

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nemanja S. Stanisavljević

**KARAKTERIZACIJA I *IN VITRO*  
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI FENOLNIH  
JEDINJENJA GRAŠKA  
(*Pisum sativum* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nemanja S. Stanisavljević

**CHARACTERIZATION AND *IN VITRO*  
BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PHENOLIC  
COMPOUNDS FROM PEA (*Pisum  
sativum* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

**MENTORI DOKTORSKE DISERTACIJE:** prof dr Svetlana Radović, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Živko Jovanović, naučni saradnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

**ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:**

1. Prof. dr Svetlana Radović, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Dr Živko Jovanović, naučni saradnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.
3. Dr Maja Natić, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Dr Ivana Matić, naučni saradnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

**DATUM ODBRANE:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentorima i članovima komisije za odbranu doktorske disertacije. Zahvalnost dugujem kolegama iz IMGGI, kao i kolegama sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije koji su pomogli izradu ove disertacije. Takođe se zahvaljujem i dr Tihomiru Čupiću iz Poljoprivrednog instituta Osijek koji je selekcionisao i umnožio semenski materijal korišćen u eksperimentima.



# KARAKTERIZACIJA I *IN VITRO* BIOLOŠKE AKTIVNOSTI FENOLNIH JEDINJENJA GRAŠKA (*Pisum sativum* L.)

## REZIME

Porodica mahunarki (*Fabaceae*) obiluje ekonomski i poljoprivredno značajnim vrstama među kojima se po zastupljenosti gajenja u Srbiji izdvaja grašak (*Pisum sativum* L.) sa udelom od 4,5% u ukupnoj povrtarskoj proizvodnji. Semenjače graška, posebno genotipova sa izrazito pigmentisanim tamnim semenima predstavljaju značajan izvor fenolnih jedinjenja čiji su sastav i biološke aktivnosti nedovoljno ispitani, te stoga ni potencijal ovog materijala nije iskorišćen na odgovarajući način. Semenjače graška čine i do 10% suve mase semena i uglavnom predstavljaju otpadni materijal koji nastaje u procesu industrijske izolacije proteina semena koji se koriste u humanoj i animalnoj ishrani. U ovom radu je ispitivan sadržaj fenolnih jedinjenja prisutnih u semenjačama deset evropskih genotipova graška kao i njihove biološke aktivnosti. Pored toga je ispitivan i uticaj različitih rastvarača, termičke obrade i *in vitro* digestije semena graška na prinos fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata.

Dobijeni rezultati su pokazali da termički tretman i *in vitro* digestija dovode do statistički značajnog povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja, kako u vodenim ekstraktima semena graška tako i u ekstraktima pripremljenim pomoću organskog rastvarača. Utvrđeno je da peptidi koji nastaju u toku *in vitro* digestije proteina semena graška mogu značajno interferirati sa testovima za određivanje antioksidativne aktivnosti, pogotovo u vodenim rastvorima, pošto i sami poseduju detektabilne antioksidativne aktivnosti. Pokazano je da kombinacija rastvarača koja sadrži 70% acetona, 29% destilovane vode i 1% sirćetne kiseline najpodesnije sredstvo za ekstrakciju ukupnih fenola iz semenjače graška, koje daje najveći prinos kako kod genotipova sa bledom, tako i kod genotipova sa izrazito tamno pigmentisanom semenjačom. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom pomenutog rastvarača se kod pojedinih genotipova (Assas, MBK 168 i Aslaug) kretao u opsegu 41,8-46,6 mg GAE/ g s.m., što su najviše do sada zabeležene vrednosti kod graška. Isti genotipovi su ujedno sadržali najviše taninskih materija i antocijanina i pokazivali su najizraženije sposobnosti uklanjanja DPPH radikala i redukcije Fe<sup>3+</sup> jona. Analizom ekstrakata semenjača pomoću UHPLC–LTQ OrbiTrap MS tehnike

identifikovano je 25 najzastupljenijih fenolnih jedinjenja i tom prilikom je detektovano 9 jedinjenja čije prisustvo do sad nije bilo zabeleženo u semanjačama graška. Prvi put je detektovano prisustvo flavanona hrizina, hesperetina, naringenina i naringina kao i flavanola katehin galata i galokatehin galata. Takođe su detektovane i manje količine morina, galangina i ruzmarinske kiseline kod većine genotipova. Analiza glavnih komponenata (PCA) je pokazala da se na osnovu sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja kao i antioksidativnih aktivnosti ekstrakata ispitivani genotipovi mogu svrstati u dve glavne grupe. Prvu grupu čine genotipovi sa bledo pigmentisanim semenjačama Golf, Törsz i MBK 88, u drugoj grupi se nalaze genotipovi sa tamnom semenjačom Aslaug, Assas, Dora, Poneka, MBK 168 i MBK 173, dok je genotip MBK 90 bio van pomenutih grupa. Ono što je značajno istaći je da raspodela genotipova na osnovu PCA analize odgovara raspodeli genotipova u grupe na osnovu boje semenjače. Ekstrakti osam od deset ispitivanih genotipova, u kojima su koncentracije najzastupljenijih komponenti bile ispod 1 $\mu$ M, su ispoljavali protektivni efekat na ćelije NT2-D1 linije humanog teratokarcinoma umanjujući stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika koje je bilo izazvano egzogenom primenom vodonik peroksida. Ekstrakti semenjača genotipova: Aslaug, Assas, Dora, Poneka, Golf, MBK 168 i MBK 173 su pokazivali citotoksične efekte zavisne od koncentracije na svim ispitivanim ćelijskim linijama (humanog karcinoma dojke MDA-MB-453, adenokarcinoma kolona LS174, hronične mijeloidne leukemije K562 i karcinoma pluća A549). Iako nije primećena značajna selektivnost u antitumorskom dejstvu, ekstrakti su pokazivali slabiji intenzitet dejstva prema normalnoj MRC-5 ćelijskoj liniji. U eksperimentima na LS174 i K562 linijama zabeleženo je značajno povećanje broja ćelija koje se nalaze u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretmana pomenutim ekstraktima. Eksperimenti u kojima su LS174 ćelije tretirane inhibitorom kaspaze 3, pre tretmana ekstraktima su pokazali da vodeni ekstrakti semenjača graška mogu pokrenuti i neki drugi put aktivacije ćelijske smrti, različit od apoptotskog posredovanog kaspazama.

Ključne reči: grašak, semenjača, termička obrada, *in vitro* digestija, fenolna jedinjenja, antioksidativna aktivnost, antitumorska aktivnost.

NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA

UŽA NAUČNA OBLAST: MOLEKULARNA BIOLOGIJA

UDK BROJ: [547.565:582.736]:57.085(043.3)

# CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM PEA (*Pisum sativum* L.)

## SUMMARY

The family of legumes (*Fabaceae*) is rich in economically and agriculturally important species among which the most abundant in Serbia stands peas (*Pisum sativum* L.) with a share of 4.5% of the total vegetable production. Pea seed coats, especially in genotypes with highly pigmented dark seeds are an important source of phenolic compounds, whose composition and biological activity have not been tested in detail, thus this valuable material is still underutilized. Pea seed coat makes up to 10% of the seed dry weight and largely represents waste material generated in the process of industrial isolation of seed proteins, which are used in human and animal nutrition. In this study the content of phenolic compounds in seeds of ten European pea genotypes, as well as their biological activities has been examined. In addition, the effect of different solvents, heat treatment and *in vitro* digestion of pea seeds on yield of phenolic compounds and antioxidant activity in extracts was also studied.

The obtained results showed that the thermal treatment and *in vitro* digestion led to a statistically significant increase of the total phenolic content, both in aqueous extracts of pea seeds and in the extracts prepared by using an organic solvent. It was shown that peptides which were formed during the *in vitro* digestion of the pea seed proteins can significantly interfere with the assays for determination of antioxidant activity, especially in aqueous solutions, since they possess a detectable antioxidant activity. It has been shown that the combination of solvents containing 70% acetone, 29% distilled water and 1% acetic acid was the most suitable means for the extraction of total phenols from pea seed coats, which gave the highest yield in both bright colored and dark colored seed genotypes. Total phenolic content of extracts obtained by mentioned solvent in certain genotypes (Assas, MBK 168 and Aslaug) ranged from 41.8 to 46.6 mg GAE / g s.m., which are the highest recorded values in pea. The same genotypes also possessed the highest tannin and anthocyanin content and showed the most pronounced ability for DPPH radical scavenging as well as for the reduction of Fe<sup>3+</sup> ions. The analysis of seed coat extracts, using the LTQ Orbitrap UHPLC-MS technique, identified 25 most abundant phenolic

compounds, from which 9 compounds have not been recorded in pea seed coats of previously studied genotypes. It was the first report of flavanones: chrysin, hesperetin, naringenin and naringin. Certain flavanols: catechin gallate and galocatechin gallate were also detected. Small amounts of morin, galangin and rosmarinic acid were detected in most genotypes. The principal components analysis (PCA) based on the content of individual phenolic compounds and antioxidant activity of extracts grouped genotypes into two main groups. The first group consists of genotypes with pale seed coats Golf, Törsz and MBK 88, in the second group were genotypes with dark seed coat Aslaug, Assas, Dora, Poneka, MBK 168 and MBK 173, while MBK 90 genotype was outside the groups. What is important to emphasize is that the distribution of genotypes in groups based on PCA analysis corresponds to the distribution according to seed coat color. Extracts of eight out of ten investigated genotypes, in which the concentration of the most abundant compounds were below 1  $\mu\text{M}$ , were displaying a protective effect on NT2-D1 human teratocarcinoma cell line by reducing the formation of reactive oxygen species, which was caused by exogenous application of hydrogen peroxide. Seed coat extracts obtained from genotypes: Aslaug, Assas, Dora, Poneka, Golf, MBK 168 and MBK 173 showed cytotoxic effects dependent on the concentration in all tested cell lines (human breast cancer MDA-MB-453, colon adenocarcinoma LS174, chronic myeloid leukemia K562 and A549 lung carcinoma). Although the significant selectivity in the antitumor activity of extracts has not been recorded they showed weaker cytotoxic activities against normal MRC-5 cell line. In experiments on LS174 and K562 lines a significant increase in the number of cells located in subG1 phase of the cell cycle was observed after treatment of the above mentioned extracts. Experiments in which the LS174 cells were treated with an inhibitor of caspase-3 before treatment with extracts showed that aqueous extracts of pea seed coats can induce some other pathway of the cell death, other than apoptotic caspase-mediated pathway.

Key words: peas, seed coat, thermal treatment, *in vitro* digestion, phenolic compounds, antioxidant activity, anti-tumor activity.

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SCIENTIFIC DISCIPLINE: MOLECULAR BIOLOGY

UDC NUMBER: [547565: 582736]: 57 085 (043.3)



# SADRŽAJ

## 1. UVOD

1.1 Klasifikacija fenolnih jedinjenja.....	1
1.1.1 Prosti fenoli.....	3
1.1.2 Fenolne kiseline i aldehidi.....	5
1.1.3 Acetofenoni i derivati fenilsirćetne kiseline.....	6
1.1.4 Cinaminske kiseline, cinaminski aldehidi i alkoholi.....	7
1.1.5 Kumarini i izokumarini.....	8
1.1.6 Halkoni, dihidrohalkoni i auroni.....	8
1.1.7 Flavonoidi.....	9
1.1.7.1 Flavonoli.....	11
1.1.7.2 Flavoni.....	11
1.1.7.3 Flavanoli (Flavan-3-oli) .....	12
1.1.7.4 Flavanoni.....	13
1.1.7.5 Antocijanidini.....	14
1.1.7.6 Izoflavoni .....	15
1.1.8 Biflavonili .....	16
1.1.9 Benzofenoni, ksantoni i stilbeni .....	16
1.1.10 Kinoni .....	17
1.1.11 Betacijanini .....	18
1.1.12 Lignani .....	19
1.1.13 Lignin.....	20
1.1.14 Tanini.....	20
1.2 Potencijalni mehanizmi fiziološkog delovanja fenolnih jedinjenja.....	25
1.2.1 Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja.....	25
1.2.2 Antitumorsko dejstvo fenolnih jedinjenja.....	36
1.3 Bološka raspoloživost fenolnih jedinjenja.....	44
1.4 Grašak.....	46
1.5 Sastav fenolnih jedinjenja semena graška.....	48
1.6 Biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja graška .....	49

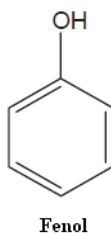
1.7 Uticaj rastvarača i termičkog tretmana na prinos fenolnih jedinjenja graška u ekstraktima i njihove biološke aktivnosti.....	50
2. CILJ RADA.....	53
3. MATERIJALI I METODE.....	54
3.1 Uzorci graška .....	54
3.2 Priprema metanolnih ekstrakata suvih semena.....	54
3.3 Priprema metanolnih ekstrakata kivanog semena.....	55
3.4 Priprema metanolnih i vodenih ekstrakata kuvanih i enzimski digeriranih semena.....	55
3.5 Priprema proteinskih izolata semena i frakcija izolata MW < 3 kDa i MW < 10 kDa.....	56
3.6 Priprema ekstrakata prečišćenih semenjača .....	57
3.7 Sadržaj ukupnih fenola (TPC).....	57
3.8 Sadržaj totalnih antocijanina (TAC).....	58
3.9 Sadržaj rastvornih kondenzovanih tanina (TCT).....	58
3.10 DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) test.....	58
3.11 Test sposobnosti uklanjanja hidroksilnog radikala.....	59
3.12 Test sposobnosti uklanjanja vodonik peroksida.....	60
3.13 Test sposobnosti redukcije Fe <sup>3+</sup> jona.....	60
3.14 Test sposobnosti helacije Fe <sup>2+</sup> jona.....	61
3.15 Test sposobnosti <i>in vitro</i> inhibicije aktivnosti angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE).....	61
3.16 Određivanje sastava fenolnih jedinjenja UHPLC–LTQ OrbiTrap MS tehnikom.....	63
3.17 Test sposobnosti neutralizacije unutarćelijskih reaktivnih vrsta (IAA).....	63
3.18 Test <i>in vitro</i> citotoksičnosti ekstrakata.....	64
3.19 Analiza faza ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom.....	66
3.20 Ispitivanje efekta specifičnog inhibitora kaspaze-3.....	67
3.21 Statistička obrada podataka.....	67
4. REZULTATI.....	68
4.1 Uticaj termičkog tretmana i <i>in vitro</i> digestije na sadržaj ukupnih fenola semena graška.....	68
4.2 Uticaj termičkog tretmana i <i>in vitro</i> digestije na sposobnost ekstrakata za uklanjanje	

DPPH radikla.....	69
4.3 Uticaj termičkog tretmana i <i>in vitro</i> digestije na sposobnost ekstrakata za uklanjanje hidroksilnog radikla (OH <sup>•</sup> ).....	72
4.4 Uticaj termičkog tretmana i <i>in vitro</i> digestije na sposobnost ekstrakata za uklanjanje vodonik peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	74
4.5 Uticaj rastvarača na prinos ukupnih fenola (TPC) u ekstraktima semenjača graška.....	76
4.6 Određivanje ukupnih fenola (TPC), antocijanina (TAC) i solubilnih kondenzovanih tanina (TCT) u ekstraktima semenjača graška.....	78
4.7 Sposobnost ekstrakata semenjača za uklanjanje DPPH radikala, redukcije Fe <sup>3+</sup> jona i helacije Fe <sup>2+</sup> jona.....	81
4.8 Određivanje sastava fenolnih jedinjenja pomoću UHPLC-LtQ Orbitrap-MS tehnike..	83
4.9 Analiza glavnih komponenata (PCA) .....	88
4.10 <i>In vitro</i> analiza citotoksične aktivnosti.....	91
4.11 Određivanje sposobnosti neutralizacije unutarćelijskih reaktivnih vrsta (IAA).....	96
4.12 Inhibicija angiotenzin konvertujućeg enzima.....	98
5. DISKUSIJA.....	100
6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	127

## 1. UVOD

### 1.1 Klasifikacija fenolnih jedinjenja

Fenoli su jedinjenja koja poseduju jednu ili više hidroksilnih grupa koje su direktno vezane za aromatični prsten. Fenol (**Slika 1**) predstavlja bazičnu strukturu ove klase hemijskih jedinjenja. Fenoli su na više načina slični alifatičnim alkoholima kod kojih je hidroksilna grupa vezana za aciklični ugljovodonični lanac. Ipak hidroksilna grupa fenola je pod uticajem aromatičnog prstena što uslovljava slabije vezivanje vodonika, čineći fenole blagim kiselinama (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 1.** Strukturna formula fenola (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

Polifenoli su jedinjenja koja poseduju više od jedne fenolne hidroksilne grupe vezane za jedan ili više benzenovih prstenova i termin se ne odnosi na polimere pojedinih fenolnih jedinjenja, iako takva jedinjenja postoje. Fenolna jedinjenja se nalaze u velikom broju u biljkama i produkti su njihovog sekundarnog metabolizma. Obično se u biljnim tkivima nalaze u formi glikozida ili estara, pre nego slobodna jedinjenja (Vermerris and Nicholson, 2006). Fenolna jedinjenja obuhvataju veoma veliku i raznoliku grupu molekula, sa preko 8000 do sada okarakterisanih struktura koje se kreću od prostih molekula kao što su fenolne kiseline, pa sve do visoko polimerizovanih jedinjenja kao što su tanini. Ova jedinjenja se mogu klasifikovati na više načina. Harborne and Simmonds (1964) predlažu klasifikaciju zasnovanu na broju ugljenikovih atoma u molekulu (**Tabela 1**). Alternativne klasifikacije su predložili Swain i Bate-Smith (1962) prema kojoj su fenolna jedinjenja klasifikovana na “uobičajene” i “manje uobičajene” prema svojoj zastupljenosti u prirodi.

Ribéreau-Gayon (1972) je grupisao fenolna jedinjenja u tri klase na sledeći način: 1) Široko rasprostranjene fenole, prisutne u svim biljnim organizmima ili od specifičnog interesa za određenu biljnu vrstu, 2) fenole koji su manje zastupljeni u prirodi, sa ograničenim brojem poznatih struktura, 3) fenolna jedinjenja koja se javljaju u formi polimera.

**Tabela 1.** Klasifikacija fenolnih jedinjenja (preuzeto i modifikovano iz Harborne and Simmonds, 1964)

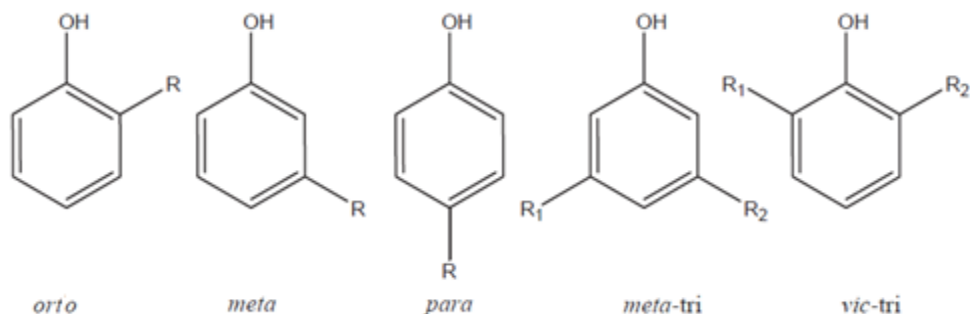
Ugljovodonični skelet	Klasa
C <sub>6</sub>	Prosti fenoli
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Fenolne kiseline i srodna jedinjenja
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenoni Derivati fenilsirćetne kiseline
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cinaminska kiseline Aldehidi cinaminske kiseline Alkoholi cinaminske kiseline
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Kumarini Izokumarini Hromoni
C <sub>10</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>14</sub>	Kinoni
C <sub>15</sub> C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidi
C <sub>30</sub>	Biflavonili
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbeni Benzofenoni
C <sub>18</sub>	Betacijjanini
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ili oligomeri	Lignani i neolignani
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> polimeri	Lignini
Oligomeri ili polimeri	Tanini
Polimeri	Flobafeni

Prirodna fenolna jedinjenja su poslednjih decenija u centru interesovanja mnogih istraživačkih grupa, pošto se u značajnim količinama nalaze u prehrambenim proizvodima

biljnog porekla, a ima i indicija podržanih kliničkim studijama da njihova redovna konzumacija umanjuje rizik od pojave brojnih oboljenja. (Anderson *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000; Mehta *et al.* 2010; Ramos, 2008). Fenoli su široko rasprostranjeni sastojci biljne hrane (voća, povrća, žitarica, biljnih ulja, čokolade itd.) kao i napitaka (voćnih sokova, kafe, piva, vina, jakih alkoholnih pića itd.) i delom su odgovorni za formiranje njihovih ukupnih organoleptičkih osobina. Na primer, fenoli doprinose stepenu gorčine i trpkosti voćnih sokova usled interakcije jedinjenja iz klase procijanidina sa glikoproteinima pljuvačke. Antocijanini koji pripadaju grupi flavonoida su odgovorni za oranž, crvenu, plavu i purpurnu boju voća i povrća. Poznato je takođe da su fenoli poput vanilina, siringina, i dr. odgovorni za formiranje arome, specifičnog bukea i boje vina, kao i mnogih drugih alkoholnih pića koja odležavaju u drvenim sudovima (Vermerris and Nicholson, 2006). Za mnoga fenolna jedinjenja, a pogotovo ona iz klase flavonoida je pokazano da poseduju širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antioksidativna, antitumorska, antihipertenzivna i antidijabetična (Crozier *et al.*, 2009). U poslednje vreme se sve više pažnje posvećuje proučavanju i drugih klasa fenolnih jedinjenja kao što su fenolne kiseline i tanini za koje se nekada smatralo da ne poseduju značajne biološke aktivnosti (Robbins, 2003).

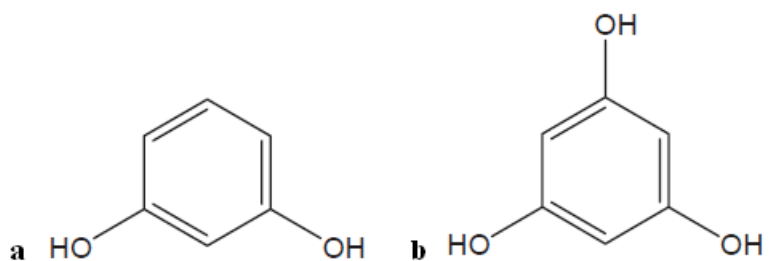
### 1.1.1 Prosti fenoli

Pod nazivom prosti fenoli se podrazumevaju uglavnom supstituisani fenoli. Nomenklatura *orto*, *meta* i *para* odnosi se na 1,2-; 1,3- i 1,4- supstituciju na benzenovom prstenu, pri čemu je jedan od supstituenata hidroksilna grupa. U situaciji kada postoje tri supstituenta, supstitucije mogu biti na pozicijama 1,3 i 5 što se u slučaju da su sva tri supstituenta identična označava kao *meta*-tri-supstitucionni obrazac, dok se supstitucija na položajima 1,2,6 označava sa prefiksom 'vic' (**Slika 2**).



**Slika 2.** Nomenklatura supstituisanih fenola. R, R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> – supstituenti (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

U proste fenole spadaju: rezorcinol (1,3-dihidroksi benzen) koji je *meta*-dihidroksilovani prosti fenol (**Slika 3a**), zatim floriglucinol (1,3,5-trihidroksi benzen) ili *meta*-trihidroksilovani prosti fenol (**Slika 3b**). Prosti fenoli se retko nalaze u biljnim tkivima i to u veoma malim koncentracijama. Katehol (1,2-dihidroksi benzen) prisutan je u voću i povrću i odgovoran je za oksidaciju pri mehaničkom oštećenju plodova u reakciji koju katalizuje polifenol oksidaza u prisustvu kiseonika, pri čemu nastaje braon pigment, derivat benzokinona. Pirogalol (1,2,3-trihidroksi benzen), zajedno za pomenutim kateholom, poseduje antiseptičnu aktivnost i bitan je sastojak mnogih lekovitih biljaka (Vermerris and Nicholson, 2006).

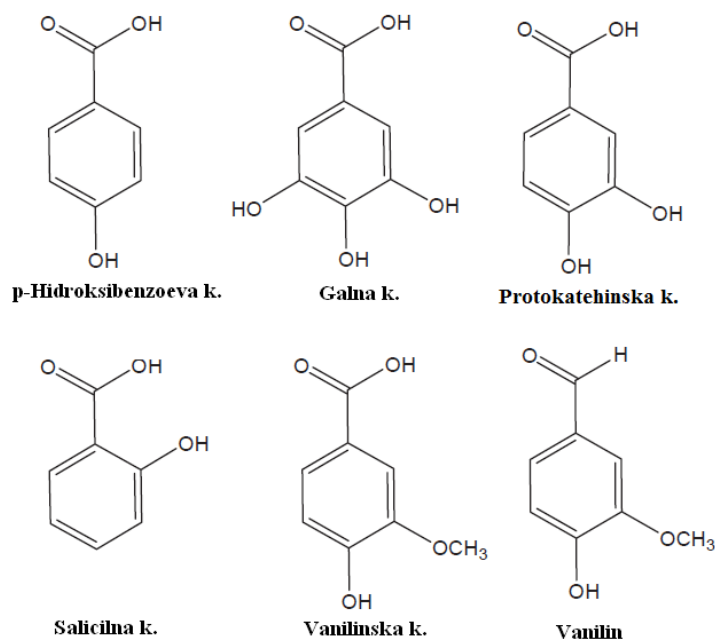


**Slika 3.** a) rezorcinol, b) floriglucinol (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.2 Fenolne kiseline i aldehidi

Kada se razmatraju fenolne kiseline kao sekundarni metaboliti biljaka pojam se često odnosi na heterogenu grupu organskih kiselina koje se na osnovu svog ugljenikovog skeleta mogu podeliti na dve podklase: hidroksibenzoene i hidroksicinaminske. Hidroksibenzoene kiseline se karakterišu prisustvom karboksilnih grupa kao supstituenata na fenolu. Neke od najčešćih hidroksibenzoenih kiselina prisutnih u biljnim tkivima su: *p*-hidroksi benzoena kiselina, galna kiselina, protokatehinska kiselina, salicilna kiselina i vanilinska kiselina (**Slika 4**) Pod nazivom “fenolne kiseline” u hemiji se često podrazumevaju jedinjenja kod kojih je za fenolni prsten vezana karboksilna grupa. Varijabilnost u okviru podklasa se ogleda u broju, tipu i poziciji bočnih ostataka, dok ugljenikov skelet ostaje isti. U mnogim slučajevima aldehidni analozi kiselina se klasifikuju u okviru pomenutih grupa (npr. vanilin, analog vanilinske kiseline se često svrstava zajedno sa hidroksibenzoenim kiselinama) (Robbins, 2003). Iako nema mnogo podataka o fiziološkoj funkciji fenolnih kiselina kod biljaka, zna se da su povezane sa raznim procesima kao što su: usvajanje nutrijenata, sinteza proteina, fotosinteza, odbrana od patogena i dr. (Manach *et al.*, 2004; Dai and Mumper, 2010; Robbins 2003). Lokalizovane su u gotovo svim biljnim organima, u listu, korenu, stablu i semenu. Samo mala frakcija fenolnih kiselina postoji kao slobodna, dok su ostale često vezane estarskim vezama za razna jedinjenja (glukozu, organske kiseline, terpene, flavonoide) kao i strukturne komponente ćelije (celulozu, lignin, itd). Sadržaj fenolnih kiselina u biljnim tkivima može mnogo da varira u zavisnosti od abiotičkih i biotičkih faktora kojima je biljka izložena. Ako se razmatra zastupljenost fenolnih kiselina u prirodi, kofeinska, *p*-kumarinska, vanilinska i protokatehinska kiselina su zastupljene u gotovo svim biljkama, dok je pojedinačno najzastupljenija hlorogena kiselina koja predstavlja ester kofeinske i kininske kiseline. Kada se razmatra prisustvo fenolnih komponenata u hrani biljnog porekla, flavonoidi predstavljaju ubedljivo najzastupljeniju klasu sa učešćem od približno 2/3 svih fenolnih jedinjenja koja se mogu naći u hrani, fenolne kiseline pak čine najveći deo od preostale trećine, dok su ostale klase jedinjenja daleko manje zastupljene (Robbins, 2003).

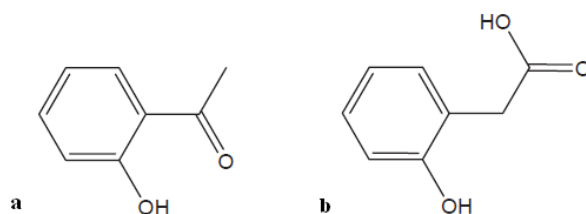




**Slika 4.** Fenolne kiseline i aldehidi (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson,2006).

### 1.1.3 Acetofenoni i derivati fenilsirćetne kiseline

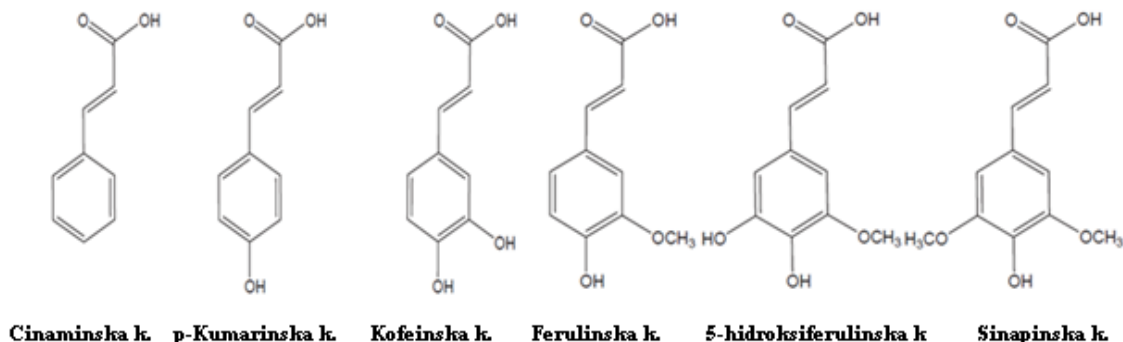
Acetofenoni su najprostiji aromatični ketoni koji se retko nalaze u prirodi. Primeri uključuju 2-hidroksi acetofenon koji je važan prekursor u sintezi smola i farmakoloških agenasa i 2-hidroksifenil sirćetnu kiselinu (**Slika 5a, b**) (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 5.** a) 2-hidroksi acetofenon, b) 2-hidroksifenil sirćetna kiselina (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

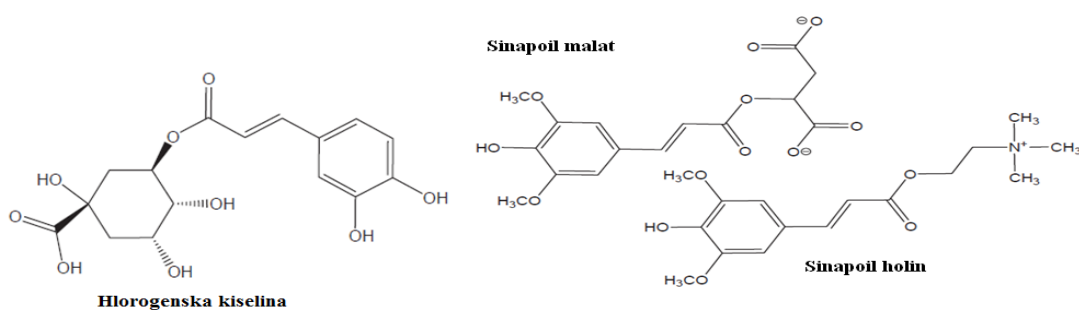
### 1.1.4 Cinaminske kiseline, cinaminski aldehidi i alkoholi

Postoji šest široko rasprostranjenih cinaminskih kiselina sa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> skeletom (**Slika 6**). Sve biljke najverovatnije sadrže najmanje tri od ovih šest kiselina: *p*-kumarinska, cinaminska, kofeinska, ferulinska, 5-hidroksi ferulinska, sinapinska (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 6.** Cinamične kiseline (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

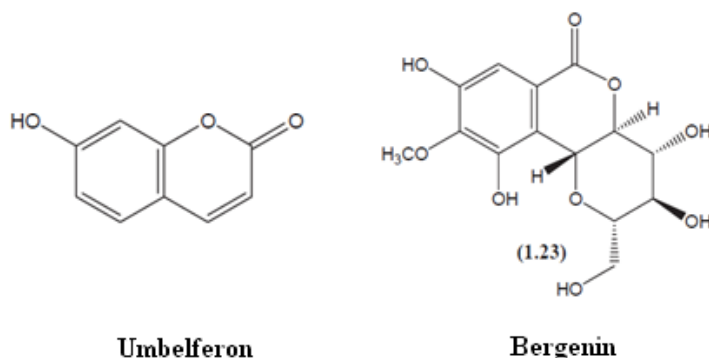
Cinaminske kiseline se u biljkama najčešće nalaze u formi estara kvinske, šikimatne i vinske kiseline. (Vermerris and Nicholson, 2006). Na primer, hlorogena kiselina je estar kofeinske i kvinske kiseline (**Slika 7**). Cinaminske kiseline često grade estere sa šećerima kao i sa drugim organskim kiselinama, npr., sinapoil estri koji se nalaze u biljkama familija *Brassicaceae*: sinapoil malat prisutan u lišću i sinapoil holin prisutan u korenu (**Slika 7**).



**Slika 7.** Cinaminske kiseline i derivati (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.5 Kumarini i izokumarini

Kumarini i izokumarini imaju C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> skelet, s tim što poseduju heterociklični prsten sa kiseonikom u sklopu C<sub>3</sub> jedinice (**Slika 8**). Biljke sadrže veliki broj kumarina od kojih mnogi igraju vitalnu ulogu u odbrani od patogena i herbivora, kao i u odbrani od UV zračenja. Kumarin umbeliferon se koristi u više enzimskih eseja, gde se estri umbeliferona koriste kao supstrati za nespecifične esteraze u florescentnim imunoesejima. Izokumarini, kao što je bergenin, imaju strukturu sličnu kumarinima, ali je pozicija kiseonika i karbonilne grupe u okviru heterociklusa obrnuta u odnosu na kumarine. Izokumarini takođe igraju ulogu u odbrani od patogena i parazita. Pomenuti bergenin ima sposobnost da inhibira razvoj gljivičnog oboljenja pepelnice graška (Vermerris and Nicholson, 2006).

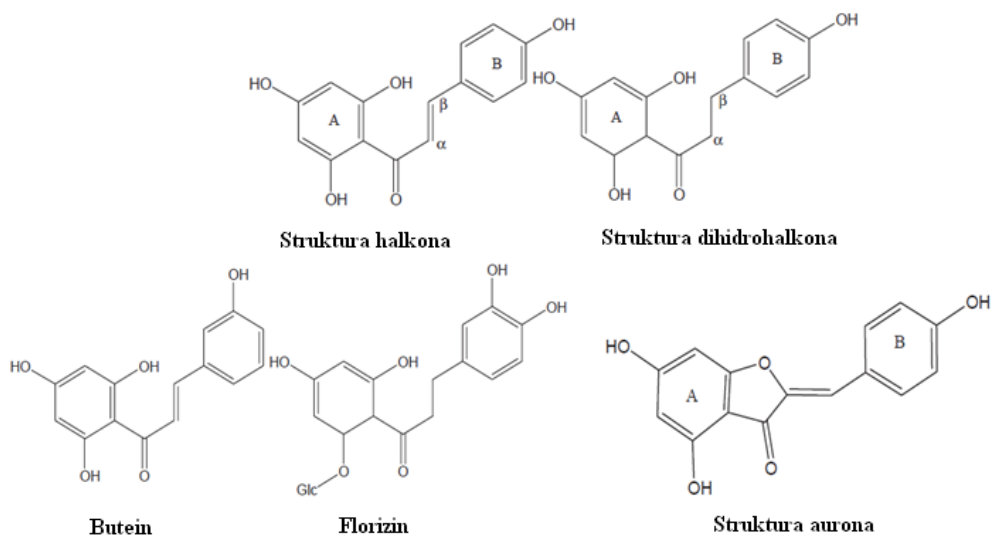


**Slika 8.** Predstavnicu kumarina i izokumarina (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.6 Halkoni, dihidrohalkoni i auron

Halkoni i dihidrohalkoni imaju linearni C<sub>3</sub> lanac koji povezuje dva prstena. C<sub>3</sub> lanac halkona sadrži dvostruku vezu, dok je ova veza kod dihidrohalkona zasićena (**Slika 9**). Halkoni poput buteina, predstavljaju žute pigmente cvetova, dok je dihidrohalkon florizin (floreitin-2'-O-D-glukozid) iz lista jabuka okarakterisan kao potencijalni antitumorski agens (**Slika 9**). Halkoni su inače intermedijeri u biosintezi flavonoida koji predstavljaju

najrasprostranjeniju i najmnogobrojniju grupu fenolnih jedinjenja. Florizin, uz halkanaringenin i arbutin, predstavlja najzastupljenije halkone prisutne u biljnoj hrani. Halkanaringenin je karakterističan za plodove paradajza, arbutin za kruške, jagode i žitarice, dok se u tragovima može naći u čaju, kafi i crvenom vinu (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 9.** Halkoni, dihidrohalkoni i auroni (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

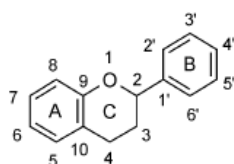
Auroni nastaju ciklizacijom halkona, tako što meta-hidroksilna grupa reaguje sa  $\alpha$ -ugljenikovim atomom gradeći petočlani heterociklus (**Slika 9**). Auroni su takođe poznati kao žuti pigmenti cvetova (Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.7 Flavonoidi

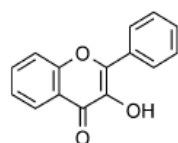
Flavonoidi su polifenolna jedinjenja koja se sastoje od 15 ugljenikovih atoma sa dva aromatična prstena koja su povezana trokarbonskim mostom C6–C3–C6. Oni su najmnogobrojnija grupa fenolnih jedinjanja u biljnom carstvu (Crozier *et al.*, 2009). Odlikuju se značajnim prisustvom u epidermisu lista i pokožici plodova voća. Glavne

potklase flavonoida prema zastupljenosti u ishrani su: flavonoli, flavoni, flavanoli (flavan-3-oli), flavanoni, antocijanidini i izoflavoni (**Slika 10**). U manje zastupljene potklase spadaju: dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini, halkoni, dihidrohalkoni i auronii (Crozier *et al.*, 2009). Osnovni skelet flavonoida može imati izuzetno

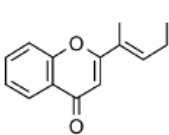
veliki broj supstituenata prisutnih uglavnom na 4*O*-,5- i 7-pozicijama (**Slika 10**). Šećeri su vrlo uobičajeni, pa se većina flavonoida uglavnom u prirodi javlja u obliku glikozida. Šećeri i hidroksilne grupe povećavaju hidrofilnost flavonoida dok ostali supstituenti kao što su na primer metil ili izopentil grupe čine flavonoide hidrofobnim, to jest lipofilnim.



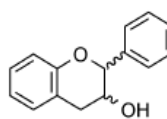
Osnovni skelet flavonoida (1)



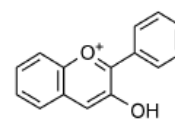
Flavonol (2)



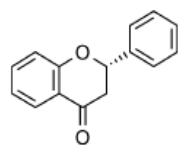
Flavon (3)



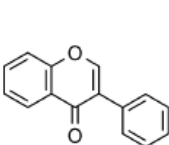
Flavanol (4)



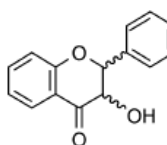
Antocijanidin (5)



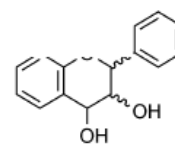
Flavanon (6)



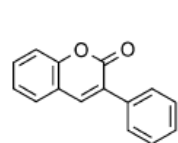
Izoflavon (7)



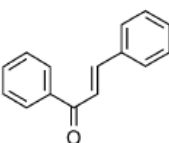
Dihidroflavonol (8)



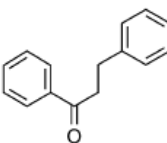
Flavan-3,4-diol (9)



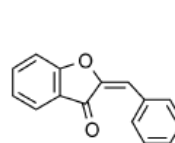
Kumarin (10)



Halkon (11)



Dihidrohalkon (12)

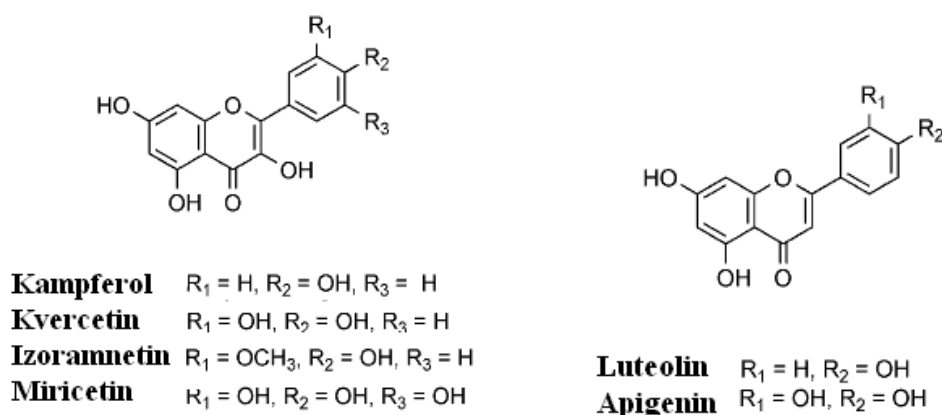


Auron (13)

**Slika 10.** Klasifikacija flavonoida (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).

### 1.1.7.1 Flavonoli

Flavonoli su najrasprostranjeniji flavonoidi u biljnom svetu, prisutni su u svim razdelima biljaka a odsutni su kod algi. Takođe ih nema ni kod gljiva. Ova grupa je veoma široka, diverzifikovana i spada u jedne od najbolje izučenih klasa fenolnih jedinjenja (Crozier *et al.*, 2009) Glavni flavonoli prisutni u hrani su kampferol, kvercetin, izoramnetin i miricetin (**Slika 11**), koji se najčešće nalaze u formi O-glikozida. Konjugacija se odigrava najčešće na C3 poziciji, dok se supstitucija najčešće dešava na pozicijama 5-, 7-, 4'-, 3'- i 5'-. Iako je broj aglikona ograničen, samo kampferol se može konjugovati sa 200 različitih šećera. Koncentracije flavonola u namirnicama koje se redovno konzumiraju su dobro dokumentovane, mada se pojavljuju velike razlike u količinama detektovanim u istovetnim namirnicama, što može biti posledica sezonskih varijacija u sastavu ili efekata tehničke obrade (Crozier *et al.*, 2009).



**Slika 11.** Flavonoli i flavoni (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).

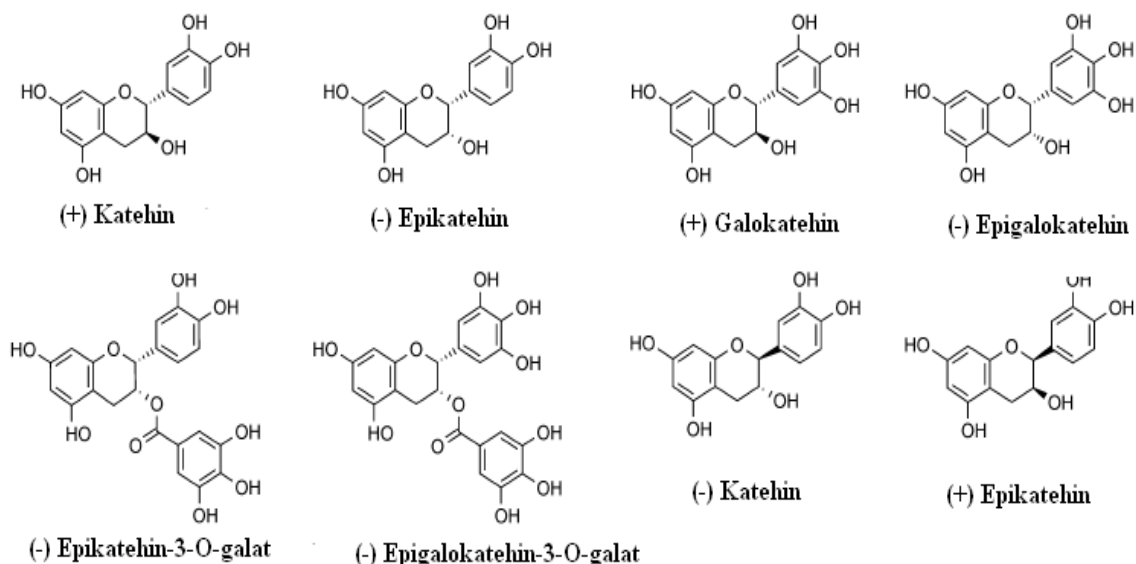
### 1.1.7.2 Flavoni

Kod tipičnih flavona kao što su luteolin i apigenin (**Slika 11**) nema oksigenacije na C3 atomu, ali takođe mogu imati veoma širok opseg supstitucija, uključujući metilaciju, O- i C alkilaciju i glikozilaciju. Većina flavona postoji u formi 7-O-glikozida. Nisu tako široko

rasprostranjeni kao flavonoli, zastupljeni su u većim koncentracijama u biljkama poput celera, peršuna i srodnog začinskog bilja. Polimetoksilovani flavoni poput tangeretina i nobiletina su zastupljeni u raznim vrstama citrusa (Crozier *et al.*, 2009).

### 1.1.7.3 Flavanoli (Flavan-3-oli)

Flavanoli su strukturno najkompleksnija klasa flavonoida, počev od jednostavnih monomera kao što su (+) katehin i njegov izomer (-) epikatehin (**Slika 12**), koji često mogu biti hidroksilovani. Mogu se takođe esterifikovati sa galnom kiselinom, gradeći galokatehine ili se međusobno polimerizovati dajući kompleksne strukture oligomerne ili polimerne molekule proantocijanidine, poznate i pod nazivom kondenzovani tanini. Usled postojanja dva hiralna centra na C2 i C3 atomima flavanoli se javljaju u četiri izomerna oblika za svaki nivo hidroksilacije B prstena (**Slika 10**). Dva izomera su veoma zastupljena u prirodi a to su (+) katehin i (-) epikatehin, dok su druga dva (-) katehin i (+) epikatehin relativno slabo zastupljeni. Kod oligomernih i polimernih proantocijanidina postoji dodatni hiralni centar na C4 na svakoj dodatnoj flavanolnoj jedinici. Postojanje ovog dodatnog hiralnog centra dovodi do razlika u hiralnosti koje imaju značajnog efekta na 3D strukturu ovih molekula. Iako ovaj efekat malo utiče na redoks osobine i aktivnost molekula u uklanjanju slobodnih radikala, očekivano je da ima izraženiji efekat na vezivanje molekula za razne strukture po sistemu ključ-brava, kao što su interakcije enzima i supstrata, enzima i inhibitora, receptora i liganda itd. (Crozier *et al.*, 2009).

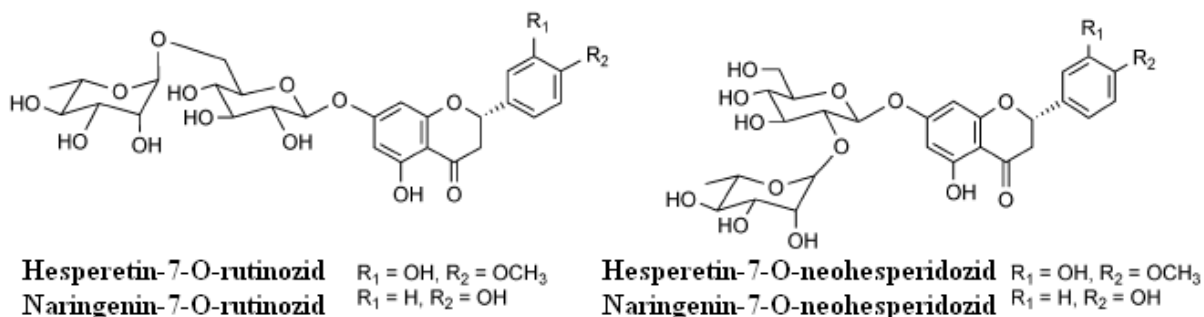


Slika 12. Flavanoli (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).

#### 1.1.7.4 Flavanoni

Flavanoni su takođe neplanarni molekuli sa hiralnim centrom na C2 atomu. Kod većine flavanona u prirodi C prsten je vezan za B prsten u  $\alpha$ - konfiguraciji. Flavanoni se nalaze u većim koncentracijama u citrusnom voću. Najrasprostranjeniji je glikozid hesperetin-7-*O*-rutinozid, poznatiji pod nazivom hesperidin (Slika 13), koji se zajedno sa naringenin-7-*O*-rutinozidom (naringinom) nalazi u kori citrusa. A tu su još i hesperetin-7-*O*-neohesperidozid (neohesperidin) iz ploda gorke pomorandže (*Citrus aurantium*) i naringenin-7-*O*-neohesperidozid (naringin) iz grejpfruta (*Citrus paradisi*), koji se odlikuju izuzetno gorkim ukusom (Crozier *et al.*, 2009).

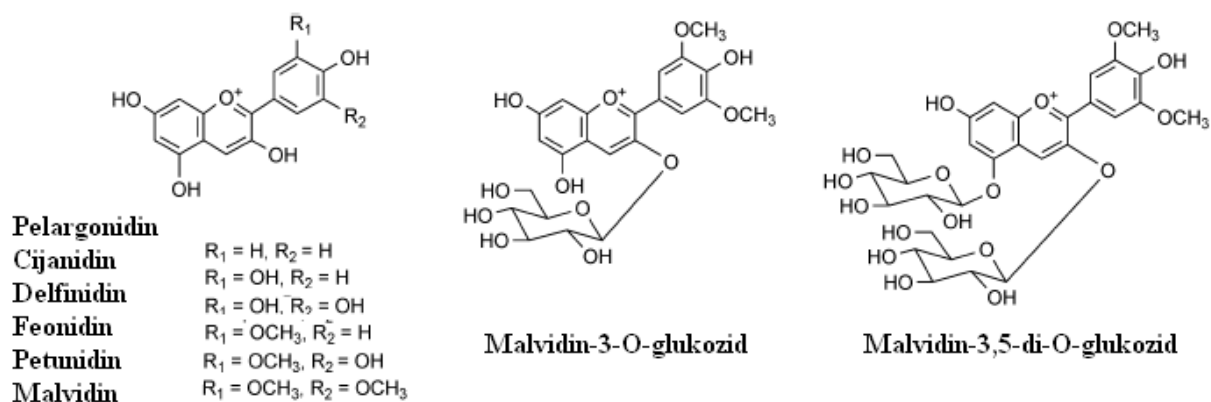




Slika 13. Flavanoni (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).

### 1.1.7.5 Antocijanidini

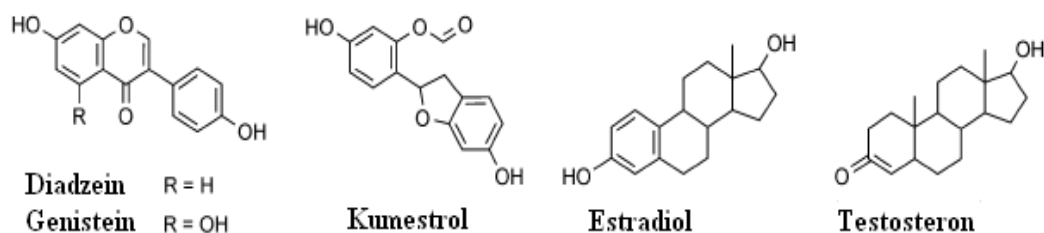
Antocijanidini su najviše prisutni u voću, cveću i plodovima povrća kojem daju crvenu, plavu i purpurnu boju. Takođe ih ima i u lišću, stabljikama, semenima i korenskom tkivu. Najzastupljeniji antocijanidini su: pelargonidin, cijanidin, delfinidin, feonidin, petunidin i malvidin (Slika 14). U biljnim tkivima se nalaze gotovo uvek konjugovani sa šećerima a ovakvi konjugati se nazivaju antocijanini, koji takođe mogu biti konjugovani sa hidroksicinatima i organskim kiselinama poput sirćetne kiseline (Crozier *et al.*, 2009).



Slika 14. Antocijanidini i antocijanini (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).

### 1.1.7.6 Izoflavoni

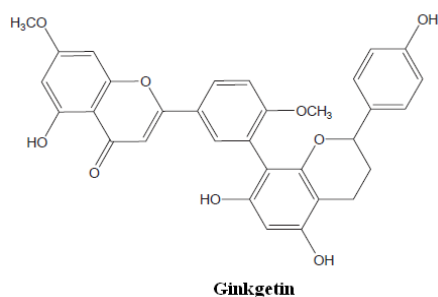
Kod izoflavona je B prsten vazan za C prsten preko C3 atoma i ovo je grupa jedinjenja koja se gotovo isključivo nalazi kod mahunarki, najveće koncentracije su detektovane u semenima soje (*Glycine max*). Izoflavoni diadzein, genistein, kumestan i kumestrol (**Slika 15**) iz lucerke (*Trifolium* spp.) poseduju aktivnost sličnu estrogenu koja je dovoljno jaka da može da utiče na reprodukciju životinja koje se njome hrane, te su stoga dobili naziv fitoestrogeni. Ovi izoflavoni molekulskom mimikrijom imitiraju steroidni hormon estradiol, blokirajući ovulaciju kod životinja. Iz tog razloga ishrana životinja voluminoznim krmivom koje sadrži mahunarke mora biti ograničena. Pokazano je da konzumacija genisteina i diadzeina u produktima koji sadrže soju dovodi do smanjnja incidence kancera prostate i kancera dojke. Ipak mehanizmi su različiti, rast kancera prostate je indukovani i zavistan od nivoa testosterona čija je produkcija suprimirana estradiolima. Kada je nivo estradiola u organizmu nizak izoflavoni mogu da ga nadomeste i da suprimiraju lučenje androgenog hormona, što usporava rast tumora. Rast tumora dojke je pak zavistan od estradiola posebno u ranoj fazi. Izoflavoni uneti hranom u ovom slučaju kompetiraju sa estrogenom ograničavajući tako njegovu dostupnost receptorima, te tako suprimiraju rast tumora (Crozier *et al.*, 2009).



**Slika 15.** Izoflavoni i steroidni hormoni (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).

### 1.1.8 Biflavonili

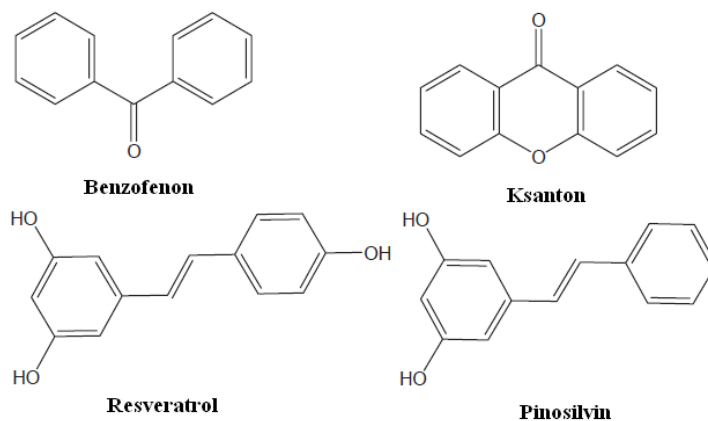
Biflavonili poseduju ugljenkov skelet od 30 C atoma, oni su dimeri flavona kao što je na primer apigenin i njegovi metilovani derivati. Nalaze se često kod biljaka golosemenica kao što je *Ginkgo biloba* koji sadrži biflavonil ginkgetin (**Slika 16**) (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 16.** Biflavonil ginkgetin (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.9 Benzofenoni, ksantoni i stilbeni

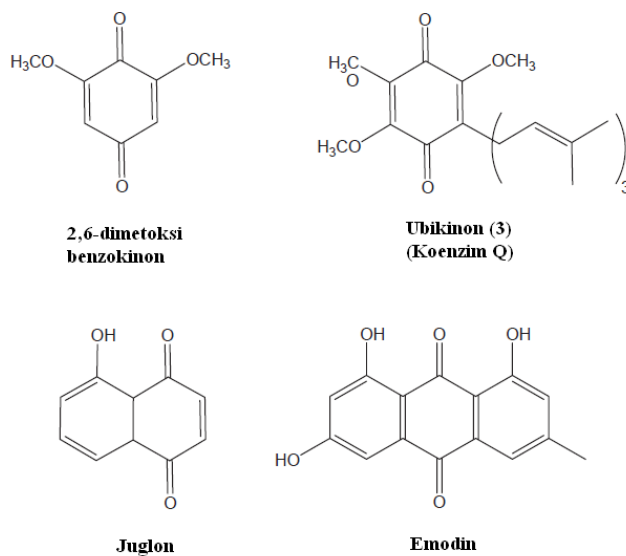
Benzofenoni i ksantoni imaju  $C_6-C_1-C_6$  strukturu, dok stilbeni imaju  $C_6-C_2-C_6$  strukturu ugljenikovog skeleta. Ksantoni su žuti pigmenti cvetova, dok su stilbeni komponente srži drveta. Na **Slici 17** su prikazane strukture benzofenona, ksantona i dva stilbena rezveratrola i pinosilvina (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 17.** Benzofenoni, ksantoni i stilbeni (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.10 Kinoni

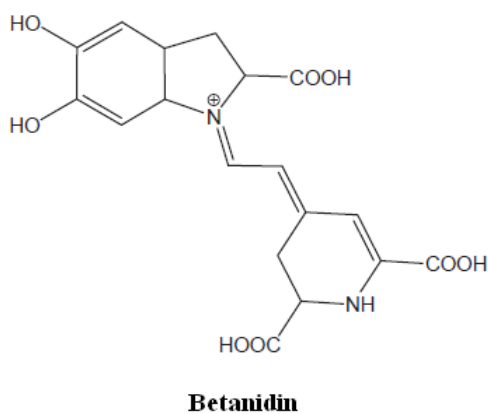
U ovu grupu spadaju benzokinoni, antrakinoni, i naftokinoni. Benzokinoni kao što je 2,6-dimetoksi benzokinon su prisutni u korenskim eksudatima i funkcionišu kao stimulansi za formiranje haustorija parazitskih biljaka. Ubikinoni kao što je ubikinon (3), gde broj 3 označava broj izoprenoidnih bočnih lanaca je takođe poznat pod imenom Koenzim Q (**Slika 18**), imaju ulogu u transportu elektrona u mitohondrijama. Naftokinoni su retki, najpoznatiji je juglon koji se nalazi u listu i plodu oraha. Antrakinoni su široko rasprostranjeni kod viših biljaka i gljiva, npr. antrakinon emodin, koji se javlja u obliku ramnozida, može se naći u korenu biljke rabarbare *Rheum rhabarbarum* (Vermerris and Nicholson, 2006).



**Slika 18.** Kinoni (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.11 Betacijanini

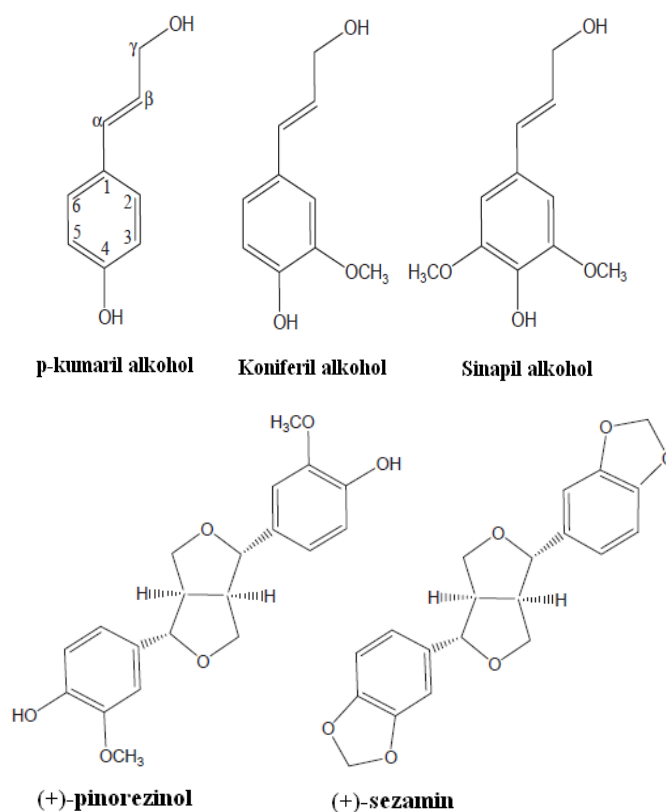
Betacijanini su crveni pigmenti prisutni u repi, cvekli i blitvi (*Beta vulgaris*). Imaju apsorpcioni spektar sličan antocijaninima, ali za razliku od njih poseduju heterocikluse sa azotom. (Vermerris and Nicholson, 2006). Najčešće se nalaze u formi glikozida, najpoznatiji je betanidin (**Slika 19**).



**Slika 19.** Betanidin (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.12 Lignani

Lignani su dimeri ili oligomeri koji su rezultat kuplovanja monilignola: *p*-kumaril alkohola, koniferil alkohola i sinapil alkohola (**Slika 20**), pri čemu je koniferil alkohol najčešći monomer lignana. Oni se često nalaze u odrvenelim stablima i semenima biljaka i imaju insekticidna svojstva. Neki od lignana se koriste i u medicinske svrhe. Lignan se sintetizira u reakciji monolignol radikala koji se formiraju radom biljnih peroksidaza koje iziskuju prisustvo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Termin lignan se uobičajeno odnosi na dimere povezane 8-8' (β-β') vezom, dok se termin neolignan odnosi na dimere i oligomere povezane drugim tipom veza (Vermerris and Nicholson, 2006). Većina lignana je optički aktivna i obično se samo po jedan enantiomer nalazi kod jedne biljne vrste. Predstavnicima lignana su (+) pinorezinol i (+) sezamin (**Slika 20**).



**Slika 20.** Lignani (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

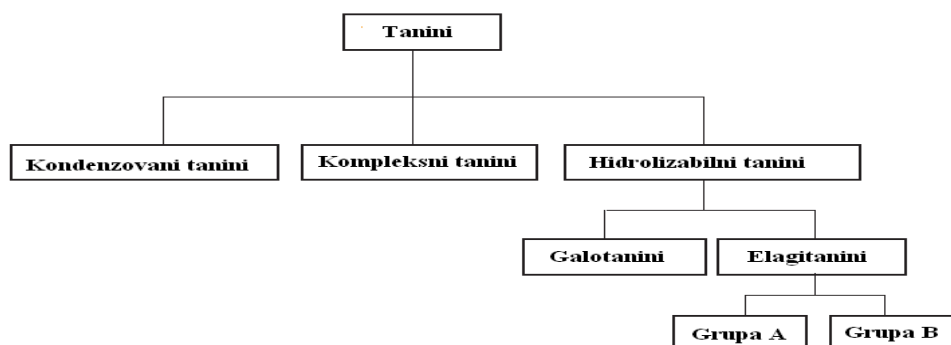
### 1.1.13 Lignin

Lignin je polimerni fenol, drugo najzastupljenije jedinjenje na planeti posle celuloze, jedan je od glavnih strukturnih molekula biljaka. Kao i lignani i lignin nastaje kuplovanjem monolignola: *p*-kumaril alkohola, koniferil alkohola i sinapil alkohola. Druge komponente takođe mogu biti u sastavu lignina ali u malim količinama, pre svega koniferilaldehid, sinapaldehid, dihidrokoniferil alkohol, 5-hidroksi koniferil alkohol itd. (Vermerris and Nicholson, 2006).

### 1.1.14 Tanini

Tanini čine veoma široku grupu jedinjenja koji se odlikuju velikim diverzitetom struktura. Sve ove grupe se međutim odlikuju jednom zajedničkom osobinom, a to je sposobnost da vezuju i talože proteine. Iz ove osobine proističe i njihovo ime pošto su se još od preistorijskih vremena koristili za štavljenje kože (*eng. Tanning*). Ova reakcija je posledica unakrsnog vezivanja lanaca kolagena u životinjskoj koži pod uticajem tanina. U okviru tradicionalne Japanske i Kineske medicine tanini su korišćeni kao antiinflamatorni i antiseptični agensi, kao i u tretmanu mnogih bolesti kao što su dijareja i tumorska oboljenja želudca i duodenuma. Tanini se takođe intenzivno koriste u industriji vina i piva, gde se primenjuju prvenstveno kao agensi za taloženje proteina koji izazivaju mućenje. Tanini su u prirodi širtoko rasprostranjeni, sa relativno velikom zastupljenošću u u rodovima: hrastova (*Quercus* spp.), kestenova (*Castanea* spp.) i vrste dlakavi ruj (*Rhus typhina*), kao i kod ukrasne baštenske biljke *Tellima grandiflora* itd. Tanini mogu biti prisutni u lišću, kori i srži drveta kao i u plodovima gde su odgovorni za fenomen adstrigencije. Pretpostavlja se da je njihova primarna uloga u biljnom svetu zaštita biljaka od patogenih infekcija i herbivora (Vermerris and Nicholson, 2006). Tanini se mogu klasifikovati u tri glavne grupe koje čine: kondenzovani tanini, hidrolizabilni tanini i kompleksni tanini (Khanbabaee and Van Ree, 2001). Ove grupe se dalje dele kao što je prikazano na **Šemi 1**. Postoji i grupa

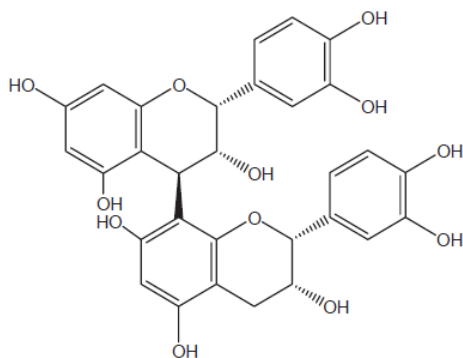
pod nazivom florotanini, ali oni se nalaze samo kod određenih morskih algi i nisu zastupljeni u humanoj ishrani.



Šema 1. Klasifikacija tanina (preuzeto i modificirano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

Kondenzovani tanini (Proantocijanidini) su oligomeri ili polimeri katehina i/ili leukoantocijanidina. Ne mogu se hidrolizovati blagim kiselinskim tretmanom i predstavljaju glavnu frakciju fenolnih jedinjenja koja su odgovorna za fenomen adstrigencije prilikom konzumacije voća ili povrća. Hidrolizom pod ekstremnim uslovima koja obično podrazumeva zagrevanje u kiselini, dobijaju se antocijanidini. Primer kondenzovanog tanina je procijanidin B<sub>2</sub> (epikatehin-(4 $\beta$ →8')-epikatehin), prikazan na **Slici 21**. Iako se generalno smatralo da je antioksidativna aktivnost tanina manje izražena od aktivnosti flavonoida, neke novije studije su ukazale da je antioksidativna aktivnost kondenzovanih tanina u pozitivnoj korelaciji sa stepenom polimerizacije. Pokazano je da je antioksidativna aktivnost hidrolizabilnih i kondenzovanih tanina velike molekulske mase i petnaest do trideset puta intenzivnija nego kod prostijih fenola. Polimeri se formiraju dejstvom kiselina ili enzima i sastoje se u proseku od 2-10 jedinica, mada ima i identifikovanih polimera koji sadrže i do 50 katehinskih jedinica (Khanbabae and Van Ree, 2001). Stepem polimerizacije takođe utiče na sposobnost precipitacije tanina, koja raste sa povećanjem stepena polimerizacije, što ima primenu u industriji vina, gde je nepoželjno visoko prisustvo taninskih materija koje izazivaju adstrigenciju, a poželjan je visok stepen precipitacije proteina.



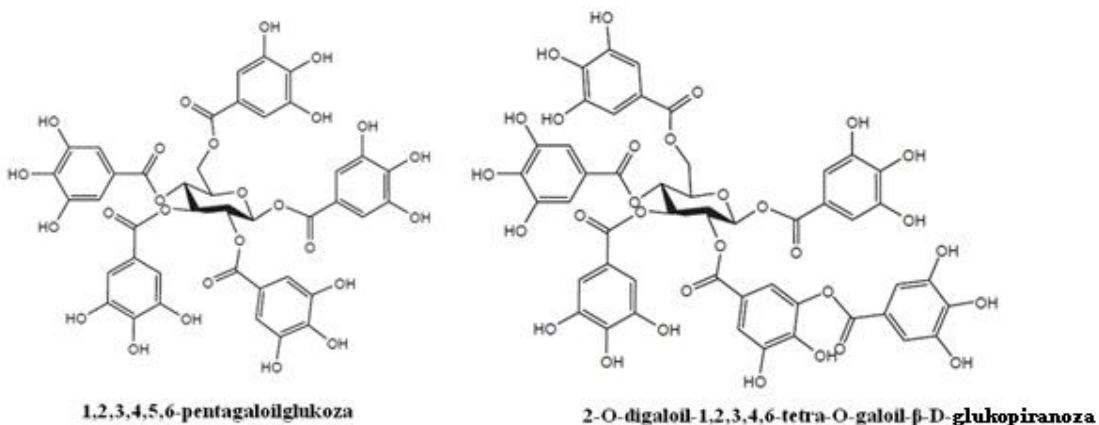


Procijanidin B2

**Slika 21.** Procijanidin B2 (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

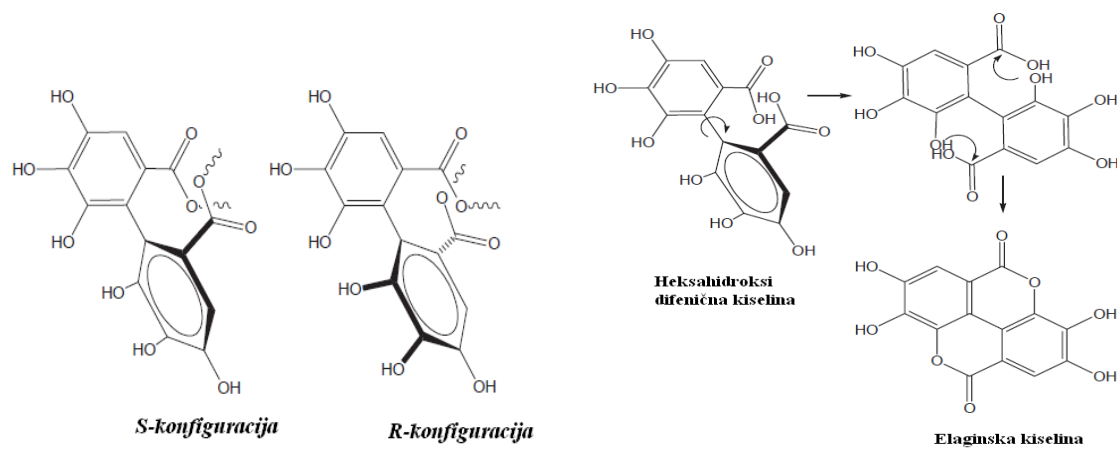
Hidrolizabilni tanini se sastoje iz glukoze ili polihidroksilnog alkohola (poliola) koji su parcijalno ili potpuno esterifikovani galnom kiselinom gradeći galotanine ili sa heksa hidroksidifenilnom kiselinom gradeći elagitanine. Ove dve grupe metabolita se lako hidrolizuju od strane kiselina, baza i mnogobrojnih enzima te su stoga i dobile ime hidrolizabilni tanini. Ipak i oni mogu biti polimerizovani gradeći molekule velike mase. Najpoznatiji hidrolizabilni tanin je svakako taninska kiselina koja pripada galotaninima i sastoji se od pentagaloil glukoze koja može biti dodatno esterifikovana sa još pet jedinica galne kiseline.

Galotanini sadrže karakteristične *meta*-depsidne veze između ostataka galne kiseline. Ova veza je labilnija od alifatične estarske veze i podleže metanolizi u prisustvu blage kiseline, dok se pak alifatična estarska veza metanolizira u prisustvu jakih mineralnih kiselina i toplote. Najčešći poliol je D-glukoza, iako neki galotanini sadrže katehin i triterpenoidne jedinice kao poliolo jezgro. Galotanini sa D-glukozom se sintetišu iz 1,2,3,4,5,6-pentagaloilglukoze (**Slika 22**), primer tipičnog galotanina je 2-*O*-digaloil-1,2,3,4,6-tetra-*O*-galoil- $\beta$ -D-glukopiranoza (**Slika 22**), kod koje je dodatni ostatak galne kiseline lociran na C2 atomu glukopiranoznog prstena.



**Slika 22.** Galotanini (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

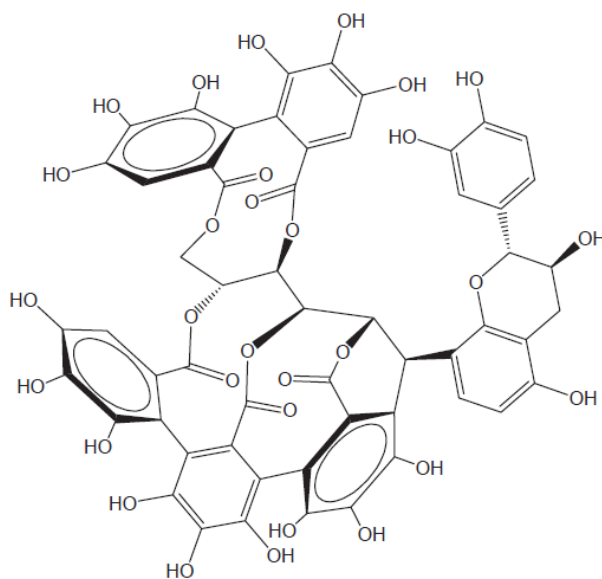
Elagitanini su takođe hidrolizabilni tanini izvedeni iz pentagaloil glukoze, ali za razliku od galotanina sadrže dodatnu C-C vezu između susednih galoil ostataka. Ova veza se formira oksidativnim kuplovanjem između dva susedna galoil ostatka i rezultuje u formiranju heksahidroksidifenoil (HHDP) jedinice koja može biti *S*- ili *R*- konfiguracije (**Slika 23**).



**Slika 23.** Elagitanini (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson 2006).

Ime elagitanina je izvedeno od elaginske kiseline koja se formira spontano iz heksahidroksi difenične kiseline u vodenom rastvoru putem intramolekulske reakcije esterifikacije (**Slika 23**).

Kompleksni tanini se definišu kao tanini koji se sastoje od katehina koji je glikozidnom vezom povezan sa galotaninskom ili elagitaninskom jedinicom. Kao što samo ime govori, struktura ovih jedinjenja može biti veoma složena, primer je akutizimin A (**Slika 24**). Kod njega je flavo-galonil jedinica vezana glikozidnom vezom za C1 atom poliola otvorenog lanca, izvedenog iz D-glukoze sa tri dodatne hidrolizabilne estarske veze. Ovaj kompleksni tanin nastaje tokom procesa starenja vina u drvenim sudovima gde katehinske jedinice potiču iz grožđa, dok elagitanin potiče iz hrastovog drveta. Akutizimin A inače ima sposobnost inhibicije topoizomeraze II, enzima koji je potreban za deobu ćelija kancera.



**Akutizimin A**

**Slika 24.** Kompleksni tanin akutizimin A (preuzeto i modifikovano iz Vermerris and Nicholson, 2006).

## 1.2 Potencijalni mehanizmi fiziološkog delovanja fenolnih jedinjenja

Za mnoga fenolna jedinjenja je pokazano da su moćni efektori bioloških procesa kao i da utiču na umanjenje rizika od većeg broja oboljenja preko nekoliko komplementarnih i preklapajućih mehanizama. Jedna od najispitivanijih bioloških aktivnosti fenolnih jedinjenja je zasigurno antioksidativna aktivnost koja je višestruko pokazana u velikom broju *in vitro* studija (Halliwell *et al.*, 2005; Halliwell, 2012). U poslednjih par decenija postavljeno je više hipoteza o sistemskom antioksidativnom delovanju fenolnih jedinjenja, koje se u poslednje vreme sve više dovode u pitanje, dok se paralelno sve više pažnje posvećuje proučavanju prooksidativnih osobina fenola, njihovoj ulozi u regulaciji genske ekspresije, modulaciji aktivnosti mnogih enzima i uticaju na ćelijske puteve signalne transdukcije (Halliwell, 2012).

### 1.2.1 Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja

Slobodne radikale predstavljaju atomi, molekuli ili joni koji u svom spoljašnjem elektronskom omotaču sadrže najmanje jedan nespareni elektron, što ih čini visoko reaktivnim vrstama, te mogu lako reagovati sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama kao i sa drugim biomolekulima. Sve ovo je praćeno modifikacijama pomenutih molekula, što može biti praćeno značajnim izmenama njiove strukture i funkcije i posledičnim poremećajima fizioloških funkcija ćelije (Halliwell and Gutteridge, 2006). Osim slobodnih radikala postoje i druge neradikalske reaktivne vrste koje mogu ispoljavati slične efekte. U podeli reaktivnih vrsta koju su sačinili Halliwell i Gutteridge (2006) postoje: reaktivne vrste kiseonika, reaktivne vrste azota, reaktivne vrste broma i reaktivne vrste hlora od kojih svaka grupa obuhvata radikalske i neradikalske vrste (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Pregled reaktivnih atomskih i molekulskih vrsta (preuzeto i modifikovano iz Halliwell and Gutteridge, 2006)

Slobodnoradikalске vrste	Neradikalске vrste
<b>Reaktivne vrste kiseonika</b>	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$	Vodonik peroksid, $H_2O_2$
Hidroksil-radikal, $OH^{\cdot}$	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
Hidropeoksil-radikal, $HO_2^{\cdot}$	Hipobromna kiselina, $HOBr$
Peroksil-radikal, $RO_2^{\cdot}$	Kiseonik u singlet stanju, $^1\Delta_g \ ^1O_2$
Alkoksil-radikal, $RO^{\cdot}$	
Karbonatni radikal $CO_3^{\cdot-}$	Ozon, $O_3$
Ugljendioksidni radikal $CO_2^{\cdot+}$	Organski peroksidi, $ROOH$
Kiseonik u singlet stanju $^1\Sigma^1O_2$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
<b>Reaktivne vrste azota</b>	
Azotmonoksidni radikal, $NO^{\cdot}$	Azotasta kiselina, $HNO_2$
Azotdioksidni radikal, $NO_2^{\cdot}$	Nitrozil katjon, $NO^{\cdot+}$
Nitratni radikal, $NO_3^{\cdot}$	Nitroksidni anjon, $NO_2^{\cdot-}$
	Azot(IV)-oksid, $N_2O_4$
	Azot(III)-oksid, $N_2O_3$
	Peroksinitrit, $ONOO$ Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
	Nitronijum (nitril) katjon, $NO_2^{\cdot+}$
	Alkilperoksinitriti, $RO_2ONO$
	Nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$
<b>Reaktivne vrste hlora</b>	
Atomski hlor, $Cl^{\cdot}$	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
	Nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$
	Hlor (gas), $Cl_2$
	Brom hlorid, $BrCl$
<b>Reaktivne vrste broma</b>	
Atomski brom, $Br^{\cdot}$	Hipobromna kiselina, $HOBr$
	Brom (gas), $Br_2$
	Brom hlorid, $BrCl$

Konsumacija biljne hrane i prehrambenih proizvoda sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, u prvom redu flavonoida, često se dovodi u vezu sa smanjenim rizikom od pojave mnogih humanih oboljenja što je potvrđeno u više epidemioloških studija (Huxley and Neil, 2003; Hertog and Hollman, 1996; Hertog *et al.*, 1993; Sesso *et al.*, 1999; Hirvonen *et al.*, 2001). Poznata je i činjenica da flavonoidi i druga fenolna jedinjenja poseduju značajnu antioksidativnu aktivnost *in vitro*, sa obzirom na sposobnost efikasne neutralizacije reaktivnih vrsta kiseonika, azota i hlora. Pored toga imaju i značajnu sposobnost helacije metalnih jona umanjujući na taj način njihov prooksidativni efekat. Iako se iz priloženog nameće logična pretpostavka da ova jedinjenja imaju sposobnost da na sistemskom nivou ispoljavaju antioksidativne efekte, što je podržano određenim studijama na animalnim i humanim modelima, ova pretpostavka je i dalje predmet brojnih kontroverzi (Halliwell *et al.*, 2005; Halliwell, 2012). Ključne zamerke ovoj teoriji su sledeće:

1) Protektivni efekti hrane bogate fenolnim jedinjenjima ne moraju nužno biti vezani za pomenuta jedinjenja pošto se radi o mešavima kompleksnog sastava. Po analogiji sa određenim studijama koje su pokazale da konzumacija hrane bogate vitaminom C snižava nivo oksidativnih oštećenja DNK *in vivo*, dok konzumacija prečišćenog vitamina C nije pokazivala takav efekat (Halliwell, 2002).

2) Flavonoidi i druga fenolna jedinjenja se odlikuju kompleksnošću i poseduju mnoge druge biološke aktivnosti među kojima su: uticaj na puteve signalne transdukcije, inhibicija aktivnosti telomerase, inhibicija aktivnosti ciklooksigenaze, lipoksigenaze i angiotenzin konvertujućeg enzima, modulacija aktivnosti redoks senzitivnih transkripcionih faktora, kao i modulacija aktivnosti antioksidativnih enzima. Stoga su fiziološki efekti fenolnih jedinjenja pre rezultanta ovih bioloških dejstava, nego sistemskog antioksidativnog efekta (Naasani *et al.*, 2003; Wiseman *et al.*, 2001; Rosenkranz *et al.*, 2002; Levites *et al.*, 2002; Actis-Goretta *et al.*, 2003).

3) Prisustvo fenolnih komponenti u plazmi je veoma nisko uprkos tome što flavonoidi i fenolna jedinjenja mogu biti apsorbovani kroz gastro-intestinalnu (GI) barijeru.

Koncentracije koje se postižu u plazmi su obično niže od  $1\mu\text{mol/L}$ , što je delom posledica brzog metabolisanja od strane humanih tkiva ili bakterija GI trakta. Mnogi od produkata metabolizma ovih jedinjenja kao što su metilovane forme ili forme glukuronata imaju značajno umanjen antioksidativni kapacitet u odnosu na izvorna fenolna jedinjenja. Iz pomenutih razloga se postavlja pitanje da li su ove koncentracije dovoljne za ispoljavanje sistemskog antioksidativnog efekta (Halliwell *et al.*, 2005).

4) Flavonoidi i druga fenolana jedinjenja su u suštini ksenobiotici i njihovi citotoksični efekti su zabeleženi kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* studijama. I pored toga fiziološki smisao ovakvih efekata je i dalje nejasan, mada je pokazano da brza oksidacija fenolnih komponenata u ćelijskom medijumu dovodi do nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$  i kinonskih/semikinonskih formi fenola, koji su najverovatnije odgovorni za citotoksične efekte. (Halliwell *et al.*, 2005).

Uprkos navedenim činjenicama koje osporavaju sistemsko delovanje fenolnih jedinjenja kao antioksidanasa, nedvosmisleno je da bar u pojedinim organskim sistemima, poput digestivnog trakta flavonoidi mogu ispoljavati lokalno antioksidativno i protektivno dejstvo za šta postoji više dokaza.

Prema predloženom mehanizmu antioksidativni i protektivni efekat fenolnih jedinjenja se ispoljava pre apsorpcije u digestivnom traktu (Halliwell *et al.*, 2000). Smatra se da ova jedinjenja mogu ispoljavati protektivni efekat u smislu prevencije gastričnog karcinoma kao i karcinoma kolona putem antioksidativnog kao i drugih mehanizama delovanja, poput modulacije genske ekspresije, inhibicije enzima, uticaja na puteve signalne transdukcije i uticaja na sastav crevne flore, ne vezujući biološku aktivnost striktno za antioksidativnu aktivnost pomenute klase jedinjenja. Logičke pretpostavke ove hipoteze se ogledaju u činjenici da su koncentracije fenolnih jedinjenja u GI traktu daleko veće od pomenutih  $1\mu\text{mol/L}$  koje se mogu naći u cirkulaciji. Pošto je apsorpcija fenolnih jedinjenja nepotpuna, ona ulaze u kolon gde zajedno sa svojim metaboličkim produktima, koji su posledica mikrobijalne fermentacije, mogu ispoljavati korisne efekte. GI trakt je

konstantno izložen reaktivnim vrstama kiseonika, hlora i azota poreklom iz hrane ili aktivacije fagocita. Izvori reaktivnih vrsta uključuju:

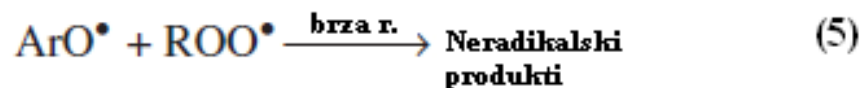
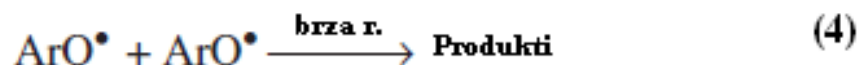
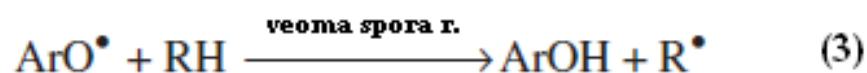
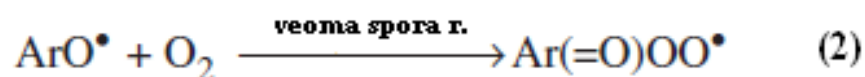
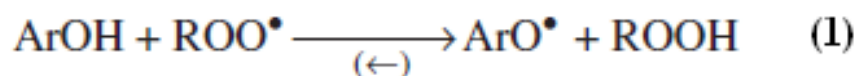
- 1) Mešavine koje sadrže askorbat i  $\text{Fe}^{2+}$  jone sa izuzetno izraženim prooksidativnim efektom.
- 2) Prehrambeni proteini koji sadrže hem.
- 3) Lipidni peroksidi, citotoksični aldehidi i izoprostani iz hrane, što je vrlo značajan izvor jer želudačni sok stvara uslove za peroksidaciju prehrambenih lipida.
- 4) Nitrati iz hrane i pljuvačke koji se konvertuju pomoću želudačne kiseline u  $\text{HNO}_2$ , koja se pak dalje prevodi u reaktivne vrste azota.
- 5) Pojedine namirnice koje sadrže visoke koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- 6) Namirnice sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja koja poseduju visok afinitet prema kiseoniku kao što su hidroksi-hidrohinoni.
- 7) Aktivacija imunskih ćelija prirodno prisutnih u GI traktu.

Direktni protektivni efekti flavonoida i drugih fenolnih komponenti u digestivnom traktu se mogu ogledati u neutralisanju reaktivnih vrsta, inhibiciji lipidne peroksidacije indukovane proteinima koji sadrže hem, inhibicije deaminacije DNK izazvane reaktivnim vrstama azota, helaciji redoks-aktivnih prelaznih metala i aktivaciji antioksidativnih enzima.

Poznata je činjenica da fenoli sprečavaju ili odlažu oksidaciju mnogih organskih matriksa putem transfera vodonikovog atoma sa svojih -OH grupa na peroksil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) radikal, po mehanizmu koji najverovatnije uključuje prenos vodonika u obliku protona i jednog elektrona između dva atoma kiseonika (Foti, 2007). Oni spadaju u grupu takozvanih antioksidanata koji zaustavljaju lančane slobodno-radikalske reakcije (*eng. chain-breaking antioxidants*). Mehanizam prenosa aromatičnog vodonika na  $\text{ROO}^{\bullet}$  je poznat i pod nazivom HAT (*eng. H Atom Transfer*) mehanizam (Bolland and Have, 1947). U skorije vreme ova



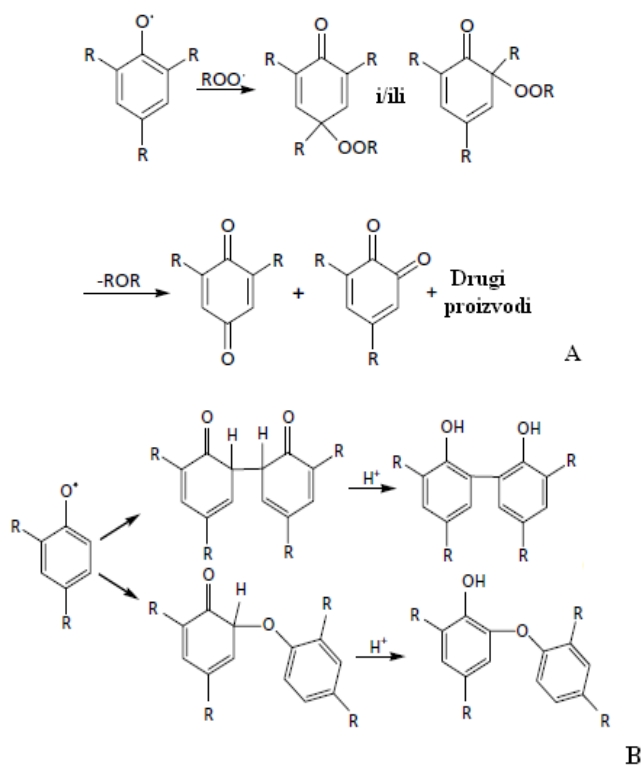
hipoteza je unapređena i mehanizam je nazvan protonom kuplovani transfer elektrona – PCET (eng. *Proton-Coupled Electron Transfer*). Ovaj mehanizam uključuje prethodno formiranje vodonične veze između vodonika iz fenolne OH grupe i elektronskog para sa kiseonika O<sup>•</sup> iz peroksil radikala, potom se vodonik prenosi kao proton između dva atoma kiseonika, a jedan elektron simultano prelazi iz 2p orbitale kiseonika fenolne grupe na kiseonik iz peroksil radikala u orbitalu u kojoj je nesporeni elektron (Foti, 2007).



**Slika 25.** Reakcije fenolnih antioksidanata sa peroksilnim radikalom i terminacija slobodnoradikalne reakcije (preuzeto i modifikovano iz Foti, 2007)

Od fenola nastaje rezonantno stabilisani ariloksil radikal (ArO<sup>•</sup>) (**Slika 25**), reakcija (1) koji je efikasan fenolni antioksidant, slabo reaktivan prema molekulskom kiseoniku ili supstratu, reakcije (2) i (3). Terminacija lančane radikalne reakcije se događa interakcijom dva ariloksil radikala (**Slika 25**), reakcija (4) ili ariloksil radikala i nekog drugog radikala, reakcija (5) ArO<sup>•</sup> radikal je u stanju da reaguje sa drugim radikalom ROO<sup>•</sup> pri čemu najčešće dolazi do adicije na aromatičnom prstenu (**Slika 26**), reakcija A. ArO<sup>•</sup> sa

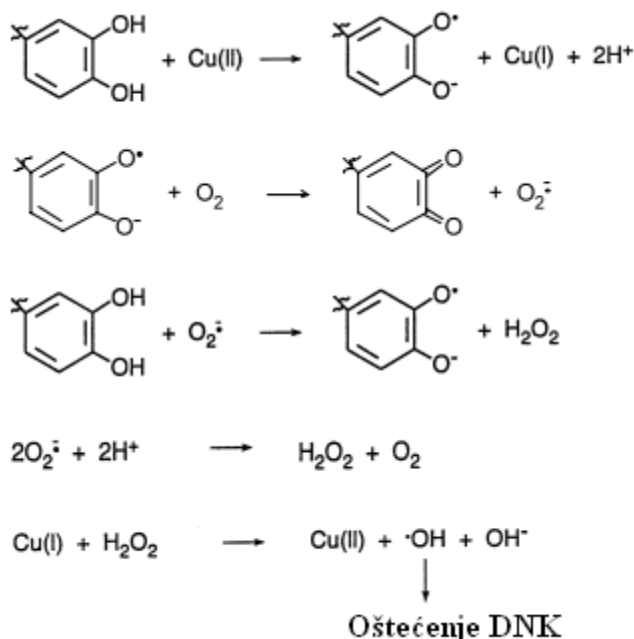
istovetnim molekulom (*eng. self-quenching*) daje najčešće C-C ili C-O produkte (**Slika 26**), reakcija B.



**Slika 26.** Sudbina ArO• radikala (preuzeto i modifikovano iz Foti, 2007)

Fenoli, pored antioksidativne, mogu pokazati i prooksidativnu sposobnost. Fenoksil radikali nastali tokom antioksidativne reakcije pod normalnim uslovima ne pokazuju prooksidativnu aktivnost zbog brze konverzije u ne-radikalisku formu polimerizacionom, enzimskom ili neenzimskom reakcijom redukcije radikala. Fenoksil radikali pokazuju citotoksičnu prooksidativnu aktivnost samo u slučaju produžetka života radikala. Smatra se da u tom procesu bitnu ulogu imaju metalni joni i da je taj proces u osnovi patogeneze Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Kristinova, 2008). Na primer inicijalna oksidacija katehola od strane  $\text{Cu}^{2+}$  daje semikinon koji reaguje sa kiseonikom dajući u sledećoj reakciji superoksid anjon radikal. Ova reakcija ima autokatalitički karakter, pošto će

superoksid anjon radikal naknadno oksidovati katehol regenerišući semikinon i dajući vodonik peroksid. Vodonik peroksid može nastati i u reakciji dismutacije superoksid anjon radikala. U prisustvu jednovalentnog bakra ( $\text{Cu}^+$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  se brzo konvertuje do visokoreaktivnog hidroksilnog radikala u Fentonovoj reakciji (Sakihama *et al.*, 2002). Sve pomenute reakcije su prikazane na **Slici 27**.

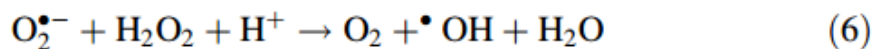
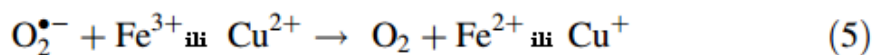
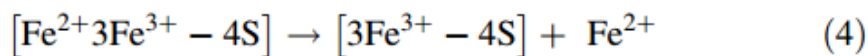
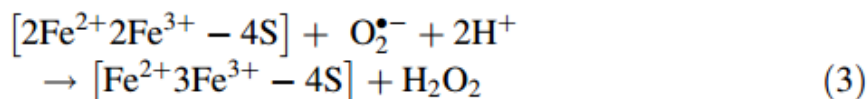
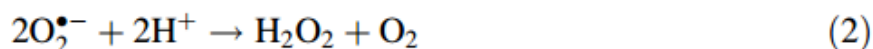
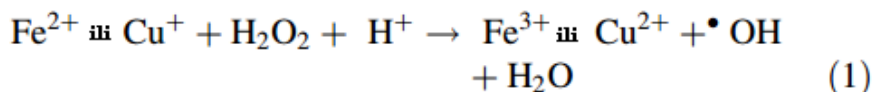


**Slika 27.** Prooksidativne reakcije fenolnih radikala (preuzeto i modifikovano iz Sakihama *et al.*, 2002)

U novijim studijama se više pažnje posvećuje upravo prooksidativnim efektima fenola. Postoje hipoteze u kojima se pretpostavlja da izlaganje ćelija niskim koncentracijama prooksidanata vrši aktivaciju ćelijskih mehanizama antioksidativne zaštite, koje se na taj način pripremaju i lakše prevazilaze situacije u kojima dolazi do oksidativnog stresa (Halliwell, 2008; Halliwell, 2012).

Još jedna značajna aktivnost fenolnih jedinjenja koja se svrstava u indirektnu antioksidativnu aktivnost je sposobnost helacije prelaznih metala koji mogu dovesti do geneze reaktivnih vrsta. Hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) koji predstavlja jednu od najreaktivnijih vrsta kiseonika nastaje na nekoliko načina, a jedan od bitnijih izvora je redukcija peroksida

posredovana metalima (**Slika 28**). Vodonik peroksid se najčešće redukuje od strane  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Cu}^+$  u Fentonovoj reakciji (reakcija 1). Formiranje bioloških peroksida kao što je  $\text{H}_2\text{O}_2$  je proces koji se prirodno dešava u toku ćelijske respiracije, zatim protonacijom superoksida u vodenom medijumu (reakcija 2), oksidacijom [4Fe-4S] proteina od strane superoksid anjon radikala ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (reakcija 3). Pored geneze  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  oslobađa  $\text{Fe}^{2+}$  iz enzima kao što su [4Fe-4S] dehidrataze i feritin (reakcija 4). Superoksid takođe redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  iz vodenih rastvora, prevodeći ih u oblik koji može reagovati sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reakcija 5), mada je poluvreme ove reakcije u *in vivo* sistemima veoma dugo (10h) i u ćeliji postoje prisutniji reduktanti kao što je na primer NADH, pa je ova reakcija od manjeg značaja. Dugo se smatralo da je jedan od izvora hidroksilnog radikala i Haber-Weiss-ova reakcija, mada je konačno pokazano da se ona *in vivo* ne dešava (Perron and Brumaghim, 2009).

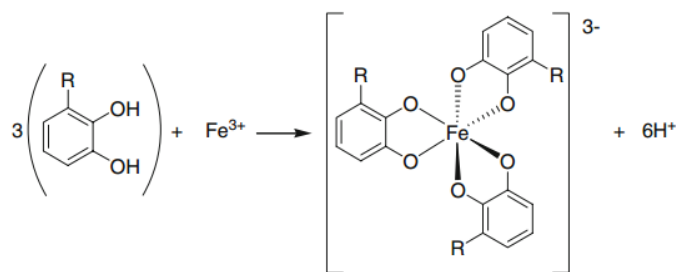


**Slika 28.** Prooksidativne reakcije prelaznih metala (preuzeto i modifikovano iz Perron and Brumaghim, 2009).

U situacijama kada je vodonik peroksid prisutan u povišenim koncentracijama usled oksidativnog stresa, ili iz nekog egzogenog izvora, redoks aktivni metali kao što su  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Cu}^+$  a koji su lokalizovani i vezani elektrostatičkim interakcijama za fosfatnu okosnicu DNK ili kovalentno za azotne baze reaguju sa njim dajući  $\text{OH}^{\bullet}$  radikale. Hidroksilni radikal oduzima vodonik sa 4' pozicije u dezoksiribozi, što posle sleda reakcija dovodi do

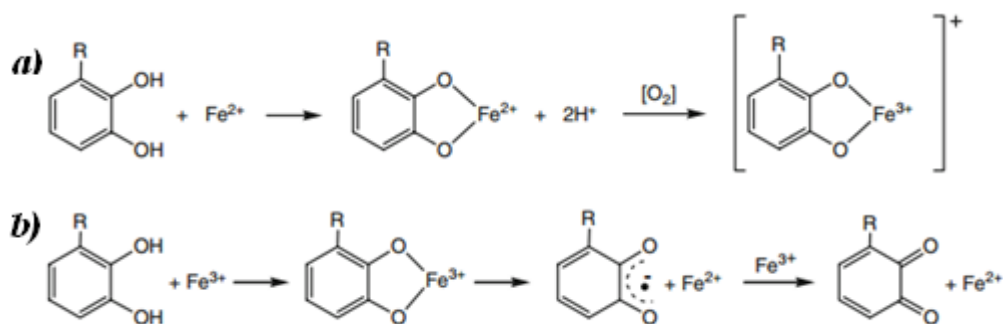
raskidanja fosfodiesterne veze. Alternativno,  $\text{OH}^\bullet$  radikal može oksidovati azotne baze dajući produkte poput 8-oksoguanina, a mogu dovesti i do otvaranja ili fragmentacije prstena azotne baze. Oštećenja DNK nastale kao posledica pomenutih reakcija (prekidi lanca i oštećenje baza) mogu naknadno dovesti do genetičkih mutacija, kancera ili ćelijske smrti (Perron and Brumaghim, 2009).

Katehol i galol kao i njihovi derivati (što uključuje većinu fenolnih jedinjenja) su efikasni helatori metala. Kada se nalaze u deprotonovanom obliku katehol i galol, što je potrebno da bi helacija bila moguća, ovi ostaci se nazivaju kateholati ili galati. Za helaciju metalnih jona, potrebna je oktaedralna geometrija koja se postiže kada se tri kateholatne ili galatne grupe koordinativno vežu za jon metala (**Slika 29**).



**Slika 29.** Oktaedralna geometrija pri koordinativnom vezivanju jona metala (preuzeto i modifikovano iz Perron and Brumaghim, 2009).

Imajući ovo u vidu, očekivano je da će polifenoli sa galatnim ili kateholatnim grupama uvek vezivati gvožđe u odnosu 1:3. (Perron and Brumaghim, 2009). Ipak uzimajući u obzir izuzetno veliku strukturnu raznolikost polifenola kao i činjenicu da je formiranje kompleksa zavisno od pH vrednosti, ispoljava se veći broj modaliteta koordinacije jona metala od strane fenolnih jedinjenja. Fenolna jedinjenja se lako deprotonuju na fiziološkom pH u kontaktu sa gvožđem, postajući tako snažne Luisove baze, što im daje mogućnost da grade stabilne komplekse sa metalima koji se ponašaju kao snažne Luisove kiseline (npr.  $\text{Fe}^{3+}$ ). Stabilnost kompleksa fenola sa  $\text{Fe}^{2+}$  je mnogo niža pošto ovaj jon spada u granične (slabe) Luisove kiseline, pored toga kompleksovanje  $\text{Fe}^{2+}$  sa fenolima značajno ubrzava njegovu oksidaciju (**Slika 30a**).

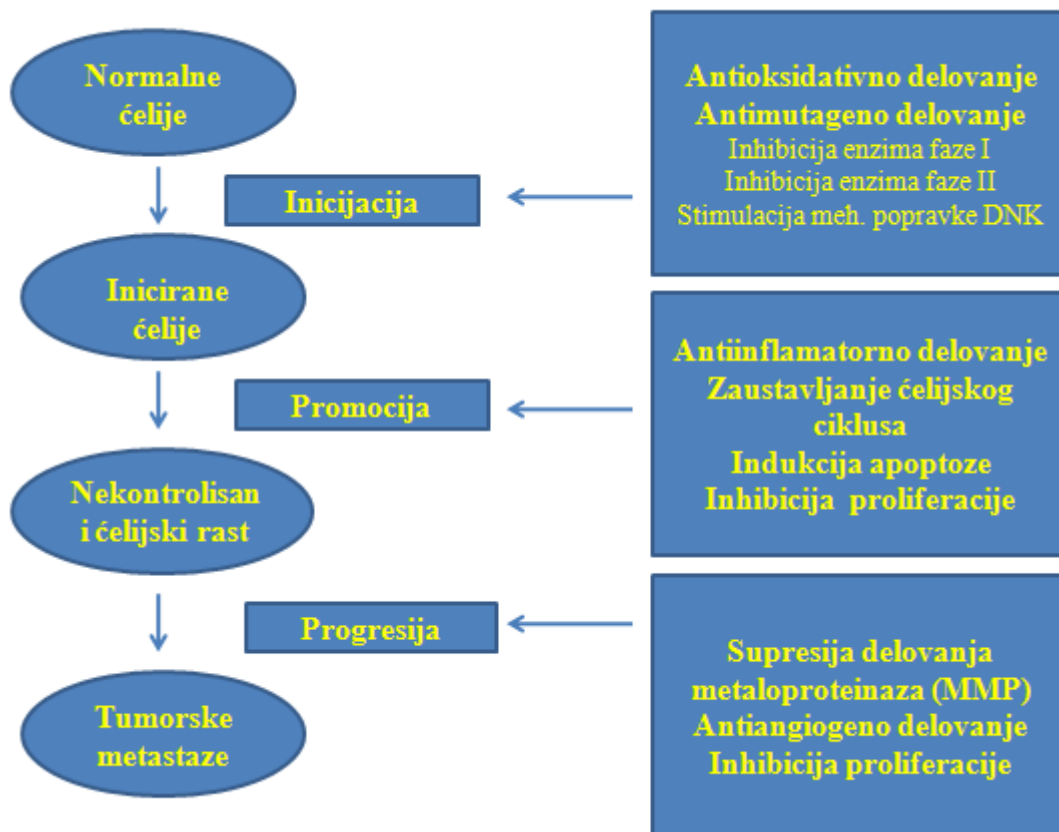


**Slika 30.** a) Koordinacija  $Fe^{2+}$  od strane polifenola i posledični transfer elektrona pri kome se u prisustvu kiseonika gradi kompleks  $Fe^{3+}$  jona i polifenola. b) Koordinacija  $Fe^{3+}$  jona od strane polifenola, pri čemu dolazi do redukcije gvožđa (preuzeto i modifikovano iz Perron and Brumaghim, 2009).

U načelu helacija gvožđa od strane polifenola se smatra indirektnom (posrednom) antioksidativnom aktivnošću, što je podržano brojnim *in vitro* studijama (Kawabata *et al.*, 1996; Yoshino and Murakami, 1998), mada se i dalje aktivno debatuje i o potencijalnim prooksidativnim aktivnostima koje proizilaze iz redukcije gvožđa od strane polifenola (**Slika 30b**), što je eksperimentalno dokazano kao moguća reakcija u *in vivo* sistemima (Hider *et al.*, 2001; Ryan and Hynes, 2007).

### 1.2.2 Antitumorsko dejstvo fenolnih jedinjenja

Neoplastična transformacija je višestupni proces koji uključuje seriju pojedinačnih koraka inicijacije, promocije, progresije, invazije i metastaze (**Šema 2**). Faza inicijacije počinje oštećenjem DNK u ćeliji ili populaciji ćelija izloženih kancerogenima (Doll and Peto, 1981).

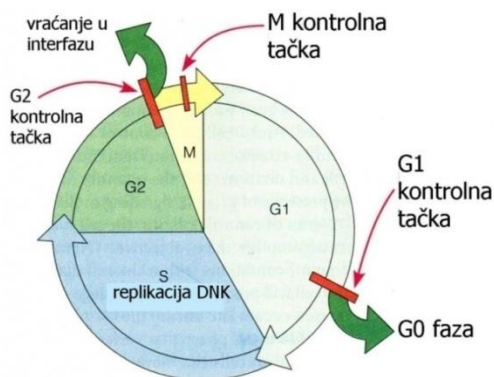


Šema 2. Potencijalni mehanizmi antikancerskog delovanja biljnih fenola

U situaciji kada izostane reparacija DNK, dolazi do genetičke mutacije i takva mutirana ćelija se može podeliti mitozom dajući klon mutirane ćelije. Promocija tumora je selektivna klonalna ekspanzija iniciranih ćelija pri kojoj nastaju aktivno-proliferišuće premaligne tumorske populacije ćelija, što je reverzibilni i dugoročni proces. U kasnijem stadijumu razvoja malignih tumora dolazi do invazije i metastaze (Dai and Mumper, 2010).

Tokom protekle dve decenije pokazan je izuzetan značaj izmenjene regulacije ćelijskog ciklusa u razvoju malignih tumora, zapravo defekti u regulaciji progresije ćelijskog ciklusa su jedana od naizraženijih osobnosti neoplastično transformisanih ćelija. Maligne ćelije akumuliraju mutacije koje rezultuju u pokretanju konstitutivnog signala za mitozu što pak dovodi do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija. Pored toga maligne ćelije se odlikuju genomskom i hromozomskom nestabilnošću. Ova tri događaja su direktno

ili indirektno posredovana defektnom regulacijom enzima-ciklin zavisnih kinaza (CDK). Progresija ćelijskog ciklusa eukariotskih ćelija je regulisana smenjivanjem aktivacije i inaktivacije serije CDK u različitim fazama ciklusa. Aktivnosti CDK su pozitivno regulisane od strane ciklina koji predstavljaju njihove regulatorne subjedinice. Iako ima više ciklina u humanim ćelijama, samo određene grupe učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa. To su tri interfazna ciklina CDK2, CDK4 i CDK6 koji deluju u interfazi, mitotski CDK1, kao i još deset ciklina svrstanih u četiri klase A, B, D i E. Mutacije koje se povezuju sa malignim tumorima najčešće uslovljavaju izmenjenu regulaciju CDK/ciklin kompleksa, što vodi ulasku u proliferaciju, to jest ponovnom ulasku u ćelijski ciklus. Kontrola ćelijskog ciklusa se sprovodi na određenim kontrolnim tačkama u toku ciklusa. Aktivacija ovih kontrolnih tačaka rezultuje prekidom ciklusa putem modulacije aktivnosti CDK. U ovim tačkama se kontrolišu: a) Oštećenja DNK - G2/M kontrolna tačka; b) Pravilno sastavljanje deobnog vretena - M kontrolna tačka; c) Spremnost za ulazak u S fazu (replikacija DNK) - G1/S kontrolna tačka (**Slika 31**) (Malumbres and Barbacid, 2009). Postoji mnogo studija koje su pokazale da fenolna jedinjenja imaju sposobnost modulacije aktivnosti CDK. U *in vitro* ogledima na kulturama malignih ćelija pokazano je da flavonoidi kao što su kvercetin zatim genistein, luteolin i epigalokatehin galat, mogu delovati na G1/S ili G2/M kontrolne tačke blokirajući proliferaciju (Zi *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2001; Casagrande and Darbon, 2001).



**Slika 31.** Ćelijski ciklus i kontrolne tačke (preuzeto i modifikovano sa <http://gleesonbiology.pbworks.com/w/page/7537859/C9>)



Apoptoza predstavlja proces programirane ćelijske smrti koja se odvija kako u patološkim tako i fiziološkim uslovima. Smanjena sposobnost indukcije apoptoze (programirane ćelijske smrti) ili njeno potpuno odsustvo je odlika malignih ćelija. Upravo je iz tih razloga indukovanje apoptoze jedan od glavnih mehanizama delovanja mnogih antitumorskih lekova. Ključno mesto u pokretanju apoptoze ima aktivacija proteolitičkih enzima kaspaza koja se postiže na nekoliko načina. Prvi je unutrašnji ili mitohondrijalni, drugi je spoljašnji, to jest put koji se aktivira preko receptora smrti a treći je najmanje proučen i povezan je sa aktivacijom preko endoplazmatičnog retikuluma (Xu *et al.*, 2011). Od dvanaest poznatih humanih kaspaza, šest (kaspaza 3, 6, 7, 8, 9 i 10) je zasigurno uključeno u proces apoptoze, što je pokazano na više model sistema. Jedna od trenutno važećih klasifikacija apoptotskih kaspaza deli ih na dve klase: efektorske koje deluju u kasnijim fazama apoptoze a zadužene su za enzimsko sečenje koje vodi ka degradaciji raznih ćelijskih struktura i inicijatorske koje započinju proteolitičku kaskadu (Depraetere and Golstein, 1998; Thornberry and Lazebnik, 1998). U jedne od glavnih efektorskih kaspaza ubrajaju se kaspaze-3, -6 i -7. Jednom aktivirani ovi enzimi su sposobni da vrše sečenje velike većine ćelijskih polipeptida (Earnshaw *et al.*, 1999; Tewari *et al.*, 1995; Sakahira *et al.*, 1998; Sahara *et al.*, 1999). Interesantna je činjenica da povišena ekspresija ovih kaspaza u humanim ćelijama je relativno netoksična, ukazujući pri tom da prekursori kaspaza imaju ograničeni kapacitet autoaktivacije. Umesto toga efektorske kaspaze su obično aktivirane od strane drugih kaspaza. Kaspaze 8 i 9 su glavne inicijatorske kaspaze, proenzimske forme ovih molekula ispoljavaju blagu ali uočljivu proteolitičku aktivnost, a tek posle aktivacije one zadobijaju snažnu proteolitičku aktivnost i sposobnost da dalje indukuju aktivaciju efektorskih kaspaza (Juo *et al.*, 1998; Nagata, 1997). Među supstratima kaspaza se nalaze enzimi uključeni u održavanje funkcije genoma kao što je enzim za reparaciju DNK- poliadenozin difosfat ribozo polimeraza (PARP), kao i DNK zavisna protein kinaza (DNA-PK) ili regulatori ćelijskog ciklusa uključujući retinoblastoma protein, p53 regulator MDM-2, MEKK i protein kinaza C- $\delta$ . U supstrate kaspaza spadaju i strukturni elementi ćelije kao što su lamini, gelsolin i fodrin. Takođe postoje dokazi da je DNK sečenje pokrenuto pomoću kaspaza. Sve ovo ukazuje na činjenicu da kaspaze

formiraju hijerarhijsku mrežu, sličnu onoj kod sistema komplementa, čija je funkcija najverovatnije amplifikacija apoptotskog stimulusa (Garcia-Calvo *et al.*, 1999; Nicholson, 1999; Los *et al.*, 1999).

Postoje konzistentni epidemiološki dokazi koji idu u prilog hipotezi da ishrana bogata fenolnim jedinjenjima značajno umanjuje rizik od pojave mnogih malignih oboljenja (Dai and Mumper 2010). Ekstrakti biljnih fenola su poslednjih decenija testirani na velikom broju malignih ćelijskih linija koje predstavljaju različite evolutivne faze razvoja malignih tumora. Za fenolne ekstrakte bobičastog voća: borovnice, kupine, maline, brusnice i jagode, koji su sadržali u prvom redu antocijanine, kamferol, kvercetin i estre kumarinske i elaginske kiseline, pokazano je da inhibiraju rast ćelijskih linija kancera kolona (HT-29, HCT-116), dojke (MCF-7), prostate (LNCaP, DU-145) i humanog oralnog karcinoma (KB, CAL-27) (Zhang *et al.*, 2008, Seeram *et al.* 2006). Slični rezultati su prijavljeni na nekoliko ćelijskih sistema pri ispitivanju ekstrakata vina i odgovarajućih prečišćenih jedinjenja (resveratrola, kvercetina, katehina i epikatehina), zatim ekstrakata crnog i zelenog čaja, citrusa, maslinovog ulja, jabuka i mahunarki (Dai i Mumper 2010). Takođe je pokazano da izoflavon genistein iz soje inhibira rast više malignih ćelijskih linija: leukemije, limfoma, prostate, dojke i pluća (Sarkar and Li, 2002). Mc Cann i saradnici (2007) su koristeći ustanovljene modele za: genotoksičnost (HT-29), invazioni i metastatski potencijal (HT-115), funkciju barijere kolona (CaCo-2) ispitivali efekat fenolnih ekstrakata jabuka na ključne faze kolorektalne kancerogeneze, zaključivši da pomenuti ekstrakt ima uticaja na sve tri faze kancerogeneze. Takođe je pokazano da galna kiselina indukuje apoptozu u ćelijskoj liniji kancera pluća HCN-H640, pri čemu mehanizam nije potpuno rasvetljen (Ji *et al.* 2009). Pokazano je da galna kiselina indukuje apoptozu koja je povezana sa zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G2/M prelasku, kao i sa povećanjem intracelularne koncentracije  $Ca^{2+}$  jona, gubitkom membranskog potencijala mitohondrija i aktivacijom kaspaze-3. Pored ovoga, galna kiselina povećava i nivo proteina GADD153, GRP78, Bax i Bad, i snižavanje nivoa Bcl-2 i Bcl-xL, vrši aktivaciju kaspaza 8 i 9 i otpuštanje citohroma C i AIF iz mitohondrija (Ji *et al.* 2009).

Pored *in vitro* testova, mnoge *in vivo* studije su sprovedene u cilju potvrđivanja antitumorske aktivnosti fenolnih jedinjenja. Ispitivanja su sprovedena na animalnim modelima kod kojih su tumori indukovani hemijski, genetički ili UV svetlošću, kao i na ksenograft (tumori presađeni na životinje) modelima uključujući kolon, pluća, dojke, jetru, prostatu, želudac, jednjak, tanko crevo, pankreas i tumore kože. Lala i saradnici (2006) su ispitivali hemoprotektivna svojstva ekstrakata bogatih antocijaninima na muškim pacovima soja Fischer 344, tretiranim azoksimetanom, koji izaziva kancer kolona. Posle 14 nedelja ishrane bogate antocijaninima, kod pacova je primećeno smanjenje broja aberantnih fokusa na crevnim kriptama u odnosu na kontrolnu grupu za oko 70%. U drugoj studiji koju su sproveli Ding i saradnici (2006) ispitivana je sposobnost cijanidin-3-glukozida, glavnog antocijanina ploda kupine, da inhibira razvoj papiloma intukovanih 7,12-dimetil benz antracenom i 12-*O*-tetradekanoilforbol-13-acetatom. Tom prilikom je pokazano da izlaganje kože miša sa indukovanim papilomima cijanidin-3-glukozidu, dva puta nedeljno, dovodi do smanjenja broja tumora po jedinki za 53% posle 20 nedelja. Inhibicija tumorogeneze preparatima čaja i aktivnim fenolnim komponentama izolovanim iz njega, kao što je npr. epigalokatehin galat je takođe potvrđena u većem broju studija na animalnim modelima (Dai and Mumper, 2010). Ipak, kada se razmatraju antitumorske aktivnosti čaja treba imati u vidu da ova i srodne biljke sadrže i druge nefenolne aktivne komponente koje imaju antitumorsku aktivnost, poput alkaloida kofeina. Imajući u vidu veći broj studija sprovedenih na animalnim modelima, treba istaći da efektivnost fenolnih ekstrakata na različite organe zavisi od koncentracije aktivnih konstituenata koji mogu dopreti do određenih tkiva, te su stoga vid primene i biološka raspoloživost aktivnih principa faktori koje treba pažljivo razmotriti pri poređenju njihovih inhibitornih aktivnosti na različite tumore. Postoji i nešto manji broj studija sprovedenih na ljudima u kojima je razmatran potencijal fenolnih jedinjenja u prevenciji kancera. U većini ovih studija su praćeni biološki markeri antioksidativnog statusa ili oksidativnog stresa, kao što su: antioksidativni kapacitet plazme i seruma, koncentracija malondialdehida (jedan od proizvoda oksidacije lipida) u plazmi, status glutaciona, oksidativna oštećenja na DNK

mononukleara iz krvi, praćenje 8-hidroksi-2'-deoksi guanozina (markera oksidativnog oštećenja nukleotida) u urinu itd. (Dai and Mumper, 2010).

U šestomesečnoj hemiopreventivnoj pilot studiji sprovedenoj na pacijentima sa Baret-ovim jednjakom, predmalignim oboljenjem jednjaka koje se karakteriše metaplastičnim promjenama skvamoznog epitela, je utvrđeno da je ishrana koja je sadržala 32-45g/dan liofolizovanog ekstrakta kupine dovela redukovane urinarne ekskrecije 8-hidroksi-2'-deoksi guanozina, ukazujući na redukciju oksidativnih oštećenja nukleotida (Kresty *et al.*, 2006). Novija studija koju su sproveli Sporman i saradnici (2008) u cilju procene efekata konzumiranja voćnih sokova bogatih antocijaninima od strane pacijenata na hemodijalizi. Ova grupa pacijenata se smatra grupom povišenog rizika za pojavu kancera, arterioskleroze i drugih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Studija je obuvatala dvadeset jednog pacijenta na hemodijalizi koji su kao dodatak ishrani konzumirali po 200 mL na dan soka od crvenog voća u periodu od 4 nedelje. Na nedeljnoj bazi su praćena oštećenja na DNK komet esejem, sadržaj glutaciona, malondialdehida i karbonilovanih proteina (oksidativno oštećenih proteina) kao i ukupnog antioksidativnog kapaciteta u krvi i NF- $\kappa$ B vezujuće aktivnosti. Rezultati su ukazali na statistički značajno smanjenje oksidativnih oštećenja DNK, proteina i lipida i smanjenu NF- $\kappa$ B vezujuću aktivnosti. Autori su ove efekte povezali sa visokim koncentracijama antocijanina i drugih polifenola u korišćenim sokovima, zaključujući da njihova konzumacija može predstavljati preventivnu meru u smanjivanju verovatnoće za razvoj hroničnih bolesti poput kancera i kardiovaskularnih oboljenja u populacijama koje su izložene pojačanom oksidativnom strasu kao što su pacijenti na hemodijalizi.

NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor kapa B) je redoks senzitivni transkripcioni faktor koji reguliše brojne fiziološke funkcije i uključen je u patogenezu mnogih oboljenja. NF- $\kappa$ B reguliše ekspresiju citokina, inducibilne azot oksid sintaze (iNOS), ciklooksigenaze 2 (COX-2), faktora rasta kao i inhibitora apoptoze. Patološki izmenjena regulacija NF- $\kappa$ B je povezana sa inflamatornim bolestima kao što su astma, Kronova bolest, ulcerozni kolitis, autoimunske bolesti kao što je reumatoidni artritis, zatim sa neurodegenerativnim bolestima

i pojavom kancera. Za nekoliko fenolnih jedinjenja je pokazano da su potentni inhibitori NF- $\kappa$ B, među njima se izdvajaju: kurkumin, resveratrol i epigalokatehin-galat. Za kurkumin je pokazano da u dozama od 10-30  $\mu$ mol/L inhibira aktivaciju NF- $\kappa$ B kod ćelija humanog karcinoma prostate (Crozier *et al.*, 2009).

Aktivator protein 1 (AP-1) je takođe redoks senzitivni transkripcioni faktor sa ulogama u normalnom razviću i odgovoru na stres. Povezan je sa regulacijom rasta, ćelijskom transformacijom, inflamacijom i urođenim imunskim odgovorom. Ima ulogu u regulaciji ekspresije gena uključenih u apoptozu, a poznato je da može promovisati ćelijsku proliferaciju aktivirajući ciklin D1 gen i reprimirajući tumor supresorske gene kao što su p53, p21cip1/waf1 i p16. Pokazano je da flavan-3-oli iz zelenog čaja, *trans*-resveratrol i kurkumin imaju sposobnost da suprimiraju odgovor pokrenut preko AP-1 (Crozier *et al.*, 2009).

Za antocijanine je pokazano na ćelijama u kulturi da imaju sposobnost indukcije enzima faze II koji imaju antioksidativnu ulogu. Ćelije klona 9 jetre pacova i neizmenjene ćelije dojke tretirane visokim koncentracijama antocijanina (20-50mM) su pokazivale uvećan antioksidativni kapacitet, kroz povećanje aktivnosti NADPH reduktaze, glutation reduktaze, glutation S-transferaze i glutation peroksidaze. I ostale fenolne komponente su takođe uključene u indukciju enzima faze II, pa se stoga mogu smatrati kandidatima za prevenciju malignih oboljenja. Tretman 5-O-kofeoilkvinskom kiselinom povećava aktivnos glutation S-transferaze i NADPH oksidoreduktaze u kulturi mišjih epidermalnih ćelija. Slični rezultati su dobijeni sa tretmanima više tipova ćelija u kulturi sa napicima bogatim fenolnim komponentama kao što su čaj i mate. Mehanizmi preko kojih ove komponente deluju su aktivacija gena pozicioniranih „uzvodno“ u sistemu regulacije antioksidativnog odgovora ćelije. U skorijim studijama je pokazano da nuklearni transkripcioni faktor eritroid 2p45 (NF-E2)-vezani faktor (NRF 2) kritični transkripcioni faktor koji se vezuje za gene koji kodiraju antioksidativne enzima u više tipova ćelija i tkiva. Fenolne komponente poput galne kiseline, p-kumarinske kiseline i ferulunske kiseline u većim koncentracijama (100mg/kg telesne mase) dovode do značajnog povećanja nivoa NRF 2 i posledičnog

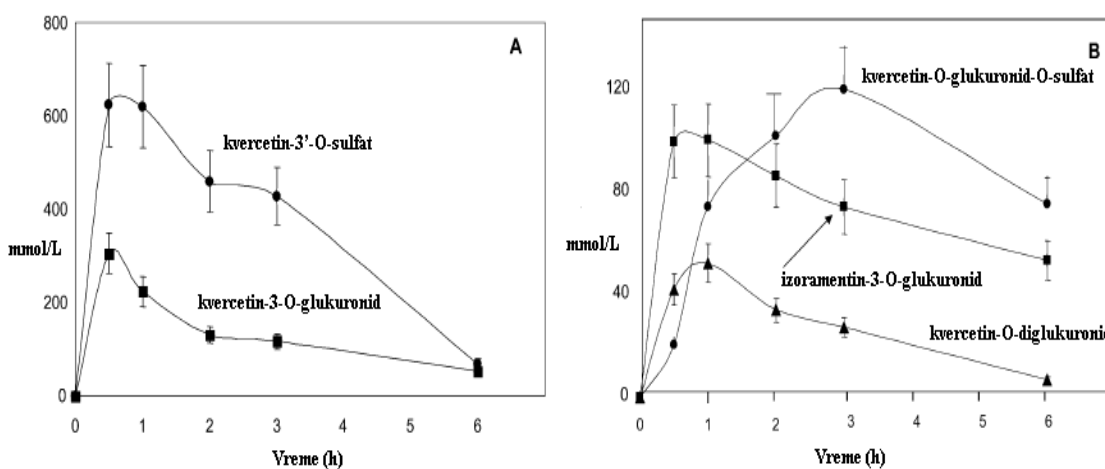
povećanja ekspresije gena za antioksidativne enzime u srčanom mišiću pacova. Slično tome pokazano je da kurkumin, *trans*-resveratrol i sintetički analozi kofeinske kiseline i 4'-bromflavon ispoljavaju hemopreventivne efekte kroz stimulaciju Nrf 2 (Crozier *et al.*, 2009).

MAP kinaze su familija visoko konzerviranih signalnih proteina koji mogu biti podeljeni u tri glavne grupe: 1) Erk- aktivirane ekstracelularnim signalima 2) c-Jun N terminalne kinaze/ stresom aktivirane kinaze (JNK) i 3) p38MAPK. Tipično je da su JNK i p38MAPK kaskade aktivirane sredinskim stresom i proinflamatornim citokinima, kao što su TNF, interleukini 1, 2 i 17 i uglavnom su povezani sa indukcijom inflamacije i programirane ćelijske smrti. MAPK signalni put je uključen i u regulaciju ekspresije enzima faze II i indukciju apoptoze. Flavan 3-oli iz zelenog čaja: epigalokatehin galat primenjen u dozi od 25mmol/L a detektovan u cirkulaciji sa koncentracijom od 100nM suprimirao je tumorigenezu putem indukcije MAP kinaza (ERK, JNK i p38) na nekoliko animalnih modela kod kojih je hemijski indukovana kancerogeneza, pri čemu je primećen dozno-zavisni i vremenski-zavisni efekat. (+)-Katehin i kvercetin u milimolarnim koncentracijama su ispoljavali kardioprotektivni efekat kroz supresiju PAL-1 ekspresije *in vitro* u kulturi humanih endotelijalnih ćelija poreklom iz koronarne arterije kroz aktivaciju ERK, JNK i p38 signalnih puteva. U jednoj od skorašnjih studija je pokazano da kvercetin, takođe primenjen u milimolarnim koncentracijama ispoljava dozno-zavisnu anti adipogenu aktivnost aktivirajući apoptozu diferenciranih adipocita aktivacijom ERK i JNK signalnih puteva. 5-O-Kofeoilkvinska kiselina ispoljava hemioprotektivni efekat na A594 humanim malignim ćelijama *in vitro* na dozno zavistan način u koncentracijama od nekoliko mmol/L uglavnom preko regulacije MAPK signalnog puta. Dodatno je pokazano da vrši supresiju NF- $\kappa$ B i AP-1 signalnog puta posredovanog reaktivnim vrstama kiseonika i na taj način pruža zaštitu od hemijskih kancerogena iz spoljašnje sredine (Crozier *et al.*, 2009).

### 1.3 Bološka raspoloživost fenolnih jedinjenja

Dijetni flavonoidi kao najmnogobrojnija i najprisutnija grupa fenolnih jedinjenja u ishrani ljudi postoje predominantno kao konjugati u formi glikozida i usvajaju se ograničeno u tankom crevu. Ovaj proces je vezan sa hidrolizom i oslobađanjem aglikona kao rezultat rada enzima laktaze-florizin hidrolaze (LPH), koja se nalazi na trepljastoj ivici epitelijalnih ćelija creva i ima veoma široku supstratnu specifičnost za flavonoid-*O*- $\beta$ -*D*-glukozide. Oslobođeni aglikoni ulaze pasivnom difuzijom u epitelijalne ćelije zahvaljujući svojoj povećanoj lipofilnosti i blizini ćelijske membrane (Croizer *et al.*, 2009). Alternativno mesto hidrolize glikozida je citoplazma gde postoji enzim citosolna  $\beta$ -glukozidaza (CBG). Da bi se ovo odigralo potrebno je da se polarni glukozid transportuje u epitelijalnu ćeliju, najverovatnije učešćem aktivnog natrijum zavisnog transportera SGLT1. Stoga su ova dva puta usvajanja opšte prihvaćena u literaturi. Ipak, novija istraživanja u kojima je SGLT1 transporter eksprimiran u oocitama organizma *Xenopus laevis* su pokazala ne samo da SGLT1 ne transportuje flavonoide već i da određeni glukozidi i aglikoni imaju sposobnost da ga inhibiraju. Pre prelaska u krvotok flavonoidi podležu raznim metaboličkim promenama formirajući sulfate, glukuronide i veći broj metilovanih produkata, a takođe dolazi o do refluksa u lumen tankog creva. Pretpostavka je da se ovo događa pomoću transportera sličnih MRP (*eng. Multidrug Resistance Protein*) transporteru. Kada se nađu u krvotoku podležu drugoj fazi metaboličke obrade koja se odvija u jetri, odakle se enterohepatičnim transportom deo prenosi u žuč, odakle opet mogu dospeti u tanko crevo. Neapsorbovani deo i deo koji se vraća u tanko crevo podleže dejstvu enzima mikroflore kolona pri čemu nastaju aglikoni koji se dalje razlažu do fenolnih kiselina i hidroksicinamata koje mogu biti apsorbirane i kasnije ekskretovane preko urina. Sudija koju su sproveli Mullen i saradnici (2006) ispitivala je biološku raspoloživost kvercetin-4'-*O*-glukozida i kvercetin-3,4'-*O*-diglukozida iz luka. Pacijenti su bili na dijeti sa niskim sadržajem flavonoida dva dana pre ingestije oboka koji se sastojao od 270g luka koji je sadržao ukupno 275  $\mu$ mol gor pomenutih flavonoidnih glukozida, posle čega je 24h praćen sadržaj njihovih metabolita u plazmi putem HPLC-MS analize. Pet metabolita kvercetina je detektovano: kvercetin-3'-*O*-sulfat, kvercetin-3-*O*-glukuronid, kvercetin-*O*-glukuronid-*O*-

sulfat, kvercetin-*O*-diglukuronid i izoramentin-3-*O*-glukuronid. Njihovi kvantitativni profili 0-6h posle ingestije su prikazani na **Slici 32**. Ova i više sličnih studija (Jaganath *et al.*, 2006; Mullen *et al.*, 2008; Stalmach *et al.*, 2009) potvrđuju da samo veoma mali deo od inicijalno unete količine fenolnih jedinjenja dospeva u krvotok (u koncentracijama < 1  $\mu$ M), a još manji deo ostaje u nepromenjenom hemijskom obliku koji se može naći u biljnim tkivima. Procenat unešene količine fenolnih jedinjenja koja će se apsorbovati uslovljen je strukturom samog jedinjenja (npr. vrsta šećera vezana za aglikon) kao i sastavom hranljivog matriksa uz koji se fenolna jedinjenja unose. Svaki uneti pojedinačni fenol ili polifenol daje više metabolita, možda čak i do 20 iako uglavnom 2-3 dominiraju, stoga je njihove egzaktne količine teško predvideti s obzirom da zavise ne samo od individualnih genetičkih razlika već i od individualnih varijacija u sastavu crevne mikroflore i njenih enzima (Croizer *et al.*, 2009). Biološki efekti nastalih metabolita su u zavisnosti od njihovih koncentracija na relevantnim mestima, kao i od prijemčivosti njihovog vezivnog mesta (receptora, enzima, transportera itd), što takođe podleže individualnim varijacijama na genskom nivou. Ovakva situacija dovodi do otežane interpretacije rezultata dobijenih u *in vivo* sistemima.



**Slika 32.** Koncentracije kvercetin-3'-*O*-sulfata, kvercetin-3-*O*-glukuronida (A) i kvercetin-*O*-glukuronid-*O*-sulfata, kvercetin-*O*-diglukuronida i izoramentin-3-*O*-glukuronida (B) u plazmi šest zdravih ispitanika u period od 0 do 6h posle konzumacije uzorka koji je sadržao 275  $\mu$ mol flavonol glukozida (preuzeto i modifikovano iz Crozier *et al.*, 2009).



## 1.4 Grašak

Porodica mahunarki (*Fabaceae*) obiluje ekonomski i poljoprivredno značajnim vrstama među kojima se po zastupljenosti gajenja u Srbiji izdvaja grašak (*Pisum sativum* L.) sa udelom od 4,5% u ukupnoj povrtarskoj proizvodnji dok je godišnja proizvodnja graška u svetu, prema podacima iz 2006 godine, procenjena na 892 000 t (Duranti, 2006). Dok je prema podacima prema podacima Svetske organizacije za hranu i poljoprivredu FAO (*eng. Food and Agriculture Organization*) 2009 dosegla čitavih 10 000 000 t, a glavni proizvođači su Kanada, Ruska federacija, Kina, Sjedinjene američke države i Indija (FAOSTAT 2011)

Pretpostavlja se da je grašak u Evropu donet sa Blisko-Istočnog Mediterana gde mu je postojbina. Prvi tragovi su nađeni na prostorima Turske i Iraka, a procenjuje se da datiraju sa početka neolita (7000 godina p.n.e) (Dore and Varouquaux, 2006)

Mahunarke, gde spada i grašak se smatraju za izuzetno značajne komponente ljudske ishrane posebno u nerazvijenim zemljama, zbog njihovog balansiranog nutritivnog sastava (Dahl *et al.*, 2012). Predstavljaju bogat izvor, u prvom redu proteina i skroba, zatim vlakana i minerala. Grašak (*Pisum sativum* L.) je jednogodišnja dikotiledona biljka iz porodice mahunarki (*Fabaceae*). Ima zeljasto stablo uglastog preseka koje može biti granato ili negranato. Odlikuje se sa manje mehaničkih elemenata te je često poleglo ili se povija. Listovi su perasto složeni sa 1-3 para listića, na vrhu se završava rašljikom (**Slika 33**). Cvetovi su dvopolni i zigomorfni leptirastog izgleda skupljeni u grozdaste cvasti. Krunicu čine zastavica krilce i čunić. Zastavica je crvenkasta, ljubičasta ili bela sa tanmom nervaturom, široka je i obrnuto srcasta. Krila su tamno crvena ili bela a čunić je roze boje ili bledo zelenkast. Cvet ima deset prašnika od toga devet sraslih i jedan slobodan. Plodnik tučka je skoro sedeći i sadrži više semenih zametaka. Plod je mahuna, najčešće prava i na krajevima zašiljena, dužine 4-11cm. Mahuna može sadržati od 3 do 10 semena koja mogu biti glatka ili sa teksturom (Petković, 1995). Boja semena je najčešće zelena ali postoje i vrste sa žutom, bež, narandžastom i tamno-braon bojom semena (Bernhoft, 2008).



**Slika 33.** Uzgoj graška na otvorenom a); grašak u cvetu b); zrela stabljika c); plod graška (mahuna) d).

U **Tabeli 3** prikazan je sastav nekih komponenti graška (Dahl *et al.*, 2012). Uz proteine i ugljene hidrate, treba pomenuti, masti, lecitin i dijetna vlakna. Za vreme klijanja graška stvaraju se vitamini C i E. Plod je odličan izvor vitamina C (50% preporučenog dnevnog unosa), ali ga u osušenim plodovima ima samo u tragovima. Vitamin E postoji u maloj količini, ali je postojan tokom kuvanja. Vitamina A ima u tragovima. Grašak je i odličan izvor tiamina (vitamin B1) u suvim plodovima, a dobar izvor riboflavina (vitamin B2) i niacina koji ima ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti.

**Tabela 3.** Sastav nekih komponenti graška (preuzeto i modifikovano iz Dahl *et al.*, 2012).

<b>Komponente</b>	<b>Opseg (%)</b>
Proteini	21,2-32,9
Skrob	36,9-49,0
Amiloza	20,7-33,7
Ukupna dijetna vlakna	14,0-26,0
Nerastvorljiva vlakna	10,0-15,0
Rastvorljiva vlakna	2,0-9,0
Rastvorljivi šećeri	5,3-8,7
Totalni lipidi	1,2-2,4
Pepeo	2,3-3,4

## 1.5 Sastav fenolnih jedinjenja semena graška

U skorije vreme pored nutrijenata pažnju naučne javnosti privlače i efekti koje na zdravlje ljudi ispoljavaju sekundarni metaboliti ovih biljaka. Visok sadržaj fenolnih jedinjenja kod graška je često povezan sa smanjenjem efikasnosti varenja proteina, te se ova jedinjenja smatraju antinutrijentima, posebno u ishrani preživara. Sa druge strane ta ista fenolna jedinjenja među kojima su: flavonoidi, lignani, fenolne kiseline i tanini, smatraju se vrednim bioaktivnim sastojcima koji mogu ispoljavati širok spektar bioloških aktivnosti (Amarowicz and Pegg, 2008).

Semenjače graška, posebno genotipova sa izrazito pigmentisanim tamnim semenima (Troszynska and Ciska, 2002) predstavljaju značajan izvor fenolnih jedinjenja čiji su sastav i biološke aktivnosti nedovoljno ispitani, te stoga ni potencijal ovog materijala nije iskorišćen na odgovarajući način. Semenjače graška čine i do 10% suve mase semena i uglavnom predstavljaju otpadni materijal koji nastaje u procesu industrijske izolacije proteina semena koji se koriste u humanoj i animalnoj ishrani (Han and Baik, 2008; Innocentini *et al.*, 2009). Prethodne studije fenolnog sastava evropskih varijeteta graška su ograničene na veoma mali broj komercijalnih kultivara, a pogotovo nedostaju podaci o varijetetima sa pigmentisanim i tamno obojenim semenjačama koji su sa manjim udelom zastupljeni u humanoj ishrani usled neodgovarajućih senzoričkih karakteristika, te se intenzivnije koriste u ishrani životinja. U prethodnim studijama sprovedenim na evropskim kultivarima sa svetlim i tamno bojenim semenjačama analize su pokazale da se značajno veće količine fenolnih jedinjenja nalaze kod tamnih kultivara i da je najviše polifenola, u prvom redu flavonoida i tanina skoncentrisano u semenjačama, čiji sastav intenzivno varira u zavisnosti od ispitivanog kultivara (Troszynska and Ciska, 2002; Amarowicz and Pegg, 2008). U semenjačama su detektovane značajne količine glikozida kvercetina, luteolina, apigenina i tetrahidroksidihidroalkona. Takođe je zabeleženo prisustvo izoflavona i flavanola, u prvom redu katehina galokatehina i epigalokatehina, dok su pojedini kultivari sadržali i veće količine fenolnih kiselina - galne, protokatehinske i *p*-hidroksibenzoeve (Duenas *et al.*, 2004). Nešto više podataka o sadržaju ukupnih fenola pružaju studije

sprovedene na severnoameričkim i evropskim kultivarima gde je procenjeno da je sadržaj varirao od 162-325 mg/kg suve mase semena što predstavlja značajne količine u poređenju sa drugim biljnim vrstama koje se smatraju za bogate izvore fenolnih jedinjenja. Malobrojni podaci o ukupnom sadržaju fenola u prečišćenim semenjačama graška ukazuju da se njihov sadržaj može kretati od 2,6 pa sve do 9 mg/g suve mase u zavisnosti od vrste rastvarača i načina ekstrakcije (Han and Baik, 2008).

### 1.6 Biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja graška

Najispitivanija biološka aktivnost fenolnih jedinjenja graška je antioksidativna kao i u slučaju drugih biljaka bogatih fenolima. Do sada je sproveden veliki broj studija u kojima je testirana *in vitro* antioksidativna aktivnost izolata fenolnih jedinjenja upotrebom gotovo svih postojećih eseja antioksidativne aktivnosti. Amarowicz i Troszynska (2003) su određivali antioksidativnu aktivnost acetonskih ekstrakata graška pomoću DPPH metode, eseja za procenu redukcione sposobnosti (esej sa fericijanidom) i eseja za procenu sposobnosti inhibicije oksidacije linoleinske kiseline. Agboola i saradnici (2010) su određivali antioksidativnu aktivnost ekstrakta graška primenom eseja za totalnu antioksidativnu aktivnost TEAC i DPPH metodom. Xu i Chang (2009) su u iste svrhe koristili FRAP esej za procenu sposobnosti redukcije  $Fe^{3+}$  jona i esej za sposobnost uklanjanja peroksilnog radikala (PRSC). Ista istraživačka grupa je koristila i ORAC esej (Xu and Chang, 2008a). Troszynska i Ciska (2002) su koristile lipozomski metod dok su Amarowicz i Raab (1997) koristili esej sa fotoindukovanom hemiluminiscencijom za procenu totalne antioksidativne aktivnosti hidrosolubilne frakcije semena graška. Podaci dobijeni u većini ovih studija nisu komparabilni iz više razloga: upotreba različitih eseja, odsustvo ili upotreba različitih antioksidanata kao standarda izražavanje po suvoj i vlažnoj masi semena itd. Uz to ni u jednoj od pobrojanih studija se ne vrši korelacija između pojedinih fenolnih jedinjenja i određenih antioksidativnih eseja. U jedinoj do sada sprovedenoj studiji ovog tipa (Duenas *et al.*, 2006) utvrđeno je da najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta semenjače graška (merenoj DPPH esejem), daju

flavoni, flavanoli i trimerni proantocijanidini. U načelu, postoji veći broj *in vitro* studija koje su potvrdile relativno visoke antioksidativne ekstraktata semena graška, posebno semenjača koje se odlikuju najvišim sadržajem fenolnih jedinjenja, naročito tanina, koji su uglavnom odsutni u kotiledonima (Troszynska and Ciska 2002). Sa druge strane gotovo da nema studija koje potvrđuju antioksidativne aktivnosti na ćelijskim sistemima. U jedinoj studiji tog tipa koju su sproveli Xu i Chang (2009) na ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma želudca pokazano je da pretretman ekstraktima graška u trajanju od 1h pre apikacije vodonik peroksida umanjuje stvaranje intracelularnih reaktivnih kiseoničnih vrsta na dozno zavistan način.

Pored antioksidativne aktivnosti pokazano je da se ekstrakti fenolnih jedinjenja graška odlikuju i potencijalnim antihipertenzivnim i antidijabetičnim aktivnostima. Postoje dokazi da fenolni ekstrakti graška imaju sposobnost inhibicije dva enzima koji imaju bitnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska a to su angiotenzin konvertujućii enzim (ACE) i renin (Agboola *et al.*, 2010). U studiji koju su sproveli Yao i saradnici (2011) pokazano je da etanolni ekstrakt kineskog kultivara graška Ding-Wan No.1 ima sposobnost inhibicije intestinalne  $\alpha$ -glukozidaze, jednog od ključnih enzima uključenih u digestiju ugljenih hidrata, kao i inhibicije enzima tirozinaze koja je uključena u produkciju melanina i čija povišena aktivnost često korelira sa malignim promenama na koži. Ipak u ovoj studiji nema podataka o tome da li su ovi inhibitorni efekti dozno zavisni i u kojoj meri koreliraju sa sadržajem određenih fenolnih komponenti u uzorku.

### **1.7 Uticaj rastvarača i termičkog tretmana na prinos fenolnih jedinjenja graška u ekstraktima i njihove biološke aktivnosti**

Različiti sistemi rastvarača se koriste za izdvajanje fenola iz biljaka i biljnih proizvoda. Voda, vodene smeše sa etanolom, metanolom i acetonom se obično koriste za izdvajanje antioksidanasa iz obrađene biljne hrane (Sun and Ho, 2005). Za izdvajanje antioksidanata iz žitarica i mahunarki do sada primenjivani ekstrakcioni medijumi uključuju: destilovanu vodu (Baublis *et al.*, 2000; Zielinski and Kozłowska, 2000), apsolutni methanol (Handelman *et al.*, 1999; Cardador-Martinez *et al.*, 2002), 80 %

metanol (Duenas *et al.*, 2002), 70 % metanol (Zhou and Yu, 2004), 50% ili 80% aceton i 70% aceton sa 0.5% sirćetnom kiselinom (Xu and Chang, 2007), apsolutni etanol (Yu *et al.* 2002), 95% etanol (Onyeneho and Hettiarachchy, 1992), 80% etanol (Liu *et al.* 2005) , 70 % etanol (Zhou and Yu 2004), 80% aceton (Troszynska and Ciska, 2002; Amarowicz *et al.*, 2004; Madhujith and Shahidi, 2005) , kiselu 70% aceton (Prior *et al.*, 2003; Wu *et al.* 2004), 70 % aceton (Takahata *et al.*, 2001) , i 50 % aceton (Zhou and Yu, 2004). Međutim, razlozi za izbor ovih rastvarača nisu pojašnjeni, niti je bilo ozbiljnijih komparativnih studija u kojima bi se poredio efekat upotrebe različitih rastvarača na prinos ukupnih fenola u ekstraktima semena graška, izuzimajući studiju koju su sprovedi Xu i Chang (2007) zaključivši da 50% aceton daje najveći sadržaj TPC kod svih vrsta graška, dok 80% zakišljeni aceton daje najveći prinos totalnih flavonoida, kondenzovanih tanina i najviše vrednosti inhibicije sintetičkog DPPH radikala.

Grašak se, kao i većina drugih mahunarki se konzumira nakon termičke obrade čija je primarna uloga inaktivacija i/ili oslobađanje od antinutrijenata kao što su enzimski inhibitori, lektini, saponini itd. Pored toga, kuvanjem se postiže bolji ukus i tekstura hrane. Čest korak pre kuvanja jeste potapanje semena u vodi i bubrenje čime se skraćuje sam proces termičke obrade i postiže eliminacija u vodi rastvornih antinutrijenata. Ipak, smatra se da proces kuvanja doprinosi i osiromašenju antioksidanata kojih, inače, ima u malim količinama. Ovo smanjenje količine antioksidanata jeste prvenstveno posledica odbacivanja „prve vode“ tokom pripreme (Sathya and Siddhuraju, 2013). Iako postoji veći broj studija koje se bave određivanjem ukupnih fenola, tanina i flavonoida u sirovim ili osušenim semenima graška, daleko je manje studija koje se bave fenolnim sadržajem i antioksidativnim aktivnostima graška posle termičke obrade. U nekoliko sprovedenih studija (Xu and Chang, 2008b; Han and Baik, 2008; Xu and Chang, 2009) nedvosmisleno je potvrđeno da kuvanje semena graška na atmosferskom pritisku, povišenom pritisku, kao i kuvanje na pari pa čak i blanširanje dovode sniženja ukupnih fenola od 2.2 do 50.8%, antioksidativne aktivnosti od 5.9 do 69.3% (mereno DPPH esejem) dok su podaci dobijeni ORAC esejem ukazali da pojedini tretmani kao što su kuvanje pod povišenim pritiskom i kuvanje na pari mogu dovesti i do statistički značajnog povećanja antioksidativne

aktivnosti za čitavih 174%. Kada se razmatra efekat termičke obrade na ostale biološke aktivnosti fenolnih ekstrakata graška, izuzimajući *in vitro* antioksidativne aktivnosti, literatura je još oskudnija. U jedinoj do sada sprovedenoj studiji (Xu and Chang, 2009) razmatrana je citotoksična aktivnost fenolnog ekstrakta graška na ćelijskim linijama: adenokarcinoma želuca (AGS ćelijska linija), kolorektalnog adenokarcinoma (SW480 ćelijska linija) i karcinoma prostate (DU145 ćelijska linija) gde je ćelijska proliferacija analizirana 48h nakon primene različitih koncentracija ekstrakata neobrađenog i termički obrađenog zelenog i žutog graška uzgojenog u Kini. U ovim eksperimentima ekstrakt sirovog zelenog graška je pokazao statistički značajan dozno zavisni antiproliferativni efekat na AGS i SW480 ćelijske linije međutim ovde nije bilo tretmana neizmenjenih ćelijskih linija te nema podataka o eventualnoj selektivnosti u antitumorskom dejstvu. Pokazano je takođe da termička obrada značajno umanjuje antiproliferativni kapacitet ekstrakta, mada ovo umanjeno nije bilo u statistički značajnoj korelaciji sa smanjenjem sadržaja ukupnih fenola niti sa smanjenjem bilo koje *in vitro* antioksidativne aktivnosti. Ista istraživačka grupa je proučavala efekat ekstrakata na stvaranje unutarćelijskih reaktivnih vrsta na AGS ćelijskoj liniji pomoću redoks senzitivne boje dihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) koja prolazi kroz ćelijsku membranu i emituje fluorescenciju pri oksidaciji od strane reaktivnih vrsta, u prvom redu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i superoksid anjon radikala. Pokazano je da ekstrakti neobrađenog žutog i zelenog graška imaju sposobnost dozno zavisne inhibicije stvaranja reaktivnih vrsta dok je ta sposobnost kod ekstrakata koji su termički obrađeni bila umanjena i praćena gubitkom dozne zavisnosti.

## 2. CILJ RADA

Ovaj rad je urađen kao deo projekta "Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog biodiverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju" (OI173005), a u okviru podprojekta koji se odnosi na biodiverzitet biljnih kultura od interesa za poljoprivredu.

Uzimajući u obzir da su prethodna istraživanja fenolnog sastava semenjača graška kao i ispitivanja njihove biološke i farmakološke aktivnosti veoma oskudna i ograničena na mali broj varijeteta, predmet ove doktorske disertacije je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnog sastava semenjača odabranih evropskih varijeteta graška i *in vitro* analiza antioksidativne, antihipertenzivne i antitumorske aktivnosti tečnih ekstrakata semenjača, sa posebnim osvrtom na rasvetljavanje mehanizama citotoksičnosti. Pored toga proučavan je i uticaj termičke obrade *in vitro* digestije kao i primene različitih rastvarača na prinos fenolnih jedinjenja u ekstraktima i njihove biološke aktivnosti.

S obzirom da se danas posvećuje sve više pažnje upotrebi funkcionalne hrane u prevenciji mnogih oboljenja i da se paralelno razvijaju mnogobrojni tehnološki postupci koji omogućavaju maksimalno iskorišćenje sporednih produkata prehrambene industrije koji sadrže vredne biološki aktivne komponente, ova doktorska disertacija predstavlja prilog istraživanju značajne biljne sirovine čiji potencijal nije u potpunosti iskorišćen, sa nadom da će pružiti nešto detaljniji uvid u mogućnosti primene ovog biljnog materijala u terapijske svrhe.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Uzorci graška

U ovoj studiji je korišćeno 13 kultivara i oplemenjivačkih linija graška (*Pisum sativum* L.) poreklom iz centralne i severne Evrope: Aslaug (kultivar, Norveška), Assas (kultivar, Francuska), Dora (kultivar, Češka republika), Golf (kultivar, Nemačka), Poneka (kultivar, Nemačka), Törsz (kultivar, Mađarska), MBK 88 (oplemenjivačka linija, Hrvatska), MBK 90 (oplemenjivačka linija, Hrvatska), MBK 168 (oplemenjivačka populacija, Hrvatska), MBK 173 (oplemenjivačka populacija, Hrvatska), P1 (čista uniformna linija „Maksimirski bijeli“, Hrvatska), P2 (čista uniformna linija LBORK, Hrvatska) i P3 (90% čista uniformna linija, Hrvatska). Svi uzorci vode poreklo iz herbarijumske zbirke Odeljenja za krmno bilje Poljoprivrednog instituta Osijek u Hrvatskoj. Semena su posejana u martu 2012. godine na tri parcele (5 m × 2 m) sa gustom od 120 biljaka po m<sup>2</sup> na dubini od 5 cm. Parcele se nalaze na otvorenim oglednim poljima Poljoprivrednog instituta Osijek, u Istočnoj Slavoniji sa koordinatama (45°31'33"N 18°45'56"E). Zemljište pripada tipu černozema na lesu, sledećeg hemijskog sastava: pH<sub>KCl</sub> = 6,9, humus = 1,64%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 23,6 mg/100g, K<sub>2</sub>O = 25,6 mg/100g, CaCO<sub>3</sub> = 0,8%. Sve biljke su gajene pod istim uslovima. Posađeni grašak je dostigao zrelost krajem jula kada je ubran ručno. Uzorci sa svake od tri parcele (po 300g semena) su odabrani nasumično. Sakupljena semena su osušena na 25°C do približno jednakog sadržaja vlage pre analize.

#### 3.2 Priprema metanolnih ekstrakata suvih semena

Suva semena graška P1, P2, P3 samlevena su do praha pomoću tučka i avana u tečnom azotu i prosejana kroz sito promera 0,3 mm. U epruvete za centrifugu dodato je po 200 mg spraćenog semena i po 2 mL čistog metanola. Sadržaj epruveta je mešan na 300 rpm i 4 °C u mraku tokom 24 h na orbitalnoj mešalici (Lab-Therm Adolf Kühner AG SCHWEIZ). Ekstrakti su potom centrifugirani 15 minuta na 5000 x g. Supernatanti su sačuvani i korišćeni dalje u eksperimentu.

### 3.3 Priprema metanolnih ekstrakta kuvanog semena

Prah suvih semena P1, P2, P3 pripremljen na gore opisan način je dodat u plastične epruvete za centrifugu sa zatvaračem, u količini od 200 mg i u svaku epruvetu je dodato po 2 mL destilovane vode. Epruvete su zatvorene i uzorci su kuvani na 100 °C tokom 30 minuta. Nakon toga, uzorci su koncentrovani na 60 °C pomoću vakuum uparivača (Buchi Heating Bath B490) i potom liofilizovani na liofilizatoru Hetosicc OD52-1. U svaku kivetu dodato je po 2 mL čistog metanola i ekstrakcija izvedena na gore opisan način. Supernatanti su dobijeni na prethodno opisan način i korišćeni u sledećim eksperimentima.

### 3.4 Priprema metanolnih i vodenih ekstrakta kuvanih i enzimski digeriranih semena

Samleveni uzorci genotipova P1, P2, P3 (po 200 mg) kuvani su na gore opisan način i posle hlađenja pomešani sa 1 mL rastvora koji sadrži: 125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO<sub>3</sub> i pepsin (3 g/L). pH rastvora je podešen na 2,0 pomoću 10 M rastvora HCl (Hanna HI2213 pH/ORP Meter). Digestija se odvijala tokom 90 minuta u vodenom kupatilu za mešanje na 37 °C. Nakon toga, u svaki uzorak dodata je destilovana voda (1 mL) koja sadrži 2% žučnih soli i pH vrednost je podešena na 8,0 pomoću 10 M rastvora NaOH. Nakon inkubacije od 10 minuta na 37 °C u CO<sub>2</sub> inkubatoru (Hera Cell 150 Thermo Scientific) (Pp CO<sub>2</sub> = 22%), dodat je pankreatin (1% w/v u finalnoj zapremini). Uzorci su inkubirani 120 minuta na 37 °C u CO<sub>2</sub> inkubatoru (Pp = 22%) i potom centrifugirani 5 minuta na 5000 x g. Supernatant je koncentrovan na 60 °C pomoću vakuum uparivača (ovaj tretman inaktivira pepsin i pankreatin koji mogu interferirati sa esejima za određivanje antioksidativne aktivnosti). Suvi ostatak je potom liofilizovan.

Jedna grupa liofilizata je resuspendovana u po 2 mL čistog metanola i mešana tokom 24 h u mraku na 4 °C. Potom su ekstrakti centrifugirani 5 minuta na 5000 x g, a supernatanti odvojeni i korišćeni dalje u eksperimentu. Ovi supernatanti predstavljaju metanolne ekstrakte enzimski digeriranih i termički obrađenih semena.

Druga grupa liofilizata je resuspendovana u po 2 mL destilovane vode i mešana tokom 24 h u mraku na 4 °C. Potom su ekstrakti centrifugirani 5 minuta na 5000 x g, a supernatanti odvojeni i korišćeni dalje u eksperimentu. Ovi supernatanti predstavljaju vodene ekstrakte enzimski digeriranih i termički obrađenih semena.

### 3.5 Priprema proteinskih izolata semena i frakcija izolata MW < 3 kDa i MW < 10 kDa

Sa semena varijeteta P1, P2, P3 semenjače su uklonjene ručno i kotiledoni samleveni pomoću tučka i avana u tečnom azotu. Odmašćivanje samlevenih kotiledona vršeno je sa 3 zapremine heksana (1:3 w/v) tokom 6 sati. Nakon ceđenja kroz Whatman filter papir No 4 na sobnoj temperaturi postupak odmašćivanja je ponovljen još dva puta. Heksanski prah je sušen na vazduhu na sobnoj temperaturi tokom 24 h, zatim, ponovo samleven i prosejan kroz sito (veličine pora 0,3 mm). Po 200 mg svakog uzorka (u triplikatu) je resuspendovano u destilovanoj vodi (1:10 w/v) i pH vrednost je podešena na 10,0 pomoću 1 M NaOH. Smeša je blago mešana na rotacionoj mešalici tokom 2 h na sobnoj temperaturi i potom centrifugirana 15 minuta na 5000 x g. Procedura ekstrakcije je ponovljena na precipitatima. Supernatanti prve i druge ekstrakcije su spojeni i proteini su taloženi podešavanjem pH na 4,5 pomoću 1 M rastvora HCl. Nakon stajanja na 4 °C tokom 1 h, talog je dobijen centrifugiranjem 15 minuta na 5000 x g. Talog je ispran destilovanom vodom i pH vrednost podešena na 7,0 pomoću 1 M rastvora NaOH, nakon čega je liofilizovan i skladišten na 4 °C do upotrebe. Proteinski prah je resuspendovan u 2 mL destilovane vode i kuvan na 100 °C tokom 30 minuta u plastičnim epruvetama. Nakon *in vitro* digestije (koja je rađena na već opisan način), digerirani uzorci su kuvani 15 minuta na 95 °C radi stopiranja digestije i nakon hlađenja centrifugirani 15 minuta na 5000 x g i 4 °C. Supernatanti jedne serije su propušteni kroz Milliphore filtere od 3 kDa, a supernatanti druge serije su propušteni kroz Milliphore filtere od 10 kDa. Na ovaj način dobijene su po dve grupe filtrata svake vrste semena koji sadrže peptide molekulske mase manje od 3 kDa, odnosno, manje od 10 kDa. Ovi filtrati su liofilizovani i čuvani na -80°C do analize.

### 3.6 Priprema ekstrakata prečišćenih semenjača

Sa semena varijeteta: Aslaug, Assas, Dora, Golf, Poneka, Törsz, MBK 88, MBK 90, MBK 168, MBK 173 semenjače su uklonjene ručno, potom samlevene u tečnom azotu i prosejane kroz sito promera 0,3 mm a potom ekstrahovane različitim rastvaračima ili mešavinama rastvarača uvek u odnosu 1:20 (200 mg spršenih semenjača u 4 mL rastvarača) u trajanju od 12h na sobnoj temperaturi u orbitalnoj mešelici na 300 rpm, zaštićeni od svetlosti. Korišćeni su sledeći rastvarači: apsolutni methanol, apsolutni aceton, 96% etanol, destilovana voda, 80% aceton, 80% methanol, 80% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom, 80% methanol sa 1% sirćetnom kiselinom, 70% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom. U slučaju kada je korišćena voda kao rastvarač, uzorci su prethodno kuvani 10 minuta na 100°C, pa je ekstrakcija nastavljena na isti način. Po završenoj ekstrakciji uzorci su centrifugirani 20 minuta na 5000 x g, supernatanti su sačuvani, dopunjeni do 4 mL odgovarajućim rastvaračem i čuvani na -80°C do analize.

### 3.7 Sadržaj ukupnih fenola (TPC)

Za određivanje sadržaja totalnih fenola po metodi (Singelton and Rosi, 1965; Julken-Titto, 1985) korišćen je Folin-Ciocalteu (FC) reagens i galna kiselina (GA) kao standard. Reakciona smeša se sastojala od 20 µL ekstrakata koji je pomešan sa po 1580 µL destilovane vode, 100 µL FC reagensa i 300 µL 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Smeše su stajale 2 h na sobnoj temperaturi nakon čega je merena apsorbance na 765 nm upotrebom spektrofotometra Ultrospec 3200 pro (GE Healthcare). Pošto su ekstrakti semena su kompleksne smeše koje mogu apsorbovati svetlost na 765 nm su napravljene su i dodatne slepe probe, bez FC reagensa, za svaki uzorak. Apsorbance dobijene za dodatne slepe probe oduzete su od vrednosti dobijene za uzorke sa FC reagensom. Sadržaj totalnih fenola je izražen u ekvivalentima GA (mg GAE po gramu suve mase semena) pomoću standardne krive (opseg linearnosti 50-1000 µg GA/mL, R<sup>2</sup> = 0,993).

### 3.8 Sadržaj totalnih antocijanina (TAC)

Sadržaj totalnih antocijanina je određivan prethodno opisanom metodom (Abdel-Aal and Hucl, 1999). Odmereno je po 100 mg spašenih semenjača i pomešano sa 2 mL smeše metanola i 1N HCl (85:15 v/v). Semenjače su ekstrahovane na sobnoj temperaturi u orbitalnoj mešalici 30 minuta, sa brzinom rotacije 300 rpm. Supernatanti su potom izdvojeni centrifugiranjem 8000g, 20 minuta. Apsorbancija supernatanta je merena na 535nm i na 700nm. Sadržaj antocijanina je preračunat i zražen u  $\mu\text{g}$  ekvivalenata cijanidin-3-glukozida (CGE) po g suve mase semenjača, korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta  $25965 \text{ Abs/M} \times \text{cm}$  i relativne molekulske mase cijanidin-3-glukozida od 449,2 g/mol, pomoću formule:  $c (\mu\text{g CGE/g s.m.}) = ((A_{535} - A_{700}) \times V_{\text{eks}} \times 449,2) / 25965 \times m (\text{g})$ , gde je  $V_{\text{eks}}$  zapremina ekstrakta a  $m$  je masa semenjače, izražena u g, koja je upotrebljena za ekstrakciju.

### 3.9 Sadržaj rastvornih kondenzovanih tanina (TCT)

Određivanje sadržaja rastvornih kondenzovanih tanina vršeno je metodom koju su razvili Broadhurst i Jones (1978), sa manjim modifikacijama (Xu and Chang, 2007). Ekstrakt semenjače u zapremini od 50  $\mu\text{L}$  dodat je u smešu koju je činilo 3 mL 4% rastvora vanilina u metanolu i 1,5 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline. Mešavina je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi a potom je apsorbancija merena na 500 nm, koristeći metanol kao slepu probu. Rezultati su izraženi u jedinicama apsorbancije na 500 nm po g suve mase ( $A_{500\text{nm}}/\text{g s.m.}$ ).

### 3.10 DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) test

Određivanje sposobnosti ekstrakata za uklanjanje sintetičkog DPPH radikala vršeno je po prethodno opisanom metodi (Parejo *et al.*, 2002). Reakciona smeša sastojala se iz: 860  $\mu\text{L}$  0,1 M kalijum fosfatnog pufera pH 7,0, 40  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 100  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  DPPH $\cdot$  u

metanolu. Kontrola za svaku grupu uzoraka bila je ista i sastojala se iz: 860  $\mu\text{L}$  0,1 M kalijum fosfatnog pufera pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  DPPH $\cdot$  u metanolu i 40  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg rastvarača (tj. rastvarač odgovarajućeg ekstrakta). Individualne slepe probe sastojale su se iz: 100  $\mu\text{L}$  metanola (umesto rastvora DPPH $\cdot$ ), 860  $\mu\text{L}$  0,1 M kalijum fosfatnog pufera pH 7,0 i 40  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg ekstrakta. Svi rastvori su držani u mraku na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega je merena apsorbancija na 517 nm. Sposobnost ekstrakta za neutralisanje DPPH radikala (u procentima) izračunata je na osnovu sledeće formule: % neutralisanja DPPH $\cdot$  =  $\{(A_{517c}-A_{517s})/A_{517c}\} \times 100$  gde  $c$  predstavlja kontrolu a  $s$  uzorak.

Za određivanje sposobnosti ekstrakata semenjača za neutralisanje DPPH radikala korišćena je modifikovana procedura (Stanisavljević *et al.*, 2015). Gde se reakciona smeša sastoji is 500  $\mu\text{L}$  uzorka razblaženog u 50mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 7,0 i 500  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  DPPH $\cdot$  u metanolu. Individualne slepe probe za svaki ekstrakt su pripremljene mešanjem 500  $\mu\text{L}$  metanola (umesto rastvora DPPH $\cdot$ ) i 500  $\mu\text{L}$  50 mM kalijum fosfatnog pufera pH 7,0 u kome je razblažen odgovarajući ekstrakt. Svi rastvori su držani u mraku na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega je merena apsorbancija na 517 nm. Antiradikalna aktivnost u % je preračunata na prethodno opisan način a vrednosti su izražene u ekvivalentima Trolox-a (TE $\mu\text{M}$ /g suve mase semena) na osnovu standardne krive sa opsegom linearnosti 0,1-100 mM Trolox-a ( $R^2=0,991$ ).

### 3.11 Test sposobnosti uklanjanja hidroksilnog radikala

Sposobnost ekstrakata za uklanjanje hidroksilnih radikala određena je pomoću Co(II)/EDTA/OH $\cdot$ /H $_2$ O $_2$ -Luminol sistema (Parejo *et al.*, 2002). Intenzitet hemiluminiscencije (CL) izražen je u relativnim svetlosnim jedinicama (RLU), a za određivanje RLU korišćen je GloMax 20/20 luminometar. Najveću CL vrednost reakcije (kontrolno svetlo) smanjuju supstance koje vezuju hidroksil radikal. Reakciona smeša sadržala je: 300  $\mu\text{L}$  reakcionog rastvora pH 9,0 koji sadrži 2,26 mM Co (II) i 0,84 mM EDTA, 25  $\mu\text{L}$  reakcionog rastvora pH 9,0 koji sadrži 0,56 mM luminol i 25  $\mu\text{L}$  ekstrakta

(analizirani uzorak), metanola ili vode (u slučaju kontrola). U ove reakcione smeše dodato je 50  $\mu\text{L}$  0,52 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  u mraku radi započinjanja reakcije (luminometar ima injektor koji se programira da automatski dodaje  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Intenzitet CL je meren nakon 20 minuta. Vrednost bazalne luminiscencije smeša koje sadrže gore pomenuti rastvor (ali bez luminola) je takođe određena i oduzeta od vrednosti odgovarajućih uzoraka. Relativna inhibicija CL, koja predstavlja meru uklanjanja hidroksilnog radikala je izračunata za sve ekstrakte na osnovu formule: % Inhibicije =  $(1 - \text{RLU}_{\text{uzorka}}/\text{RLU}_{\text{kontrola}}) \times 100$ .

### 3.12 Test sposobnosti uklanjanja vodonik peroksida

Sposobnost ekstrakata za neutralisanje vodonik peroksida određena je spektrofotometrijski (Ruch *et al.*, 1989). Pripremljen je 40 mM rastvor  $\text{H}_2\text{O}_2$  u 50 mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4. Reakciona smeša je sadržala: 200  $\mu\text{L}$  razblaženog ekstrakta, 3,4 mL fosfatnog pufera i 0,6 mL rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Apsorbanca reakcione smeše je merena posle 5 min na 230 nm. Za svaki uzorak napravljen je i odgovarajući blank koji je sadržao fosfatni pufer i odgovarajući ekstrakt. Relativna sposobnost neutralisanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  izračunata je na osnovu sledeće formule: % neutralisanja  $\text{H}_2\text{O}_2 = \{(A_0 - A_1/A_0)\} \times 100$ , gde je  $A_0$  – apsorbanca kontrole (fosfatni pufer sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a  $A_1$  – apsorbanca kompletne reakcione smeše.

### 3.13 Test sposobnosti redukcije $\text{Fe}^{3+}$ jona

Redukujuća sposobnost ekstrakata je merena metodom po Pownall-u (Pownall *et al.*, 2010), sa manjim modifikacijama. Korišćeno je 250  $\mu\text{L}$  ekstrakta koji je pomešan sa 250  $\mu\text{L}$  100 mM kalijum-fosfatnog pufera pH 6,6 i 250  $\mu\text{L}$  1% rastvora kalijumfericijanida. Mešavina je zagrevana u vodenom kupatilu 20 minuta na 50°C. Posle završene inkubacije u 250  $\mu\text{L}$  smeše je dodato 50  $\mu\text{L}$  0.1% rastvora feri-hlorida i 250  $\mu\text{L}$  destilovane vode, i inkubirano dodatnih 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca ovako tretirane

smeše je očitana na 700 nm, a rezultati su izraženi preko nagiba krive zavisnosti redukujuće sposobnosti ( $A_{700\text{nm}}$ ) od zapremine dodatog ekstrakta.

### 3.14 Test sposobnosti helacije $\text{Fe}^{2+}$ jona

Test sposobnosti helacije dvovalentnog gvožđa je određivan po prethodno opisanoj metodi (El and Karakaya, 2004). Alikvoti ekstrakata od po 200  $\mu\text{L}$  su pomešani sa 740  $\mu\text{L}$  destilovane vode i 20  $\mu\text{L}$  2mM rastvora  $\text{FeCl}_2$ . Smeša je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom joj je dodato 200  $\mu\text{L}$  5mM rastvora ferozina i inkubacija je nastavljena dodatnih 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca smeše je potom merena na 562 nm. Kontrole su pripremljene na isti način, s tim što je umesto ekstrakta korišćen odgovarajući rastvarač. Helirajuća sposobnost je izražena u % upotrebom formule:  $\text{Fe}^{2+}$  helirajuća sposobnost (%) =  $\{(A_{562c} - A_{562s}) / A_{562c}\} \times 100$ , gde c i s predstavljaju kontrole i uzorke.

### 3.15 Test sposobnosti *in vitro* inhibicije aktivnosti angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE)

ACE inhibitorna aktivnost je određena prethodno opisanom metodom koju su razvili Cushman i Cheung (1971) sa manjim modifikacijama (Agboola *et al.*, 2010). Alikvoti ekstrakata zapremine 50  $\mu\text{L}$  su pomešani sa 150  $\mu\text{L}$  100 mM boratnog pufera pH 8,3, koji je sadržao i 0,3 M NaCl i, zatim je smeši dodato 200  $\mu\text{L}$  ACE (50mU/mL). Reakciona smeša je inkubirana 10 min na 37°C u vodenom kupatilu a potom joj je dodato 600  $\mu\text{L}$  4,5 mM hipuril-histidil-leucina (supstrata). Ovako dobijena smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Po završenoj inkubaciji 1mL 1M HCl je dodat da bi se zaustavila enzimaska reakcija. Hipurična kiselina nastala u reakciji je ekstrahovana sa 1mL etil acetata, inkubacijom 5 minuta na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje. Sloj etilacetata je posle razdvajanja od vodene faze prebačen u tubu od 2 mL i uparen pod strujom argona.



Posle sušenja talog je rastvoren u 1mL destilovane vode, i njegova apsorbanacija je izmerena na 228 nm. Neinhibirana kontrolna reakcija je pripremljena na isti način s tim što je umesto ekstrakta korišćena destilovana voda. Procenat inhibicije ACE je sračunat prema formuli: % ACE inhibicije =  $(A_{C228nm} - A_{U228nm}) / A_{C228nm} \times 100$ , gde  $A_C$  predstavlja apsorbanaciju kontrole a  $A_U$  apsorbanaciju uzorka.

### 3.16 Određivanje sastava fenolnih jedinjenja UHPLC–LTQ OrbiTrap MS tehnikom

Koncentrovani standardni rastvori svih fenolnih jedinjenja su pripremljeni u koncentraciji od 1000 mg/L rastvaranjem u metanolu (MS grade, Merck, Dramstadt, Germany). Razblaživanjem standardnih rastvora metanolom dobijeni su radni rastvori koncentracija 0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 0,750 i 1,000 mg/L. Kalibracione krive su konstruisane merenjem površina pikova standardnih jedinjenja i njihovim predstavljanjem u funkciji koncentracije radnih rastvora standarda. Kalibracione krive su imale dobru linearnost ( $R^2 > 0,99$ ).

Hromatografsko razdvajanje fenolnih jedinjenja vršeno je sistemom za tečnu hromatografiju visokih performansi (UHPLC), koji se sastoji iz kvarterne pumpe Accela 600 i automatskog sistema za nanošenje uzoraka Accela (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Analitička kolona korišćena za razdvajanje je bila *Synchronis* C18 kolona, dimenzija (50 × 2,1 mm, 1,7 μm). Korišćena je mobilna faza (A) voda + 0,1% mravlja kiselina i faza (B) acetonitril + 0,1% mravlja kiselina. Korišćen je linearni gradijent pri protoku od 0,3 mL/min: 0,0–1,0 min 5% B, 1,0–12,0 min od 5% do 95% (B), 12,0–12,2 min od 95% do 5% (B), zatim 5% (B) tokom 3 minuta. Injekciona zapremina je iznosila 5 μL.

UHPLC sistem je bio spregnut sa hibridnim masenim spektrometrom koji se sastoji od linearnog jon-trap i Orbitrap masenog analizatora, sa elektronsprej jonskim izvorom (*heated-electrospray ionization probe*, HESI-II, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Maseni spektri snimani su u negativnom modu. Parametri jonskog izvora su bili sledeći: voltaža izvora 4.5 kV, kapilarna votraža -35V, temperatura kapilare 300 °C. Maseni

spektri snimani su u opsegu od 50 do 2000  $m/z$ . Kolizijska energija korišćena za fragmentaciju je bila podešena na 35 eV.

Polifenolna jedinjenja su identifikovana na osnovu odgovarajućih karakteristika: maseni spektar, tačna masa, karakteristična fragmentacija i retenciono vreme. *Xcalibur* softver (verzija 2.1) korišćen je za upravljanje instrumentom i analizu podataka.

### 3.17 Test sposobnosti neutralizacije unutarćelijskih reaktivnih vrsta (IAA)

Unutarćelijska antioksidativna aktivnost je određivana upotrebom fluorescentne boje 2',7'-dihlorofluorescin-diacetata (DCFH-DA) po prethodno opisanoj proceduri (Girard-Lalancette *et al.*, 2009) sa modifikacijama (Xu and Chang, 2009). NT2-D1 ćelije humanog teratokarcinoma su gajene 24 h na 37° C u plejtovima ravnog dna sa 96 bunara do gustine od  $10^4$  ćelija po bunaru. Ćelije su potom isprane tri puta PBS puferom pH 7,0 i inkubirane dodatnih 24 h u PBS medijumu koji je sadržao različite koncentracije vodenih ekstrakata semenjača graška. Po završenoj inkubaciji ćelije su isprane tri puta sa PBS puferom a potom inkubirane 30 minuta sa 200  $\mu$ L PBS pufera koji je sadržao 5  $\mu$ M DCFH-DA, što je bilo praćeno ponovnim ispiranjem PBS puferom tri puta. Nakon ispiranja je iniciran oksidativni stres dodatkom 10  $\mu$ M  $H_2O_2$  i započeto je merenje fluorescencije koje je trajalo 30 min korišćenjem ekscitacione talasne dužine od 485 nm i praćenjem emisije na 530 nm pomoću aparata Infinite® 200 (Tecan, Austria). Očitavanje fluorescencije u kinetičkom ciklusu je vršeno na svakih 60 s. Slepe probe su sadržale ćelije u PBS-u sa dodatkom peroksida a bez DCFH-DA. Dok su kontrole sadržale ćelije kojima je dodat DCFH-DA i peroksid, ali nisu bile prethodno tretirane ekstraktima semenjača. Kvantifikacija sposobnosti neutralizacije unutarćelijskih reaktivnih vrsta je vršena na sledeći način: prvo je određena površina ispod krive fluorescencije dobijene pri kinetičkom merenju prema formuli  $P = [F_1/2 + (F_2:F_{n-1}) + R_n/2] \times CT$ , gde je P površina izpod krive, F1 fluorescencija izmerena na početku ciklusa, a F<sub>n</sub> fluorescencija u poslednjem merenju ciklusa, CT predstavlja trajanje ciklusa u minutima. Sposobnost neutralizacije unutarćelijskih reaktivnih vrsta se dobija na osnovu formule: IAA (%) = 100 x [(Pk-Pb)-

(Pu-Pb)]/(Pk-Pb), gde je Pu površina ispod krive fluorescencije uzorka, Pk, površina ispod krive fluorescencije kontrole, Pb se odnosi na slepu probu.

### 3.18 Test *in vitro* citotoksičnosti ekstrakata

Ćelije humanog karcinoma dojke MDA-MB-453, humanog adenokarcinoma kolona LS174, humanog karcinoma pluća A549 i normalni fibroblasti pluća MRC-5 su gajeni u kulturi u vidu monosloja, dok su ćelije hronične mijeloidne leukemije K562 održavane u kulturi u vidu suspenzije u kompletnom hranljivom medijumu sledećeg sastava (RPMI 1640 sa L-glutaminom (3 mM), streptomycinom (100 µg/mL) i penicilinom (100 IU/mL), 10% toplotom inaktiviranog (56°C) fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 25 mM HEPES puferom), na način prethodno opisan (Matić *et al.*, 2013). Ćelijske kulture su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO<sub>2</sub> i zasićenim vodenom parom. Sve korišćene ćelije su dobijene iz kolekcije American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

MDA-MB-453 (3,000 ćelija/100 µL po bunaru), LS174 (7,000 ćelija/100 µL po bunaru), A549 (5,000 ćelija/100 µL po bunaru) i MRC-5 (5,000 ćelija/100 µL po bunaru) su gajene u mikrotitar pločama sa 96 bunara 20h radi adhezije. Potom su tretirane sa pet različitih koncentracija vodenih ekstrakata semenjača graška 0,375 % do 6 % za ekstrakte 1-5, 9 i 10, ili od 0.625 % do 10 % za ekstrakte 6-8. Dodato je po 50 µl rastvora ispitivanih ekstrakata. Kontrolnim ćelijama je dodat samo hranjivi medijum. K562 ćelije (5,000 ćelija/100 µL po bunaru) su zasejane 2 h pre dodavanja ekstrakata. Svi korišćeni ekstrakti su pre upotrebe razblaženi hranljivim medijumom i profiltrirani kroz membranski filter veličina pore 0,22 µm. Preživljavanje ćelija je mereno pomoću MTT kolorimetrijskog testa kojim se određuje preživljavanje na osnovu količine redukovanog kolorimetrijskog reagensa u metabolički aktivnim ćelijama, po prethodno opisanoj metodi (Mosmann, 1983), uz modifikacije (Ohno and Abe, 1991). MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je žuta tetrazolijumska so koja se u živim, metabolički aktivnim ćelijama redukuje do formazana, nerastvornog kristala ljubičaste boje. Dodavanjem deterdženta SDS-a dolazi do

rastvaranja formazana i stvara se obojeni rastvor koji ima maksimum apsorpcije na 570 nm. Količina rastvorenog formazana direktno je proporcionalna broju živih ćelija. Nakon inkubacije ćelija u prisustvu testiranih ekstrakata u trajanju od 72 h, u uzorke sa ćelijama i odgovarajuće blankove uzoraka mikrotitar ploča sa 96 sudića dodato je po 10 µL MTT reagensa. Uzorci su inkubirani 4 h na 37°C, a potom je u uzorke dodato po 100 µL 10% SDS-a. Ploče su inkubirane tokom noći, a zatim je narednog dana očitavana apsorbanca na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču Multiskan EX Thermo Labsystems. Da bi se izračunalo ćelijsko preživljavanje u procentima S[%] apsorbanca uzorka ćelija (Au), koje su rasle u prisustvu ekstrakata različitih koncentracija, podeli se sa apsorbancom kontrolnog uzorka ćelija (Ak), koje su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma, i pomnoži sa 100. Ćelijsko preživljavanje se određuje prema formuli:  $S[\%] = (Au/Ak) \times 100$

Treba imati u vidu da se apsorbanca blanka uvek oduzima od apsorbance odgovarajućeg ćelijskog uzorka. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu a cisplatina je korišćena kao pozitivna kontrola. Rezultati su izraženi preko IC<sub>50</sub>, koji se definiše kao koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50% u poređenju sa kontrolom. Reagensi: RPMI 1640, FBS, L-glutamin, HEPES, MTT i SDS su proizvodi kompanije Sigma Aldrich. Antibiotici koji su dodavani u medijum su nabavljeni od kompanije Galenika a.d. (Beograd, Srbija).

Esej *in vitro* citotoksičnosti na NTERA-2 D1 (NT2/D1) ćelijama hunamog teratokarcinoma je takođe izveden MTT metodom ali po drugačijoj proceduri (Tada *et al.*, 1986). Ćelije NT2/D1 (donacija University of Sheffield, UK) su gajene u DMEM medijumu koji je sadržao 10% fetalni goveđi serum (FBS), 4500 mg/L glukoze, 2 mmol/L L-glutamin i penicillin/streptomycine (Gibco), na 37°C sa 10% CO<sub>2</sub>, na prethodno opisan način (Andrews, 1998; Andrews *et al.*, 1984). Ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa gustinom 5 x 10<sup>4</sup> ćelija po bunaru, da bi se izbegao konfluentni rast tokom tretmana. Tretmani vodenim ekstraktima su započeti 24 h sata posle zasejavanja radi adaptacije ćelija. Nakon 24 h tretmana različitim razblaženjima ekstrakata, medijum je uklonjen i ćelijama je dodat MTT reagens (Merck, Germany). Inkubacija je trajala 2h na 37°C. U ovoj reakciji se MTT reagens redukuje od strane mitohondrijalnih dehidrogenaza živih ćelija

dajući ljubičasti formazanski produkt. Po uklanjanju MTT reagensa po 100  $\mu$ l DMSO agensa je dodato u bunare radi lize ćelija i sloubilizacije kristala formazana. Apsorbancija je potom merena na 550 nm upotrebom čitača za mikrotitar ploče (Infinite® 200, Tecan, Austria). Rezultati su izraženi preko IC<sub>50</sub> koji se definiše kao koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50% u poređenju sa kontrolom koja je tretirana samo hranljivim medijumom.

### 3.19 Analiza faza ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom

K562 ćelije mijeloidne leukemije i LS174 ćelije adenokarcinoma kolona su tretirane rastvorima ispitivanih ekstrakata semenjače graška, čije su koncentracije bile IC<sub>50</sub> i 2 x IC<sub>50</sub> (ustanovljenim nakon tretmana koji je trajao 72 h). Posle inkubacije od 24 h, odnosno 48 h, ćelije su sakupljene, oprane u PBS puferu i fiksirane 70% etanolom na ledu, prema prethodno opisanoj proceduri (Ormerod, 2000; Matić *et al.*, 2013). Uzorci ćelija su čuvani minimum nedelju dana na -20 °C, pre bojenja. Ćelije su centrifugirane i oprane u PBS puferu i resuspendovane u rastvoru RN-aze A u PBS-u (finalne koncentracije 200  $\mu$ g/mL) i inkubirane 30 minuta na 37 °C. U sledećem koraku je ćelijama dodat propidijum jodid u koncentraciji 40  $\mu$ g/mL. Pripremljeni ćelijski uzorci su zatim analizirani na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države), podešenim tako da detektuje 10,000 događaja. Intenzitet fluorescencije propidijum jodida, koji je ekscitovan na 488 nm argon-jonskim laserom detektovan je na FL2 kanalu. Dobijeni podaci su analizirani uz pomoć CELLQuest softvera (BD Biosciences). Na osnovu dobijenih DNK histograma (broj događaja u odnosu na FL2-A (*eng.* FL2-*area*) određivan je procenat ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Prateći plot FL2-A u odnosu na FL2-W (*eng.* FL2 *width*) je omogućio da analiza DNK sadržaja ćelija uključi samo pojedinačne ćelije, odnosno omogućio je da se iz analize isključe ćelijski agregati i ćelijski debris. Ribonukleaza A i propidijum jodid bili su proizvod kompanije Sigma Aldrich.

### 3.20 Ispitivanje efekta specifičnog inhibitora kaspaze-3

U cilju ispitivanja da li vodeni ekstrakti semenjača graška mogu pokrenuti apoptozu LS174 ćelija adenokarcinoma kolona putem aktivacije kaspaze-3, određivan je procenat ćelija koje se po tretmanu ekstraktima nalaze u subG1 fazi, pri čemu su ćelije dodatno bile izložene pretretmanu sa specifičnim peptidnim inhibitorom kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK). LS174 ćelije su pretretirane Z-DEVD-FMK inhibitorom finalne koncentracije 30  $\mu$ M u trajanju od 2 h, a zatim su dodavani rastvori ekstrakata. Sedam odabranih ekstrakata semenjača u koncentraciji od 2 x IC<sub>50</sub> je tokom 24h inkubirano sa ćelijama. Za svaki ekstrakt je postavljen i referentni ćelijski uzorak koji nije pretretiran inhibitorom, odnosno koji je samo tretiran ekstraktom. Posle završenog tretmana ćelije su sakupljene tripsinizacijom, oprane u PBS-u i fiksirane u 70% etanolu. Nakon nedelju dana ćelijski uzorci su analizirani protočnom citometrijom na način opisan u prethodnom poglavlju. Specifični inhibitor kaspaze-3 koji je korišćen u analizama bio je proizvod kompanije R&D Systems (Mineapolis, Sjedinjene Američke Države).

### 3.21 Statistička obrada podataka

Statistička analiza je sprovedena primenom sledećih statističkih testova: Kolmogorov-Smirnov test – za proveru distribucije podataka po normalnoj raspodeli, za analizu rezultata korišćeni su Student t test i analiza varijanse (ANOVA) sa Duncan-ovim post hoc test-om. Statistička obrada podataka izvedena je programima MS Office 2007 Excel i SPSS (Verzija 17.0 IBM SPSS Inc. SAD). Statistička značajnost bila je dokazana u svim slučajevima kada je verovatnoća iznosila  $p < 0,05$ .

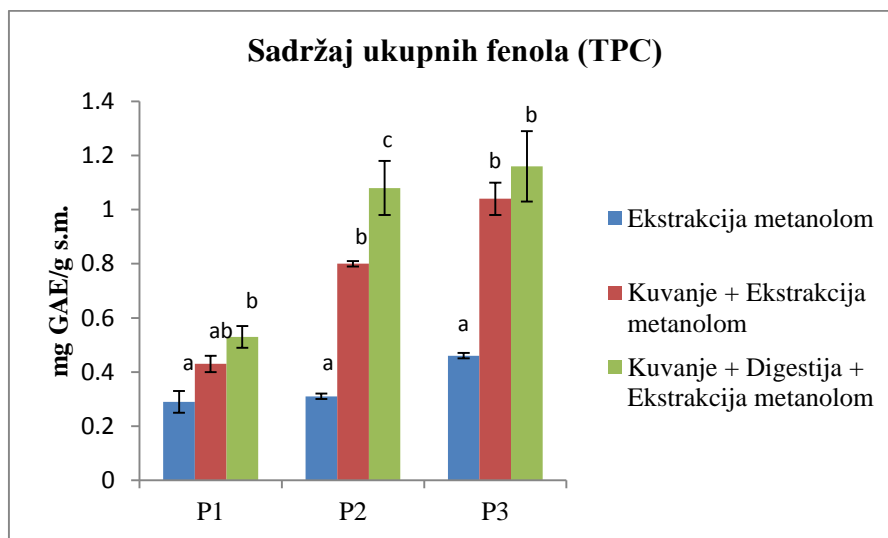
## 4. REZULTATI

### 4.1 Uticaj termičkog tretmana i *in vitro* digestije na sadržaj ukupnih fenola semena graška.

U cilju ispitivanja sadržaja efekata termičkog tretmana i *in vitro* digestije na sadržaj ukupnih fenola semena graška, brašno dobijeno homogenizacijom suvih semena graška genotipova P1, P2 i P3 je podvrgnuto ekstrakciji na tri različita načina. Jedna grupa uzoraka je ekstrahovana metanolom bez prethodnog tretmana, druga grupa uzoraka je podvrgnuta termičkom tretmanu (kuvanje na atmosferskom pritisku u trajanju od 45 min) koji simulira konvencionalni način pripreme u domaćinstvu, kombinovan sa ekstrakcijom metanolom. Treća grupa uzoraka je bila podvrgnuta opisanom termičkom tretmanu, za kojom je sledila *in vitro* digestija i naknadna ekstrakcija metanolom. Cilj ovih tretmana je bio da se ispituju razlike u fenolnom sadržaju ekstrakata koje se javljaju kao posledica konvencionalne obrade i *in vitro* digestije semena u odnosu na način ekstrakcije koji se često sreće u literaturi.

Rezultati pomenutog eksperimenta su prikazani na **Slici 34**. Dobijene vrednosti ukazuju na činjenicu da kuvanje semena na atmosferskom pritisku dovodi do statistički značajnog povećanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktu za 126 do 158% kod dva od tri ispitivana genotipa (P2 i P3), koji se inače odlikuju nešto višim vrednostima ukupnih fenola nego genotip P1, a ujedno i nešto višim stepenom pigmentisanosti semenjače. Pri tretmanu koji uključuje kombinaciju termičke obrade i *in vitro* digestije primećeno je još izraženije povećanje 82-248% u odnosu na ekstrakciju metanolom bez ikakvog tretmana, pri čemu je ovo povećanje bilo statistički značajno za sva tri genotipa. Kod genotipa P2 je takođe primećena statistički značajna razlika (povećanje od 35%) između ekstrakata dobijenih primenom termičkog tretmana i onih koji su dodatno podvrgnuti *in vitro* digestiji pored termičkog tretmana. U ekstraktima termički obrađenih i *in vitro* digeriranih semena koji su naknadno ekstrahovani vodom nije određivan sadržaj ukupnih fenola zbog osobenosti

metode korišćene u ovoj analizi. Fosfomolibdenski reagens koji se koristi u ovu svrhu može biti redukovani i od strane fenolnih grupa aromatičnih aminokiselina u proteinima, atomatičnih amina, askorbinske kiseline i drugih komponenti kojima vodeni ekstrakt obiluje, što bi dovelo do pogrešnog proračuna količine ukupnih fenola u ekstraktu.



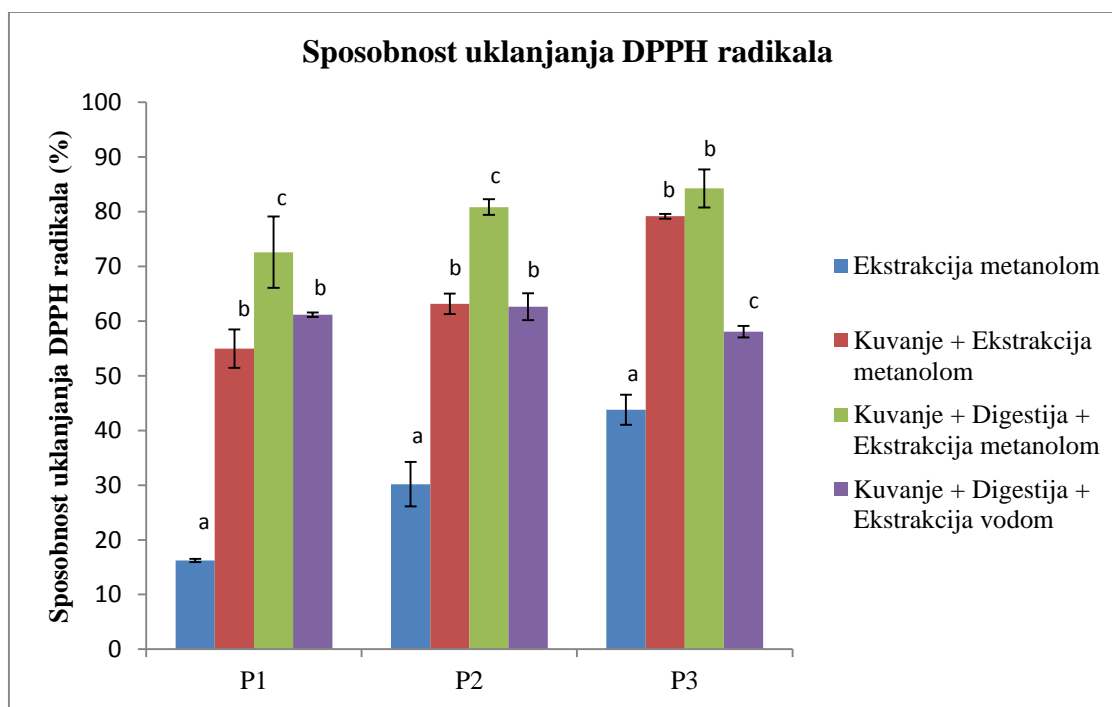
**Slika 34.** Sadržaj ukupnih fenola celih semena graška genotipova P1, P2 i P3, ekstrahovanih metanolom, nakon termičke obrade i nakon kombinovane termičke obrade i *in vitro* digestije. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

#### 4.2 Uticaj termičkog tretmana i *in vitro* digestije na sposobnost ekstrakata za uklanjanje DPPH radikla

Na **Slici 35** su prikazani rezultati određivanja sposobnosti uklanjanja sintetičkog DPPH radikala od strane ekstrakata pripremljenih na prethodno opisan način, s tim što su u ovoj analizi bili korišćeni i vodeni ekstrakti termički obrađenih digeriranih semena.



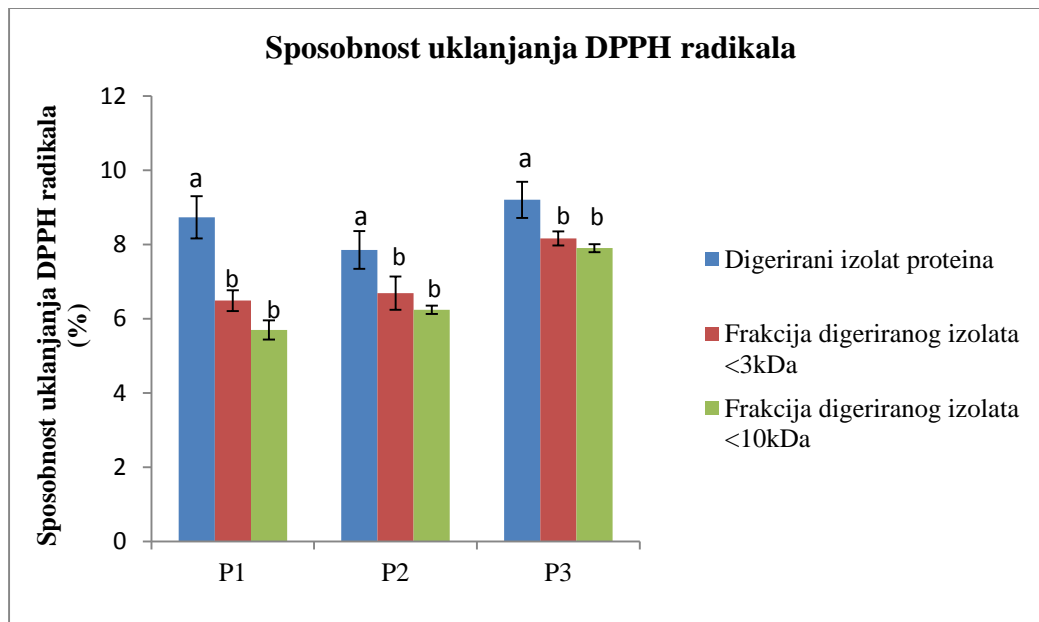
Sposobnost ekstrakta za uklanjanje DPPH radikala predstavlja meru *in vitro* antioksidativne aktivnosti. Analize su pokazale da je termički tretman doveo do statistički značajnog povećanja antioksidativne aktivnosti za 82-242% kod svih ispitivanih genotipova, dok je *in vitro* digestija dovela do dodatnog statistički značajnog povećanja od 28 do 32% kod dva ispitivana genotipa P1 i P2. Vodeni ekstrakti termički obrađenih i *in vitro* digeriranih semena su pokazali znatno niže vrednosti nego metanolni ekstrakti dobijeni od semena tretiranih na isti način, pri čemu su vrednosti antiradikalske aktivnosti za sva tri genotipa bile uravnotežene 58-61% (Slika 35).



**Slika 35.** Sposobnost uklanjanja DPPH radikala određivana u ekstraktima celih semena graška genotipova P1, P2 i P3, ekstrahovanih metanolom, nakon termičke obrade i nakon kombinovane termičke obrade i *in vitro* digestije. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose

na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $p < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

Vodeni i u nešto manjoj meri metanolni ekstrakti termički obrađenih i *in vitro* digeriranih semena mogu sadržati peptide nastale delovanjem digestivnih enzima. U cilju procene uticaja peptida nastalih tokom *in vitro* digestije na sposobnost uklanjanja DPPH radikala analizirani su izolati digeriranih i termički obrađenih proteina graška, zatim frakcija digeriranog izolata molekulske mase ispod 10 kDa, kao i frakcija mase manje od 3 kDa. Polazna količina materijala za izolaciju proteina koji su dalje tretirani bila je ista kao i polazna količina materijala korišćena za ostale ekstrakcije.

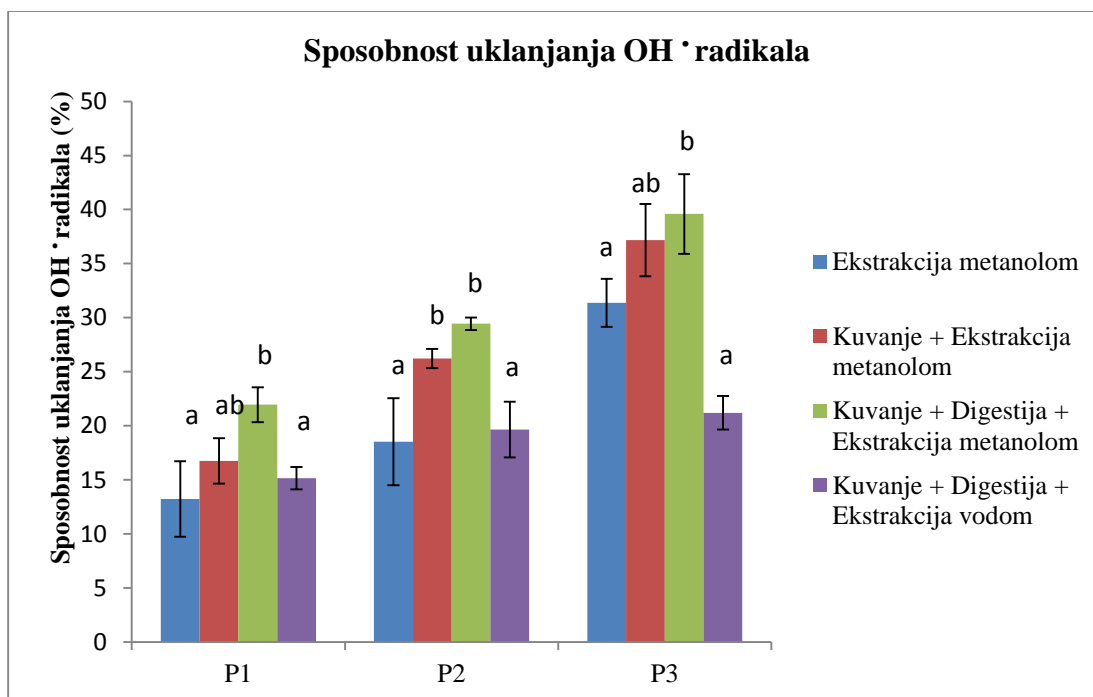


**Slika 36.** Sposobnost uklanjanja DPPH radikala od strane digeriranog izolata proteina semena genotipova P1, P2, P3, kao i frakcija digeriranog izolata. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

Rezultati ovog određivanja su prikazani na **Slici 36**. Očekivano najveću antiradikalnu aktivnost kod sva tri genotipa su pokazali izolati digeriranih proteina 7,85 – 9,20%. Frakcije izolata manje od 3 kDa bile su sledeće po jačini 6,69 – 8,16%, dok su najmanje aktivnosti zabeležene u frakciji izolata manjoj od 10 kDa, iako statistički značajne razlike između frakcija MW < 3 kDa i MW < 10 kDa nisu ustanovljene. Na osnovu priloženog dijagrama se može zaključiti da se najveći udeo u antiradikalnoj aktivnosti digeriranog proteinskog izolata može pripisati frakcijama male molekulske mase ispod 10 kDa.

#### **4.3 Uticaj termičkog tretmana i *in vitro* digestije na sposobnost ekstrakata za uklanjanje hidroksilnog radikla (OH •)**

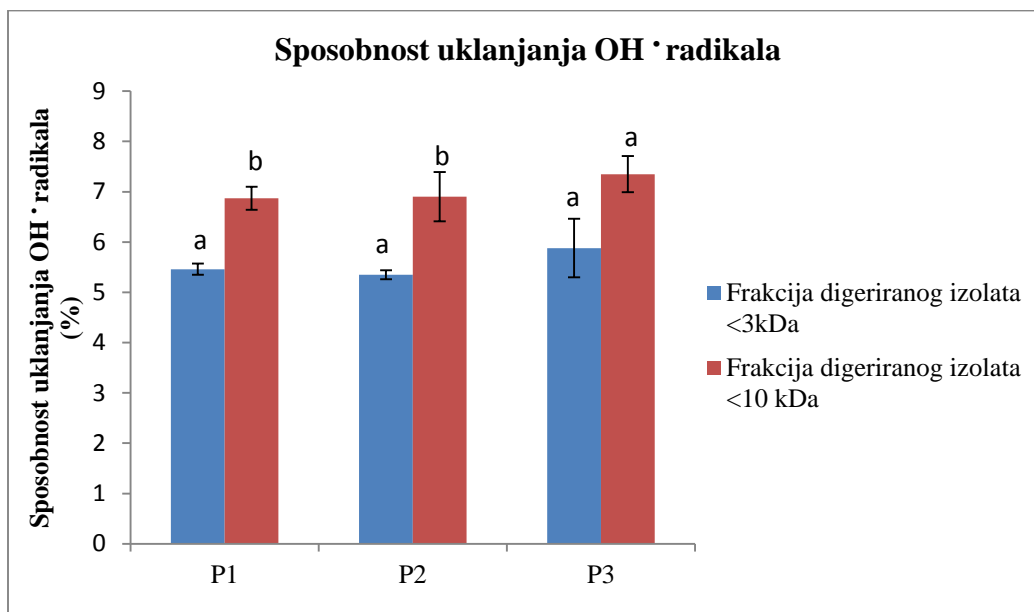
Na **Slici 37** su prikazani rezultati određivanja sposobnosti uklanjanja fiziološki relevantnog hidroksilnog radikala od strane ekstrakata pripremljenih na prethodno opisan način. Dobijeni rezultati su ukazali na sličan obrazac antiradikalne aktivnosti kao u slučaju DPPH radikala. Primena termičkog tretmana nije dovela do statistički značajnog povećanja antiradikalne aktivnosti, dok je *in vitro* digestija u kombinaciji sa termičkim tretmanom dovela do značajnog povećanja aktivnosti od 26,1 do 65,8 % u odnosu na ekstrakte dobjene uz isključivu upotrebu metanola. Vodeni ekstrakti termički obrađenih i digeriranih semena su i u ovom slučaju pokazali daleko manju antiradikalnu aktivnost od metanolnih ekstrakata tretiranih na isti način.



**Slika 37.** Sposobnost uklanjanja hidroksilnog radikala određivana u ekstraktima celih semena graška genotipova P1, P2 i P3, ekstrahovanih metanolom, nakon termičke obrade i nakon termičke obrade sa *in vitro* digestijom. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

U cilju procene uticaja peptida nastalih tokom *in vitro* digestije na sposobnost uklanjanja hidroksilnog radikala analizirane su frakcije digeriranih i termički obrađenih proteina semena molekulske mase ispod 10 kDa i mase manje od 3 kDa. Ukupni hidrolizat je izostavljen iz analize jer je pokazano da snažno interferira sa luminometrijskim esejem dajući nekonzistentne rezultate. Posle frakcionisanja situacija se značajno promenila te je antiradikalska aktivnost frakcija uspešno izmerena (**Slika 38**). Rezultati su pokazali da se antiradikalska aktivnost frakcija kreće od 5,5 – 7,6% , što je znatno niže od vrednosti

dobijenih za metanolne ekstrakte, pri čemu su frakcije ispod 10 kDa pokazivale više aktivnosti od frakcija ispod 3 kDa suprotno rezultatima dobijenim u DPPH eseju.

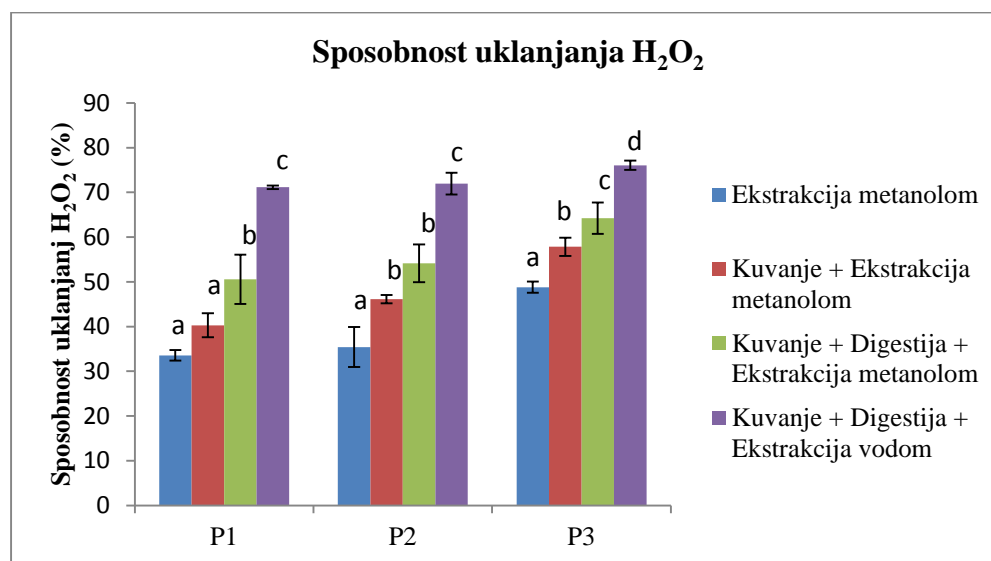


**Slika 38.** Sposobnost uklanjanja hidroksilnog radikala od strane frakcija digeriranog proteinskog izolata semena genotipova P1, P2 i P3. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

#### 4.4 Uticaj termičkog tretmana i *in vitro* digestije na sposobnost ekstrakata za uklanjanje vodonik peroksida ( $H_2O_2$ )

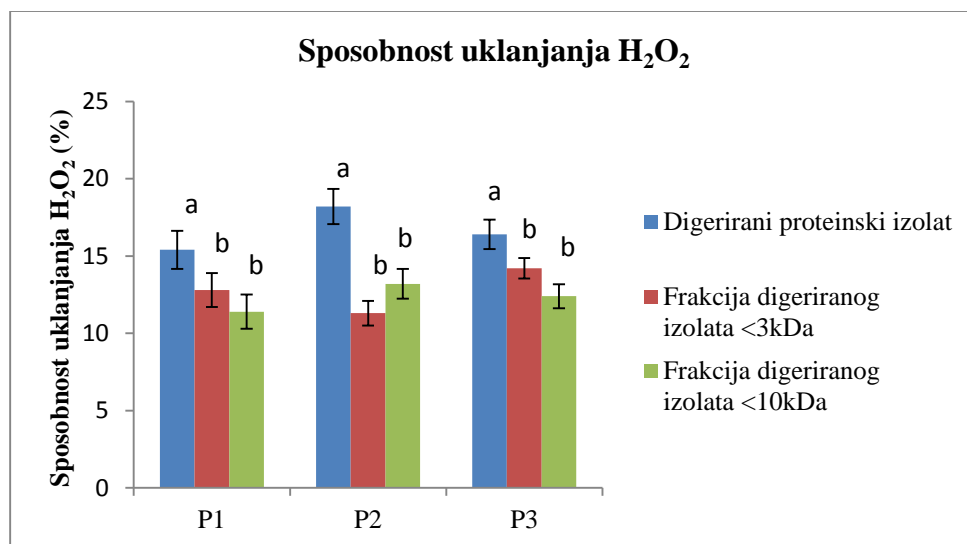
Sposobnosti uklanjanja vodonik peroksida su testirane za sve dobijene ekstrakte. Rezultati su prikazani na **Slici 39**. Termička obrada je dovela do statistički značajnog povećanja sposobnosti uklanjanja  $H_2O_2$  za 18,5 do 30,2 % kod dva od tri ispitivana genotipa. Digestija kombinovana sa termičkim tretmanom i ekstrakcijom metanolom dovela je do dodatnog povećanja 11 – 25,6 % kod dva ispitivana genotipa. Vodeni ekstrakti

termički obrađenih i *in vitro* digeriranih semena su pokazali ubedljivo najveće vrednosti, što je u suprotnosti sa rezultatima pokazanim u dva prethodna eseja.



**Slika 39.** Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida određivana u ekstraktima celih semena graška genotipova P1, P2 i P2, ekstrahovanih metanolom, nakon termičke obrade i nakon kombinovane termičke obrade i *in vitro* digestije. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

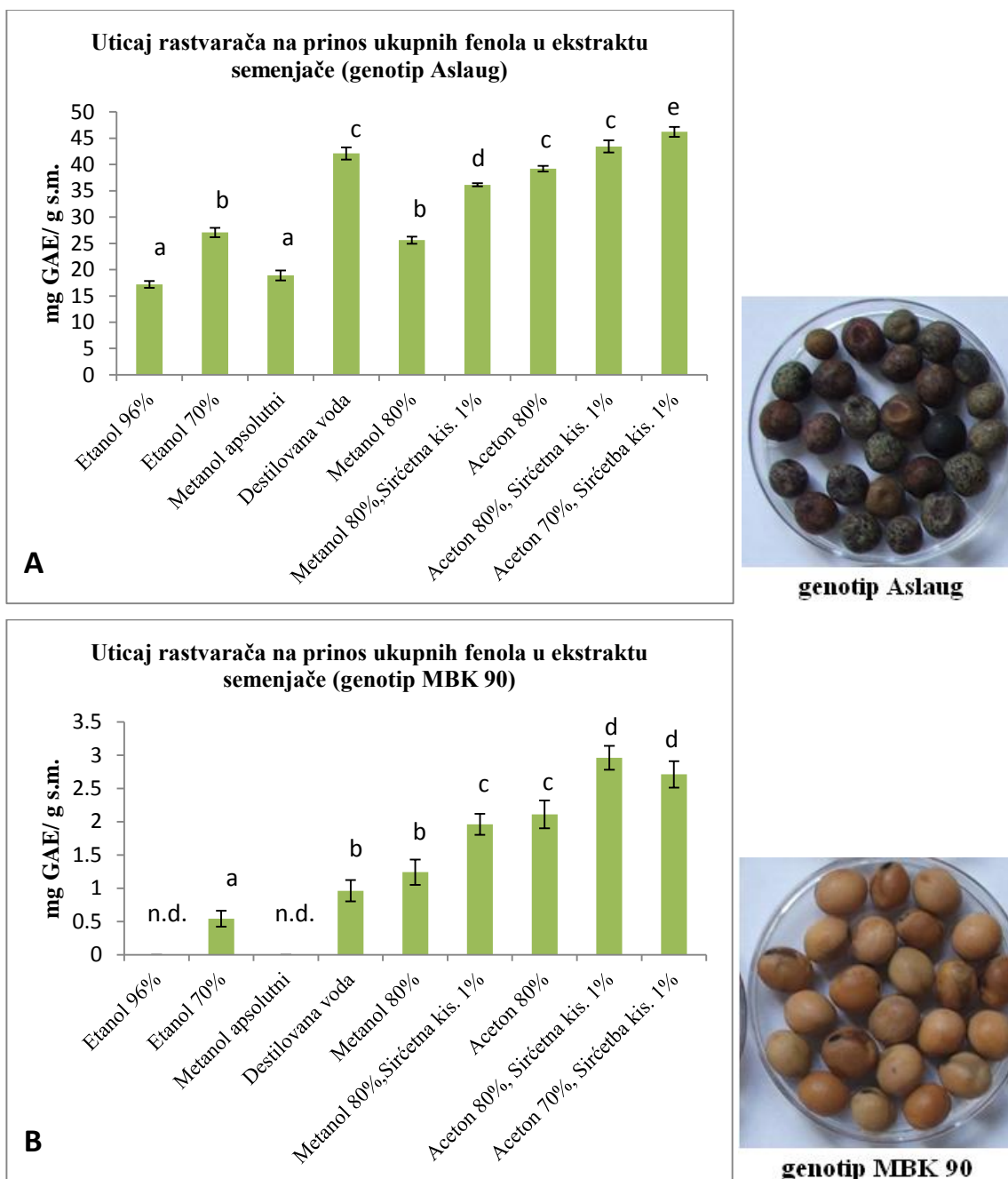
Termički obrađeni i *in vitro* digerirani proteinski izolati su takođe testirani na sposobnost uklanjanja vodonik peroksida. Rezultati su prikazani na **Slici 40**. I u ovom slučaju najviše vrednosti su zabeležene u ukupnom hidrolizatu, dok su frakcije ispod 10 kDa i ispod 3 kDa pokazale nešto niže vrednosti, pri čemu između ove dve frakcije nije bilo statistički značajnih razlika.



**Slika 40.** Sposobnost uklanjanja hidroksilnog radikala od strane digeriranog proteinskog izolata semena genotipova P1, P2 i P3 i njegovih frakcija. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti koje se odnose na isti uzorak (isti genotip) a označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

#### 4.5 Uticaj rastvarača na prinos ukupnih fenola (TPC) u ekstraktima semenjača graška

Pregledom literature ustanovljeno je da postoji veliki broj metoda za tečnu ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz različitih semena mahunarki u kojima se primenjuje širok spektar rastvarača. Upotrebom različitih rastvarača, varijacijama u odnosu rastvarača i suve materije kao i varijacijama u dužini ekstrakcije i broju primenjenih reekstrakcija dobijaju se izuzetno heterogeni rezultati za TPC. U cilju dobijanja optimalnog prinosa TPC testirano je 9 različitih kombinacija rastvarača korišćenih u prethodnim studijama. Testovi su sprovedeni na uniformno usitnjenim semenjačama dva genotipa graška koji se dijametralno razlikuju po pigmentisanosti semnjače. Na **Slici 41A** prikazan je uticaj rastvarača na TPC ekstrakata semenjače tamno pigmentisanog genotipa Aslaug.



**Slika 41.** Uticaj primene različitih rastvarača na prinos TPC u ekstraktima semenjača dva genotipa. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).



Rezultati su pokazali da u slučaju ovog genotipa najniže vrednosti TPC daju ekstrakti dobijeni pomoću 96% etanola i 100% metanola (17,2-18,9 mg GAE/g s.m). Etanol 70% i 80% methanol su dali nešto više vrednosti (25,6 – 27,06 mg GAE/g s.m.), dok se u sledeću grupu prema efikasnosti spada mešoviti rastvarač (80% methanol sa 1% sirćetnom kiselinom) sa prinosom od 36,13 mg GAE/g s.m. Visoke prinose su dali i 80% aceton i 80% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom (39,2 – 43,44mg GAE/g s.m.). Najviše prinose TPC je dala upotreba rastvarača koji je sadržao 70% aceton i 1% sirćetnu kiselinu (46,21 mg GAE/g s.m.).






Na **Slici 41B** prikazani su rezultati dobijani na blago pigmentisanom genotipu MBK 90. Vrednosti dobijene na ovom genotipu su bile 10 – 15 puta niže u odnosu na tamno obojeni genotip Aslaug. U ovom slučaju 96% etanol i 100% methanol su dali ekstrakte u kojima je TPC bio ispod granice pouzdane detekcije za korišćeni metod. Etanol 70% dao je prinos od 0.54 mg GAE/g s.m. Duplo veći prinosi su bili zabeleženi upotrebom destilovane vode i 80% metanola (0,96 – 1,24 mg GAE/g s.m). Sledeći rastvarači po prinosu su bili 80% aceton i 80% methanol sa 1% sirćetnom kiselinom (1,96 – 2,11 mg GAE/g s.m), dok su najviše koncentracije fenolnih ekstrakata (2,71 – 2,96 mg GAE/g s.m) dali kombinovani rastvarači sa acetonom: 80% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom i 70% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom.

#### **4.6 Određivanje ukupnih fenola (TPC), antocijanina (TAC) i solubilnih kondenzovanih tanina (TCT) u ekstraktima semenjača graška**

Na osnovu prethodno sprovedenih testova u kojima je testiran efekat različitih rastvarača na prinos fenolnih jedinjenja u ekstraktima i testova u kojima je ispitivan prinos ovih jedinjenja u određenim delovima semena izveden je zaključak da semenjače graška ekstrahovane kombinovanim rastvarčem koji sadrži 70% aceton i 1% sirćetnu kiselinu daju najveći prinos fenolnih jedinjenja, te je ovaj sistem dalje korišćen za analize na ostalim genotipovima. Rezultati dobijeni na semenjačama deset različito pigmentisanih varijeteta su prikazani u **Tabeli 4**. Sadržaj ukupnih fenola je varirao od 2,78 mg GAE/g s.m. pa sve do

46,46 mg GAE/g s.m. Veoma visoke vrednosti su detektovane kod izrazito tamno obojenih genotipova Aslaug, MBK 168 i Assas. Generalno, tamnije pigmentisani genotipovi su pokazivali višestruko veće vrednosti (čak i do 15 puta više) od blago pigmentisanih genotipova. Sadržaj kondenzovanih tanina (proantocijanidina) je u nedostatku odgovarajućeg standarda izražen u jedinicama apsorbancije na 500 nm (mereno vanillin esejem). Detektovani nivo kondenzovanih tanina stoji u visokoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola ( $R = 0,96$ ), pri čemu je situacija gotovo identična kao kod ukupnih fenola, tamniji genotipovi su pokazivali najviše vrednosti kondenzovanih tanina. Sadržak ukupnih antocijanina varira od 21,45 do 104,26  $\mu\text{g CAE/g s.m.}$  čineći samo mali deo ukupnih fenola, što je i očekivano kod semena mahunarki pošto ovi pigmenti kod njih nisu zastupljeni u velikoj meri. Koeficijent korelacije između koncentracija ukupnih fenola i antocijanidina je znatno niži ( $R = 0,75$ ) od koeficijenta korelacije dobijenih za ukupne fenole i kondenzovane tanine.

**Tabela 4.** Sadržaj ukupnih fenola, antocijanina i kondenzovanih tanina Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

		Ukupni fenoli (mg GAE/g s.m.)	Ukupni antocijanini ( $\mu$ g CAE/g s.m.)	Kondenzovani tanini ( $A_{500nm}$ /g s.m.)
	<b>Aslaug</b>	46,56 $\pm$ 1,05a	75,77 $\pm$ 3,67a	3,075 $\pm$ 0,035a
	<b>Assas</b>	41,80 $\pm$ 0,2b	47,52 $\pm$ 2,30b	2,945 $\pm$ 0,024b
	<b>Dora</b>	34,15 $\pm$ 0,78c	64,47 $\pm$ 2,30c	2,155 $\pm$ 0,020c
	<b>Golf</b>	23,13 $\pm$ 0,97d	38,64 $\pm$ 1,40d	1,380 $\pm$ 0,090d
	<b>Poneka</b>	39,02 $\pm$ 0,72e	88,00 $\pm$ 2,03e	1,825 $\pm$ 0,070e
	<b>Törsz</b>	18,84 $\pm$ 0,31f	70,82 $\pm$ 1,91a	1,310 $\pm$ 0,020f
	<b>MBK 88</b>	15,94 $\pm$ 0,78g	41,52 $\pm$ 1,97d	0,935 $\pm$ 0,020d
	<b>MBK 90</b>	2,78 $\pm$ 0,53h	21,45 $\pm$ 1,40f	0,305 $\pm$ 0,050g
	<b>MBK 168</b>	45,75 $\pm$ 2,09a	104,26 $\pm$ 2,94g	3,140 $\pm$ 0,030a
	<b>MBK 173</b>	36,64 $\pm$ 1,11c	70,24 $\pm$ 1,40h	2,498 $\pm$ 0,030h

#### 4.7 Sposobnost ekstrakata semenjača za uklanjanje DPPH radikala, redukcije Fe<sup>3+</sup> jona i helacije Fe<sup>2+</sup> jona

Ekstrakti semenjača dobijeni primenom odabranog rastvarača (aceton/voda/sirćetna kiselina) su testirani za sposobnost uklanjanja DPPH radikala u cilju provere njihove antioksidativne aktivnosti. DPPH esej se bazira na sposobnosti 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala da reaguje sa donorima vodonika, što su u ovom slučaju fenolna jedinjenja u ekstraktu. Stabilni DPPH radikal snažno apsorbuje u vidljivom spektru na 517nm, a vezivanje vodonika do kojeg dolazi po dodatku antioksidanta/redukujućeg agensa, rezultuje u smanjenju apsorbancije na pomenutoj talasnoj dužini. Rezultati DPPH eseja su prikazani u **Tabeli 5**. Utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) među većinom analiziranih genotipova. Najvišu antioksidativnu aktivnost je pokazao ekstrakt semenjače genotipa Aslaug (8,04 mMTE/g) a najmanju MBK 90 (0,54 mMTE/g). Antioksidativna aktivnost je opadala po sledećem redosledu: Aslaug > Poneka > MBK 173 > MBK 168 > Assas > Dora > Golf > Törsz > MBK 88 > MBK 90.

Značajne varijacije među genotipovima su primećene i u sposobnosti redukcije Fe<sup>3+</sup> jona, koja predstavlja meru redukcione sposobnosti ekstrakata (**Tabela 5**). Dobijeni rezultati se u određenoj meri razlikuju od rezultata DPPH eseja. Redukciona sposobnost je opadala posledjećem redosledu: Dora > Aslaug > Poneka > MBK 173 > MBK 168 > Assas > Golf > Törsz > MBK 88 > MBK 90.

Divalentni jon gvožđa Fe<sup>2+</sup> spada u jedne od najjačih prooksidanata koji mogu inicirati formiranje izrazito reaktivnog hidroksilnog radikala u biološkim sistemima putem Fentonove reakcije. Ferozin ima sposobnost da formira stabilan kompleks sa Fe<sup>2+</sup> koji apsorbuje na 532 nm. U prisustvu agenasa koji mogu helirati Fe<sup>2+</sup> formiranje pomenutog kompleksa je smanjeno ili onemogućeno uslovljavajući pad apsorbancije na 532 nm. Helirajuća sposobnost nekog agensa se u ovom slučaju izražava kao procenat smanjenja apsorbancije po dodatku agensa, u ovom slučaju ekstrakta semenjače. Rezultati određivanja helirajuće sposobnosti su prikazani u **Tabeli 5**. Ekstrakti semenjača svih analiziranih genotipova interferirali su sa formiranjem Ferozin/Fe<sup>2+</sup> kompleksa pokazujući značajne

sposobnosti helacije dvovalentnog gvožđa. Ovom prilikom je primećeno da se ekstrakti ponašaju suprotno od onoga što je bilo primećeno u DPPH eseju i eseju redukcione sposobnosti. Helirajuća sposobnost je opadala po sledećem redosledu: Assas >Dora >Golf >MBK 173 > Aslaug > Törsz >MBK 168 >Poneka > MBK 88 > MBK 90.

U cilju utvrđivanja odnosa između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne, redukcione i helirajuće sposobnosti ekstrakata sprovedena je korelaciona analiza ovih parametara i dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 6**. Analiza je pokazala da sadržaj ukupnih fenola značajno korelira sa rezultatima DPPH eseja ( $R = 0,968$ ), dok je korelacija sa redukcionom sposobnošću ekstrakata bila nešto niža ( $R = 0,859$ ). Nasuprot ovome korelacija između sadržaja ukupnih fenola i sposobnosti helacije dvovalentnog gvožđa je bila vrlo niska ( $R = 0,66$ )

**Tabela 5.** Sposobnost uklanjanja DPPH radikala, redukcije  $Fe^{3+}$  jona i helacije  $Fe^{2+}$  jona acetonskih ekstrakata semenjača graška. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Vrednosti označene su istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

	DPPH esej (mMTE/g)	Sposobnost redukcije $Fe^{3+}$ jona (nagib)	Sposobnost helacije $Fe^{2+}$ jona (%)
Aslaug	8,04 $\pm$ 0,14a	0,268 $\pm$ 0,004a	22,9 $\pm$ 1,5 a
Assas	6,87 $\pm$ 0,22b	0,220 $\pm$ 0,006b	33,7 $\pm$ 2,1b
Dora	4,70 $\pm$ 0,15c	0,346 $\pm$ 0,009c	33,3 $\pm$ 1,7b
Golf	3,56 $\pm$ 0,12d	0,140 $\pm$ 0,005d	24,6 $\pm$ 1,6a
Poneka	7,42 $\pm$ 0,49ab	0,237 $\pm$ 0,006b	21,2 $\pm$ 0,6a
Törsz	2,45 $\pm$ 0,09e	0,096 $\pm$ 0,005e	23,0 $\pm$ 1,3a
MBK 88	1,77 $\pm$ 0,11f	0,063 $\pm$ 0,0005f	10,4 $\pm$ 0,8c
MBK 90	0,54 $\pm$ 0,08g	0,021 $\pm$ 0,0003g	8,1 $\pm$ 0,4d
MBK 168	6,90 $\pm$ 0,10b	0,232 $\pm$ 0,018b	21,6 $\pm$ 1,5a
MBK 173	7,02 $\pm$ 0,24b	0,235 $\pm$ 0,004b	23,8 $\pm$ 1,0a

**Tabela 6.** Korelacioni koeficijenti sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnih parametara. Podebljane vrednosti označavaju statistički značajne korelacije ( $P < 0,05$ ).

	DPPH	TPC	Spos. redukcije Fe <sup>3+</sup> jona	Spos. helacije Fe <sup>2+</sup> jona
DPPH	1,000	<b>0,968</b>	<b>0,812</b>	0,582
TPC	<b>0,968</b>	1,000	<b>0,859</b>	0,660
Sposredukcije Fe <sup>3+</sup>	<b>0,812</b>	<b>0,859</b>	1,000	0,774
Spos. helacije Fe <sup>2+</sup>	0,582	0,660	0,774	1,000

#### 4.8 Određivanje sastava fenolnih jedinjenja pomoću UHPLC-LtQ Orbitrap-MS tehnike

U ekstraktima semanjača dobijenih pomoću kiselog acetona identifikovano je i kvantifikovano 25 najzastupljenijih fenolnih jedinjenja (**Tabela 7**). Detektovani su predstavnici pet klasa fenolnih jedinjenja: fenolne kiseline (hidroksi benzoeve i hidroksicinaminske kiseline) i četiri klase flavonoida (flavanoli, flavonoli, flavanoni i flavoni). Od fenolnih kiselina detektovane su: galna kiselina koja je najviše zastupljena kod srednje pigmentisanog genotipa Poneka (29,95 mg/kg) i kod izrazito tamnih genotipova: Aslaug, Assas, Dora, MBK 168 i MBK 173, a bila je potpuno odsutna kod slabo pigmentisanih genotipova MBK 88 i MBK 90. *p*-Hidroksi benzoeva kiselina je, za razliku od galne kiseline, bila najzastupljenija kod slabo pigmentisanih genotipova: Törsz (19,95 mg/kg), MBK 88 (68,22 mg/kg) i MBK 90 (22,99 mg/kg), dok je bila potpuno odsutna ili prisutna u veoma niskim koncentracijama kod tamno pigmentisanih genotipova. Kod genotipa MBK 88 je ova kiselina pojedinačno bila najzastupljenije fenolno jedinjenje. Ostale fenolne kiseline: protokatehinska, hlorogena, kofeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i ružmarinska su bile prisutne kod većine genotipova sa sadržajem ispod 4 mg/kg i ravnomernom distribucijom među genotipovima. Od flavanola detektovani su: katehin, epikatehin, katehin galat, galokatehin galat, epigalokatehin galat i epigalokatehin.

Epigalokatehin je bio pojedinačno najzastupljenije fenolno jedinjenje kod većine ispitivanih genotipova sa izuzetkom tri najslabije pigmentisana genotipa : Törsz, MBK 88 i MBK 90. Najveći sadržaj epigalokatehina je zabeležen kod genotipa Aslaug (202,72 mg/kg) što je ujedno i najviši detektovani sadržaj nekog fenolnog jedinjenja u celokupnoj studiji. Od ostalih flavanola epikatehin je detektovan u značajnim količinama (7,5-13,02 mg/kg) kod genotipova: Golf, Törsz i MBK 88. Epigalokatehin galat je takođe bio prisutan u nešto višim koncentracijama kod većine genotipova (4,16 – 17,74 mg/kg), dok su ostali (katehin, katehin galat i epigalokatehin galat) bili prisutni u koncentracijama ispod 3 mg/kg sa nešto ravnomernijom distribucijom među genotipovima. Detektovano je pet flavonola: kvercetin, rutin, kamferol, morin i galangin, od kojih je jedino morin bio zastupljen u višim koncentracijama i to kod slabije pigmentisanih genotipova (Golf, Törsz, MBK 88 i MBK 90 ) u opsegu od 12,54 – 35,53 mg/kg. Kod genotipa MBK 90 morin je bio pojedinačno najzastupljenije fenolno jedinjenje. Ostali flavonoli su detektovani u veoma niskim koncentracijama ispod 2 mg/kg. Flavanoni (naringin, naringenin, hrizin i hesperetin) su bili prisutni u izuzetno niskim koncentracijama 0,06 – 0,54 mg/kg, pri čemu su hrizin i hesperetin detektovani u manje od polovine ispitivanih genotipova. Od flavona detektovani su luteolin i apigenin. Zabeleženo je značajnije prisustvo luteolina kod većine genotipova, dok su najveće vrednosti bile kod genotipova: Dora, Golf, Poneka, Törsz i MBK 88 (5,68 – 8,57 mg/kg). Apigenin je bio gotovo istovetno distribuiran među svim ispitivanim genotipovima u količinama od 0,3 – 0,4 mg/kg.

Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja je ispitivan i u vodenim rastvorima semenjača dobijenih upotrebom destilovane vode kao rastvarača. Ovi ekstrakti su korišćeni u esejima ćelijske citotoksičnosti. Ekstrakti dobijeni na pomenut način su se kvalitativno i kvantitativno razlikovali od ekstrakata dobijenih upotrebom kiselog acetona kao rastvarača (**Tabela 8**). Vodeni ekstrakti su generalno sadržali više određenih fenolnih kiselina, ovo je posebno bilo izraženo u slučaju galne i *p*-hidroksibenzoeve kiseline koja je bila najzastupljenija kiselina kod većine genotipova. Sadržaj ostalih kiselina se manje razlikovao od nivoa detektovanih u acetonskim ekstraktima. Sadržaj flavanola u vodenim ekstraktima je bio značajno niži, sa izuzetkom katehina čija je koncentracija bila nešto viša

nego u slučaju acetonskih ekstrakata. Najupečatljivije razlike su zabeležene u sadržaju flavonola i flavanona: kvercetin, kamferol, hrizin i hesperetin nisu detektovani ni kod jednog genotipa, dok je naringenin detektovan u zanemarljivo niskoj koncentraciji samo kod jednog genotipa a sadržaj ostalih jedinjenja iz ove dve grupe je bio značajno umanjen u odnosu acetonske ekstrakte.



**Tabela 7.** Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u acetonskim ekstraktima semenjača. n.d. – nije detektovano prisustvo.

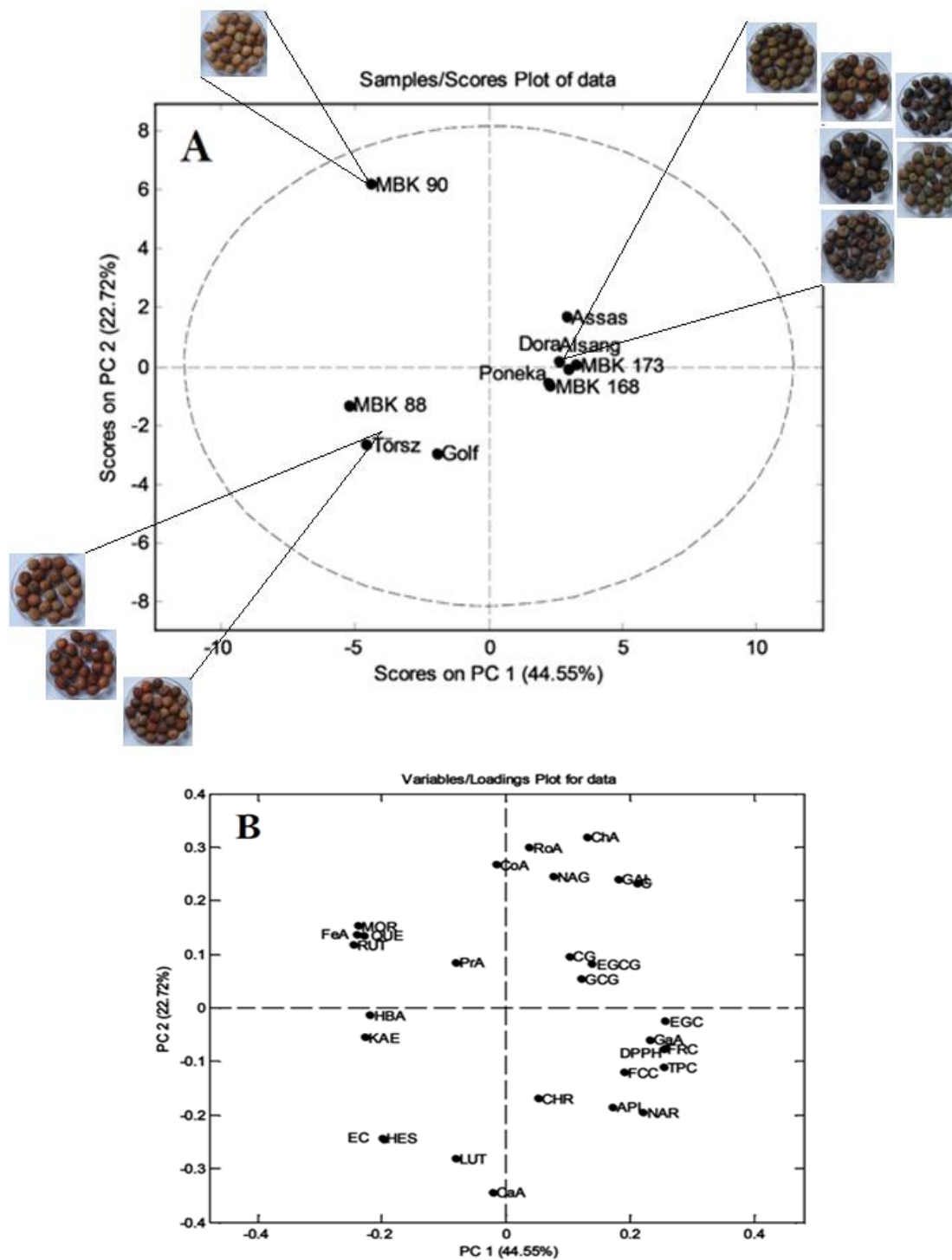
mg/kg		Alsaug	Assas	Dora	Golf	Poneka	Törsz	MBK 88	MBK 90	MBK 168	MBK 173
Fenolne kiseline	Galna kiselina	19,70	9,59	23,84	9,08	29,95	1,02	n.d.	n.d.	18,13	15,43
	Protokatehuinska kiselina	1,12	1,62	1,30	0,89	2,25	1,31	2,08	1,64	0,94	0,84
	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	n.d.	0,66	2,11	5,05	3,13	19,95	68,22	22,99	1,45	n.d.
	Hlorogena kiselina	0,99	1,27	0,87	0,61	0,98	0,64	0,57	1,25	0,99	0,95
	Kafeinska kiselina	0,81	0,40	0,69	0,85	0,86	1,25	0,91	0,20	0,92	0,91
	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,50	1,13	1,16	0,28	0,87	0,58	0,98	1,20	0,57	0,64
	Ferulinska kiselina	1,67	1,82	2,12	2,07	2,52	2,54	3,15	3,44	1,73	1,38
Ruzmarinska kiselina	0,15	0,15	0,15	0,12	0,14	0,12	n.d.	0,29	0,15	0,14	
Flavanoli	Katehin	1,89	2,19	2,15	n.d.	2,33	n.d.	n.d.	2,00	1,99	2,01
	Epikatehin	1,14	1,03	1,41	10,07	1,26	13,02	7,53	1,34	1,52	1,55
	Katehin galat	0,30	0,38	0,30	0,29	0,30	0,28	0,34	0,31	0,33	0,39
	Galokatehin galat	13,70	17,74	4,16	5,73	4,67	4,21	5,55	4,18	5,56	5,56
	Epigalokatehin galat	0,86	0,93	1,31	0,44	0,77	0,51	0,89	0,65	0,59	0,99
	Epigalokatehin	202,72	90,92	136,30	34,25	142,92	5,90	1,41	1,44	172,56	183,18
Flavonoli	Kvercetin	0,14	0,21	0,31	0,24	0,38	0,80	1,51	1,46	0,12	0,12
	Rutin	0,28	0,26	0,28	0,59	0,31	1,31	0,79	1,51	0,29	0,29
	Kaemferol	0,98	0,99	1,03	1,43	1,13	2,04	3,90	1,75	0,97	n.d.
	Morin	0,94	0,76	1,12	13,69	1,37	20,69	12,54	35,33	1,56	0,91
	Galangin	0,74	0,74	0,74	0,72	0,73	0,72	0,72	0,74	0,73	0,75
Flavanoni	Naringenin	0,25	0,30	0,31	0,26	0,36	0,17	0,14	n.d.	0,28	0,26
	Naringin	0,31	0,25	0,54	0,25	0,51	n.d.	0,31	0,58	0,34	0,39
	Hrizin	n.d.	n.d.	0,06	0,06	0,06	n.d.	0,06	n.d.	0,06	0,06
	Hesperetin	n.d.	n.d.	n.d.	0,20	n.d.	0,16	0,16	n.d.	n.d.	n.d.
Flavoni	Luteolin	4,03	3,24	6,81	5,68	6,85	8,57	6,53	2,39	4,00	4,16
	Apigenin	0,35	0,37	0,35	0,33	0,43	0,30	0,35	0,23	0,34	0,35

**Tabela 8.** Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima semenjača. n.d – nije detektovano prisustvo.

mg/kg		Alsaug	Assas	Dora	Golf	Poneka	Törsz	MBK 88	MBK 90	MBK 168	MBK 173
Fenolne kiseline	Galna kiselina	24,99	14,60	39,81	12,03	43,15	1,99	0,60	0,18	26,03	27,91
	Protokatehuinska kiselina	0,80	0,98	0,94	0,59	1,54	0,54	1,00	0,71	0,61	0,38
	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	0,87	2,21	1,00	13,15	2,83	61,43	62,34	15,00	0,39	1,49
	Hlorogena kiselina	1,14	1,78	1,23	0,66	1,21	0,77	0,63	1,19	1,19	1,21
	Kafeinska kiselina	0,68	0,34	0,48	0,66	0,56	0,95	0,67	0,15	0,68	0,70
	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,38	0,95	0,95	0,19	0,65	0,65	1,23	0,96	0,53	0,39
	Ferulinska kiselina	1,29	1,42	1,91	1,76	1,25	2,35	2,43	3,70	1,65	1,54
	Ruzmarinska kiselina	0,12	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	n.d.	0,23	n.d.	0,12
Flavanoli	Katehin	1,93	2,62	3,44	2,08	2,42	2,57	3,75	n.d.	2,12	2,10
	Epikatehin	0,96	1,43	1,64	6,18	1,43	6,03	4,30	0,78	0,94	1,00
	Katehin galat	0,30	0,34	0,28	0,29	0,28	0,28	0,31	0,32	0,31	0,32
	Galokatehin galat	n.d.	5,39	5,53	n.d.	6,54	11,34	7,00	5,37	6,07	n.d.
	Epigalokatehin galat	0,51	0,83	0,62	0,90	0,76	0,80	0,55	0,87	0,68	0,76
	Epigalokatehin	123,62	69,57	107,16	34,46	114,22	5,21	2,41	1,51	127,69	130,03
Flavonoli	Kvercetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	n.d.
	Rutin	0,26	0,27	0,27	0,45	0,27	0,86	0,56	0,87	0,27	0,28
	Kaemferol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Morin	n.d.	0,33	0,33	0,42	0,33	0,52	0,45	0,82	0,34	0,33
	Galangin	0,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flavanoni	Naringenin	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Naringin	0,29	0,34	0,33	0,27	0,32	0,33	0,48	0,27	0,43	0,37
	Hrizin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Hesperetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flavoni	Luteolin	0,47	0,44	0,45	0,41	0,57	0,41	0,40	n.d.	0,50	0,50
	Apigenin	0,24	0,24	0,23	n.d.	0,23	n.d.	n.d.	n.d.	0,23	0,23

#### 4.9 Analiza glavnih komponenti (PCA)

PCA analiza je primenjena u cilju određivanja odnosa između 10 uzoraka graška iz različitih evropskih regiona. Dimenzije početne matrice bile su 10 (broj genotipova graška) × 29 (broj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja i antioksidativnih eseja), a za obradu podataka korišćena je matrica kovarijanse, uz prethodno autoskaliranje. Pomenuta analiza je pokazala da prvih šest glavnih komponenta opisuju 95,07% ukupne varijanse (varijabilnosti podataka). Prva glavna komponenta (*PC1*) je opisivala 44,55% varijanse, druga (*PC2*) 22,72%, a treća (*PC3*) svega 11,36%. Na **Slici 42A** prikazan je grafik zavisnosti prve dve glavne komponente *PC1* i *PC2*. Sa ovog grafika se vidi jasno razdvajanje genotipova duž *PC1* ose na dve glavne grupe, dok je genotip MBK 90 van grupa. Prva grupa obuhvata slabije pigmentisane genotipove (Golf, Törsz, i MBK 88), dok su u drugoj grupi grupisani tamnije bojeni genotipovi (Alsang, Assas, Dora, Poneka, MBK 168, i MBK 173). Varijable sa najznačajnijim doprinosom na grupisanje uzoraka mogu se identifikovati pomoću grafik vektora latentnih varijabli (**Slika 42B**). Visoke koncentracije epikatehina, *p*-hidroksibenzojeve kiseline, kamferola i hesperetina koje su detektovane kod genotipova Golf, Törsz, i MBK 88 su prepoznate kao najznačajniji faktori za njihovo grupisanje i odvajanje od drugih uzoraka. Sa druge strane, koncentracije epigalokatehina i galne kiseline, zajedno sa sadržajem ukupnih polifenola i rezultatima *in vitro* testova za određivanje antioksidativne aktivnosti su najviše doprinele izdvajanju genotipova: Alsang, Assas, Dora, Poneka, MBK 168, i MBK 173 u zasebnu grupu. Genotip MBK 90 se izdvaja od pomenutih grupana na osnovu visokog sadržaja *p*-kumarinske, ferulinske, ruzmarinske kiseline, i najnižeg sadržaja kofeinske kiseline i luteolina kao i ukupnih fenola, antioksidativnih aktivnosti i sposobnosti helacije Fe<sup>2+</sup> jona.



Slika 42. Analiza glavnih komponenti. (A) PCA grafik skorova. (B) PCA grafik vektora latentnih varijabli.

Sa **Slike 42B** se takođe može zaključiti da su epigalokatehin, galna kiselina, naringenin i apigenin komponente koje imaju najviše uticaja na sposobnost uklanjanja DPPH radikala, sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> jona, kao i na sposobnost helacije Fe<sup>2+</sup> jona.

**Tabela 9.** Korelacioni koeficijenti za antioksidativne aktivnosti i sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja dobijeni na acetonskim ekstraktima semenjača. Povećane vrednosti označavaju statistički značajne korelacije ( $P < 0,05$ ).

	DPPH	Spos. redukcije Fe <sup>3+</sup>	Spos. helacije Fe <sup>2+</sup>
Galna kiselina	<b>0,797</b>	<b>0,874</b>	0,501
Protokatehinska kiselina	-0,224	-0,286	-0,357
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	-0,699	-0,696	-0,687
Hlorogena kiselina	0,341	0,200	0,109
Kofeinska kiselina	0,140	0,099	0,087
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	-0,265	-0,053	-0,076
Ferulinska kiselina	-0,827	-0,756	-0,729
Ruzmarinska kiselina	-0,042	-0,025	-0,059
Katehin	0,604	0,598	0,281
Epikatehin	-0,562	-0,538	-0,142
Katehin galat	0,325	0,121	0,137
Galokatehin galat	0,496	0,268	0,432
Epigalokatehin galat	0,289	0,612	0,398
Epigalokatehin	<b>0,914</b>	<b>0,859</b>	0,461
Kvercetin	-0,858	-0,825	-0,796
Rutin	-0,875	-0,865	-0,645
Kaemferol	-0,705	-0,674	-0,591
Morin	-0,887	-0,873	-0,672
Galangin	0,453	0,483	0,267
Naringenin	<b>0,820</b>	<b>0,842</b>	<b>0,772</b>
Naringin	0,054	0,234	-0,195
Hrizin	0,145	0,294	0,035
Hesperetin	-0,574	-0,558	-0,211
Luteolin	-0,193	0,028	0,137
Apigenin	<b>0,729</b>	<b>0,634</b>	0,472

Rezultati korelacione analize pojedinačnih fenolnih jedinjenja sa *in vitro* esejima za antioksidativne aktivnosti ekstrakata su prikazani u **Tabeli 9**. Pokazano je da sadržaj galne kiseline, epigalokatehina, naringenina i apigenina statistički značajno ( $P < 0,05$ ) i pozitivno koreliše sa rezultatima DPPH esej i esej redukcione sposobnosti, dok samo naringenin pokazuje statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa sposobnošću helacije  $Fe^{2+}$  jona.

#### 4.10 *In vitro* analiza citotoksične aktivnosti

Citotoksičnost deset vodenih ekstrakata semenjača graška je ispitivana na odabranim humanim malignim ćelijskim linijama karcinoma dojke MDA-MB-453, adenokarcinoma kolona LS174, hronične mijeloidne leukemije K562, karcinoma pluća A549, kao i na normalnim fibroblastima pluća MRC-5. Rezultati određivanja citotoksične aktivnosti su prikazani u **Tabeli 10**. Ekstrakti semenjača 1-5 (Aslaug, Assas, Dora, Golf i Poneka), 9 (MBK 168) i 10 (MBK 173) su pokazali izraženo dozno-zavisno citotoksično dejstvo na svim ispitivanim malignim ćelijskim linijama. Ekstrakti 1-3, 5, 9 i 10 su pokazali vrlo dobru citotoksičnu aktivnost. Među njima ekstrakti 1 (Aslaug) i 9 (MBK 168) su ispoljili najvišu citotoksičnu aktivnost). Sa druge strane, ekstrakt 4 (Golf) je pokazao nižu aktivnost, u poređenju sa pomenutih šest ekstrakata, veoma niske aktivnosti su pokazali i ekstrakti 6 (Törsz) i 7 (MBK 88) dok ekstrakt 8 (MBK 90) nije pokazao citotoksični efekat ni pri koncentracijama do 10%.

Ekstrakti 1-5, 9 i 10 su pokazali najintenzivnije citotoksično dejstvo na K562 ćelijama mijeloidne leukemije kao što se vidi iz **Tabele 10**. Isti ekstrakti su pokazali dobru citotoksičnu aktivnost prema MDA-MB-453 ćelijama karcinoma dojke iako su intenziteti citotoksičnosti bili 2-3 puta niži od onih zabeleženih na K562 liniji. Nešto niža citotoksična aktivnost je ispoljena na ćelijama karcinoma pluća A459 i adenokarcinoma kolona LS174. Značajno je istaći da su ekstrakti 1-5, 9 i 10 pokazivali više intenzitete citotoksične aktivnosti na liniji karcinoma pluća A549 u poređenju sa normalnim fibroblastima pluća, mada im je selektivnost bila niska.

U cilju ispitivanja uticaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja na intenzitet citotoksične aktivnosti ekstrakata sprovedena je analiza korelacija između  $IC_{50}$  vrednosti i sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 11**. Sadržaj epigalokatehina je statistički značajno korelirao sa intenzitetom citotoksične aktivnosti ekstrakata semenjače graška na MDA-MB-453, LS174 i K562 malignim ćelijskim linijama. Vodeni ekstrakti 1, 9 i 10 koji su pokazivali najvišu citotoksičnu aktivnost imali su i najviši sadržaj epigalokatehina. Sadržaj luteolina je takođe pokazivao značajne korelacije sa intenzitetom citotoksičnih aktivnosti na LS174 i K562 ćelijama.

**Tabela 10.** Koncentracije vodenih ekstrakata semenjače graška koje su inhibirale ćelijsko preživljavanje za 50%.

ekstrakt	$IC_{50}$ (zapremina ekstrakta, vol %)				
	MDA-MB-453	LS174	K562	A549	MRC-5
(1) Aslaug	0,89 ± 0,21	1,97 ± 0,51	0,46 ± 0,06	1,17 ± 0,18	1,93 ± 0,06
(2) Assas	1,15 ± 0,08	2,39 ± 0,17	0,48 ± 0,09	1,68 ± 0,59	2,08 ± 0,10
(3) Dora	1,33 ± 0,12	3,36 ± 0,81	0,59 ± 0,16	2,03 ± 0,60	2,85 ± 0,56
(4) Golf	2,68 ± 0,17	5,48 ± 0,52	1,47 ± 0,67	4,09 ± 1,05	5,60 ± 0,57
(5) Poneka	1,29 ± 0,06	2,90 ± 0,45	0,52 ± 0,07	1,74 ± 0,61	2,83 ± 0,39
(6)Törsz	9,02 ± 0,70	8,00 ± 0,69	8,54 ± 0,51	>10	>10
(7) MBK 88	10,00 ± 0,01	9,25 ± 0,29	9,78 ± 0,31	>10	>10
(8) MBK 90	>10	>10	>10	>10	>10
(9) MBK 168	0,89 ± 0,02	1,84 ± 0,26	0,41 ± 0,08	1,22 ± 0,21	2,07 ± 0,15
(10) MBK 173	1,37 ± 0,05	2,41 ± 0,55	0,48 ± 0,08	1,60 ± 0,34	2,70 ± 0,80
Cisplatina*	8,04 ± 0,88	17,80 ± 0,63	5,45 ± 0,18	14,42 ± 0,70	9,24 ± 0,18

Napomena: vrednosti  $IC_{50}$  u tabeli su predstavljene kao  $X_{av} \pm SD$  određene na osnovu tri nezavisna eksperimenta; \* $IC_{50}$  vrednosti za cisplatinu (pozitivna kontrola) su predstavljene u  $\mu M$ .

**Tabela 11.** Korelacioni koeficijenti između intenziteta citotoksične aktivnosti i sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja dobijeni na vodenim ekstraktima semenjača. Povebljane vrednosti označavaju statistički značajne korelacije ( $P < 0,05$ ).

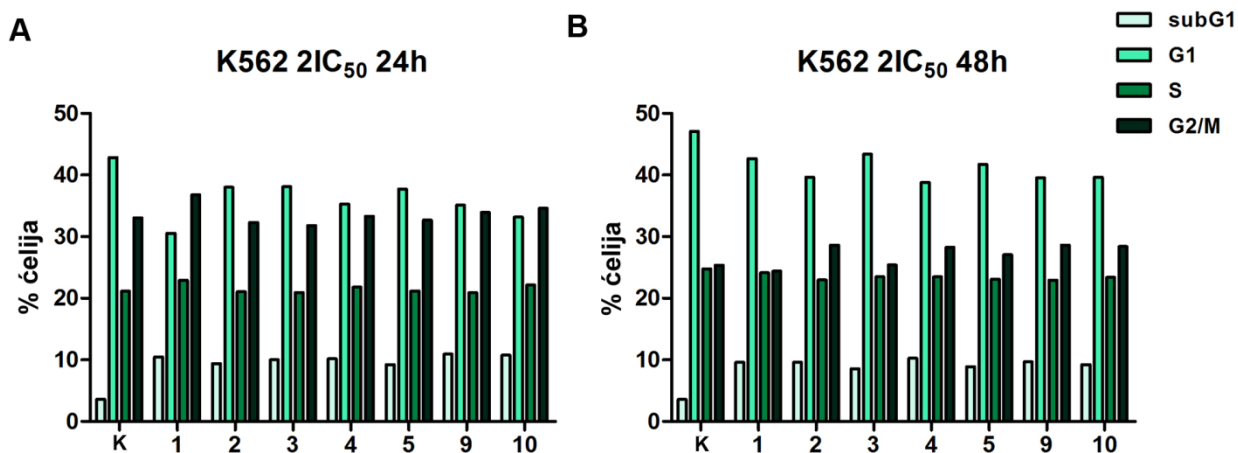
	IC <sub>50</sub> MDA-MB-453	IC <sub>50</sub> LS174	IC <sub>50</sub> K562	IC <sub>50</sub> A549	IC <sub>50</sub> MRC-5
Galna kiselina	-0,544	-0,500	-0,527	0,000	0,107
Protokatehinska kiselina	-0,159	0,067	0,117	0,143	-0,036
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	<b>0,862</b>	<b>0,883</b>	<b>0,895</b>	0,750	0,714
Hlorogena kiselina	-0,546	-0,527	-0,508	0,108	0,018
Kofeinska kiselina	0,210	0,025	-0,034	-0,559	-0,342
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,270	0,370	0,409	0,144	0,018
Ferulinska kiselina	<b>0,745</b>	<b>0,717</b>	<b>0,711</b>	0,464	0,500
Katehin	0,410	0,500	0,536	0,393	0,286
Epikatehin	<b>0,824</b>	<b>0,904</b>	<b>0,920</b>	<b>0,955</b>	<b>0,901</b>
Galokatehin galat	0,374	0,475	0,494	0,111	0,037
Epigalokatehin galat	0,227	0,159	0,181	0,577	0,522
Epigalokatehin	<b>-0,695</b>	<b>-0,817</b>	<b>-0,862</b>	-0,750	-0,571
Rutin	<b>0,922</b>	<b>0,810</b>	<b>0,791</b>	0,611	0,709
Morin	<b>0,726</b>	0,679	0,682	0,512	0,512
Naringin	0,143	-0,017	-0,025	-0,429	-0,393
Luteolin	-0,679	<b>-0,706</b>	<b>-0,738</b>	-0,451	-0,324

Statistički značajne pozitivne korelacije između sadržaja *p*-hidroksibenzoeve kiseline, ferulične kiseline, epikatehina, rutina i IC<sub>50</sub> vrednosti dobijene na određenom broju ćelijskih linija ukazuju na činjenicu da ova jedinjenja najverovatnije nemaju presudan uticaj na citotoksičnu aktivnost ekstrakata.

U cilju ispitivanja mehanizama citotoksične aktivnosti najaktivnijih vodenih ekstrakata semenjača posmatrane su promene u distribuciji ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa. U tu svrhu su korišćene ćelijske linije mijeloidne leukemije K562 i adenokarcinoma kolona LS174 tretirane dvostrukim IC<sub>50</sub> koncentracijama ekstrakata i analizirane protočnom citometrijom.

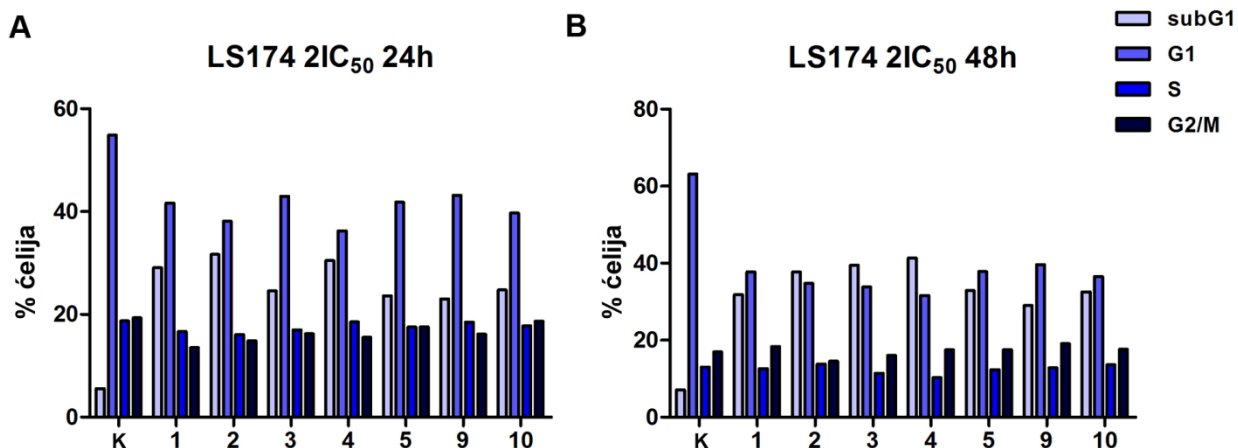
Analiza faza ćelijskog ciklusa je pokazala da su svi odabrani ekstrakti (1-5, 9 i 10) indukovali povećanje broja K562 ćelija koje su se nalazile u subG1 fazi posle tretmana u trajanju od 24 i 48 h u poređenju sa kontrolnim uzorkom ćelija (**Slika 43A, B**).





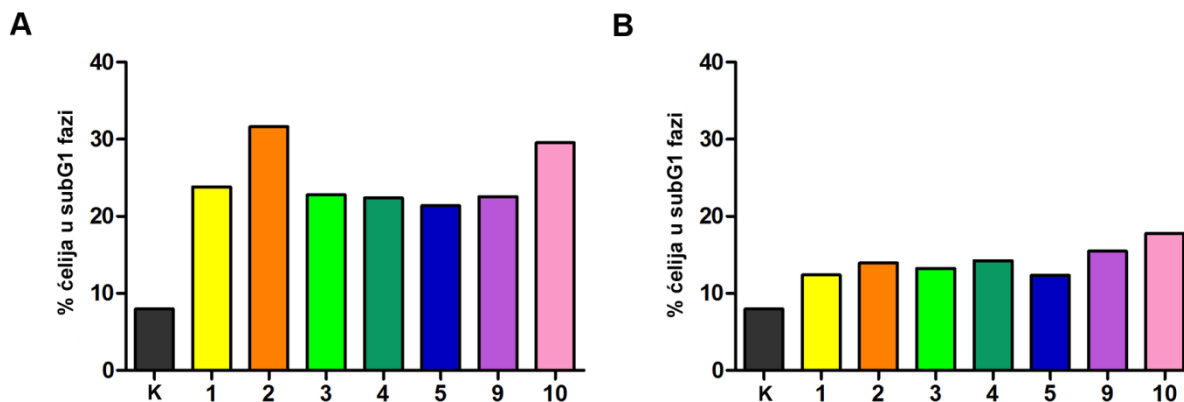
**Slika 43.** Promene u distribuciji K562 ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa po tretmanu 24h – (A) i 48h - (B) odabranim ekstraktima koji su pokazivali najizraženiji citotoksični efekat. C – kontrolna grupa ćelija, 1-ekstrakt semenjače genotopa Aslaug, 2-Assas, 3-Dora, 4-Golf, 5-Poneka, 9-MBK 168, 10-MBK 173. Primenjene koncentracije odgovaraju dvostrukim IC<sub>50</sub> vrednostima.

Procenat K562 ćelija, tretiranih ekstraktima, koje su se nalazile u subG1 fazi je bio tri puta veći u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Svaki od odabranih ekstrakata primenjenih u koncentraciji od 2 IC<sub>50</sub>, posle 24 i 48 h, je uslovio značajno povećanje broja LS174 ćelija u subG1 fazi u poređenju sa netretiranim ćelijama. Ovde je povećanje bilo još izraženije (4-5 puta u odnosu na ćelije u kontrolnom uzorku) (**Slika 44A, B**). Ekstrakti 1, 2 i 4 su indukovali najviši porast broja LS174 ćelija u subG1 fazi posle 24h tretmana.



**Slika 44.** Promene u distribuciji LS174 ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa po tretmanu 24h – (A) i 48h - (B) odabranim ekstraktima koji su pokazivali najizraženiji citotoksični efekat. C – kontrolna grupa ćelija, 1-ekstrakt semenjače genotopa Aslaug, 2-Assas, 3-Dora, 4-Golf, 5-Poneka, 9-MBK 168, 10-MBK 173. Primenjene koncentracije odgovaraju dvostrukim IC<sub>50</sub> vrednostima.

Kako bi se ispitaio mogući proapoptotski efekat odabranih ekstrakata, testirana je njihova sposobnost da indukuju apoptozu u kulturi ćelija adenokarcinoma kolona LS174 u prisustvu specifičnog inhibitora efektorske kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK). Protočnom citometrijom je analiziran ćelijski ciklus i praćena je distribucija ćelija u subG1 fazi ciklusa kod ćelija pretretiranih inhibitorom kaspaze-3 u poređenju sa ćelijama koje nisu bile izložene inhibitoru. Na **Slici 45A** su prikazani procenti ćelija u subG1 fazi u kontrolnom uzorku, i uzorcima ćelija koje su tretirane ekstraktima (1-5, 9 i 10) bez primene inhibitora, dok su na **Slici 45B** prikazani rezultati istog oglada ali na ćelijama koje su prethodno tretirane inhibitorom kaspaze-3. Poređenjem dijagrama evidentno je da je pretretman inhibitorom kaspaze-3 znatno umanjio procenat ćelija u subG1 fazi za sve testirane ekstrakte, ali ih nije vratio na nivo kontrole, što ukazuje na to da ekstrakti semenjače graška mogu pokrenuti i neki drugi put aktivacije ćelijske smrti kod LS174 ćelija koji je različit od onog apoptotskog posredovanog kaspazama.

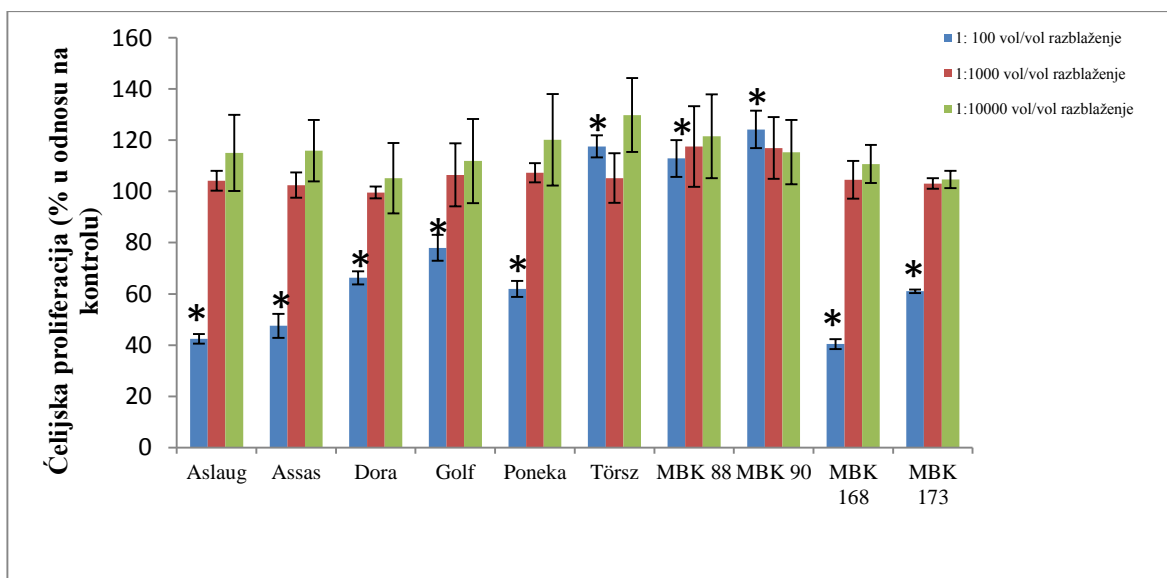


**Slika 45.** Efekti primene inhibitora kaspaze-3 na procenat LS174 ćelija koje se nalaze u subG1 fazi po tretmanu ekstraktima. (A) – ćelije tretirane ekstraktima, (B) – ćelije tretirane inhibitorom kaspaze-3, pre tretmana ekstraktima. C – kontrolna grupa ćelija, 1-ekstrakt semenjače genotopa Aslaug, 2-Assas, 3-Dora, 4-Golf, 5-Poneka, 9-MBK 168, 10-MBK 173. Primjenjene koncentracije odgovaraju dvostrukim  $IC_{50}$  vrednostima.

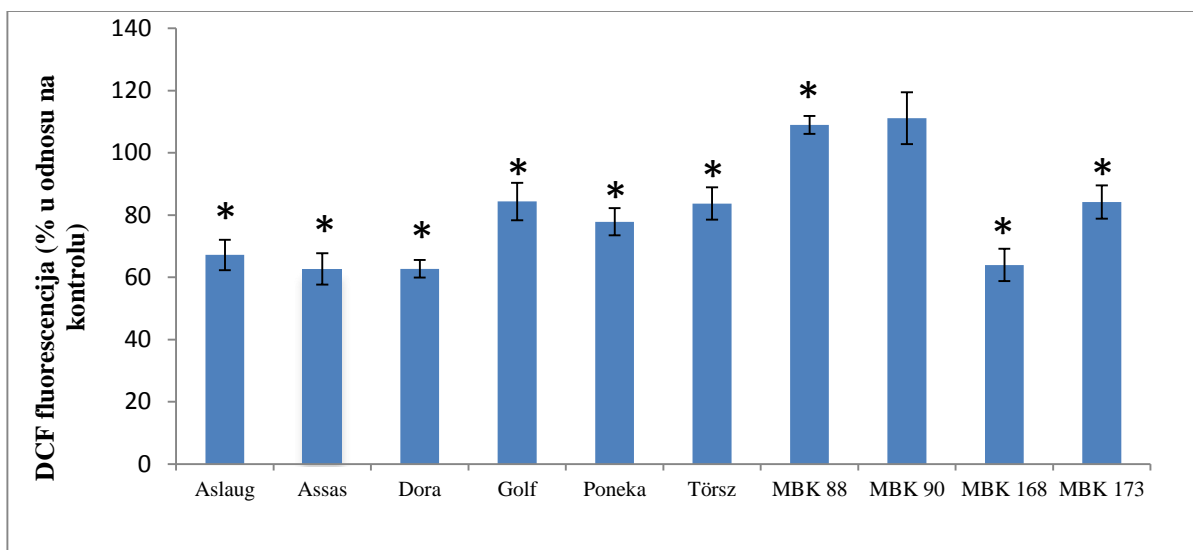
#### 4.11 Određivanje sposobnosti neutralizacije unutarćelijskih reaktivnih vrsta (IAA)

Dihydrodihlorohlorofluorescein diacetat ( $H_2DCFH-DA$ ) je fluorescentna boja koja se koristi kao indikator unutarćelijske produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) pošto ima sposobnost difuzije kroz ćelijsku membranu. Po ulasku u ćeliju ona biva hidrolizovana od strane ćelijskih esteraza i prelazi u nefluorescentnu naelektrisanu formu 2'7'-dihlorofluorescein, koji ne može napustiti ćelije sa intaktnim membranama. U prisustvu ROS, u prvom redu  $H_2O_2$  i  $O_2^{\bullet-}$ , ili unutarćelijskih oksidaza, ova forma se oksiduje prelazeći u 2'7'-dichlorofluorescein (DCF) koji fluorescira. Ova fluorescentna boja ima široku primenu u indirektnom određivanju unutarćelijske antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata, uzoraka hrane ili sintetičkih komponenata, gde se stepen IAA meri stepenom smanjenja fluorescencije koja se emituje iz ćelija. Pošto je utvrđeno da DCF fluorescencija zavisi od broja živih ćelija, pre procene efekata vodenih ekstrakata semenjače neophodno je bilo odrediti koncentraciju ekstrakata koja ima najmanje efekta na proliferaciju NT2-D1 ćelija koje su korišćene kao model sistem. U tu svrhu je sproveden MTT esej citotoksičnosti sa tri različita razblaženja ekstrakata 1: 100, 1:1000 i 1: 10000. Rezultati

MTT testa su prikazani na **Slici 46** sa koje se vidi da razblaženja 1: 1000 i 1: 10000 nisu imale statistički značajnog efekta na proliferaciju NT2-D1 ćelija. Razblaženje ekstrakta 1: 1000 je stoga odabrano za tretman ćelija pri proceni IAA. Rezultati određivanja IAA su pokazali da pretretman NT2-D1 ćelija u trajanju od 24h vodenim ekstraktima 8 od 10 ispitivanih genotipova doveo do smanjenja produkcije unutarćelijskih ROS. Ekstrakt genotipa MBK 90 nije ispoljio statistički značajan efekat dok je ekstrakt genotipa MBK 88 doveo do povećanja unutarćelijskih ROS (**Slika 47**).



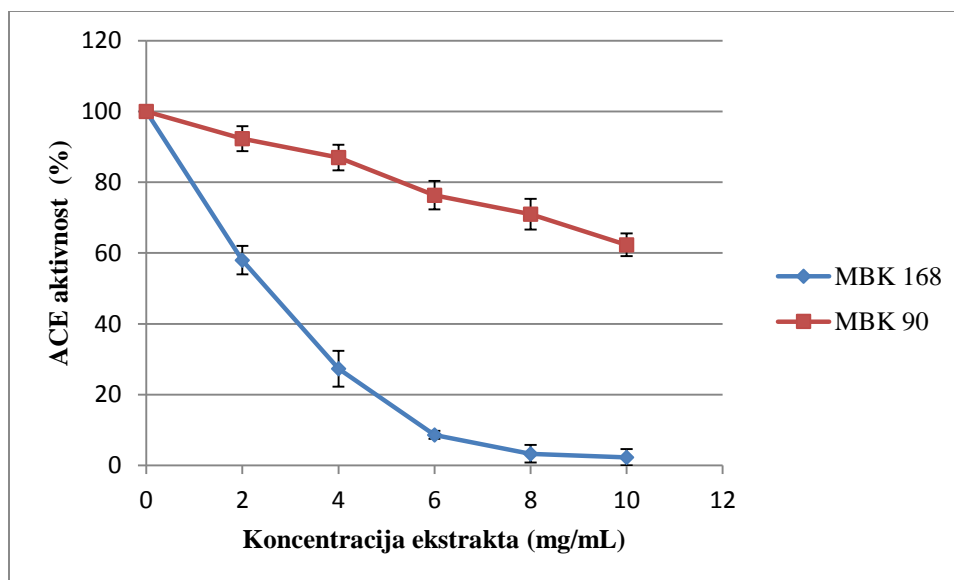
**Slika 46.** Uticaj razblaženja vodenih ekstrakata semenjača na proliferaciju NT-2 ćelija u kulturi mereno MTT testom. Vrednosti obeležene zvezdicom se statistički značajno razlikuju od kontrole,  $P < 0,05$  (T-test).



**Slika 47.** Uticaj pretretmana NT2-D1 ćelija u trajanju od 24 h netoksičnim razblaženjima vodenih ekstrakta semenjača (1:1000 vol/vol) na stvaranje unutarćelijskih ROS po tretmanu 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vrednosti obeležene zvezdicom se statistički značajno razlikuju od kontrole, P < 0,05 (T-test).

#### 4.12 Inhibicija angiotenzin konvertujućeg enzima

Određivanje sposobnosti inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima *in vitro* je vršeno za dva suva acetonska ekstrakta semenjača. Odabran je genotip MBK 90 kao predstavnik grupe genotipova sa bledo obojenom semenjačom koji se karakterisao najnižim prinosom ukupnih fenola, antocijanina i kondenzovanih tanina i genotip MBK 168 izrazito tamne semenjače koji je imao najviši zabeleženi sadržaj fenolnih jedinjenja. Rezultati ovog određivanja (**Slika 48**) ukazuju na znatno izraženiju sposobnost inhibicije kod tamno obojenog genotipa MBK 168 ( $IC_{50} = 3.3 \pm 0.08$  mg/mL) u poređenju sa ekstraktom semenjače MBK 90 kod kojeg je  $IC_{50}$  vrednost iznosila > 10 mg/mL.



**Slika 48.** Određivanje sposobnosti inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE). Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.

## 5. DISKUSIJA

Konzumni odnosno baštenski grašak (*Pisum sativum* L.) je namirnica bogata proteinima sa širokom zastupljenošću u ljudskoj ishrani, posebno u zemljama u razvoju. Počev od dvadesetih godina prošlog veka, selekcija i oplemenjavanje graška se sprovodi prevashodno u cilju poboljšanja agronomskih parametara poput prinosa, otpornosti na abiotički i biotički stres, povećanja sadržaja proteina i dr. Selekcija se vrši i u smeru redukcije antinutritivnih faktora kao što su inhibitori tripsina, fitati i tanini (Han and Baik, 2008). Kao neminovna posledica ovih procesa dolazi do značajnog gubitka genetičke varijabilnosti ove značajne biljne kulture (Baranger *et al.*, 2004; Pošvec and Griga, 2000). Sastav makronutrijenata graška kod priznatih i rasprostranjenih sorti je veoma dobro izučen (Duranti, 2006). Poslednjih godina povećano je interesovanje za proučavanje sekundarnih metabolita graška, u prvom redu polifenola, među koje spadaju i tanini, posebno nakon otkrića značajnih bioloških aktivnosti koje ova jedinjenja poseduju (Amarowicz and Pegg, 2008). Primetna je i aktuelizacija upotrebe ranije potisnutih kultivara sa tamno obojenim semenjačama kao potencijalne funkcionalne hrane i izučavanja njihovog hemijskog sastava (Troszynska and Ciska, 2002). Uprkos ovom obnovljenom interesovanju, studije koje se bave fenolnim jedinjenjima graška i njihovim biološkim aktivnostima su i dalje malobrojne i sporadične.

U našoj laboratoriji je grašak (*P. sativum*) uveden u upotrebu kao model sistem za ispitivanje odgovora na abiotički stres 2010. Uporedo je i počelo ispitivanje fenolnog sastava retkih genotipova graška sa tamno obojenim semenjačama i određivanje njihovih bioloških aktivnosti u cilju prepoznavanja genotipova koji se mogu koristiti kao funkcionalna hrana ili kao genski pul za kontrolisana ukrštanja u cilju postizanja pomenutih svojstava.

U humanoj ishrani mahunarke se najčešće koriste posle termičke obrade, te je sa tog aspekta značajno izučavati sastav i promene u sadržaju nutrijenata pri termičkom tretmanu, kao i sastav i promene u sastavu antinutrijenata i bioaktivnih jedinjenja, u koje spadaju i

fenoli. Na raznim mahunarkama, a između ostalog i na grašku, je sprovedeno više studija u kojima je ispitan efekat različitih načina termičke obrade na sadržaj fenolnih jedinjenja, pri čemu su često dobijani kontradiktorni rezultati (Han and Baik 2008; Nilsson *et al.*, 2008; Xu and Chang 2008a; Xu and Chang 2008b). U studiji koju su sproveli Xu i Chang (2008a) primećeno je da kuvanje semena dovodi do značajnih promena u količini ukupnih fenola u semenima više mahunarki, međutim promene su zavisile od tipa mahunarke i primenjenog tretmana. U pomenutoj studiji kuvanje zelenog graška na atmosferskom pritisku dovelo je do smanjenja sadržaja ukupnih fenola za 50-56%. Ovaj efekat je većinski pripisan difuziji rastvornih fenola u vodeni medijum korišćen prilikom termičke obrade. U istoj studiji je pokazano i da kuvanje na pari semena soje pod povišenim pritiskom dovodi do povećanja sadržaja ukupnih fenola za 35%. Značajno je istaći da je povećanje bilo pozitivno korelisano sa povećanjem primenjenog pritiska. Ovaj efekat se objašnjava činjenicom da pri spomenutom termičkom tretmanu mogu nastati tzv. Millard-ovi reakcioni produkti koji poseduju antioksidativnu aktivnost i mogu reagovati sa FC reagensom koji se koristi za određivanje ukupnih fenola, što je primećeno i u studijama na drugim biljnim vrstama (Manzocco *et al.*, 2001; Nicoli *et al.*, 1999). Drugo moguće objašnjenje je da termički tretman može dovesti do raskidanja glikozidne veze između šećera i flavonoida što može rezultovati povećanom reaktivnošću odgovarajućeg aglikona ka FC reagensu (Xu and Chang, 2008b.) U svakom slučaju, najveći broj pomenutih studija ukazuje da termički tretman uglavnom dovodi do smanjenja fenolnog sadržaja graška i umanjenja antioksidativne aktivnosti. Tumačenju ovih studija treba pristupiti sa velikom oprežnošću s obzirom na to da je u nekima od njih primenjena neadekvatna eksperimentalna metodologija, poput odbacivanja vode za kuvanje koja nedvosmisleno sadrži određenu količinu fenolnih materija kao što su to pokazali Xu i Chang (2008a), pogotovo imajući u vidu da se takva praksa pri termičkoj obradi u domaćinstvu retko primenjuje kada je u pitanju grašak.

Rezultati dobijeni na genotipovima P1, P2 i P3 prezentovani u ovoj tezi takođe nisu jednoznačni. Eksperimenti sprovedeni na tri pomenuta genotipa su izvedeni u uslovima gde nije moglo dolaziti do gubitka fenola odbacivanjem vode u kojoj su usitnjena semena



kuvana, pošto je celokupna količina vode i semena liofilizovana pre ekstrakcije organskim rastvaračem. U ovakvim uslovima termička obrada je uslovlila statistički značajno povećanje saržaja ukupnih fenola, i to prvenstveno kod tamnije pigmentisanih genotipova P2 i P3. Dobijeni rezultati ukazuju da je termički tretman uslovio prevođenje određene količine fenolnih jedinjenja iz vezanog i esterifikovanog u slobodni oblik, povećavajući njegovu rastvorljivost u metanolu koji je korišćen za ekstrakciju. Poznato je da se esterifikovani fenoli semenog omotača mogu osloboditi na nekoliko načina: kiselom hidrolizom, alkalnom lizom i, u manjoj meri, termičkim tretmanom koji uključuje primenu organskog rastvarača (Cuevas-Montilla *et al.*, 2011). Povećane vrednosti ukupnih fenola kod tamnijih genotipova mogu biti posledica razlaganja visokopolimerizovanih fenolnih komponenti kao što je lignin. On se formira polimerizacijom tri vrste monolignola: *p*-kumaril, sinapil i koniferil alkohola, i kovalentno se vezuje za celulozu u ćelijskom zidu (Shahidi and Naczka, 2004). Pokazano je da kuvanje pod pritiskom može dovesti do razgradnje lignoceluloze i depolimerizacije lignina (Fernandez-Bolanos *et al.*, 1998). Kao posledica ovog procesa sadržaj fenolnih komponenata rastvornih u vodi se može povećati (Castro *et al.*, 2008). Različitost dobijenih rezultata se može objasniti i sa ovog aspekta, naime termički tretman je kod tamnije pigmentisanih genotipova, za koje se generalno smatra da sadrže više kondenzovanih tanina, flavonoida i lignina (Troszynska and Ciska, 2002) uslovio povećanje TPC najverovatnije usled: povećanja rastvorljivosti određenih grupa kondenzovanih tanina, oslobađanja aglikona flavonoida i parcijalne depolimerizacije lignina, kao i oslobađanja drugih nespecifičnih reduktanata koji mogu reagovati sa FC reagensom poput Millard-ovih reakcionih produkata (Xu and Chang 2008a; Xu and Chang 2008b).

Primena *in vitro* gastrointestinalne digestije u kombinaciji sa termičkim tretmanom dovela je do statistički značajnog povećanja ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu kod sva tri ispitivana genotipa P1, P2 i P3. Najveći broj fenolnih jedinjenja hrane postoji u obliku glikozida ili polimera, sa izuzetkom flavan-3-ola, pri čemu najveći deo glikozida preživljava kiselu hidrolizu u želudcu (Manach *et al.*, 2004). Pošto neenzimska kisela hidroliza najverovatnije nije razlog povećanja ukupnih fenola usled deglikozilacije, ostaje

moгуćnost da su enzimski preparati, sa obzirom na činjenicu da su grubo prečišćeni (pepsin, pankreatin), mogli sadržati manje količine enzima glikozidaza poreklom od ćelija gastrointestinalne mukoze ili mikroorganizama, mada bi ovo u svakom slučaju predstavljalo samo manji doprinos (Scalbert and Williamson, 2000). Iako je opšteprihvaćeno da su monomerni flavan-3-oli stabilni u sredini želudca, pokazano je da se flavanolni oligomeri koji se sastoje od 2 do 10 monomera degraduju u kiseloj sredini želudca. (Spencer *et al.*, 2000). U pomenutoj studiji je pokazano da inkubacija proantocijanidina (kondenzovanih tanina) sa veštačkim želudačnim sokom u trajanju od 0,1 do 3h dovodi do njihovog razlaganja na epikatehinske monomere, dimerne ili druge oligomerne jedinice. Nasuprot pomenutoj studiji, dokazano je i da u *in vivo* uslovima (studija na pacijentima), ne dolazi do razlaganja oligomernih proantocijanidina (Rios *et al.*, 2002). U svakom slučaju hemijsko razlaganje proantocijanidina u blago kiseloj sredini jedobro okarakterisano, te iz toga sledi da, ako je pH vrednost u želudcu dovoljno niska, što zavisi od količine i kvaliteta unesenog hranljivog matriksa, zasigurno će doći do razlaganja proantocijanidina na manje flavanolne jedinice (Spencer, 2003). Osim ovoga je pokazano da fenolne kiseline, katehin , taninska kiselina i posebno proantocijanidini velike molekulske mase imaju sposobnost da se čvrsto vezuju za proteine u digestivnom traktu, te stoga pepsin i pankreatin mogu vršiti hidrolizu proteina i oslobađati jedan deo ovih jedinjenja iz kompleksa (Rawel *et al.*, 2002; Spencer, 2003; Tarko *et al.*, 2009). Postoji mali broj studija koje razmatraju uticaj *in vitro* digestije na fenolni sadržaj mahunarki. U prethodno sprovedenoj studiji (Bolling *et al.*, 2009) pokazano je da su vodeni ekstrakti soje podvrgnute gastrointestinalnoj digestiji pokazivali više vrednosti za TPC nasuprot ekstraktima pripremljenim upotrebom organskog rastvarača. U studiji koja razmatra uticaj *in vitro* digestije na sadržaj fenolnih jedinjenja u sojinom mleku (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013) pokazano je takođe da gastrična digestija dovodi do povećanja sadržaja ukupnih fenola za 35%, fenolnih kiselina za 70% i flavonoida za 33%, ukazujući da digestija u kiseloj sredini želudca pospešuje otpuštanje fenolnih jedinjenja iz matriksa. Vrednosti pomenutih parametara posle intestinalne faze digestije su bile nešto umanjene, ali i dalje više od inicijalnih vrednosti pre digestije. Ovi literaturni podaci su u saglasnosti sa

rezultatima dobijenim na našim genotipovima P1, P2 i P3 kod kojih je isključivo *in vitro* digestija dovela do povećanja koncentracije ukupnih fenola za 35% na jednom genotipu (P2), dok je u kombinaciji sa termičkim tretmanom ovaj porast, primećen kod sva tri genotipa, iznosio 82-248% u odnosu na ekstrakt netretiranih semena ekstrahovanih metanolom. U svakom slučaju ne treba zanemariti ni činjenicu da upotreba FC reagensa može dovesti do precenjivanja količine ukupnih fenola s obzirom da se fosfomolibdenski reagens može redukovati od strane askorbata, sumpor dioksida, jona  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  i aromatičnih amina (Roginsky and Lissi, 2005). Evidentno je da *in vitro* digestija brašna mahunarki dovodi do oslobađanja određene količine peptida (Pownall *et al.*, 2010). Pokazano je da pojedini peptidi male molekulske mase, naročito oni koji sadrže aromatične aminokiseline i rastvorljivi su u metanolu (Rastogi and Oaks, 1986), imaju sposobnost da interaguju sa fosfomolibdenskim reagensom, te u ovom slučaju mogu dovesti do precenjivanja količine ukupnih fenola.

Kada se razmatraju promene antioksidativnih aktivnosti koje se dešavaju pod uticajem termičkog tretmana i *in vitro* digestije tu je situacija još heterogenija. Mnogobrojne istraživačke grupe, koje su se bavile ovom problematikom izučavajući različite mahunarke, dolazile su do oprečnih rezultata. U studiji koju su sprovodili Xu i Chang (2008b) pokazano je da termički tretman ima različite i oprečne efekte na semena žute i crne soje. Semena crne soje su posle svakog vida termičkog tretmana pokazivala niži nivo antioksidativne aktivne aktivnosti merene sa tri standardna eseja (DPPH, FRAP i ORAC), dok su semena žute soje pokazivala sniženu antioksidativnu aktivnost posle kuvanja na atmosferskom pritisku, dok je kuvanje pod povišenim pritiskom, kuvanje na pari, kao i kuvanje na pari pod povišenim pritiskom dovelo do porasta antioksidativne aktivnosti. U slučaju genotipova graška P1, P2 i P3 razmatranih u ovoj tezi termički tretman je doveo do statistički značajnog povećanja sposobnosti uklanjanja DPPH radikala kod sva tri genotipa, što je i bilo očekivano imajući u vidu povišen sadržaj ukupnih fenola koji je zabeležen nakon tretmana. U studiji na kukuruzu je pokazano da kuvanje pod pritiskom na 115°C dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti za 44% (mereno DPPH esejem), uprkos smanjenju askorbata za 25% (Dewanto *et al.*, 2002). Ovo povećanje je bilo

objašnjeno činjenicom da je tretman doveo do povećanja ukupnih fenola za 54%, u prvom redu sadržaja ferulinske kiseline koji je bio povišen za čitavih 550%. U našem slučaju sama *in vitro* digestija je dovela do dodatnog povećanja antioksidativne aktivnosti merene DPPH esejem za 6-32% u metanolnim ekstraktima zavisno od genotipa. Pored toga u ovom slučaju je određivana i antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta skuvanih i *in vitro* digeriranih semena i analiza je pokazala vrednosti, koje su bile više od onih dobijenih prostom ekstrakcijom pomoću metanola, ali ujedno niže od vrednosti dobijenih na uzorcima koji su prošli kombinovani termički tretman i *in vitro* digestiju za kojom je sledila ekstrakcija metanolom. Ovo se može objasniti činjenicom da je efikasnost ekstrakcije fenola u ovakvom vodenom medijumu niža (Parejo *et al.*, 2002). Pored toga pokazano je i da visoko prisustvo proteina u uzorku, kakvim se vodeni ekstrakt odlikuje može inhibirati DPPH esej usled interakcije proteina sa DPPH reagensom i njegove posledične precipitacije (Bolling *et al.*, 2009). Prilikom određivanja sposobnosti uklanjanja hidroksilnog radikala primećena je ista zakonitost kao i u slučaju DPPH eseja, osim što vrednost određena na uzorcima koji su prošli kroz termički tretman, *in vitro* digestiju i ekstrakciju vodom, nije pokazivala statistički značajne razlike u odnosu na vrednosti izmerene u ekstraktima dobijenim prostom ekstrakcijom metanolom, čak je u slučaju genotipa P3 bila i niža. Uzrok za ovo su najverovatnije osobenosti primenjenog eseja koji može biti inhibiran u prisustvu proteina koji se nalaze u vodenom ekstraktu (Pownall *et al.*, 2010). U slučaju određivanja sposobnosti uklanjanja vodonik peroksida ponovio se isti obrazac za većinu uzoraka kao u prethodna dva eseja, ali sa bitnom razlikom što je u ovom slučaju apsolutno najveću sposobnost imao vodeni ekstrakt termički obrađenih i *in vitro* digeriranih semena. Slični rezultati su dobijeni u prethodnim studijama (Bolling *et al.*, 2009; Pownall *et al.*, 2010), gde je primećeno da se vodeni rastvori hidrolizovanih proteina mahunarki odlikuju visokim sposobnostima uklanjanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, najverovatnije usled značajnog prisustva peptida sa visokim afinitetom za vezivanje vodonik peroksida. Sa ciljem provere pomenutih tvrdnji u okviru ove teze je sprovedena izolacija proteina semena sva tri ispitivana genotipa P1, P2 i P3, pri čemu su polazne količine materijala za izolaciju bile identične polaznim količinama korišćenim za sve prethodne eksperimente, dok je proteinski

izolat prošao iste tretmane uključujući termičku obradu i *in vitro* digestiju. Ovako su dobijeni hidrolizati proteina semena koji donekle odražavaju proizvode koji se dobijaju tokom *in vitro* digestije semena s tim što su lišeni većine fenolnih komponenti. Ukupni hidrolizati i njihove frakcije MW < 10 kDa i MW < 3 kDa su analizirane u sva tri prethodno opisana eseja (DPPH, sposobnost uklanjanja OH•radikala i sposobnost uklanjanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dobijeni rezultati u sva tri eseja su pokazali da se ovi hidrolizati, a posebno njihove frakcije molekularne mase ispod 3kDa odlikuju antioksidativnim aktivnostima koje nisu zanemarljive. Pod pretpostavkom da je barem jedan deo ovih peptida rastvoran u metanolu, može se tvrditi da oni zajedno sa fenolnim jedinjenjima značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata, barem kada se radi o ekstraktima semena podvrgnutih *in vitro* digestiji, ali ove pretpostavke treba detaljno ispitati u daljim ogleđima.

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) u ekstraktima pripremljenim od semena graška ili određenih semenih delova je jedan od glavnih parametara koji ukazuje na potencijalnu antioksidativnu aktivnost koju ovi ekstrakti mogu ispoljiti. Određivanje TPC-a uključuje ekstrakciju samlevenih semena mešavinom organskih rastvarača, najčešće su kombinacije metanol-voda ili aceton-voda, sa dodatkom sirćetne ili hlorovodonične kiseline do 1%, nakon čega sledi reakcija sa Folin-Ciocalteu fenolnim reagensom u alkalnoj sredini, i spektrofotometrijska detekcija obojenog proizvoda. Rezultati se najčešće izražavaju količinama ekvivalenta standardne komponente (galna kiselina ili katehin) po jedinici suve mase semena ili suve mase ekstrakta. Poznato je da na prinos fenolnih jedinjenja pri ekstrakciji utiču tip rastvarača i stepen njegove polarnosti, pH vrednost na kojoj se vrši ekstrakcija, temperatura i vreme trajanja ekstrakcije, kao i hemijski sastav i fizičke karakteristike uzorka (Xu and Chang, 2007). Vrlo je malo literaturnih podataka koji porede efekte različitih rastvarača na prinos fenolnih jedinjenja u ekstraktima graška. U jedinoj takvoj studiji sprovedenoj na brašnu celog semena graška (Xu and Chang, 2007), poređen je efekat 50% acetona, 80% acetona, zakiseljenog 70% acetona, 70% metanola, 70% etanola i apsolutnog etanola, pri čemu su kao model korišćene dve sorte baštenskog graška SW Capri – žute semanjače i Cruiser – zelene semanjače, proizvodi firme Meridian Seeds

LLC (West Fargo, N. Dakota, USA.) koji se inače smatraju za sorte sa niskim sadržajem tanina, namenjene humanoj ishrani. Kod pomenutih sorti efekti rastvarača su se znatno razlikovali - 70% metanol je kod sorte zelenog graška davao najveći prinos ukupnih fenola dok je 80% aceton bio najefikasniji u ekstrakciji flavonoida i ubedljivo najefikasniji u ekstrakciji kondenzovanih tanina, dajući gotovo duplo veći prinos od drugih rastvarača. Kod sorte graška žute boje semena 50% aceton je dao najveći prinos ukupnih fenola dok je 80% aceton ponovo bio najefikasniji u ekstrakciji flavonoida i kondenzovanih tanina.

Rezultati dobijeni na semenjačama dva evropska genotipa ispitivana u okviru ove teze su pokazali da je 70% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom bio najefikasniji u ekstrakciji ukupnih fenola kod oba ispitivana genotipa, koja su se dijametralno razlikovala po pigmentisanosti semenjače: Aslaug – izrazito tamno pigmentisan genotip i MBK 90 – sa izrazito svetlom semenjačom. U slučaju tamnih genotipova ovo je i bilo očekivano sa obzirom na to da poseduju visok sadržaj flavonoida i kondenzovanih tanina, za koje je pokazano da se bolje ekstrahuju mešavinom acetona i vode (Dai and Mumper, 2010). Poznato je takođe da kombinacije organskih rastvarača sa organskim kiselinama primenjenim u niskim koncentracijama povoljno utiču na ekstrakciju antocijanina pošto pomažu denaturaciju ćelijskih membrana ujedno povećavajući njihovu rastvorljivost i stabilišu ih, pošto je poznato da se antocijanini na baznom pH parcijalno degraduju (Dai and Mumper, 2010). Blago kiseli uslovi takođe pogoduju oslobađanju hidrolizabilnih tanina (Bravo, 1998). U jedinoj do sada sprovedenoj studiji u kojoj je ispitivan efekat rastvarača na prinos fenolnih jedinjenja u ekstrakciji semenjača graška (Oomah *et al.*, 2011), koja se može porediti sa studijom sprovedenom u okviru ove teze, najbolji rezultati su dobijeni upotrebom zagrejane destilovane vode kao rastvarača, na temperaturi 70-80°C. Ovi ekstrakti su imali prinos ukupnih fenola koji je daleko premašivao one vrednosti dobijene upotrebom 70% acetona ili 80% etanola. Ovde se može povući paralela sa rezultatima dobijenim u okviru ove teze na genotipu Aslaug gde je prinos ukupnih fenola dobijen upotrebom destilovane vode uz zagrevanje na 100 °C bio približan prinosu koji je davao zakišeljani 70% aceton. Nasuprot ovome, vodeni ekstrakt semenjače blago pigmentisanog genotipa MBK 90 je imao tri puta niži prinos fenola pri upotrebi zagrejane destilovane vode

kao rastvarača u poređenju sa zakišljenim acetonom. Na osnovu priloženih rezultata dobijenih na dva „granična genotipa“ razmatranih u kontekstu stepena pigmentisanosti semenjače, može se zaključiti da je rastvarač 70% aceton sa 1% sirćetnom kiselinom pokazao najbolje rezultate u ekstrakciji ukupnih fenola, te je kao takav korišćen u daljim eksperimentima koji su podrazumevali identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja semenjača, kao i za određivanje sadržaja kondenzovanih tanina.

Rezultati dobijeni upotrebom pomenutog rastvarača na deset ispitivanih genotipova su potvrdili rezultate drugih istraživačkih grupa koji se tiču korelacija između intenzivne pigmentisanosti semenjače i visokog sadržaja ukupnih fenola sprovedenih na mnogobrojnim vrstama mahunarki (Troszynska and Ciska 2002; Xu and Chang 2007; Han and Baik 2008; Oomah et al. 2011). Poredeći rezultate dobijene u okviru ove teze sa dostupnim literaturnim podacima o sadržaju ukupnih fenola kod evropskih, severnoameričkih i kineskih varijetetima graška, prezentovanim u **Tabeli 12**, može se zaključiti da su vrednosti detektovane kod genotipova Aslaug (46,56 mg GAE/ g s.m.), MBK 168 (45,75 mg GAE/ g s.m.) i Assas ( 41,80mg GAE/ g s.m.) najveće do sada izmerene vrednosti za sadržaj ukupnih fenola u semenjačama nekog varijeteta graška. Ove vrednosti su bile bliske onima dobijenim na semenjačama kineskih varijeteta soje sa crnom semenjačom, koji se smatraju mahunarkama sa najvišim sadržajem fenolnih jedinjenja, a koji se kreće u opsegu od 0,512 pa do 60,58 mg GAE/ g s.m. (Zhang *et al.*, 2011).

**Tabela 12.** Pregled literaturnih podataka o zastupljenosti ukupnih fenola u semenima i semenim delovima prethodno ispitivanih genotipova graška (*Pisum sativum* L.) n.p. – vartijetet nepoznatog porekla, kv. – kultivar.

Uzorak	Ukupni fenoli	Jedinica	Referenca
Grašak zeleni n.p. (u svežem stanju)	183	mgGAE/100g s.m.	Duenas <i>et al.</i> , (2004)
Grašakzeleni kv. "Cruiser"	1.07-1.53	mgCAE/g	
Grašak ekstrakt n.p.	22.6	mgCAE/g ex.	Xu and Chang, (2007)
Grašak ekstrakt n.p.	3.48	gCAE/100g	
Brašno graška n.p.	5.76		
Propulse™-prot. izolat graška n.p.	2.84		
CentaraIII™-dijetna vlakna graška n.p.	0.56		
Centara IV™-dijetna vlakna graška n.p.	0.47	mM GAE/100g s.m.	
Uptake 80™-skrobno brašno graška n.p. sa dijetnim vlaknima	2.36		
Grašak kv. "Marych"	35.4		
Grašak kv. "Milwa"	28.3	mgCAE/100g s.m.	Klepacka <i>et al.</i> , (2011)
Grašak kv. "Wiato"	42.1		
Grašak kv. "Stratus"	1.22		
Grašak kv. "Goloden"	1.38	mgGAE/g s.m	
Ekstrakt semenjače graška kv. "Fidelia"	460	mgCAE/g ex.	Duenas <i>et al.</i> , (2004)
Grašak žuti n.p.	2.5		
Grašak kv. "Joel"	1.2	mg/g s.m.	Han <i>et al.</i> , (2008)
Semenjače žutog grašaka	2.6-9.1	gCAE/g s.m.	Oomah <i>et al.</i> , (2010)
Stočni grašak kv. "AC Tamor"	162		
Stočni grašak kv. "Spring D"	167		
Stočni grašak kv. "Fluo"	167		
Stočni grašak kv. "Celeste"	182		
Stočni grašak kv. "Montana"	193		
Stočni grašak kv. "Bohatyr"	191	mgCAE/ kg s.m.	Wang <i>et al.</i> , (1998)
Stočni grašak kv. "Carneval"	192		
Stočni grašak kv. "Titan"	193		
Stočni grašak kv. "Baroness"	201		
Stočni grašak kv. "Express"	280		
Stočni grašak kv. "Richmond"	325		



Dobijene rezultate za sadržaj solubilnih kondenzovanih tanina nije bilo jednostavno porediti usled veoma velikog broja različitih načina izražavanja sadržaja ovih jedinjenja, što se vidi iz **Tabele 13**. Kondenzovani tanini (proantocijanidini) se određuju najčešće metodama kao što su: vanillin/HCl metod, BSA (goveđi serum albumin) precipitacioni metod ili n-butanol/HCl metod, pa se stoga mogu izražavati u ekvivalentima katehina po jedinici mase ekstrakta ili suve mase upotrebljenog materijala ili u jedinicama apsorpcije na 500, 510 ili 550 nm, u zavisnosti od korišćenog metoda.

**Tabela 13.** Pregled literaturnih podataka o zastupljenosti kondenzovanih tanina u semenima i semenim delovima prethodno ispitivanih genotipova graška (*Pisum sativum* L.) n.p. – vartijetet nepoznatog porekla, kv. – kultivar.

Uzorak	Kondenzovani tanini	Jedinica	Referenca
Grašak zeleni Grašak zeleni kv. "Cruiser"	0.03-1.71	mgCAE/g	Xu and Chang, (2007)
Grašak žiti Grašak zeleni kv. "SW Capri"	0.00-1.52		
Ekstrakt zelenog graška n.p.	0.23	A <sub>550nm</sub> /g ex.	
Ekstrakt stočnog graška n.p.	0.072	A <sub>550nm</sub> /g ex.	
Više sorti stočnog graška	0.2-13	mg/g	
Semenjače graška kv. "Kwestor"	0.00	mgCAE/100g	Troszynska and Ciska, (2002)
Semenjače graška kv. "Fidelia"	1560		
Ekstrakt semenjače graška kv. "Fidelia"	204	A <sub>550nm</sub> /g ex.	
Grašak n.p. ekstrakt	71	A <sub>550nm</sub> /g ex.	Amarowicz <i>et al.</i> , (2003)
Grašak kv. "Stratus"	1.5-1.7 cca	mgCAE/g	Xu and Chang, (2009)
Grašak kv. "Goloden"	2.0-2.2 cca		

Dobijeni rezultati na semenjačama su donekle uporedivi sa studijom koju su sproveli Troszynska i saradnici (2002), gde je sadržaj kondenzovanih tanina semenjača graška izražen u jedinicama apsorbanije na 550 nm po gramu suvog ekstrakta sa vrednošću od 201  $A_{550\text{nm}}/\text{g}$  s.m. za semenjače kultivara "Fidelia" koji se odlikuje intenzivnom pigmentacijom. Ovaj rezultat je daleko viši od vrednosti dobijenih u okviru ove teze (0,305-3,140  $A_{500\text{nm}}/\text{g}$  s.m.), što je i razumljivo s obzirom da je u našem slučaju vrednost apsorbanije izražena po gramu suve materije polaznog materijala (semenjače) a ne po gramu ekstrakta kao u pomenutoj studiji. Više koncentracije kondenzovanih tanina zabeležene kod tamnijih genotipova se mogu dovesti u vezu sa rezistentnošću na presetvenu germinaciju semena (Harris and Burns, 1970). Tanini se takođe smatraju odgovornim za usporavanje rasta klijanaca zato što usporavaju brzinu razlaganja skroba i proteina, najverovatnije inaktivacijom hidrolitičkih enzima (Salunkhe *et al.*, 1982).

Pregledom literature je ustanovljeno da nema dostupnih podataka o sadržaju ukupnih antocijanina u semenima graška. Podaci koji su dobijeni u okviru ove teze pokazali su da svi od ispitivanih genotipova sadrže manje količine antocijanina u opsegu od 21,45 do 104,26  $\mu\text{g CAE}/\text{g}$  s.m. što ih čini minornim komponentama u poređenju sa sadržajem ukupnih fenola 2,78-45,75 mg GAE/g s.m. Ovakvi rezultati su i očekivani pošto antocijanini nisu grupa jedinjenja sa velikom rasprostranjenošću kod mahunarki. Izuzetak predstavljaju određeni varijeteti crne soje kod kojih se sadržaj monomernih antocijanina u semenjačama može dostići i vrednosti od preko 6 mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po gramu suve mase (Xu and Chang, 2008b).

Rezultati određivanja sposobnosti acetonskih ekstrakata za uklanjanje DPPH radikala su se kretali u opsegu od 0,54 - 8,04 mM TE/g s.m i veoma su dobro i statistički značajno korelirali sa sadržajem ukupnih fenola ( $R = 0,986$ ), dok je korelacija sadržaja ukupnih fenola i redukcione sposobnosti ekstrakata bila nešto niža ( $R = 0,859$ ), ali ipak statistički značajna. Ono što vredi istaći jeste da sposobnost helacije dvovalentnog gvožđa koja se uzima kao merilo indirektno antioksidativne aktivnosti nije bila korelisana ni sa jednim od određivanih parametara. Rezultati korelacione analize pojedinačnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnih aktivnosti (**Tabela 9**) pokazali su da sadržaj galne kiseline,

epigalokatehina, naringenina i apigenina statistički značajno ( $p < 0,05$ ) i pozitivno koreliraju sa rezultatima DPPH eseja i eseja redukcione sposobnosti, dok samo naringenin pokazuje statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa sposobnošću helacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona. Uprkos ovom rezultatu, vrlo je malo verovatno da je naringenin, koji je u semenjačama prisutan u veoma niskim koncentracijama ( $< 0,3 \text{ mg/kg}$ ), odgovoran za jake metal-helirajuće aktivnosti. U vise studija je postavljena hipoteza o značaju fenolnih jedinjenja kao helatora prelaznih metala, u prvom redu bakra i gvožđa koji putem Fentonove reakcije u živim sistemima mogu pokrenuti kaskade oksidacije bioloških molekula (Perron and Brumaghim, 2009; Kawabata *et al.*, 1996; Yoshino and Murakami, 1998). Rezultati dobijeni u okviru ove teze se mogu objasniti činjenicom da su u ekstraktima prisutna i druga jedinjenja poput fitata ili malih peptida koji se odlikuju visokom sposobnošću helacije metala i neravnomernom distribucijom među ispitivanim genotipovima koji u ovom slučaju kompetiraju sa polifenolima za vezivanje  $\text{Fe}^{2+}$  jona u pomenutom eseju. U prilog ovome idu u podaci novije studije (Abizari *et al.*, 2012), u kojima je potvrđeno da je biološka raspoloživost gvožđa u brašnu semena mletačkog graška (*Eng. Cowpea*), određena pre molarnim odnosom fitične kiseline i gvožđa nego molarnim odnosom polifenola i gvožđa, ukazujući tako na veći afinitet fitične kiseline za vezivanje gvožđa od polifenolnih jedinjenja.

Iako u svetu postoji na hiljade varijeteta graška i na stotine priznatih sorti sa širokom upotrebom u humanoj i animalnoj ishrani, je malo literaturnih podataka o sastavu fenolnih jedinjenja u semenima graška, do sada objavljeni podaci na tri evropska i dva severnoamerička kultivara su sumirani u **Tabeli 14**. U sudiji koju su sproveli Duénas i saradnici (2004) na dva evropska kultivara pokazane su velike razlike u sastavu kotiledona i semenjača graška. Dominantne komponente kotiledona su fenolne kiseline u prvom redu hidroksibenzoeve (oko 85-87% identifikovanih fenola), dok su glikozidi flavona i flavonola zastupljeni sa svega 3,5%. Sastav semanječe je značajno drugačiji: 30-50% čine glikozidi flavona i flavonola, 2-19% Flavan-3-oli 4-30% tetrahidroksi-dihidroalkoni i 16-32% hidroksibenzoeve kiseline.

**Tabela 14.** Pregled literaturnih podataka o pojedinačnim fenolnih jedinjenja u semenima i semenim delovima prethodno ispitivanih genotipova graška (*Pisum sativum* L.) n.p. – vartijetet nepoznatog porekla, kv. – kultivar

Uzorak	Jedinjenje	Referenca
Semenjače tamno obojenih graškova, kultivari "ZP-849" i "Fidelia"	Galna kiselina	Duenas <i>et al.</i> , (2004)
	Aldehyd galne kiseline	
	(+)-Galokatehin	
	Protokatehuinska kiselina	
	Prodelfinidin	
	<i>p</i> -Hidroksibenzoil-malonska kiselina	
	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	
	(-)- Epigalokatehin	
	Vanilinska kiselina	
	(+)-Katehin	
	<i>trans p</i> -Kumaroil-malonska kiselina	
	(-)-Epikatehin	
	<i>trans</i> Feruloil-malonska kiselina	
	<i>trans p</i> -kumarnska kiselina	
	<i>trans</i> ferulinska kiselina	
	Luteolin glikozid	
	Apigenin 8- <i>C</i> -glukozid	
	Apigenin glikozid	
	Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	
	Glikozid tetrahidriksi-dihidroalkona	
Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozid		
Luteolin glikozid		
Kotiledoni tamno obojenih graškova, kultivari "ZP-849" i "Fidelia"	Glikozid protokatehuinske kiseline	
	Protokatehuinska kiselina	
	<i>p</i> -Hidroksi benzoeva kiselina	
	(-)-Epigalokatehin	
	Vanilinska kiselina	
	<i>trans p</i> -Kumaroil-malonska kiselina	
	Siringinska kiselina	
	<i>trans p</i> -Kumarinska kiselina	
	<i>trans</i> -Ferulinska kiselina	
	Kamferol-3-arabinozid-7-ramnozid	
	Kvercetin -3- <i>O</i> -galaktozid	
	Glikozid tetrahidriksi-dihidroalkona	

Uzorak	Jedinjenje	Referenca
Ekstrakt grašaka varijeteta “Esla”	Protokatehinska kiselina <i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina <i>p</i> -Hidroksibenzoev aldehid <i>trans p</i> -Kumaroil-malonska kiselina <i>trans p</i> -kumarinska kiselina <i>cis p</i> -kumarinska kiselina <i>trans</i> Feruloil-malonska kiselina <i>trans</i> Ferulinska kiselina	
Grašak zeleni, kv. “Stratus”	Galna kiselina	Xu and Chang , (2009)
Grašak žuti, kv. “Goloden”	Protokatehinska kiselina 2,3,4 Trihidroksi benzoeva kiselina Protokatehuil aldehid <i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina Hlorogena kiselina <i>p</i> -Kumarinska kiselina <i>o</i> -Kumarinska kiselina Siringaldehid <i>m</i> -kumarinska kiselina Ferulinska kiselina Sinapinska kiselina Gentizinska kiselina Vanilin Kofeinska kiselina Siringinska kiselina <i>trans</i> Cinaminska kiselina (+)-Katehin Kamferol-3-glukozid Miricetin	

Ovom prilikom je primećeno da se najveće razlike u fenolnom sastavu među kultivarima uočavaju na semenjačama koje su inače bogatije flavonoidima i taninima, dok su generalno kotoledoni bili bogatiji prostim fenolima, u prvom redu fenolnim kiselinama. Nešto drugačiji rezultati su prezentovani u studiji koju su sprovedi Xu i Chang (2009) na severnoameričkim kultivarima žutog i zelenog graška. U navedenoj studiji korišćeni su ekstrakti celih semena za koje je pokazano da sadrže značajno manje flavonoida, dok im je sadržaj fenolnih kiselina približan po sastavu i količinama onom dobijenom na evropskim kultivarima. Razlog ovome može biti to što su u ovoj studiji korišćeni genotipovi sa

odsustvom tamno pigmentisane semenjače kakvom se odlikuju dva ispitivana evropska kultivara u pređašnjoj studiji (Duénas *et al.*, 2004).

U prilog ovome ide i više istraživanja koja su pokazala pozitivne korelacije između tamne pigmentacije semenjače i visokog sadržaja flavonoida i tanina (Troszynska and Ciska, 2002; Xu and Chang, 2009; Kumar *et al.*, 2010)

U studiji sastava pojedinačnih fenola na deset evropskih varijeteta analiziranih u ovoj tezi identifikovano je i kvantifikovano 25 fenolnih jedinjenja, od čega je devet jedinjenja prvi put okarakterisano u semenima graška. Prvi put je detektovano prisustvo čitave klase fenolnih jedinjenja, flavanona, koji su inače jedni od bitnih konstituenata citrusnog voća. Detektovani su glavni predstavnici ove grupe hrizin, hesperetin, naringenin i naringin (naringenin-7-*O*- neohesperidozid) koji se inače nalazi u grejpfrotu i odlikuje se izuzetno izraženom gorčinom. Uprkos svom niskom prisustvu (<1 mg/kg) ova jedinjenja mogu biti, pored taninskih materija, nosioci gorkog ukusa koji je izražen pogotovo kod tamnijih genotipova. Pored flavanona detektovana su i dva nova flavanola: katehin galat sa količinama < 0,5 mg/kg kod svih genotipova i galokatehin galat u količinama 4,16-17,74 mg/kg, pri čemu nije bilo očiglednih korelacija između boje semena i sadržaja ove dve komponente.

Prvi put je zabeleženo i prisustvo dva nova flavanola morina i galangina, pri čemu je galangin relativno slabo zastupljen kod svih genotipova sa izuzetno ravnomernom distribucijom 0,72-0,75 mg/kg. Morin je pak heterogenije raspoređen među genotipovima (0,76 – 35,33 mg/kg), pri čemu je primećeno da je upravo on najzastupljenija fenolna komponenta kod genotipova sa najbleđim semenjačama (Golf, Törsz, MBK88 i MBK90). Jedina fenolna kiselina koja dosad nije identifikovana kod graška bila je ruzmarinska kiselina koja je detektovana u 9 od 10 ispitivanih genotipova, ali u veoma niskim količinama (0,12 – 0,29 mg/kg).

Analiza glavnih komponenata (PCA) je pokazala da se na osnovu sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja kao i antioksidativnih aktivnosti ekstrakata ispitivani genotipovi mogu svrstati u dve glavne grupacije. Prvu grupu čine genotipovi: Golf, Törsz i MBK 88 a u drugoj grupi se nalaze genotipovi Aslaug, Assas, Dora, Poneka, MBK 168 i

MBK 173, dok je genotip MBK 90 bio van grupa. Ono što je važno istaći je da raspodela genotipova po grupama odgovara raspodeli genotipova prema boji semena što je lako uočljivo na **Slici 42A**. Kao glavni faktori koji uslovljavaju odvajanje grupe genotipova sa slabo pigmentisanom semenjačom (Golf, Törsz i MBK 88) identifikovani su: epikatehin, *p*-Hidroksibenzoeva kiselina, kamferol i hesperetin. Sa druge strane, koncentracije epigalokatehina i galne kiseline, zajedno sa TPC i antioksidativnim aktivnostima su najviše doprinele izdvajanju intenzivno pigmentisanih genotipova (Alsang, Assas, Dora, Poneka, MBK 168, i MBK 173). Genotip MBK 90 koji se odlikovao najnižim stepenom pigmentacije je izdvojen van pomenutih grupa na osnovu visokog sadržaja *p*-kumarinske, ferulinske, ružmarinske kiseline, i najnižeg sadržaja kofeinske kiseline i luteolina kao i ukupnih fenola, antioksidativnih i metal-helirajućih aktivnosti.

Fenolna jedinjenja izolovana iz biljaka se smatraju snažnim antioksidantima, što je pokazano u mnogobrojnim *in vitro* studijama (Duenas *et al.*, 2004; Halliwell *et al.*, 2005; Huxley and Neil, 2003), te je pomenuta aktivnost van svake sumnje barem kada se radi o ogledima sprovedenim na bezćelijskim sistemima. Situacija je nešto složenija kada se radi o živim sistemima, bilo da su to ćelije u kulturi ili animalni modeli, o čemu svedoči intenzivna polemika u naučnoj zajednici koja se vodi oko sistemskog antioksidativnog efekta fenolnih jedinjenja, koja je detaljno obrazložena u uvodnom delu ove teze (Halliwell, 2012). Jedne od osnovnih pretpostavki negacije postojanja sistemskog antioksidativnog efekta leže u činjenici da najveći broj fenolnih jedinjenja koji se može naći u cirkulaciji u nepromenjenom obliku, tj. u obliku u kome se nalazi u biljci, u sistemskoj cirkulaciji ne prelazi koncentracije od 1  $\mu\text{mol/L}$ , što nije dovoljno da bi obavljali neutralizaciju reaktivnih vrsta *in situ* (Crozier *et al.*, 2009). Uprkos tome, postoji više studija u kojima je pokazano da primena biljnih ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima može dovesti do umanjenja oksidativnog stresa u ćelijskim linijama ili animalnim modelima koji su bili izloženi najčešće hemijskim jedinjenjima ili zračenju kao izazivačima oksidativnog stresa (Huxley and Neil, 2003). Ovo je direktno ukazivalo na činjenicu da se sistemski antioksidativni efekat postiže mehanizmom različitim od proste interakcije fenolnih jedinjenja sa slobodnim radikalima i drugim reaktivnim vrstama koje ovaj stres izazivaju. Podaci o

antioksidativnom efektu ekstrakata mahunarki na živim sistemima gotovo da ne postoje. U jedinjoj za sada objavljenoj studiji koju su sproveli Xu i Chang (2009) na ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma želuca pokazano je da pretretman ekstraktima graška u trajanju od 1h, pre primene vodonik peroksida, umanjuje stvaranje intracelularnih reaktivnih vrsta kiseonika na dozno zavistan način. Za razliku od pomenute studije, u ovoj tezi je ispitivan efekat dugoročnijeg pretretmana (24 h) NT-2 D1 ćelijske linije vodenim ekstraktima semenjača graška u cilju sagledavanja njihovog potencijalnog efekta na stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika po naknadnom tretmanu ćelija vodonik peroksidom. U postavljanju i realizaciji ovog oglada bile su potrebne određene mere predostrožnosti, s obzirom na to da boja koja se koristi za detekciju reaktivnih vrsta ( $H_2DCFH-DA$ ) ima sposobnost da se oksiduje od strane hema i njemu sličnih proteina kao i od citohroma *c*, tako da u slučaju apoptoze indukovane u ćelijskoj liniji fluorescentni signal bi predstavljao pre odraz oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija i drugih oksidanata nego reaktivnih kiseoničnih vrsta (Burkitt and Wardman, 2001). Takođe je pokazano i da je DCF fluorescencija zavisna od broja živih ćelija pošto je za formiranje oksidaciji podložnog produkta DCFH neophodno dejstvo esterze intaktnih ćelija (Brubacher and Bols, 2001). Iz pomenutih razloga je prvo bilo neophodno odabrati razblaženja ekstrakata koja neće dovesti do intenzivne proliferacije ćelija niti će ispoljavati snažan citotoksični efekat. Odabrano razblaženje vodenih ekstrakata 1: 1000 (vol/vol) je dovelo do redukcije stvaranja unutarćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika za 20-40% kod osam od deset ispitivanih genotipova. Dva genotipa koja nisu pokazala ovaj efekat (MBK 88 i MBK 90) spadaju u grupu genotipova koji se odlikuju veoma niskim sadržajem ukupnih fenola i kondenzovanih tanina. Činjenica da je tretman ćelija ekstraktima bio vremenski razdvojen od same inicijacije stresa egzogenom promenom  $H_2O_2$  posle 24 h i da su ćelije pre toga više puta isprane od medijuma koji je sadržao ekstrakt, ukazuje na to da se protektivni efekat ekstrakata najverovatnije ne zasniva na direktnom uklanjanju reaktivnih vrsta kiseonika već na mobilisanju antioksidativnih mehanizama ćelija putem regulacije genske ekspresije ili interakcijom sa ćelijskim signalnim putevima, kako je to pretpostavljeno u prethodnim studijama (Naasani *et al.*, 2003; Wiseman *et al.*, 2001; Rosenkranz *et al.*, 2002; Levites *et*



al., 2002; Actis-Goretta *et al.*, 2003). Ono što je evidentno u ovom slučaju je da je protektivni efekat ekstrakata koji se ogleda u smanjenoj produkciji unutarćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika, pozitivno korelisan sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, pošto je u slučaju ispitivanih ekstrakata izostao kod onih koji su se odlikovali najnižim sadržajem ukupnih fenola. Vodeni ekstrakti ovih genotipova su sadržali i najmanje flavonoida. Poznato je da flavonoidi ispoljavaju ksenobiotički efekat, što je zabeleženo kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* studijama. I pored toga, fiziološki smisao ovakvih efekata je i dalje nejasan, mada je pokazano da brza oksidacija fenolnih komponenata u ćelijskom medijumu dovodi do nastanka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kinonskih/semikinonskih formi fenola, koji su najverovatnije odgovorni za citotoksične efekte (Halliwell *et al.*, 2005). U studiji koju su sprovedli Matsuo i saradnici (2005) pokazan je citotoksični efekat apigenina, kamferola, luteolina, naringenina, kvercetina i rutina na kulturi normalnih humanih embrionalnih fibroblasta pluća (TIG1) i humanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene (HUVEC), pri čemu su se koncentracije pomenutih jedinjenja koje su redukovale preživljavanje ćelija za 50% iznosile od 40 do > 300 μM. U istoj studiji je sugerisano da flavonoidi ispoljavaju svoj citotoksični efekat preko povećanja stvaranja unutarćelijskih ROS molekula, što je i pokazano upotrebom upotrebom iste fluorescentne boje (H<sub>2</sub>DCFH-DA) kao i u našim eksperimentima. Međutim za razliku od naših eksperimenata gde koncentracije ni najzastupljenijih jedinjenja u vodenim ekstraktima nisu prelazile koncentracije od 1 μM, ovde su ćelije bile izložene daleko višim koncentracijama fenolnih jedinjenja, te poređenje sa ovom studijom nije moguće.

Jedna od bioloških aktivnosti biljnih ekstrakata od izuzetnog značaja je i antitumorska aktivnost. Pronalaženje efikasnih antitumorskih supstanci, koje dejstvom na onkogene signalne puteve mogu sprečavati rast i progresiju malignih tumora, uz postojanje selektivnosti prema malignim ćelijama je svakako jedan od bitnih ciljeva savremene onkologije. Fenolna jedinjenja biljaka su posebno interesantna kao potencijalni antitumorski agensi koji bi mogli da sekoriste u prevenciji i terapiji malignih bolesti, zbog svojih potvrđenih antioksidativnih, antiproliferativnih i proapoptotskih efekata. Pregledom literature je utvrđeno da pojedini kultivari i sorte graška, posebno onih sa tamnim

semenjačama i visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, mogu poslužiti kao jeftin i lako dostupan izvor fenolnih jedinjenja sa antitumorskim delovanjem, s obzirom na široku rasprostranjenost i visoku zastupljenost u poljoprivredi mnogih zemalja (Amarowicz and Pegg, 2008). Postoji manji broj studija u kojima su dokumentovane antitumorske aktivnosti ekstrakata celih semena graška i njihovih semenih delova (Xu and Chang, 2009; Sumner and Dixon, 2003), pri čemu ne postoje studije koje se bave mehanizmima antikancerske aktivnosti ovih mahunarki. Međutim postoji određeni broj studija antioksidativnog kapaciteta izolata fenolnih jedinjenja graška i određivanja njihovog kvalitativnog sastava koje ukazuju da bi varijeteti ove vrste mogli da predstavljaju bitan izvor jedinjenja sa antitumorskim dejstvom (Duenas *et al.*, 2004; Xu and Chang, 2009; Troszynska and Ciska, 2002).

U okviru ove doktorske teze predstavljeni su rezultati do sada najsvеobuhvatnijeg određivanja antitumorskih dejstava vodenih ekstrakata deset retkih evropskih genotipova graška (*Pisum sativum* L.) sa različito obojenim semenjačama, čiji je hemijski sastav fenolnih jedinjenja prethodno detaljno okarakterisan. Pored toga izloženi su i rezultati početnih eksperimenata usmerenih u cilju razjašnjavanja mehanizama antitumorskog delovanja pomenutih ekstrakata.

Većina analiziranih ekstrakata je pokazala dobru citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke MDA-MB-453, adenokarcinoma kolona LS174, hronične mijeloidne leukemije K562 i karcinoma pluća A549. Iako nije primećena značajna selektivnost u antitumorskom dejstvu, od značaja je da se istakne da su ekstrakti pokazali slabiji intenzitet citotoksičnog dejstva prema normalnoj MRC-5 ćelijskoj liniji. Ekstrakti semenjača genotipova Aslaug, Assas, Dora, Poneka, Golf, MBK 168 i MBK 173 su pokazali citotoksične efekte zavisne od koncentracije na svim ispitivanim ćelijskim linijama. Značajno je istaći da su K562 ćelije mijeloidne leukemije bile najosetljivije na citotoksično dejstvo većine ekstrakata. Ubedljivo najjače citotoksične aktivnosti su zabeležene za ekstrakte dva ispitivana genotipa: MBK 168 i Aslaug, koji su se ujedno odlikovali najvišim sadržajem ukupnih fenola, kondenzovanih tanina i najvišim

antioksidativnim aktivnostima. Dok genotipovi sa najnižim sadržajem ukupnih fenola i tanina nisu pokazivali citotoksične efekte čak ni na primenjenim koncentracijama ekstrakata do 10%, što je i bilo očekivano imajući u vidu da je pozitivna korelacija između visokog sadržaja fenola i citotoksične aktivnosti odavno poznata i dokumentovana na mnogim drugim biljnim ekstraktima (Dai and Mumper, 2010; Zhang *et al.*, 2008; Seeram *et al.*, 2006). Ista grupa ekstrakata bogatih fenolima je pokazala citotoksične aktivnosti i na ćelijskoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-453, adenokarcinoma kolona LS174, i karcinoma pluća A549, ali su te aktivnosti bile 2-3 puta niže u poređenju sa aktivnostima pokazanim na K562 liniji i selektivnost im je bila nešto niža. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnom studijom koju su sproveli Xu and Chang (2009), gde je pokazano da acetonski ekstrakti zelenog i žutog graška ispoljavaju dozno zavisnu citotoksičnu aktivnost na ćelijskim linijama adenokarcinoma želuca (AGS), kolorektalnog adenokarcinoma (SW480) i karcinoma prostate (DU145). Korelaciona analiza sprovedena u cilju ispitivanja uticaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja na citotoksičnu aktivnost pokazala je da sadržaj epigalokatehina statistički značajno korelira sa  $IC_{50}$  vrednostima u slučaju MDA-MB-453, LS174 i K562 ćelijskih linija. Epigalokatehin je ujedno i najzastupljenije fenolno jedinjenje kod genotipova sa tamno obojenom semenjačom: Aslaug, Assas, Dora, Golf, Poneka, MBK 168 i MBK 173. Epigalokatehin je, uz epigalokatehin galat, jedan od glavnih flavonoida zelenog čaja čije su citotoksične i antioksidativne aktivnosti veoma dobro dokumentovane (Weisburg *et al.*, 2004). Sadržaj luteolina je takođe pokazivao značajne korelacije sa intenzitetom citotoksičnih aktivnosti na LS174 i K562 ćelijama. Inhibicija ćelijske proliferacije A549 ćelija u kulturi luteolinom je već dokumentovana ranije (Cai *et al.*, 2011). Pokazano je da luteolin značajno inhibira rast A549 ćelija na vremenski zavistan i koncentraciono zavistan način sa  $IC_{50}$  koncentracijama u opsegu od 35,2 – 68,1  $\mu$ M u zavisnosti od trajanja tretmana. U istoj studiji je pokazano da tretman luteolinom dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2 fazi, praćenu inhibicijom ekspresije ciklina A, kao i fosforilacijom CDC2 (ciklin zavisne kinaze 2). U navedenoj studiji primećeno je i da dolazi do fosforilacije JNK 1,2 i 3 koja može indukovati apoptozu preko translokacije Bax proteina u mitohondrije i aktivacije kaspaze-9 za koju je takođe

utvrđena povišena ekspresija po tretmanu luteolinom. Takođe je bila primećena i povišena ekspresija kaspaze-3. U našim eksperimentima postojala je korelacija između koncentracije luteolina u ekstraktima i citotoksične aktivnosti na A549, ali ona nije bila statistički značajna, dok je statistički značajna korelacija dobijena u slučaju LS174 i K562 ćelijske linije. Uprkos nedostatku statistički značajnih korelacija između koncentracija drugih fenolnih jedinjenja u ekstraktu i citotoksičnih aktivnosti ne može se isključiti potencijalna uloga ovih jedinjenja kao citotoksičnih agenasa koji deluju sinergistički, s obzirom da su ove aktivnosti ranije dokumentovane za skoro svaku od pojedinačnih fenolnih komponenata identifikovanih u našim uzorcima (Matsuo *et al.*, 2005; Spilioti *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2012).

Uzimajući u obzir da su mehanizmi citotoksičnog dejstva ekstrakata većine mahunarki, a pogotovo graška u potpunosti nepoznati (Xu and Chang, 2009), preduzeti su eksperimenti sa najaktivnijim vodenim ekstraktima semenjača u cilju uočavanja promena u distribuciji ćelija po određenim fazama ćelijskog ciklusa. Kao model su korišćene K562 i LS174 maligne ćelijske linije. Eksperimenti su pokazali da su svi ispitivani ekstrakti indukovali povećanje broja K562 ćelija koje su se nalazile u subG1 fazi ćelijskog ciklusa oko tri puta u odnosu na netretirane kontrole, dok je to povećanje bilo još izraženije kod LS174 ćelija (4-5 puta), što je ukazivalo na ćelijsku smrt po tipu apoptoze. U kasnim stadijumima apoptotske kaskade endonukleaze seku veze između nukleozoma i fragmentišu DNK dajući veći broj oligomera približne dužine oko 180 bp koji se akumuliraju u ćeliji. Ako se ovakve ćelije fiksiraju u etanolu a posle toga rehidratišu, jedan deo ovih oligomera napušta ćeliju snižavajući količinu DNK u ćeliji. Ove ćelije se na histogramu protočne citofluorimetrije uočavaju kao “hipodiploidni” ili subG1 pik, što omogućava da se na ovaj način odredi procenat apoptotskih ćelija (Gong *et al.*, 1994). Međutim, prilikom interpretacije podataka sa DNK histograma, treba imati u vidu da ćelije u nekrozi, takođe mogu biti distribuirane u okviru subG1 pika na histogramu (Ormerod 2000). Stoga je neophodno dodatno rasvetliti tip ćelijske smrti koju indukuju testirani agensi. U cilju potvrde proapoptotskih aktivnosti odabranih ekstrakata, testirana je njihova sposobnost da indukuju ćelijsku smrt u kulturi ćelija adenokarcinoma kolona LS174 u prisustvu

specifičnog ireverzibilnog inhibitora efektorske kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK). Značajno smanjenje procenta ćelija u subG1 fazi je primećeno za sve ekstrakte u eksperimentu gde je korišćen i inhibitor kaspaze-3, ali nije bilo povratka na nivo kontrole, što ukazuje da ekstrakti semenjače graška mogu pokrenuti i neki drugi put aktivacije ćelijske smrti kod LS174 ćelija, koji je različit od onog apoptotskog posredovanog kaspazama. Iako je ranije pokazano da pojedini flavonoidi kao što su galangin, luteolin, hrizin i kvercetin pokreću apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaze-3 i 8 ali ne i kaspaze-9, pokazana je i značajna uloga kalpaina pored kaspaza u apoptozi u ćelijskoj liniji U937 indukovanoj fizetinom, apigeninom i 3,7-dihidroksiflavonom (Monasterio *et al.*, 2004). Nasuprot ovim rezultatima u jednoj od retkih studija (Kook *et al.*, 2007) na ćelijama humanog osteosarkoma pokazano je da flavonoidi mogu pokrenuti apoptozu nezavisnu od aktivacije kaspaza u kojoj dolazi do mitohondrijalnog stresa indukovano p53 proteinom koji dovodi do oslobađanja citohroma c u citoplazmi jedarne translokacije AIF (eng. *Apoptosis-Inducing Factor*) i endonukleaze G.

Određivanje sposobnosti inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima *in vitro* je ukazalo na znatno izraženiju sposobnost inhibicije ACE kod tamno obojenog genotipa MBK 168 ( $IC_{50} = 3,3 \pm 0,08$  mg/mL) u poređenju sa ekstraktom semenjače MBK 90 kod kojeg je  $IC_{50}$  vrednost iznosila  $> 10$  mg/mL. Ovakve aktivnosti ekstrakata su bile i očekivane s obzirom da je ranije potvrđena sposobnost pojedinih flavan-3-ola i procijanidina da inhibiraju angiotenzin konvertujući enzim (Actis-Gioretta *et al.*, 2003). U prethodnoj studiji koju su takođe sprovedli Actis-Gioretta i saradnici (2006) demonstrirane su i značajne sposobnosti hrane bogate flavonoidima za inhibiciju ACE *in vitro*. Uzevši u obzir ove činjenice može se pretpostaviti da je visok sadržaj flavonoida i tanina u ekstraktima semenjača genotipa MBK 168 uslovio njegovu značajnu ACE inhibirajuću aktivnost. U jedinoj za sada objavljenoj studiji koja razmatra ACE inhibitorne aktivnosti fenola graška (Agboola *et al.*, 2010) pokazano je da suvi ekstrakt semena celog graška, proteinskog izolata ili izolata njegovih vlakana, primenjen u koncentraciji od 10 mg/mL ispoljava ACE inhibitorne aktivnosti u opsegu od 0-65%, pri čemu su najviše aktivnosti zabeležene kod ekstrakta celog semena, dok ekstrakti proteinskih izolata nisu pokazivali

inhibitorne aktivnosti. Pomenute vrednosti su u svakom smislu poredive sa našim rezultatima, pošto je korišćena ista metodologija. Može se zaključiti da su ACE inhibitorne aktivnosti MBK 168 genotipa, više 2-3 puta od ACE inhibitornih aktivnosti prikazanih u pomenutoj studiji. U svakom slučaju dobijene IC<sub>50</sub> koncentracije je vrlo teško postići u sistemskoj cirkulaciji, s obzirom da na to koncentracije fenolnih jedinjenja unetih hranom u serumu retko prelaze koncentracije od 1 μmol/L, tako da je potencijal primene fenolnih jedinjenja graška kao terapijskih agenasa za lečenje hipertenzije putem inhibicije ACE veoma mali.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Termički tretman semena graška (kuvanje na atmosferskom pritisku 45 min, i temperaturi od 100°C) kombinovan sa ekstrakcijom metanolom dovodi do statistički značajnog povećanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktu u poređenju sa ekstraktima dobijenim ekstrakcijom metanolom bez prethodne termičke obrade. Ovaj efekat je primećen kod dva (P2 i P3) od tri ispitivana genotipa.
2. Ekstrakti dobijeni primenom termičke obrade pokazivali su: povećanu sposobnost uklanjanja DPPH radikala u slučaju svih ispitivanih genotipova, povećanu sposobnost uklanjanja hidroksilnog radikala kod jednog ispitivanog genotipa (P2) i povećanu sposobnost uklanjanja vodonik peroksida kod dva ispitivana genotips (P2 i P3) u poređenju sa ekstraktima dobijenim ekstrakcijom metanolom bez prethodne termičke obrade.
3. Termičkim tretmanom kombinovanim sa *in vitro* digestijom za kojim je sledila ekstrakcija semena apsolutnim metanolom dobijeni su ekstrakti koji su se odlikovali povećanim sadržajem ukupnih fenola, sposobnošću uklanjanja DPPH radikala kao i povećanom sposobnošću uklanjanja hidroksilnog radikala i vodonik peroksida kod svih ispitivanih genotipova u poređenju sa ekstraktima dobijenim ekstrakcijom metanolom bez prethodnog tretmana.
4. Vodeni ekstrakti semena, koja su bila prethodno termički obrađena i podvrgnuta *in vitro* digestiji, su pokazivali izraženije sposobnosti ukljanjanja DPPH radikala od metanolnih ekstrakata netretiranih semena, a niže vrednosti od metanolnih ekstrakata termički obrađenih i *in vitro* digeriranih semena. Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida od strane ovih ekstrakata je bila najveća u odnosu na sve ostale ispitivane ekstrakte.
5. Hidrolizati dobijeni nakon termičkog tretmana i *in vitro* digestije proteinskog izolata semena, a posebno njihove frakcije molekulske mase ispod 10 kDa, pokazivali su značajne sposobnosti uklanjanja DPPH radikala, hidroksilnog radikala kao i vodonik peroksida.

6. Kombinacija rastvarača koja se sastoji od 70% acetona, 1% sirćetne kiseline i 29% destilovane vode pokazala se kao kao najefikasnije sredstvo za ekstrakciju ukupnih fenola iz semenjača graška, kako izrazito pigmentisanih tako i blago pigmentisanih semena.
7. Sadržaj ukupnih fenola detektovan kod genotipova Assas, MBK 168 i Aslaug koji se kretao u opsegu od 41,8-46,6 mg GAE po gramu suve mase semenjače, je najviši do sada zabeležen kod nekog genotipa graška i po vrednostima je blizak sadržaju ukupnih fenola u crnim varijetetima soje (*Glycine max*).
8. U acetonskim ekstraktima semenjača je detektovano i kvantifikovano 25 fenolnih jedinjenja od kojih je devet jedinjenja prvi put okarakterisano u semenima graška. Prvi put je detektovano prisustvo čitave klase fenolnih jedinjenja, flavanona: hrizina, hesperetina, naringenina i naringina, koji mogu biti, pored taninskih materija, nosioci gorkog ukusa koji je izražen pogotovo kod tamnijih genotipova. Detektovana su i dva nova flavanola (katehin galat i galokatehin galat), dva flavonola (morin i galangin) i jedna nova fenolna kiselina (ruzmarinska kiselina).
9. Sadržaj galne kiseline, epigalokatehina, naringenina i apigenina je statistički značajno ( $P < 0,05$ ) i pozitivno korelisao sa rezultatima DPPH eseja i eseja redukcionne sposobnosti, dok je samo naringenin pokazivao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa sposobnošću helacije  $Fe^{2+}$  jona.
10. Grupa genotipova sa izrazito pigmentisanom semenjačom (Assas, MBK 168, MBK 173, Aslaug, Dora i Poneka) se u analizi glavnih komponenti na osnovu sastava pojedinačnih fenolnih jedinjenja i *in vitro* antioksidativnih aktivnosti ekstrakata jasno razdvojila od grupe genotipova sa blaže pigmentisanim semenjačama koju čine genotipovi Golf, Törsz i MBK 88, dok se genotip sa najslabije pigmentisanom semenjačom MBK 90 našao van ovih grupa.
11. Vodeni ekstrakti semenjača osam od deset ispitivanih genotipova u kojima su koncentracije najzastupljenijih fenolnih komponenti bile ispod  $1\mu M$  su ispoljavale protektivni efekat na ćelije NT2-D1 u kulturi umanjujući stvaranje unutarćelijskih ROS izazvano egzogenom primenom vodonik peroksida.



12. Ekstrakti semenjača genotipova Aslaug, Assas, Dora, Poneka, Golf, MBK 168 i MBK 173 su pokazali citotoksične efekte zavisne od koncentracije na svim ispitivanim ćelijskim linijama (humanog karcinoma dojke MDA-MB-453, adenokarcinoma kolona LS174, hronične mijeloidne leukemije K562 i karcinoma pluća A549). Iako nije primećena značajna selektivnost u antitumorskom dejstvu, od značaja je da se istakne da su ekstrakti pokazali slabiji intenzitet citotoksičnog dejstva prema normalnoj MRC-5 ćelijskoj liniji.
13. Korelaciona analiza sprovedena u cilju ispitivanja uticaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja na citotoksičnu aktivnost pokazala je da sadržaj epigalokatehina statistički značajno korelira sa  $IC_{50}$  vrednostima u slučaju MDA-MB-453, LS174 i K562 ćelijskih linija.
14. Vodeni ekstrakti semenjača genotipova Aslaug, Assas, Dora, Poneka, Golf, MBK 168 i MBK 173 indukuju povećanje broja K562 ćelija koje su se nalazile u subG1 fazi ćelijskog ciklusa oko tri puta u odnosu na netretirane kontrole, dok je to povećanje bilo još izraženije kod LS174 ćelija (4-5 puta), što je ukazivalo na ćelijsku smrt po tipu apoptoze.
15. Značajno smanjenje procenta ćelija u subG1 fazi je primećeno za sve ekstrakte u eksperimentu gde je korišćen i inhibitor kaspaze-3, ali nije bilo povratka na nivo kontrole, što ukazuje da ekstrakti semenjače graška mogu pokrenuti i neki drugi put aktivacije ćelijske smrti kod LS174 ćelija, koji je različit od onog apoptotskog posredovanog kaspazama.
16. Određivanje sposobnosti inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) *in vitro* je ukazalo na znatno izraženiju sposobnost inhibicije kod tamno obojenog genotipa MBK 168 ( $IC_{50} = 3,3 \pm 0,08$  mg/mL ) u poređenju sa ekstraktom semenjače MBK 90 kod kojeg je  $IC_{50}$  vrednost iznosila  $> 10$  mg/mL. Dobijene  $IC_{50}$  koncentracije je vrlo teško postići u sistemske cirkulaciji, s obzirom da na to koncentracije fenolnih jedinjenja unetih hranom u serumu retko prelaze koncentracije od 1  $\mu$ mol/L, tako da je potencijal primene fenolnih jedinjenja graška kao terapijskih agenasa za lečenje hipertenzije putem inhibicije ACE veoma mali.

## 7. LITERATURA

1. Abdel-Aal ESM and Hucl, P (1999) A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry* 76: 350-354
2. Abizari AR, Moretti D, Schuth S, Zimmermann MB, Armar-Klemesu M, Brouwer ID (2012) Phytic acid-to-iron molar ratio rather than polyphenol concentration determines iron bioavailability in whole-cowpea meal among young women. *Journal of Nutrition* 142:1950-1955.
3. Actis-Gioiretta L, Ottavini JI, Keen CL, Fraga CG (2003) Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Letters* 555: 597-600.
4. Actis-Gioiretta L, Ottavini JI, Fraga CG (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 229-234.
5. Agboola S, Mofolasayo O, Wats B, Aluko R (2010) Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed flours and the in vitro bioactive properties of their polyphenols. *Food Research International* 43: 582-588
6. Amarowicz R and Pegg, RB (2008) Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110: 865-878.
7. Amarowicz R and Raab, B (1997) Antioxidative activity of leguminous seed extracts evaluated by chemiluminescence methods. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung* 52c: 709-712.
8. Amarowicz R and Troszynska, A (2003) Antioxidant activity of extract of pea and its fractions of low molecular phenolics and tannins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 12/53 SI 1: 10-15
9. Amarowicz R, Troszynska A, Barylko-Pikielna N, Shahidi F (2004) Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total

- phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids* 11:278-286.
10. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS (1999) Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 464S-474S.
  11. Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Fogh J (1984) Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory Investigation* 50: 147-162.
  12. Andrews, PW (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APIMS* 106: 158-167.
  13. Baranger A, Aubert G, Arnau G, Laine AL, Deniot G, Potier J, Weinachter C, Lejeune-Henaut I, Lallemand J, Burstin J (2004) Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1309-1321.
  14. Baublis A, Decker EA, Clydesdale FM (2000) Antioxidant effects of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry* 68:1-6.
  15. Bernhoft, A (2008) Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13 – 14 November 2008.
  16. Bolland JL and Have, PT (1947) Kinetic studies in chemistry of rubber and related materials. V. The inhibitory effect of phenolic compounds on the thermal oxidation of ethyl linoleate. *Discussions of the Faraday Society* 252-260.
  17. Bolling BW, Blumberg JB, Chen CO (2009) Extraction methods determine the antioxidant capacity and induction of quinone reductase by soy products *in vitro*. *Food Chemistry* 116: 351-355.
  18. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutritional Reviews* 56: 317-333.

19. Broadhurst RB and Jones, WT (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of Science of Food and Agriculture* 29: 788-794.
20. Burkitt MJ and Wardman P (2001) Cytochrome C is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 282:329-33
21. Cai X, Ye T, Liu C, Lu W, Lu M, Zhang J, Wang M, Cao P (2011) Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicology in Vitro* 25: 1385–1391
22. Cardador-Martinez A, Loacra-Pina G, Oomah BD (2002) Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6975–6980.
23. Casagrande F and Darbon, JM (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin100 dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology* 61:1205-1215.
24. Castro E, Conde E, Moure A, Falque E, Cara C, Ruiz E, Dominguez H (2008) Antioxidant activity of liquors from steam explosion of *Olea europea* wood. *Wood Science and Technology* 42:579–592
25. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ (2001) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *International Journal of Oncology* 19:837-844
26. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26: 1001-43
27. Cuevas Montilla E, Hillebrand S, Antezana A, Winterhalter P (2011) Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 7068-7074.
28. Cushman DW and Cheung, HS. (1971) Spectrophotometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20: 1637-1648.

29. Dahl WJ, Foster LM, Tyler RT (2012) Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.) British Journal of Nutrition 108, S3-S10.
30. Dai J and Mumper, RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15, 7313-7352.
31. Depraetere V and Golstein, P (1998) Dismantling in cell death: molecular mechanisms and relationship to caspase activation. Scandinavian Journal of Immunology 47: 523-531
32. Dewanto V, Wu X, Liu RH (2002) Processed sweet corn has higher antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 4959-4964.
33. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X (2006) Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. Journal of Biological Chemistry 281, 17359-17368.
34. Doll R and Peto, R (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Journal of the National Cancer Institute 66: 1191-1308.
35. Doré C and Varoquaux, F (2006) In: Cirad, C (ed.) Historie et amelioration de in quante plantes cultivées Inra, France, pp 840.
36. Dueñas M, Hernández T, Estrella I (2004) Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.) European Food Research and Technology 219: 116-123.
37. Dueñas M, Hernández T, Estrella I (2006) Assessment of *in vitro* antioxidant capacity of the seed coat and cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. Food Chemistry 98: 95-103
38. Dueñas M, Hernández T, Estrella, I (2002) Phenolic composition of the cotyledon and seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). European Food Research and Technology 215: 478-483.
39. Duranti M, (2006) Grain legume proteins and nutraceutical properties. Fitoterapia 77: 67-82.

40. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68: 383-424
41. El S and Karakaya, S (2004) Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 55: 67-74
42. Fernandez-Bolanos J, Felizon B, Brenes M, Guillen R, Heredia A (1998) Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 1643–1649.
43. Food and Agriculture Organization (FAO) FAOSTAT.[http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)
44. Foti MC, (2007) Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 1673-1685
45. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW Thornberry NA (1999) Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differentiation* 6: 362-369
46. Girard-Lalancette K, Pichette A, Legault J (2009). Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry* 115:720-726
47. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry* 218: 314-319.
48. Halliwell B, (2000) The antioxidant paradox. *Lancet* 355: 1179-1180.
49. Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford
50. Halliwell B, Rafter J, Jenner A (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 268S-276S.

51. Halliwell B, Zhao K, Whiteman ML (2001) The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radical Research* 33: 819-830.
52. Halliwell B. (2002) Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biology and Medicine* 32: 968-974.
53. Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476: 107-112
54. Halliwell, B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* 70: 257-265
55. Han H, Baik BK (2008) Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food science and Technology* 43: 1971-1978.
56. Handelman GJ, Cao G, Walter MF, Nightingale ZD, Paul GL, Prior RL, Blumberg JB (1999) Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of lowdensity lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4888-4893.
57. Harborne JB and Simmonds, NW (1964) *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, pp 101.
58. Harris HB and Burns, RE (1970) Influence of tannin content on preharvest seed germination in sorghum. *Agronomy Journal* 62: 835-836
59. Hertog MGL and Hollman, PCH (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 63-71
60. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993). Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart diseases: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007–1011.
61. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH (2001). Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology* 335: 190-203.

62. Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Häkkinen S, Albanes D, Virtamo J (2001) Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 12: 62-67.
63. Huxley RR and Neil HAW (2003) The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition* 57: 904-908.
64. Innocentini MDM, Barizan WS, Alves MNO, Pisani Junior R. (2009) Pneumatic separation of hulls and meats from cracked soybeans. *Food and Bioproducts Processing* 87: 237-246.
65. Jaganath B, Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006) The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man *Free Radical Research* 40: 1035-1046.
66. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, Yang JL, Lin CH, Lin JJ, Wu Suen LJ, Wood WG, Chung JG Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion dependent pathways *in vitro* and suppresses lung xenograft tumor growth *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7596-7604.
67. Julken-Titto, R (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 213-217.
68. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Current Biology* 8: 1001-1008
69. Kawabata T, Schepkin V, Haramaki N, Phadke RS, Packer L (1996). Iron coordination by catechol derivative antioxidants. *Biochemical Pharmacology* 51: 1569-1577
70. Khanbabaee K and Van Ree, T (2001) Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports* 18: 641-649.
71. Kook SH, Son YO, Chung SW, Lee SA, Kim JG, Jeon YM, Lee JC. (2007) Caspase-independent death of human osteosarcoma cells by flavonoids is driven by



- p53-mediated mitochondrial stress and nuclear translocation of AIF and endonuclease G. *Apoptosis*. 2: 1289-1298
72. Kresty LA, Frankel WL, Hammond CD, Baird ME, Mele JM, Stoner GD, Fromkes JJ (2006) Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized black raspberries: interim results show berries modulate markers of oxidative stress in Barrett's esophagus patients. *Nutrition and Cancer* 54: 148-156
73. Kristinova Vera (2008) Evaluation of Antioxidant Effect Using Different Analytical Methods. Diploma thesis, Brno University of Technology.
74. Kumar V, Rani A, Kumar Dixit A, Pratap D, Bhatnaga D (2010) A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. *Food Research International* 43: 323-328
75. Lala G, Malik M, Zhao C, He J, Kwon Y, Giusti MM, Magnuson BA (2006) Anthocyanin rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutrition and Cancer* 54: 84-93
76. Levites Y, Amit T, Youdim MBH, Mandel S (2002) Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *Journal Biological Chemistry* 277: 30574-30580.
77. Liu JB, Chang SKC, Wiesenborn D. (2005) Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2333-2340.
78. Los M, Wesselborg S, Schulze OK (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10: 629-639
79. Madhujith T and Shahidi, F (2005) Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* 70: S85-S90.
80. Malumbres M and Barbacid, M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9: 153-166

81. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.
82. Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lericci CR (2001) Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology* 11: 340-346.
83. Matić I, Ajančić IS, Vajs VE, Jadranin MB, Gligorijević NN, Milosavljević SM, Juranić ZD (2013). Cancer-suppressive potential of extracts of endemic plant *Helichrysum zivojinii*: Effects on cell migration, invasion and angiogenesis. *Natural Product Communications* 8: 1291-1296.
84. Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T (2005) Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 253-259.
85. McCann MJ, Gill CI, O'Brien G, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR (2007) Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1224-1230.
86. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X (2010). Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharmaceutical Research* 27: 950-961.
87. Miller HE, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A, Kanter M (2000) Whole-grain products and antioxidants. *Cereal Foods World* 45: 59-63.
88. Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, López-Moratalla N, Martínez-Irujo JJ (2004) Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutrition and Cancer* 50: 90-100.
89. Mosmann, T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
90. Mullen W, Archeveque MA, Edwards CA, Matsumoto H, Crozier A (2008) Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: Impact of a full-fat yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11157–11164.

91. Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006) Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition* 96:107-116
92. Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T, Yong Feng W, Johnston J, Chan K, Tsuruo T (2003) Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research* 63: 824-830.
93. Nagata, S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365
94. NC Bols and Brubacher, JL (2001) Chemically de-acetylated 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *Journal of Immunological Methods* 251: 81-91
95. Nicholson, DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 6: 1028-1042
96. Nicoli MC, Anese M, Parpinel M (1999) Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 10: 94-100.
97. Nilsson J, Stegmark R, Akesson B (2004) Total antioxidant capacity in different pea (*Pisum sativum*) varieties after blanching and freezing. *Food Chemistry* 86: 501-507.
98. Ohno M and Abe, T (1991) Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods* 145: 199-203.
99. Onyeneho SN and Hettiarachchy, HS (1992) Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40: 1496-1500.
100. Oomah BD, Caspar F, Malcolmson LJ, Bellido A-S (2011) Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International* 44: 436-441.

101. Ormerod, MG (2000) Analysis of DNA—general methods, In: Flow Cytometry, Ormerod, MG (ed.), Oxford University Press, New York, pp 83–98.
102. Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C (2002) Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6882-6890.
103. Perron NR and Brumaghim, JL (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics* 53: 75-100
104. Petković B, Marin P, Boža P (1995) *Praktikum iz sistematike viših biljaka*. Nauka. Beograd.
105. Pošvec Z and Griga, M (2000) Utilisation of isozymes polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 113:251-258
106. Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE (2010) Amino acid composition and antioxidant properties of pea seeds (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4712-4718.
107. Prior RL, Hoang H, Gu LW, Wu XL, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang DJ, Ou BX, Jacob R (2003) Assay for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51: 3273-3279.
108. Ramos, S. (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research* 52: 507-526.
109. Rastogi V and Oaks A (1986) Hydrolysis of storage proteins in barley endosperms. *Plant Physiology* 81: 901-906.
110. Rawel HM, Czajka D, Rohn S, Kroll J (2002) Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins *International Journal of Biological Macromolecules* 30: 137-150.

111. Ribéreau-Gayon, P (1972) Plant Phenolics. In: Hegwood, VH (Ed) Plant Phenolics, university review in botany. Oliver and Boyd, Edinburgh, pp. 254
112. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 1106-1110.
113. Robbins, RJ (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2866-2887.
114. Rocha LD, Monteiro MC, Anderson JT (2012) Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids -A Review. *Cancer and Clinical Oncology* 1:109-121.
115. Rodríguez-Roque MJ, Rojas-Graü MA, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O (2013) Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 136: 206-212.
116. Roginsky V and Lissi EA (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235–254.
117. Rosenkranz S, Knirel D, Dietrich H, Flesch M, Erdmann E, Böhm M (2002) Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the “French paradox”. *FASEB Journal* 16: 1958-1960
118. Ruch RJ, Cheng SJ, Klauning JE (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechines isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10: 1003-1008
119. Ryan P and Hynes, MJ (2007) The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron (III). *Journal of Inorganic Biochemistry* 101: 585-593
120. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401: 168-173
121. Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99

122. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80.
123. Salunkhe DK, Jadhav SK, Kadam SS, Chavan JK (1982) Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 17: 277-305.
124. Sarkar FH and Li, Y (2002) Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer and Metastasis Reviews* 21: 265-280.
125. Sathya A and Siddhuraju, P (2013) Effect of indigenous processing methods on phenolics and antioxidant potential of underutilized legumes *Acacia auriculiformis* and *Parkia roxburghii*. *Journal of Food Quality* 36: 98-112.
126. Scalbert A and Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073S-2085S.
127. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9329-9339.
128. Sesso HD, Gaziano M, Buring JE, Hennekens CH (1999) Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *American Journal of Epidemiology* 149: 162-167.
129. Shahidi F and Naczk, M (2004) Biosynthesis, classification, and nomenclature of phenolics in food and nutraceuticals. In: *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, Shahidi F, Naczk M (eds.) CRC Press, Boca Raton, FL p 10.
130. Singleton VL and Rossi, JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
131. Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srani SK, Debnam E, Rice-Evans C (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical Biophysical Research Communications* 272: 236-241.

132. Spencer, JP (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition* 133: 3255S-3261S.
133. Spilioti E, Jaakkola M, Tolonen T, Lipponen M, Virtanen V, Chinou I, Kassi E, Karabournioti S, Moutsatsou P (2014) Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic and Anticancer Potential of Honeys Derived from Various Regions in Greece. *PLoS ONE* 9: 94860.
134. Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Eisenbrand G, Janzowski C (2008) Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 17: 3372-3380.
135. Stalmach A, Troufflard S, Serafini M, Crozier A (2009) Absorption, metabolism and excretion of Choladi green tea flavan-3-ols by humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53: S44-S53
136. Stanisavljević NS, Ilić M, Jovanović Ž, Čupić T, Dabić DČ, Natić MM, Tešić ŽLj, Radović SS (2015) Identification of seed coat phenolic compounds from differently colored pea varieties and characterization of their antioxidant activity. *Archives of Biological Sciences* DOI:10.2298/ABS141204042S
137. Sumner LW and Dixon, RA (2003) Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131: 878-885.
138. Sun T and Ho, CT (2005) Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90: 743-749.
139. Swain T and Bate-Smith, EC (1962) Flavonoid compounds, in: *Comparative Biochemistry Vol. III.*, M. Florkin and H. S. Mason (eds.), Academic Press, New York, NY, pp 755-809.
140. Tada H, Shibo O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K (1986) An improved colorimetric assay for interleukin-2. *Journal of Immunological Methods* 93: 157-165.

141. Takahata Y, Ohnishi-Kameyama M, Furuta S, Takahashi M, Suda I (2001) Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5843-5847.
142. Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Michalik J (2009) Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technology and Biotechnology* 47: 456-463.
143. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Kixit VM (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.
144. Thornberry NA and Lazebnik, Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316
145. Troszynska A and Ciska, E (2002) Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. *Czech Journal of Food Science* 20: 15-22.
146. Troszynska A, Estrella I, Lopez-Amores ML, Hernandez T (2002) Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) seed coat acetone extract. *LWT Food Science and Technology* 35: 158-164
147. Vermerris W and Nicholson, R (2006) Families of phenolic compounds and means of classification. In: Vermerris W and Nicholson, R (eds.) *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, USA pp 1-34.
148. Wang N & Daun JK (2004) The Chemical Composition and Nutritive Value of Canadian Pulses. *Canadian Grain Commission Report* 19-29.
149. Weisburg JH, Weissman DB, Sedaghat T, Babich H (2004) *In vitro* Cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 95: 191-200.
150. Wiseman S, Mulder T, Rietveld A (2001) Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathway *in vitro*. *Antioxidants and Redox Signaling* 3:1009-1021.



151. Wu XL, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4026-4037.
152. Xu B and Chang, S (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* 72, S159-S166.
153. Xu B and Chang, S (2009) Phytochemical profiles and health-promoting effects of cool-season food legumes as influenced by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10718-10731.
154. Xu B and Chang, SKC (2008a) Effect of soaking, boiling and steaming on total phenolic content and antioxidant of cool season food legumes. *Food Chemistry* 110: 1-13
155. Xu B and Chang, SKC (2008b) Total phenolics, phenolic acids, isoflavones and antocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7165-7175.
156. Xu H, Xu Y, Zhang W, Shen L, Yang L, Xu Z (2011) Aquaporin-3 positively regulates matrix metalloproteinases via PI3K/AKT signal pathway in human gastric carcinoma SGC7901 cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 30: 86-91
157. Yao Y, Cheng X, Wang L, Wang S, Ren G (2011) Biological potential of sixteen legumes in China. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 7048-7058.
158. Yoshino M and Murakami, K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Analytical Biochemistry* 257: 40-44.
159. Yu LL, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M (2002) Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1619-1624.

160. Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D (2008) Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 670-675.
161. Zhang RF, Zhang FX, Zhang MW, Wei ZC, Yang CY, Tang XJ, Deng YY, Chi JW (2011) Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5935-5944
162. Zhou KQ and Yu, LL (2004) Antioxidant properties of bran extracts from Trego wheat grown at different locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1112-1117.
163. Zi X, Feyes DK, Agarwal R. (1998) 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. *Clinical Cancer Research* 4: 1055-64.
164. Zielinski H and Kozłowska, H (2000) Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2008-2016.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани Немања Станисављевић

број индекса M3010/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка  
(*Pisum sativum* L.)”

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.07.2015



Nemanja Stanišević

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Немања Станисављевић

Број индекса M3010/2010

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада “Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)”

Ментори др Светлана Радовић и др Живко Јовановић

Потписани Немања Станисављевић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 24.07.2015



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

“Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)”

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.07.2015



## BIOGRAFIJA

Nemanja Stanisavljević je rođen 05.10.1986. god. U Beogradu, gde je završio srednju medicinsku školu, na smeru farmaceutski tehničar. Studije Molekularne biologije i fiziologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je 2005., a diplomirao je 2010 godine sa prosečnom ocenom 9,30. Od 2011. Zaposlen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Učestvovao je na jednom nacionalnom i jednom bilateralnom projektu. Član je društva biljnih fiziologa Srbije, Federation of European Societies of Plant Biology, Legume Society, Srpskog biohemijskog društva i Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju.

Do sada je objavio 15 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima i 18 kongresnih saopštenja. Od toga iz doktorske disertacije ima objavljena dva rada:

1. **Stanisavljević, N.**, Jovanović, Ž., Čupić, T., Lukić, J., Miljuš-Đukić, J., Radović, S., Mikić, A. (2013): Extractability of antioxidants from legume seed flour after cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion in comparison with methanolic extraction of the unprocessed flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 48:2096-2104.
2. **Stanisavljević, N.**, Ilić, M., Jovanović, Ž., Čupić, T., Dabić, D., Natić, M., Tešić, Ž., Radović, S. (2015) Identification of seed coat phenolic compounds from differently colored pea varieties and characterization of their antioxidant activity. *Archives of Biological Sciences* doi:10.2298/ABS141204042S