

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

IVICA P. JEREMIĆ

CITOTOKSIČNO DEJSTVO
EKSTRAKATA BILJKE *SIDERITIS*
***SCARDICA* NA TUMORSKE ĆELIJE U**
***IN VITRO* USLOVIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

IVICA P. JEREMIĆ

**CYTOTOXIC EFFECT OF *SIDERITIS*
SCARDICA EXTRACTS AGAINST TUMOR
CELLS IN VITRO**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013

- 1. Mentor: dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**
- 2. Komentor: dr Vanja Tadić, naučni savetnik, Institut za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić”**

Komisija u sastavu:

**dr Vladimir Trajković – vanredni profesor, Institut za mikrobiologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

**dr Ivanka Marković – vanredni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

dr Ljubisav Rakić – redovni profesor u penziji, SANU

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratorij Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Aleksandre Isaković. Disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.

Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Aleksandre Isaković, dok je izolacija i hemijska karakterizacija ekstrakata *Sideritis Scardica* obavljena u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić,, pod rukovodstvom naučnog savetnika dr Vanje Tadić.

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Aleksandri Isaković na ukazanom poverenju, bezrezervnoj ličnoj i profesionalnoj podršci i velikoj pomoći tokom svih faza izrade teze. Uvek optimističan stav, koristan savet i velika podrška učinili su rad na tezi znatno lakšim i doprineli su da naš odnos preraste u iskreno prijateljstvo.

Naučnom savetniku dr Vanji Tadić na velikoj pomoći, ukazanom poverenju i spremnosti da uvek konstruktivno učestvuje u rešavanju naučnih dilema. Posebnu zahvalnost dugujem na veoma korisnim sugestijama koje se odnose na hemijske karakteristike ispitivanih ekstrakata.

Prof. dr Ivanki Marković na podršci tokom eksperimentalnog rada, kao i nizu korisnih sugestija tokom završne faze pisanja ove teze. Takođe prof. Marković dugujem zahvalnost na buđenju interesovanja za nauku i formiranju „biohemijskog načina razmišljanja,, koje datira još iz mojih studentskih dana.

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću na korisnim savetima tokom obrade eksperimentalnih rezultata, kao i pomoći tokom završne faze pisanja ove teze i prilikom oblikovanja publikacija proisteklih iz teze.

Akademiku Ljubisavu Rakiću na ukazanom poverenju, korisnim sugestijama i stalnoj inspiraciji za naučni rad.

Dr Anđelki Isaković za pomoć prilikom eksperimentalnog rada sa imunoblot tehnikom.

Mojim dragim kolegama sa Instituta za biohemiju: Željki, Anđelki, Sonji, Nadi, Nikoli, Sanji...na prijateljskoj podršci, nesebičnoj pomoći i uvek korisnim savetima.

Topla atmosfera i vedar duh učinili su da se svi osećamo kao jedna velika porodica.

Citotoksično delovanje ekstrakata biljke *S. scardica* na tumorske ćelije u *in vitro* uslovima

Rezime

Sideritis scardica Griseb, Lamiaceae (Šarplaninski čaj) je endemska biljka Balkanskog poluostrva, koja se tradicionalno koristi za lečenje astme, bronhitisa, gastričnih i reumatskih tegoba. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita citotoksični efekat različito frakcionisanih ekstrakata na tumorske ćelijske linije: humane promijelocitne leukemije HL-60, mišjeg melanoma B16 i pacovskog glioma C6 u *in vitro* uslovima. Rezultati su pokazali značajan citotoksični efekat ekstrakta *S. scardica* na sve testirane tumorske linije. Pokazano je da se među identifikovanim, aktivnim jedinjenjima, flavonoidima apigeninu i luteolinu može pripisati odgovornost za citotoksičnost ekstrakata. Posebno je značajno da ovi ekstrakti nisu bili toksični za primarne pacovske astrocite i mononuklearne ćelije periferne krvi čoveka. Mehanizam citotoksičnosti koju su dietil-etarski i etil-acetatni ekstrakt *S. scardica* ispoljili prema tumorskim ćelijskim linijama je kompleksan i uključuje indukciju apoptoze, autofagije i zastoja u ćelijskom ciklusu. Dietil-etarski i etil-acetatni ekstrakt, kao i citotoksične fenolne komponente apigenin i luteolin indukuju AMPK/Akt/mTOR nezavisnu autofagiju u tretiranim C6 ćelijama glioma. Kombinovana primena karmustina i ekstrakata, dovodi do smanjenja citotoksičnosti karmustina prema C6 ćelijama. Sa druge strane, C6 ćelije tretirane netoksičnim dozama dietil-etarskog i etil-acetatnog ekstrakta, postaju znatno osetljivije na delovanje UV zračenja. Za razliku od njih, primarni astrociti, tretirani istim dozama ekstrakata postaju rezistentniji na UV zračenje.

Imajući u vidu bogatstvo flavonoidima i mnogostruke mehanizme antitumorskog delovanja *S. scardica* bi mogla da se ubroji u tzv. funkcionalnu hranu sa hemopreventivnim svojstvima.

Ključne reči: ekstrakti, *S. scardica*, apoptoza, autofagija

Cytotoxic effect of *Sideritis scardica* extracts against tumor cells in vitro

Abstract

Sideritis scardica (Mountain tea) is endemic plant of Balcan Peninsula traditionally used to cure asthma, bronchitis, rheumatic disorders and gastric complaints. The aim of this study was to investigate cytotoxic effect of different *S. scardica* extracts on tumor cell lines: human promyelocytic leukemia HL-60, mouse melanoma B16 and rat glioma C6. The results showed significant cytotoxic effect of diethyl ether and ethyl acetate extracts on all tested tumor lines. As main active principles, flavonoids apigenin and luteolin were identified. Additionally, extracts were not toxic for either rat astrocytes in primary cultures, and human peripheral blood mononuclear cells. The mechanism of cytotoxicity is rather complex and includes apoptosis and autophagy induction, as well cell cycle arrest. Diethyl ether and ethyl acetate extracts, as well cytotoxic compound apigenin and luteolin induced AMPK/Akt/mTOR independent autophagy in treated glioma cells. The combinatorial use of carmustine and extracts, lead to a decreased toxicity of carmustine against C6 cells. C6 cells treated with non-toxic doses of extracts were more susceptible to UV light induced cytotoxicity. Contrary, rat astrocytes in primary cultures, treated with the same concentrations of extracts, were more resistant to UV irradiation.

Considering rich flavonoid content, as well as multiple mechanisms underlying their antitumor actions, *S. scardica* could be regarded as functional food with chemopreventive properties.

Key words: extracts, *S. scardica*, apoptosis, autophagy

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Sideritis</i> vrste: geografska rasprostranjenost i taksonomske karakteristike.....	1
1.1.1. Upotreba <i>Sideritis</i> vrsta u tradicionalnoj medicini.....	2
1.1.2. Aktivni principi <i>Sideritis</i> vrsta	3
1.1.2.1. Flavonoidi.....	3
1.1.2.2. Terpeni.....	4
1.1.2.3. Eterična ulja.....	5
1.1.3. Farmakološka aktivnost.....	6
1.1.3.1. Antioksidansno delovanje.....	7
1.1.3.2. Antiinflamatorno delovanje.....	8
1.1.3.3. Gastroprotektivno delovanje.....	9
1.1.3.4. Antimikrobna aktivnost.....	10
1.1.3.5. Druga dejstva <i>Sideritis</i> vrsta.....	11
1.1.4. <i>Sideritis scardica</i>	12
1.2. Apoptoza kao mehanizam delovanja antitumorskih lekova.....	14
1.2.1. Spoljašnji put aktivacije kaspaza.....	15
1.2.2. Unutrašnji (mitohondrijalni) put aktivacije kaspaza.....	15
1.2.3. Zajednički put aktivacije kaspaza.....	16
1.2.4. Apoptoza i kancerogeneza.....	17
1.2.5. Poremećaj balansa proapoptotskih i antiapoptotskih proteina.....	17
1.2.6. Poremećaj funkcije kaspaza.....	19
1.2.7. Poremećaj signalizacije nishodno od receptora smrti.....	20
1.3. Autofagija kao mehanizam delovanja antitumorskih lekova.....	20
1.3.1. Mehanizam autofagije.....	21
1.3.2. Autofagija i kancerogeneza.....	23
1.3.3. Autofagija kao mehanizam koji favorizuje preživljavanje kancerskih ćelija.....	24
1.3.4. Autofagija kao antitumorski mehanizam.....	24
1.3.5. Indukcija autofagije kao mehanizam delovanja antikancerskih lekova.....	25
1.3.6. Polifenoli i indukcija autofagije.....	26
1.4. Koncept hemoprevencije tumora.....	27
1.4.1. Flavonoidi kao hemopreventivni agensi	29
2. CILJEVI.....	32
3. METODOLOGIJA.....	33
3.1. Ekstrakcija biljnog materijala.....	33
3.1.1. Određivanje ukupnog fenolskog sadržaja.....	33
3.1.2. Ukupan sadržaj flavonoida.....	34
3.1.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata.....	34
3.1.4. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i ukupna antioksidativna sposobnost ekstrakata.....	35
3.1.5. Analiza ekstrakta korišćenjem tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC procedura, engl. High pressure liquid chromatography).....	36
3.2. Ćelijske linije.....	38
3.3. Ispitivanje citotoksičnog efekta-određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze i kisele fosfataze.....	40
3.4. Ozračivanje ćelija ultraljubičastim (UV) zracima.....	42

3.5. Kombinovana citotoksičnost.....	42
3.6. Protočna citometrija.....	43
3.6.1. Osnovni principi protočne citometrije.....	43
3.6.1.1. Određivane tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom.....	45
3.6.1.2. Merenje aktivacije kaspaza.....	46
3.6.1.3. Detektovanje kiselih citoplazmatskih vezikula.....	46
3.6.1.4. Merenje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala.....	47
3.6.1.5. Analiza ćelijskog ciklusa.....	47
3.7. Određivanje ekspresije proteina uključenih u proces autofagije.....	48
3.8. Statistička obrada.....	49
4. REZULTATI.....	51
4.1. Uticaj <i>S. scardica</i> ekstrakata na vijabilitet primarnih astrocita, MNPK i tumorskih ćelijskih linija.....	51
4.1.1. Ispitivanje vijabiliteta ćelija primenom LDH testa.....	60
4.2. Uticaj <i>S. scardica</i> ekstrakata i njihovih odabranih fenolskih komponenti na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala.....	61
4.3. Uticaj <i>S. scardica</i> ekstrakata na progresiju ćelijskog ciklusa.....	64
4.4. Ispitivanje tipa ćelijske smrti.....	67
4.5. Uticaj <i>S. scardica</i> ekstrakata i njihovih fenolskih komponenti na aktivaciju kaspaza u C6 ćelijama glioma pacova.....	71
4.6. Ispitivanje procesa autofagije u C6 ćelijama tretiranim <i>S. scardica</i> ekstraktima i njihovim fenolskim komponentama.....	72
4.6.1. Uticaj <i>S. scardica</i> ekstrakata na povećanje sadržaja kiselih citoplazmatskih vezikula.....	72
4.6.2. Uticaj apigenina i luteolina na porast kiselih citoplazmatskih vezikula u C6 ćelijama glioma pacova.....	75
4.6.3. Uticaj <i>S. scardica</i> ekstrakata na ekspresiju proteina i signalnih molekula uključenih u proces autofagije.....	75
4.6.4. Uticaj apigenina i luteolina na ekspresiju proteina i signalnih molekula uključenih u proces autofagije.....	78
4.7. Uticaj udruženog delovanja ekstrakata i UV zračenja na vijabilitet C6 ćelija glioma pacova i normalnih astrocita.....	79
4.8. Uticaj udruženog delovanja apigenina i luteolina sa UV zračenjem na vijabilitet C6 ćelija glioma pacova i normalnih astrocita.....	80
4.9. Uticaj ekstrakata <i>S. scardica</i> -e na citotoksični efekat karmustina prema C6 ćelijama pacovskog glioma.....	81
4.10. Uticaj apigenina i luteolina na citotoksični efekat karmustina prema C6 ćelijama pacovskog glioma.....	83
5. DISKUSIJA.....	84
6. ZAKLJUČAK.....	97
7. LITERATURA.....	98

1. UVOD

1.1. *Sideritis* vrste: geografska rasprostranjenost i taksonomske karakteristike

Rod *Sideritis* fam. Lamiaceae obuhvata više od 150 jednogodišnjih i višegodišnjih biljaka, koje su široko rasprostranjene na Mediteranu, Madeiri i Kanarskim ostrvima.

Naziv roda potiče od grčke reči *sideros* (gvožđe), a odnosi se na drevnu upotrebu biljke za pospešivanje zaceljivanja rana nastalih oružjem napravljenim od gvožđa (González-Burgos i sar., 2011).

Rod *Sideritis* ima vrlo složenu taksonomsku klasifikaciju zbog visoke stope hibridizacije između vrsta. Rod *Sideritis* je podeljen u dva podroda: *Sideritis* (evropske vrste) i *Marrubiastrum* (makaronezijske vrste). Podrod *Marrubiastrum* obuhvata 24 višegodišnje vrste rasprostranjene na 10 ostrva: Madeiri i Kanarskom arhipelagu.

Podrod *Sideritis*, obuhvata oko 125 jednogodišnjih i višegodišnjih vrsta, koje su podeljene u 4 sekcije: *Hesiodia*, *Burgsdorffia*, *Sideritis* i *Empedoclea*. (Bojović i sar., 2011).

U Srbiji postoji samo jedna vrsta roda *Sideritis-S.montana* (Diklić 1974), ali zbog njenih prooksidanskih osobina se ne koristi u tradicionalnoj medicini (Koleva i sar., 2003).

Sideritis scardica Griseb. (šarplaninski čaj) je endemska biljka Balkanskog poluostrva iz *Empedoclea* sekcije, rasprostranjena u regionu Šar planine, u Grčkoj, Bugarskoj, Turskoj, Albaniji i Makedoniji.

1.1.1. Upotreba *Sideritis* vrsta u tradicionalnoj medicini

Terapijska upotreba *Sideritis* vrsta se po prvi put spominje u Dioskoridovoj knjizi ``De materia medica``, koja je napisana još u prvom veku nove ere.

Upotreba dekokta ili infuza napravljenih od nadzemnih delova *Sideritis* vrsta široko je rasprostranjena u narodnoj medicini međutim, u poslednje vreme, sve češće se na tržištu pojavljuju preparati koji sadrže *Sideritis* vrste. U tradicionalnoj medicini se najviše koriste zbog svog antiinflamatornog, antimikrobnog, spazmolitičkog i antireumatskog delovanja.

U Turskoj, gde su *Sideritis* vrste poznate pod imenom „dag cayi, yayla cayi,„ i u Grčkoj, nadzemni delovi biljke se vrlo široko koriste za pripremu biljnih lekova i čajeva. Čaj, koji se obično servira sa medom i limunom, dobro je poznat po svojoj specifičnoj aromi, vrlo prijatnom ukusu i karakterističnoj žutoj boji, a uglavnom se koristi protiv gastrointestinalnih bolesti, kao što su bol u stomaku, loše varenje, nadutost, zatim za olakšavanje simptoma prehlade, uključujući temperaturu, kijavicu, bol u grlu, kao roborantno i diuretičko sredstvo (Bojović i sar., 2011). Na planini Taurus u Turskoj, smeša napravljena od *S. psidica*, ječmenog brašna, luka i katrana od bora, koristi se kao obloga za olakšavanje stomaćnog bola (Yesilada i sar., 1995). Infuz napravljen od listova i cvetova vrste *S. leptoclada* se zbog svoj ekspektoransnih osobina koristi za lečenje prehlade u zapadnoj Anatoliji (Turska) (Kargioglu i sar., 2008). Endemska *S. trojana* je jedna od najčešće korišćenih biljnih sirovina u oblasti svetih planina-Mount Ida (planina bogova), za lečenje gušobolje, čira i „grudnih bolesti,„ (Celik i sar., 2008)

U španskoj narodnoj medicini *Sideritis* vrste su poznate kao „rabo de gato,„ ili „zaharena,„ i koristi se najviše zbog svojih gastroprotektivnih svojstava, a ulaze u sastav mnogih preparata zbog antiinflamatornog i antireumatskog delovanja (González-Burgos i sar., 2011), dok se vodeni ekstrakt biljke koristi kao dezinficijens i sredstvo za zaceljivanje rana i opekotina. Na Maderi i Porto Santo ostrvima infuz napravljen od *S. candicans* koristi se za lečenje bronhitisa i crevnih bolesti (Rivera i sar., 1995). U regiji Nijar-Cabo de Gata, u

jugoistočnoj Španiji *S. granatensis* se koristi protiv bola u leđima, infekcija oka i kao stimulator apetita, dok se u kombinaciji sa tamjanom, koristi kod oštećenja jetre (Bojović i sar., 2011). Vrsta *S. foetens*, sama, ili u kombinaciji sa *S. angustifolia* se tradicionalno koristi za olakšavanje menstrualnih tegoba, dok se *S. tragoriganum* koristi kao sredstvo za lečenje rana, problema sa varenjem i infekcija urinarnog trakta (González-Burgos i sar., 2011). U regionu Kalabrije u Italiji lišće *S. syriaca* se koristi za zaustavljanje krvarenja kod posekotina (Leporatti i sar., 2007). U Bugarskoj, infuz napravljen od *S. scardica* koristi se kao ekspektorans kod plućnog emfizema i za lečenje angine pectoris (Ivancheva i sar., 2000). Pored toga, u Bugarskoj, čaj nazivaju "Bugarskom viagrom", aludirajući na afrodizijačka svojstva čaja.

1.1.2. Aktivni principi *Sideritis* vrsta

U *Sideritis* vrstama identifikovan je veliki broj različitih hemijskih jedinjenja, kao što su: terpeni, flavonoidi, etarska ulja, iridoidi, kumarini, lignani i steroli. Diterpeni, flavonoidi i etarska ulja nalaze se skoro u svim vrstama roda *Sideritis* i glavni su nosioci farmakološkog delovanja.

1.1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi (*lat. flavus-žut*) su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti biljaka, koji imaju brojne funkcije. Oni su veoma važni biljni pigmenti, od kojih potiče boja cvetova, a služe da privuku insekte oprašivače. Takođe, služe da štite biljke od fotosintetičkog stresa indukovano ultraljubičastom svetlošću, kao hemijski glasnici i fiziološki regulatori.

Flavonoidi imaju opštu C6-C3-C6 strukturu, u kojoj su dva C6 prstena fenolske prirode (A i B). Dalje se mogu podeliti u antocijanine, flavan-3-ole, flavone, flavanone i flavonole (Tsao, 2010).

Rod *Sideritis* je dosta bogat flavonoidima. Ustanovljena je korelacija između tipa flavonoida i njegove geografske rasporostranjenosti: 5, 6, 7-trioksi flavoni (cirsimartinin, salvigenin, nepetin) dominiraju u Makaronezijskim vrstama, dok su 5, 6, 7, 8-tetraoksi flavoni (sideritoflavon, ksantomikrol, gardenin) znatno više zastupljeni u Mediteranskim vrstama (Gil i sar., 1993). Rasprostranjenost flavonskih glikozida je od interesa i sa taksonomskog stanovišta. Tako na primer, 8-hidroksi flavonski glikozidi su naročito karakteristični za neke sekcije *Sideritis*-a, kao što su Marrubiastrum sekcija, za razliku od sekcija Empedocleopsis i Creticae (Bojović i sar., 2011). Među Iberijsko-severno-Afričkim vrstama, vrste sekcije *Sideritis* takođe se karakterišu akumulacijom 7-glikozida i 8-hidorksi flavona (izoskutelaerin, hipolaetin i njihovi metil estri). Makedonske i bugarske *Sideritis* vrste (*S. scardica* i *S. raeseri*) sadrže hidroksicimetne kiseline, feniletanoidne glikozide, i acetilisane i neacetilisane 7-O-glikozide flavonoida. Izolovano je dva tipa flavona: 8-hidroksi (hipolaetin, izoskutelarein i njihovi metoksi derivati) i 5, 7-dihidroksi (apigenin i luteolin). Svi nađeni flavonoidni glikozidi bili su 7-O-alozil-(1, 2)-glikozidni derivati 5,8-dihidroksi flavona, sa različitim supstituentima u B prstenu (Kostadinova i sar., 2007). *S. scardica* i *S. raeseri* razlikuju se međusobno po sastavu derivata hidroksicimetne kiseline i 7-O-glikozida flavonoida. Feruloilkina kiselina detektovana je samo u metanolskom ekstraktu *S. raeseri*, dok 7-O-glikozidi flavonoida nisu bili detektovani. U većini vrsta koje su rasprostranjene na Balkanskom poluostrvu, preko 90% ukupnog fenolskog sadržaja čine fenil-etanoidni glikozidi i flavonoidni acetyl-glikozidi, dok su značajno manje zastupljeni hidroskicimetne kiselina i 7-O-glikozidi flavonoida (Petreska i sar., 2011).

1.1.2.2. Terpeni

Terpeni su vrlo raznolika grupa hemijskih jedinjenja, koje produkuju mnoge biljke, a naročito četinari. Derivati su izoprena (C₅H₈), a mogu biti linearni ili

razgranati, sa različitim brojem izoprenskih jedinica i imaju opštu formulu $(C_5H_8)_n$. Hemijskim modifikacijama terpena, npr. oksidacijom ili rearanžiranjem ugljeničnog skeleta nastaju terpenoidi, poznati i pod nazivom izoprenoidi. Terpeni se dele u odnosu na broj izoprenskih jedinica, koje imaju u svom sastavu. Hemiterpeni imaju jednu izoprensku jedinicu. Sam izopren je jedini hemiterpen, ali su poznati brojni derivati-hemiterpenoidi, kao što su prenil i izovalerijanska kiselina. Monoterpeni u svom sastavu imaju 2 izoprenske jedinice (npr. geraniol, limonen) dok seskviterpeni imaju 3 izoprenske jedinice (farnezol). Diterpeni u svom sastavu imaju 4 izoprenske jedinice, derivati su geranil-geranil pirofosfata i imaju brojna farmakološka dejstva.

U *Sideritis* vrstama najzastupljeniji su različiti diterpeni; izolovano je najmanje 160 različitih diterpena (Piozzi i sar., 2006). Diterpeni su po prvi put izolovani iz vrste *S. italica*, dok je prisustvo diterpenoida kasnije potvrđeno u mnogim vrstama, naročito u onima koje rastu na Iberijskom poluostrvu i Kanarskim ostrvima (Gonzalez-Burgos i sar., 2011.). Detaljnijom analizom diterpenoidnog sastava različitih *Sideritis* vrsta otkriveno je da su kurenski diterpeni isključivo prisutni u vrstama rasprostranjenim u istočnoj i centralnoj mediteranskoj zoni (Turska, Grčka i Italija), dok vrste koje rastu na zapadnom Mediteranu i u regionu Makaronezije sadrže diterpene sa različitim ugljovodoničnim skeletom (ent-kaureni, labdan, atisen, pimarane, bejeran, trahiloban, rozan) (Bojović i sar., 2011). U *Sideritis* vrstama najčešće se nalaze sledeći kaurenski diterpenski derivati: foliol, sidol, linearol, sideridiol i izolinearol. Prisustvo različitih vrsta diterpenoida koristi se kao hemotaksonomski marker (Gomez-Serranillos i sar., 1998).

1.1.2.2. Etarska ulja

Iako je familija *Lamiaceae* poznata po prisustvu etarskih ulja, u *Sideritis* vrstama se ne nalaze u velikim količinama. Analizom etarskih ulja moguće je

zapaziti veliki polimorfizam među populacijama *Sideritis*-a, a zaključeno je da postoje nove vrste, hemijski varijeteti i hibridi. Baser (2002) i Kirimer i saradnici (2004) klasifikovali su *Sideritis* vrste koje rastu u Turskoj u 6 klasa u odnosu na hemijski sastav etarskih ulja: grupa čije je etarsko ulje bogato monoterpenskim ugljovodonicima, grupa sa etarskim uljem u kojem dominiraju oksidovani monoterpeni, grupa sa etarskim uljem bogatim seskviterpenima, zatim grupa u čijem etarskom ulju su uglavnom prisutni oksidovani seskviterpeni, grupa sa etarskim uljima bogatim diterpenima i grupa koja obuhvata biljne vrste sa etarskim uljima drugačijeg hemijskog sastava u odnosu na pomenute. Kirimer i saradnici (2004) su dodatno zapazili korelaciju između prinosa ulja i prisustva glavnih konstituenata; što je veći sadržaj etarskog ulja, veći je sadržaj ugljovodoničnih monoterpena, a ukoliko je prinos ulja manji, veći je sadržaj seskviterpena. Za diterpene nije uočeno slično pravilo. Iz Španskih i Grčkih vrsta izolovani su uglavnom monoterpeni i to najčešće: α i β pinen, sabinen, mircen i limonen.

1.1.3. Farmakološka aktivnost

Zahvaljujući veoma složenom hemijskom sastavu, *Sideritis* vrste ispoljavaju vrlo širok spektar farmakološkog delovanja. U literaturi je opisano antioksidantno, antiinflamatorno, antimikrobno, gastroprotektivno, imunomodulatorno i hipoglikemijsko delovanje. Pored toga, pokazano je da neke vrste mogu da deluju kao selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina, da inhibiraju holinesterazu, reduktazu aldoza i da imaju dejstvo slično selektivnim modulatorima estrogenskih receptora.

1.1.3.1. Antioksidantno delovanje

Proces nastanka slobodnih radikala, neodvojiv je od procesa oksidativne fosforilacije, odnosno proizvodnje energije. Oko 5% utrošenog kiseonika, konvertuje se u slobodne radikale. U svim eukariotama postoje mehanizmi za odbranu od slobodnih radikala, čime se sprečava nastanak oksidativnog stresa. Međutim, u raznim patološkim stanjima, dolazi do poremećaja ravnoteže, u korist prooksidanasa, i nastaje oksidativni stres, koji je povezan sa preko 150 različitih bolesti, kao jedan od glavnih patogenetskih mehanizama ili kao krajnji mehanizam oštećenja tkiva (Alfada i Sallam, 2012). Za mnoge *Sideritis* vrste postoje podaci da imaju antioksidantno delovanje u *in vitro* uslovima. Tunalier i saradnici (2004) su pokazali antioksidantno delovanje za 27 različitih vrsta *Sideritis*-a, mereno peroksidacijom linoleinske kiseline indukovanom Fe^{+2} . Pokazano je da antioksidantni kapacitet, direktno zavisi od fenolskog sadržaja: *S. amasiaca* i *S. germanopolitana* sa najvećim fenolskim sadržajem, pokazale su najveću antioksidantnu aktivnost. Takođe veza između antioksidantne aktivnosti i fenolskog sadržaja uočena je i za metanolne ekstrakte *S. ozturkii* i *S. caesarea* (Sagdic i sar., 2008).

U Grčkoj, *Sideritis* vrste se koriste kao konzervansi i boje koje se dodaju maslinovom ulju. Zbog svoje visoke antioksidantne aktivnosti *S. euboea* bi se mogla koristiti kao aditiv za hranu, što bi bilo i ekonomski isplativo (Tsaknis i sar., 2005). Bez obzira na tradicionalnu upotrebu ove biljke, u kliničkom istraživanju kontrolisanom placebom, sprovedenom u cilju ispitivanja *in vivo* antioksidantne aktivnosti, nije nađena značajna razlika u markerima oksidativnog stresa u krvi (glutation, nitriti, koenzim Q, vitamini A, C, E) između intervencijske i placebo grupe (Skouroliahou i sar., 2009). Međutim, infuz napravljen od *S. caesarea* pokazao je antioksidantnu aktivnost u životinjskom modelu indukovnog oksidativnog stresa (Celik i sar., 2010). Takođe, u *in vivo* eksperimentu sa miševima koji su tretirani ekstraktima biljke *S. clandestine* tokom 6 nedelja, pokazano je da poseduju znatno veću

antioksidantnu aktivnost u međumozgu mereno FRAP (ferric reducing power) esejom (Linardaki i sar., 2008).

1.1.3.2. Antiinflamatorno delovanje

Upotreba *Sideritis* vrsta u tradicionalnoj medicini se u velikoj meri zasniva na njihovom antiinflamatornom delovanju. Izveden je veliki broj *in vivo* eksperimenata, koji su za mnoge vrste roda *Sideritis* potvrdili antiinflamatorno delovanje u životinjskim modelima. Većina ovih eksperimenata zasniva se na sprečavanju, odnosno smanjenju otoka šape odraslih ženki Wistar pacova koja je indukovana karageninom, dok je u nekim eksperimentima vršeno poređenje antiinflamatornog efekta *Sideritis* ekstrakata sa nesteroidnim antiinflamatornim lekovima.

Antiinflamatorna svojstva se uglavnom pripisuju sadržaju diterpenoida, međutim ne može se isključiti ni značaj različitih flavonoida, za koje takođe postoje brojni eksperimentalni podaci o antiinflamatornom delovanju.

Menghini i saradnici (2005) pokazali su antiinflamatorno delovanje heksanskog ekstrakta *S. syriaca*. Pored toga, isti ekstrakt je pokazao centralno i periferno analgetsko delovanje. Slično delovanje-analgetsko i antiinflamatorno pokazala je i vrsta *S. candicans*, u modelu edema šape indukovanoj karageninom, a antiinflamatorno delovanje bilo je u korelaciji sa prisustvom fitosterola, triterpenskih derivata i diterpenoida ent-kaurenskog tipa (Hernandez-Perez i sar., 2004).

Analgetsko delovanje pokazano je i za vrste: *S. canariensis* (Hernandez-Perez i sar., 2002), *S. lhotskyi* (*Hernandez-Perez M i sar., 2002) i *S. foetens* (Navarro i sar., 2001).

Lipidna frakcija heksanskog ekstrakta *S. javalambrensis* pokazala je značajnu antiinflamatornu aktivnost. Oralno primenjena, inhibirala je karageninom indukovani edem šape, dok je topikalno primenjena inhibirala edem ušne školjke indukovani 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetatom. Kvantifikacijom

neutrofilne mijeloperoksidaze dokazano je topikalno antiinflamatorno delovanje. Pored toga, značajno je bila smanjena degranulacija neutrofila i otpuštanje histamina, a u *in vitro* uslovima ekstrakt je smanjio sintezu azot monoksida iz lipopolisaharidom (LPS) stimulisanih makrofaga (Godo i sar., 2000). Kao glavni nosilac antiinflamatornog delovanja izolovan je diterpenoid labdan, koji je pokazao brojna farmakološka dejstva. Labdan inhibira sintezu prostaglandina E2 u mišjim makrofazima u kulturi stimulisanim jonoforama, kao i u makrofagnim linijama stimulisanim LPS-om, i smanjuje ekspresiju inducibilnih formi ciklooksigenaze i sintaze azotnog oksida (Pang i sar., 1996). Slično delovanje pokazuje i diterpenoid andaluzol izolovan iz *S. foetans*, za koji je takođe pokazano da smanjuje karageninom indukovani edem, smanjuje otpuštanje histamina iz mastocita i smanjuje neutrofilnu infiltraciju (Navarro i sar., 1997).

Feniletanoidni glikozidi-verbaskozid i jedan derivat izoskutelareina pokazali su se kao snažni antiinflamatorni agensi, a izolovani su iz acetonskog ekstrakta vrste *S. stricta* (Kupeli i sar., 2007). Još jedno fenolsko jedinjenje ozturkozid C (derivat hrizoeriola), dobijeno iz vrste *S. ozturkii*, pokazalo je značajnu antiinflamatornu i antinociceptivnu aktivnost (Kupeli i sar., 2007).

Pored navedenih jedinjenja u *Sideritis* vrstama su opisana i mnoga druga sa antiinflamatornim svojstvima, zbog čega je antiinflamatorno delovanje ovih biljaka veoma složeno i usmereno na različite faze inflamatornog procesa, a verovatno će buduća istraživanja dovesti do razvoja novih potencijalnih antiinflamatornih agenasa.

1.1.3.3. Gastroprotektivno delovanje

Porast upotrebe nesteroidnih antiinflamatornih lekova, kortikosteroida i velika rasprostranjenost *Helicobacter pylori* infekcije doveli su do velikog porasta incidence ulkusne bolesti. Iako danas, postoje lekovi koji efikasno smanjuju lučenje hlorovodonične kiseline u želucu, njihova upotreba nije

bezazlena (porast incidence aspiracionih pneumonija, smanjenje resorpcije kalcijuma, veći rizik od nastanka osteoporoze), pa se nameće potreba za razvojem novih agenasa sa gastroprotektivnim delovanjem.

Za mnoge *Sideritis* vrste pokazano je antiulkusno delovanje, koje se uglavnom zasniva na sadržaju flavonoida. Flavonoid hipolaetin-8-O- β -D-glukozid koji se nalazi u više vrsta (*S. leucantha*, *S. mugronensis*, *S. angustifolia*, *S. saetabanesis*) ispoljava gastroprotektivno delovanje povećanjem produkcije mukusa i smanjivanjem kiselosti želudačnog sadržaja (Villar i sar., 1984, Alcaraz i sar., 1998, Zarzuelo i sar., 1998). Prisustvo pirokateholske grupe u 3`-4` poziciji povećava antiulkusnu aktivnost (Alcaraz i sar., 1998). U eksperimentima Zarzuela (Zarzuelo i sar., 1998), pokazano je da su izvesne *Sideritis* vrste efikasnije protiv indometacinom indukovanih ulkusa (*S. funkiana*, *S. incana*) dok su druge bile efikasnije protiv stresom indukovanih ulkusa (*S. hirsuta*). Esencijalna ulja, prisutna u *S. italica* pokazaju snažnu dozno zavisnu aktivnost protiv *H. pylori* (Basile i sar., 2006).

1.1.3.4. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobno delovanje *Sideritis* vrsta uglavnom potiče od prisustva esencijalnih ulja odnosno od terpenskih derivata. Brojne *Sideritis* vrste, pokazuju aktivnost protiv širokog spektra gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, kao i protiv gljiva iz roda *Candida*.

Esencijalna ulja iz *S. angustifolia*, *S. funkiana*, *S. javalambrensis*, *S. leucantha*, *S. mugronensis* i *S. tragoriganum* inhibiraju rast Gram-pozitivnih bakterija, (*S. aureus*, *M. phlei*) i gljive *C. albicans*, ali nisu pokazale aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija (Bojović i sar., 2011). Nasuprot tome, vrste *S. cilicica* i *S. bilgerana* su ispoljile značajno antimikrobno delovanje i protiv Gram-pozitivnih (*S. aureus*, *B. cereus*, *S. epidermidis*), ali i protiv Gram-negativnih bakterija (*S. typhimurium*, *E. Coli*) sa minimalnim inhibitornim koncentracijama-MIC u rasponu 0.125-0.5 mg/mL. Za obe vrste

karakteristično je prisustvo α i β pinena, kojima se pripisuje antimikrobna aktivnost (Iskan i sar., 2005).

S. perfoliata i *S. trojana* pokazale su umerenu aktivnost protiv *E. coli*, meticilin rezistentnog *S. aureus*-a, *E. aerogenes* i *B. cereus*-a (MIC u rasponu 125-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i izrazitu antimikrobnu aktivnost protiv *S. epidermidis* (MIC 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Kirimer i sar., 2008).

1.1.3.5. Druga dejstva *Sideritis* vrsta

Vodeni ekstrakti *S. euboica* i *S. clandestina* indukovali su osteoplastnu diferencijaciju KS483 progenitorskih ćelija. Istovremeno, ovi ekstrakti su ispoljili antiproliferativno dejstvo na ćelije karcinoma dojke, dok nisu stimulisali proliferaciju karcinoma cerviksa, dakle pokazano je delovanje slično selektivnim modulatorima estrogenskih receptora (Kassi i sar., 2004).

Kasnije je u životinjskom modelu pokazano antiosteoporotsko delovanje ekstrakta iste biljke. Šestomesečna primena ekstrakta *S. euboica* sprečila je gubitak koštane mase i popravila biomehaničke karakteristike kostiju kod ovariektomisanih pacova, nakon šestomesečne primene (Dontas i sar., 2011).

Metanolski ekstrakt vrste *S. libanotica* ssp. *linearis* pokazao je značajan citotoksični efekat na sledeće ćelijske linije: Vero ćelije (ćelije epitela bubrega afričkih zelenih majmuna), C6 (pacovski gliom) i HeLa ćelije (humani karcinom uterusa) (Demirtas i sar., 2009).

Pored napred navedenih delovanja, mnoge vrste roda *Sideritis* pokazuju analgetsko delovanje u različitim modelima, za neke je pokazano da deluju kao inhibitori preuzimanja serotonina, a neke inhibiraju holinesterazu.

1.1.4. *Sideritis scardica*

Sideritis scardica Griseb., Lamiaceae se vekovima koristi u tradicionalnoj medicini Balkanskih naroda, zbog anti-inflamatornog, anti-mikrobnog, anti-reumatskog i gastroprotektivnog delovanja. Široko se upotrebljava u lečenju astme, bronhitisa i emfizema. Do skoro, farmakološke studije koje potvrđuju delovanje *S. scardica* nisu bile sprovedene. Nedavno su hemijski okarakterisani različiti *S. scardica* ekstrakti i sproveden je niz eksperimenata, kako na animalnim modelima, tako i u *in vitro* uslovima na ćelijskim linijama (Tadić i sar., 2012). Svi ispitivani ekstrakti pokazali su značajnu *in vitro* antioksidansnu aktivnost merenu DPPH testom (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), koji se zasniva na redukcionoj sposobnosti ekstrakta, odnosno na obezbojavanju DPPH reagensa pod odgovarajućim uslovima. Pokazano je da je antioksidansna sposobnost ispitivanih ekstrakata direktno proporcionalna sadržaju fenolskih komponenti. Fenolske komponente imaju sposobnost da neutrališu superoksidni anjon i hidroskilni radikal, kao i da budu donori vodoničnih jona. Prisustvo derivata hidroksicimetne kiseline povećavalo je antioksidantnu sposobnost ekstrakata. Grupa $-CH=CH-CO-$ prisutna u derivatima hidroksicimetne kiseline ima veliku tendenciju da donira vodonik i na taj način znatno pojačava antioksidantna svojstva. Svi okarakterisani ekstrakti su pokazali i znatno antiinflamatorno delovanje. U animalnom modelu inflamacije (karageninom indukovani edem šape pacova), ekstrakti su pokazali značajno anti-inflamatorno delovanje, koje je bilo uporedivo sa nesteroidnim antiinflamatornim lekom indometacinom. Najbolje antiinflamatorno delovanje pokazao je ekstrakt dobijen obradom etanolnog ekstrakta etrom. Antiinflamatorno delovanje se takođe može pripisati prisustvu fenolskih supstanci. Naime, u prvoj fazi inflamacije indukovane karageninom, za pojavu otoka su odgovorni brzoreagujući inflamatorni medijatori, kao što su histamin, serotonin, prostaglandini, dok nakon toga dolazi do infiltracije neutrofilima, koji otpuštaju svoje medijatore i indukuju oksidativni stres. Za različite fenolske komponente, pokazano je da mogu da

spreče migraciju neutrofila, a zbog antioksidansnih svojstava mogu da neutrališu slobodne radikale koji su, barem delom, odgovorni za oštećenje tkiva nakon aktivacije neutrofila.

U istoj studiji pokazano je i gastroprotektivno delovanje *S. scardica* ekstrakata. Ispitivano je protektivno delovanje ekstrakata, kao i referentnog leka ranitidina (antagonist H₁ receptora) na nastanak etanolom indukovanih ulkusa. Ekstrakt dobijen obradom etanolnog ekstrakta *S. scardica*-e n-butanolom u dozi od 100 mg/kg, primenjen oralno, pokazao je značajan gastroprotektivni efekat, koji je bio čak bolji od efekta postignutog ranitidinom. Gastroprotektivno delovanje se takođe može pripisati sadržaju fenolskih komponenti i antioksidantnom delovanju, jer su slobodni radikali važan patofiziološki mehanizam oštećenja mukoze želuca u etanolom indukovanim ulkusima.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti *S. scardica*-e, pokazalo je umereno, do snažno delovanje protiv nekoliko patogenih bakterija (Tadić i sar., 2012). Pokazana je veća osetljivost Gram-pozitivnih, u odnosu na Gram-negativne bakterije, izuzev *Hemophilus sp.* i *Pasteurella multocida*, koje su iako Gram-negativne, bile jako osetljive na delovanje ekstrakata. *Hemophilus* je bio najosetljivija od svih ispitivanih bakterija sa minimalnim inhibitornim koncentracijama-MIK, koje su iznosile 40 i 80 µg/mL za etil-acetatnu i n-butanolnu frakciju. Obe frakcije pokazale su MIK od 80 µg/mL za *Corynebacterium pseudotuberculosis*; slično, etarska ulja su bila najtoksičnija za istu bakteriju. Najrezistentnije na delovanje ekstrakata bile su Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, za koje su MIK bile veće od 2560 µg/mL za sve ispitivane komponente. Sve ispitivane komponente pokazale su relativno slabu aktivnost na inhibiciju rasta gljive *Candida albicans* i većina MIK iznosila je oko 2560 µg/mL.

1.2. Apoptoza kao mehanizam delovanja antitumorskih lekova

Apoptoza je programirana ćelijska smrt koja se javlja u fiziološkim i patološkim uslovima. Važna je za odžavanje homeostaze tkiva i u fiziološkim uslovima odvija se tokom procesa normalnog razvoja, starenja i involucije organa. U patološkim uslovima, preterano izražena apoptoza u nekim tkivima može biti osnov degenerativnih bolesti (npr. Parkinsonova bolest), dok rezistencija ćelija na apoptozu može biti u osnovi malignih bolesti.

Apoptoza je otkrivena 1970. godine, a sam termin potiče iz grčkog jezika i označava „opadanje lišća u jesen,, (Kerr i sar., 1972). To je kontrolisan proces u kome ćelija aktivno učestvuje izvršavajući genski regulisan program autodestrukcije (Majno i sar., 1995).

Glavne morfološke karakteristike ćelija koje su ušle u proces apoptoze su kondenzacija jedra i hromatina koje prati nuklearna fragmentacija, zaokrugljivanje ćelije, smanjenje volumena ćelije (piknoza) i retrakcija pseudopoda (Kroemer i sar., 2005). Integritet ćelijske membrane ostaje očuvan tokom celog procesa. U kasnijim fazama apoptoze može da dođe do „bubrenja” ćelijske membrane i formiranja tzv. apoptotskih tela (Kroemer i sar., 2005), ali ćelije obično bivaju fagocitovane pre formiranja apoptotičnih tela. Ukoliko ne dođe do fagocitoze apoptotičnih tela, ona se raspadaju na način koji vrlo podseća na nekrotični tip ćelijske smrti, a sam proces se zove sekundarna nekroza (Ziegler i sar., 2004). Tokom apoptoze dolazi do brojnih biohemijskih promena, kao što su: aktivacija kaspaza (cistein zavisne serin proteaze), razgradnje proteina i nukleinskih kiselina i rearanžiranja fosfolipida ćelijske membrane (Kumar i sar., 2010). Rano tokom procesa apoptoze dolazi do premeštanja fosfatidil-serina iz unutrašnjeg sloja u spoljašnji sloj ćelijske membrane (flip-flop difuzijom), što omogućava ćelijama fagocitnog sistema da prepoznaju i fagocituju apoptotične ćelije bez indukcije inflamatornog odgovora (Hengartner, 2000). Centralni događaj u procesu apoptoze je aktivacija kaspaza. Kaspaze mogu biti aktivirane na tri načina. Klasično se opisuju dva puta aktivacije: unutrašnji i spoljašnji i oni pripadaju

inicijatorskoj fazi apoptoze. Oba puta aktivacije kaspaza se susreću u tzv. zajedničkom putu, koji u stvari predstavlja egzekutorsku fazu apoptoze. Treći put aktivacije kaspaza je unutrašnji put povezan sa endoplazmatskim retikulumom, međutim on je još uvek nedovoljno proučen (O'Brien i sar., 2008).

1.2.1. Spoljašnji put aktivacije kaspaza

Spoljašnji put aktivacije kaspaza, odnosno apoptoze, započinje nakon vezivanja "liganda smrti" za "receptore smrti". Najbolje proučeni ligandi smrti su faktor nekroze tumora (*engl. tumor necrosis factor*- TNF) i Fas ligand-FasL, koji se vezuju za svoje receptore TNF receptor-1 (TNFR1) i Fas (Hengartner, 2000). Oba receptora imaju svoje unutarćelijske domene kojima regrutuju svoje adapterske protein kao što su domen smrti vezan za TNF receptor (*engl. TNF receptor-associated death domain*, TRADD) i domen smrti vezan za Fas (*engl. Fas-associated death domain*, FADD). Vezivanje liganda za receptor smrti indukuje konformacionu promenu u unutarćelijskom domenu receptora i formira vezno mesto za adapterski protein, a ceo novonastali kompleks koji formiraju ligand, receptor i adapterski protein se naziva signalni kompleks koji indukuje smrt (*engl. death-inducing signalling complex*-DISC) (O'Brien i sar., 2008). DISC indukuje prevođenje prokaspaze 8 u aktivnu kaspazu 8 (inicijatorska kaspaza spoljašnjeg puta), koja inicira apoptozu delujući na nishodne egzekutorske kaspaze.

1.2.2. Unutrašnji (mitohondrijalni) put aktivacije kaspaza

Ireverzibilno genetsko oštećenje, porast unutarćelijske koncentracije jona kalcijuma ili oksidativni stres su samo neki od stimulusa koji mogu da pokrenu mitohondrijalni put aktivacije apoptoze. Bez obzira na stimulus,

dolazi do naglog povećanja propustljivosti mitohondrijalne membrane i otpuštanja različitih proapoptotskih molekula u citoplazmu (kao što je citohrom C). Unutrašnji put aktivacije kaspaza je regulisan proteinima Bcl-2 familije. Bcl-2 familija se deli u dve velike grupe: propapoptotske članove (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim i Hrk) i antiapoptotske članove (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 i Mcl-1) (Reed, 1997). Proapoptotski proteini stimulišu dok antiapoptotski proteini sprečavaju otpuštanje citohroma C u citoplazmu. Inicijacija apoptoze nije uslovljena apsolutnom ekspresijom određenog proteina, već odnosom između proapoptotskih i antiapoptotskih članova (Reed, 1997.). Takođe i drugi apoptotski faktori mogu da budu otpušteni iz intermembranskog prostora mitohondrija, kao što su faktor koji indukuje apoptozu (*engl. apoptosis inducing factor-AIF*), sekundarni aktivator kaspaza poreklom iz mitohondrija (*engl. second mitochondria-derived activator of caspase - Smac*), direktni IAP vezujući protein-DIABLO (*engl. direct IAP Binding protein with Low pI*) i Omi/protein visokih temperaturnih zateva A-HtrA2 (*engl. high temperature requirement protein A*) (Kroemer i sar., 2007). Citohrom C zajedno sa faktorom koji aktivira proteaze uključene u process apoptoze (*engl. apoptotic protease activating factor 1, APAF-1*) i kaspazom-9 gradi kompleks koji se naziva apoptozom i aktivira egzekutorsku kaspazu 3 (Kroemer i sar., 2007). Sa druge strane, Smac/DIABLO ili Omi/HtrA2 indukuju apoptozu vezujući se za inhibitore proteina apoptoze (*engl. inhibitor of apoptosis proteins- IAPs*), što dovodi do raskidanja kompleksa IAPs-a i kaspaza 3 i 9 i aktivacije apoptoze (LaCasse i sar., 2008).

1.2.3. Zajednički put aktivacije kaspaza

Zajednički put, odnosno egzekutorska faza apoptoze sastoji se u seriji aktivacije više kaspaza. I unutrašnji i spoljašnji put aktivacije kaspaza konvergiraju u istu tačku, tj. aktivaciju kaspaze-3. Kaspaza-3 razgrađuje inhibitor kaspazom aktivirane deoksiribonukleotidaze (*engl. caspase activated*

deoxyribonuclease, CAD), pri čemu je CAD odgovoran za internukleozomalnu degradaciju DNK (Ghobrial i sar., 2005). Pored toga, egzekutorske kaspaze indukuju razgradnju protein kinaza, citoskeletnih proteina, proteina koji vrše popravku DNK i inhibitronih subjedinih proteina iz familije endonukleaza. One imaju i uticaj na citoskelet, ćelijski ciklus i signalne puteve, što sve zajedno doprinosi nastanku promena tipičnih za apoptozu (Ghobrial i sar., 2005).

1.2.4. Apoptoza i kancerogeneza

Ranih sedemdesetih godina prošlog veka Kerr je povezoao apoptozu sa kancerogenezom. Naime, apoptoza je predstavljena kao biološki process koji omogućava uklanjanje potencijalno malignih ćelija, redukcije ćelijske hiperplazije i sprečavanje progresije tumora (Kerr i sar., 1972). Definitivno, smanjena sposobnost apoptoze ili rezistencija na apoptozu igraju ključnu ulogu u procesu kancerogeneze. Postoji mnogo načina kojim maligna ćelija smanjuje svoju sposobnost da uđe u apoptozu ili postaje rezistentna na indukciju apoptoze. Uopšteno, svi se oni mogu klasifikovati u tri grupe: poremećaj balansa između proapoptotskih i antiapoptotskih proteina, poremećaj funkcije kaspaza i poremećaj signalizacije nishodno od receptora smrti.

1.2.5. Poremećaj balansa proapoptotskih i antiapoptotskih proteina

Bcl-2 familija proteina igra ključnu ulogu u regulaciji mitohondrijalnog unutrašnjeg puta apoptoze. Bcl-2 protein otkriven je pre više od 20 godina, kodiran je istoimenim genom, a ime mu potiče od B ćelijski limfom 2 (*engl. B cell lymphoma*), jer je prvi put identifikovan u B ćelijskom limfomu sa translokacijom 14-18 (Tsujimoto i sar., 1984). Većina članova Bcl-2 familije su

dimerni proteini, smešteni na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, gde regulišu njenu propustljivost, a imaju funkciju jonskih kanala ili mogu da formiraju permeabilizacione pore (Minn i sar., 1997). Na osnovu funkcije i Bcl-2 homolognih (BH) domena, svi pripadnici Bcl-2 familije su podeljeni u 3 grupe. Prvu grupu čine antiapoptotski članovi, koji imaju sva 4 BH domena i tu spadaju Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, i Bcl-B/Bcl2L10. Drugu grupu čine proapoptotski proteini koji imaju samo BH-3 domen i nazivaju se BH-3-samo proteini i tu spadaju Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, i Bik. Treću grupu čine takođe proapoptotski proteini, ali oni za razliku od druge grupe imaju sva 4 BH domena i nju čine Bax, Bak i Bok/Mtd (Dewson i sar., 2010).

Smanjena sposobnost ćelija da uđu u apoptozu, ili rezistencija na apoptozu može nastati zbog prekomerne ekspresije antiapoptotskih proteina, smanjene ekspresije proapoptotskih proteina, ili kombinacije oba. Pokazano je da prekomerna ekspresija Bcl-2 proteina štiti ćelije kancera prostate od indukcije apoptoze (Raffo i sar., 1995). Prekomerna ekspresija Bcl-xl gena, je odgovorna za nastanak multiple rezistencije tumorskih ćelija na lekove, "štiteći" ih od ulaska u apoptozu (Minn i sar., 1995). Tako na primer, u hroničnoj limfocitnoj leukemiji maligne ćelije imaju antiapoptotski fenotip, sa prekomernom ekspresijom Bcl-2 proteina i niskim koncentracijama proapoptotskih proteina, kao što je Bax. Tako je pokazano da leukemogeneza u hroničnoj limfocitnoj leukemiji nastaje zbog smanjene apoptoze, a ne povećane proliferacije, kako bi se očekivalo (Goolsby i sar., 2005).

Protein p53 je jedan od najbolje proučenih tumor supresorskih proteina. On nije samo uključen u indukciju apoptoze, već ima i veoma značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, razviću, diferencijaciji, hromozomskoj segregaciji, DNK rekombinaciji i ćelijskom starenju (Oren i sar., 1999), zbog čega se i naziva "čuvar genoma" (Lane, 1992.). Greške u p53 genu nađene su u preko 50% humanih kancera (Bai i sar., 2006).

Inhibitori apoptotskih proteina (*engl. inhibitor of apoptosis proteins, IAPs*) su grupa srodnih proteina koji regulišu apoptozu, ćelijsku deobu i signalnu transdukciju. Oni se karakterišu prisustvom BIR domena (*engl. baculovirus IAP repeat*) (LaCasse i sar., 2008), a do danas ih je opisano osam: NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), X-vezani IAP (XIAP, BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin/MLIAP (BIRC7) i IAP-u sličan protein 2 (BIRC8) (Vucic i sar., 2007). IAPs su endogeni inhibitori kaspaza, koji se vezuju za konzervirani BIR domen u aktivnom centru kaspaza, što onemogućava pristup supstratima, ili indukuje razgradnju aktivnih kaspaza (Wei i sar., 2008). Poremećaj ekspresije IAPs-a prisutan je u mnogim tipovima kancera. Visoka ekspresija IAPs-a je uočena u karcinomu pankreasa, a rezistencija na hemoterapiju je posredovana prekomernom ekspresijom proteina cIAP-2 (Lopes i sar., 2007). Apollon je prekomerno eksprimiran u ćelijama glioma i odgovoran je za rezistenciju na apoptozu indukovanu cisplatinom i kamptotecinom (Chen i sar., 1999). Takođe je za mnoge druge članove IAPs familije pokazana jasna asocijacija sa malignim tumorima.

1.2.6. Poremećaj funkcije kaspaza

Kaspaze se mogu grubo podeliti u 2 grupe: kaspaze koje učestvuju u produkciju citokina i koje su aktivne tokom inflamatornog odgovora (kaspaze 1, 4, 5, 13 i 14) i kaspaze koje imaju ključnu ulogu u apoptozi (kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, 9 i 10). Apoptotske kaspaze se mogu dalje klasifikovati na inicijatorske (2, 8, 9 i 10), koje su primarno odgovorne za započinjanje procesa apoptoze i efektorske ili egzekutorske (3, 6 i 7) koje su odgovorne za razgradnju ćelijskih elemenata tokom apoptoze (Fink i sar., 2005). Imajući u vidu ključnu ulogu kaspaza u procesu apoptoze, nije iznenađujuće da poremećaj u njihovom funkcionisanju može biti povezan sa procesom kancerogeneze. Nishodna regulacija kaspaze-9 je čest događaj kod pacijenata u II stadijumu kolorektalnog karcinoma i korelira sa lošom prognozom (Shen i sar., 2009).

Informaciona RNK za kaspazu-3 u uzorcima karcinoma dojke, ovarijuma i cerviksa bila je ili nedetektabilna (dojka i cerviks) ili značajno smanjena, i povezana je sa hemiorezistencijom ćelija karcinoma dojke (Devarajan i sar., 2002).

1.2.7. Poremećaj signalizacije nishodno od receptora smrti

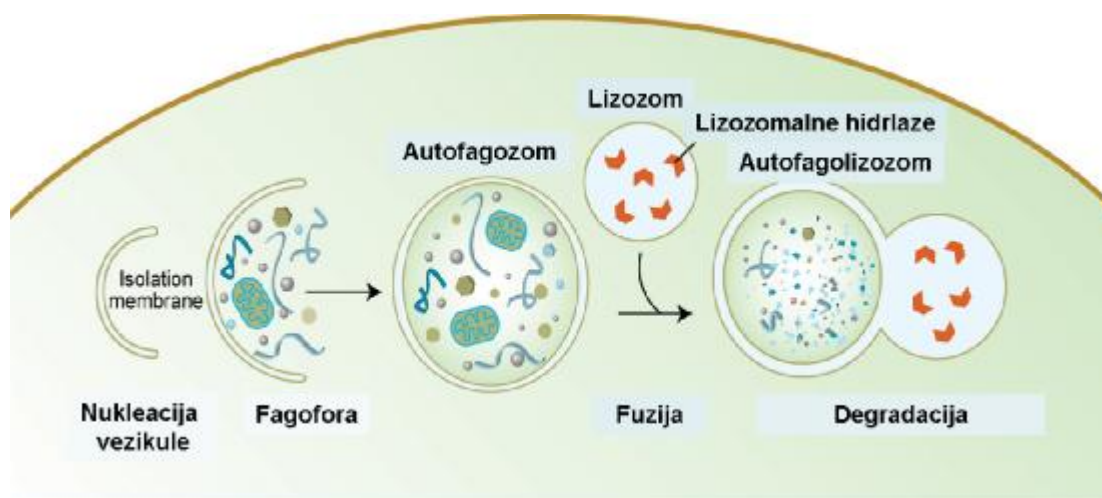
Receptori smrti i ligandi za receptore smrti imaju ključnu ulogu u započinjanju spoljašnjeg puta apoptoze. Nakon vezivanja liganada, receptori se vezuju za brojne adapterske proteine sa domenima smrti, inicirajući signalnu kaskadu. Međutim ligandi smrti se mogu vezati i za lažne receptore smrti (*engl. decoy death receptors*), koji nemaju domene smrti, pa nisu u stanju da započnu signalnu kaskadu, niti da indukuju apoptozu (Lavrik i sar., 2005). Smanjena ekspresija receptora smrti, ili pak povećana ekspresija lažnih receptora smrti može dovesti do povećane rezistencije na indukciju apoptoze. Smanjena ekspresija Fas liganda primećena je u leukemijama rezistentnim na terapiju i u neroblastomima (Fulda i sar., 1998). Prekomerna ekspresija lažnih receptora smrti takođe je opisana u različitim tumorima (Fulda, 2010).

1.3. Autofagija kao mehanizam delovanja antitumorskih lekova

Autofagija (makroautofagija) je proces digestije karakterističan za sve eukariote, posredovan lizozomima, kojim se uklanjaju različite ćelijske komponente. U fiziološkim uslovima autofagijom se uklanjaju dugoživeći proteini i oštećene organele, međutim tokom perioda deprivacije nutrijenata, autofagija postaje proces koji ćeliji omogućava opstanak, obezbeđujući joj neophodne molekule za održavanje metaboličkih procesa, odnosno sintezu adenzin tri fosfata-ATP.

1.3.1. Mehanizam autofagije

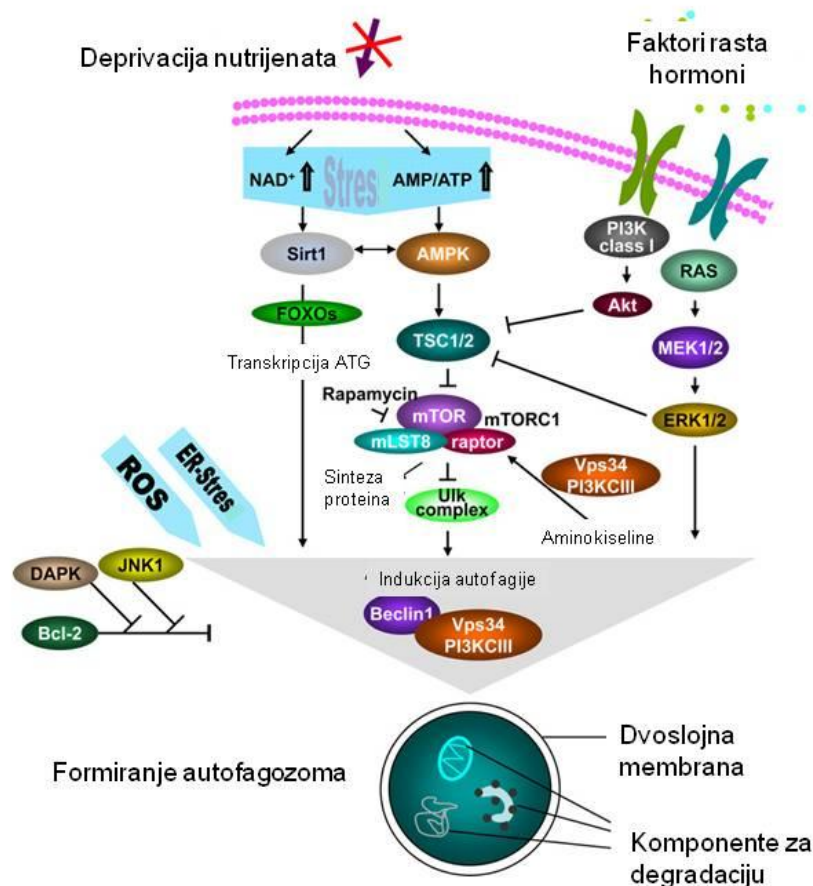
Tokom autofagije, deo citoplazme koji sadrži unutarćelijske komponente koje treba ukloniti okružuje se membranom i tako nastaje fagofora (Seglen i sar., 1990). Fagofora se zatim zatvara formirajući vakuolu obavijenu dvostrukom membranom pri čemu nastaje autofagozom. Koristeći se dineinskim "nožicama" autofagozom klizi duž mikrotubula i odlazi do centra za organizaciju mikrotubula, gde se spaja sa lizozomom i formira autofagolizozom. Mnogi proteini učestvuju u procesu formiranja autofagolizozoma. U kvascu su identifikovani mnogi geni koji regulišu autofagiju, koji se grupnim imenom nazivaju ATG geni (*engl. AuTophagy-related Genes*), a mnogi od njih imaju homologe u ćelijama sisara (Nakatogawa i sar., 2009).



Slika 1. Proces formiranja autofagolizozoma (Modifikovano prema: *Nature*, 2008, 28: 451)

Centralnu ulogu u regulaciji autofagije svakako zauzima mTOR kompleks (*engl. mammalian target of rapamycin, mTOR*) koji integriše brojne signale koji utiču na autofagiju, kao što su faktori rasta, nutrijenti, različiti stresori i energetska status ćelije. Kinaza mTOR glavni je represor autofagije i uključena je u kontrolu ćelijskog rasta i proliferacije. Jedan od glavnih aktivatora mTOR

puta je signalni put Akt/protein kinaza B put, koji aktiviran različitim hormonima i faktorima rasta. Akt svoje delovanje ostvaruje inhibitorynom fosforilacijom proizvoda tumor supresorskog gena TSC 1/2 (*engl. tuberous sclerosis complex 1/2*). TSC 1/2 je glavni inhibitor mTOR-a, preko koga mnogi aktivatori mTOR-a ostvaruju svoje delovanje (Bhaskar i sar., 2007). Sa druge strane tokom deprivacije nutrijenata, dolazi do povećanja unutarćelijske koncentracije adenzin monofosfata-AMP, što dovodi do aktivacije AMP-om aktivirane protein kinaza (AMPK). AMPK aktivira TSC 1/2, što ima za posledicu inhibiciju mTOR-a i indukciju autofagije (Hoyer-Hansen i Jaattela, 2007). AMPK je takođe značajna i za kontrolu ćelijskog ciklusa, zbog svoje uloge u fosforilaciji p53 proteina, čime izaziva zastoj u ćelijskom ciklusu u stanjima deprivacije nutrijenata, i ovaj mehanizam je poznat pod nazivom energetska kontrolna tačka (Hardie, 2007). Takođe i mnogi unutarćelijski signalni molekuli igraju ulogu u regulaciji autofagije, kao što su: RAS, ERK, MEK, c-Jun aminoterminalna kinaza i dr. Mnogi stresori mogu da iniciraju autofagiju, za sada još uvek nedovoljno proučenim putevima. Oštećenje mitohondrija, ili pak endoplazmatskog retikuluma mogu biti okidači za započinjanje autofagije (Reef i sar., 2006, Ding i sar., 2007). Povećana produkcija slobodnih radikala, takođe može biti jedan od inicijatora autofagije, dok neka novija istraživanja ukazuju na značaj slobodnih radikala, kao elemenata koji su neophodni za inicijaciju autofagije (Scherz-Shouval i sar., 2007).



Slika 2. Regulacija autofagije-centralna uloga mTOR-a (Modifikovano prema: *Ageing Res Rev*, 2012, 6:12)

1.3.2. Autofagija i kancerogeneza

Autofagija se često naziva mačem sa dve oštrice, jer može da bude mehanizam koji omogućava kancerskim ćelijama da prežive, a sa druge strane pod nekim drugim uslovima, može da bude mehanizam umiranja ćelije, nezavisan ili pak blisko spregnut sa apoptozom i nekrozom. Da li će aktivacija autofagije omogućiti preživljavanje tumorskih ćelija, ili će biti mehanizam ćelijske smrti zavisi od stadijuma kancerogeneze, vrste ćelija odnosno tkiva i prirode stresora (Boya i sar., 2005).

1.3.3. Autofagija kao mehanizam koji favorizuje preživljavanje kancerskih ćelija

Autofagija može biti mehanizam, kojim normalne i kancerske ćelije obezbeđuju supstrate za sintezu ATP-a i na taj način može biti važan faktor koji omogućava kancerskim ćelijama da prežive u uslovima kada je ograničena dostupnost glukoze i drugih nutrijenata, kada su kompromitovani signali poreklom od faktora rasta, ili kad postoje povećane metaboličke potrebe zbog različitih precipitirajućih faktora (Levine i Kroemor, 2008). Postoje hipoteze koje ukazuju da je zapravo nizak nivo autofagije neophodan za inicijaciju tumora (Edinger i Thompson, 2004). Prema tom konceptu, autofagija omogućava preživljavanje tumorskih ćelija u grupama sve do formiranja neovaskulature. Takođe solidni tumori mogu da koriste autofagiju kao mehanizam preživljavanja tokom metaboličkog stresa koji je često prisutan u tumorima zbog loše vaskularizacije ili hipoksije. Prekomerna ekspresija Ras protoonkogena, koja je karakteristična za različite tumore, može da inicira autofagiju, kao faktor preživljavanja ćelija u unutrašnjosti tumora, dok se ne obavi adekvatna neoangiogeneza (Kang i Avery, 2008). Takođe, uklanjanje oštećenih organela i proteina posredstvom autofagije, može da bude način kojim ćelija smanjuje oštećenje DNK i posledičnu genetsku nestabilnost. Takođe, autofagija može da zaštiti tumorske ćelije od nekroze i inflamacije, koje nastaju kao posledica akumulacije „ćelijskog otpada“ (Mathew i sar., 2007).

1.3.4. Autofagija kao antitumorski mehanizam

Pod određenim uslovima, autofagija funkcioniše kao programirana ćelijska smrt (tip II) dovodi do umiranja tumorskih ćelija. Poremećaj apoptoze je čest u tumorskim ćelijama, zbog čega autofagija kao mehanizam ćelijske smrti ima

još veći značaj. Čak i u ćelijama koje su kompetentne za izvršenje programa apoptoze, autofagija može biti veoma važan činilac koji dovodi do smrti ćelije (Guillon-Munos i sar., 2006).

U humanim kancerima je pokazano da su česte promene različitih gena uključenih u proces autofagije. Monoalelski gubitak beklina I je pokazan u karcinomima dojke, ovarijuma i prostate (Yue i sar., 2003). Smanjena ekspresija LC3B-II (proteina neophodnog za formiranje autofagolizozoma) i beklina I (glavni proautofagni protein), nađena je u astrocitomima visokog gradusa i povezana je sa progresijom tumora (Huang i sar., 2010).

1.3.5. Indukcija autofagije kao mehanizam delovanja antikancerskih lekova

Autofagija kao mehanizam ćelijske smrti se može indukovati u tumorskim ćelijama primenom različitih citotoksičnih lekova. Tako npr. antiestrogenski lek tamoksifen, koji se koristi u terapiji karcinoma dojke, ali i za prevenciju karcinoma u specifičnim slučajevima, u koncentraciji od 1 μ M indukuje autofagiju MCF-7 ćelija (humani karcinom dojke) i izgleda da je ovaj efekat leka neophodno za definitivnu smrt ćelije (Bursch i sar., 1996). Arsen trioksid indukuje smrt ćelija glioma i leukemija procesima apoptoze i autofagije, koje su asocirane sa povećanom ekspresijom beklina I (Qian i sar., 2007). Rapamicin, direktni inhibitor mTOR-a, verovatno je najpoznatiji induktor autofagije i trenutno su u toku klinička istraživanja njegove potencijalne primene kao antikancerskog leka (Tsang i sar., 2007). Neki lekovi koji indukuju oštećenje DNK, kao što su kaptotecin, etopozid i temolozamid mogu takođe da izazovu autofagiju, međutim tako indukovana autofagija nije mehanizam ćelijske smrti, već može biti mehanizam rezistencije tumorskih ćelija na lek (Katayama i sar., 2007). Naime, autofagija koju indukuju etopozid i temolozamid dovodi do produkcije ATP-a, koji tumorske ćelije štiti od mitotske katastrofe (ćelijska smrt koja se dešava tokom ćelijske deobe, najčešće kao posledica neadekvatne segregacije hromozoma).

Evidentno da modulacija autofagije različitim agensima ima veoma veliki terapijski potencijal, međutim, potrebno je precizno analizirati vrstu tumora na koji se deluje, odgovarajuće vreme delovanja i vrstu agensa koji se koristi za modulaciju autofagije.

1.3.6. Polifenoli i indukcija autofagije

Polifenolima se pripisuju brojni pozitivni efekti na očuvanje zdravlja, kao i na prevenciju brojnih bolesti koje su povezane sa procesom starenja, kao što su neurodegenerativne, maligne i kardiovaskularne bolesti. Mehanizam delovanja polifenola je vrlo kompleksan i uključuje različite signalne puteve. Često se navodi da je njihova antioksidantna aktivnost jedan od najvažnijih mehanizama koji se nalazi u osnovi njihovog delovanja. Međutim, za mnoge polifenole je pokazano da osim antioksidantnog delovanja mogu da imaju i prooksidantno delovanje, što zavisi od vrste polifenolskog jedinjenja, načina primene, vrste tkiva i naročito koncentracije primenjenog polifenolskog jedinjenja. Pored toga, za mnoge degenerativne bolesti se smatra da su bar delom uzrokovane smanjenjem stepena autofagije u ćelijama tokom starenja, pa se protektivno delovanje polifenola objašnjava delom njihovom sposobnošću da indukuju autofagiju.

Iako neki raniji radovi pokazuju da izvesna polifenolska jedinjenja mogu da vrše negativnu regulaciju procesa autofagije (Gordon i sar., 1995), kasnije se pojavilo mnogo više radova koji ukazuju na jasna proautofagna svojstva polifenola (Singletary i Milner, 2008). Polifenolska jedinjenja indukuju autofagiju delujući na različite signalne puteve. Tako npr. kvercetin i rezveratrol aktiviraju sirtuine, histon deacetilaze, za koje je pokazano da utiču na dužinu života kod nižih eukariota (Howitz i sar., 2003). Sirtuini vrše deacetilaciji FoxO transkripcionih faktora (Brunet i sar., 2006), što povećava transkripciju Atg gena i indukuje autofagiju (Sengupta i sar., 2009). Pored

toga, sirtuini mogu da vrše direktnu deacetilaciju Atg 5, Atg 7 i LC₃ započinjući formiranje autofagozoma (Lee i sar., 2008).

Polifenoli deluju i preko nuklearnog faktora κ B (*engl. nuclear factor κ B*, NF κ B) i u zavisnosti od vrste ćelije, mogu indukovati ili inhibirati autofagiju (Mehrpour i sar., 2010). Epigalokatehin galat, dobro poznata supstanca iz zelenog čaja, za koji postoje brojni dokazi da utiče na prevenciju malignih i neurodegenerativnih bolesti, indukuje autofagiju na više različitih načina: inhibira supresore Beklina I, kao što su Bcl-2 i Bcl-xl, stabilizuje lizosomalne enzime što favorizuje razgradnju u autofagolizozomima i deluje na Atg gene (Leon i sar., 2003, Dashwood i sar., 2005, Devika i Prince, 2008).

Kurkumin, polifenol koji se dobija iz kurkume (*Curcuma longa*), sastojak karija, za koji postoje izvesni dokazi da može da deluje preventivno na pojavu Alchajmerove bolesti i da ima antikancerogena svojstva, takođe indukuje autofagiju delujući preko Akt i Erk signalnih molekula i na taj način ispoljava svoj antitumorski efekat (Aoki i sar., 2007). Slično delovanje na indukciju autofagije i inhibiciju rasta tumorskih ćelija pokazuje i genistein, flavon koji je izolovan iz soje sa fitoestrogenskim svojstvima (Gossner i sar., 2007).

Nedavno je pokazano da apigenin indukujući porast ekspresije AMPK indukuje autofagiju keratinocita, čime se može objasniti njegov hemopreventivni efekat (Tong i sar., 2012).

1.4. Koncept hemoprevencije tumora

Maligna oboljenja su drugi vodeći uzrok smrtnosti u razvijenom svetu i većini zemalja u razvoju, posle kardiovaskularnih oboljenja (Jemal i sar., 2008.). Zbog toga prevencija i rano otkrivanje malignih oboljenja predstavljaju najveći izazov većine zdravstvenih sistema (Glade, 1999.). Izbegavanje poznatih kancerogenih fizičkih, hemijskih i bioloških agenasa, uz adekvatnu ishranu i fizičku aktivnost, predstavlja najbolji način prevencije malignih oboljenja (Glade, 1999.).

Hemoprevencija malignih oboljenja podrazumeva smanjenje rizika od nastanka tumora primenom različitih prirodnih ili sintetskih agenasa. Koncept hemoprevencije malignih oboljenja je nastao u eksperimentalnim radovima Berenbluma (Berenblum, 1929), koji je pokazao da se upotrebom dihlor-etil sulfida može sprečiti pojava tumora kod miševa izazvanih katranom. Nakon Berenblumovih pionirskih radova na polju hemoprevencije tumora, nastupio je period zatišja, sve do sedamdesetih godina prošlog veka, kada je objavljen rad, koji je pokazao hemopreventivno dejstvo derivata retinoične kiseline (Sporn i sar., 1979) nakon čega su, sve do danas, nastavljena vrlo intenzivna istraživanja u ovom polju.

Mnoge epidemiološke, kao i studije na eksperimentalnim životinjama, su pokazale da unos voća i povrća smanjuje incidencu malignih oboljenja (Reddy i sar., 2003, Block i sar., 1992). Danas su izolovane mnoge komponente iz biljnih sirovina koje pokazuju značajan hemopreventivni potencijal. Triterpen likopen iz paradajza, polifenoli iz zelenog čaja, rezveratrol iz crnog grožđa, flavonoidi apigenin i luteolin su samo neke od supstanci za koje je pokazano antitumorsko delovanje, kako u laboratorijskim sistemima, tako i u populacionim istraživanjima (Amin i sar., 2009). Postoje najmanje dve strategije za razvoj hemopreventivnih agenasa. Jedan od načina bi bio da se identifikuju prirodni konstituenti prisutni u namirnicama i da se, kroz epidemiološke studije, prati mortalitet uzrokovan kancerom, a u zavisnosti od vrste hrane koju određena populacija konzumira, specifičnih geografskih razlika ili razlika koje se javljaju nakon migracija u novu sredinu (Lippman i sar., 2002). Drugi, verovatno racionalniji način, bio bi identifikacija već prisutnih, kao i dizajniranje i identifikacija novih agenasa koji deluju ciljano na specifične molekule uključene u kancerogenezu (Gupta, 2007).

1.4.1. Flavonoidi kao hemopreventivni agensi

Flavonoidi su polifenolski derivati veoma rasprostranjeni u biljnom svetu. Postoji preko 4000 flavonoida, koji su klasifikovani u nekoliko grupa: flavonoli, flavani, proantocianidini, flavanoni, flavoni, izoflavoni i neoflavonoidi. Klasifikacija je izvršena na osnovu strukture molekula, koji se sastoji od dva benzenova prstena, međusobno povezana tri ugljeničnim lancem, koji sa kiseonikom gradi heterocikličnu strukturu (C6-C3-C6). Prisustvo različitih kombinacija multiplih hidroksil, metoksil i O-glikozidnih grupa kao supstituenata na osnovnu benzo-pironsku strukturu, je upravo odgovorno za raznovrsnost ove grupe jedinjenja (Hodek i sar., 2002). Flavonoidi su u hrani najčešće prisutni u formi O-glikozida sa šećerom koji je vezan sa ugljenikom na C3 poziciji. Smatra se da je prosečni dnevni unos flavonoida oko 1g (Kuhnau, 1976).

Flavonoidi ispoljavaju brojne pozitivne biološke efekte. Interaguju sa različitim ćelijskim strukturama, pokazuju antioksidantna svojstva, deluju anti-inflamatorno, anti-virusno i anti-kancerski. Za mnoge flavonoide je pokazano da mogu da zaustave ili čak da izvrše reverziju procesa kancerogeneze (Surh, 2003) i smatraju se hemopreventivnim supstancama (Birt, 2001).

Proces kancerogeneze je kompleksan, ali se uslovno može podeliti u 3 faze: inicijacija, promocija i progresija (Sporn, 1991). Inicijacija nastaje nakon interakcije organizma sa kancerogenima iz spoljašnje sredine (hemikalije, jonizujuće zračenje). Smatra se da u ovom koraku dolazi do promene metabolizma ćelije, menja se sposobnost popravke DNK oštećenja, formiraju se novi obrasci ćelijske deobe. Ćelije koje su prošle kroz process inicijacije imaju znatno veću osetljivost na druge stimulse, koji mogu da indukuju malignu promenu. Faze promocije i progresije traju relativno dugo. One uključuju nekontrolisanu proliferaciju "iniciranih" ćelija, formiranje inicijalne tumorske mase, sticanje sposobnosti za invaziju okolnih tkiva i konačnu diseminaciju u udaljena tkiva, odnosno metastaziranje (Moolgavkar, 1978).

Flavonoidi deluju u svim fazama kancerogeneze. Delujući antioksidansno oni pružaju zaštitu od slobodnih radikala, koji mogu da izvrše inicijaciju kancerogeneze. Pored toga mnogi flavonoidi indukuju enzime II faze procesa detoksikacije u jetri (procesi konjugacije sa glutationom i glukuronskom kiselinom) koji se neophodni za detoksikaciju brojnih hemijskih kancerogena. Flavonoidi indukuju apoptozu i na taj način mogu da spreče dalju proliferaciju ćelija koje su prošle kroz proces inicijacije. Konačno, za neke flavonoide je pokazano da smanjuju invazivnost tumora, odnosno da sprečavaju nastanak metastaza (Moolgavkar, 1978).

Jedan od najvažnijih načina delovanja flavonoida je interakcija sa enzimima faze I (npr. citohrom P₄₅₀) koji mogu da aktiviraju brojne prokancerogene (npr. benzpiren) u reaktivne produkte, koji interaguju sa nukleofilnim supstratima u ćeliji i indukuju malignu transformaciju. Flavonoidi inhibiraju aktivnost određenih izoenzima iz grupe citohroma P₄₅₀, kao što su CYP_{1A1}, CYP_{1A2} (Marchand i sar., 2009, Tsyrllov i sar., 2004) i time sprečavaju oštećenje ćelije i proces kancerogeneze. S druge strane, flavanoli iz zelenog čaja indukuju enzime faze II u jetri, stimulišući izlučivanje hemijskih kancerogena iz organizma (Bu-Abbas, 1998). Na proces detoksikacije kancerogena u drugim tkivima, a ne samo u jetri, deluju neki drugi flavonoidi. Tako npr. biokanin A, izoflavon prisutan u mnogim mahunarkama, povećava aktivnost prostatične UDP-glukuronil transferaze, zbog kojih se u lokalno tkivu prostate smanjuje koncentracija androgena (inaktiviraju se vezujući se sa glukuronskom kiselinom) čime se sprečava maligna transformacija (Sun i sar., 1998).

Antiproliferativno delovanje flavonoida ostvaruje se preko više mehanizama. Oksidansi, odnosno slobodni radikali, jedan su od glavnih faktora koji utiču na progresiju tumorskog rasta. Direktno antioksidansno delovanje flavonoida, kao i supresija enzimskih sistema koju produkuju slobodne radikale smanjuje proliferaciju tumorskih ćelija (Mutoh i sar., 2000). Antiproliferativno delovanje flavonoida posredovano je i inhibicijom aktivnosti ornitin dekarboksilaze, a time posledičnim smanjenjem sinteze DNK i proteina

(Makita i sar., 1996). Mnogi flavonoidi utiču na ciklus deobe ćelije. Brzina ćelijskog ciklusa u najvećoj meri zavisi od aktivnosti ciklin zavisnih kinaza (*engl. cyclin dependent kinase*, CDK). Promena u aktivnosti CDK je ključni momenat u nastanku neoplazija. U različitim tipovima kancera povećana je značajno aktivnost CDK, kao i mutacije gena koji kodiraju inhibitore CDK, pa su lekovi koji modulišu aktivnost CDK danas su u fokusu istraživačkog interesa (Senderowicz, 1999). Tako na primer, silimarin, genistein, kvercetin, luteolin, apigenin, epigalokatehin-3-galat blokiraju proliferaciju ćelija u G₁/S ili G₂/M kontrolnoj tački i inhibiraju proliferaciju tumorskih ćelija u *in vitro* uslovima (Zi i sar., 1998, Choi sar., 2001, Casagrande i sar., 2001).

Apoptoza, odnosno programirana ćelijska smrt omogućava uklanjanje nepotrebnih ili oštećenih ćelija. Smanjena sposobnost apoptoze je osnovna karakteristika mnogih tumorskih ćelija, a rezistencija tumora na apoptozu indukovanu citostaticima je značajan razlog izostajanja pozitivnog odgovora na primenjenu hemioterapiju. Značajna i pozitivna karakteristika flavonoida jeste da oni indukuju apoptozu različitih tumorski transformisanih ćelija ali ne i netransformisanih ćelija. Mehanizmi indukcije apoptoze su vrlo raznoliki i uključuju: inhibiciju aktivnosti DNK topoizomerase I i II (Bailly, 2000., Sukardiman i sar., 2000.), regulaciju ekspresije proteina toplotnog šoka (*engl. heat shock proteins*) (Rong i sar., 2000.), modulaciju signalnih puteva (Yin i sar., 1999.), nishodnu regulaciju nuklearnog transkripcionog faktora κB (NF-κB), aktivaciju endonukleaza i supresiju MCL-1 proteina (Iwashita i sar., 2000, Konig i sar., 1997).

Indukcija autofagije (programirana ćelijska smrt tip II), kao mehanizam antitumorskog delovanja flavonoida tek je odnedavno privukla pažnju istraživača. Za nekoliko flavonoida je pokazano da mogu da izazovu autofagiju, međutim, većina ispitivanih flavonoida istovremeno indukuje i autofagiju i apoptozu (Wen i sar., 2012., Zhang i sar., 2012.). Indukcija autofagije može biti veoma važna strategija u terapiji tumora, naročito kod tumora koji su rezistentni na apoptozu indukovanu hemioterapijskim agensima.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati citotoksičnost različitih ekstrakata biljke *S. scardica* i njenih glavnih polifenolskih komponenti na tumorske ćelijske linije.
2. Ispitati tip i molekulske mehanizme ćelijske smrti indukovane ekstraktima *S. scardica*-e i njihovih polifenolskih komponenti.
3. Ispitati da li postoji sinergističko citotoksično dejstvo ekstrakata *S. scardica*-e i antitumorskih lekova (karmustin), odnosno da li postoji sinergističko citotoksično dejstvo ekstrakata *S. scardica*-e i UV zračenja.

3. METODOLOGIJA

3.1. Ekstrakcija biljnog materijala

Ceo proces ekstrakcije i karakterizacije ekstrakata urađen je na Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić,, u Beogradu.

Sideritis scardica Griesb., fam. Lamiaceae je sakupljana u svom prirodnom staništu na Šarplanini (u podnožju Ljuboten) na 1300 m nadmorske visine, u vreme cvetanja. Biljni materijal je osušen na vazduhu, a zatim spakovan u papirne kese i čuvan na hladnom i tamnom mestu do dalje obrade. Biljni materijal je verifikovan, reprezentativni primerci su deponovani u herbarijum botaničke bašte Jevremovac pod registracionim brojem SS/08. Identifikaciju je obavio profesor DMITAR Lakušić (Institut za botaniku, Fakultet za biologiju Univerziteta u Beogradu). Osušeni nadzemni delovi biljke su sprášeni i ekstrahovani 70 % etanolom (ukupni ekstrakt-ekstrakt 1). Prinos ekstrakta iznosio je 16,7 % (u odnosu na osušenu biljnu sirovinu). Etanolni ekstrakt je rastvoren u vodi, snažno promućkan i dalje ekstrahovan sukcesivno u separacionom levku sa 600 mL dietil-etra, 600 mL etil-acetata i 600 mL zasićenog n-butanola. Dobijene su sledeće frakcije: dietil-etarska 2,8 g (frakcija 2), etil-acetatna 1,3 g (frakcija 3) i n-butanolna 4,4 g (frakcija 4). Prinos frakcija 2, 3 i 4 iznosio je 16,7, 7,5 i 26,3 % u odnosu na ukupni ekstrakt, odnosno 0,46, 0,21 i 0,73 % u odnosu na osušen biljni materijal. U daljem tekstu u cilju jednostavnijeg prikazivanja rezultata, frakcije su označavane kao ekstrakti, odnosno frakcije 2, 3 i 4 označavane su kao ekstrakti 2, 3 i 4.

3.1.1. Određivanje ukupnog fenolskog sadržaja

Ukupan fenolski sadržaj određivan je po Folin-Ciocalteu metodu (Velioglu i sar., 1998). Uzorci su rastvarani u metanolu i 100 µL rastvora uzorka

pomešano je sa 750 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razblaženog deset puta). Nakon 5 minuta inkubacije na 22 °C, dodato je 750 μ L rastvora natrijum bikarbonata (60 g/L). Nakon 90 minuta inkubacije apsorbance su očitavane na 725 nm. Serijski rastvori galne kiselina (0-100 mg/L) služili su za konstrukciju standardne krive. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suve materije ekstrakata (mg GA/g).

3.1.2. Ukupan sadržaj flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida određivan je po metodu opisanom u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 6.0 (Council of Europe, 2004.). Ukratko, uzorci su ekstrahovani smešom aceton/HCl pod refluksnim kondenzorom. AlCl₃ kompleks flavonoidne frakcije ekstrahovane etil-acetatom meren je očitavanjem apsorbance na UV-VIS spektrofotometru HP 8453 na 425 nm. Sadržaj flavonoida izražen kao procenat hiperozida, prikazan je kao srednja vrednost \pm standardna devijacija dobijena iz 3 nezavisna merenja.

3.1.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata

Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata određena je metodom po Bloisu (Blois, 1958), sa izvesnim modifikacijama. Metoda se zasniva na obezbojavanju DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) radikala pri redukciji, a pad apsorbance prati se na 517 nm. Različite koncentracije uzoraka 0,01-1 % (100 μ L) mešane su sa 900 μ L metanolnog rastvora DPPH koncentracije 0,04 mg/mL. Apsorbanca je očitavana na 517nm nakon 20 minuta. Procenat inhibicije je izračunavan korišćenjem sledeće formule $I = [(Ac - Auz)/Ac] \times 100$, gde je I procenat inhibicije, Ac apsorbanca negativne kontrole (100 μ L čistog metanola) i Auz je apsorbanca uzorka. Sintetički antioksidans trolox i tercijerni butilirani hidroksitoluen (BHT) korišćeni su kao pozitivne

kontrole. IC₅₀ vrednosti su izračunate korišćenjem linearne regresione analize.

3.1.4. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i ukupna antioksidativna sposobnost ekstrakata

Sadržaj ukupnih fenola se kretao u intervalu od od 84,2 do 345 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog biljnog ekstrakta. Najbogatiji fenolima bio je ekstrakt 3 (etil-acetatni). Sadržaj flavonoida izražen kao procenat hiperozida takođe je bio najveći za ekstrakt 3 i iznosio je 1,1 %. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 1.

Antioksidansna aktivnost ipitivana DPPH testom, pokazala je da svi ekstrakti imaju antioksidansnu sposobnost, koja je bila najizraženija za ekstrakt 2 (dietil-etarski). Troloks i butilovani hidroksitoulen-BHT, poznati antioksidativni agensi, služili su kao pozitivne kontrole (Tabela 1).

Tabela 1. Antioksidativna sposobnost i ukupni sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima *S.scardica*-e

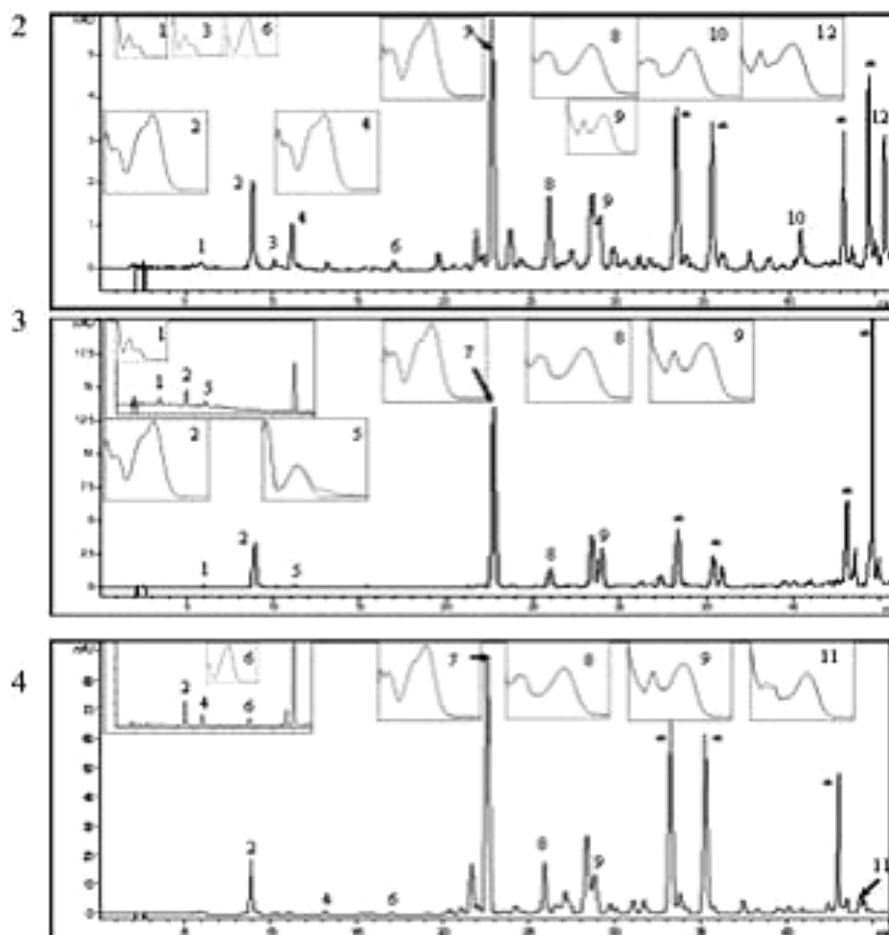
Ekstrakt	DPPH aktivnost IC ₅₀ ±SD (µg/mL)	Ukupni fenoli ±SD (mg GAE/ g DW)	% flavonoida±SD
1 Etanolni	31,50±0,36	188,45±12,91	0,4±0,0
2 Dietil etarski	147,27±1,76	84,20±7,29	0,4±0,0
3 Etil-acetatni	20,07±0,41	345,61±21,70	1,1±0,0
4 n-butanolni	5,67±0,37	300,25±13,39	0,5±0,0
troloks	5,9±0,25	-	-
BHT	6,0±0,27	-	-

3.1.5. Analiza ekstrakata korišćenjem tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC procedura, engl. High pressure liquid chromatography)

Hromatogrami ispitivanih ekstrakata (slika 3), kao i kvantifikacija identifikovanih sastojaka urađena je na aparatu HPLC Agilent Technologies 1200. Detekcija je vršena uz pomoć DAD (detektora sa nizom dioda), a sekundarni metaboliti su identifikovani na sledećim talasnim dužinama: 260 nm (protokatehinska i siringična kiselina), 280 nm (hlorogenska, vanilična, p-kumarna i kafena kiselina), 325 nm (ferula kiselina) i 360 nm (flavonoidi). Separacija komponenti je postignuta korišćenjem LiChrospher 100 RP 18e (5 µm), 250x4mm kolona sa protokom 1 mL/min i mobilnim fazama A [500 mL of H₂O plus 9.8 mL of 85% H₃PO₄ (w/w)], B (MeCN). Uzorci su pripremani rastvaranjem 118.6, 49.4, 9.4, i 53.0 mg ekstrakata 1, 2, 3 i 4 u 10ml metanola, a zatim flitrirani kroz PTFE filter pre HPLC analize. Injektovani volumen uzoraka iznosio je 4 µL. Standardni rastvori flavonoida i polifenolskih kiselina pripremani su u metanolu u sledećim koncentracijama: 0.01 mg/ml (protokatehinska, p-kumarna, vanilična, ferula i siringična kiselina, kao i luteolin i hrizoeriol), 0.05 mg/mL (apigenin, hlorogenska i kafena kiselina) i 0.12mg/mL (apigenin-7-O-glukozid i luteolin-7-O-glukozid). Za identifikaciju i kvantifikaciju komponenti u ispitivanim ekstraktima, korišćene su tri mešavine standarda sa prethodno pomenutim koncentracijam: mešavina 1 sa kafenom kiselinom, apigenin-7-O-glukozidom i apigeninom; mešavina 2 sa hlorogenskom kiselinom, hrizoeriolom, luteolin-7-O-glukozidom i luteolinom; i mešavina 3 koja je sadržala ostale ispitivane supstance. Injektovani volumen je bio isti kao volumen ispitivanih ekstrakata. Identifikacija je vršena na osnovu retencionih vremena i poklapanja spektara. Kvantifikacija je vršena metodom eksternog standarda.

HPLC analizom dobijeni su sledeći podaci: Ferula kiselina je bila najzastupljeniji sastojak svih ispitivanih uzoraka i njena zastupljenost iznosila je 0,36 %, 2,34 %, i 2,92 % za ekstrakte 2, 3 i 4. Ekstrakt 2 je bio bogatiji aglikonima flavonoida, za razliku od više polarnih ekstrakata 3 i 4. Ostale

identifikovane komponente bile su hlorogenska kiselina, vanilična kiselina, kafena kiselina, sirinđična kiselina, p-kumarna kiselina, ferula kiselina, apigenin, luteolin, apigenin-7-O-glukozid i luteolin-7-O-glukozid (Tabela 2).



Slika 3. Reprezentativni hromatogrami odgovarajućih ekstrakata. Pikovi pojedinačnih komponenti obeleženi su brojevima, koji odgovaraju sledećim supstancama: protokatehinska kiselina (1), hlorogenska kiselina (2), vanilična kiselina (3), kafena kiselina (4), sirinđična kiselina (5), p-kumarna kiselina (6), ferula kiselina (7), luteolin-7-O-glukozid (8), apigenin-7-O-glukozid (9), luteolin (10), hrizoeriol (11), apigenin (12).

Tabela 2. Kvantitativno određivanje fenola i fenolkarbonskih kiselina u ekstraktima *S. scardica*

Br.	Komponenta	Ekstrakt			Rtb/Rtc	λ_{max}
		2	3	4		
1.	Protokatehinska kiselina	0,05	1,70	1,70	5,90/6,43	218, 260, 294
2.	Hlorogenska kiselina	0,52	-	-	8,90/8,90	218, 238, 298sh, 324
3.	Vanili _na kiselina	0,04	0,54	0,54	10,15/9,90	218, 260, 292
4.	Kafena k iselina	0,17	-	-	11,18/11,17	218, 238, 298sh, 324
5.	Siringi _na kiselina	-	0,19	0,19	11,22/11,25	218, 274
6.	<i>p</i> -Kumarin	0,12	2,92	2,92	17,21/17,02	226, 298sh, 366
7.	Ferula kiselina	0,36	0,32	0,32	22,78/22,06	218, 236, 298sh, 324
8.	Luteolin -7-O-glukozid	0,03	0,61	0,61	23,85/23,89	254, 268sh, 348
9.	Apigenin -7-O-Glukozid	0,08	-	-	28,98/29,09	266, 336
10.	Luteolin	0,21	0,03	0,03	40,65/40,83	254, 268sh, 348
11.	Hrizoeriol	-	-	-	44,38/44,27	250, 266sh, 292sh
12.	Apigenin	0,32	-	-	45,47/45,49	266, 338

Rtb je retenciono vreme odgovarajuće komponente

3.2. Čelijske linije

U eksperimentima su korišćene sledeće tumorske čelijske linije: B16 (mišji melanom), HL-60 (humana promijelocitna leukemija) i C6 (pacovski gliom). Sve čelijske linije su nabavljene od Evropske kolekcije čelijskih linija (*engl. European Collection of Cell Cultures*). Nakon odmrzavanja, ćelije su pasażirane tokom 7 dana i tek nakon toga korišćene za dalji eksperimentalni rad.

Pored tumorskih linija korišćeni su i primarni pacovski astrociti i humane mononuklearne ćelije periferne krvi-MNPK.

Sve ćelije su održavane u vlažnoj atmosferi u inkubatoru na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂.

Za gajenje tumorskih ćelijskih linija korišćen je medijum RPMI-1640 (Gibco), koji je sadržao 2mM glutamina, 20mM HEPES-a, 10mM natrijum piruvata, fetalni teleći serum (5% za B16 i C6; 10% za HL-60 i MNPK) i 1% miksture antibiotika (penicilin/streptomycin).

Primarni pacovski astrociti dobijani su izolacijom iz mozгова novorođenih pacova starosti 3-5 dana (Trajković i sar., 1997). Nakon dekapitacije, uklanjanja kalvarije i preparacije mozga, sa mozga se uklanjaju ovojnice, veliki krvni sudovi i mali mozak. Tkivo mozga se zatim mehanički usitnjava u medijumu, a zatim centrifugira na 1600 obrtaja tokom 5 minuta. Nakon centrifugiranja sakuplja se talog astrocita, koji se još jednom pere u medijumu centrifugiranjem tokom 5 minuta na 1600 obrtaja. Ovako izdvojeni astrociti u vidu taloga su zasejavani u flaskove prethodno presvučene poli-L-lizinom. Nakon prvih 24h inkubacije, flaskovi se peru i medijum se menja svežim. Nakon 7 dana od uspostavljanja kulture, flaskovi se stavljaju na orbitalnu mešalicu (10 ciklusa u minutu) u inkubator tokom 24 sata. Mešanje na orbitalnoj mešalici ima za cilj da ukloni slabije adherentne ćelije (endotelne ćelije, oligodendociti, fibroblasti) i omogućava da se dobija čistija kultura astrocita. Čistoća kulture astrocita je potvrđena bojenjem na glijalni kiseli fibrilarni protein (glial fibrilar acid protein, GFAP). Kulture se koriste za dalji eksperimentalni rad ukoliko se utvrdi da u njima ima preko 95% GFAP pozitivnih ćelija.

MNPK su izolovane iz uzoraka heparinizovane humane krvi uz pomoć gustinskog gradijenta nizom centrifugiranja uz pomoć LymphoPrep™ (Axis Shield, Oslo, Norway).

Za sve eksperimente korišćeni su različito frakcionisani ekstrakti *Sideritis scardica*: etanolni (ekstrakt-1), dietil-etarski (ekstrakt 2), etil-acetatni (ekstrakt-3) i n-butanolni (ekstrakt-4). Za sve ekstrakte je prvo ispitano da li prema

korišćenim ćelijskim linijama i primarnim ćelijama pokazuju citotoksičan efekat, a dalje rasvetljavanje mehanizama citotoksičnosti sprovedeno je samo sa ekstraktima koji su pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost, na odgovarajućim ćelijama. Najviše pažnje posvećeno je ispitivanju citotoksičnog efekta ekstrakata *S. scardica*-e na ćelijskoj liniji glioma pacova. Pored toga, ispitivana je interakcija citotoksičnih ekstrakata i karmustina-agensa koji se koristi u terapiji glioma.

Dodatno su, sa istim ciljem, sprovedeni eksperimenti sa fenolskim komponentama ekstrakata (apigenin, luteolin, apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid, ferula kiselina, hrizoeriol).

Ekstrakti i fenolske komponente rastvarane su u dimetil-sulfoksidu-DMSO. Krajnja koncentracija DMSO u svim eksperimentima nije prelazila 0.1% i nije imala nikakav uticaj na vijabilitet ćelija.

3.3. Ispitivanje citotoksičnog efekta-određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze i kisele fosfataze

Za ispitivanje citotoksičnog efekta, ćelijske linije su zasejavane u ploče sa 96 bunara (15000 C6 i B16 ćelija, 20000 HL-60 ćelija, 25000 MNPK ćelija, 10000 astrocita po bunaru). Nakon zasejavanja, adherentne ćelije su inkubirane tokom 24h, medijum je odlivan a ćelije tretirane dvostruko opadajućim koncentracijama ekstrakata/fenolskih komponenti u finalnoj zapremini od 100 μ l medijuma. Nakon 24h inkubacije iz svakog bunara sakupljano je 50 μ L supernatanta, koji je zamrzavan i korišćen za određivanje aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH). Ostatak supernatanta je odliven, a u adheriranim ćelijama određivana je aktivnost kisele fosfataze (Touhey, 2003).

Test kisele fosfataze: U svaki bunar dodavano je 100 μ L reakcione mešavine koja je sadržala 0.1 M acetatni pufer, pH 5.5, koji je sadržao 10mM para-nitrofenil-fosfata-PNFF i 0.1% Triton-X. Ćelije su potom inkubirane na 37°C tokom 90 minuta. Nakon inkubacije, reakcija se prekida dodavanjem 50 μ L

NaOH po bunaru. Kisela fosfataza prisutna u živim ćelijama u kiseloj sredini iz PNFF oslobađa p-nitrofenil anjon, koji je u baznoj sredini (nastaloj nakon dodavanja NaOH) žute boje. Intezitet nastale žute boje proporcionalan je broju živih, vijabilnih ćelija. Apsorbanca žute boje koja se razvila nakon dodavanja NaOH očitavana je na čitaču za mikrotitar ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) na talasnoj dužini od 405 nm. Dobijene vrednosti apsorbanci tretiranih ćelija se izražavaju kao % od kontrole (netretirane ćelije) čija se apsorbanca arbitrarno predstavlja kao 100%.

Za ćelije u suspenziji korišćen je delimično modifikovan metod za određivanje aktivnosti kisele fosfataze. Nakon 24h inkubacije, direktno u ćelijsku suspenziju dodavano je 50 µL reakcione mešavine (0,3 M acetatni pufer, pH 5,5 koji je sadržao 30mM para-nitrofenil-fosfata-PNFF i 0,3% Triton-X). Nakon 60 minuta inkubacije na 37°C, po bunaru je dodavano po 50 µL 0,3 M NaOH, a zatim je očitavana apsorbanca nastale žute boje i vršeno izračunavanje kako je ranije opisano.

Određivanje aktivnosti LDH: LDH je unutarćelijski enzim koji se otpušta iz ćelije nakon narušavanja integriteta ćelijske membrane iz ćelija podleglih nekrozi, odnosno, ćelija koje su podlegle sekundarnoj nekrozi (Badovinac i sar., 2000).

Određivanje aktivnosti LDH vršeno je u mikrotitar pločama sa 96 bunara korišćenjem supernatanata sakupljenih tokom tretmana ćelija za potrebe ispitivanja ćelijskog vijabiliteta za adherentne ćelije. Supernatant ćelija u suspenziji dobijene je prethodnim centrifugiranjem mikrotitar ploča tokom 5 minuta na 1800 obrtaja/min. U 50 µL supernatanta dodavano je 50 µL reakcione mešavine (54 mM L(+) laktat, 0,66 mM p-jodo-nitro-tetrazolijum hlorid, 0,28 mM fenzin-metosulfat i 1,3 mM NAD+koji su rastvoreni u 0,2 M Tris-puferu, pH 8,2) i posle inkubacije u trajanju od 10 minuta, očitavana je apsorbanca nastale ružičaste boje na 570 nm. Kao pozitivna kontrola korišćen je 3% rastvor Tritona-X (100% nekroze- najintenzivnija ružičasta boja). Procenat citotoksičnosti je izračunavan po sledećoj formuli

$$\% \text{ citotoksičnosti} = [(E-N)/(T-N)] \times 100,$$

gde je E-apsorbanca tretiranih ćelija, N-apsorbanca netretiranih ćelija (negativna kontrola), T-apsorbanca ćelija tretiranih Tritonom-X (potpuno nekrotične ćelije).

3.4. Ozračivanje ćelija ultraljubičastim (UV) zracima

Oštećenje DNK tumorskih, ali i normalnih ćelija je česta posledica različitih različitih postupaka za lečenje tumora. U ovom eksperimentalnom modelu je kao model oštećenja DNK korišćeno UV zračenje transiluminatora. Istovremeno su ozračivane netretirane ćelije, kao i ćelije koje su prethodno tretirane sa ekstraktima i odabranim fenolskim komponentama (30 min pre izlaganja UV zracima). Nakon ozračivanja ćelija zasejanih u ploče sa 96 bunara, ćelije su inkubirane tokom naredna 24h i određivan je njihov vijabilitet testom kisele fosfataze. Dužina definitivno primenjene ekspozicije određivana je empirijski iz više eksperimenata. Naime, ćelije su izlagane UV zracima tokom različitih vremenskih interval (od 30 sekundi do 5 minuta) da bi im nakon 24h bio određen vijabilitet. Za dalje eksperimente korišćena je dužina ekspozicije, koja je smanjila vijabilitet ozračenih, netretiranih (kontrolnih) ćelija na približno 50%. Za C6 ćelije vreme izlaganja UV zracima je iznosilo 2 minuta a za primarne astrocite pacova 3 minuta.

3.5. Kombinovana citotoksičnost

Da bi se ispitalo kombinovano (sinergističko, antagonističko ili aditivno) citotoksično dejstvo ekstrakata i hemioterapijskih agenasa (karmustin) ćelije su zasejane u ploče sa 96 bunara i istovremeno su tretirane karmustinom i odgovarajućim ekstraktom/fenolskom komponentom, a zatim je određen vijabilitet testom kisele fosfataze kako je već ranije opisano. Za potrebe eksperimenata uvek je korišćen karmustin u koncentraciji IC_{50} (dobijena na isti

način, kako je već opisano za ekstrakte odnosno fenolske komponente) i različite koncentracije ekstrakata odnosno fenolskih komponenti.

3.6. Protočna citometrija

Metodom protočne citometrije određivano je više parametara: tip ćelijske smrti (apoptoza/nekroza), kvantifikacija ćelija u određenoj fazi ćelijskog ciklusa, aktivacija kaspaza, merenje potencijala mitohondrijalne membrane, produkcija slobodnih kiseoničnih radikala i određivanje prisustva kiselih citoplazmatskih vezikula.

3.6.1. Osnovni principi protočne citometrije

Protočna citometrija omogućava precizno ispitivanje izolovanih pojedinačnih ćelija koje se nalaze u tečnom medijumu. Ćelije se uređuju jedna za drugom, razdvojene najmanje 1mm, i kreću velikom brzinom (više od 30 km/h) ispred izvora svetlosti, najčešće lasera. Laser ih osvetljava svetlošću odgovarajuće talasne dužine, što dovodi do fenomena fluorescencije i emitovanja svetlosti od strane osvetljene ćelije. Ova emitovana svetlost, se detektuje bilo u ravni lasera (prednje rasipanje- engl. forward scatter- FSC) ili pod uglom od 90° (bočno rasipanje- engl. side scatter- SSC) i daje informaciju o veličini i granuliranosti (ili strukturi) svake od ispitivanih ćelija.

Izvor svetlosti omogućava ekscitaciju fluorescentnih molekula koji se nalaze na ćeliji, bilo kao molekuli već prirodno prisutni na ćeliji (autofluorescencija) ili kao fluorohromi kojima su dodatno obeležene ćelijske strukture ili antitela na ćelijski antigen od interesa što se postiže adekvatnom pripremom uzorka. Glavni cilj pripreme uzorka koji obično predstavlja inkubaciju ćelija pod odgovarajućim okolnostima, sa fluorescentnom bojom ili fluorescentno konjugovanim antitelom ili ligandom, je da se stvori ćelijska suspenzija

pojedinačnih ćelija, koje su obojene odgovarajućim bojama i koje će proći kroz sistem protočnog citometra bez remećenja ravnomernog protoka tečnosti. Na ovaj način mogu da se analiziraju cele ćelije, ćelijske organele ili druge ćelijske komponente (na primer nukleinske kiseline). To znači da analizi ćelija na protočnom citometru predhodi korak obeležavanja ćelija molekulima koji su specifični bilo prema nekoj strukturi ili funkciji ćelije, a koji fluoresceriraju pošto se osvetle svetlošću lasera odgovarajuće talasne dužine. Signali difuzije i fluorescence (fotona) odlaze do detektora koji vrši merenje signala, kvalitativno i kvantitativno, i transformiše ga u električni signal. Na ovaj način je svaka ćelija transformisana u jedan "električni događaj" sa više koordinata (veličina, granuliranost, fluorescenca 1, fluorescenca 2). Time za svaku ćeliju postoji više parametara koji odgovaraju različitim svetlosnim signalima koji se registruju simultano: u vidu rasipanja svetlosti i fluorescence. Iza detektora se nalaze optički filteri koji osiguravaju specifičnost merenja selekcijom svetlosti koju emituje ćelija osvetljena laserom. Svetlosni signal transformisan u analogni elektronski signal se potom prevodi u numerički signal koji se registruje za svaku pojedinačnu ćeliju. Svaki numerički signal se uvodi u informativni digitalni oblik koji se potom prevodi u histogramski zapis, pri čemu je sada moguće precizirati distribuciju fluorescence i statistički obraditi dati uzorak.

Za potrebe ovog segmenta istraživanja je korišćen FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Analiza svakog pojedinačnog uzorka je podrazumevala analizu 10000 ćelija, a ovako dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro. Za sve eksperimente za koje je korišćena protočna citometrija, ćelije su zasejavane u ploče sa 6 bunara. Adherentne ćelije su zasejavane 24h pre tretmana (300000 ćelija po bunaru), dok su ćelije u suspenziji tretirane istog dana (500000 ćelija po bunaru).

3.6.1.1. Određivanje tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom

Za određivanje tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom ćelije se boje aneksinom V koji je obeležen fluorescentnom bojom-fluorescein izotiocijanatom-FITC (An-V FITC) i propidijum jodidom (*engl. propidium iodide*, PI). Jedan od ranih događaja u apoptozi je preraspodela fosfolipida ćelijske membrane. Fosfatidil serin koji se nalazi na unutrašnjoj strani ćelijske membrane tokom apoptoskog procesa, prelazi u spoljašnji sloj ćelijske membrane. Aneksin-V ima veliki afinitet za vezivanje za fosfatidil serin, tako da ćelije koje eksprimiraju fosfatidil serin bivaju obeležene aneksin-V-FITC-om. Propidijum jodid je fluorescentna boja koja se umeće u molekul nukleinskih kiselina, međutim ne može da prođe kroz neoštećenu ćelijsku membranu, tako da se propidijum jodidom boje samo ćelije sa oštećenim integritetom ćelijske membrane. Dakle, ovim dvostrukim bojenjem sa An/PI moguće je razlikovati sledeće populacije ćelija: dvostruko negativne An⁻/PI⁻ (normalna ćelijska populacija), aneksin pozitivne An⁺/PI⁻ (ćelije u ranoj apoptozi), dvostruko pozitivne An⁺/PI⁺ (ćelije u kasnoj apoptozi) i propidijum jodid pozitivne An⁻/PI⁺ (nekrotične ćelije).

Nakon tretmana sa IC₅₀ koncentracijama ekstrakata za koje je u prethodnim eksperimentima pokazano da prema odgovarajućim ćelijskim linijama ispoljavaju citotoksičan efekat, ćelije su tripsinizirane, oprane u puferovanom fiziološkom rastvoru, a zatim su resuspendovane u aneksin vezujućem puferu u koji je prethodno dodata odgovarajuća količina An-V-FITC i PI, prema uputstvu proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA). Nakon 30 minuta inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, ćelije su analizirane na protočnom citometru, na FL-1 (zelena fluorescence, FITC-a) i FL-2 kanalu (narandžasta fluorescence, PI). Rezultati su izraženi u procentima u odnosu na celokupnu analiziranu populaciju ćelija.

3.6.1.2. Merenje aktivacije kaspaza

Kaspaze su serin proteaze, koje učestvuju u inicijaciji (kaspaze 8 i 9) i izvršavanju procesa apoptoze (npr. kaspaza 3). Za detektovanje aktivacije kaspaza, korišćen je fluorescentno obeleženi pankaspazni inhibitor (R&D systems, Minneapolis, USA). Pankaspazni inhibitor koji je konjugovan sa FITC-om, prolazi kroz ćelijsku membranu i ireverzibilno se vezuje za aktivirane kaspaze čime se on aktivira i emituje zelenu fluorescenciju čiji se intenzitet očitava na FL-1 kanalu. Višak nevezanog reagensa se uklanja ispiranjem ćelija. Ukratko, ćelije se nakon tretmana tripsiniziraju, peru u puferovanom fiziološkom rastvoru i inkubiraju sa odgovarajućom koncentracijom pankaspaznog inhibitora (prema uputstvu proizvođača) tokom 15 minuta na 37°C. Nakon toga se centrifugiraju (brzina), peru i na kraju se resuspenduju u puferovanom fiziološkom rastvoru. Ukoliko u uzorku postoji povećana aktivnost kaspaza u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije), intenzitet zelene fluorescencije pankaspaznog inhibitora se povećava.

3.6.1.3. Detektovanje kiselih citoplazmatskih vezikula

Kisele citoplazmatske vezikule jedan su od markera procesa autofagije, ali nisu specifične za njega. Detekcija kiselih citoplazmatskih vezikula vrši se uz pomoć fluorohroma akridin oranža, koji predstavlja pH senzitivnu boju. U prisustvu kiselog sadržaja akridin oranž emituje crveno/narandžastu fluorescenciju, dok jedra ćelija pokazuju zelenu fluorescenciju (neutralno pH). Na protočnom citometru prati se promena odnosa FL-3/FL-1 (crvena/zelena) fluorescencije, koja je proporcionalna porastu broja vezikula sa kiselim sadržajem. Protočni citometar se baždari tako da odnos FL-3/FL-1 u kontroli (netretirane ćelije) bude jednak jedinici da bi se analiza ovog odnosa u uzorcima vršila u odnosu na kontrolu. Eksperimentalni postupak se sastoji u petnaestominutnoj inkubaciji ćelija na 37°C sa bojom rastvorenom u

medijumu (1:100), nakon čega se ćelije dva puta peru u puferovanom fiziološkom rastvoru i onda vrši očitavanje. Povećanje broja vezikula sa kiselim sadržajem u uzorku se registruje kao povećanje odnosa FL3/FL1.

3.6.1.4. Merenje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala

Za merenje produkcije slobodnih radikala, korišćen je redoks senzitivni fluorohrom dihidro-rodamin (DHR). DHR (nefluorescentan molekul) slobodno prolazi kroz ćelijsku membranu i u prisustvu slobodnih radikala dolazi do njegove oksidacije u rodamin, koji emituje zelenu fluorescenciju, koja se može kvantifikovati na FL-1 kanalu. Eksperimentalni postupak podrazumeva da se ćelije tokom trajanja tretmana istovremeno inkubiraju sa DHR (finalna koncentracija 5 μ M). Nakon isteka inkubacije ćelije se standardno tripsiniziraju, peru u puferovanom fiziološkom rastvoru i očitavanje se vrši na protočnom citometru na FL-1 kanalu. Povećanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala je proporcionalno promeni intenziteta zelene fluorescence koju emituje rodamin.

3.6.1.5. Analiza ćelijskog ciklusa

Za analizu odnosa ćelija koje se nalaze u određenoj fazi ćelijskog ciklusa korišćeno je bojenje sa PI. PI se interkalira u molekul nukleinskih kiselina, a na osnovu intenziteta fluorescencije može se proceniti količina DNK u analiziranim ćelijama. Ćelije u G_0G_1 su diploidne ($2n$), ćelije sa hipodiploidnim sadržajem DNK (fragmentisana DNK) odgovaraju ćelijama koje se nalaze u procesu apoptoze ($<2n$), ćelije u S fazi imaju veći sadržaj DNK od diploidnog između $2n$ i $4n$, dok ćelije u G_2M fazi imaju dvostruko veći sadržaj DNK od diploidnog ($4n$).

Sam eksperimentalni postupak sproveden je po ranije objavljenoj metodi (Mijatović i sar., 2005.). Ukratko, nakon tretmana ćelije se tripsiniziraju, peru, a zatim fiksiraju u 70% etanolu. Nakon najmanje 24h fiksacije, ćelije se peru, a zatim permeabilizuju Triton-X-om i izlažu se RNA-zi, kako bi se razgradila sva RNK prisutna u ćelijama, koja takođe može da interaguje sa PI. Nakon toga ćelijama inkubacionoj mešavini se dodaje PI (1mg/ml), inkubira 15 minuta i zatim analizira na protočnom citometru.

3.7. Određivanje ekspresije proteina uključenih u proces autofagije

Nakon inkubacije sa ekstraktima, odnosno fenolskim komponentama, koje su u prethodnoj analizi na protočnom citometru pokazale da dovode do povećanja broja vezikula sa kiselim sadržajem, ćelije su oprane hladnim PBS-om i skrejperima skidane sa Petri šolja. Odmah nakon skidanja ćelije se prebacuju u pufer za liziranje (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF i 10 µl proteaza inhibitornog koktela) (Sigma- Aldrich) i inkubiraju na ledu tokom 30 minuta. Nakon toga se centrifugitaju na 14000 g na temperaturi od +4°C, tokom 15 minuta. Talog se odbacuje, a supernatanti se dalje analiziraju. U supernatantima se zatim meri koncentracija proteina metodom po Bradfordu. Proteini reaguju sa bojom Coomassie Brilliant blue i grade plavo obojeni kompleks, a intenzitet obojenosti kompleksa direktno je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Svaki uzorak analiziran je u triplikatu, a apsorbance su očitavane u mikrotitar pločama na 570 nm na aparatu Tecan, Sunrise (Dorset, UK). Koncentracije proteina u uzorcima se očitavaju korišćenjem standardne krive, koja se konstruiše nakon merenja apsorbance serije standardnih rastvora odgovarajućih različitih koncentracija goveđeg serumskog albumina (0, 5, 10, 15 i 20 mg/mL). Uzorci se nakon izračunavanja koncentracije proteina po potrebi razblažuju i do dalje analize čuvaju na temperaturi od -80°C. Za dalju analizu proteini se razdvajaju uz pomoć poli-akril amid elektrofereze na gelu. Razdvojeni proteini se

polusuvim sistemom za prenos prenose na nitroceluluznu membranu (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Membrana se tokom noći inkubira sa primarnim antitelom na +4 °C. Nakon ispiranja u odgovarajućim puferima (TBS-T u sastavu 50mM Trisa, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6), inkubira se tokom 2h sa sekundarnim antitelom, obeleženim peroksidazom (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Nitrocelulozne membrane se zatim uranjaju u ECL rastvor (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) koji služi kao supstrat za peroksidazu, a gde kao proizvod reakcije nastaje jedinjenje koje emituje fotone (efekat luminiscence). Potom se rendgenski film (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) izlaže tako pripremljenim membranama. Na mestima gde su se antitela vezala za protein, javiće se svetlina na rendgenskom filmu, čiji je intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji odgovarajućeg proteina u uzorku. Nakon razvijanja filmovi se skeniraju i vrši se denzitometrija, koristeći se odgovarajućim softverom (ImageJ, NIH, Bethesda, USA). Fosfo forme proteina kvantifikovane su u odnosu na ukupni sadržaj odgovarajućeg proteina, dok su LC3 i p62 kvantifikovani u odnosu na aktin kao konstitutivno eksprimirani protein.

Za identifikaciju i kvantifikaciju proteina korišćena su primarna antitela usmerena na sledeće proteine: LC₃ (*engl. light chain 3*), fosfo-AMPK (treonin 172), AMPK, fosfo-Akt (serin 473), fosfo-mTOR (serin 2448), mTOR, aktin (sva nabavljena od Cell Signalin Technology, Beverly, MA) i p62 (Biolegend, San Diego, CA)

3.8. Statistička obrada

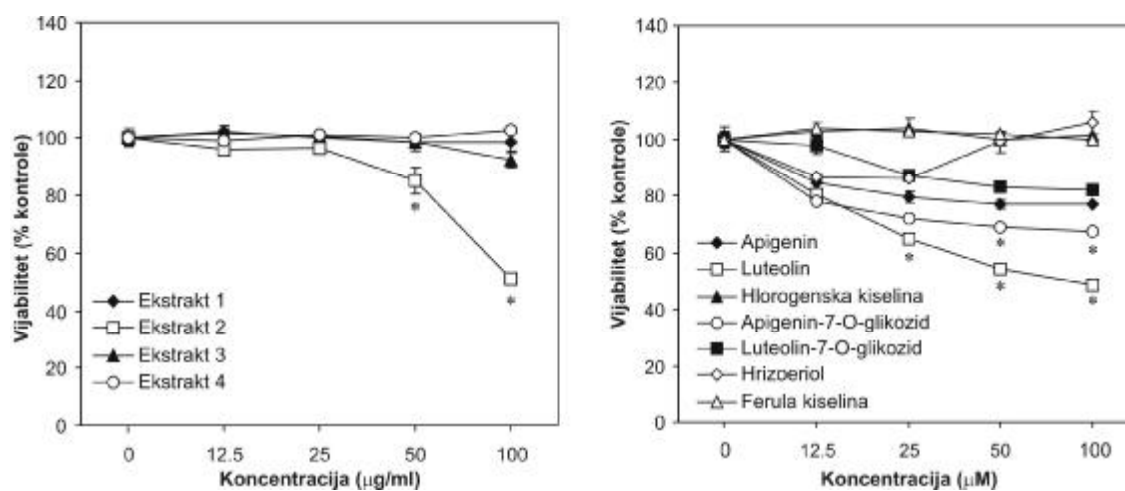
Za predstavljanje rezultata korišćene su metode deskriptivne statistike. Za analizu značajnosti razlike korišćena je jednofaktorska analiza varijanse, praćena Student-Newman-Keuls testom. Za neparametarske podatke korišćen

je Wilcoxon-ov test sume rangova pracen Mann-Whitney testom. Verovatnoća nulte hipoteze manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

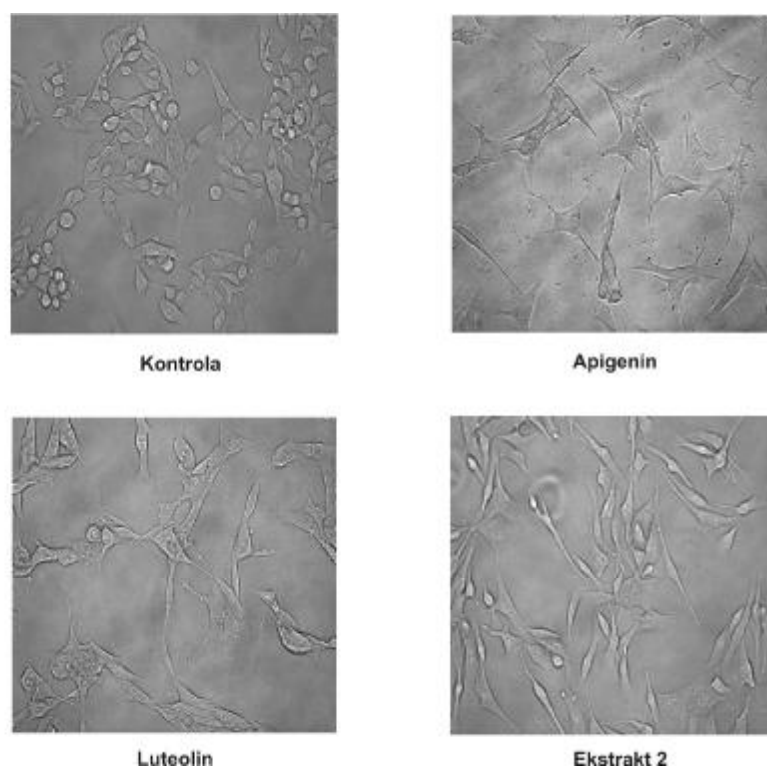
4.1. Uticaj *S. scardica* ekstrakata na vijabilitet primarnih astrocita, MNPK i tumorskih ćelijskih linija

Nakon 24h inkubacije sa dvostruko opadajućim koncentracijama ekstrakata *S. Scardica* (0-100 $\mu\text{g/ml}$), samo je dietil-etarski ekstrakt (ekstrakt 2) pokazao dozno zavisnu citotoksičnost na B16 ćelijama mišjeg melanoma, smanjujući im vijabilitet na 51,3% u odnosu na netretirane ćelije primenjen u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$. Ostali ispitivani ekstrakti nisu ispoljili citotoksični efekat na B16 ćelijama. Analizom citotoksičnosti odabranih fenolskih komponenti pokazano je da je njihov stepen citotoksičnosti prema B16 ćelijama bio luteolin < apigenin-7-O-glikozid < apigenin < luteolin-7-O-glikozid, koji su smanjili vijabilitet B16 ćelija na 48,8%, 67,3%, 77,2% i 82% u odnosu na kontrolu, primenjeni u koncentraciji od 100 μM (Slika 4).



Slika 4. Uticaj ekstrakata *S. scardica*-e (levo) i odabranih fenolskih komponenti (desno) na vijabilitet B16 ćelija mišjeg melanoma nakon 24h inkubacije. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost vijabiliteta u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

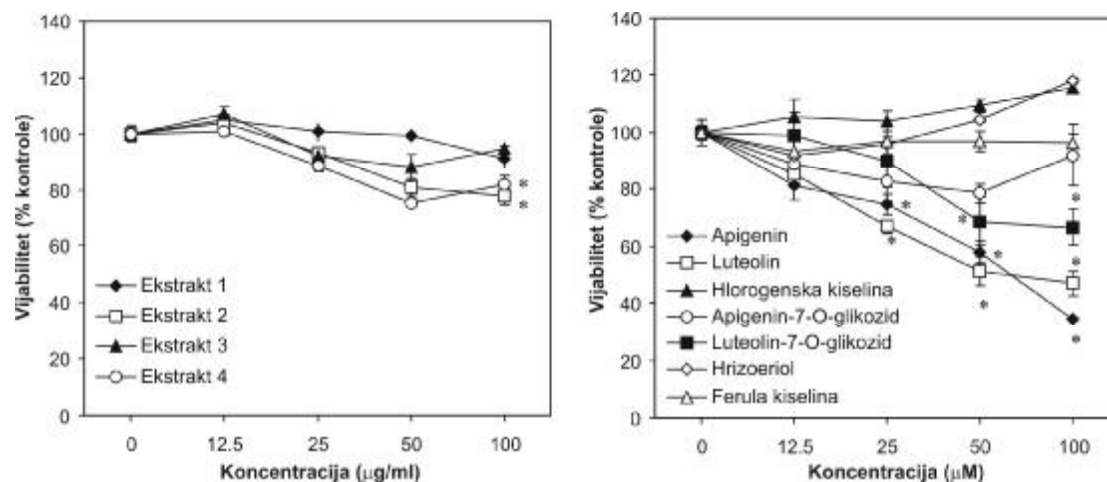
Uticaj ekstrakta i fenolskih komponenti na vijabilitet B16 ćelija, takođe je praćen fazno-kontrastnom mikroskopijom (Slika 5). Analizirane su samo ćelije tretirane ekstraktima i flavonoidnim komponentama koje su, u prethodnim eksperimentima, pokazale značajan citotoksični efekat. Netretirane ćelije pokazuju tipičan poligonalan oblik i formiraju konfluentne kulture. Ćelije tretirane ekstraktom 2 su znatno ređe i poprimaju izdužen oblik. Apigenin ne dovodi do značajnog smanjenja gustine ćelija u kulturi, ali menja njihovu morfologiju. Ćelije tretirane luteolinom, znatno su ređe, uočavaju se brojne zaokrugljene ćelije, a na velikom uveličanju, jasno se uočava piknoza jedra kod većine ćelija (podatak nije prikazan).



Slika 5. Fazno-kontrastna mikroskopija B16 ćelija (uveličanje 200X). Kontrolu čine netretirane ćelije. Za tretmane je korišćen ekstrakt 2 (100 µg/ml) i apigenin i luteolin (100 µM)

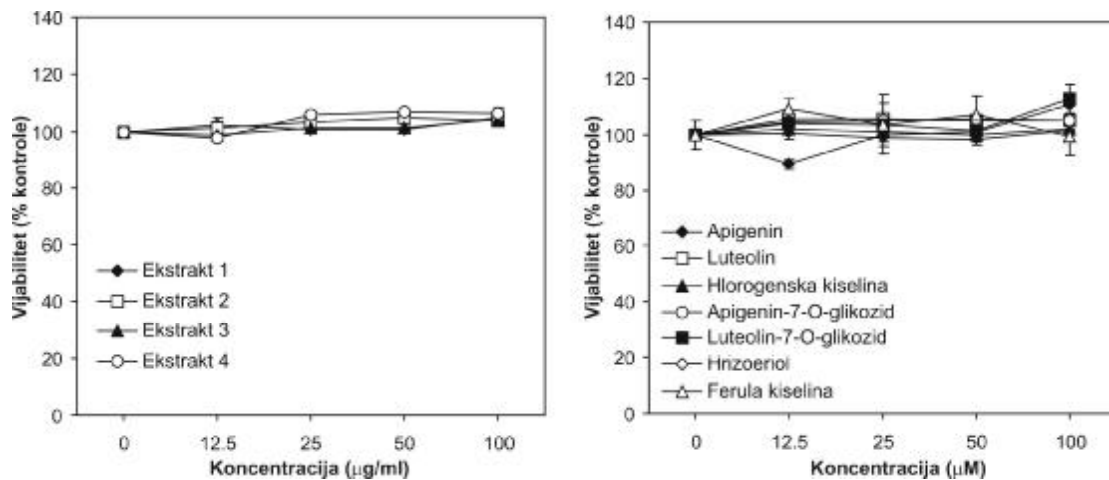
Ekstrakt 2 i 3 su bili značajno citotoksični za HL-60 ćelije, smanjujući im vijabilitet na 77,5% i 81,9% u odnosu na kontrolu, primenjeni u koncentraciji od 100 µg/mL. Od fenolskih komponenti najtoksičniji je bio apigenin koji je

smanjio vijabilitet HL-60 ćelija na 34,4%, luteolin na 47,1% i njihovi glukozidi, luteolin-7-O-glukozid i apigenin-7-O-glukozid koji su smanjili vijabilitet HL-60 ćelija na 66,6% i 78,4% u odnosu na kontrolu (Slika 6).



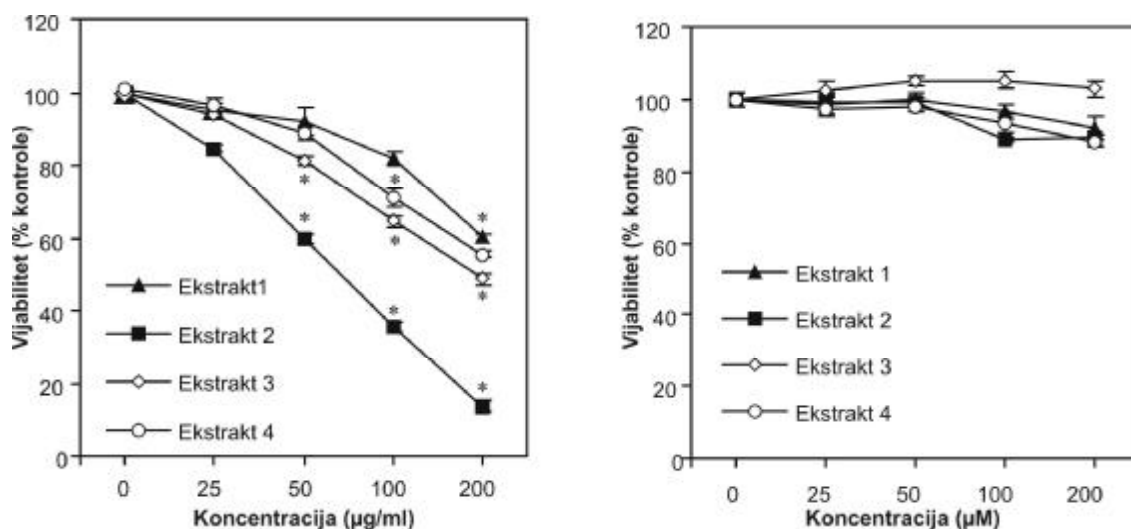
Slika 6. Uticaj ekstrakata *S. scardica*-e (levo) i odabranih fenolskih komponenti (desno) na vijabilitet HL-60 ćelija humane promijelocitne leukemije nakon 24h inkubacije. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost vijabiliteta u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

Ni jedan od ispitivanih ekstrakata, niti fenolskih komponenti ekstrakata nije bio citotoksičan za humane mononuklearne ćelije iz periferne krvi (Slika 7).



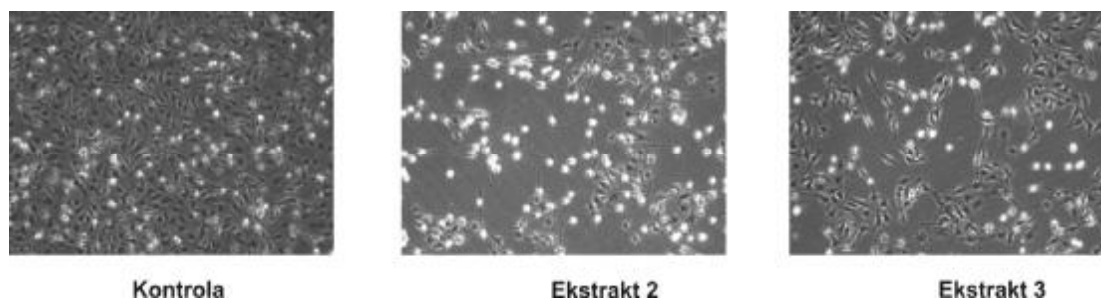
Slika 7. Uticaj ekstrakata *S. scardica*-e (levo) i odabranih fenolskih komponenti (desno) na vijabilitet humanih mononuklearnih ćelija iz periferne krvi nakon 24h inkubacije. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost vijabiliteta u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

Ekstrakti 2 i 3 su pokazali najizraženiju citotoksičnost prema C6 ćelijama pacovskog glioma, sa IC_{50} vrednostima od 81,6 µg/mL i 109,4 µg/mL (slika 8). Kad su bili primenjeni u maksimalnoj koncentraciji od 200 µg/mL, ukupni ekstrakt (ekstrakt 1) i *n*-butanolni ekstrakt (ekstrakt 4) su smanjili vijabilitet C6 ćelija do 61,2 % odnosno 57,3 %. Ni jedan od ispitivanih ekstrakata nije bio toksičan za primarne astrocite pacova u kulturi. Rezultati su prikazani na slici 8.



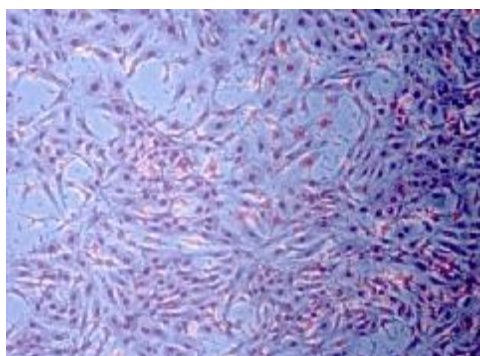
Slika 8. Uticaj ekstrakata *S. scardica*-e na vijabilitet C6 gliomskih ćelija (levo) i normalnih pacovskih astrocita u primarnoj kulutri (desno). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost vijabiliteta u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

Fazno-kontrastna mikroskopija C6 ćelija, takođe je potvrdila rezultate dobijene testovim vijabiliteta (Slika 9). Ćelije u kontroli su tipičnog poligonalnog oblika i grade konfluentne kulture, sa veoma malim brojem okruglih svetlih ćelija. Ćelije tretirane ekstraktom 2 koji je prema C6 ćelijama ispoljio najveću citotoksičnost su bile znatno manje gustine, izmenjene morfologije, kontrahovanih ćelijskih tela, a veliki broj ćelija je pokazao morfološke znake ćelijske smrti (okrugle svetle ćelije). Ćelije tretirane ekstraktom 3 su upadljivo manjeg proliferativnog potencijala u odnosu na kontrolu, poprimaju izdužen oblik i izvestan broj ćelija pokazuje morfološke osobine apoptoze, međutim u znatno manjoj meri u odnosu na tretman sa ekstraktom 2, ukazujući da je pad vijabiliteta prevashodno posledica zastoja u proliferaciji, a u znatno manjoj posledica ćelijske smrti.

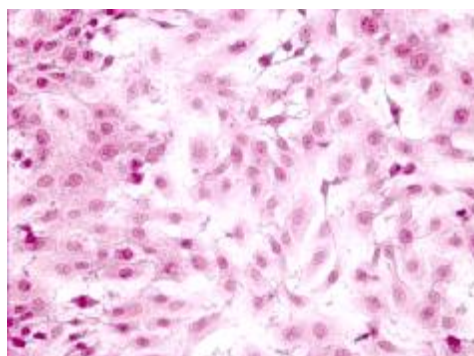


Slika 9. Fazno-kontrastna mikroskopija C6 ćelija. Kontrolu čine netretirane ćelije. Za tretmane su korišćeni ekstrakt 2 i 3 u koncentraciji 100 µg/ml.

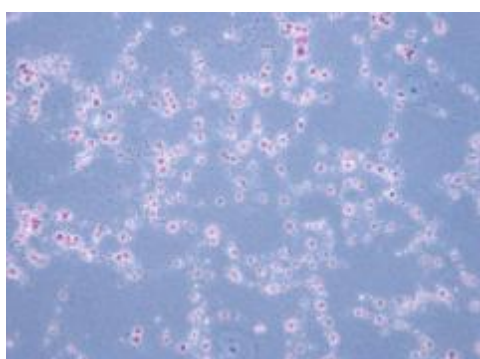
U cilju detaljnije analize morfoloških promena nakon tretmana ekstraktima 2 i 3, ćelije su obojene Fuchsinom i posmatrane pod svetlosnim mikroskopom na malom i velikom uveličanju (Slika 10). Na malom uveličanju jasno se zapaža da veliki broj ćelija tretiranih ekstraktom 2 pokazuje morfološke osobine ćelijske smrti. Na velikom uveličanju opažaju se piknotična jedra, kontrahovana ćelijska tela i končasti produžeci između ćelija. Ćelije tretirane ekstraktom 3 su nešto gušće u odnosu na ćelije tretirane ekstraktom 2, imaju velika ćelijska tela i u njima se jasno opažaju brojne vakuole.



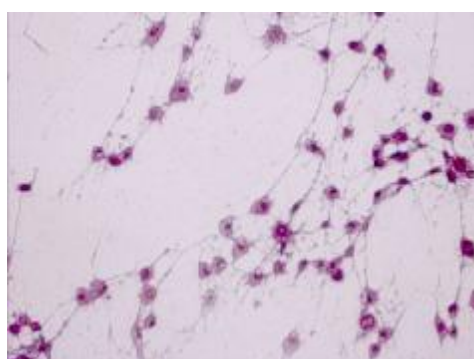
Kontrola (200x)



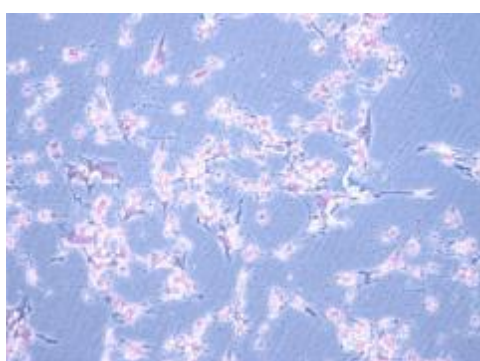
Kontrola (400x)



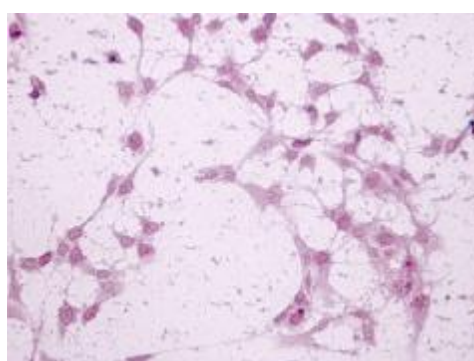
Ekstrakt 2 (200x)



Ekstrakt 2 (400x)



Ekstrakt 3 (200x)

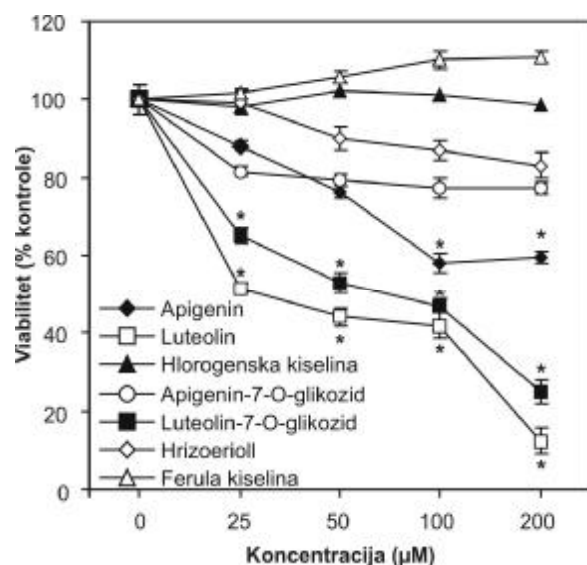


Ekstrakt 3 (400x)

Slika 10. Svetlosna mikroskopija ćelija tretiranih ekstraktima 2 i 3 u koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$. Na levoj strani slici prikazane su ćelije fotografisane na malom uveličanju, dok su na desnoj iste ćelije fotografisane na velikom uveličanju. Kontrolu predstavljaju netretirane ćelije.

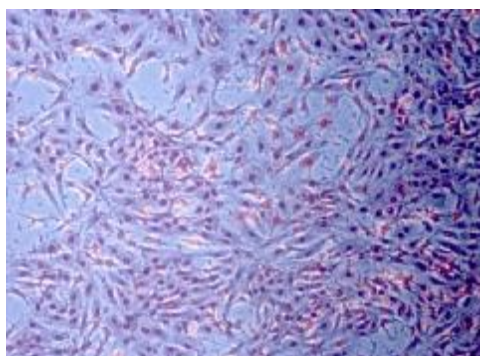
Imajući u vidu da ekstrakti *S. Scardica* nisu bili toksični za astrocite, u narednim eksperimentima smo ispitivali toksičnost fenolskih komponenti samo na C6 ćelije glioma. Najtoksičniji je bio luteolin, sa IC_{50} vrednošću od 30,2 μM i luteolin-7-O-glukozid sa IC_{50} vrednošću od 75 μM . Apigenin je

takođe pokazao značajnu dozno zavisnu citotoksičnost koja se gubi pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (postize se plato) ali bez postizanja IC₅₀ vrednosti dok apigenin-7-O-glukozid nije ispoljio značajnu citotoksičnost prema C6 ćelijama glioma. Rezultati su prikazani na slici 11.

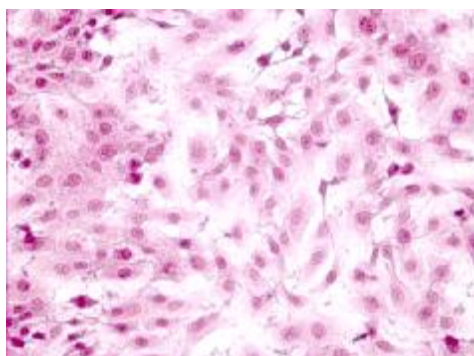


Slika 11. Uticaj fenolskih komponenti na vijabilitet C6 ćelija. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost vijabiliteta u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

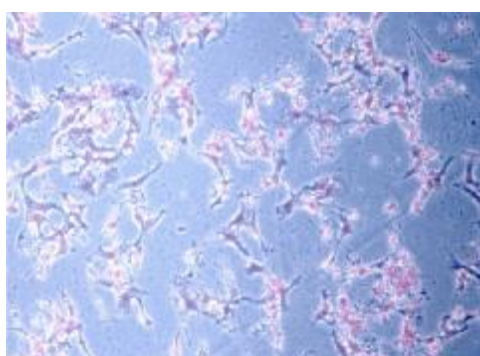
C6 ćelije tretirane apigeninom i luteolinom su takođe posmatrane pod svetlosnim mikroskopom, nakon bojenja Fuchsinom. Zanimljivo je da ćelije tretirane i apigeninom i luteolinom pokazuju relativno slične promene u morfologiji. Kao i kod ćelija tretiranih ekstraktom 3, u citoplazmi ćelija tretiranih apigeninom i luteolinom opažaju se brojne vakuole (Slika 12).



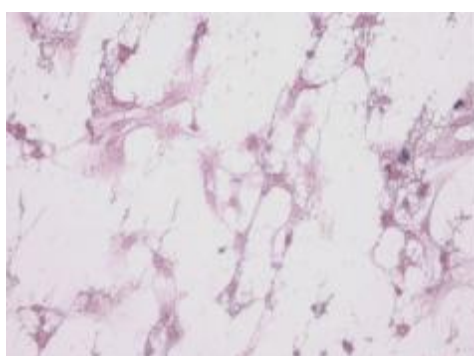
Kontrola (200x)



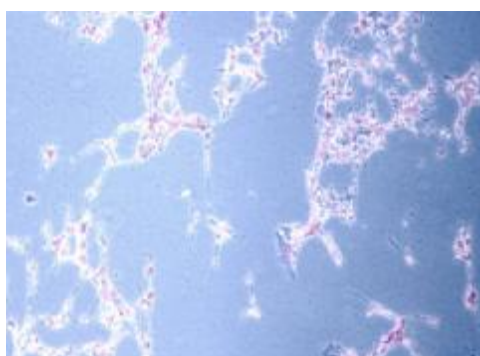
Kontrola (400x)



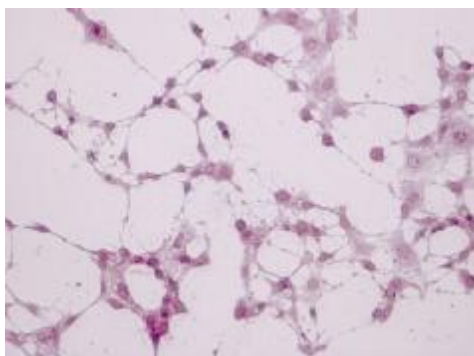
Apigenin (200x)



Apigenin (400x)



Luteolin (200x)



Luteolin (400x)

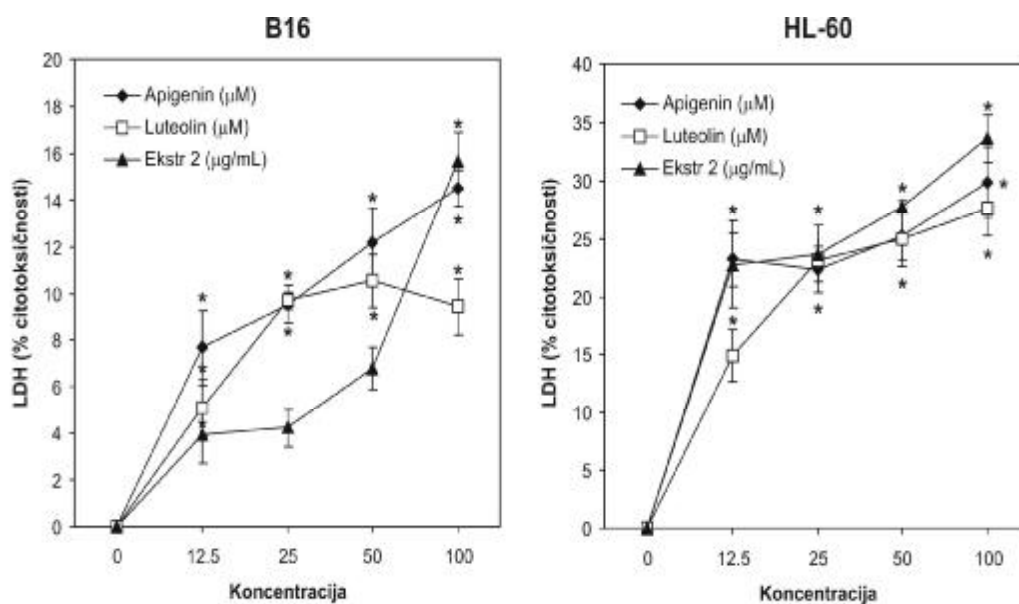
Slika 12. Svetlosna mikroskopija ćelija tretiranih apigeninom i luteolinom u koncentraciji 100 μ M. Na levoj strani slici prikazane su ćelije fotografisane na uveličanju 200x, dok su na desnoj iste ćelije fotografisane na uveličanju 400x. Kontrolu predstavljaju netretirane ćelije.

4.1.1. Ispitivanje vijabiliteta ćelija primenom LDH testa

Ćelije otpuštaju LDH nakon gubitka integriteta ćelijske membrane, koji je najčešće posledica nekrotične smrti ćelije, ili pak posledica sekundarne

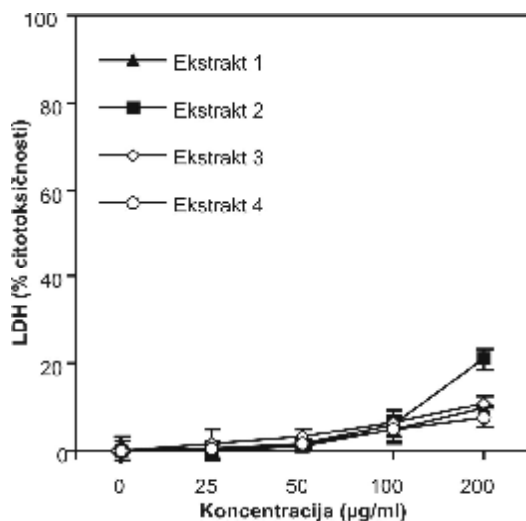
nekroze ćelija koje su umrle na neki drugi način npr. apoptozom. Merenje aktivnosti LDH u supernatantu ćelija koje su tretirane ekstraktima i fenolskim komponentama vršeno je nakon 24h inkubacije.

U kulturi B16 ćelija tretiranih apigeninom, u koncentraciji od 100 μM bilo je 14,3 % nekrotičnih ćelija, dok je u tretmanu ekstraktom 2 u koncentraciji od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bilo 15,2 % nekrotičnih ćelija. HL-60 ćelije su bile znatno osjetljivije na nekrozu, tako da je u tretmanu ekstraktom 2 koncentracije 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bilo čak 33,8 % nekrotičnih ćelija (slika 13).



Slika 13: Vijabilitet B16 i HL-60 ćelija meren LDH testom. Vijabilitet tretiranih ćelija je računat u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane ćelije), čiji je vijabilitet 100% i pozitivnu kontrolu (ćelije tretirane Triton X-om), gde se smatra da su sve ćelije mrtve (maksimalno povećanje aktivnosti LDH). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

Suprotno B16 i HL-60 ćelijama, C6 ćelije tretirane ekstraktima nisu pokazale značajno povećanje LDH aktivnosti u medijumu, što sugerise da je integritet ćelijske membrane ostao očuvan (slika 14).



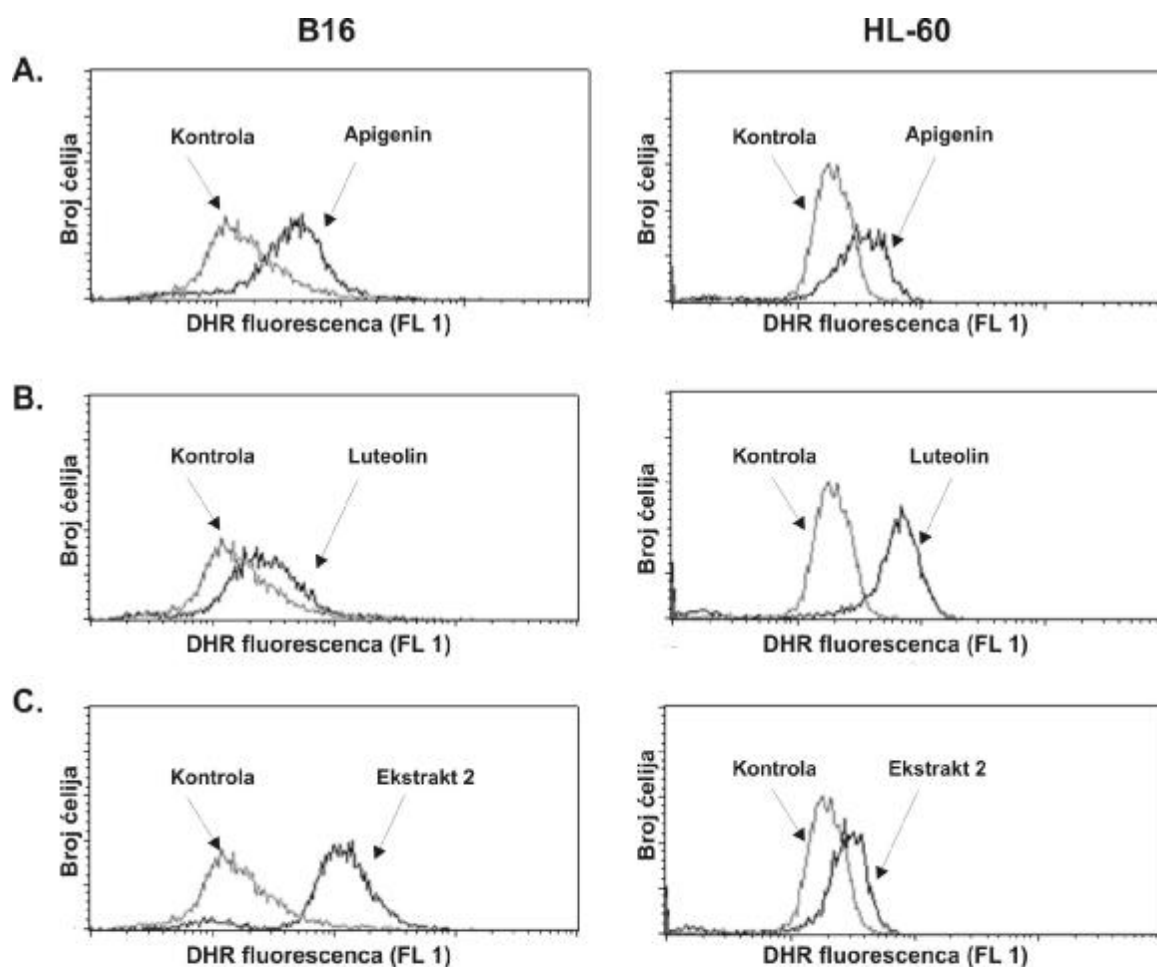
Slika 14. Vijabilitet C6 ćelija meren LDH testom. Vijabilitet tretiranih ćelija je računat u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane ćelije), čiji je vijabilitet 100% i pozitivnu kontrolu (ćelije tretirane Triton X-om), gde se smatra da su sve ćelije mrtve (maksimalno povećanje aktivnosti LDH). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ($X \pm SD$) dobijena iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

4.2. Uticaj *S. scardica* ekstrakata i njihovih odabranih fenolskih komponenti na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala

U cilju bližeg definisanja mehanizma citotoksičnog delovanja ekstrakata i njihovih fenolskih komponenti, ispitivan je uticaj ekstrakata i njihovih fenolskih komponenti na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala u tretiranim ćelijama. Svi testovi su izvedeni nakon 24h inkubacije sa ekstraktima i fenolskim komponentama koje su pokazale citotoksičnu aktivnost prema odgovarajućim ćelijskim linijama.

Ekstrakt 2 je indukovao značajno povećanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala u tretiranim B16 ćelijama, i to tako da je primenjen u koncentraciji od 100 µg/mL povećao produkciju slobodnih kiseoničnih radikala 6 puta u odnosu na kontrolu. Apigenin je doveo do dvostrukog povećanja produkcije slobodnih kiseoničnih radikala u odnosu na kontrolu tek pošto je primenjen u

maksimalnoj (200 μM) dok luteolin nije statistički značajno uticao na produkciju slobodnih radikala. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 15.

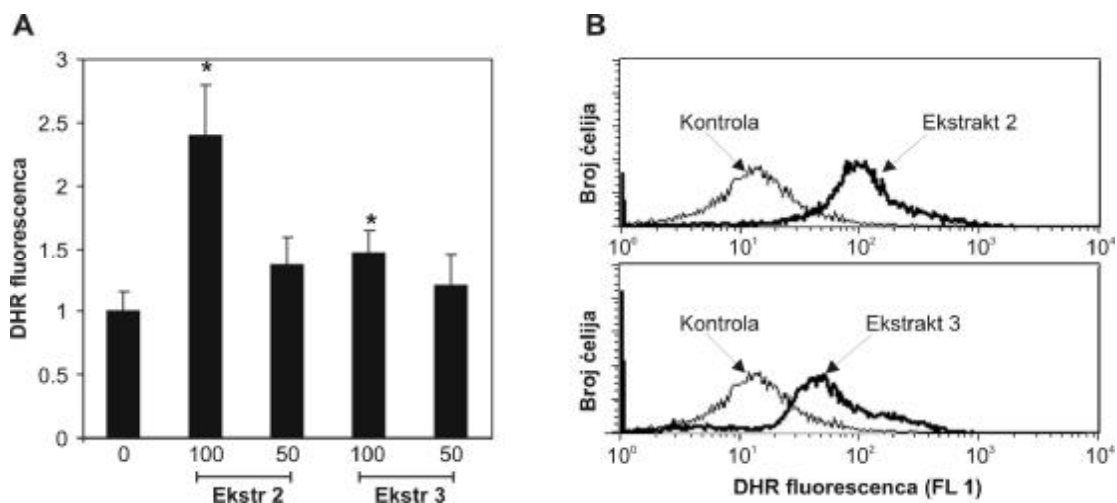


Slika 15. Reprezentativni histogrami DHR fluorescencije (pokazatelj produkcije slobodnih radikala) B16 i HL-60 ćelija tretiranih apigeninom (A), luteolinom (B) i ekstraktom 2 (C) tokom 24h inkubacije.

U HL-60 ćelijama najveću produkciju slobodnih radikala indukovao je luteolin (3 puta povećana produkcija u odnosu na kontrolu, pri koncentraciji luteolina od 100 μM), dok su ekstrakt 2 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i apigenin (100 μM) indukovali oko 1,5 puta veću produkciju slobodnih radikala u odnosu na kontrolu (slika 15).

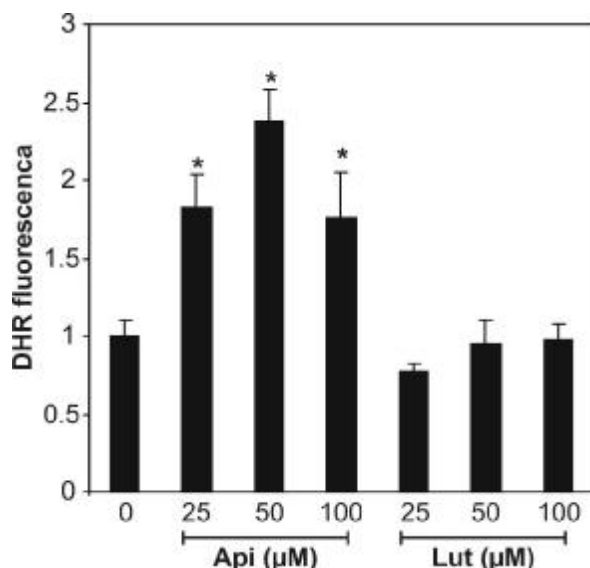
Najveći uticaj na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala u C6 ćelijama glioma je pokazao ekstrakt 2 koji je primenjen u koncentraciji od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indukovao 2,3 puta veću produkciju slobodnih radikala u C6 ćelijama u

odnosu na kontrolu, dok je ekstrakt 3 u istoj koncentraciji indukovao oko 1,5 puta veću produkciju slobodnih radikala (slika 16).



Slika 16. Produkcija slobodnih kiseoničnih radikala u C6 ćelijama nakon tretmana ekstraktima 2 i 3. Kvantitativna produkcija slobodnih kiseoničnih radikala predstavljena je na stubičastom dijagramu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ($X \pm SD$) dobijena iz tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu). (A). Vrednosti produkcije slobodnih radikala u kontroli je unapred postavljena na 1. (B) Reprerzentativni histogrami DHR fluorescencije odgovarajućeg ekstrakta i kontrole

Apigenin nije pokazao dozno zavisnu indukciju produkcije slobodnih kiseoničnih radikala u tretiranim C6 ćelijama. Naime, maksimalna produkcija postignuta je sa koncentracijom 50 μM i bila je oko 2,3 puta veća nego u kontroli, dok je pri većim koncentracijama apigenina zabeležen pad produkcije. Luteolin nije indukovao statistički značajan porast produkcije slobodnih kiseoničnih radikala ni u jednoj od ispitivanih koncentracija (slika 17).



Slika 17. Kvantitativni prikaz produkcije slobodnih radikala u C6 ćelijama tretiranim apigeninom i luteolinom. Produkcija slobodnih radikala u kontroli je unapred postavljena na 1. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ($X \pm SD$) dobijena iz tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

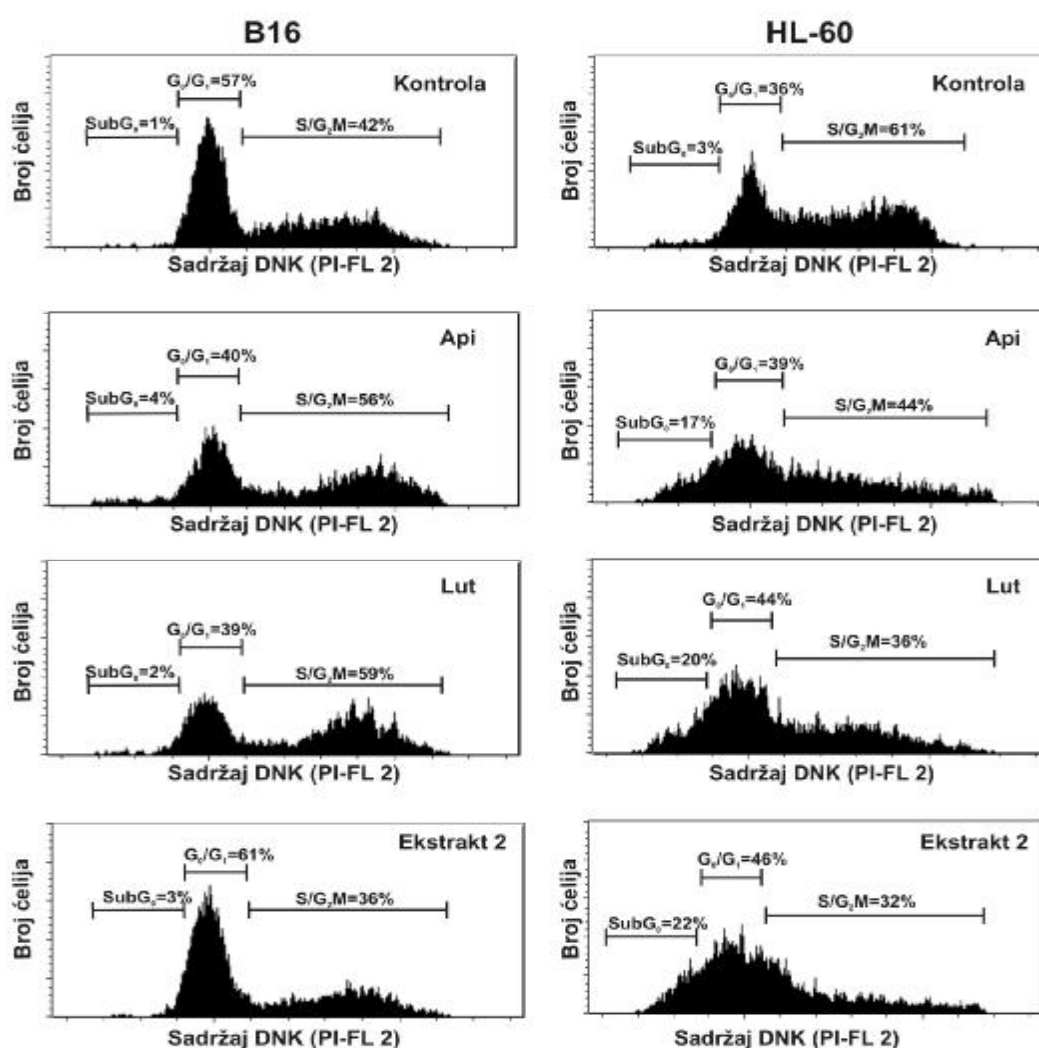
4.3. Uticaj *S. scardica* ekstrakata na progresiju ćelijskog ciklusa

Mnogi antitumorski lekovi dovode do poremećaja u ćelijskom ciklusu i ovo njihovo delovanje može biti veoma značajan dodatni antitumorski mehanizam. Za mnoge flavonoide, kao što je navedeno u uvodu, takođe je opisano da mogu da indukuju zastoj u ćelijskom ciklusu.

Ispitivanje procentualnog sadržaja ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa vršeno je na osnovu kvantifikacije ćelija sa odeđenim sadržajem DNK (hipodiploidni, haploidni, diploidni, dvostrukodiploidni), primenom bojenja propidijum jodidom ćelija koje su prethodno fiksirane u etanolu i dalje analizirane na protočnom citometru.

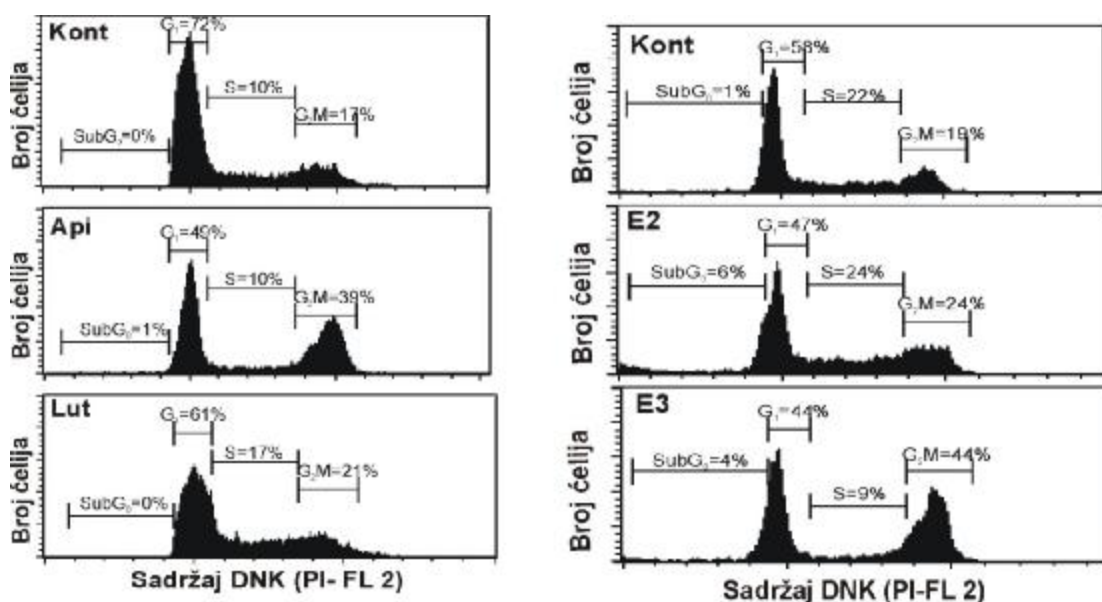
B16 ćelje tretirane ekstraktom 2 u koncentraciji od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ne pokazuju značajne promene u toku ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu dok ćelije tretirane apigeninom i luteolinom pokazuju zastoj u proliferaciji u S/G₂M fazi. U kontrolnoj grupi B16 ćelija bilo je 43 % ćelija u S/G₂M fazi, dok je u grupi tretiranoj apigeninom bilo 56 %, odnosno u grupi tretiranoj luteolinom 59 % ćelija u S/G₂M fazi (oba primenjena u koncentraciji od 100 μM).

Analiza HL-60 ćelija tretiranih ekstraktom 2 u koncentraciji 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pokazuje značajno povećan broj ćelija u subG₀ fazi (22 %), u odnosu na kontrolu, u kojoj je svega 3 % ćelija bilo u subG₀ fazi. Ćelije u subG₀ fazi imaju hipodiploidan sadržaj DNK, odnosno kod njih je došlo do fragmentacije DNK, što ukazuje da se najverovatnije radi o ćelijama koje su ušle u proces apoptoze.



Slika 18. Uticaj apigenina, luteolina i ekstrakta 2 na progresiju ćelijskog ciklusa HL-60 i B-16 ćelija. Ćelije su inkubirane tokom 24h apigeninom i luteolinom (100 μM) i ekstraktom 2 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Na slici su prikazani reprezentativni histogrami sa procentima ćelija u odgovarajućim fazama ćelijskog ciklusa (subG₀, G₀/G₁ i S/G₂M).

C6 ćelije tretirane ekstraktom 2 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pokazuju zastoje u proliferaciji u S/G₂M fazi (48 % tretiranih ćelija u S/G₂M fazi, za razliku od kontrole gde je bilo 17 % ćelija u S/G₂M fazi). Pored toga zapaža se mali porast broja hipodiploidnih ćelija (sub G₀) od 6 % u poređenju sa kontrolom (1 %). Ekstrakt 3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) je doveo do izraženog zastoja u G₂M fazi ćelijskog ciklusa u kojoj se nalazilo 39 % tretiranih ćelija, za razliku od kontrole, gde se nalazilo 17 % ćelija u G₂M fazi. Slično tretmanu ekstraktom 3, ćelije tretirane apigeninom (100 μM) su takođe pokazale izražen zastoje u G₂M fazi ćelijskog ciklusa, dok za razliku od njih, ćelije tretirane luteolinom (100 μM) pokazuju S/G₂M proliferacioni blok. Rezultati su prikazani na slici 19.



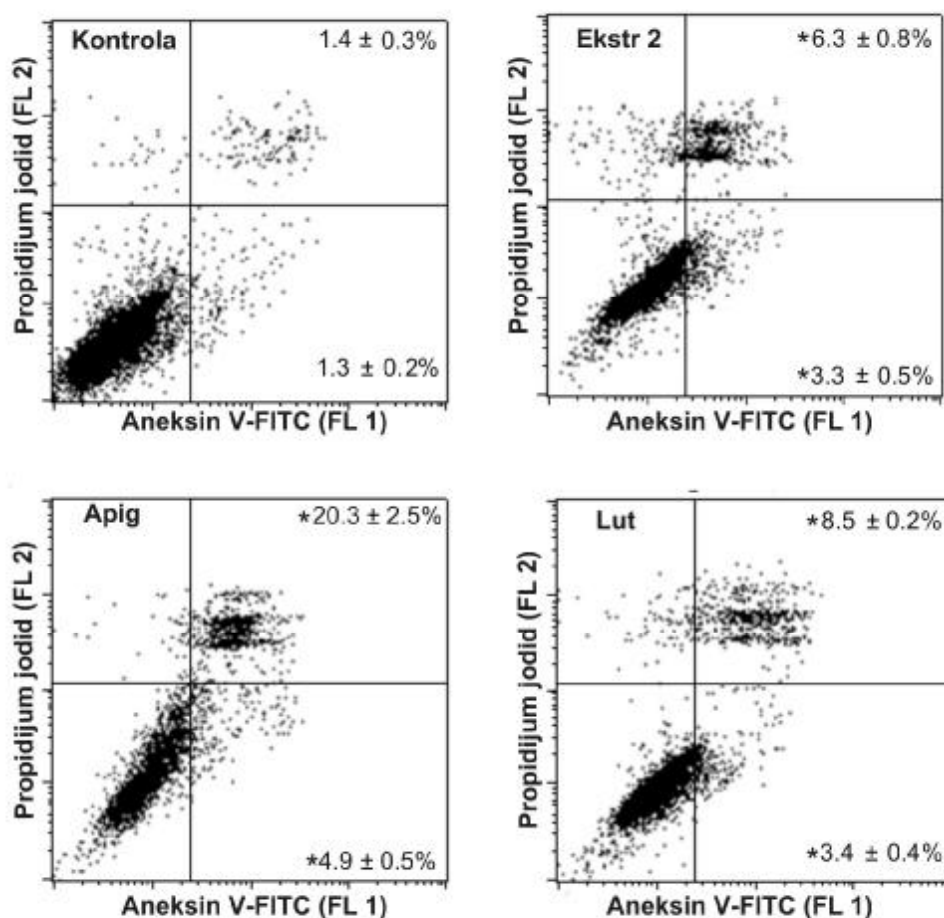
Slika 19. Uticaj apigenina, luteolina i ekstrakta 2 i 3 na progresiju ćelijskog ciklusa C6 ćelija. Ćelije su inkubirane tokom 24h apigeninom i luteolinom (100 μM) i ekstraktima 2 i 3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Na slici su prikazani reprezentativni histogrami kao i procenat ćelija u odgovarajućim fazama ćelijskog ciklusa (subG₀, G₀/G₁ i S/G₂M).

4.4. Ispitivanje tipa ćelijske smrti

Tip ćelijske smrti indukovane antitumorskim lekovima može da bude od presudnog značaja za uspeh terapije. Odlika mnogih tumora je da stiču rezistenciju na apoptozu, a sposobnost antitumorskog leka da indukuje apoptozu je najčešći mehanizam delovanja danas primenjivanih agenasa.

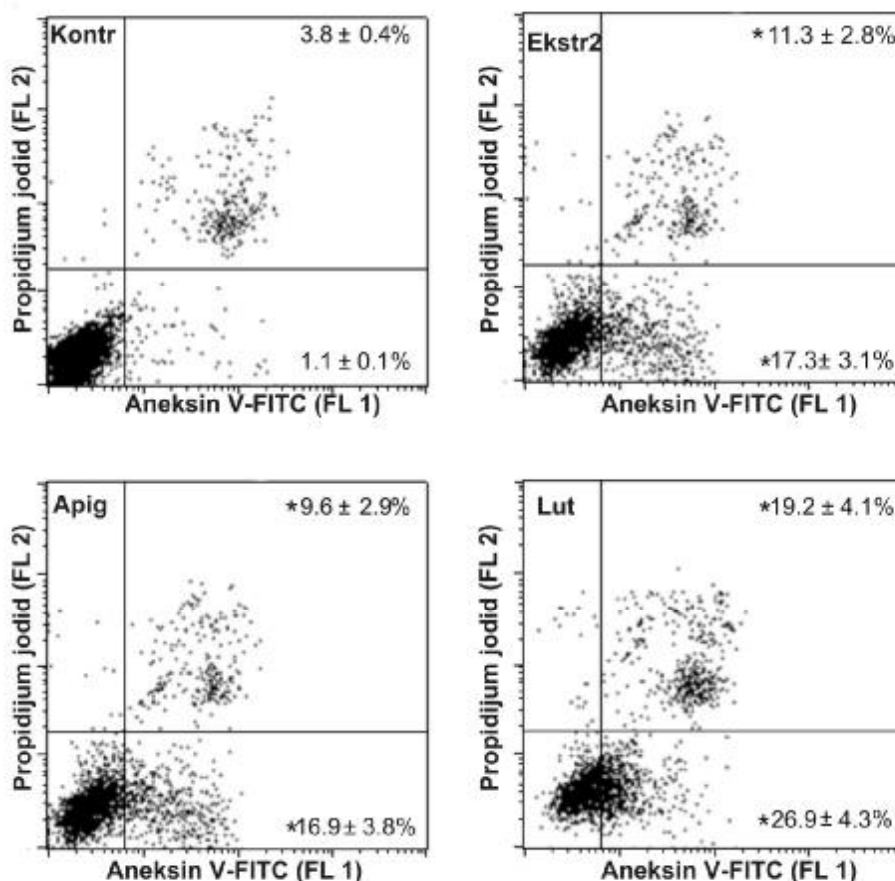
Dvostrukim bojenjem aneksinom-V (An) i propidijum jodidom (PI), ćelija koje su tokom 24h tretirane odgovarajućim koncentracijama ekstrakata i njihovih fenolnih komponenti, izvršena je diferencijacija između dva tipa ćelijske smrti- apoptoze i nekroze. Apoptotične ćelije eksternalizuju na površini ćelijske membrane fosfatidil serin, koji ima veliki afinitet da se veže za An. Pošto imaju očuvan integritet ćelijske membrane, apoptotične ćelije su nepermeabilne za PI. Sa druge strane PI lako prodire u nekrotične ćelije i interkalira u molekul DNK. Tako na osnovu An i PI pozitivnosti ćelije možemo da klasifikujemo u 4 grupe: žive ćelije (An⁻/PI⁻), ćelije u ranoj apoptozi (An⁺/PI⁻), ćelije u kasnoj apoptozi (An⁺/PI⁺) i nekrotične ćelije (An⁻/PI⁺).

Ekstrakt 2 (100 µg/ml), primenjen na B16 ćelije je doveo do povećanja procenta apoptotičnih ćelija (ukupno 9,9 % aneksin pozitivnih ćelija) u odnosu na kontrolu (2,7 %). Apigenin (100 µM) i luteolin (100 µM) su uglavnom doveli do povećanja broja ćelija u kasnoj apoptozi, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji kod apigenina (20,3 % u odnosu na 1,4% ćelija u kontroli). Ovi podaci ukazuju da ekstrakt 2 i njegove fenolske komponente dominantno indukuju apoptotsku smrt tretiranih B16 ćelija. Rezultati su prikazani na slici 20.



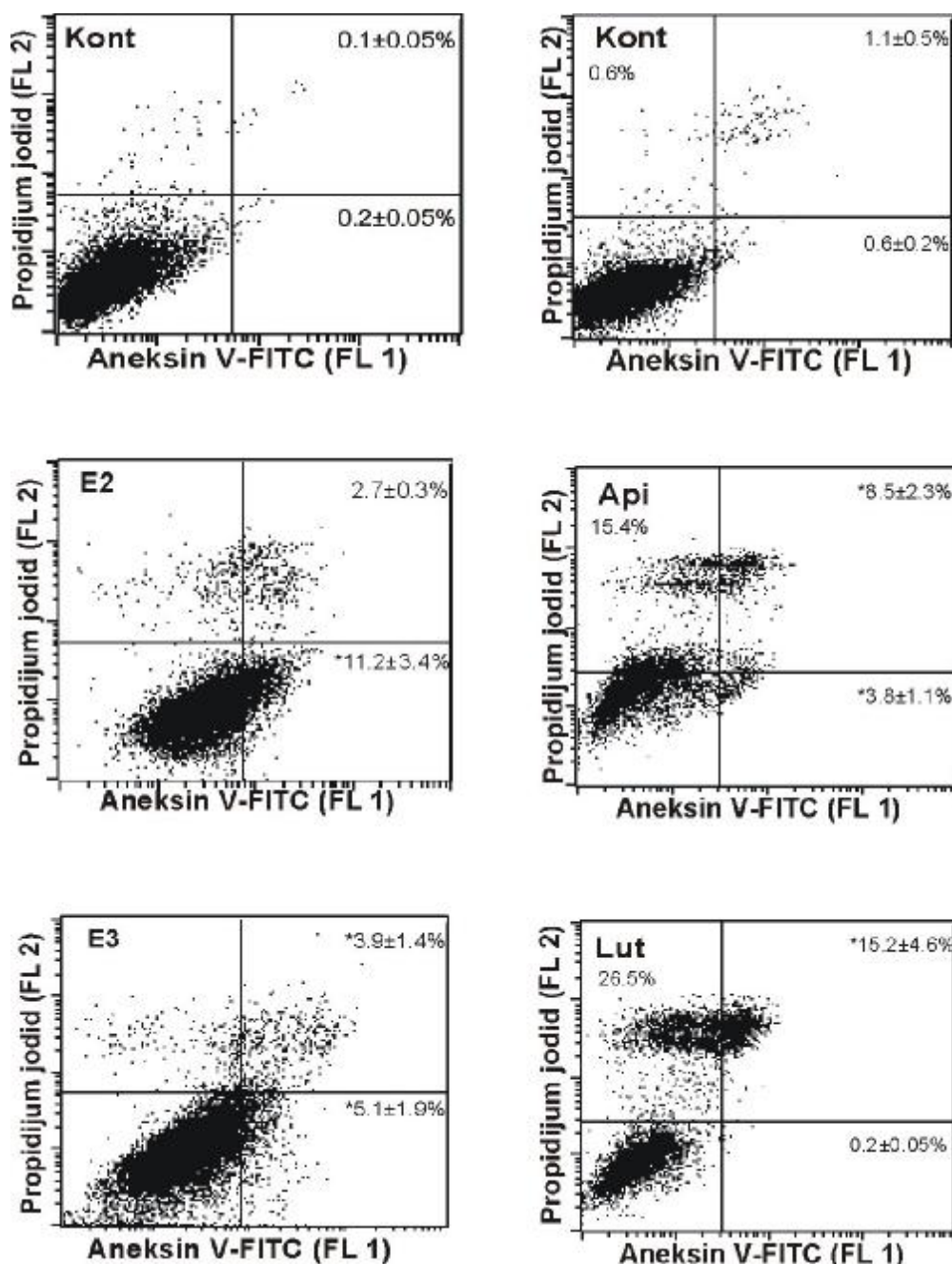
Slika 20. Efekat ekstrakta 2, apigenina i luteolina na indukciju apoptoze odnosno nekroze B16 ćelija. Ćelije su inkubirane 24h sa apigeninom i luteolinom (100 μ M) i ekstraktom 2 (100 μ g/ml). Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami i navedene srednje vrednosti procentualne zastupljenosti ćelija, dobijene analizom podataka iz 3 nezavisna eksperimenta. (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

Za razliku od B16 ćelija, kod HL-60 ćelija tretiranih ekstraktom 2 zabeležen je dominantno porast procenta ćelija u ranoj apoptozi. Isti efekat je uočen i pri tretmanu apigeninom i luteolinom. Takođe, apoptoza HL-60 ćelija indukovana ekstraktom 2 i fenolskim komponentama, bila je mnogo izraženija u odnosu na apoptozu indukovanu kod B16 ćelija, pa je tako pri tretmanu sa ekstraktom 2 zabeleženo 28,6 %, apigeninom 26,8 % i luteolinom 46,1 % ćelija u apoptozi, za razliku od kontrole u kojoj je bilo 4,9 % apoptotičnih ćelija. Rezultati su prikazani na slici 21.



Slika 21. Efekat ekstrakta 2, apigenina i luteolina na indukciju apoptoze odnosno nekroze HL-60 ćelija. Ćelije su inkubirane 24h sa apigeninom i luteolinom (100 μ M) i ekstraktom 2 (100 μ g/ml). Na slici su prikazani reprezentativni tackasti dijagrami i navedene srednje vrednosti procentualne zastupljenosti ćelija, dobijene analizom podataka iz 3 nezavisna eksperimenta. (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

U C6 ćelijama tretiranim ekstraktom 2 (100 μ g/ml), došlo je do značajnog povećanja procenta ćelija u apoptozi na 13,9 %, u poređenju s kontrolom (0,3 %). Ekstrakt 3 (100 μ g/ml), je takođe indukovao apoptozu, ali u nešto manjoj meri (9 % apoptotičnih ćelija). Apigenin (100 μ M), je dominantno indukovao nekrotičnu smrt (15,4 % u odnosu na 0,6% u kontroli), uz istovremenu indukciju kasne apoptoze (8,5 % u odnosu na 1,1 % u kontroli). Luteolin (100 μ M), je takođe dominantno indukovao nekrozu (26,5 % u odnosu na 0,6 % u kontroli), uz istovremenu indukciju kasne apoptoze (15,2 % u odnosu na 1,1 % u kontroli). Rezultati su prikazani na slici 22.



Slika 22. Efekat ekstrakta 2 i 3, apigenina i luteolina na indukciju apoptoze odnosno nekroze C6 ćelija. Ćelije su inkubirane 24h sa apigeninom i luteolinom (100 μ M) i ekstraktima 2 i 3 (100 μ g/ml). Na slici su prikazani reprezentativni tackasti dijagrami i navedene srednje vrednosti procentualne zastupljenosti ćelija, dobijene analizom podataka iz 3 nezavisna eksperimenta.

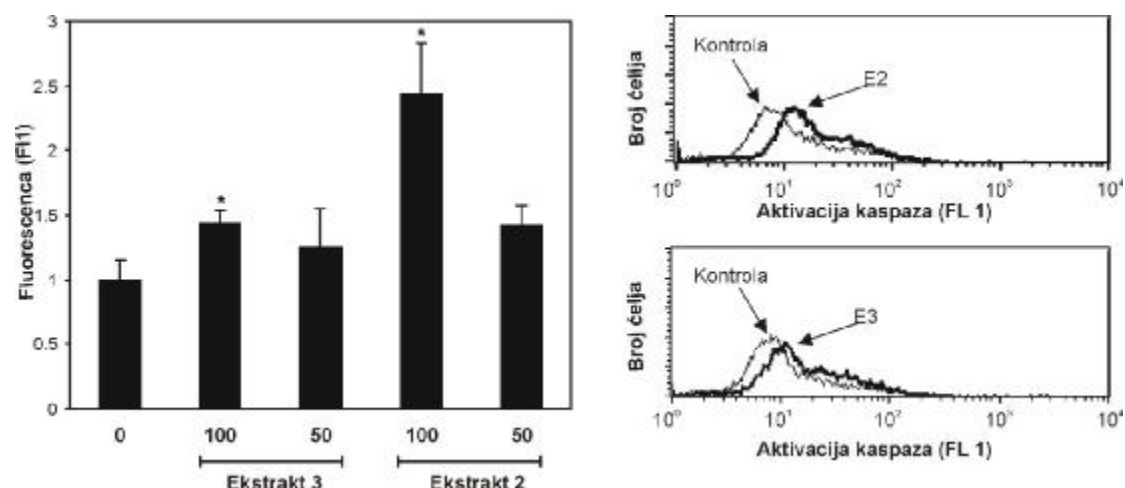
Iako su ekstrakti ispoljili citotoksičan efekat prema različitim tumorskim ćelijskim linijama, dalje definisanje mehanizma citoksičnosti je analizirano

samo na C6 ćelijama glioma pacova iz nekoliko razloga. Naime, ove ćelije su, za razliku od ostalih ispitivanih ćelijskih linija, bile osjetljive na dva ekstrakta *S. scardica* (ekstrakt 2 i 3) pri čemu su ovi ekstrakti pokazali jasnu selektivnost delovanja prema C6 tumorskoj liniji u odnosu na primarne astrocite.

4.5. Uticaj *S. scardica* ekstrakata i njihovih fenolskih komponenti na aktivaciju kaspaza u C6 ćelijama glioma pacova

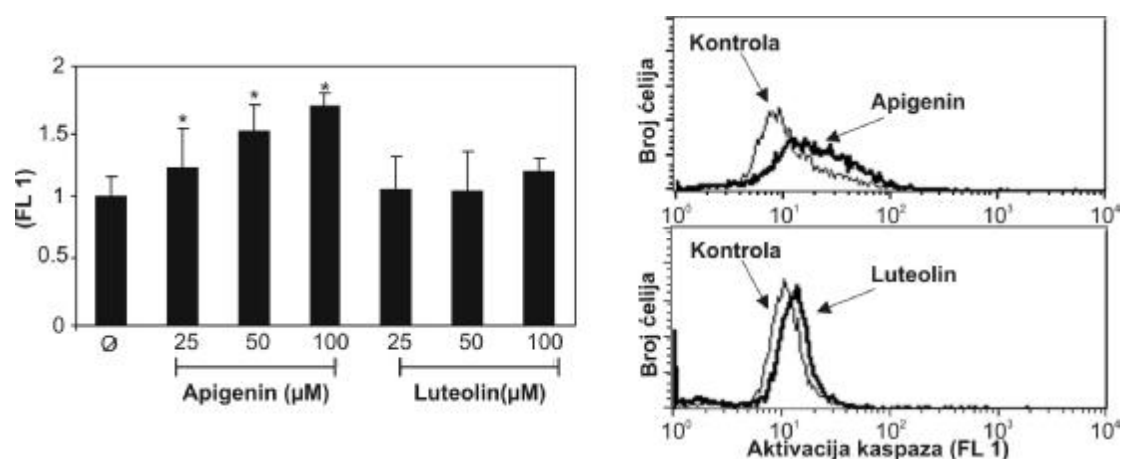
Aktivacija kaspaza (ključnih enzima uključenih u proces apoptoze) ispitivana je primenom protočne citometrije uz primenu fluorescentno obeleženog pankaspaznog inhibitora.

U C6 ćelijama glioma pacova tretiranim ekstraktom 2 (100 µg/ml) došlo je do statistički značajne, dozno zavisne aktivacije kaspaza, pa se može zaključiti da je apoptoza indukovana ekstraktom 2 zavisna od kaspaza. Ekstrakt 3, koji je inače prema C6 ćelijama glioma ispoljio slabiji citotoksičan efekat u odnosu na ekstrakta 2, takođe je doveo do statistički značajnog povećanja aktivnosti kaspaza, ali u manjoj meri u odnosu na ekstrakt 2. Rezultati su prikazani na slici 23.



Slika 23. Efekat ekstrakta 2 i 3 na aktivaciju kaspaza u C6 ćelijama. Levo su prikazani stubičasti dijagrami. Vrednosti aktivacije kaspaza su izražene u odnosu na kontrolu, koja je unapred postvaljena na 1. Prikazane su srednje vrednosti iz 3 nezavisna eksperimenta. Desno su prikazani reprezentativni histogrami (dijagrami preklapanja) fluorescence kontrole i odgovarajućeg ekstrakta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

Apigenin je takođe indukovao dozno zavisnu aktivaciju kaspaza u tretiranim C6 ćelijama glioma pacova. Kod ćelija tretiranih luteolinom, nije bila zabeležena razlika u aktivaciji kaspaza u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani na slici 24.



Slika 24. Efekat apigenina i luteolina na aktivaciju kaspaza u C6 ćelijama. Levo su prikazani stubičasti dijagrami. Vrednosti aktivacije kaspaza su izražene u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na 1. Prikazane su srednje vrednosti iz 3 nezavisna eksperimenta. Desno su prikazani reprezentivni histogrami (dijagrami preklapanja) fluorescence kontrole i odgovarajućeg ekstrakta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

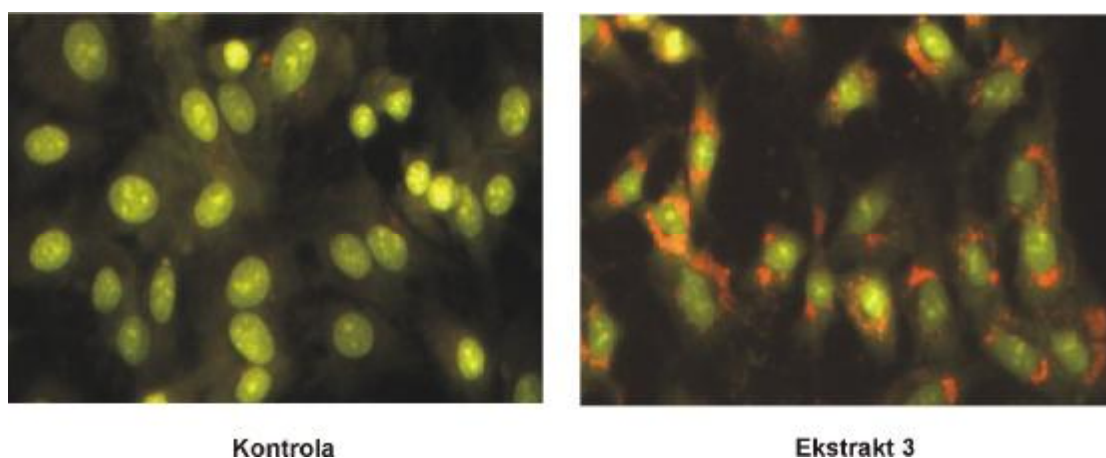
4.6. Ispitivanje procesa autofagije u C6 ćelijama tretiranim *S. scardica* ekstraktima i njihovim fenolskim komponentama

4.6.1. Uticaj *S. scardica* ekstrakata na povećanje sadržaja kiselih citoplazmatskih vezikula

Detekcija porasta sadržaja kiselih citoplazmatskih vezikula obično je prvi korak u dokazivanju procesa autofagije. Iako porast u broju vezikula ne mora apsolutno da znači i prisustvo autofagije, radi se o dobrom skrining metodu, koji se kasnije potvrđuje drugim tehnikama. Za dokazivanje prisustva kiselih citoplazmatskih vezikula koristi se pH senzitivna boja akridin oranž, koja u kiseloj sredini autofagolizozoma emituje crveno-narandžastu fluorescencu

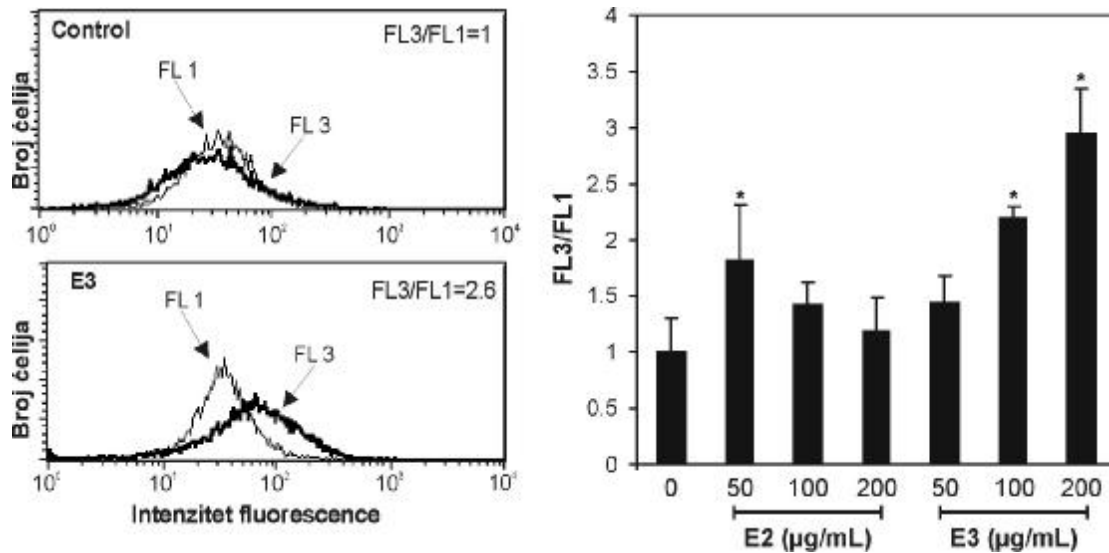
dok u neutralnoj sredini citoplazme i jedra, emituje zelenu fluorescencu. I jedna i druga fluorescencija se mogu vizualizirati fluorescentnim mikroskopom i kvantifikovati protočnom citometrijom.

Prisustvo kiselih vezikula dokazano je vizualizacijom na fluorescentnom mikroskopu. Na slici 25 prikazane su C6 ćelije, tretirane ekstraktom 3 u kojima se vidi jasan porast kiselog sadržaja na koji ukazuje povećanje broja narandžastih unutarćelijskih vezikula nasuprot kontroli koja dominantno emituje zelenu fluorescencu.



Slika 25. Fluorescentna mikroskopija C6 ćelija tretiranih ekstraktom 3 koncentracije 100 µg/ml i obojenim akridin oranžom

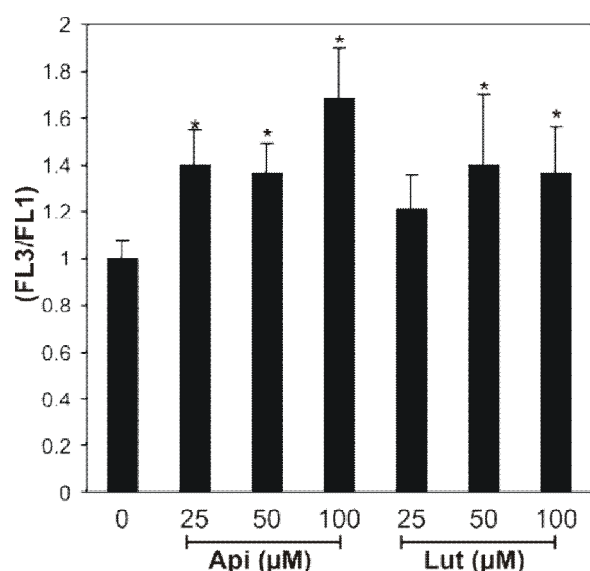
Oba ispitivana ekstrakta (ekstrakt 2 i ekstrakt 3) su dovela do povećanja sadržaja kiselih citoplazmatskih vezikula u C6 ćelijama glioma pacova. Ovaj efekat je kvantifikovan analizom ćelija obojenih akridin oranžom protočnom citometrijom odnosno izračunavanjem odnosa narandžaste (FL3) i zelene (FL1) fluorescencije (FL3/FL1) koji u kontrolnim (netretiranim ćelijama) iznosi 1. Oba ekstrakta primenjena u različitim koncentracijama su dovela do povećanja odnosa FL3/FL1 a ovaj efekat ekstrakta 3 je dodatno bio i dozno zavisian. Rezultati kvantitativne analize prisustva vezikula prikazane su na slici 26.



Slika 26. Uticaj ekstrakata 2 i 3 na porast kiselih citoplazmatskih vezikula u C6 ćelijama. Reprezentativni dijagrami preklapanja FL3 i FL1 fluorescencije u ćelijama tretiranim ekstraktom 3 i kontrolnim ćelijama (levo). Kvantitativni sadržaj kiselih citoplazmatskih vezikula tretiranim različitim koncentracijama ekstrakata 2 i 3 meren protočnom citometrijom. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti iz 3 nezavisna eksperimenta (desno) (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

4.6.2. Uticaj apigenina i luteolina na porast kiselih citoplazmatskih vezikula u C6 ćelijama glioma pacova

Slično ekstraktima *S. scardica* i apigenin i luteolin, primenjeni u različitim koncentracijama indukuju porast sadržaja kiselih citoplazmatskih vezikula u tretiranim C6 ćelijama glioma pacova. Rezultati su prikazani na slici 27.



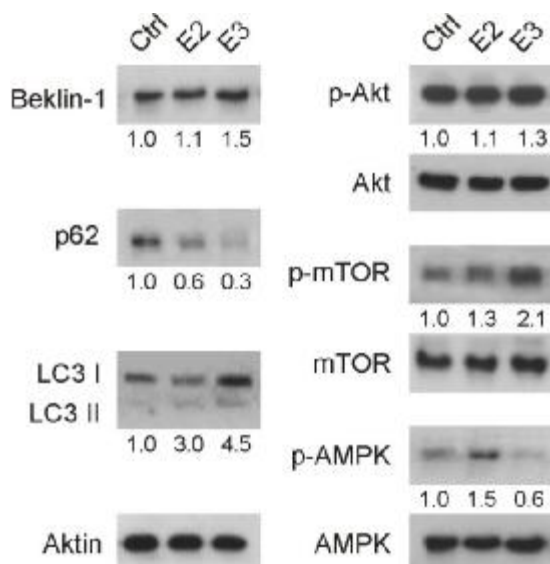
Slika 27. Uticaj apigenina i luteolina na porast kiselih citoplazmatskih vezikula u C6 ćelijama. Kvantitativni sadržaj kiselih citoplazmatskih vezikula tretiranim različitim koncentracijama apigenina i luteolina meren protočnom citometrijom. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti iz 3 nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

4.6.3. Uticaj *S. scardica* ekstrakata na ekspresiju proteina i signalnih molekula uključenih u proces autofagije

Autofagija je proces autodigestije ćelijskih komponenti posredovan lizozomima (Yorimitsu i Klionsky, 2005.). Iako je dokazano prisustvo kiselih citoplazmatskih vezikula u C6 ćelijama, ovaj nalaz nije bio dovoljan za donošenje zaključka da se stvarno radi o procesu autofagije već je bilo neophodno dalje dokazati prisustvo autofagije, merenjem ekspresije proteina uključenih u proces formiranja autofagozoma.

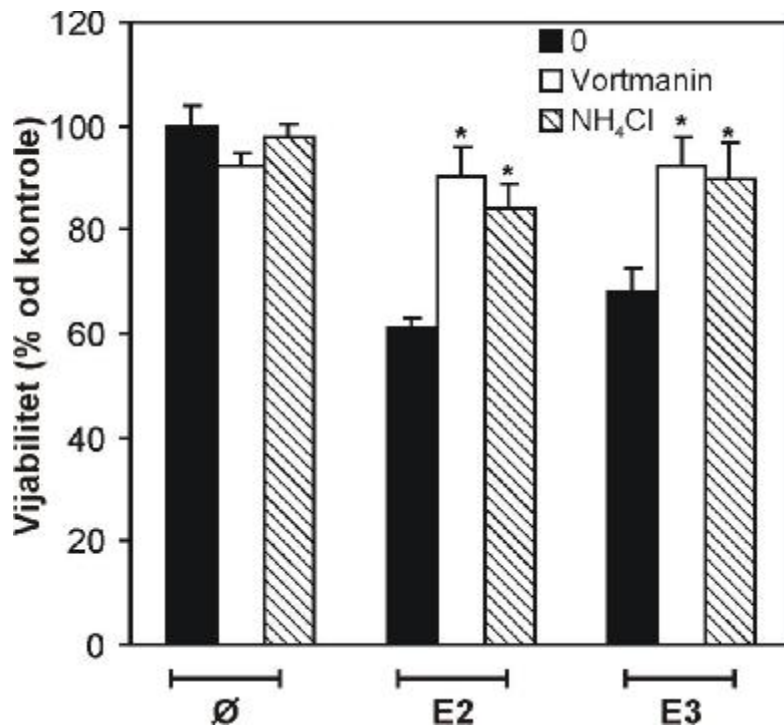
Nakon osmočasovnog inkubacionog perioda ćelije tretirane ekstraktima 2 i 3 (u konc 25 i 50 µg/ml) su povećale ekspresiju LC3-II proteina (3 odnosno 4,5 puta više u odnosu na kontrolu), koji je asociran sa autofagolizozomima (Mizushima i sar., 2007). I ekstrakt 2 i ekstrakt 3 doveli su do povećanja ekspresije glavnog autofagnog proteina beklina (ekstrakt 2 je povećao ekspresiju 1,1 put a ekstrakt 3 1,5 puta u odnosu na kontrolu). Istovremeno su ekstrakti 2 i 3 smanjili nivo ekspresije proteina p62 (relativni udeo ekspresije za ćelije tretirane ekstraktom 2 iznosio je 0,3 dok je za ćelije tretirane ekstraktom 3 iznosio 0,6), koji se selektivno razgrađuje u autofagolizozomima, potvrđujući na taj način proteolizu posredovanu autofagijom (Ichimura i sar., 2008). Rezultati su prikazani na slici 28.

U daljim eksperimentima ispitivan je aktivacioni status molekula uključenih u regulaciju procesa autofagije. Glavni negativni regulator autofagije mTOR (He i Klionsky, 2009.) i njegov glavni ushodni aktivator Akt (Hay, 2005.) nisu bili fosforilisani (aktivirani) u ćelijama tretiranim ekstraktom 2. Sa druge strane, u ćelijama tretiranim ekstraktom 3 aktivacioni status Akt-a bio je nepromenjen, ali je mTOR bio aktiviran (2,1 put veća ekspresija u tretiranim ćelijama u odnosu na kontrolu). Takođe, u C6 ćelijama tretiranim ekstraktima 2 i 3, AMPK kao jedan od mTOR inhibitora i jedan od glavnih pokretača autofagije, nije bila aktivirana (fosforilisana), sugerišući da je autofagija indukovana ekstraktima 2 i 3 nezavisna od AMPK/mTOR signalnog puta. Rezultati su prikazani na slici 28.



Slika 28. Ekspresija proteina uključenih u proces autofagije u C6 ćelijama tretiranim ekstraktom 2 (50 µg/mL) i ekstraktom 3 (100 µg/mL) nakon 8h inkubacije. Ekspresija LC3, beklina 1 i p62 je izračunata u odnosu na ekspresiju aktina. Fosfo forme proteina su izražene u odnosu na ukupni sadržaj odgovarajućeg nefosforilisanog proteina.

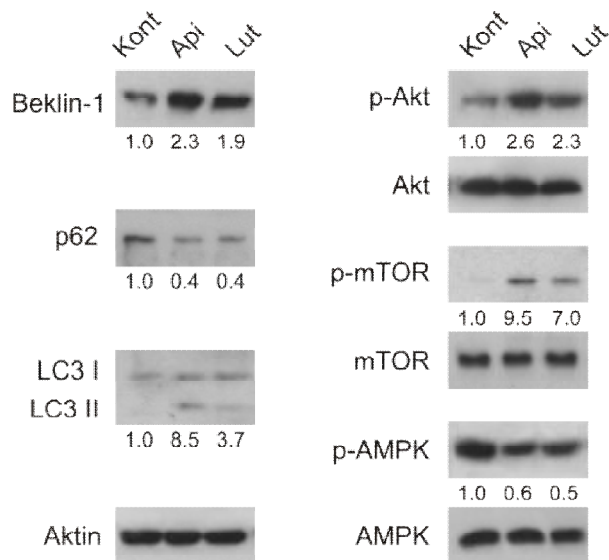
Kako bi se razjasnilo, da li je autofagija indukovana ekstraktima 2 i 3 protektivni mehanizam, ili je pak način na koji ćelije umiru, C6 ćelije glioma pacova su istovremeno tretirane ekstraktima i inhibitorima autofagije, vortmaninom (0,4 µM) i amonijum-hloridom (20 mM) (Wibo i Poole, 1974.). Prisustvo inhibitora, značajno je smanjilo citotoksičnost ekstrakata 2 (50 µg/mL) i 3 (100 µg/mL), sugerišući da je autofagija mehanizam ćelijske smrti, a ne protektivni mehanizam, kojim C6 ćelije glioma pacova pokušavaju da se zaštite od toksičnog delovanja ekstrakata. Rezultati su prikazani na slici 29.



Slika 29. Uticaj inhibitora autofagije vortmanina na vijabilitet C6 ćelija tretiranih ekstraktom 2 (E2) i ekstraktom 3 (E3). Rezultati predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu ($X \pm SD$) (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

4.6.4. Uticaj apigenina i luteolina na ekspresiju proteina i signalnih molekula uključenih u proces autofagije

Slično rezultatima koji su dobijeni pri tretmanu ekstraktima 2 i 3, u C6 ćelijama tretiranim apigeninom i luteolinom, takođe se povećala ekspresija LC3-II i beklina 1 a smanjila ekspresija p62, što potvrđuje prisustvo autofagije. Step en aktivacije (fosforilacija) AMPK je bila smanjena u odnosu na netretirane ćelije. Istovremeno je bila povećana fosforilacija Akt-a, što je bilo praćeno znatnom aktivacijom mTOR-a. Međutim, uprkos aktivaciji mTOR-a došlo je do procesa autofagije, sugerišući da je autofagija indukovana apigeninom i luteolinom nezavisna od mTOR signalnog puta. Rezultati su prikazani na slici 30.

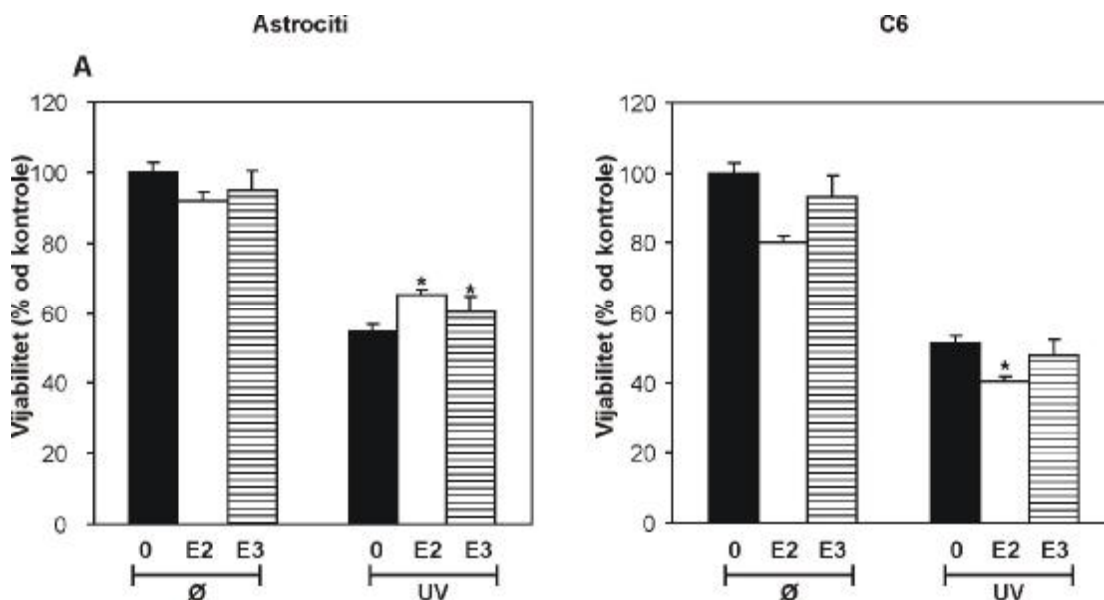


Slika 30. Ekspresija proteina uključenih u proces autofagije u C6 ćelijama tretiranim ekstraktom apigeninom (50 μ M) i luteolinom (30 μ g/mL) nakon 8h inkubacije. Ekspresija LC3, beklina 1 i p62 je izračunata u odnosu na ekspresiju aktina. Fosfo forme proteina su izražene u odnosu na ukupni sadržaj odgovarajućeg proteina.

4.7. Uticaj udruženog delovanja ekstrakata i UV zračenja na vijabilitet C6 ćelija glioma pacova i normalnih astrocita

Oštećenja DNK je krajnja posledica delovanja mnogih hemioterapijskih agenasa, a naročito alkilirajućih agenasa, koji se između ostalog upotrebljavaju u terapiji glioma. UV zračenje indukuje različite promene u molekulu DNK i može se u laboratorijskim uslovima koristiti kao model za DNK oštećenje. U daljim eksperimentima smo želeli da ispitamo udruženi efekat istovremenog delovanja UV zračenja i ispitivanih ekstrakata *S. scardica* na gliomske ćelije i normalne netransformisane astrocite. U ovim eksperimentima, ekstrakt 2 i 3 su primenjeni u koncentracijama za koje je pokazano da nisu bile značajno toksične za gliomsku liniju (25 odnosno 50 μ g/ml). Ekstrakti 2 i 3 su u kulturi primarnih astrocita pacova primenjeni uz UV zračenje doveli do statistički značajnog povećanja vijabiliteta UV ozračenih astrocita u odnosu na ćelije koje su bile izložene samo UV zračenju. Suprotno tome, ekstrakti 2 i 3 su u kulturi C6 ćelija glioma primenjeni uz UV zračenje doveli do smanjenja vijabiliteta UV ozračenih astrocita, u odnosu na

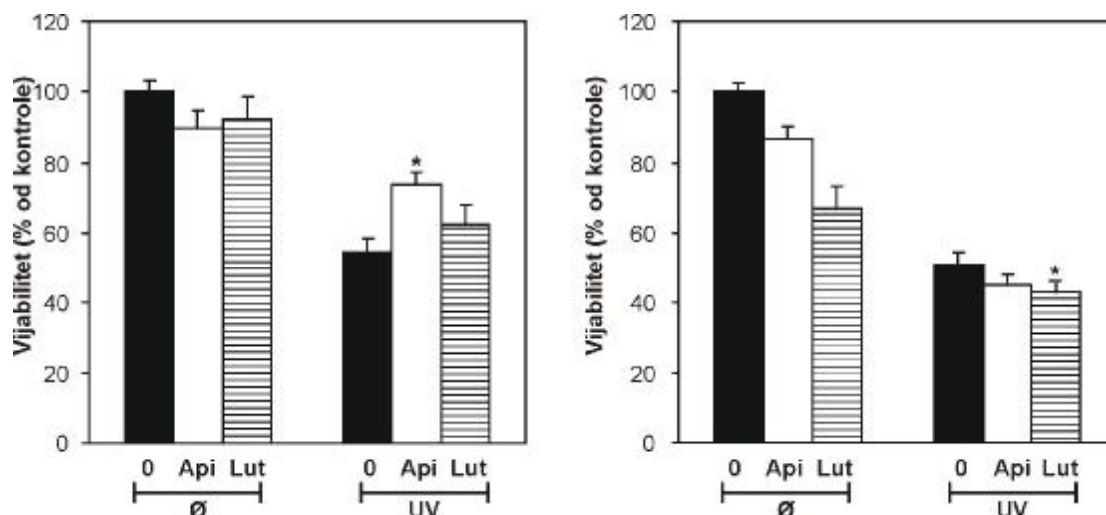
ćelije koje su bile izložene samo UV zračenju, pri čemu je ovaj efekat bio posebno izražen u tretmanu ekstraktom 2 ($p < 0,05$).



Slika 31. Udruženo delovanje UV zračenja i ekstrakata *S. scardica*-e na astrocite i C6 gliomske ćelije. Na slici su prikazane srednje vrednosti vijabiliteta ćelija (metodom kisele fosfataze) dobijene iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu nakon odgovarajućih tretmana (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije). Ekstrakt 2 je primenjen u koncentraciji 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dok je ekstrakt 3 primenjen u koncentraciji 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.8. Uticaj udruženog delovanja apigenina i luteolina sa UV zračenjem na vijabilitet C6 ćelija glioma pacova i normalnih astrocita

Apigenin, je prema astrocitima i C6 ćelijama glioma pokazao slične efekte kao i ekstrakti *S. scardica*. Naime, apigenin (50 μM) primenjen uz UV zračenje je doveo do statistički značajnog povećanja vijabiliteta astrocita odnosno smanjenja vijabiliteta C6 ćelija u odnosu na ćelije koje su bile izložene samo UV zračenju. Sa druge strane, luteolin (25 μM) nije delovao na vijabilitet UV ozračenih astrocita ali je smanjio vijabilitet UV ozračenih C6 ćelija u odnosu na ćelije koje su bile izložene samo UV zračenju. Rezultati su prikazani na slici 32.

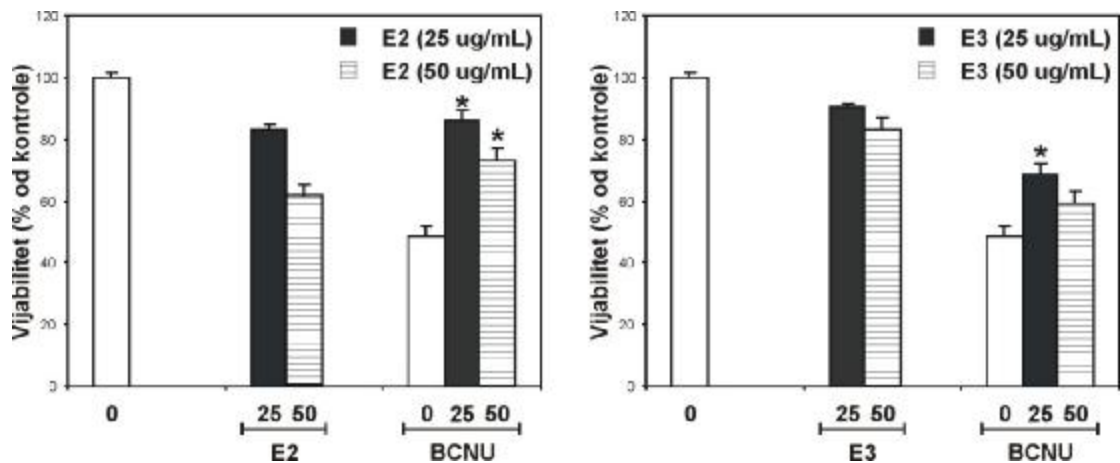


Slika 32. Udruženo delovanje UV zračenja i apigenina (50 μM) i luteolina (25 μM) na astrocite (levo) i C6 gliomske ćelije (desno). Na slici su prikazane srednje vrednosti vijabiliteta ćelija (metodom kisele fosfataze) dobijene iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu nakon odgovarajućih tretmana (* $p < 0.05$). Apigenin je primenjen u koncentraciji 50 μM , dok je luteolin primenjen u koncentraciji 25 μM

4.9. Uticaj ekstrakata *S. scardica*-e na citotoksični efekat karmustina prema C6 ćelijama pacovskog glioma

Karmustin (BCNU) je citostatik koji se često upotrebljava u hemoterapijskim protokolima za lečenje glioma visokog gradusa.

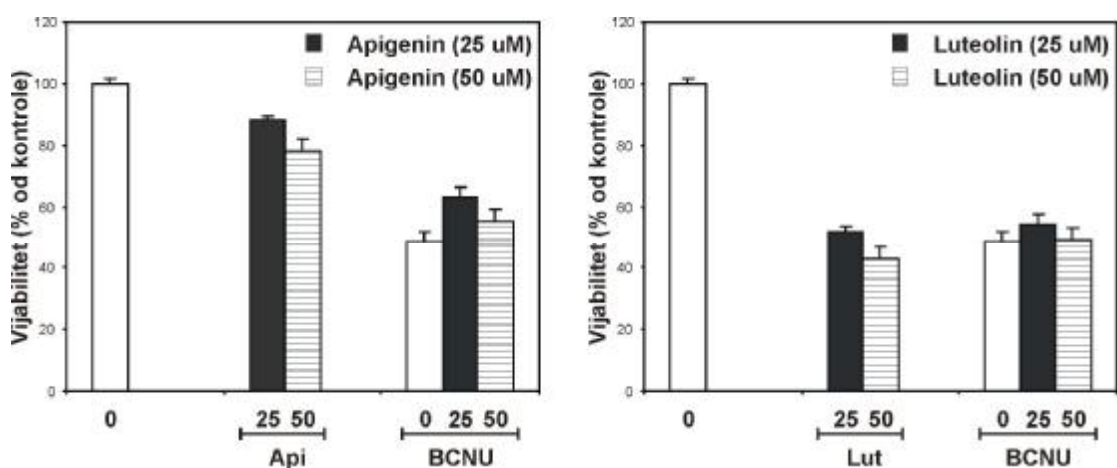
Cilj ovog eksperimenta je bio da se ispita da li će istovremena primena ekstrakata *S. scardica* i karmustina povećati citotoksični efekat karmustina, odnosno da li će ispoljiti sinergističko delovanje. Za potrebe ovih eksperimenata korišćen je karmustin u IC_{50} koncentraciji (112 μM), dok su korišćene različite koncentracije ekstrakata 2 i 3. Obe primenjene koncentracije ekstrakta 2 (25 i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kao i niža koncentracija ekstrakt 3 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) su dovele do statistički značajnog povećanja vijabiliteta ćelija tretiranih karmustinom čime su smanjili citotoksični efekat karmustina na C6 gliomske ćelije. Rezultati su prikazani na slici 33.



Slika 33. Kombinovana toksičnost karmustina (BCNU) primenjenog u koncentraciji IC_{50} sa ekstraktom 2 (levo) i ekstraktom 3 (desno) na C6 pacovsku gliomsku liniju. Na slici su prikazane srednje vrednosti vijabiliteta ćelija (merene metodom kisele fosfataze) dobijene iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu nakon odgovarajućih tretmana (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

4.10. Uticaj apigenina i luteolina na citotoksični efekat karmustina prema C6 ćelijama pacovskog glioma

Za razliku od ekstrakata 2 i 3, apigenin i luteolin primenjeni u koncentracijama 25 i 50 μM , ne smanjuju značajno citotoksičnost karmustina prema C6 gliomskoj ćelijskoj liniji, ukazujući na to da su druge komponente ekstrakata 2 i 3 odgovorne za inhibitorni uticaj ekstrakata *S. scardica* na citotoksičan efekat karmustina. Rezultati su prikazani na slici 34.



Slika 34. Kombinovana toksičnost karmustina (BCNU) primenjenog u koncentraciji IC_{50} sa apigeninom (levo) i luteolinom (desno) na C6 pacovsku gliomsku liniju. Na slici su prikazane srednje vrednosti vijabiliteta ćelija (merene metodom kisele fosfataze) dobijene iz triplikata u reprezentativnom eksperimentu nakon odgovarajućih tretmana. (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije)

5. DISKUSIJA

Biljke iz roda *Sideritis* se zbog svojih antiinflamatornih svojstava tradicionalno se koriste u narodnoj medicini mediteranskih zemalja. *Sideritis scardica* je endemska biljka Balkanskog poluostrva, rasprostranjena u regionu Šar planine, takođe vekovima upotrebljavana u narodnoj medicini, međutim, u literaturi nema podataka o njenoj farmakološkoj aktivnosti.

Naša istraživačka grupa je analizirala hemijski sastav biljke i kao najvažnije, farmakološki aktivne supstance identifikovala polifenolske komponente. Identifikovano je ukupno 13 polifenolskih komponenti u 4 različito frakcionisana ekstrakta (ukupni, dietil-etarski, etil-acetatni i n-butanolni). Polifenoli su široko rasprostranjeni u biljnom svetu i imaju brojne farmakološke efekte. Pokazano je da su polifenoli neuroprotektivni, kardioprotektivni imaju antitumorsko i antiinflamatorno delovanje, a neki utiču i na tzv. „molekule dugovečnosti,, odnosno sirtuine i produžavaju životni vek nižih organizama (Ishige i sar., 2001, Ulrich i sar., 2005). Smatra se da su neki od bioloških efekata flavonoida direktna posledica njihove antioksidativne sposobnosti (Cotelle, 2001). Zaista, većina flavonoida pokazuje snažnu antioksidativnu aktivnost kada se proučavaju u arteficialnim sistemima (Rice-Evans i Miller, 1996) koji zapravo mere redukcionu sposobnost flavonoida. Pozitivni rezultati testova nikako ne znače da će flavonoidi apsolutno uspeti da zaštite ćelije od oksidativnog stresa kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Postoje brojni podaci koji pokazuju da flavonoidi mogu da deluju antioksidativno u živim sistemima, ali i oni koji pokazuju da mogu da deluju prooksidativno i da budu toksični, što u velikoj meri zavisi od vrste primenjene polifenolske komponente, kao i od eksperimentalnih uslova (Sakihama i sar., 2002).

In vitro antioksidativna sposobnost *S. scardica* ekstrakata testirana je DPPH testom, koji se zasniva na redukcionim osobinama potencijalnog antioksidansa. Svi ispitivani ekstrakti pokazali su dobru antioksidativnu aktivnost, koja je bila u korelaciji sa fenolskim sadržajem ekstrakata. Iako je

ukupni fenolski sadržaj dobar pokazatelj antioksidativne sposobnosti, ipak rezultat u najvećoj meri zavisi od svojstva samog flavonoida prisutnog u ekstraktu. Apigenin i njegovi glikozidi deluju antioksidativno zbog prisustva kisele 4'-hidroksilne grupe. Dodatno prisustvo hidroskicimetnih kiselina povećava antioksidativnu sposobnost (Tadić i sar, 2012). Grupa $-CH=CH-CO-$ značajno povećava sposobnost doniranja vodonika i povećava antioksidativnu sposobnost (Rice-Evans i sar., 1996). Svi ispitivani ekstrakti bili su bogati derivatima hidroksicimetne kiseline, koji su istovremeno bili i najzastupljenija grupa polifenolnih jedinjenja u svim ekstraktima.

Zbog prisustva polifenolskih komponenti, moglo bi se očekivati da ekstrakti *S. Scardica* ispolje citotoksično delovanje na tumorske ćelije. U literaturi postoji mnogo podataka o različitim farmakološkim dejstvima roda *Sideritis*, ali kada je u pitanju delovanje na tumorske ćelijske linije, postoje podaci samo za vrstu *S. libanotica* ssp. *linearis*, za koju se navodi da ima značajan citotoksični potencijal na C6, HeLa i Vero ćelijske linije (Demirtas i sar., 2009). Međutim, nije razjašnjen mehanizam opisanog citotoksičnog delovanja, niti je utvrđeno koje su komponente odgovorne za citotoksični efekat ispitivanih ekstrakata.

Imajući u vidu bogat polifenolski sadržaj u *S. scardica* ekstraktima, ispitivan je citotoksični efekat korišćenjem tri tumorske linije: B16 ćelije mišjeg melanoma, HL-60 ćelije humane promijelocitne leukemije i C6 ćelije pacovskog glioma. Istovremeno je selektivnost dejstva ispitivana merenjem citotoksičnog efekta na netransformisane ćelije odnosno na mononuklearne ćelije iz periferne krvi, kao i na primarne pacovske astrocite u kulturi. U *in vitro* uslovima na svim korišćenim tumorskim linijama najjaču citotoksičnu aktivnost pokazao je dietil-etarski ekstrakt (ekstrakt 2), koji je od svih ekstrakata najbogatiji flavonoidnim aglikonima. C6 ćelije su pokazale i značajnu osetljivost na etil-acetatni ekstrakt (ekstrakt 3), koji ima visok sadržaj flavonoidnih glikozida. Imajući u vidu IC_{50} vrednosti, najosetljivije na delovanje dietil-etarskog ekstrakta bile su C6 ćelije, potom B16 ćelije, dok su najrezistentnije bile HL-60 ćelije. Za razliku od C6 i B16 ćelija, HL-60 ćelije su pokazale u znatno većoj

meri poremećaj integriteta membrane meren LDH testom, što bi moglo da ukazuje na značajno prisustvo nekroze kao mehanizma ćelijske smrti. Međutim, ne treba isključiti ni mogućnost da HL-60 ćelije umiru rano nakon tretmana procesom apoptoze i da izvestan broj ćelija u daljem toku podleže sekundarnoj nekrozi.

Ni jedan od ispitivanih ekstrakata nije pokazao značajnu toksičnost prema netumorskim ćelijama: primarnim astrocitima pacova i mononuklearnim ćelijama iz periferne krvi.

Kako bi se definisale komponente koje su odgovorne za uočeni citotoksični efekat ispitivanih ekstrakata *S. scardica* prema tumorskim ćelijskim linijama, tumorske linije su tretirane najzastupljenijim fenolskim komponentama ekstrakata: ferula kiselinom, hrizoeriolom, hlorogenskom kiselinom, apigeninom, luteolinom, apigenin-7-O-glukozidom i luteolin-7-O-glukozidom. Ferula kiselina, hrizoeriol i hlorogenska kiselina nisu bili toksični ni za jednu od ispitivanih ćelijskih linija. Luteolin je bio najtoksičnija ispitivana komponenta za B16 i C6 ćelije, dok je apigenin bio najtoksičniji za HL-60 ćelije. Značajnu toksičnost na sve tri tumorske ćelijske linije pokazali su i glikozidi apigenina i luteolina, ali imajuću u vidu da glikozidi u živim organizmima ulaze u puteve deglikozilacije i daju iste metabolite kao aglikonske komponente (Spencer i sar., 2004), u daljem toku ispitivanja mehanizama citotoksičnosti, korišćeni su samo odgovarajući aglikoni.

Iako flavonoidi u *in vitro* uslovima deluju kao antioksidansi, u živim sistemima, neki od njih mogu da imaju i prooksidativna delovanja, kao što je već navedeno (Sakihama i sar., 2002). Korišćenjem redoks senzitivne boje dihidro-rodamina, kojom se neselektivno detektuju slobodni radikali, ispitana je produkcija slobodnih kiseoničnih radikala u ćelijama tretiranim ekstraktima, odnosno citotoksičnim fenolskim komponentama, apigeninom i luteolinom. Dietil-etarski ekstrakt, koji je prema B16 ćelijama najtoksičniji, indukovao je značajnu produkciju slobodnih kiseoničnih radikala, koja je oko šest puta bila veća od kontrole. Apigenin, kao fenolna komponenta ovog ekstrakta je takođe indukovao značajnu produkciju slobodnih kiseoničnih

radikala. Međutim, luteolin, i ako je u odnosu na apigenin bio toksičniji prema B16 ćelijama, nije indukovao značajnu produkciju slobodnih kiseoničnih radikala. Sa druge strane, u HL-60 ćelijama i dietil-etarski ekstrakt, kao i apigenin i luteolin su indukovali značajnu produkciju slobodnih kiseoničnih radikala. Na C6 ćelijama je pored dietil-etarskiog ekstrakta i etil-acetatni ekstrakt indukovao značajan porast produkcije slobodnih radikala; pri čemu je stepen produkcije slobodnih radikala sa toksičnijim dietil-etarskim ekstraktom bio mnogo veći. Apigenin je u C6 ćelijama izazvao dozno zavisnu produkciju slobodnih radikala. Produkcija slobodnih kiseoničnih radikala, je dobro poznat mehanizam indukcije ćelijske smrti (Fiers i sar., 1999) i može biti jedan od veoma važnih mehanizama koji doprinose citotoksičnosti ekstrakata. Slobodni radikali mogu da učestvuju na različite načine u procesu ćelijske smrti. Pokazano je da mogu da doprinesu otpuštanju mitohondrijalnog citohoroma c, koji je neophodan za započinjanje unutrašnjeg puta apoptoze. S druge strane, izgleda da je neophodan odgovarajući redoks status ćelije da bi došlo do aktivacije kaspaza. Dodatni način, kako slobodni radikali mogu da aktiviraju ulazak ćelije u apoptozu je i aktiviranje c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) (Franklin, 2011).

Ćelijska smrt ne mora nužno da bude jedini uzrok smanjenja broja ćelija u kulturi. Zastoj u proliferaciji može da bude još jedan razlog za smanjenje broja ćelija, a on može biti i deo antitumorskog delovanja mnogih lekova. Lekovi, ali i druge supstance koje ispoljavaju antitumorsko delovanje mogu da budu fazno specifični; tako npr. citarabin, tiouracil i metotreksat deluju u S fazi, vinka alkaloidi u M fazi, pa su najefikasniji za tumore u kojima se istovremeno deli veliki broj ćelija, kao što su leukemije i limfomi. S druge strane, lekovi koji nisu specifični za ćelijski ciklus mogu da deluju u bilo kojoj fazi ćelijskog ciklusa, obično se direktno vezuju za DNK, indukuju produkciju slobodnih radikala i u njih spadaju alkilirajući agensi, citotoksični antibiotici i cisplatin (Kažić, 2011)

Ispitivanje toka ćelijskog ciklusa kod tumorskih ćelijskih linija tretiranih ekstraktima *S. scardica*-e pokazalo je da, u zavisnosti od tipa ćelije kao i od

vrste primenjenog ekstrakta, dolazi do različitih promena u ćelijskom ciklusu. Kod B16 ćelija tretiranih dietil-etarskim ekstraktom nije došlo do promene u toku ćelijskog ciklusa. Iako bi se očekivalo, da zbog izostanka efekta dietil-etarskog ekstrakta na ćelijski ciklus B16 ćelija da ni komponente dietil-etarskog ekstrakta, apigenin i luteolin takođe nemaju nikakvog uticaja na progresiju ćelijskog ciklusa, naši rezultati su pokazali, da ove dve komponente primenjene kao pojedinačne izazivaju S/G₂M blok u toku ćelijskog ciklusa B16 ćelija. Apigenin najverovatnije ne deluje citotoksično na B16 ćelije indukujući direktno ćelijsku smrt, već da svoje dejstvo uglavnom ostvaruje zaustavljajući ćelije u proliferaciji (Iwashita i sar., 2000). Međutim, u nekim drugim ispitivanjima, jasno je pokazan veliki citotoksični potencijal apigenina prema B16 ćelijama, koji ne samo da jasno inhibira njihov rast, nego smanjuje i invazivnost tumora i nastajanje metastaza u animalnim modelima (Caltagirone i sar., 2000). Ispitivanje ćelijskog ciklusa HL-60 ćelija, tretiranih dietil-etarskim ekstraktom, apigeninom i luteolinom pokazalo je povećanje broja hipodiploidnih ćelija, sa fragmentisanom DNK, ukazujući, da je najverovatnije njihovo glavno delovanje indukcija apoptoze. Apigenin, koji je bio najtoksičniji za HL-60 ćelije, nije indukovao druge promene u ćelijskom ciklusu ovih tretiranih ćelija. Za ralikom od njega, luteolin i dietil-etarski ekstrakt su indukovali i zastoj u G₀/G₁ fazi. Postoje podaci koji govore o mogućnosti da apigenin na HL-60 ćelijama indukuje zastoj u proliferaciji u G₂/M fazi (Lepley i sar., 1996), što nije potvrđeno u našem eksperimentalnom modelu. Ovo se može objasniti činjenicom da je u našim eksperimentima korišćena dva puta veća koncentracija apigenina, koja je toksičnija, zbog čega se u ćelijama verovatno brže pokretao mehanizam ćelijske smrti, mada se ne isključuje mogućnost da je ćelijska smrt posledica zastoja u ćelijskom ciklusu, koji se u našem eksperimentu javio u ranijoj fazi. Dietil-etarski ekstrakt je u tretiranim C6 ćelijama indukovao zastoj u S/G₂M fazi, dok su ćelije tretirane etil-acetatnim ekstraktom pokazale vrlo izražen zastoj u proliferaciji ali u G₂/M fazi. Zanimljivo je da neki danas široko primenjivani lekovi iz grupe taksana, kao što je paklitaksel, indukuju zastoj u G₂/M fazi delujući na

mikrotubule (Horwitz i sar., 1994). Iako je dominantni sastojak dietil-etarskog ekstrakta, apigenin je slično etil-acetatnom ekstraktu indukovao zastoj u G₂/M fazi, a luteolin je kao i dietil-etarski ekstrakt, u čijem se sastavu najvećim delom i nalazi indukovao zastoj u S/G₂M fazi ćelijskog ciklusa C6 ćelija.

Ispitivanje tipa ćelijske smrti koju indukuju ispitivani ekstrakti *S. scardica* i njihove fenolske komponente, pokazalo je da u zavisnosti od vrste ćelija, mogu da indukuju apoptozu, nekrozu ili autofagiju. Može se reći da ćelije tretirane jednom komponentom (ekstrakt ili fenolne komponente) obično ne umiru na isti način, pri čemu je prisutan različit procenat ćelija u procesu umiranja različitim tipovima ćelijske smrti, što ukazuje da je mehanizam citotoksičnosti kako ispitivanih ekstrakata, tako i njihovih fenolskih komponenti kompleksan i uključuje različite unutarćelijske signalne puteve. Tretman B16 ćelija dietil-etarskim ekstraktom doveo je do porasta broja apoptotičnih ćelija, dok do nekroze nije došlo. Apigenin i luteolin su pretežno indukovali povećanje broja ćelija u kasnoj apoptozi, a ovaj efekat apigenina je bio izraženiji u odnosu na luteolin. Imajući u vidu da je prilikom ispitivanja vijabiliteta luteolin bio toksičniji za B16 ćelije od apigenina, verovatno je da ovoj izraženoj toksičnosti luteolina znatno doprinose i neki drugi mehanizmi, kao što je npr. već opisani zastoj u ćelijskoj proliferaciji. HL-60 ćelije tretirane dietil-etarskim ekstraktom uglavnom su umirale ulazeći u apoptozu (većina ćelija je pokazivala znake rane apoptoske smrti). Slično, HL-60 ćelije, tretirane fenolskim komponentama, apigeninom i luteolinom, su takođe ulazile u apoptozu, pri čemu je taj efekat bio izraženiji kod ćelija tretiranih luteolinom. Dietil-etarski ekstrakt doveo je do značajnog povećanja procenta ćelijaranoj apoptozi u tretiranim C6 ćelijama. Za razliku od njega, etil-acetatni ekstrakt je uzrokovao diskretno povećanje u broju apoptotičnih ćelija, zbog čega se smanjenje broja ćelija verovatno može pripisati zastoj u ćelijskom ciklusu u G₂M fazi, pre nego direktnoj indukciji apoptoze, odnosno nekroze. Apigenin, a posebno luteolin, su indukovali značajno povećanje procenta nekrotičnih ćelija, pored izraženog povećanja broja ćelija u apoptozi. Apoptoza kao

mehanizam ćelijske smrti uključuje, kondenzaciju hromatina, internukleozomalnu fragmentaciju DNK i očuvanje integriteta ćelijske membrane tokom čitavog procesa. Ćelije koje uđu u proces apoptoze, podležu fagocitozi od strane okolnih ćelija ili rezidentnih makrofaga, bez izazivanja inflamacije i od strane makrofaga indukuju produkciju imunosupresivnih citokina, kao što su IL-10 i TGF- β , što dovodi do tolerancije na sopstvene antigene. Sa druge strane, nekrotična ćelijska smrt indukuje inflamaciju i može biti veoma važna za pokretanje imunskog odgovora posredovanog dendritičnim ćelijama (Sauter i sar., 2000), zbog čega nekroza može biti važan alternativni antitumorski mehanizam.

Iako se analizom ćelija na protočnom citometru nakon bojenja aneksinom V i propidijum jodidom može jasno odrediti procenat ćelija koje umiru apoptozom, odnosno nekrozom, rezultat *in vitro* testiranja se mora obazrivo interpretirati. U *in vitro* sistemima u kojima se ispituje citotoksičnost različitih supstanci, kakav je i naš, obično ne postoje okolne ćelije koje bi mogle da izvrše fagocitozu apoptotičnih ćelija, kao što se to dešava u tkivima. Zbog toga apoptotične ćelije ostaju u medijumu, a kako više nema produkcije energije zbog smrti ćelije, održavanje integriteta membrane apoptotičnih ćelija odnosno apoptotičnih tela biva narušeno, dolazi do pucanja membrane i izlivanja sadržaja ćelije, odnosno ćelije podležu sekundarnoj nekrozi (Silva, 2010).

Dalje detaljnije ispitivanje mehanizama citotoksičnosti ekstrakata *S. Scardica-e* je vršeno na C6 gliomskoj liniji imajući u vidu da je ova ćelijska linija bila najosetljivija na delovanje ekstrakata *S. scardica-e*, da smo efekte mogli istovremeno da ispitamo na odgovarajućoj netransformisanoj ćelijskoj liniji tj. primarnim astrocitima u kulturi i da neki od flavonoida, (neke od aktivnih komponenti ispitivanih ekstrakata *S. scardica*), mogu proći kroz hematoencefalnu barijeru (Youdim i sar, 2004).

Gliomi su ekstremno agresivni neuroektodermalni tumori koji imaju lošu prognozu. Srednje preživljanje pacijenata sa gliomima visokog gradusa iznosi 11 meseci (Catalan-Uribarrena, 2011) zbog čega se stalno ulažu veliki naponi u

iznalaženju novih i efikasnijih terapijskih pristupa. Velika biološka raznolikost glioma, nameće potrebu za primenom kombinovanog pristupa lečenju koji podrazumeva istovremeno delovanje na više signalnih puteva (Thaker i Pollack, 2009). Jedan od potencijalnih, vrlo obećavajućih, terapijskih pristupa, bio bi modulacija PI3K/Akt/PTEN/mTOR signalnog puta, čime bi mogla da se izbegne rezistencija glioma na postojeće agense (Fan i Weiss, 2010). Aktiviran Akt-om odnosno Ras putem, mTOR dalje prenosi proliferativni signal na ribozomalnu S6 kinazu i inhibira protein koji vezuje eukariotski inicijacioni faktor 4E, koji je neophodan za translaciju informacione RNK, odnosno za progresiju iz G1 u S fazu, što je neophodno za tumorsku proliferaciju (Newton, 2004).

Pokazano je da apigenin može da indukuje fosforilaciju AMPK, i posledično izvrši nishodnu regulaciju mTOR-a (Tong i sar., 2012), što dalje indukuje autofagiju, odnosno ćelijsku smrt (Meijer i Codogno, 2004).

Kako je ranije pokazano, dietil-etarski ekstrakt indukuje uglavnom apoptotsku ćelijsku smrt a deluje i antiproliferativno, indukujući blok ćelijskog ciklusa. Sa druge strane etil-acetatni ekstrakt ne indukuje direktno apoptozu niti nekrozu, već je smanjenje vijabiliteta uglavnom posledica zastoja u ćelijskom ciklusu u G₂M fazi. Međutim uočljiva je diskrepanca između stepena smanjenja vijabiliteta ćelija tretiranih ispitivanim ekstraktima i sposobnosti ova dva ekstrakta da izazovu apoptotsku ćelijsku smrt, odnosno zastoj u ćelijskom ciklusu. Iz tog razloga u C6 ćelijama je ispitivano prisustvo autofagije, kao alternativnog mehanizma ćelijske smrti.

Autofagija je proces autodigestije različitih ćelijskih komponenti, posredovan lizozomalnim enzimima, kojim se uklanjaju dugoživeći proteini i oštećene organele (Edinger i Thompson, 2004). Iako autofagija u ćeliji ima pre svega homeostatsku ulogu u fiziološkim uslovima, u određenim uslovima, naročito u situacijama kada ćelija ne može da umre apoptozom, autofagija može da bude alternativni mehanizam smrti, poznat kao programirana ćelijska smrt tipa II.

Kao početni korak u analizi uticaja ekstrakata i njihovih fenolskih komponenti na indukciju procesa autofagije, kvantifikovan je sadržaj kiselih citoplazmatskih vezikula, primenom pH senzitivne boje akridin oranža. Rezultati su pokazali da postoji dozno zavisni efekat indukcije porasta sadržaja kiselih citoplazmatskih vezikula nakon tretmana C6 ćelija glioma pacova sa oba ekstrakta (dietil-etarski i etil-acetatni), kao i sa obe fenolske komponente, apigeninom i luteolinom. Taj efekat je naročito bio izražen za etil-acetatni ekstrakt. Ovaj nalaz je potvrđen fluorescentnom mikroskopijom kojom se jasno uočava porast kiselog citoplazmatskog sadržaja u tretiranim ćelijama, a kvantifikovan je protočnom citometrijom. Međutim iako se ranije smatralo da je acidotropno bojenje (kakvo je i bojenje akridin oranžom) specifični marker autofagnih vakuola, kasnije je pokazano da nisu specifična za rane autofagozome, i da zapravo boje i kasne stadijume u degradacionom procesu (Bampton i sar., 2005). Autofagozomi nemaju kiseli pH i tek nakon spajanja sa lizozomom, kad nastane autofagolizozom, dolazi do pada pH vrednosti. Zbog toga je bilo neophodno autofagiju potvrditi i na druge načine. Sledeći korak je bio detekcija proteina LC3 (engl. *microtubule associated protein 1 light chain 3*- MCP1-LC3). Protein Atg 4 proteolitički deluje na LC3 na karboksiterminalnom kraju gradeći LC3-I, koji se kovalentno konjuguje sa fosfatidil-etanolaminom, gradeći LC3-II. LC3-II se specifično vezuje za kompleks Atg12-Atg5-Atg16 na fagofori i ostaje asociiran sa ograničavajućom mebranom, autofagozomom i autofagolizozomom (Rubinsztein i sar., 2009). Kod viših eukariota, LC3 je jedini protein koji je specifičan za autofagozome i autofagolizozome. Zbog toga nivoi LC3-II koreliraju sa brojem autofagozoma (Kabeya i sar., 2000).

U C6 ćelijama tretiranim dietil-etarskim ekstraktom ekspresija LC3-II je bila povećana tri puta u odnosu na kontrolu, dok u ćelijama tretiranim etil-acetatnim ekstraktom ekspresija bila veća 4,5 puta. Tretmani fenolskim komponentama takođe su značajno povećali ekspresiju LC3-II, a apigenin čak 8,5 puta više u odnosu na kontrolu. LC3-II se nalazi sa obe strane membrane autofagozoma. LC3-II prisutan na luminalnoj strani autofagozoma se

razgrađuje nakon fuzije sa lizozomima, dok LC3-II prisutan na citosolnoj strani može da se odvoji od lipida i reciklira (Mizushima i Yoshimori, 2007). U retkim slučajevima, porast LC3-II može biti posledica zastoja u njegovoj degradaciji. Ovaj zastoj se može javiti iz više razloga, kao što su sporo spajanje sa lizozomima, redukovana fuzija lizozoma i autofagozoma, ili pak smanjena proteolitička sposobnost lizozoma (Rubinsztein i sar., 2009). Zbog toga smo dalje pratili nivo ekspresije proteina p62, koji je selektivna meta autofagne degradacije (Ichimura i sar., 2008). U C6 ćelijama tretiranim sa oba ekstrakta, kao i sa obe fenolske komponente, došlo je do smanjene ekspresije p62 proteina, što potvrđuje autofagijom posredovanu proteolizu i isključuje mogućnost bloka u autofagnom procesu (Wang i sar., 2006.).

Nivoi beklina 1, veoma važnog proautofagnog proteina bili su jasno povećani u C6 ćelijama tretiranih etil-acetatnim ekstraktom, apigeninom i luteolinom. Beklin 1 ima veoma važnu funkciju u indukciji autofagije s jedne strane, a sa druge strane značajan je jer stoji na raskršću puteva između apoptoze i autofagije. Naime, Bcl-2 i Bcl-xl proapoptotski proteini, se vezuju za BH3 domen beklina 1 i inhibiraju njegovu aktivnost. Šta više beclin 1 može biti razgrađen delovanjem kaspaza, što obezbeđuje dodatnu komunikaciju između autofagije i apoptoze (Kang i sar., 2011).

Redukovana ekspresija LC3B-II i beklina 1 utvrđena je u astroglijalnim humanim tumorima. Step en ekspresije bio je u korelaciji sa gradusom tumora, tumorskom progresijom i dužinom preživljavanja pacijenata (Huang i sar., 2010). Imajući u vidu tu činjenicu, može se zaključiti da se makar delom, citotoksično delovanje *Sideritis scardica* ekstrakata na gliomske ćelije može pripisati njihovoj sposobnosti da vrše ushodnu regulaciju beklina 1 i LC3-II proteina.

Dalje je ispitivana aktivacija glavnih signalnih puteva, koji mogu da budu uključeni u proces autofagije, ali i proces nastanka glioma. Aktivacija Akt-a posredstvom fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) je glavni put prenosa signala poreklom od faktora rasta. PI3K utiče na rast ćelija tumora, proliferaciju, može biti asocirana sa rezistencijom na apoptozu i znak je loše prognoze za

pacijente obolele od glioma (Chakravart i sar., 2004). Nakon aktivacije PI3K nastaje fosfatidil-inozitol 3-fosfat (PIP3), koji dovodi do translokacije i aktivacije Akt-a. Aktivirani Akt fosforiliše nekoliko proteina koji su uključeni u preživljavanje ćelije i ćelijski rast, kao što su Bad, mTOR, kinaza glikogen sintaze (Cross i sar., 1995, Cardone i sar., 1998). Tretman C6 ćelija dietil-etarskim ekstraktom nije doveo do aktivacije Akt-a, niti do posledične aktivacije mTOR-a. Etil-acetatni ekstrakt takođe nije aktivirao Akt, ali je u tretiranim ćelijama došlo do aktivacije mTOR-a, što ipak u krajnoj liniji nije dovelo do supresije autofagije. Apigenin i luteolin su u značajnoj meri aktivirali Akt, kao i mTOR. Imajući u vidu ove činjenice, možemo da zaključimo da i ekstrakti i njihove glavne fenolske komponente indukuju Akt/mTOR nezavisnu autofagiju. Činjenica da apigenin i luteolin aktiviraju mTOR, može da bude jedan od nepovoljnih efekata kad je u pitanju njihovo antigliomsko delovanje. Za razliku od njih, ekstrakti *S. Scardica*-e slabo aktiviraju ili uopšte ne aktiviraju mTOR, što znači da njihov uticaj na Akt-PI3K signalni put ne zavisi samo od prisustva fenolskih komponenti, već da i njihove druge aktivne komponente mogu da igraju značajnu ulogu. Ekspresija AMPK, jednog od glavnih inhibitora mTOR-a, bila je umereno povećana u ćelijama tretiranim dietil-etarskim ekstraktom, dok je u ćelijama tretiranim etil-acetatnim ekstraktom, apigeninom i luteolinom bila značajno smanjena. Razlika u ekspresiji AMPK bi mogla da objasni činjenicu da jedino u ćelijama tretiranim dietil-etarskim ekstraktom nije došlo do aktivacije mTOR-a.

Kao što je već objašnjeno ekstrakti *S. scardica*-e, kao i njihove glavne fenolske komponente mogu da indukuju smrt gliomskih ćelija na više načina. Očigledno je da deluju na više signalnih puteva, što može biti veoma važno za proučavanje odnosno razvijanje strategije za sprečavanje rezistencije tumorskih ćelija na primenjene hemioterapeutike. Bez obzira na to da li će preparati *S. scardica*-e u budućnosti postati deo hemioterapijskih protokola, njihov mehanizam citotoksičnosti može da bude odličan model kombinovanog hemioterapijskog pristupa.

Standardna procedura lečenja glioma uključuje kombinovanje više hemioterapijskih agenasa, zračenje i hirurško lečenje. Mnogi od primenjivanih hemioterapijskih agenasa svoje delovanje ostvaruju posredstvom oštećenja DNK. UV zračenje je često korišćeni model DNK oštećenja i mi smo dalje ispitivali kako ekstrakti *S. scardica*-e utiču na oštećenje ćelija izazvano UV zracima. Dietil-etarski i etil-acetatni ekstrakt *S. scardica*-e, kao i njihove fenolske komponente, apigenin i luteolin, primenjeni u koncentracijama koje za C6 ćelije nisu bile citotoksične, potencirali su delovanje UV zračenja na ćelije glioma. Međutim, ekstrakti i fenolske komponente primenjene u istim koncentracijama, delovale su protektivno na primarne astrocite ozračene UV zracima.. Dakle, ekstrakti *S. scardica*-e potencijalno bi mogli da ispolje dvostruko korisno dejstvo u tretmanu tumora, tako što sa jedne strane potenciraju delovanje agenasa koji oštećuju DNK na tumorske ćelije, a sa druge strane štite netumorske ćelije od DNK oštećenja.

Pored interakcije sa UV zračenjem, ispitan je i efekat udruženog delovanja dietil-etarskog i etil-acetatnog ekstrakta tj. njihovih fenolskih komponenti sa karmustinom, često upotrebljavanim lekom u terapiji glioma. Ekstrakti su, primenjeni u subtoksičnim koncentracijama (25 i 50 µg/ml) umanjili toksične efekte karmustina prema C6 ćelijama. Međutim, inhibitorni efekat apigenina i luteolina iako prisutan, nije bio statistički značajan, tako da se može pretpostaviti da su druge supstance prisutne u ekstraktima (verovatno neke od fenolskih komponenti) odgovorne većim delom za inhibitorni efekat na citotoksičnost karmustina. Ovi podaci mogu da imaju veoma veliki praktičan značaj. Mnogi pacijenti oboleli od različitih malignih tumora često koriste alternativne metode lečenja, koje uključuju i primenu različitih biljaka. Imajući u vidu široko prisustvo različitih flavonoida u biljnom svetu, to bi moglo da utiče na smanjenje efikasnosti terapije glioma, kod pacijenata koji su na terapiji karmustinom.

Maligni tumori su globalni rastući zdravstveni problem. Iako danas postoje brojni modaliteti lečenja, izlečenje još uvek nije dostupan cilj za većinu obolelih. Zbog toga se sve više napora ulaže u prevenciju malignih tumora.

Pored usvajanja zdravih stilova života, primena hemopreventivnih agenasa u budućnosti bi mogla da bude racionalan pristup za određene populacije pacijenata. Postoje jasni podaci da flavonoidi deluju kao hemopreventivni agensi i da ispoljavaju brojna antikancerska svojstva. To može biti veoma značajno, jer multipli mehanizmi delovanja smanjuju mogućnost rezistencije tumora. *Sideritis scardica*, bogata flavonoidima, za koju smo jasno pokazali antitumorsko delovanje na više ćelijskih linija, mogla bi da se svrsta u tzv. funkcionalnu hranu i bude jeftin i lako dostupan izvor hemopreventivnih flavonoida.

6. ZAKLJUČAK

1. Ekstrakti *Sideritis scardica*, pokazuju značajno citotoksično delovanje na C6, B16 i HL-60 ćelije u *in vitro* uslovima, dok nisu toksični za primarne astrocite pacova i humane mononuklearne ćelije iz periferne krvi
2. U osnovi citotoksičnog delovanja *S. scardica* ekstrakata nalaze se fenolske komponente, apigenin i luteolin
3. Mehanizam citotoksičnosti je kompleksan i uključuje indukciju oksidativnog stresa, zastoj u ćelijskom ciklusu, indukciju apoptoze i autofagiju nezavisnu od AMPK/Akt/mTOR signalnog puta
4. Dietil-etarski i etil-acetatni ekstrakt smanjuju citotoksično delovanje karmustina na ćelije C6 glioma
5. Ekstrakti *S. scardica*, apigenin i luteolin, potenciraju citotoksično delovanje UV zračenja na C6 ćelije, dok primarne astrocite štite od delovanja UV zračenja

7. LITERATURA

1. Alcaraz M.J., Jiménez M.J. Protective effects of hypolaetin-8-glucoside on the rat gastric mucosa. *Prog Clin Biol Res.* 1988; 280:183-6.
2. Alfadda A.A., Sallam R.M. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 936486. Epub 2012 Aug 8.
3. Amin A., Kucuk O., Khuri F., Shin D. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2712-25.
4. Aoki H., Takada Y., Kondo S., Sawaya R., Aggarwal B.B., Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular Pharmacology* 2007; 72, 872 29–39.
5. Badovinac V., Trajkovic V., Mostarica-Stojkovic M. Nitric oxide promotes growth and major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of interleukin-2-activated rat lymphocytes. *Scand J Immunol* 2000; 52: 62–70.
6. Bai L., Zhu W.G: p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol* 2006, 2(4):141-153.
7. Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 2000; 7:39-58.
8. Bampton ET, Goemans CG, Niranjana D, Mizushima N, Tokkovsky AM. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* 2005; 1:23–36.
9. Baser K. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry* 2002; 74: 527–45.
10. Basile A., Senatore F., Gargano R., Sorbo S., Del Pezzo M., Lavitola A., Ritieni A., Bruno M., Spatuzzi D., Rigano D., Vuotto M.L. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 107: 240–8.
11. Berenblum I.: The modifying influence of dichloroethyl sulphide on the induction of tumours in mice by tar. *J Pathol Bacteriol* 1929; 32:425-434.

12. Bhaskar P., Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 2007; 12: 487 – 502.
13. Birt D.F., Hendrich S., Wang W. Dietary agents in cancer prevention Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 2001; 90:157-77.
14. Block G., Patterson B., Suber A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992; 18:1-29.
15. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199–1200.
16. Bojović D., Janković S., Potpara Z., Tadić V. Summary of the phytochemical research performed to date on sideritis species. *Ser J Exp Clin Res* 2011; 12(3): 109-22.
17. Boya P., Gonzalez-Polo R., Casares N., et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1025 – 40.
18. Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.L., Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., Greenberg M.E., 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 906 2011–2015.
19. Bu-Abbas A., Clifford M.N., Walker R., Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 1998; 36:617-21.
20. Bursch W., Ellinger A., Kienzl H., et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996; 17:1595 – 607.
21. Caltagirone S., Rossi C., Poggi A., Ranelletti F.O., Natali P.G., Brunetti M., Aiello F.B., Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer*. 2000; 87(4):595-600.
22. Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282:1318–1321.
23. Casagrande F., Darbon J.M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-

- dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:1205-15.
24. Catalan-Uribarrena, G. Prognostic factors and survival in a prospective cohort of patients with high-grade glioma treated with carmustine wafers or temozolamide on an intention-to-treat basis. *Acta Neurochirurgica* 2012; 154, 211-222.
 25. Celik S., Karabacak E., Uysal I. Plant have been collected from mythological Kazdagi (Mt. Ida) National Park, West Turkey by turkmens and their folk, cultural and social uses. *Eur J Scien Res* 2008; 19: 835-43.
 26. Celik I., Kaya S. The antioxidant role of *Sideritis caesarea* infusion against TCA toxicity in rats. *B J of Nut* 2010; 16: 1-6.
 27. Chakravarti A., Zhai G., Suzuki Y., et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J. Clin. Oncol* 2004; 22:1926-1933.
 28. Chen Z., Naito M., Hori S., Mashima T., Yamori T., Tsuruo T. A human IAPfamily gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:847-854.
 29. Choi J.A., Kim J.Y., Lee J.Y., Kang C.M., Kwon H.J., Yoo Y.D., et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 2001; 19:837-44.
 30. Chou T.C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.
 31. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(6):569-90.
 32. Council of Europe. Determinations of tannins in herbal drugs. In: *European Pharmacopoeia 6.0*, edition no. 6, Volume 1. Strasbourg: Council of Europe 2004; 255
 33. Cross D., Alessi D., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-789.
 34. Dashwood W.M., Carter O., Al-Fageeh M., Li, Q. Dashwood R.H. Lysosomal trafficking of beta-catenin induced by the tea polyphenol epigallocatechin- gallate. *Mutation Research* 2005; 591, 161-172.

35. Demirtas I., Sahin A., Ayhan B., Tekin S., Telci I., Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Records of Natural Products* 2009; 3: 104–109.
36. Devarajan E., Sahin A.A., Chen J.S., Krishnamurthy R.R., Aggarwal N., Brun A.M., Sapino A., Zhang F., Sharma D., Yang X.H., Tora A.D., Mehta K Downregulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002; 21(57):8843-8851.
37. Devika P.T., Prince P.S. Preventive effect of (–)epigallocatechin-gallate (EGCG) on lysosomal enzymes in heart and subcellular fractions in isoproterenol-induced myocardial infarcted Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 2008; 172, 245–252.
38. Dewson G., Kluc R.M. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton* 2010; 2:9-22.
39. Diklić N. Genus *Sideritis* L. In: *Flora of Serbia*. Josifović M, editor. Serbian academy of Science and Art; 1974; (4): 371-372.
40. Ding W., Ni H., Gao W., et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 2007; 282:4702 – 10.
41. Dontas I.A. Protective effect of *Sideritis Euboea* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *2011 Menopause*. 2011;(8):915-22.
42. Edinger A., Thompson C. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:663 – 9.
43. Fan Q.W., Weiss W.A. Targeting the RTK-PI3K-mTOR axis in malignant glioma: overcoming resistance. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2010; 347, 279-296.
44. Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18: 7719–7730.
45. Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005; 73(4):1907-1916.
46. Franklin J. Redox Regulation of the Intrinsic Pathway in Neuronal Apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(8):1437-48.

47. Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K.M. Chemosensitivity of solid tumour cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* 1998; 76(1):105-114.
48. Fulda S: Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol* 2010; 2010:370835.
49. Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:178-194.
50. Gil M., Ferreres F., Marrero A., Tomas-Lorente F., Tomas-Barberan F. Distribution of flavonoid aglycones and glycosides in *Sideritis* species from the Canary Islands and Madeira. *Phytochemistry* 1993; 34: 227-32.
51. Glade M.J. Food, nutrition, and the prevention of cancer: A global perspective: American Institute for Cancer Res/World Cancer Res Fund, American Institute for Cancer Res, Nutrition 1999; 15:523-526.
52. Godo A., de Heras B.L., Vivas J.M., Villar A. Anti-Inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*. *Biol Pharm Bull.* 2000; 23(10):1193-7.
53. Gomez-Serranillos P., Cerretero E., Slowing K., Palomino O.M., Villarrubia A.I., Villar A. HPLC quantitative analysis of diterpenoids in *Sideritis* (Labiatae) species. *Phytother Res* 1998; 12: 101-3.
54. González-Burgos E., Carretero M.E., Gómez-Serranillos M.P. *Sideritis* spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities--a review. *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(2):209-25.
55. Goolsby C., Paniagua M., Tallman M., Gartenhaus R.B. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 63(1):36-46.
56. Gordon P.B., Holen I., Seglen P.O. Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(11):5830-8
57. Gossner G., Choi M., Tan L., Fogoros S., Griffith K.A., Kuenker M., Liu, J.R. Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* 2007;105, 1034: 23-30.

58. Guillon-Munos A., VanBemmelen M., Clarke P. Autophagy can be a killer even in apoptosis-competent cells. *Autophagy* 2006; 2:140 – 2.
59. Gupta S. Prostate cancer chemoprevention: current status and future prospects. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:369–76.
60. Hardie D. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:774 – 81.
61. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, 2005; 8, 179–183.
62. He C., & Klionsky D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 2009; 43, 67–93.
63. Hengartner M.O. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 2000; 104: 325-328.
64. Hernández-Pérez M., Rabanal Gallego R.M. Analgesic and antiinflammatory properties of *Sideritis lotsyi* var. *Mascaensis*. *Phytother Res.* 2002; 16(3):264-6.
65. Hernández-Pérez M., Sánchez-Mateo C.C., Montalbetti-Moreno Y., Rabanal R.M. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. *J Ethnopharmacol.* 2004; 93(2-3):279-84.
66. Hodek P., Trefil P., Stiborova M. Flavonoids- Potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact* 2002; 139:1-21.
67. Horwitz S.B. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of Oncology*,1994; 6, 3-6.
68. Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., Sinclair D.A., Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425, 1075 191–196.
69. Hoyer-Hansen M., Jaattela M. AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy* 2007; 3:381 – 3.
70. Huang X., Bai H.M., Chen L., Li B., & Lu Y.C. Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2010; 17, 1515-1519.

71. Ichimura Y., Kumanomidou T., Sou Y.S., Mizushima T., Ezaki J., Ueno T. et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283, 22847–22857.
72. Iscan G., Kirimer N., Kurkcuglu M., Baser K.H.C. Composition and antimicrobial activity of essential oils off two endemic species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. *Chem Nat Comp* 2005; 41: 679-82.
73. Ishige K., Schubert D., Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2001; 15; 30(4):433-46.
74. Ivancheva S., Stantcheva B. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *J Ethnopharmacol.* 2000; 69(2):165-72.
75. Iwashita K., Kobori M., Yamaki K., Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64:1813-20.
76. Iwashita K., Kobori M., Yamaki K., Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64(9):1813-20.
77. Jemal A., Siegel R., Ward E., et al: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
78. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.
79. Kang C., Avery L. To be or not to be, the level of autophagy is the question. *Autophagy* 2008; 4:82 – 4.
80. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011; 18(4): 571–580.
81. Kargioglu M., Cenkci S., Serteser A., Evliyaoglu N., Konuk M., Samil Kok M., Bagci Y. An ethnobotanical survey of Inner-West Anatolia, Turkey. *Human Ecology* 2008; 36, 763–77.
82. Kassi E., Papoutsis Z., Fokialakis N., Messari J., Mitakou S., Moutsatsou P. Greek plants extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6956-61.

83. Katayama M., Kawaguchi T., Berger M., Pieper R. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2007; 14:548 – 58.
84. Kažić T. Lekovi protiv neoplazmi u Gotovi lekovi. Integra 2011, Beograd, Srbija.
85. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
86. Kirimer N., Demirci B., Iscan G., Baser K.H.C., Duman H. Composition of the essential oils of two *Sideritis* species from Turkey and antimicrobial activity. *Chem Nat Comp* 2008; 44: 121-3.
88. Kirimer, N., Baser, K.H.C., Demirci, B., Duman, H., Essential oils of *Sideritis* species of Turkey belonging to the section *Empedoclia*. *Chemistry of Natural Compounds* 2004; 40: 19–23.
89. Koleva I., Linssen J.P.H., van Beek T.A., Evstatieva L.N., Kortenska V., Handjieva N. Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (*Labiatae*) grown in Bulgaria. *J Sci Food Agric* 2003; 83: 809-19.
90. Konig A., Schwartz G.K., Mohammad R.M., Al-Katib A., Gabrilove J.L. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. *Blood* 1997; 90:4307-12.
91. Kostadinova E., Nikolova D., Alipieva K., Stefova M., Stefkov G., Evstatieva L., Matevski V., Bankova V. Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss and Heldr. from Bulgaria and Macedonia. *Nat Prod Res.* 2007 ; 21(9):819-23.
92. Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenberghe P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 12:1463-1467.
94. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87(1):99-163.
95. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976; 24:117-91.

96. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C. Robins and Cotran: pathologic basis of disease. 8 edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010; 25-32.
97. Küpeli E., Sahin F.P., Caliş I., Yeşilada E., Ezer N. Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(2):356-60.
98. Küpeli E., Sahin F.P., Yeşilada E., Caliş I., Ezer N. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Z Naturforsch C.* 2007; 62(7-8):519-25.
99. LaCasse E.C., Mahoney D.J., Cheung H.H., Plenchette S, Baird S, Korneluk RG: IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008; 27(48):6252-6275.
101. Lane D.P. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.
102. Lavrik I., Golks A., Krammer P.H. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005; 118:265-267.
103. Lee I.H., Cao L., Mostoslavsky R., Lombard D.B., Liu J., Bruns N.E., Tsokos M., Alt F.W., Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105, 3374–3379.
104. Leone M., Zhai D., Sareth S., Kitada S., Reed J.C., Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Research* 2003; 63, 8118–8121.
105. Lepley D.M., Li B., Birt D.F., Pelling J.C. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis.* 1996; 17(11):2367-75.
106. Leporatti M.L., Impieri M. Ethnobotanical notes about some uses of medicinal plants in Alto Tirreno Cosentino area (Calabria, Southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomed.* 2007; 3:34.
107. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132:27 – 42.
108. Linardaki Z., Papandreou A., Iatrou G., Lamari N., Margarity M. Antioxidant response of brain regions in adult mice after daily

- consumption of herbal tea from *Sideritis clandestina*. *Planta Medica* 2008; 74: 999–1009.
109. Lippman S.M., Hong W.K. Cancer prevention science and practice. *Cancer Res* 2002; 62:5119–25.
110. Lopes R.B., Gangeswaran R., McNeish I.A., Wang Y., Lemoine N.R. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer* 2007; 120(11):2344-2352.
111. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
112. Makita H., Tanaka T., Fujitsuka H., Tatematsu N., Satoh K., Hara A., et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res* 1996; 56:4904-9.
113. Marchand L.L., Murphy S.P., Hankin J.H., Wilkens L.R., Kolonel L.N. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:154-60.
114. Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 961 – 7.
115. Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research* 2010; 20, 1192 748–762.
116. Meijer A.J., & Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36, 2445–2462.
117. Menghini L., Massarelli P., Bruni G., Menghini A. Preliminary evaluation on anti-inflammatory and analgesic effects of *Sideritis syriaca* L. herba extracts. *J Med Food*. 2005; 8(2):227-31.
118. Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Radovic J., Miljkovic D., Harhaji L., Vuckovic O., Stosic-Grujicic S., Mostarica Stojkovic M., Trajkovic V. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 589–98.
119. Minn A.J., Rudin C.M., Boise L.H., Thompson CB. Expression of Bcl-XL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995; 86:1903-1910.

120. Minn A.J., Vélez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., Thompson C.B.: Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385(6614):353-357.
121. Mizushima N., Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007;3:542-5
122. Moolgavkar S.H., The multistage theory of carcinogenesis and the age distribution of cancer in man. *J Natl Cancer Inst*, 1978; 61(1): 49-52.
123. Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K., Komatsu H., Enya T., Matsushima H.Y., et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91:686-91.
124. Nakatogawa H., Suzuki K., Kamada Y., Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:458-467.
125. Navarro A., De las Heras B., Villar A. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24(5):470-3.
126. Navarro A., de las Heras B., Villar A.M. Andalusol, a diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Sideritis foetens* Clemen. *Z Naturforsch C.* 1997; 52(11-12):844-9.
127. Newton H. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2004; 4(1):105-128.
128. O'Brien M.A., Kirby R. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care* 2008; 18(6):572-585.
129. Oren M., Rotter V. Introduction: p53—the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:9-11
130. Pang L., de las Heras B., Hoult J.R. A novel diterpenoid labdane from *Sideritis javalambrensis* inhibits eicosanoid generation from stimulated macrophages but enhances arachidonate release. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51(6):863-8.

132. Petreska J., Stefkov G., Kulevanova S., Alipieva K., Bankova V., Stefova M. Phenolic compounds of mountain tea from the Balkans: LC/DAD/ESI/MSn profile and content. *Nat Prod Commun.* 2011; 6(1):21-30.
133. Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A., The diterpenoids from the genus *Sideritis*. *Studies in Natural Products Chemistry* 2006; 33: 493–540.
134. Qian W., Liu J., Jin J., Ni W., Xu W. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via upregulation of Beclin-1. *Leuk Res* 2007; 31:329 – 39.
135. Raffo A.J., Perlman H., Chen M.W., Day M.L., Streitman J.S., Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995; 55:4438.
136. Reddy L., Odhav B., Bhoola K.D.: Natural products for cancer prevention: A global perspective. *Pharmacol Ther* 2003; 99:1-13.
137. Reed J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies. *Semin Haematol* 1997; 34:9-19.
138. Reef S., Zalckvar E., Shifman O., et al. A short mitochondrial form of p10ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell* 2006; 22:463 – 75.
139. Rice-Evans C.A., Miller N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24(3):790-5.
140. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933–956.
141. Rivera D., Obón C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *J Ethnopharmacol.* 1995; 46(2):73-93.
142. Rong Y., Yang E.B., Zhang K., Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res* 2000; 20:4339-45.

143. Rubinsztein D.C., Cuervo A.M., Ravikumar B., Sarkar S., Korolchuk V., Kaushik S., Klionsky D.J. In search of an "autophagometer". *Autophagy*. 2009; 5(5):585-9.
145. Sagdic O., Aksoy A., Ozkan G., Ekici L., Albayrak S. Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008; 9: 80-4.
146. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 2002; 177(1):67-80.
147. Sauter B., Albert M.L., Francisco L., Larsson M., Somersan S., Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 423-434
148. Scherz-Shouval R., Snavets E., Fass E., Shorer H., Gil L., Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26:1749 - 60.
149. Seglen P.O., Gordon P.B., Holen I. Non-selective autophagy. *Semin Cell Biol* 1990; 1: 441-448.
150. Senderowicz A.M. Flavopiridol. The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs* 1999; 17:313-20.
151. Sengupta A., Molkenin J.D., Yutzey K.E. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284, 1313: 28319-28331.
152. Shen X.G., Wang C., Li Y., Wang L., Zhou B., Xu B., Jiang X., Zhou Z.G., Sun X.F. Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Dis* 2010; 12(12):1213-1218
153. Silva M.T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett.* 2010; 584(22):4491-9.
154. Singletary K., Milner J. Diet, autophagy, and cancer: a review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2008; 17 (7), 1596-1610.

155. Skouroliakou M., Katsanidou O., Stathopoulou M., Vourli G. Evaluation of the antioxidant effect of a new functional food enriched with *Sideritis euboica* in healthy subjects. *J Med Food* 2009; 12: 1105–10.
157. Spencer J., Mohsen M., & Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004; 423, 148–161.
158. Sporn M.B., Dunlop N.M., Newton D.L. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35:1332-1338.
159. Sporn M.B., Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer Res*, 1991; 51:23: 6215-8.
160. Sukardiman, Darwanto A., Tanjung M., Darmadi M.O. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 23:185-90.
161. Sun X.Y., Plouzek C.A., Henry J.P., Wang T.T., Phang J.M. Increased UDP-glucuronosyl transferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58:2379-84.
162. Surh Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:768-80.
- 163.¹Tadić V., Bojović D., Arsić I., Dorđević S., Aksentijević K., Stamenić M., Janković S. Chemical and antimicrobial evaluation of supercritical and conventional *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae extracts. *Molecules*. 2012; 17(3):2683-703.
- 164.²Tadić V.M., Jeremić I., Dobrić S., Isaković A., Marković I., Trajković V., Bojović D., Arsić I. Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Med*. 2012; 78(5):415-27.
165. Thaker N.G., Pollack I.F. Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2009; 9, 1815-1836.

166. Tong X., Smith K.A., Pelling J.C. Apigenin, a chemopreventive bioflavonoid, induces AMP-activated protein kinase activation in human keratinocytes. *Mol Carcinog* 2012; 51(3):268-79.
167. Touhey S., Heenan M. Cell culture. In: Davey J, Lord JM, editors. *Essential cell biology*. Oxford: Oxford University Press; 2003.
169. Trajković V., Badovinac V., Popadić D., Hadzić O., Stojković M.M. Cell-specific effects of pentoxifylline on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase mRNA expression. *Immunology*. 1997;92(3):402-6.
170. Tsaknis J., Lalas S. Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis euboea* (Mountain tea). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 6375-81.
171. Tsang C., Qi H., Liu L., Zheng X. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007; 12:112 – 24.
172. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12):1231-46.
173. Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M.: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-1099.
174. Tsyrllov I.B., Mikhailenko V.M., Gelboin H.V. Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1205:325-35.
175. Tunalier Z., Kosar M., Ozturk N., Baser K., Duman H., Kirimer N. Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species. *Chemistry of Natural Compounds* 2004; 40: 206–10.
176. Ulrich S., Wolter F., Stein J.M. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49(5):452-61.
177. Velioglu Y.S., Mazza Gao L., Oomah B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4113–4117.
178. Villar A., Gasco M.A., Alcaraz M.J. Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *J Pharm Pharmacol*. 1984; 36(12):820-3.

179. Vucic D., Fairbrother W.J. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13(20):5995-6000.
180. Wang Q.J., Ding Y., Kohtz D.S., Mizushima N., Cristea I.M., Rout M.P., Chait B.T., Zhong Y., Heintz N., Yue Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* 2006; 26:8057-68.
181. Wei Y., Fan T., Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008; 40(4):278-288.
182. Wen M., Wu J., Luo H., Zhang H. Galangin induces autophagy through upregulation of p53 in HepG2 cells. *Pharmacology*. 2012; 89(5-6):247-55.
183. Wibo M., & Poole B. Protein degradation in cultured cells. II. The uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsin B1. *Journal of Cell Biology*, 1974; 63, 430-440.
184. Yeşilada E., Honda G., Sezik E., Tabata M., Fujita T., Tanaka T., Takeda Y., Takaishi Y. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmacol*. 1995; 46(3):133-52.
185. Yin F., Giuliano A.E., Van Herle A.J. Signal pathways involved in apigenin inhibition of Growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res* 1999; 19: 4297-4303.
186. Yorimitsu T., & Klionsky D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation* 2005; 12, 1542-1552.
187. Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36(5):592-604.
188. Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A., Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15077 – 82.
189. Zarzuelo A., Garcia E., Jimenez J., Ocete M.A., Utrilla P., Socoro O. Antiinflammatory and anti-ulcerative activity of hypolaetin-8-glucoside. *Phytother Res* 1988; 2: 85-8.

190. Zhang X., Tang X., Liu H., Li L., Hou Q., Gao J. Autophagy induced by baicalin involves downregulation of CD147 in SMMC-7721 cells in vitro. *Oncol Rep.* 2012; 27(4):1128-34.
191. Zi X., Feyes D.K., Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1055-64.
192. Ziegler U., Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004; 19:124-128.

Biografija

Dr Ivica Jeremić je rođen 16.12.1980. u Jagodini. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je školske 2000/01, a diplomirao je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,97 kao student generacije. Specijalističke akademske studije iz oblasti imunologije na Medicinskom fakultetu upisao je školske 2007/08 godine, a specijalistički akademski rad pod nazivom: "Značaj određivanja antitela na antigene hromatina i C1q komponentu komplemента kod pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom", odbranio je 18.06.2008. godine pre komisijom u sastavu: prof. dr Mirjana Bogić, predsednik, prof. Sanja Simić Ogrizović, član i prof. dr Branka Bonači Nikolić, mentor. Od marta 2007. do januara 2009. godine bio je zaposlen na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kao saradnik u nastavi. Od januara 2009. zaposlen je na Institutu za reumatologiju, prvo kao klinički lekar, a od aprila 2014. godine kao lekar na specijalizaciji iz interne medicine.

U periodu 2007.-2010. godine bio je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, projekat br. 145058: "Molekularni mehanizmi regulacije ćelijske smrti u fiziološkim i patološkim uslovima", rukovodioca akademika Vladimira Bumbaširevića. Od 2011. godine je saradnik na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: "Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski bilans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja" čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković i "Klinički značaj poremećaja urođene i stečene imunosti kod imunoinflamatornih i imunodeficitnih stanja,, čiji je rukovodilac prof. dr Miloš Nikolić.

Po završenim redovnim studijama, 2006. godine, proveo je 4 meseca na usavršavanju u Vajcmanovom instiutu i Izraelu, u laboratoriji profesora Davida Valaha, gde je radio na projektu: „Uloga kaspaze 8 u razvoju kože,,.

Autor je većeg broja publikacija od kojih su 4 publikovane u časopisima indeksiranim u *Current contents*-u (CC).

Član je Evropske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju-EAACI, udruženja reumatologa Srbije-URES, društva za neuronauke Srbije, Evropske federacije za neuronauke-FENS i EMEUNET-a.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Ivica Jeremić

broj upisa _____

Izjavljujem

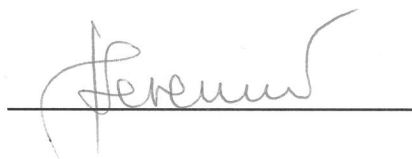
da je doktorska disertacija pod naslovom

Citotoksično dejstvo ekstrakata biljke Sideritis scardica na tumorske ćelije u in vitro uslovima

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.02.2013.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ivica Jeremić

Broj upisa _____

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada Citotoksično dejstvo ekstrakata biljke Sideritis scardica na tumorske ćelije u in vitro uslovima

Mentor Prof. dr Aleksandra Isaković

Komentor dr Vanja Tadić, naučni savetnik

Potpisani Ivica Jeremić

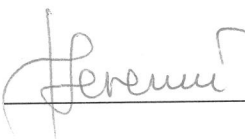
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.02.2013.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Citotoksično dejstvo ekstrakata biljke Sideritis scardica na tumorske ćelije u in vitro uslovima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.02.2013.

