosti XOD u ćelijama EAK, bilo da je ekstrakt primenjen kao pretretman, tretman ili

posttretman, sa najvećim povećanjem aktivnosti enzima kod grupe pretretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Međutim, ekstrakt herbe *Thymus panonicus* aplikovan kao pretretman životinja doveo je do značajnog smanjenja aktivnosti enzima CAT u ćelijama EAK u odnosu na kontrolu.

Rezultati disertacije se dobro slažu sa rezultatima pomenutih radova. Ekstrakt korena rena E2 je bio aktivan i ispoljio je svoje efekte – bilo da je aplikovan kao pretretman, tretman ili posttretman životinja. Takođe, ekstrakt korena rena E3 je ispoljio svoje efekte kada je aplikovan kao pretretman ili posttretman životinja. Indukovano povećanje aktivnosti XOD dovodi do povećane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, dok supresija aktivnosti CAT utiče na nagomilavanje H₂O₂, što indukuje oksidativni stres (prooksidantno delovanje) u ćelijama EAK, uz smanjenje zapremine ascita EAK, broja i vijabilnosti ćelija EAK. Ovo može ukazati na potencijalnu hemopreventivnu i antitumorsku aktivnost ekstrakta korena rena E2 i potencijalnu antitumorsku aktivnost ekstrakta korena rena E3, primenjenih kod životinja. Sok korena rena J9 je slične efekte ispoljio kada je primenjen kao pretretman, što može ukazati na njegovu potencijalnu hemopreventivnu aktivnost.

Rajeshwara i saradnici (280) su ispitivali antitumorski efekat i antioksidantnu ulogu metanolnog ekstrakta semena *Mucuna pruriens* (MEMP) primenjenog na modelu EAK kod miševa. Njihovi rezultati su pokazali da posttretman životinja ovim ekstraktom, u dozama od 125 do 250 mg/kg, dovodi do povećanja aktivnosti SOD i CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. To ukazuje na značajan antitumorski i antioksidantni efekat u ćelijama EAK. Rezultati ove disertacije se delimično slažu sa rezultatima istraživanja Rajeshwara i saradnika. Naime, posttretman životinja ekstraktima korena rena E2 i E3 pokazali su značajno povećanje aktivnosti SOD, a smanjenje aktivnosti CAT u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu, ali i u odnosu na antioksidans NALC, što može biti rezultat različitih mehanizama delovanja aktivnih komponenti u ovim ekstraktima. Polifenoli mogu delovati na aktivaciju NF-κB transkripcionog faktora koji deluje na transkripciju gena enzima uključenih u antioksidantni odgovor ćelije i povećati aktivnost SOD.

Ceylin i saradnici (281) su ispitivali antikarcinogeni efekat različitih koncentracija soka *Viburnum opulus*, sa visokim sadržajem polifenola, na modelu *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma kod miševa. Njihovi rezultati su pokazali smanjenu aktivnosti CAT i SOD u tkivu jetre kod miševa sa EAK u odnosu na zdrave životinje. Tretman sokom *Viburnum opulus* uticao je na povećanje aktivnosti CAT i SOD u tkivu jetre kod miševa sa EAK u odnosu na normalne vrednosti. Autori smatraju da smanjenje aktivnosti SOD i CAT i povećanje nivoa MDA može nastati kao rezultat

agresivnosti nastalih slobodnih radikala, kao posledica rasta karcinoma. Prevođenje slobodnih radikala u stabilnije produkte ili direktna stimulacija antoksidantnih enzima mogući su mehanizmi antioksidantne aktivnosti fenolnih komponenata ekstrakta *Viburnum opulus*. Rezultati disertacije nisu u saglasnosti sa pomenutim radom (281). Povećanje aktivnosti SOD, a smanjenje aktivnosti CAT kod posttretmana može ukazati da ekstrakti soka korena rena E2 i E3 sadrže katehine sa prooksidantnom aktivnošću, koji mogu delovati citotoksično prema tumorskim ćelijama i ispoljiti antitumorsku aktivnost na eksperimentalnim životinjama.

Poznato je da oksidativni stres nastaje kao posledica prekomerne produkcije slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji dovode do lipidne peroksidacije i povećanja malonildialdehida i drugih reaktivnih jedinjenja, a koji mogu da uzrokuju oštećenje makromolekula ćelije. Rezultati Neilson-a i saradnika (282) pokazali su da je MDA, kao krajnji produkt lipidne peroksidacije i biomarker oksidativnog stresa, povišen u ćelijama karcinoma.

Rezultati naše disertacije pokazali su da su pretretmani životinja ekstraktima E1–E4, tretmani ekstraktima E1, E3 i E4 i posttretmani ekstraktima E1, E2 i E4 doveli do značajnog povećanja intenziteta oksidativnog oštećenja lipida (LPx) membrane ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu i antioksidans NALC. Na osnovu ovoga može se pretpostaviti da su ćelije EAK bile izložene oksidativnom stresu pomenutim ekstraktima korena rena. Sok korena rena J9, bez obzira na vreme aplikacije, nije uticao na promenu intenziteta LPx u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu i NALC.

U radu Ćebović (190) ispitivana je *in vitro* i *in vivo* potencijalna anti/prooksidantna aktivnost vodenih ekstrakata lista *V. album* sa sedam različitih domaćina. Dobijeni rezultati su pokazali da su u svi vodeni ekstrakti primenjeni kao pretretman i samo određeni ekstrakti u posttretmanu, značajno pojačali intenzitet LPx u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. Rezultati naše disertacije se delimično slažu sa pomenutim radom, pri čemu su određeni ekstrakti korena rena (E1 i E4) bili aktivniji, jer su uticali na povećanje intenziteta LPx bez obzira na vreme njihove aplikacije.

Hossasin i saradnici (270) ispitivali su *in vitro* i *in vivo* antitumorsku aktivnost metanolnog ekstrakta lista *Dregea volubilis* i njegova antioksidantna svojstva. Pokazali su da posttretman ovim ekstraktom, u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg, utiče na značajno smanjenje intenziteta LPx (9,3%, 15,6% i 17,5%, redom) u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu. Takođe, rezultati Manesh-a i saradnika su pokazali da izlaganje ćelija niskim μM koncentracijama ITC dovodi do povećanja rezistencije na oksidativna oštećenja. AITC i PITC pokazuju inhibiciju lipidne peroksidacije i inhibiciju tumorske aktivnosti, kada se daju miševima intraperitonealno u dozi od 0,17 do 0,25

μM , tokom pet dana neprekidno (283). Ispitivanja Wu-a i saradnika pokazala su da je kod miševa tretiranih sa 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetatom (TPA) indukovani nastanak superoksid anjon radikala od strane peritonealnih makrofaga bio viši za 30–34% u odnosu na kontrolu, dok se životni vek trajanja *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma kod miševa, posle tretmana sa AITC i PITC povećao za 1,95 i 2,52 puta, a lipidna peroksidacija u jetri bila je inhibirana za 26–47% (284). Moguće je da se doze ITC kojima se indukuje oksidativni stres u maligno transformisanim ćelijama preklapaju sa dozama potrebnim za povećanje ćelijske antioksidantne odbrane, mada više doze ITC verovatno povećavaju oksidativni stres i njime indukovanu toksičnost. Rezultati disertacije se ne slažu sa pomenutim rezultatima u radovima, pošto je većina primenjenih ekstrakata korena rena uticala na povećanje intenziteta lipidne peroksidacije LPx, bez obzira na vreme njihove aplikacije. Ovo bi se moglo objasniti time da su u našem ispitivanju verovatno bile visoke koncentracije aktivnih komponenti koje indukuju oksidativna oštećenja ćelijskih lipida.

GSH deluje kao moćan inhibitor neoplastičnih procesa i igra važnu ulogu u endogenom ne-enzimskom antioksidantnom sistemu. U svojoj redukovanoj formi, GSH, nalazi se u veoma visokoj koncentraciji u jetri i ima ključnu protektivnu ulogu i primarno deluje kao redukujući agens i detoksikuje H_2O_2 u prisustvu enzima GSHPx (285). Neke maligno transformisane ćelije imaju visok nivo GSH zbog prevelike ekspresije gama glutamil transferaze i interorganskog protoka GSH, što utiče na povećanje njihovog antioksidantnog kapaciteta i otpornost na oksidativni stres. Visok nivo GSH je promotor metastatskog rasta (286), što može ukazati na to da GSH mora imati ulogu u metastazi tumorskih ćelija. Nasuprot ovome, kod humanih ćelijskih linija karcinoma, nađena je snižena koncentracija GSH, koja nastaje kao posledica smanjenja sinteze GSH ili trošenja GSH tokom oksidativnog stresa u ćelijama (287).

Rezultati disertacije pokazali su značajno smanjenje količine GSH u ćelijama EAK, nakon pretretmana, tretmana i posttretmana životinja ekstraktima korena rena E1–E4 i tretmana ekstraktom E8 u odnosu na EAK kontrolnu grupu i antioksidans NALC, što bi moglo da ukaže na činjenicu da su ćelije EAK bile izložene oksidativnom stresu. Smanjenje koncentracije GSH je verovatno praćeno njegovim trošenjem zbog prisustva velike količine slobodnih radikala i porastom koncentracije njegovog oksidovanog oblika GSSG ili njegovim izlaskom iz ćelije. Tretman životinja antioksidansom NALC nije uticao na promenu koncentracije GSH u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu, na osnovu čega se može pretpostaviti da primenjeni ekstrakti korena rena mogu imati prooksidantnu aktivnost. Sok korena rena J9, aplikovan kao tretman i posttretman, uticao je na smanjenje količine GSH u ćelijama EAK. Međutim, sok korena rena J9 aplikovan životinjama pre (pretretman) implantacije ćelija EAK nije uticao na promenu

količine GSH u ćelijama EAK, održavajući ga u granicama NALC grupe, što bi moglo da ukaže na njegov antioksidantni potencijal.

Rezultati ispitivanja su takođe pokazali značajno povećanje aktivnost GR u ćelijama EAK, nakon pretretmana životinja sa ekstraktima E1–E4, tretmana ekstraktima E1, E3 i E4 i posttretmana ekstraktima E2 i E4 u odnosu na EAK kontrolnu grupu i NALC. Ovo bi se moglo objasniti postojanjem oksidativnog stresa i povećanim stvaranjem oksidovanog GSSG koji aktivira GR. Sok korena rena J9, primenjen kao pretretman i tretman, snizio je aktivnost GR u ćelijama EAK u odnosu na NALC.

Značajno povećanje aktivnost GSHPx u ćelijama EAK postojalo je nakon pretretmana životinja ekstraktima E1, E2, E4 i E8, tretmana ekstraktima E2–E4 i E8 i posttretmana ekstraktima E1–E3 u odnosu na EAK kontrolnu grupu i NALC. Ovo se može objasniti povećanom sintezom enzima GSHPx, kao adaptivnim odgovorom na oksidativni stres u ćelijama EAK. Sok korena rena J9 nije uticao na značajnu promenu aktivnosti GSHPx u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

Ispitivanja Ćebović (190) pokazala su značajno smanjenje količine GSH u ćelijama EAK nakon pretretmana i tretmana svim vodenim ekstraktima lista *V. album* sa različitih domaćina u odnosu na EAK kontrolnu grupu. U posttretmanu su samo neki ekstrakti pokazali značajno smanjenje koncentracije GSH. Pretretmani, tretmani i posttretmani određenim ekstraktima lista *V. album* uticali su na povećanje aktivnosti enzimskog sistema GSHPx i GRu ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolnu grupu.

Rajeshwara i saradnici (280) su u svom radu uočili da posttretman metanolnim ekstraktom semena *Mucuna pruriens*, u dozama od 125 i 250 mg/kg, dovodi do sniženja nivoa GSH u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu.

In vivo ispitivanja Ćanadanović-Brunet i saradnika (279) pokazala su visok nivo GSH u ćelijama EAK, ukazujući na nizak nivo oksidativnog stresa u tumorskim ćelijama. Pretreman ekstraktima pulpe maline uticao je na smanjenje sadržaja GSH u ćelijama EAK u odnosu na EAK kontrolu, verovatno zbog njegove povećane potrošnje usled prisustva velike količine slobodnih radikala. U regeneraciji GSH učestvuje enzimski sistem GSHPx i GR. Značajno povećanje aktivnosti enzimskog sistema GSHPx i GRu ćelijama EAK postojalo je prilikom pretretmana životinja ekstraktima pulpe maline u odnosu na kontrolu.

U radu Vladić i saradnika (288) ispitivana je antikarcinogena aktivnost ekstrakata *Satureja Montana* na modelu *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma kod miševa. Ekstrakti su primenjeni na životinje kao pretretman, tretman i posttretman u odnosu na momenat aplikacije *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma. Pretretman i tretman ekstraktima uticali su na povećanje aktivnosti XOD, smanjenje aktivnosti CAT i smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije LPx. Takođe, došlo je do smanjenja količine GSH, a povećanja aktivnosti GR i GSHPx u ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma. Promena aktivnosti ovih biohemijskih parametara, kao markera oksidativnog stresa, može da ukaže na činjenicu da su maligne ćelije bile izložene oksidativnom stresu prilikom aplikacije pomenutih ekstrakata.

Rezultati disertacije su u saglasnosti sa ovim radovima. Ekstrakti korena rena E2 i E3, primenjeni kod životinja kao posttretman, uticali su na indukciju oksidativnog stresa (prooksidantno delovanje) u ćelijama EAK koji može imati značajnu ulogu u antitumorskoj aktivnosti. Ekstrakt E2, primenjen kao pretretman kod životinja, pokazao je iste efekte indukcije oksidativnog stresa, koji može imati ulogu u hemopreventivnoj zaštiti. Antioksidansi, kvercetin i katehin prisutni u ekstraktu E2 i katehin i epikatehin prisutni u ekstraktu E3 mogu da stupe u interakciju sa kiseonikom i dovedu do nastanka superoksid anjon radikala i povećanja oksidativnog stresa u ćelijama EAK.

Rezultati *in vivo* ispitivanja ove disertacije ukazali su na postojanje razlika u redoks statusu između ćelija *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma i njihovog odgovora na tretmane ekstraktima i sokom korena rena. Ekstrakti korena rena E2 i E3, aplikovani životinjama kod kojih već postoji razvijen EAK (posttretman), smanjili su zapreminu ascita, broj malignih ćelija EAK i povećali procenat nevijabilnih ćelija EAK u odnosu na NALC. Takođe, posttretman životinja ekstraktima E2 i E3 pokazao je značajno smanjenje količine GSH, povećanje aktivnosti enzimskog sistema GSHPx i GR, povećanje intenziteta lipidne peroksidacije LPx, kao i povećanje aktivnosti XOD i SOD, a smanjenje aktivnosti CAT u ćelijama EAK, u odnosu na efekte NALC. Ovo ukazuje da posttretmani životinja ekstraktima korena rena E2 i E3 mogu potencijalno da indukuju oksidativni stres (prooksidantna aktivnost) i utiču na smanjenje antioksidantnog kapaciteta ćelija EAK, što može da ukaže na njihovu potencijalnu antitumorsku aktivnost kod životinja. Ostali ekstrakti soka korena rena nisu pokazali značajne citotoksične efekte na ćelije EAK.

Ekstrakti E2 i E3 su u *in vitro* ispitivanjima pokazali snažno antiproliferativno delovanje prema svim ispitivanim ćelijskim linijama. U *in vivo* ispitivanjima citotoksičnog i

anti/prooksidantnog delovanja, ekstrakti E2 i E3 su se takođe svojim efektima izdvojili u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte.

Polifenolne komponente mogu ostvariti hemopreventivno delovanje koje se može pripisati njihovoj antioksidantnoj aktivnosti, dok se antitumorsko delovanje najčešće može pripisati njihovoj prooksidantnoj aktivnosti, putem direktnih i indirektnih mehanizama.

Efekti ekstrakta korena rena E3 mogu se pripisati njegovim aktivnim polifenolima, kao što su katehini i epikatehin i njihovim direktnim efektima na redoks status ćelije. Katehini mogu delovati kao prooksidansi indukujući nastanak vodonik-peroksida, dok epikatehin može autoksidacijom produkovati superoksid anjon radikal, što povećava količinu ROS koji utiču na povećanje oksidativnog stresa u ćelijama EAK.

Efekti ekstrakta E2 bi se mogli pripisati njegovim aktivnim polifenolskim komponentama – katehinima, kvercetin, kemferolu i galnoj kiselini, prisutnim u visokim koncentracijama. Kvercetin ima sposobnost oksidacije sa kiseonikom, pri čemu nastaje superoksid anjon radikal, što opet utiče na povećanje oksidativnog stresa u ćelijama EAK.

Sok korena rena J9 aplikovan životinjama pre (pretretman) implantacije ćelija EAK sprečio je formiranje velike zapremine ascita EAK i uticao je na smanjenje broja malignih ćelija EAK u odnosu na EAK kontrolu. Uticao je i na povećanje aktivnosti SOD i XOD, kao i na smanjenje aktivnosti CAT i GR u odnosu na kontrolnu grupu. Uspeo je da održi koncentraciju GSH i aktivnost enzima GSHPx u ćelijama EAK u opsegu bliskom vrednostima kontrolne grupe. Zaključujemo da nije uticao na promenu intenziteta lipidne peroksidacije. Ovo ukazuje da pretretman sokom J9 nije značajnije menjao antioksidantni status ćelija EAK.

6.3.2. Antioksidantna aktivnost i hepatoprotektivno delovanje ekstrakata i soka korena rena *in vivo*

Jetra je primarni organ odgovoran za metabolizam lekova i ksenobiotika uključujući paracetamol, diklofenak, N-nitrozo jedinjenja, kao i primarno ciljno mesto za mnoga toksična jedinjenja kao što su ugljen-tetrahlorid i aflatoksin (289). CCl₄ je dobro poznat hepatotoksin koji dovodi do hepatičnog oštećenja, nekroze (290) i apoptoze (291). Administracija CCl₄ tokom dužeg vremena dovodi do fibroze, ciroze i karcinoma jetre (292). Ugljen-tetrahlorid je moćan hepatotoksin koji dovodi do nastanka hepatične nekroze kod eksperimentalnih životinja (293–295). Indukovano oštećenje jetre odigrava se u dve subsekventne faze: direktni oksidativni stres,

koji vodi ka smrti hepatocita u prvoj fazi (296), i sekundarno oštećenje kao posledica aktivacije jetrenih makrofaga, uključujući Kupferove ćelije, koje se aktiviraju putem slobodnih radikala, oslobođenih od strane medijatora inflamacije, kao što je TNF- α (297, 298) i drugih proinflamatornih citokina (299). Patofiziološke promene izazvane CCl₄-om mogu se umanjiti ekstraktima lekovitih biljaka (293, 300) koji poseduju antioksidantni i citoprotektivni efekat, putem hvatanja slobodnih radikala i detoksikacijom.

U literaturi nisu pronađeni podaci o ispitivanjima antioksidantne aktivnosti i hepatoprotektivnih/hepatotoksičnih efekata ekstrakata i soka korena rena kod *in vivo* indukovanog oštećenja jetre.

Rezultati disertacije pokazali su da je tretman životinja sa CCl₄-om ispoljio svoje toksične efekte i doveo do značajnog smanjenja telesne mase i mase jetre životinja, kao i sadržaja hepatične DNK, dok se koncentracija hidroksiprolina povećala u odnosu na netretirane životinje u kontrolnoj grupi. Tretman životinja ekstraktom E3 nije uticao na promenu telesne mase i mase jetre životinja, a uticao je na povećanje sadržaja DNK i povećanje koncentracije hidroksiprolina u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu životinja. Tretman životinja sokom korena rena J9 nije uticao na značajnu promenu telesne mase, mase jetre životinja, sadržaja DNK i koncentracije hidroksiprolina u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu životinja. Pretretmani životinja ekstraktom E3 i sokom korena rena J9 pre aplikacije CCl₄-a najbolje su uspeli da kompenzuju toksične efekte CCl₄-a na ispitivane parametre. Njihove vrednosti su pri tome ostale bliske vrednostima kontrolne grupe netretiranih životinja. Ostali ekstrakti korena rena ispoljili su suprotne efekte.

Slično, rezultati studije Čebović (190) pokazali su da kod NMRI miševa tretiranih različitim ekstraktima *V. album* nisu uočene značajne promene telesne mase i mase jetre životinja, kao ni sadržaj hepatične DNK. To ukazuje da primena ekstrakata nije dovela do ćelijskog oštećenja tkiva. Nije došlo ni do promene koncentracije hidroksiprolina kao markera hepatičnog oštećenja. Čebović i saradnici (301) su ispitivali antioksidantni potencijal ekstrakata *Satureja Montana in vivo* kod životinja intoksikovanih CCl₄-om. Njihovi rezultati su pokazali da aplikacija citotoksičnog CCl₄-a kod životinja dovodi do smanjenja sadržaja jetrene DNK, a povećanja koncentracije hidroksiprolina kao parametara oštećenja jetre u odnosu na normalnu kontrolnu grupu. Međutim kada su ekstrakti primenjeni pre aplikacije CCl₄-a pokazali su pozitivan efekat, tako da nije uočena promena koncentracije jetrene DNK, a postojalo je značajno smanjenje koncentracije hidroksiprolina u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄. Hepatoprotektivna i

antioksidantna aktivnost ekstrakata *S. montana* može se pripisati aktivnoj komponenti, karvakrolu. Rezultati disertacije se slažu sa rezultatima ovih radova, ukazujući na potencijalnu hepatoprotektivnu aktivnost ekstrakta E3 i soka korena rena J9, dok su ostali ispitivani ekstrakti korena rena pokazali suprotne efekte. Uočene razlike u efektima ekstrakata su verovatno posledica različitog sastava i aktivnosti polifenola, kao i prisustva drugih aktivnih komponenata u njima.

6.3.2.1. Biohemijski parametri funkcije jetre nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom

Serumski enzimi AST, ALT, bilirubin i protein su markeri jetrene funkcije, a njihovo povećanje ukazuje na oštećenja jetre, kao što je nekroza, ciroza i metastaze u jetri.

Rezultati disertacije su pokazali da je tretman životinja CCl₄-om uticao na povećanje aktivnosti AST i ALT u odnosu na kontrolnu grupu. Tretmani životinja ekstraktima E1, E4 i E8 uticali su na značajno povećanje aktivnosti AST i ALT u odnosu na kontrolnu grupu. Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 nije došlo do značajnih promena aktivnosti enzima AST i ALT u odnosu na kontrolnu grupu. Prilikom pretretmana sa svim ekstraktima i sokom korena rena postojalo je značajno smanjenje aktivnosti AST i ALT u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄. Najveće smanjenje aktivnosti AST i ALT postojalo je u grupama pretretiranim ekstraktima E2 i E3 u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄, ali su vrednosti još uvek bile nešto više u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo ukazuje na potencijalnu hepatoprotektivnu aktivnost ekstrakata E2 i E3 i soka korena rena J9.

U literaturi nisu pronađeni podaci o efektima ekstrakata ili soka korena rena na aktivnost jetrenih enzima ALT i AST i njihovoj potencijalnoj hepatoprotektivnoj aktivnosti u *in vivo* ispitivanjima.

Rezultati disertacije su u skladu sa mnogim prethodnim studijama, koje su pokazale da se primenom ekstrakata sa antioksidantnom aktivnošću značajno smanjuje aktivnost serumskih enzimskih markera kod životinja intoksikovanih CCl₄-om. Aktivnosti enzima ALT, ALP i AST su bile značajno smanjene posle primene ekstrakata sa antioksidantnom aktivnošću, kao što su: metanolni ekstrakt lista *Carissa opaca* (MCL) (302), vodeni ekstrakt lista *Persea Americana* (AEPA) (303), etanolni ekstrakt *Berchemia lineata* (BELE) (304), metanolni ekstrakt *Melaleuca styphelioides* (MSE) (305) i polifenolno-etanolni ekstrakt *Huangshan Maofeng* zelenog čaja (HMTP) (306). Chan i saradnici (307) su u *in vivo* studiji na miševima pokazali da su posle tretmana sa CCl₄ aktivnošću serumskih enzima AST i ALT bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, pretretman sa litospermičnom kiselinom koja poseduje antioksidantnu

aktivnost, smanjuje aktivnost serumskih enzima AST i ALT kod životinja intoksikovanih CCl₄-om u odnosu na kontrolnu grupu, ukazujući na hepatoprotektivni efekat i obnavljanje jetrenih funkcija. U radu Ćebović i saradnika (301) ispitivan je antioksidantni potencijal ekstrakata *Satureja montana* kod životinja intoksikovanih CCl₄-om. Njihovi rezultati su pokazali da kod životinja, posle intoksikacije CCl₄-om, dolazi do značajnog povećanja aktivnosti enzima AST (8,2 puta) i ALT (15,9 puta). Pretretmani ekstraktima *S. montana* uticali su na značajno smanjenje aktivnosti oba enzima u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄ kao rezultat stabilizacije ćelijskih membrana i obnavljanja tkiva jetre.

Tretman životinja ugljen-tetrahloridom doveo je do značajnog smanjenja koncentracije proteina u serumu i porasta ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na štetno dejstvo CCl₄-a na ekskretornu i sintetsku funkcije jete. Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 nije došlo do značajnih promena koncentracija proteina i ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu. Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om tretirane ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 došlo je do značajnog povećanja koncentracije proteina i ukupnog bilirubina u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄, a dobijene vrednosti su bile bliske vrednostima kontrolne grupe. Navedeni rezultati mogu ukazati na obnavljanje funkcije jetre i potencijalnu hepatoprotektivnu aktivnost ekstrakata E2 i E3 i soka korena rena J9, dok ostali ekstrakti nisu pokazali slične efekte.

Raish i saradnici (308) su ispitivali hepatoprotektivni efekat semena *Lepidium Sativum* na životinjskim modelima koji su tretirani hepatotoksičnim D-galaktozamin/lipopolisaharidom. Njihovi rezultati su pokazali da je kod životinja tretiranih hepatotoksičnim galaktozamin/lipopolisaharidom postojalo značajno povišenje nivoa serumskih biomarkera kao što su: AST, ALT i ukupan bilirubin, što je karakteristično za oštećenje jetre. Pretretman sa etanolnim ekstraktom semena *Lepidium sativum*, u dozama 150–300 mg/kg, tokom sedam dana, uticao je na sniženje nivoa svih posmatranih parametara u odnosu na kontrolu. Ovo je rezultat smanjenja strukturnih oštećenja ćelija jetre, kao posledice antioksidantne, antiinflamatorne i antiapoptotske aktivnosti glukozinolata i flavonoida prisutnih u etanolnom ekstraktu *Lepidium sativum*.

Al-Kubaisy i saradnici (309) ispitivali su *in vivo* hepatoprotektivnu aktivnost vodenog ekstrakta herbe *Teucrium Polium* kod životinja intoksikovanih CCl₄-om. Njihovi rezultati su pokazali da aplikacija citotoksičnog CCl₄ životinjama, u dozi od 2 mL/kg, dovodi do povećanja aktivnosti enzima AST, ALT i GGT i koncentracije ukupnog bilirubina. Dovodi i do značajnog

smanjenja koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu životinja u odnosu na normalnu kontrolnu grupu. Pretretmani vodenim ekstraktima, u dozama 100–400 mg/mL, uticali su na značajno smanjenje aktivnosti AST, ALT i GGT, koncentracije ukupnog bilirubina, kao i na značajno povećanje koncentracija ukupnih proteina i albumina u odnosu na CCl₄-kontrolnu grupu. Hepatoprotektivna aktivnost se može pripisati flavonoidima prisutnim u ovom ekstraktu.

Rezultati disertacije se dobro slažu sa navedenim rezultatima ovih radova, ukazujući na potencijalnu hepatoprotektivnu aktivnost ekstrakata E2 i E3 i soka korena rena J9. Serumski AST, ALT i bilirubin su najosetljiviji markeri za dijagnostikovanje oštećenja jetre, jer se nalaze u citolazmi, iz koje se oslobađaju u visokim koncentracijama u krv prilikom ćelijskog oštećenja. Visoka aktivnost enzima jetre u serumu posle intoksikacije CCl₄-om, zabeležena u disertaciji, verovatno potiče od njihovog brzog oslobađanja iz citoplazme u krv, zbog oštećenja ćelijske membrane. Tretmani ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9, pre aplikacije CCl₄-a, značajno su smanjili aktivnost jetrenih enzima, što može biti posledica sposobnosti ovih ekstrakata da zaštite membranu hepatocita od oštećenja. Proteini (albumin i neke klase globulina) sintetišu se u jetri i služe za monitoring funkcije jetre. U disertaciji su pretretmani životinja ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 doveli do značajnog porasta ukupnih proteina (verovatno kao posledica njihove sposobnosti da utiču na sintezu proteina i regeneraciju ćelija jetre) i uspostavljanja funkcionalnog statusa hepatocita. Ovo se može pripisati visokoj koncentraciji polifenola i njihovoj antioksidantnoj aktivnosti koja sprečava oksidaciju proteina. Međutim, ostali ispitivani ekstrakti korena rena pokazali su suprotne efekte, ukazujući na potencijalnu hepatotoksičnu aktivnost.

6.3.2.2. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i soka korena rena ispitivana *in vivo* nakon intoksikacije ugljen-tetrahloridom

Oštećenja jetre indukovana ugljen-tetrahloridom posredovana su aktivacijom citohroma P450 i produkcijom reaktivnih intermedijera kao što su trihlormetil slobodni radikal (CCl₃·), koji reaguje sa kiseonikom i formira trihlormetil peroksi radikal (CCl₃OO·). Ovi radikali se mogu vezati za ćelijske molekule (nukleinske kiseline, proteine i lipide), smanjiti metabolizam lipida i inicirati malignu transformaciju ćelija jetre. Mogu se takođe vezati i za nezasićene masne kiseline i dovesti do lipidne peroksidacije ćelijskih membrana i sledstveno u serumu povećanja nivoa specifičnih enzima jetre AST, ALT, ALP, GGT i LDH (310). Inhibicija produkcije i aktiviranja slobodnih radikala je veoma važan faktor u prevenciji i tretmanu oštećenja jetre indukovano CCl₄-om. Jetru od oksidativnog oštećenja štiti sistem antioksidantne zaštite. GSH je najznačajniji ne-enzimski endogeni antioksidans koji štiti ćelije od oksidativnog oštećenja, a sniženje nivoa GSH čini ćelije

podložnim oksidativnom stresu (311). GSH i CAT se zajedno suprotstavljaju oksidaciji proteina, lipida i DNK, putem neutralizacije ROS (312). Zaštitna uloga GSH protiv oksidativnog stresa ogleda se u tome da on deluje kao kofaktor mnogih detoksikujućih enzima, direktno vezuje hidroksil radikal i singletni kiseonik i regeneriše vitamine C i E, vraćajući ih u njihovu aktivnu formu (313). Redukovani GSH je biološki aktivna forma, koja se oksiduje do glutation disulfida (GSSG) tokom oksidativnog stresa, a regeneracija GSSG do aktivne sulfhidrilne forme GSH se ostvaruje aktivnošću enzima glutation reduktaze (GR). Glutation peroksidaza (GSHPx) deluje u asocijaciji sa GSH, koji postoji u visokoj koncentraciji u ćeliji, i katalizuje konverziju vodonik-peroksida ili organskih peroksida do vode ili alkohola, uz simultanu oksidaciju GSH do GSSG. Ona takođe kompetira sa CAT za vodonik peroksid kao supstrat (314).

Tretman životinja CCl₄-om uticao je na značajno povećanje aktivnosti GSHPx u odnosu na kontrolnu grupu, a slični efekti su postojali i kod grupa životinja tretiranih ekstraktima korena rena E1, E2, E4 i E8. Kod grupa životinja tretiranih ekstraktima E1, E2, E3, E8 i sokom korena rena J9 pre aplikacije CCl₄-om, postojalo je značajno smanjenje aktivnosti GSHPx u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄. Ekstrakt E3 i sok korena rena J9 – bilo da su aplikovani samostalno ili pre aplikacije CCl₄-om – pokazali su najbolje efekte, jer su uspeali da održe aktivnost GSHPx na nivou vrlo bliskom fiziološkim vrednostima kontrolne grupe.

Aplikacija CCl₄-om uticala je na značajno smanjenje aktivnost GR u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman životinja sokom korena rena J9 značajno je povećao aktivnost GR u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na sve grupe tretirane ekstraktima korena rena. Pretretmani (pre aplikacije CCl₄) sa svim ekstraktima i sokom korena rena uticali su na značajno povećanje aktivnosti GR u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄. Ekstrakti E2 i E3 i sok korena rena J9 – bilo da su aplikovani kao tretman ili pretretman (pre aplikacije CCl₄) – pokazali su najbolje efekte, jer su uspeali da održe aktivnost GR na nivou vrlo bliskom fiziološkim vrednostima kontrolne grupe.

Rezultati disertacije pokazali su da je tretman životinja CCl₄-om uzrokovao značajno smanjenje količine GSH (oko sedam puta) u odnosu na kontrolnu grupu, jer se GSH troši za detoksikaciju CCl₄. U grupama životinja tretiranim ekstraktom E3 i sokom korena rena J9 uočeno je povećanje količine GSH u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om bile tretirane ekstraktom E3 i sokom korena rena J9 pretretmani su uspeali da održe količinu GSH u nivou kontrolne grupe i da kompenzuju njegovo trošenje sa CCl₄-om, ispoljavajući svoju protektivnu i potencijalnu antioksidantnu aktivnost.

U literaturi nisu pronađeni podaci o ispitivanjima antioksidantne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena kod *in vivo* indukovano oštećenja jetre.

Vujić i saradnici (315) ispitivali su *in vivo* i *in vitro* antioksidantne efekte ekstrakata pulpe cvekle. Njihovi rezultati su pokazali da aplikacija CCl₄ kod životinja dovodi do značajnog povećanja aktivnosti GSHPx, a smanjenja aktivnosti GR i smanjenja količine GSH (sedam puta) u odnosu na kontrolu. Tretman životinja vodnim ekstraktom pulpe cvekle pokazao je umereno povećanje aktivnosti GSHPx, dok se aktivnost GR nije menjala, kao ni količina GSH u homogenatu jetre u odnosu na kontrolu. Kombinovani tretman životinja vodnim ekstraktom pulpe cvekle i CCl₄-om uticao je na značajno smanjenje aktivnosti GSHPx u odnosu na životinje kojima je aplikovan samo CCl₄. Kod kombinovanog tretmana vodeni ekstrakt pulpe cvekle je smanjio toksične efekte CCl₄-a kod životinja, održavajući količinu GSH u homogenatu jetre na nivou kontrolnih vrednosti. Očuvao je takođe aktivnost GR, mada je njena aktivnost bila nešto niža u odnosu na kontrolnu grupu. Antioksidantna aktivnost vodenog ekstrakta pulpe cvekle može se pripisati prisutnim fenolnim komponentama i betalainima. Rezultati disertacije su slični rezultatima ovog rada, ukazujući na značajnu antioksidantnu aktivnost i potencijalni hepatoprotektivni efekat ekstrakata E2 i E3 i soka korena rena J9, nasuprot CCl₄-om indukovanoj hepatotoksičnosti. Naime, u ovim ekstraktima su prisutni flavonoidi i flavonoli koji mogu delovati kao donori vodonikovih atoma slobodnim radikalima i neutralisati ih i time sprečiti veliko trošenje GSH. Ostali ispitivani ekstrakti korena rena nisu pokazali iste efekte.

Kaurinović i saradnici (316) su ispitivali *in vitro* i *in vivo* antioksidantne efekte različitih ekstrakata listova *Lauris nobilis* L. Njihovi rezultati su pokazali da tretman životinja CCl₄-om utiče na značajno smanjenje količine GSH u odnosu na kontrolu, što ukazuje da GSH deluje kao antioksidans. Tretmani životinja ispitivanim ekstraktima održali su količine GSH na nivou vrednosti kontrolne grupe. Međutim, kada su pre aplikacije CCl₄-om životinje bile tretirane ispitivanim ekstraktima, oni nisu pokazali protektivni efekat, nego su uticali na još veće smanjenje količine GSH u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinovani tretmani ekstraktima lovorovog lista i CCl₄-om nisu značajno uticali na aktivnost GSHPx. Jedino je etil-acetatni ekstrakt lovora povećao aktivnost GSHPx u odnosu na grupu tretiranu CCl₄-om. Rezultati disertacije se delimično slažu sa ovim radom, jer su pretretmani ekstraktom E3 i sokom korena rena J9 uspeli da održe količinu GSH u nivou vrednosti kontrolne grupe, kao i da kompenzuju njegovo trošenje sa CCl₄-om, ispoljavajući potencijalnu antioksidantnu aktivnost. Naime, u ekstraktu E3 i sok korena J9 prisutni su flavonoidi i katehini koji mogu delovati kao donori vodonikovih atoma ili

elektrona slobodnim radikalima i neutralisati ih i time sprečiti trošenje GSH. Ostali ekstrakti korena rena nisu pokazali iste efekte.

Lipidna peroksidacija se smatra kritičnim faktorom u patogenezi hepatičnog oštećenja indukovanog CCl₄-om (302). Značajno smanjenje lipidnih peroksida u tkivu jetre prilikom kombinovanog tretmana CCl₄-om i antioksidanasa ukazuje na protektivni efekat mnogih antioksidanasa biljnog porekla. Tako, na primer, metanolni ekstrakt lista *Carissa opaca* (MCL), bogat aktivnim komponentama: flavonoidima, kumarinima, alkaloidima, antrahinonima, saponinima, taninima i terpenoidima, može uticati na smanjenje lipidne peroksidacije ćelijskih membrana putem hvatanja slobodnih radikala produkovanih od strane CCl₄-a (302).

Rezultati disertacije su pokazali da je tretman životinja CCl₄-om uticao na značajno povećanje intenziteta LPx, kao markera oštećenja jetre u odnosu na kontrolnu grupu. Tretmani životinja ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 nisu uticali na promenu LPx, pokazujući svoj protektivni efekat u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi životinja koja je pre aplikacije CCl₄-om tretirana sokom korena rena J9 uočen je značajan supresivni efekat na intenzitet lipidne peroksidacije nastale dejstvom CCl₄-a u odnosu na kontrolnu grupu.

Ahn i saradnici (317) ispitivali su potencijalnu hepatoprotektivnu aktivnost AITC kod CCl₄ indukovane hepatotoksičnosti kod miševa. Njihovi rezultati su pokazali da administracija CCl₄-a dovodi do značajnog povećanja nivoa MDA, kao markera lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu. Tretman sa AITC pre aplikacije CCl₄-om uticao je na supresiju nastanka MDA u odnosu na grupu tretiranu samo CCl₄-om, ukazujući na potencijalnu hepatoprotektivnu aktivnost AITC.

Takođe, do sličnih rezultata došli su Go i saradnici (318), koji su ispitivali protektivni efekat ekstrakta izolovanog iz *Galla Rhois*, kod CCl₄ indukovanog oštećenja jetre miševa. U grupi životinja tretiranoj CCl₄-om koncentracija MDA u tkivu jetre je bila za 221% veća u odnosu na netretiranu grupu, dok je koncentracija MDA kod kombinovanog tretmana ekstraktom galatonina i CCl₄-om bila značajno niža u odnosu na grupu tretiranu samo CCl₄-om. Aktivnost ekstrakta *Galla Rhois* pripisuje se visokom sadržaju galne kiseline, metal-galata i galatanina, koji putem smanjenja oksidativnog stresa i regulacijom aktivnosti antioksidantnih enzima ostvaruju hepatoprotektivni efekat. Rezultati disertacije su slični rezultatima prethodnih studija, ukazujući da ekstrakti E2 i E3 i sok korena rena J9 mogu značajno smanjiti količinu lipidnih peroksida u tkivu jetre, nastalih delovanjem CCl₄-a i tako prevenirati hepatotoksična oštećenja jetre. Polifenolne kiseline i flavonoidi iz ovih ekstrakata preveniraju lipidnu peroksidaciju putem hvatanja superoksid anjona i hidroksil radikala i tako smanjuju ROS. Pored toga, mogu prekidati lančane reakcije oksidacije lipida doniranjem atoma vodonika radikalima. Ostali ekstrakti nisu pokazali iste efekte.

Enzim ksantin oksidaza (XOD) deluje prooksidantno. Ona transformiše hipoksantin u ksantin, odnosno ksantin u mokraćnu kiselinu, formirajući pritom reaktivne kiseonične vrste, superoksid anjon radikal i vodonik-peroksid.

Rezultati disertacije su pokazali da tretman životinja CCl₄-om dovodi do povećanja aktivnosti XOD u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama životinja tretiranim ekstraktima E2, E3 i E8 i sokom korena rena J9 aktivnost XOD se čak smanjila u odnosu na vrednosti netretirane kontrolne grupe. Pretretmani (pre aplikacije CCl₄-a) sa ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 uspeali su da održe aktivnost XOD u fiziološkim granicama kontrolne grupe, Kontrola, poništavajući prooksidantan efekat CCl₄-a.

Rezultati ispitivanja Vujić i saradnici (315) pokazali su da tretman životinja CCl₄-om ne utiče na promenu aktivnosti hepaticne XOD u odnosu na kontrolu. Tretman životinja vodenim ekstraktom pulpe cvekle (sa dozama od 1 do 3 mL/kg telesne mase) pokazao je značajno povećanje aktivnosti XOD, u odnosu na grupu tretiranu samo CCl₄-om, ukazujući na prooksidantnu aktivnost ovog ekstrakta. Rezultati u ovoj disertaciji nisu u saglasnosti sa pomenutim radom, pošto su tretmani ekstraktima E2, E3 i E8 i sokom korena rena J9 smanjili aktivnost XOD u odnosu na vrednosti kontrolne grupe, ukazujući na njihovu antioksidantnu aktivnost. Polifenoli prisutni u ekstraktima i soku korena rena (kafena kiselina, alkil-galati, flavonoidi) mogu delovati kao indirektni antioksidansi, putem inhibicije redoks osetljivog transkripcionog faktora NF-κB i smanjiti aktivnost prooksidantne XOD. Međutim, ekstrakti E1 i E4 su uticali na povećanje aktivnosti XOD u odnosu na vrednosti kontrolne grupe.

U studiji Kaurinović i saradnika (316) kod grupa životinja tretiranih etanolnim i etil-acetatnim ekstraktom listova *Lauris nobilis* L. postojalo je smanjenje aktivnosti XOD u odnosu na kontrolu, što može da ukaže na antioksidantnu aktivnost ovih ekstrakata. Međutim, ostali ekstrakti su pokazali suprotan efekat povećavajući aktivnost XOD, u odnosu na kontrolu, što može da ukaže na prooksidativnu aktivnost ovih ekstrakata. Rezultati disertacije se dobro slažu sa rezultatima ovog rada. Pretretmani ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9, sa značajnim sadržajem polifenolnih kiselina i flavonoida, smanjili su aktivnost XOD u odnosu na grupu tretiranu CCl₄-om. To može da ukaže na njihovu potencijalnu antioksidantnu aktivnost i hepatoprotektivni efekat. Ostali ekstrakti korena rena nisu pokazali slične efekte.

Rezultati disertacije su pokazali da je CCl₄ indukovana hepatotoksičnost uticala na veliko smanjenje aktivnosti SOD i CAT u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu. Tretmani životinja ekstraktom E8 i sokom korena rena J9 uspeali su da održe aktivnost enzima SOD na nivou fizioloških vrednosti kontrolne grupe. Tretmani sa ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9 su održali aktivnost CAT na nivou fizioloških vrednosti kontrolne grupe. Značajno povećanje

aktivnosti SOD postojalo je kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om tretirane ekstraktima E2 i E8 i sokom korena rena J9 u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄. Kod grupa životinja koje su pre aplikacije CCl₄-om tretirane ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9, postojalo je značajno povećanje aktivnosti CAT u odnosu na grupu Kontrola+CCl₄. Ovi rezultati bi mogli da ukažu na potencijalnu antioksidantnu aktivnost ekstrakata E2, E3 i E8 i soka korena rena J9, dok ostali ekstrakti nisu pokazali iste efekte.

Studija Raisha i saradnika (308) pokazala je da je kod životinja koje su pre aplikacije hepatotoksičnog galaktozamin/lipopolisaharida bile pretretirane etanolnim ekstraktom semena *Lepidium sativum*, tokom sedam dana, došlo do smanjenja oksidativnog stresa usled povećanja aktivnosti antioksidantnih enzima SOD i CAT u odnosu na grupu tretiranu CCl₄-om.

Chan i saradnici (307) su ispitivali antioksidantni i hepatoprotektivni efekat litospermične kiseline (policiklična fenolno karboksilna kiselina) *in vitro* i *in vivo*. U grupi životinja tretiranoj CCl₄-om aktivnosti SOD i CAT su bile značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu. Pretretman litospermičnom kiselinom uticao je na povećanje aktivnosti i SOD i CAT u odnosu na vrednosti grupe tretirane CCl₄-om. To ukazuje da litospermična kiselina može da smanji oksidativna oštećenja jetre uzrokovana CCl₄-om. Rezultati disertacije se dobro slažu sa rezultatima ovih ispitivanja, ukazujući na potencijalnu antioksidantnu aktivnost ekstrakata E2, E3 i E8 i soka korena rena J9. Oštećenje jetre CCl₄-om dovodi do povećanja produkcije ROS, koji mogu da oštete biomolekule, pa i ove antioksidantne enzime i smanje njihovu aktivnost, dok pretretman ovim ekstraktima deluje protektivno. Ostali ekstrakti nisu pokazali iste efekte.

Studija Ahn-a i saradnika (317) pokazala je da su aktivnosti SOD i CAT bile značajno povišene kod pretretmana sa AITC u grupama životinja CCl₄-om izazvanim oštećenjima u odnosu na grupu tretiranu samo CCl₄-om. Takođe, MDA, kao marker lipidne peroksidacije, bio je snižen u grupi pretretiranoj sa AITC, kod CCl₄ izazvanog oštećenja. Ovi rezultati ukazuju da je hepatoprotekcija aktivirana sa AITC delimično povezana sa efektom hvatanja radikala, preko antioksidantnih enzima SOD i CAT, uz povezanu supresiju lipidne peroksidacije.

Rezultati brojnih studija pokazali su da enzim SOD smanjuje koncentraciju visoko reaktivnih superoksid anjon radikala pretvarajući ih u H₂O₂, dok CAT, GSH i GSHPx razgrađuju H₂O₂, da bi zaštitile tkivo jetre od slobodnih kiseoničnih radikala, nastalih delovanjem CCl₄ (302, 305). Posle smanjenja aktivnosti SOD zbog injektovanja CCl₄-a, aktivnost antioksidantnih enzima se značajno povećava kao odgovor na tretman metanolnim ekstraktom *Melaleuca styphelioides* (MSE) (305), metanolnim ekstraktom lista *Carissa opaca* (MCL) (302), polifenolno-etanolnim ekstraktom *Huangshan Maofeng* zelenog čaja (HMTP) (306). Rezultati drugih studija su takođe

pokazali da AITC-om indukovana protekcija hepatocita od oksidativnog stresa izazvanog CCl₄-om dovodi do povećanja aktivnosti SOD i CAT, uz smanjenje intenziteta LP_x, i smanjenje aktivnosti ALT i AST, što čini dobro poznatu kaskadu kod modela sa CCl₄-om izazvanim oštećenjima jetre (295, 319) i verovatno je hepatoprotektivni mehanizam delovanja AITC.

Rezultati ove disertacije ukazuju da bi ekstraktima E2, E3 i sokom korena rena J9 mogla biti aktivirana hepatoprotekcija. Naime, biohemijski pokazatelji oksidativnog stresa u jetri u značajnoj meri su se normalizovali kod životinja koje su pre intoksikacije CCl₄-om bile pretretirane ekstraktima E2 i E3 i sokom korena rena J9. To ukazuje na činjenicu da poseduju potencijal da spreče oštećenja hepatocita slobodnim radikalima. Ovaj efekat hepatoprotekcije bi mogao da bude delimično povezan sa efektom hvatanja radikala, preko povećanja aktivnosti antioksidantnih enzima SOD i CAT, uz povezanu supresiju lipidne peroksidacije i održavanje nivoa GSH koji štiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Posledično značajno smanjenje aktivnosti AST i ALT, kao i koncentracije ukupnih bilirubina, moglo bi da ide u prilog obnavljanju funkcije jetre. Ekstrakti E1, E4 i E8 su pokazali suprotne efekte, ukazujući na potencijalnu hepatotoksičnost.

Navedeni rezultati dokazuju da je postignut četvrti cilj i potvrđena četvrta hipoteza. Naime, ekstrakti E2, E3 i sok rena J9 ispoljavaju potencijalno hepatoprotektivno delovanje *in vivo*, prevenirajući oštećenja jetre indukovana hepatotoksičnim CCl₄-om.

Rezultati disertacije su pokazali postojanje različitog antitumorskog delovanja ekstrakata i soka korena rena prema određenim tipovima tumora *in vitro* i *in vivo*. Pokazali su takođe i postojanje različitih antioksidantnih/prooksidantnih i hepatotoksičnih/hepatoprotektivnih efekata *in vivo*.

7. Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti sledeće:

1. U ekstraktima i soku korena rena identifikovane su polifenolne komponente: fenolne kiseline (galna, protokatehinska, kafena, ferulna, izoferulna, hlorogena, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarinska, siringinska i sinapinska kiselina) i flavonoidi (katehin, epikatehin, kvercetin, kemferol, luteolin, apigenin i izoramnetin). Najveći sadržaj polifenola bio je prisutan u dihlormetanskom ekstraktu pulpe korena rena, E1 i dihlormetanskom ekstraktu soka korena rena, E3. U soku korena rena J9 najzastupljeniji su katehin i galna kiselina.

2. *In vitro* ispitivanja antitumorske aktivnosti ekstrakata i soka korena rena, pokazala su da su ekstrakti E1, E2, E3 i E4 i sok korena rena J9 ispoljili najsnažniju antiproliferativnu aktivnost, indukujući nekrozu kao mehanizam ćelijske smrti, prema većini ćelijskih linija. Ekstrakt E4 je ispoljio najsnažnije i neselektivno citotoksično delovanje prema svim ćelijskim linijama, sa najsnažnijim delovanjem na ćelijske linije karcinoma jetre pacova (H-4-II-E) i karcinoma grlića materice (HeLa). Ekstrakt E2 je delovao citotoksično na sve ćelijske linije, osim karcinoma prostate (PC-3). Ekstrakt E3 je najsnažnije delovao na ćelijske linije zdravih pluća (MRC-5) i karcinoma dojke (MCF7). Najsnažnije antiproliferativno delovanje soka korena rena J9 bilo je prema ćelijskim linijama karcinoma grlića materice (HeLa), karcinoma jetre pacova (H-4-II-E), ali i prema ćelijama izvedenim iz zdravog tkiva (MRC-5).

3. *In vitro* ispitivanja hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata i soka korena rena su pokazala da su ekstrakti korena rena E2 i E4 ispoljili citotoksično delovanje prema ćelijskoj liniji karcinoma jetre (HepG2), dok su ekstrakti E1, E2, E3 i E4 delovali citotoksično na ćelijsku liniju karcinoma jetre pacova (H-4-II-E).

4. *In vivo* ispitivanja antitumorske aktivnosti ekstrakata korena rena na ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma pokazala su da posttretmani ekstraktima E2 i E3 ispoljavaju potencijalnu citotoksičnu aktivnost. Ovi ekstrakti indukuju oksidativni stres (prooksidantna aktivnost) i utiču na značajno smanjenje antioksidantnog statusa ćelija EAK, što može da ukaže na njihovu potencijalnu antitumorsku aktivnost kod životinja.

5. *In vivo* ispitivanje antitumorske aktivnosti soka korena rena J9 na ćelijama *Ehrlich*-ovog ascitnog karcinoma pokazalo je da je on, aplikovan životinjama pre (pretretman) implantacije ćelija EAK, sprečio formiranje velike zapremine ascita, kao i da je broj ćelija EAK bio značajno manji. Uticao je takođe i na promenu antioksidantnog statusa ćelija EAK (ali znatno manje u

odnosu na ekstrakte E2 i E3), što može da ukaže na njegovu potencijalnu hemopreventivnu aktivnost.

6. *In vivo* ispitivanja antioksidantne aktivnosti i hepatoprotektivnog delovanja ekstrakata i soka korena rena su pokazala da ekstrakti E2 i E3 i sok korena rena J9 mogu da preveniraju oštećenja jetre putem supresije oksidativnog stresa indukovanoog hepatotoksičnim CCl₄-om, što ukazuje na njihovo potencijalno hepatoprotektivno delovanje. Oni utiču na povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima SOD i CAT, a smanjenje aktivnosti prooksidantne XOD, uz povezanu supresiju lipidne peroksidacije i održavanje nivoa GSH kao jakog antioksidansa koji štiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Značajno smanjenje aktivnosti AST i ALT i koncentracije ukupnih bilirubina moglo bi da ukaže na obnavljanje funkcije jetre.

8. Literatura

1. Beck LY. *Pedanius dioscorides of anazarbus*. Hildesheim: Olms-Weidmann; 2005.
2. Courter JW, Rhodes AM. Historical notes on horseradish. *Econ Bot.* 1969; 23:156–64.
3. Shehata A, Mulwa RM, Babadoost M, Uchanski M, Norton MA, Skirvin R, et al. Horseradish: botany, horticulture, breeding. In: Janick J, editor. *Horticultural review*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009. p. 221–61.
4. Dalby A, Cato MP. *On farming de agricultura*. Totnes, Devon: Prospect Books; 1998.
5. Bostock J, Riley HT. *Pliny the elder. A description of plants, and of the remedies derived from them*. London: Taylor and Francis; 1855.
6. Wedelsbäck Bladh K, Olsson KM. Introduction and use of horseradish (*Armoracia rusticana*) as food and medicine from antiquity to the present: emphasis on the Nordic countries. *J Herbs Spices Med Plants.* 2011;17(3):197–213.
7. Grive MA. *Modern herbal*. 5th ed. Thetford: Lowe and Brydine Printers LTD; 1979.
8. Johnston JS, Pepper AE, Hall AE, Chen ZJ, Hodnett G, Drabek J, et al. Evolution of genome size in Brassicaceae. *Ann Bot.* 2005; 95(1): 229–35.
9. Sampliner D, Miller A. Ethnobotany of horseradish (*Armoracia rusticana*, Brassicaceae) and its wild relatives (*Armoracia* spp.): reproductive biology and local uses in their native ranges. *Econ Bot.* 2009; 63(3): 303–13.
10. Mohlenbrock RH. *The illustrated flora of Illinois-flowering plants willows to mustards*. Carbondale, IL: Southern Illinois University Press; 1980. p. 181.
11. Winiarczyk K, Bednara J. The progamic phase and seed formation in *Armoracia rusticana*. *Plant Breed.* 2008; 127(2): 203–7.
12. Walters SA, Wahle EA. Horseradish production in Illinois. *Hort Technol.* 2010; 20(2): 267–76.
13. Tucakov J. *Lečenje biljem*. Beograd: Rad; 1996. p. 573.
14. Perlaki Z, Djurovka M. Horseradish root yield depending on organic and mineral fertilizers. *Contemp Agric.* 2009; 58(1–2): 106–11.
15. Verkerk R, Dekker M. Glucosinolates. In: Bilbert J, Senyuva HZ, editors. *Bioactive compounds in foods*. Hoboken: Blackwell Publishing; 2008.
16. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothioyanates among plants. *Phytochem.* 2001; 56(1): 5–51.
17. Yan X, Chen S. Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta.* 2007; 226(6): 1343–52.

18. Travers-Martin N, Kuhlmann F, Müller C. Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiol Biochem.* 2008; 46(4): 506–16.
19. Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci.* 2014; 64(1): 48–59.
20. Grubb CD, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci.* 2006; 11(2): 89–100.
21. Halkier BA, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann Rev Plant Biol.* 2006; 57: 303–33.
22. Sønderby IE, Geu-Flores F, Halkier BA. Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 2010b; 15(5): 283–90.
23. Wittstock U, Halkier B. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends Plant Sci.* 2002; 7(6): 263–70.
24. Chen S, Glawischnig E, Jorgensen K, Naur P, Jorgensen B, Olsen CE, et al. CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in Arabidopsis. *Plant J.* 2003; 33(5): 923–7.
25. Naur P, Petersen BL, Mikkelsen MD, Bak S, Rasmussen H, Olsen CE, et al. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003; 133(1): 63–72.
26. Geu-Flores F, Nielsen MT, Nafisi M, Møldrup ME, Olsen CE, Motawia MS, et al. Glucosinolate engineering identifies a gamma-glutamylpeptidase. *Nat Chem Biol.* 2009; 5(8): 575–7.
27. Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA. Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J.* 2004; 37(5): 770
28. Brown PD, Tokuhisa JG, Reichelt M, Gershenzon J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry.* 2003; 62(3): 471–81.
29. Bones AM, Rossiter J. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry.* 2006; 67(11): 1053–67.
30. Mithen RF, Dekker M, Verkerk R, Rabot S, Johnson IT. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J Sci Food Agric.* 2000; 80(7): 967–84.
31. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med.* 2012; 18(6): 337–47.

32. Li X, Kushad MM. Correlation of glucosinolates content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *J Agric Food Chem*. 2004; 52(23): 6950-5.
33. Redovnikovic IR, Peharec P, Rasol MK, Delong K, Brkic K, Vorkapic-Furac J. Glucosinolate profiles, myrosinase and peroxidase activity in horseradish (*Armoracia lapatifolia* Gilib.) Plantlets, tumour and teratoma tissues. *Food Technol Biotechnol*. 2008a; 46(3): 317–21.
34. Agneta R, Rivelli AR, Ventrella E, Lelario F, Sarli G, Bufo SA. Investigation of glucosinolate profile and qualitative aspects in sprouts and roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) using LC-ESI-hybrid linear ion trap with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(30): 7474–82.
35. Wu X, Yhou QH, Xu K. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacol Sin*. 2009; 30(5): 501–12.
36. Brown J, Morra MJ. Glucosinolate – containing seed meal as a soil amendment to control plant pests 2000-2002. Columbus, Ohio: National Renewable Energy Laboratory; 2005. p. 3-7.
37. Zhang Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res*. 2004; 555(1–2): 173–90.
38. Ohta Y, Takatani K, Kawakishi S. Decomposition rate of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *Biosci. Biotechn. Biochem*. 1995; 59: 102–103.
39. Bruggeman IM, Temmink JH, van Bladeren PJ. Glutathione- and cysteine-mediated cytotoxicity of allyl and benzyl isothiocyanate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986; 83(2): 349–59.
40. Callaway EC, Zhang Y, Chew W, Chow HH. Cellular accumulation of dietary anticarcinogenic isothiocyanates is followed by transporter-mediated export as dithiocarbamates. *Cancer Lett*. 2004; 204(1): 23–31.
41. Conaway CC, Krzeminski J, Amin C, Chung FL. Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*. 2001; 14(9): 1170–6.
42. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*. 2002; 22(1): 19–34.
43. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*. 2001b; 21: 381–406.
44. Harborne JB. For the content of flavonoids. In: Buckingham J, editor. *Dictionary of natural products*. New York: Chapman and Hall; 1994.
45. Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytol*. 2005; 165(1): 9–28.
46. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agricult*. 2020; 80(7): 1033–43.

47. Ahn CH, Choi WC, Kong JY. Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1997; 17(3C): 1913–7.
48. Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F. Modulation of ceramide-induced NF-Kb binding activity and apoptotic response of caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(7): 722–33.
49. Hagiwara A, Kokubo Y, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S, Hirose M, et al. Inhibitory effects of phenolic compounds on development of natural occurring preneoplastic hepatocytic foci in long-term feeding studies using male F344 rats. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1966; 16(6): 317–25.
50. Inoue M, Suyuki R, Sakaguchi N, Li Y, Takeda T, Ogihara Y, et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18(11): 1526–30.
51. Madlener S, Saiko P, Vonach C, Viola K, Huttary N, Stark N, et al. Multifactorial anticancer effects of digalloyl-resveratrol encompass apoptosis, cell-cycle arrest, and inhibition of lymphendothelial gap formation in vitro. *Br J Cancer.* 2010; 102(9): 1361–70.
52. Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Grusch M, Saiko P, Krupitza G, Venkateswarlu S, et al. Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2009; 274(2):299–304.
53. Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1988; 48(21): 5941–6.
54. Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE, Velasco M, Woods J, et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis.* 2000; 21(6): 1149–55.
55. Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, et al. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett.* 2000; 157(1): 15–21.
56. Kasai H, Fukuda S, Yamaizumi Z, Mori H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38(5): 467–71.
57. Castelluccio C, Bolwell GP, Gerrish C, Rice-Evans C. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem J.* 1996; 316(2): 691–4.
58. Pannala AS, Rayaq R, Halliwell B, Singh S, Rice-Evans CA. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: Nitration or electron donation? *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24: 594–606.
59. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF-kappa B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(7): 6017–26.

60. Shigeoka Y, Igishi T, Matsumoto S, Nakanishi H, Kodani M, Yasuda K, et al. Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor-beta through Akt inhibition. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130(3): 146–52.
61. Ferreira D, Bekker R. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat Prod Rep.* 1996; 13: 411–33.
62. Hemingway RW, Karchesy Joseph J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum Press. 1989. p. 83–107.
63. Yang L, Liu Y, Wang M, Qian Y, Dong X, Gu H, et al. Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibiting of the Akt-CSN6-Myc signalling axis. *Mol Med Rep.* 2016; 14(5): 4559–66.
64. Singh B, Mense SM, Bhat N, Putty S, Guthiel WA, Remotti F, et al. Dietary quercetin exacerbates the development of estrogen-induced breast tumors in female ACI rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 247(2): 83–90.
- 65 Jaramillo S, Lopez S, Varela L M, Rodriguez-Arcos R, Jimenez A, Abia R, et al. The flavonol isorhamnetin exhibits cytotoxic effects on human colon cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(20): 10869–75.
66. Lee HJ, Lee HJ, Lee EO, Ko SG, Bae HS, Kim CH, et al. *Cancer letters.* 2008; 27: 342–353.
67. Kim JE, Lee DE, Lee K W, Son JE, Seo SK, Li J, et al. Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer Prev Res.* 2011; 4(4): 582–91.
68. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999; 65(4): 337–53.
69. Ma G, Yang C, Qu Y, Wei H, Zhang T, Zhang N. The flavonoid component isorhamnetin in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in Eac-109 cells. *Chem Biol Interact.* 2007; 176(2): 153–60.
70. Gadkari PV, Balaraman M. Catechins: sources, extraction and encapsulation: a review. *Food Bioprod Process.* 2015; 93: 122–38.
71. Hirose M, Hoshiya T, Akagi K, Takahashi S, Hara Y, Ito N. Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 1993; 14(8): 1549–53.
72. Ho CT, Chen Q, Shi H. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev Med.* 1992; 21(4): 520–5.
73. Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Cooper KD, Mukhar H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis.* 1999; 20(11): 2117–24.

74. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R. The bacterial activity of tea and coffee. *Lett Appl Microbiol.* 1989; 8(4): 123–5.
75. Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT. Food phytochemicals for cancer prevention. Washington, DC: American Chemical Society; 1994.
76. Verstraeten SV, Hammmestone JF, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PL. Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trmeis isolated from peanut and Cocoa. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(12): 5041–8.
77. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3275S–84S.
78. Hsu S, Yu FX, Huang Q, Lewis J, Singh B, Dickinson D, et al. A mechanismbased in vitro anticancer drug screening approach for phenolic phytochemicals. *Assay Drug Dev Technol.* 2003b; 1(5): 611–8.
79. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(6): 569–90
80. Yanishlieva NV. Inhibiting oxidation. In: Pakorny J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. *Antioxidants in food: Practical applications.* Cambridge: Woodhead Publishing; 2001.
81. Yoshino M, Murakami K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem.* 1998; 257(1): 40–4.
82. Shahidi F, Wasnasundar PK. Phenolic antioxidants. *Crit Food Sci Nutr.* 1992; 32(1): 67–103.
83. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem.* 1998; 46(5): 1887-92.
84. Kurutas EB, Ciragil P, Gul M, Kilinc M. The effects of oxidative stress in urinary tract infection. *Mediators Inflamm.* 2005; 2005(4): 242–4.
85. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44–84.
86. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54(3): 176–86.
87. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. *East Mediterran Health J.* 1998; 4(2): 350–60.
88. Di Meo S, Reed T, Vendini P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological condition. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1245049.
89. Zhao RU, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *Int J Mol Med.* 2019; 44(1): 3–15.

90. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, et al. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*. 2004; 24(36): 7779–88.
91. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. *Biohemija slobodnih radikala*. Niš: Medicinski fakultet; 2000.
92. Lambert AJ, Brend MD. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*. 2004; 382 (Pt 2): 517–204.
93. Circu ML, Moyer MP, Harrison L, Aw TY. Contribution of glutathione status to oxidant induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(8): 1190–8.
94. Rachek LI, Yuzefovych LV, Ledoux SP, Julie NL, Wilson GL. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 240(3): 348–54.
95. Ghafourifar P, Cadens E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26(4): 190–5.
96. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271(5 Pt 1): C1424–37.
97. Fattman CL, Enghild JJ, Crapo JD, Schaeffer LM, Valnickova S, Oury TD. Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem Biophys Commun*. 2000; 275(2): 542–8.
98. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54(3): 176–86.
99. Flora SJ. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev*. 2009; 2(4): 191-206.
100. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 1994; 15(1): 7–10.
101. Đukić MM. *Oksidativni stres: kliničko-dijagnostički značaj*. Beograd: Vulkan izdavaštvo; 2008.
102. Svingen BA, Beuge JY, O Neal FO, Aust SD. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1979; 254(13): 5892–9.
103. Jovičić A, Mihajlović R, Čolić M, Selaković MV. Content of malonilaldehyde and TGF- β in the CSF of patients in the acute phase of completed stroke. *Eur J Neurol*. 2000;(Suppl): S110.
104. Đukić M, Jovičić M, Nedeljković M, Milić B. Indeks lipidne peroksidacije u plazmi alkoholičara u toku terapije disulfiramom. *Jugoslav Med Biochem* 1996;15(4):285.

105. Stadtman ER, Berlett SB. Free radical-mediated modification of proteins. In: Wallace KB, editor. Free radical toxicology. New York: Taylor and Francis; 1997.
106. Davies MJ, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(11–12): 1151–63.
107. Pryor WA. Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: It has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radic Biol Med.* 1988; 4(4): 219–223.
108. Kassam SN, Rainbow AJ. Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359(4): 1004–9.
109. Nabavi SF, Barber AJ, Spagnuolo C, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM. Nrf2 as molecular target for polyphenols: a novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016; 53(5): 293–312.
110. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2- an update. *Free Radic Biol Med.* 2014; 66: 36–44.
111. Feng X, Tan W, Cheng S, Wang H, Ye S, Yu C. Upregulation of microRNA-126 in hepatic stellate cells may affect pathogenesis of liver fibrosis through the NF- κ B pathway. *DNA Cell Biol.* 2015; 34(7): 103–8.
112. Christian P, Su Q. MicroRNA regulation of mitochondrial and ER stress signaling pathways: implications for lipoprotein metabolism in metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; 307(9): E729–37.
113. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev.* 2012; 32(4): 687–726.
114. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52 Suppl 1: S128–38.
115. Molavian H, Tonekaboni AM, Kohandel M, Sivaloganathan S. The synergetic coupling among the cellular antioxidants glutathione peroxidase/peroxiredoxin and other antioxidants and its effect on the concentration of H₂O₂. *Sci Rep.* 2015; 5: 13620.
116. Kirkman HN, Gaetani G. Mammalian catalase: a venerable enzymewith new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences.* 2007; 32(1): 44–50.
117. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller A, Teixeira M, et al. Superoxide dismutases and superoxide reductase. *Chem Rev.* 2014; 114(7): 3854–918.
118. Shafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(11): 1191–212.
119. Birk J, Meyer M, Aller I, Hansen HG, Odermatt A, Dick TP, et al. Endoplasmatic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J Cell Sci.* 2013; 126(Pt 7): 1604–17.

120. Lu C, Armstrong JS. Role of calcium and cyclophilin D in the regulation of mitochondrial permeabilization induced by glutathione depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363(3): 572–7.
121. Rubartelli A, Bonifaci N, Sitia R. High rates of thioredoxin secretion correlate with growth arrest in hepatoma cells. *Cancer Res.* 1995; 55(3): 559–604.
122. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res.* 2018; 52(7): 751–62.
123. Knight TR, Fariss MW, Farhood A, Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetoaminophen overdose in mice. *Toxicol Sci.* 2003; 76(1): 229–36.
124. Wong E. Introduction to neoplasia [Internet]. 2018 [cited 2020 Dec 27]. Available from: <http://www.pathophys.org/introneoplasia/>
125. Stošić Z. Maligna neoplazija kao etiološki faktor bolesti. In: Borota R, Ćurić N, Dujmović F, Đerić M, Mitić G, Stošić Z, editors. *Osnovi kliničke patofiziologije*. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2012.
126. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 254(2): 86–99.
127. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2009; 38(1): 96–109.
128. Klaunig JE, Wang Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Curr Opin Toxicol.* 2018; 7:116–21.
129. Wilson VL. Carcinogenesis. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of sustainability science and technology*. New York: Springer Science Publisher; 2012.
130. Borghaei H, Weiner LM. Oncological diseases. In: Myers RA. *Encyclopedia of sustainability science and technology*. New York: Springer Science Publisher; 2012.
131. Bommer UA, Vine KL. Cancer biology: molecular and genetic basis [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 28]. Available from: <https://ro.uow.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com/&httpsredir=1&article=1495&context=ihmri>
132. Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins Patologia básica*. Rio de Janeiro: Saunders; 2008. p. 187–243.
133. Zachary JF, McGavin MD. *Bases da patologia em veterinária*. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier; 2009.
134. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cells response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2(28): 594–604.

135. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239–67.
136. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS – mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(7): 579–91.
137. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1): 47–95.
138. Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* 1994; 344(8926): 862–3.
139. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17(10): 1195–214.
140. Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* 1994; 54(7 Suppl): S1890–4.
141. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell.* 2002; 9(5): 1031–44.
142. Rolfs F, Huber M, Gruber F, Bohm F, Pfister HJ, Bochkov VN, et al. Dual role of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 6 in skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2013; 73(11): 3460–9.
143. Kuehne A, Emmert H, Soehle J, Winnefeld M, Fischer F, Wenck H, et al. Acute activation of oxidative pentose phosphate pathway as first-line response to oxidative stress in human skin cells. *Mol Cell.* 2015; 59(3): 359–71.
144. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic condition. *J Carcinog.* 2006; 5: 14.
145. Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med.* 2007; 11(6): 1214–24.
146. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
147. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods.* 2008; 44(3): 200–4.
148. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(3): 231–41.
149. Schultz RM. Cell cycle, programmed cell death, and cancer. In: Devlin TM, editor. 6th ed. *Textbook of biochemistry with clinical correlations.* Hoboken: John Wiley & Sons; 2006. p. 1014–35.
150. Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Li Z. Role of chaperones and FcγR in immunogenic death. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(5): 512–7.

151. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003; 171(9): 4672–9.
152. Festjens V, VandenBerghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signaling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochem Biophys Acta.* 2006; 1757(9–10): 1371–87.
153. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(7): 552–65.
154. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000; 407(6805): 784–8.
155. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146(1): 3–15.
156. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 2003; 40(5): 481–95.
157. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997; 185(8): 1481–6.
158. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 2008; 18(4): 157–64.
159. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 4): 437–41.
160. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004; 384(Pt 2): 201–32.
161. Fisher U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003; 10(1): 76–100.
162. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulation apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* 2002; 9(10): 1115–25.
163. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000; 403(6765): 98–103.
164. Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(5): 1150–4.
165. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem.* 1998; 273(45): 29648–53

166. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 2004; 23(16): 2950–66.
167. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. 2007; 129(3): 447–50.
168. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008; 19(3–4): 325–31.
169. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26(9): 1324–37.
170. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenameele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004; 23(16): 2861–74.
171. Garido G, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006; 13(9): 1423–33.
172. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-induced factor in programmed cell death. *Nature*. 2001; 410(6828): 549–54.
173. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 87–106.
174. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Rev*. 2007; 87(1): 99–163.
175. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi TF, Parsons MJ, Green DR. The Bcl-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37(3): 299–310.
176. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001; 7(3): 683–94.
177. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000; 288(5468): 1053–8.
178. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(9): 621–32.
179. Lartigue L, Kushnareva Y, Seong Y, Lin H, Faustin B, Newmeyer DD. Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(23): 4871–84.
180. Sarosiek KA, Ni Chonghaile T, Letai A. Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol*. 2013; 23(12): 612–9.
181. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 4): 437–41.

182. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276(10): 7320–6.
183. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol.* 2010; 2010: 370835.
184. Miyashita T, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, et al. Tumor suppressor p53 is regulator of bcl2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994; 9(6): 275–87.
185. Kupchan SM. Recent advances in the chemistry of terpenoid tumor inhibitors. *Pure Appl Chem.* 1970; 21(2): 227–46.
186. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural products isolation. New Jersey: Humana Press Inc; 2006.
187. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat Cancer Inst.* 1990; 82(13): 1107–12.
188. Četojević-Simin D, Velićanski A, Cvetković D, Markov S, Četković G, Tumbas Šaponjac V, et al. Bioactivity of Meeker and Willametter raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chem.* 2015; 166: 407–13.
189. Četojević-Simin D. Tumor cell growth activity of fruit and pomace extracts. In: Oven JP, editor. *Fruit and pomace extracts: biological activity, potential applications and beneficial health effects.* New York: Nova Science Publishers; 2015. p. 241–53.
190. Čebović T. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts from different host trees on oxygen free radicals production and activities of antioxidant enzymes [dissertation]. Beograd: Faculty of Pharmacy; 2008.
191. Mc Clatchey Kenneth D. *Clinical laboratory medicine.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 275.
192. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010; 5(1): 51–66.
193. Bergmayer UH. *Methoden der enzymatischen analyse.* Weinheim: Verlag Chemie; 1970. p. 483–4.
194. Beers RF Jr, Sizer IW. Spectrophotometric method for measuring of break down of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 195(1): 133–40.
195. Chiu DT, Stults FH, Tappel AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1976; 445(3): 558–60.
196. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In: Bergmayer HU, editors. *Methods of enzymatic analysis.* 3rd ed. Basel: Weinheim; 1983. p. 258–65.

197. Beuthler E, Duron O, Kelly B. Improved methods for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1983; 61: 882–9.
198. Buege AL, Aust DS. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleisher S, Parker L, editors. *Methods in enzymology.* New York: Academic Press; 1978. p. 306–10.
199. 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.
200. Ćebović T. *Practical manual in biochemistry.* Novi Sad: Faculty of Medicine; 2016.
201. Kovačević Z. *Praktična biohemija i molekularna biologija.* Novi Sad: Medicinski fakultet; 1994.
202. 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.
203. Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 93(2): 440–7.
204. Weber WW. Seed production in horseradish. *J Hered.* 1949; 40(8): 223–7.
205. Tawfig N, Heaney RK, Plumb JA, Fenwick GR, Musk SRR, Williamson G. Dietary glucosinolates as blocking agents against carcinogenesis: Glucosinolate breakdown products assessed by induction of quinone reductase activity in murine hep 1c1c7 cells. *Carcinogenesis.* 1995; 16(5): 1191–4.
206. Blažević I, Mastelić J. Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chem.* 2009; 113(1): 96–102.
207. Clarke DB. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal Methods.* 2010; 2(4): 310–25.
208. Rosa AS, Heaney R, Fenwick G, Portas C. Glucosinolates in crop plants. In: Janick J, editor. *Horticultural reviews.* New York: John Wiley & Sons; 1997. p. 99–215.
209. Herz C, Tran HTT, Marton MR, Maul R, Beldermann S, Shreiner M. Evaluation of an aqueous extract from horseradish root (*Armoracia rusticana* Radix) against lipopolysaccharide-induced cellular inflammation reaction. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017; 2017: 1950692.
210. *Composition of Foods Raw, Processed, Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25.* Baltimore: U.S. Department of Agriculture; 2012.
211. Okuda T, Yoshida T, Htano T. Economical and medicinal plant research. In: Wagner H, Hikino H, Farnsworth NR, editors. *Economic and medicinal plant research.* Cambridge: Academic Press; 1991. p. 129.

212. Gao X, Bjork L, Trajkovski V, Uggla M. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Sci Food Agric*. 2000; 80(14): 2021–7.
213. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*. 2000; 36(10): 1235–47.
214. Xiao D, Srivastava SK, Lew KL, Zeng Y, Hershberger P, Johnson CS, et al. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis*. 2003; 24(5): 891–7.
215. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacoth*. 2002; 56(4): 200–7.
216. Vallejo F, Tomas-Barberan FA, Garcia-Viguera C. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *J Sci Food Agr*. 2002; 82(11): 1293–7.
217. Martinez-Sanchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F. A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(7): 2330–40.
218. Calabrone L, Larocca M, Marzocco S, Martelli G, Rossano R. Total phenols and flavonoids content, antioxidant capacity and lipase inhibition of root and leaf horseradish (*Armoracia rusticana*) extracts. *Food Nutr Sci*. 2015; 6(6): 64–74.
219. Tomsone L, Kruma Z. Comparison of different solvents for isolation of phenolic compounds from horseradish (*Armoracia Rusticana* L.) leaves. *Res Rural Dev*. 2013; 1:104–10.
220. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Methods in enzymology, oxidant and antioxidants (Part A). In: Packer L, editor. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 152–78.
221. Fursa NS, Litvinenko VI, Krivenchuk PE. Flavonoids of *Armoracia rusticana* and *Barbarea arcuata*. *Chem Nat Compd*. 1969; 5: 270–1.
222. Cirimbei MR, Dinucă R, Vizireanu C. Study on herbal action of horseradish (*Armoracia rusticana*). *J Agroalimnt Proc Technol*. 2003; 19: 111–5.
223. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(5): 727–47.
224. Nićiforović N, Abramović H. Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014; 13(1): 34–51.
225. Četojević-Simin D. Bioaktivnost prirodnih proizvoda – antitumorsko delovanje in vivo. Novi Sad: Naučni institut za prehrambene tehnologije; 2015.
226. Zhao B, Hu M. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncol Lett*. 2013; 6(6): 1749–55.

227. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 35(3): 473–85.
228. Yeh RD, Chen JC, Lai TY, Yang J S, Yu CS, Chiang JH, et al. Gallic acid induces G(0)/G(1) phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res*. 2011; 31(2): 2821–32.
229. Locatelli C, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Creczynski-Pasa T B. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: the relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chem Biol Interact*. 2009; 181(2): 175–84.
230. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. - Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(3): 560–8.
231. Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of sprcific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999; 10(1): 71–5.
232. Gupta K, Panda D. Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry*. 2002; 41(43): 13029–38.
233. Nguyen TT, Tran E, Ong CK. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. *J Cell Physiol*. 2003; 197(1): 110–21.
234. Wang C, Kurzer MS. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer*. 1997; 28(3): 236–47.
235. Teng BS, Lu YH, Wang ZT, Tao XY, Wei DZ. In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. *Pharmacol Res*. 2006; 54(3): 186–94.
236. Hasegawa T, Nishino H, Iwashima A. Isothiocyanates inhibit cell cycle progression of HeLa cells at G2/M phase. *Anticancer Drugs*. 1993; 4(2): 273–9.
237. Konić-Ristić A, Stanojković T, Srdić-Radić T, Dilber S, Đorđević B, Stanković I. In vitro assessment of antiproliferative action selectivity of dietary isothiocyanates for tumor versus normal human cells. *Vojnosanit Pregl*. 2016; 73(7): 636–42.
238. Zhao B, Hu M. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncol Lett*. 2013; 6(6): 1749–55.
239. Yu R, Mandlekar S, Harvey KJ, Ucker DS, Kong AN. Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Res*. 1998; 58(3): 402–8.
240. Tseng E, Scott-Ramsay EA, Morris ME. Dietary organic isothiocyanates are cytotoxic in human breast cancer MCF-7 and mammary epithelial MCF-12A cell lines. *Exp Biol Med*. 2004; 229(8): 835–42.

241. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol.* 2001; 19(4): 837–44.
242. Hung H. Inhibition of estrogen receptor alpha expression and function in MCF-7 cells kaempferol. *J Cell Physiol.* 2004; 198(2): 197–208.
243. Wang C, Kurzer MS. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer.* 1997; 28(3): 236–47.
244. Miyoshi N, Uchida K, Osawa T, Nakamura Y. Selective cytotoxicity of benzyl isothiocyanate in the proliferating fibroblastoid cells. *Int J Cancer.* 2007; 120(3): 484–92.
245. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF-kappa B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(7): 6017–26.
246. Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli, Scambia G, et al. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer.* 1992; 50(3): 486–92.
247. Li C, Yang X, Chen C, Cai S, Hu J. Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway. *Mol Med Rep.* 2014; 9(3): 935–40.
248. Musk SRR, Johnson IT. Allyl isothiocyanate is selectively toxic to transformed cells of the human colorectal tumor line HT29. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 2079–83.
249. Smith TK, Lund EK, Parker ML, Clarke RG, Johnson IT. Allyl-isothiocyanates causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells. *Carcinogenesis.* 2004; 25(8): 1409–15.
250. Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60(5): 1426–33.
251. Kuang YF, Chen ZH. Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(10): 1711–8.
252. Tsai SH, Huang WW, Huang WC, Lu CC, Chang JH, Peng SF, et al. ERK-modulated intrinsic signaling and G2/M phase arrest contribute to the induction of apoptotic death by allyl isothiocyanate in MDA-MB-468 human breast adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.* 2012; 41(6): 2065–72.
253. Salem SD, Abou-Tarboush FM, Saeed NM, Al-Qadasi VVD, Farah MA, Al-Buhairi Mm, et al. Involvement of p53 in gemcitabine mediated cytotoxicity and radiosensitivity in breast cancer cell lines. *Gene.* 2012; 498(2): 300–7.
254. Nair HK, Rao KV, Aalinkeel R. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11(1): 63–9.

255. Xu C, Shen G, Yuan X, Kim J, Gopalkrishnan A, Keum JS, et al. ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*. 2006; 27(3): 437–45.
256. Srivastava SK, Xiao D, Lew KL, Hershberger P, Kokkinakis DM, Johnson CS, et al. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits growth of PC-3 human prostate cancer xenografts in vivo. *Carcinogenesis*. 2003; 24(10): 1665–70.
257. Ye L, Zhang Y. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 2001; 22(12): 1987–92.
258. Jeong WS, Keum YS, Chen C, Jain MR, Shen G, Kim JH, et al. Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *J Biochem Mol Biol*. 2005; 38(2): 167–76.
259. Yannai S, Day AJ, Williamson G, Rhodes MJ. Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers of quinone reductase in murine hepatoma cell lines. *Food Chem. Toxicol*. 1998; 36(8): 623–30.
260. Rose P, Whiteman M, Huang SH, Halliwell B, Ong CN. β -Phenylethyl isothiocyanate-mediated apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(7): 1489–503.
261. Uhl M, Laky B, Lhoste E, Kassie F, Kundi M, Knasmüller S. Effects of mustard sprouts and allylisothiocyanate on benzo(a)pyrene – induced DNA damage in human-derived cells: a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2003; 23(1): 273–82.
262. Teng BS, Lu YH, Wang ZT, Tao XY, Wei DZ. In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. *Pharmacol Res*. 2006; 54(3): 186–94.
263. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS – mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(7): 579–94.
264. Pahl HL, Baeuerle PA. Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays*. 1994; 16(7): 497–502.
265. Gao J, Liu X, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(47): 17207–12.
266. Sun Y, Rigas B. The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents. *Cancer Res*. 2008; 68(20): 8269–77.
267. Segura JA, Barbero LG, Marquez J. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduced responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol Lett*. 2000; 74(2): 111–5.

268. Prasad SB, Giri A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. *Indian J Exp Biol.* 1994; 32(3): 155–62.
269. Bhattacharya S, Prasanna A, Majumdar P, Kumar RBS, Haldar PK. Antitumor efficacy and amelioration of oxidative stress by *Trichosanthes dioica* root against Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Pharm Biology.* 2011; 49(9): 927–35.
270. Hossain E, Chakrobort S, Milan A, Chattopadhyya P, Mandal SC, Gupta JK. In vitro and in vivo antitumor activity of a methanol extract of *Dregea volubilis* leaves with its antioxidant effect. *Pharm Biol.* 2012; 50(3): 338–43.
271. Vulić J, Čebović T, Čanadanović V, Četković G, Đilas SM, Čanadanović-Brunet J, et al. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food Funct.* 2013; 4(5): 713–21.
272. Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Kumar TS. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemose* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25(8): 1070–6.
273. Kaya E, Keskin L, Aydogdu I, Kuku I, Bayraktar N, Erkut M A. Oxidant/antioxidant parameters and their relationship with chemotherapy in Hodgkin's lymphoma. *J Int Med Res.* 2005; 33(6): 687–92.
274. Čebović T, Arsenijević J, Drobac M, Živković J, Šošarić 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.
275. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 1997; 12(2): 525–35.
276. Casado A, de la Torre R, López-Fernández ME, Carrascosa D, Casado MC, Ramírez MV. Superoxide dismutase and catalase blood levels in patients with malignant diseases. *Cancer Lett.* 1995; 93(2): 187–92.
277. Rushmore TH, Picket CB. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem.* 1993; 268(16): 11475–8.
278. Rengarajan T, Nandakumar N, Balasubramanian MP. D-Pinitrol prevents rat breast carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene through inhibition of Bcl-2 induction of p53, caspase-3 proteins and modulation of hepatic biotransformation enzymes and antioxidants. *Biomed Prev Nutr.* 2013; 3: 31–41.
279. Čanadanović-Brunet J, Vulić J, Čebović T, Četković G, Čanadanović V, Đilas S, et al. Phenolic profile, antiradical and antitumor evaluation of raspberries pomace extract from Serbia. *Iran J Pharm Res.* 2016; 16(Suppl): S142–52.
280. Rajeshwar Y, Gupta M, Mazumder UK. Antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Int J Pharm Ther.* 2005; 4(1): 46–53.

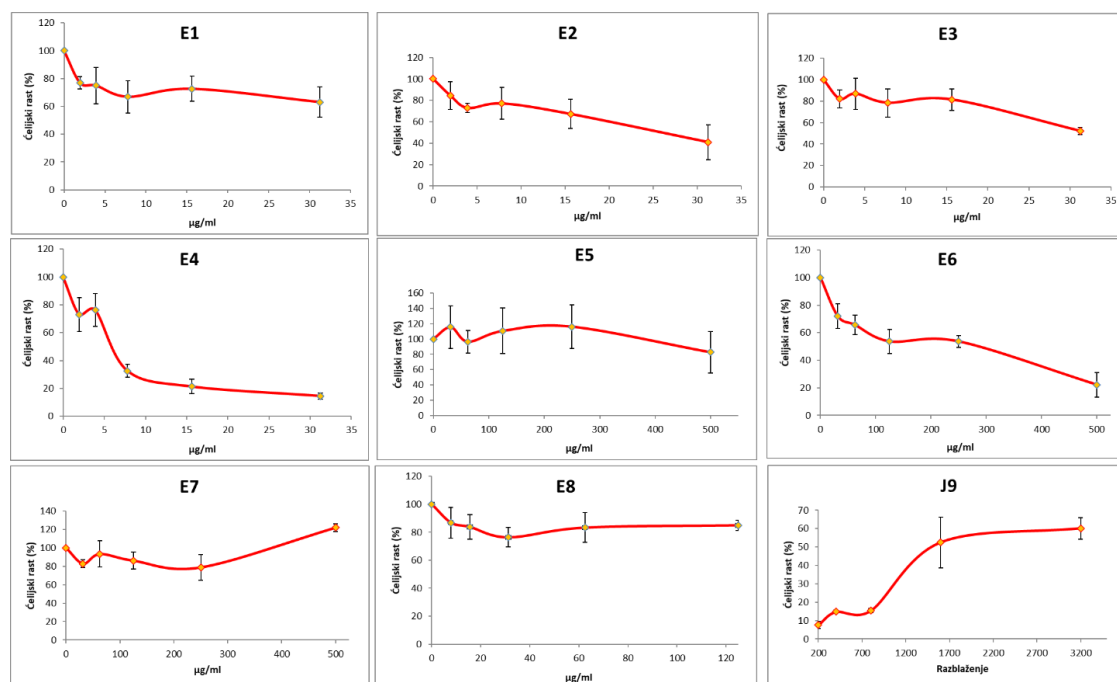
281. Ceylin A, Aksoy A, Ertekin T, Yay AH, Nisari M, Karatoprak GS, et al. The effects of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on experimentally induced Ehrlich ascites tumor in mice. *J Cancer Res Ther.* 2018; 14(2): 314–20.
282. Neilson F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress, reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem.* 1997; 43(7): 1209–14.
283. Manesh C, Kuttan G. Anti-tumour and anti-oxidant activity of naturally occurring isothiocyanates. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003; 22(2): 193–9.
284. Wu L, Ashraf MHN, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, et al. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(18): 7094–9.
285. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 711–60.
286. Ortega A, Carretero J, Obrador E, Estrela JM. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels. *Nitric Oxide.* 2008; 19(2): 107–14.
287. Sharma R, Singhal SS, Srivastava SK, Bajpai KK, Frenkel EP, Awasthi S. Glutathione and glutathione linked enzymes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 1993; 75(2): 111–9.
288. Vladić J, Čebović J, Vidović S, Jokić S. Evaluation of anticancer activity of *Satureja montana* supercritical and spray-dried extracts on Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. *Plants.* 2020; 9(11): 1532.
289. Besednova NN, Zaporozheta TS, Kuznetsova TA, Kryzhanovskii SP, Kovalev NN, Zviagintseva TN. Hepatoprotective effects of extracts and polysaccharides from seaweed. *Antibiot Khimioter.* 2014; 59 (3–4): 30–7.
290. Siviková K, Piesová E, Dianovský J. The protection of Vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-induced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 2001; 494(1–2): 135–42.
291. Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol.* 1998; 153(2): 515–25.
292. Wernke MJ, Schell JD. Solvents and malignancy. *Clin Occup Environ Med.* 2004; 4(3): 513–27.
293. Ahn H, Park JS, Chae S, Moon JW, Hyun JW, Shin T. Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine in CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Acta Histochem.* 2014; 116(6): 1104–12.
294. Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(11): 3417–21.

295. Mihailović V, Mihailović M, Uskoković A, Arambašić J, Mišić D, Stanković V, et al. Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2013; 52: 83–90.
296. McCay PB, Lai EK, Payer JL, DuBose CM, Janzen EG. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 1984; 259(4): 2135–43.
297. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 119(2): 275–9.
298. elSisi AE, Earnest DL, Sipies IG. Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 119(2): 295–301.
299. Jiang W, Gao M, Sun S, Bi A, Xin Y, Han X, et al. Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 422(2): 344–50.
300. Kang S, Yang W, Oh H, Bae Y, Ahn M, Kang RK, et al. Protective effect of ethyl acetate extract of *Ishige okamurae* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Korean J Vet Res.* 2011; 51(4): 259–65.
301. Ćebović T, Vladić J, Gavarić G, Zeković Z, Vidović S. Assessment of antioxidant and hepatoprotective potential of *Satureja montana* extracts against CCl₄ induced liver damage. *Lekovite sirovine.* 2019; 39: 5–10.
302. Sahreen S, Khan MR, Khan RA. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl₄-induced damage in rat. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11: 48–56.
303. Brai BI, Adisa RA, Odetola AA. Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of *Persea Americana*, Mill (Lauraceae) "avocado" against CCl₄-induced damage in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014; 11(2): 237–44.
304. Li C, Yi LT, Geng D, Han YY, Weng LJ. Hepatoprotective effect of ethanol extract from *Berchemia lineate* against CCl₄-induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharm Biol.* 2015; 53(5): 767–72.
305. Al-Sayed E, El-Lakkany NM, Seif El-Din SH, Sabra AN, Hammam OA. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Melaleuca styphelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Pharm Biol.* 2014; 52(12): 1581–90.
306. Cui Y, Yang X, Lu X, Chen J, Zhao Y. Protective effects of polyphenols-enriched extract from Huangshan Maofeng green tea against CCl₄-induced liver injury in mice. *Chem Biol Interact.* 2014; 220: 75–83.
307. Chan KWK, Wing Ho WS. Anti-oxidative and hepatoprotective effect of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2015; 34(2): 673–80.

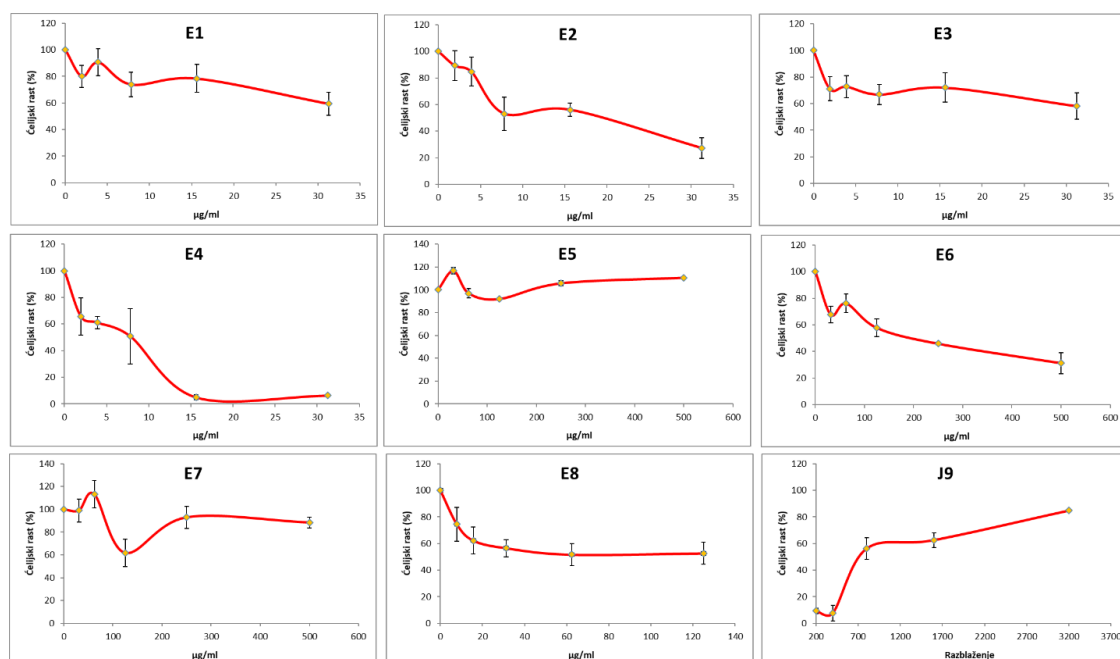
308. Raish M, Ahmad A, Alkharfy KM, Ahamad SR, Mohsin K, Al-Jnoobi F, et al. Hepatoprotective activity of *Lepidium sativum* seeds against D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatotoxicity in animal model. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 16(1): 501.
309. Al-Kubaisy K, Al-essa LY, Shawagfeh MT, AL- Groom R, Al-Jamaïen H. Hepatoprotective activity of teucrium Polium against CCL4 induced hepatotoxicity in male albino rats. *Int J Indig Med Plants*. 2013; 46(2): 1206–10.
310. Singh N, Kamath V, Narasimhamurthy K, Rajini PS. Protective effect of potato pell extract against carbon tetrachloride – induced liver injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008; 26(2): 241–6.
311. Ballatori N, Kance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation an the etiology and progression of human disease. *Biol Chem*. 2009; 390(3): 191–214.
312. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver disease and hepatotoxicity. *Mol Aspect Med*. 2009; 30(1–2): 29–41.
313. Birk J, Meyer M, Aller I, Hansen HG, Odermatt A, Dick TP, et al. Endoplasmatic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 7): 1604–17.
314. Molavian H, Tonekaboni AM, Kohandel M, Sivaloganathan S. The synergetic coupling among the cellular antioxidants glutathione peroxidase/peroxiredoxin and other antioxidants and its effect on the concentration of H2O2. *Sci Rep*. 2015; 5: 13620.
315. Vujić JJ, Čebović TT, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Čanadanović VM, Đilas SM. In vivo and in vitro antioxidant effects of beetroot pomace extracts. *J Funct Foods*. 2014; 6: 168–75.
316. Kaurinović B, Popović M, Vlasisavljević S. In vitro and in vivo effects of *Lauris nobilis* L. leaf extracts. *Molecules*. 2010; 15(5): 3378–90.
317. Ahn M, Kim J, Bang H, Moon J, Kim GO, Shin T. Hepatoprotective effects of allyl isothiocyanate against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Chem Biol Interact*. 2016; 254: 102–8.
318. Go J, Kim JE, Koh EK, Song SH, Sung JE, Lee HA, et al. Protective effects of gallotannin-enriched extract isolated from *Galla Rhois* against CCl4-induced hepatotoxicity in ICR mice. *Nutrients*. 2018; 8(3): 107.
319. Beak SH, Park M, Suh JH, Choi HS. Protective effects of an extract of young radish (*Raphanus sativus* L.) cultivated with sulfur (sulfur-radish extract) and of sulforaphane on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(5): 1176–82.

9. Prilozi

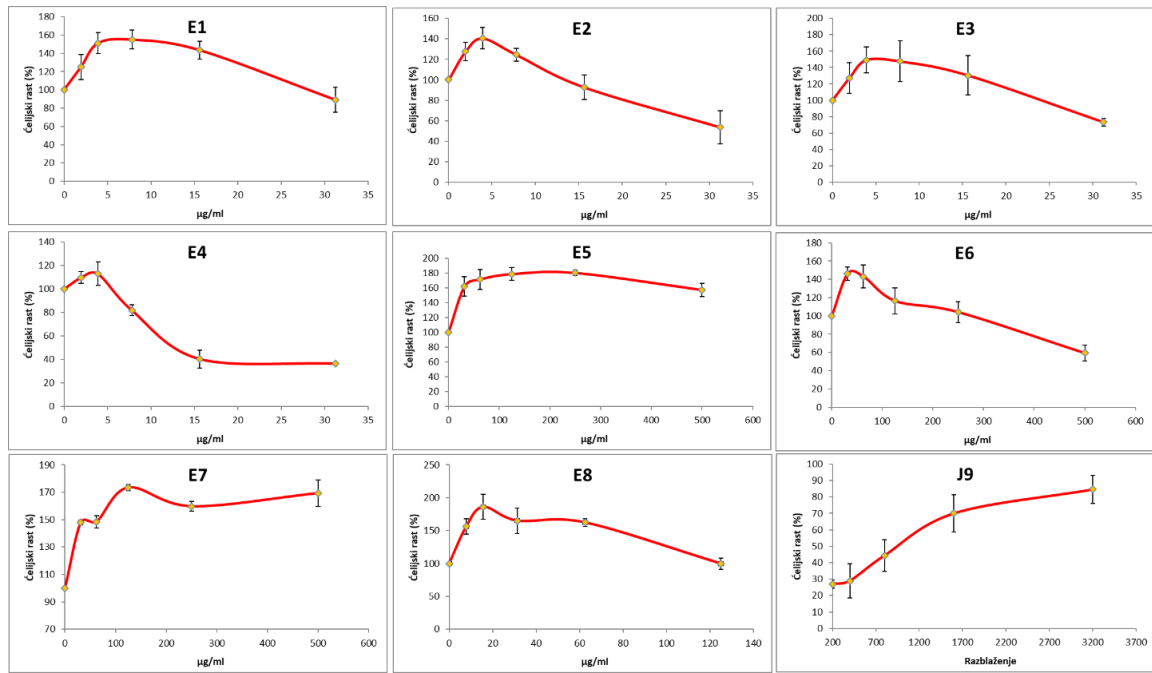
Prilog 1. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ispitivanih ćelijskih linija



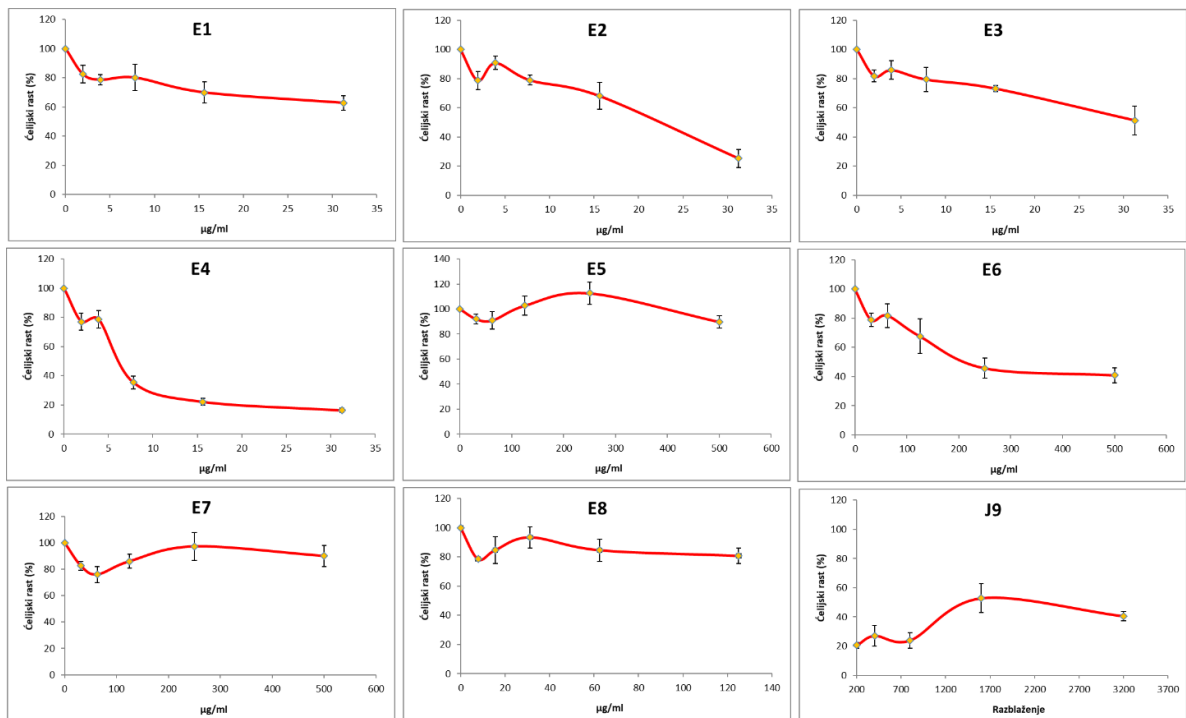
Grafikon 9.1. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije karcinoma grlića materice (HeLa)



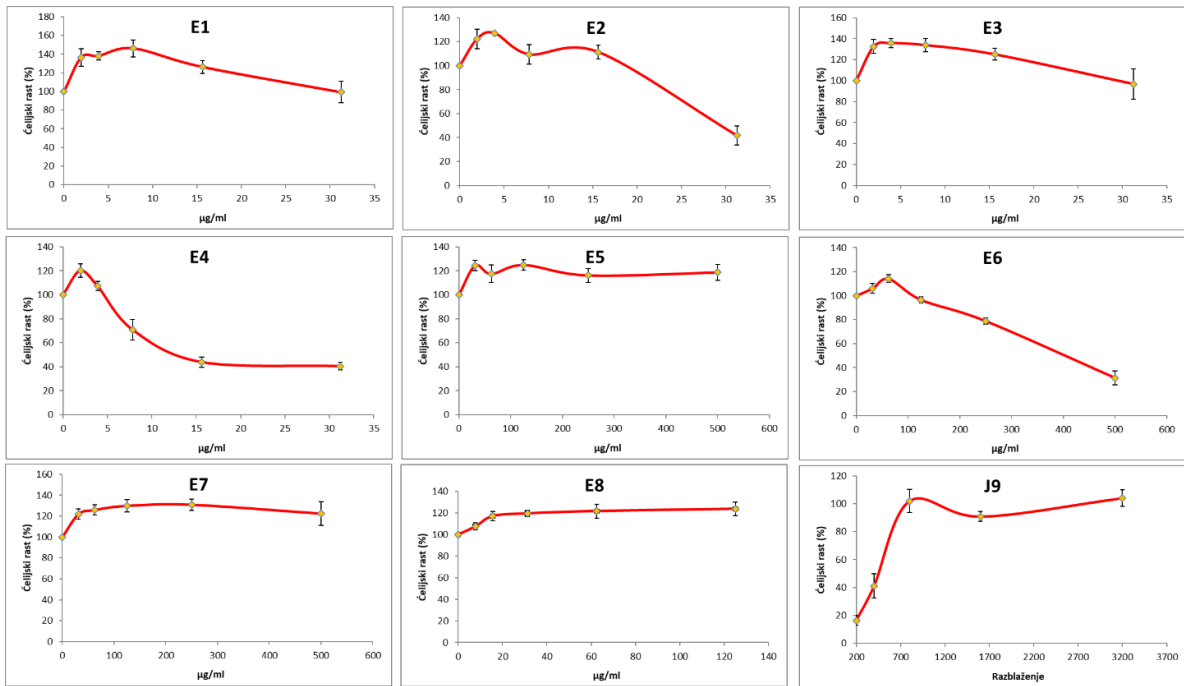
Grafikon 9.2. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije adenokarcinoma dojke (MCF7)



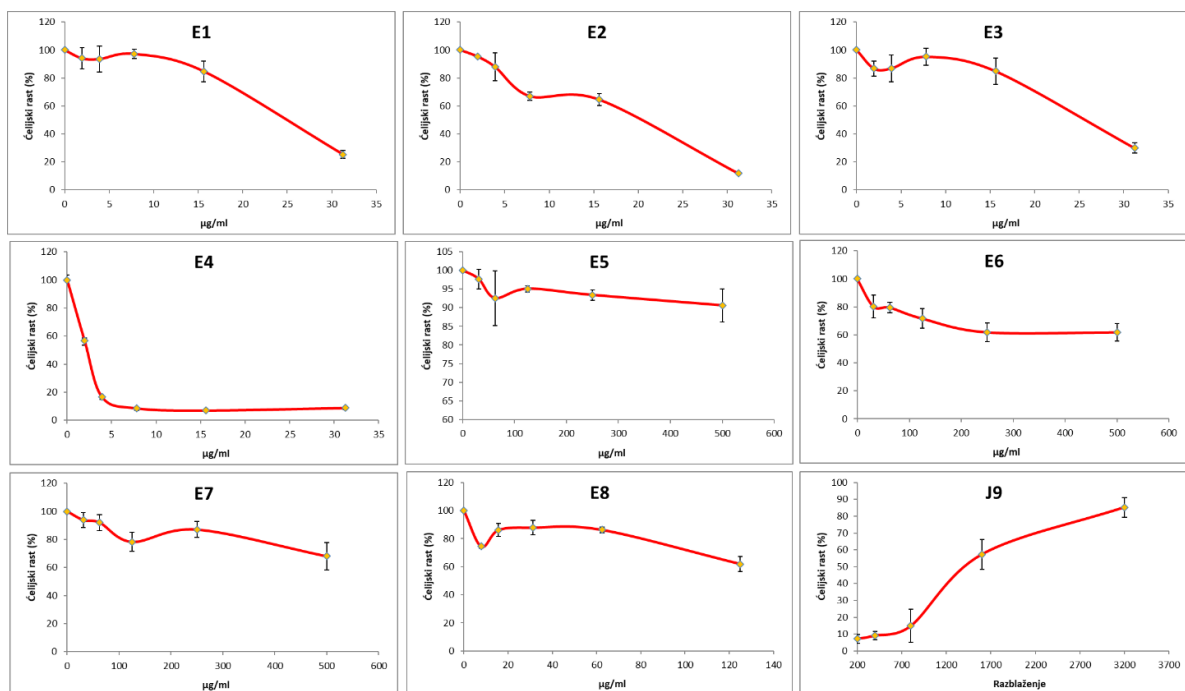
Grafikon 9.3. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije adenokarcinoma debelog creva (HT-29)



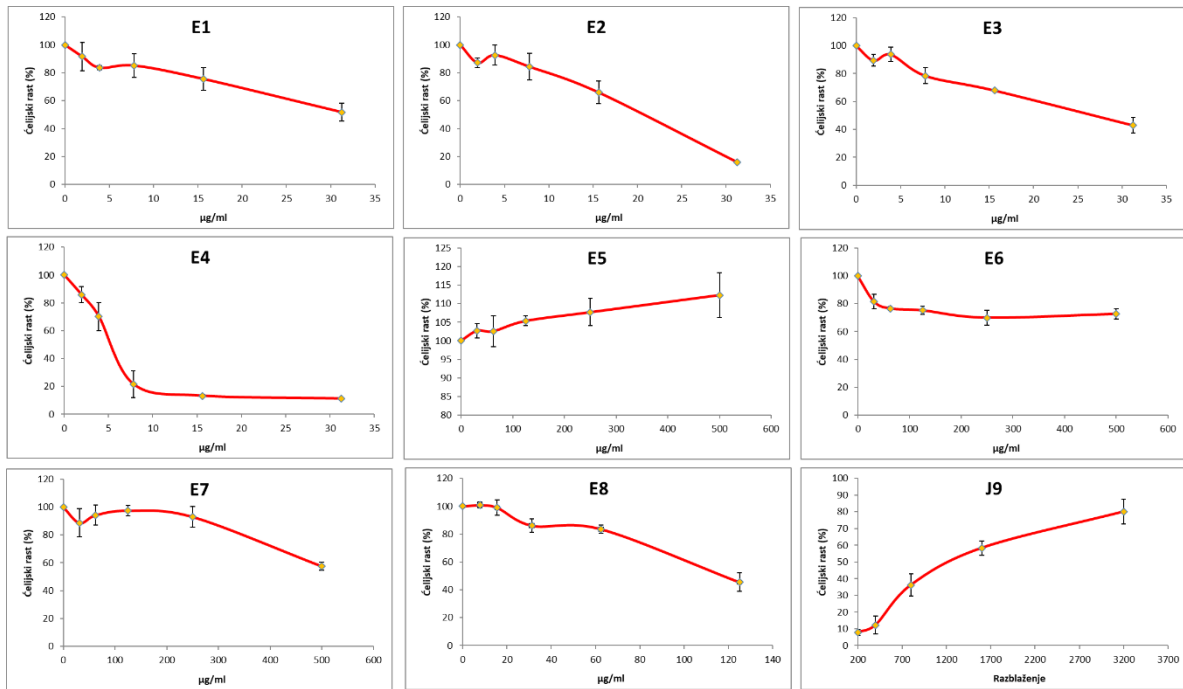
Grafikon 9.4. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast normalne (zdrave) fetalne ćelijske linije pluća (MRC-5)



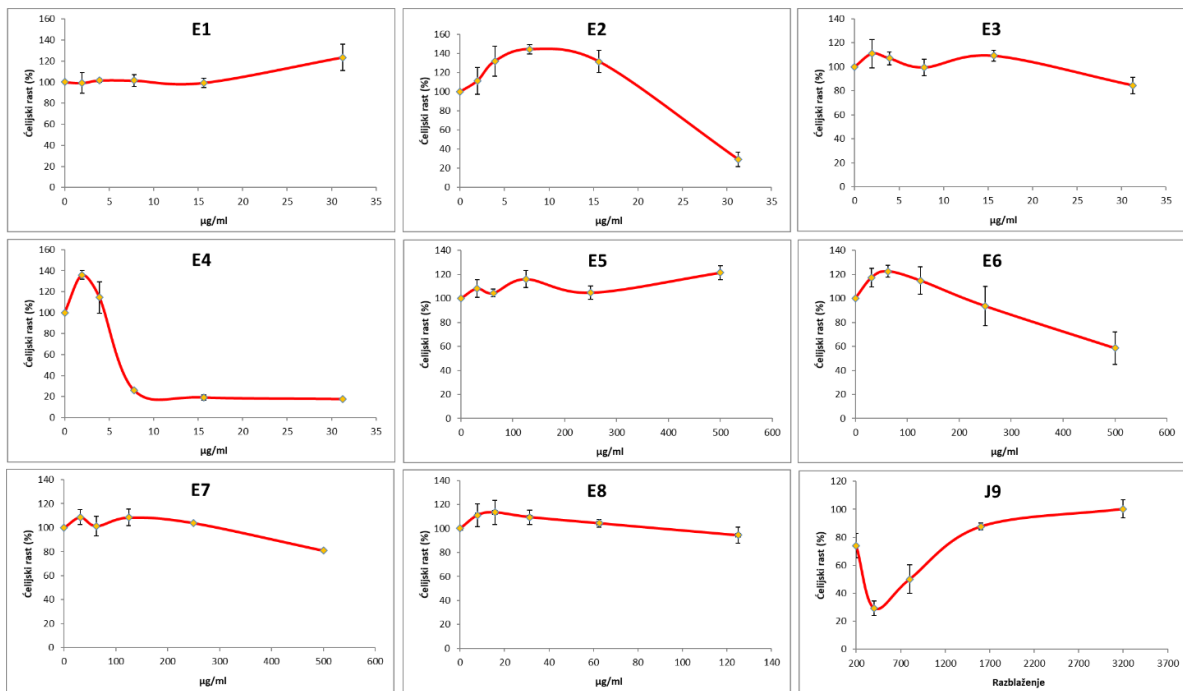
Grafikon 9.5. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije adenokarcinoma pluća (A549)



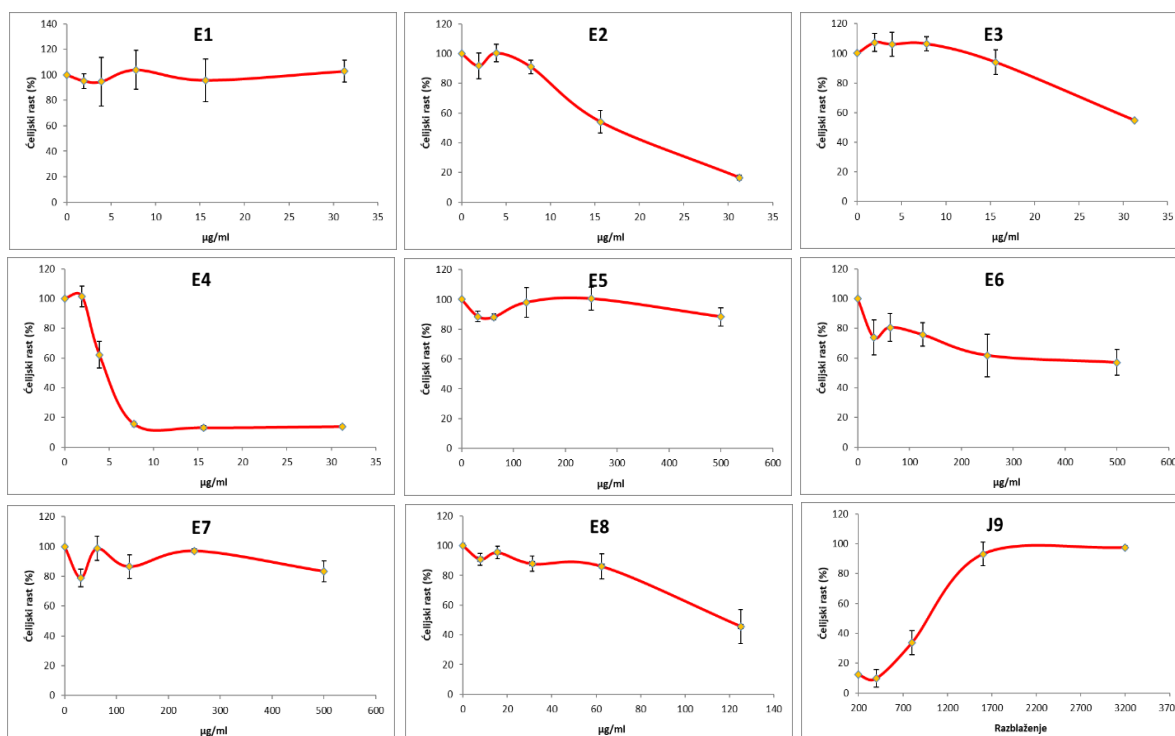
Grafikon 9.6. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije karcinoma jetre pacova (H-4-II-E)



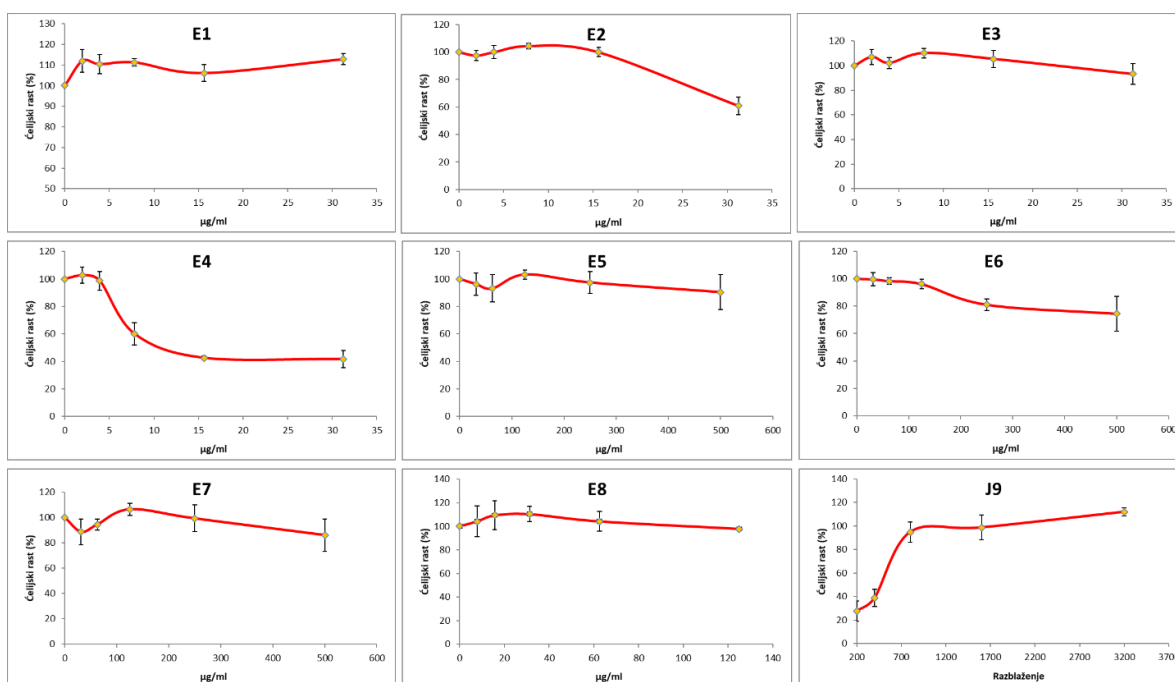
Grafikon 9.7. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231)



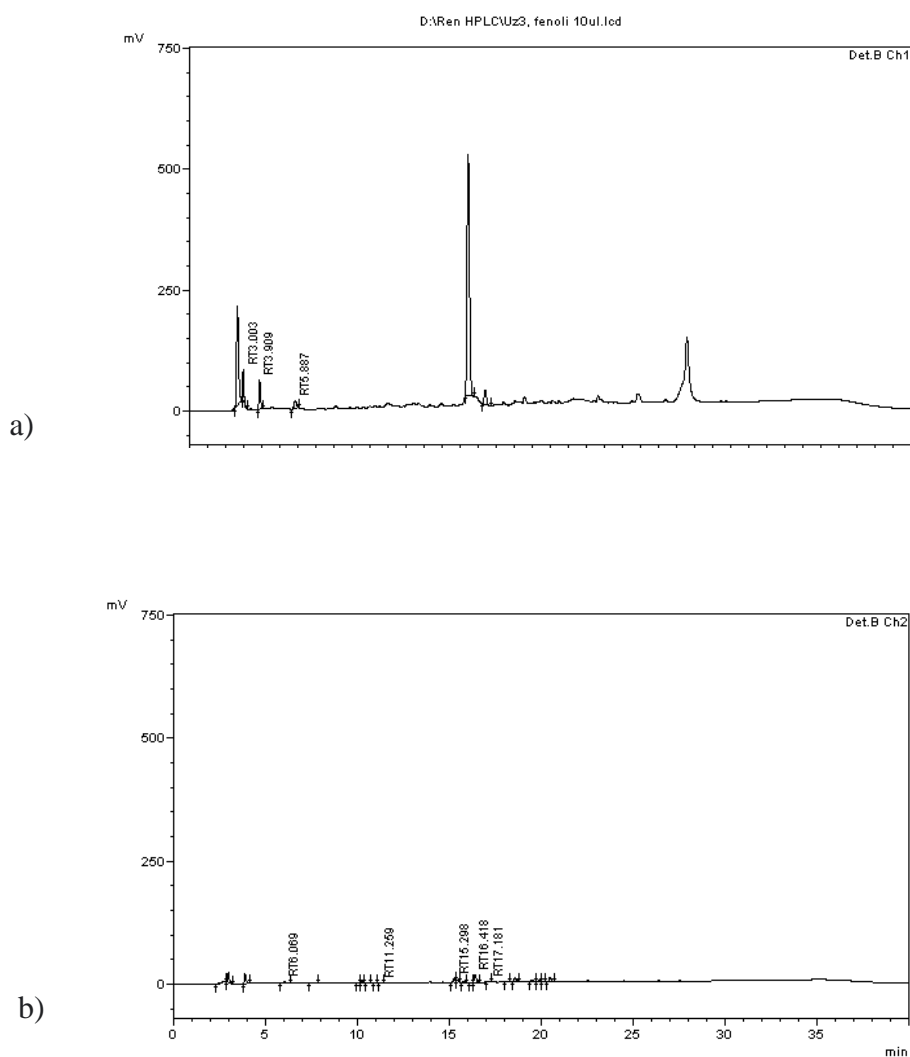
Grafikon 9.8. Uticaj ekstrakata E1–E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije karcinoma kože (Hs 294T)



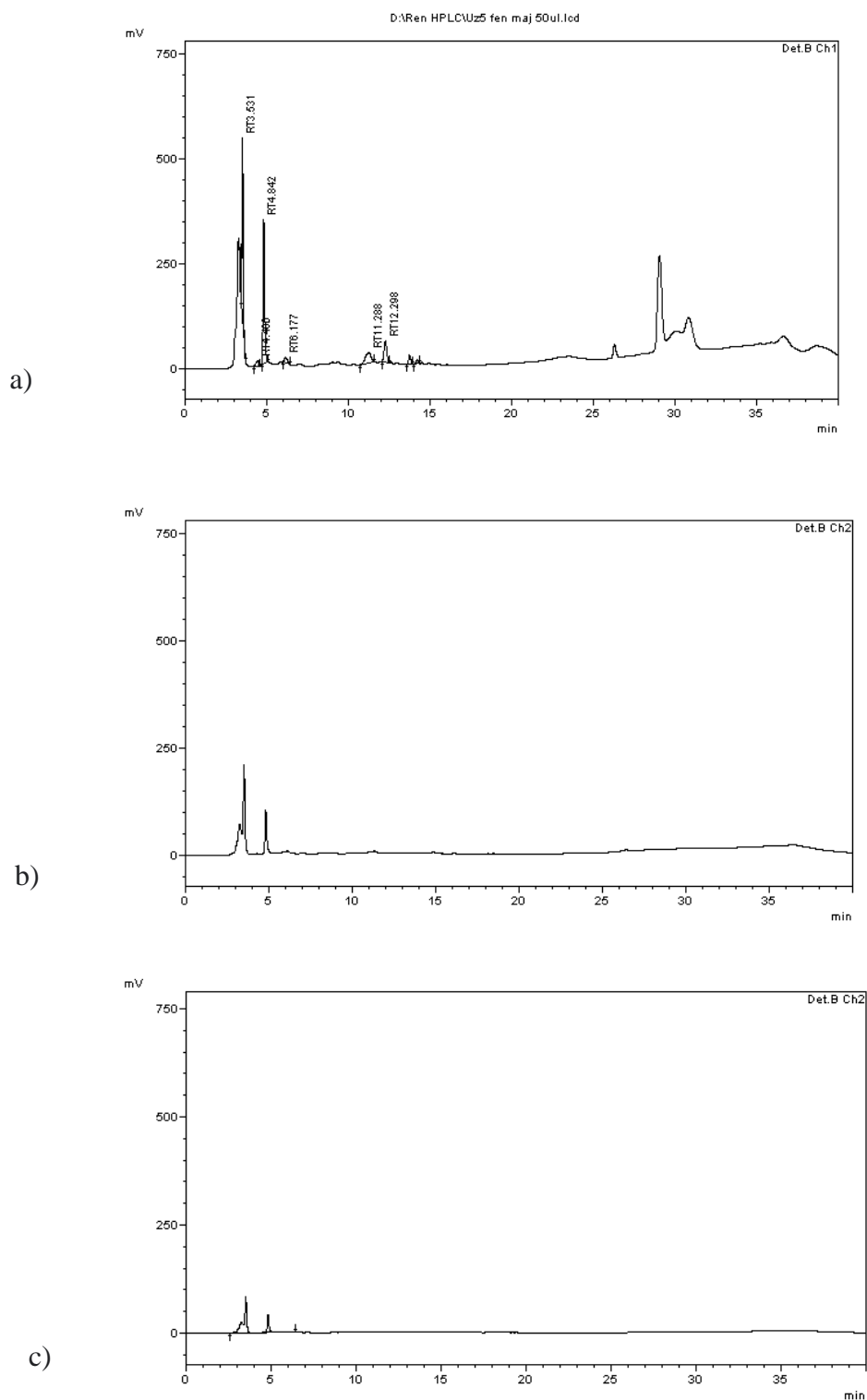
Grafikon 9.9. Uticaj ekstrakata E1-E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije karcinoma jetre (Hep G2)



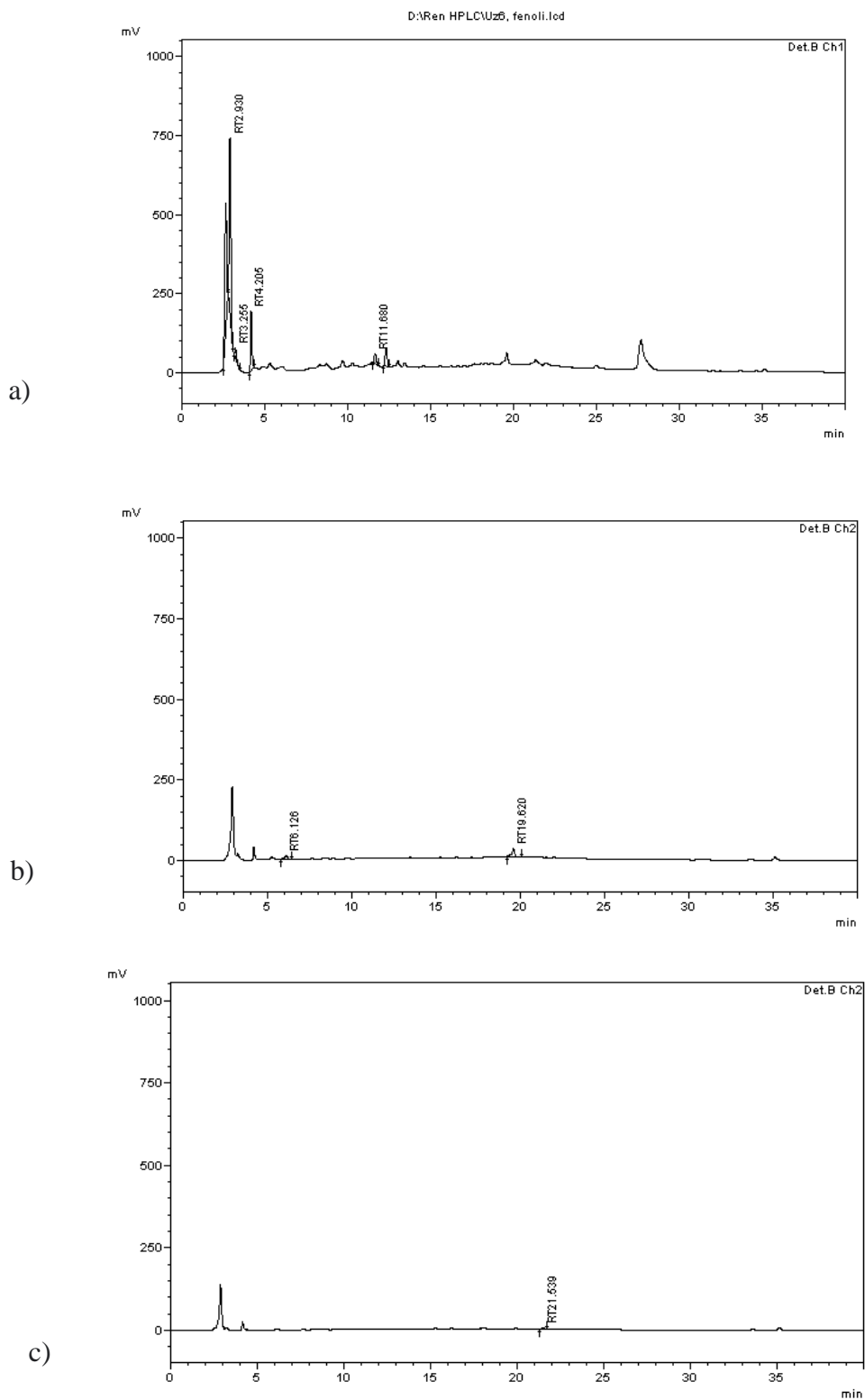
Grafikon 9.10. Uticaj ekstrakata E1-E8 i soka korena rena J9 na rast ćelijske linije adenokarcinoma prostate (PC-3)

Prilog 2. HPLC hromatogrami za ekstrakte i sok korena rena

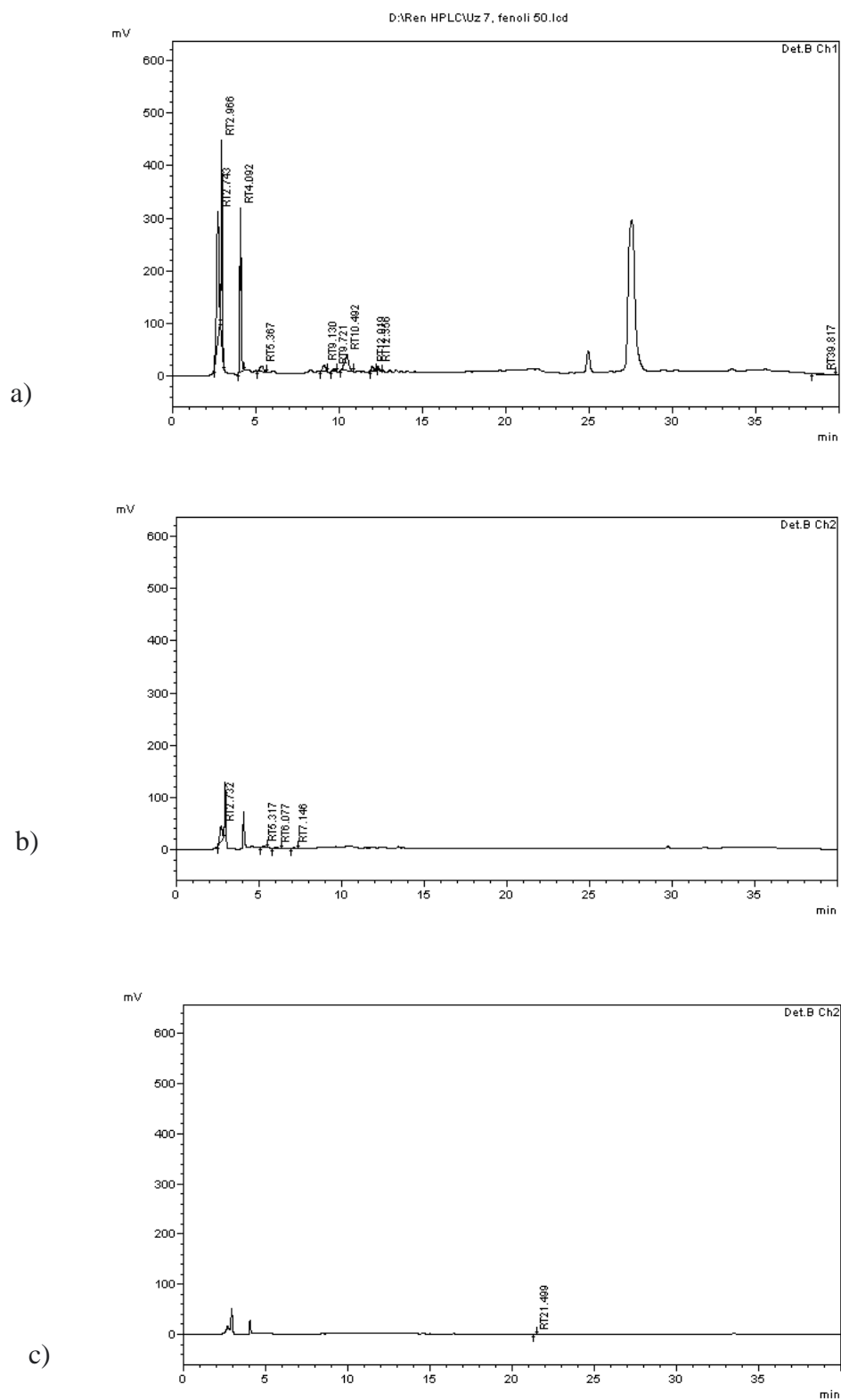
Grafik 10.1. Hromatogrami ekstrakta E3 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm



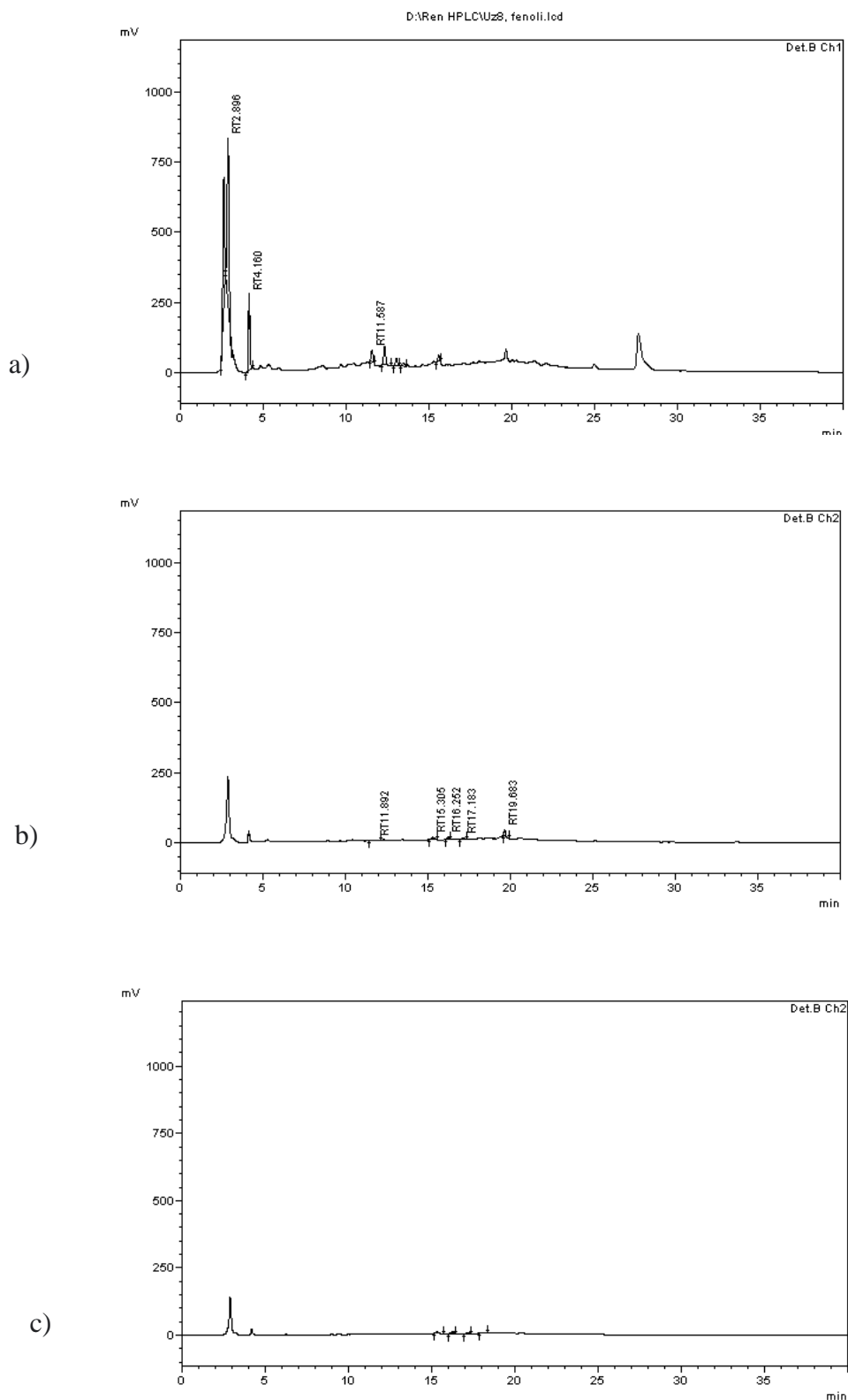
Grafik 10.2. Hromatogrami ekstrakta E5 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm



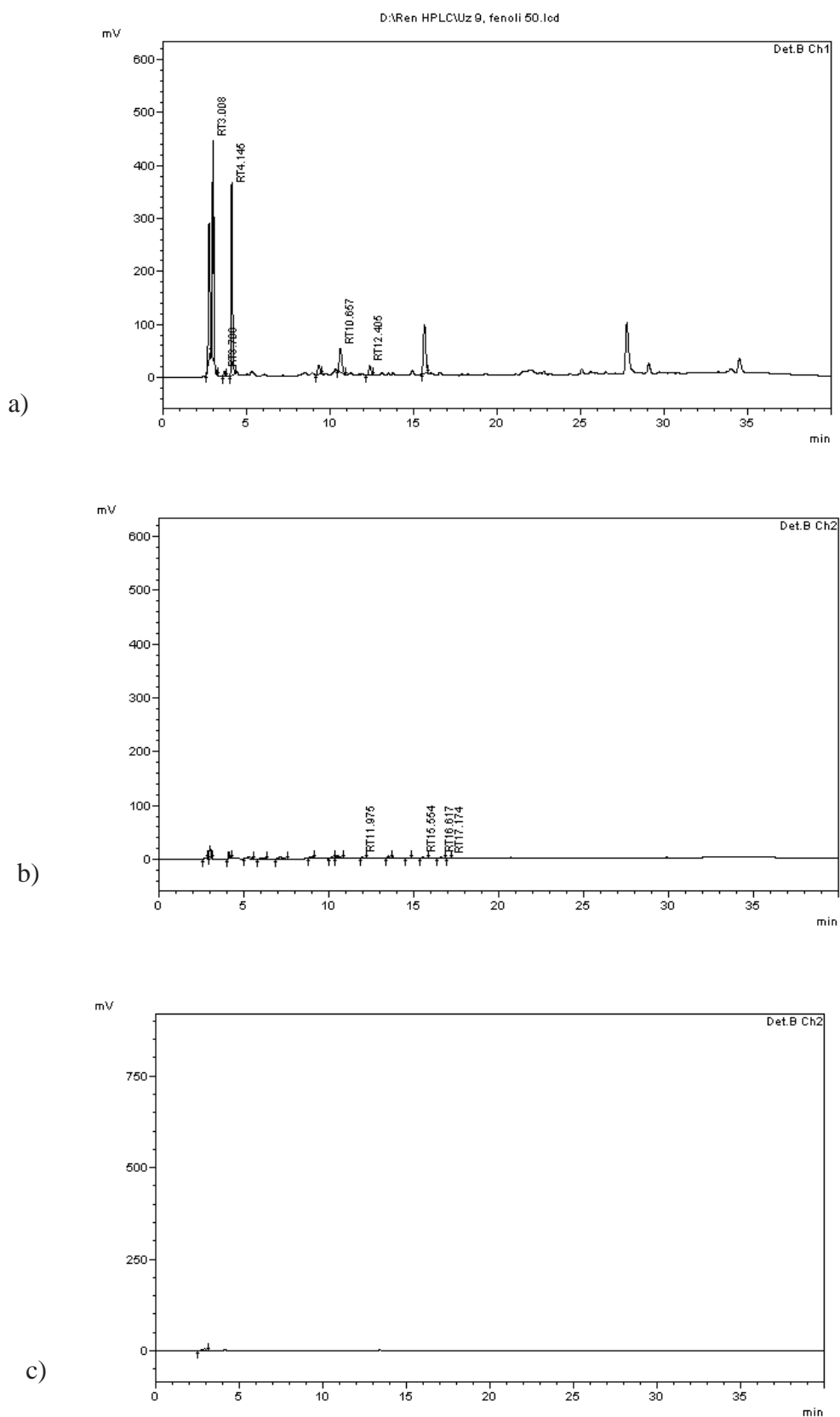
Grafik 10.3. Hromatogrami ekstrakta E6 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm



Grafik 10.4. Hromatogrami ekstrakta E7 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm



Grafik 10.5. Hromatogrami ekstrakta E8 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm



Grafik 10.6. Hromatogrami soka korena rena J9 određeni upotrebom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC) na a) 280 nm b) 320 nm c) 360 nm

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Одређивање антитуморске и хепатопротективне активности рена <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Институт за онкологију Војводине, Пут др Голдмана 4, Сремска Каменица, Србија б) Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Хајдук Вељкова 3, Нови Сад, Србија
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије-смер клиничка медицина
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Спроведено истраживање је обухватило претклиничко испитивање ефеката осам екстраката и сока корена рена: <i>in vitro</i> - антипролиферативно деловања према већем броју ћелијских линија и механизам антитуморског деловања; <i>in vivo</i> у експериментима на животињама - цитотоксични, антиоксидантни/прооксидантни и хепатопротективни/хепатотоксични ефекти.</p>
<p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p>
<p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p>

д) узорци ткива: навести врсту _____

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту – научни радови

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати – лабораторијски експерименти

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx

б) SPSS фајл, датотека .sav

с) PDF фајл, датотека .pdf

д) Текст фајл, датотека .docx

е) JPG фајл, датотека .jpg

ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: **40**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): **велики број**

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је неколико минута или неколико дана

б) варијабле које се више пута мере односе се на: биолошке активности (антипролиферативна активност, механизам ћелијске смрти) екстраката и сока корена рена код *in vitro* испитивања и биолошке активности (антитуморска активност, антиоксидантни статус, хепатопротективна активност и антиоксидантна активност) екстраката и сока корена рена код *in vivo* испитивања

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване арапским бројем и речима

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

a) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

a) експеримент, навести тип – лабораторијск експеримент

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип прикупљање података из литературе – преглед научне литературе која је доступна у овом моментз

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Течни хроматограф (HPLC) са SPD детектором, филтер фотометар, спектрофотометар

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

a) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

a) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан помоћу статистичке обраде података

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Статистичком контролом добијеног резултата

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој осеци на универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијуму докторских дисертација у Новом Саду (CRIS).

3.1.2. URL адреса адреса: <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertation.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Протокол огледа одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду, одобрење број 01-90/4, 06.04.2015., односно Управа за ветерину, Министарство пољопривреде и заштите животне средине, број решења: 323-07-09304/2015-05.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално- делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Видосава Петровић, vidapetrovicns@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Видосава Петровић, vidapetrovicns@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Видосава Петровић, vidapetrovicns@gmail.com