



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Марина З. Радовић Јаковљевић

**ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНИХ И ЦИТОТОКСИЧНИХ
ЕФЕКТА ВРСТА *ARTEMISIA VULGARIS* И *ARTEMISIA
ALBA* НА ХУМАНЕ ЛИМФОЦИТЕ *IN VITRO* И SW-480
ЋЕЛИЈСКУ ЛИНИЈУ КАРЦИНОМА КОЛОНА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Marina Z. Radović Jakovljević

**INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC AND CYTOTOXIC
EFFECTS OF *ARTEMISIA VULGARIS* AND *ARTEMISIA
ALBA* SPECIES ON HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO* AND
SW-480 COLON CANCER CELL LINE**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

Аутор	
Име и презиме: Марина З. Радовић Јаковљевић	
Датум и место рођења: 11.03.1988. године, Аранђеловац, Србија	
Садашње запослење: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, звање: истраживач-сарадник	
Докторска дисертација	
Наслов: Испитивање генотоксичних и цитотоксичних ефеката врста <i>Artemisia vulgaris</i> и <i>Artemisia alba</i> на хумане лимфоците <i>in vitro</i> и SW-480 ћелијску линију карцинома колона	
Број страница: 132	
Број слика: 23	
Број библиографских података: 285	
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Биологија, ужа научна област Генетика и еволуција (575. 1: 615)	
Ментор: др Оливера Милошевић Ђорђевић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу	
Оцена и одбрана	
Датум пријаве теме: 25.05.2016. године, ННВ Природно-математичког факултета, бр. одлуке 550/XI-1	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: Веће за природно-математичке науке, IV-01-435/6; 15.06.2016. године	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу 2. др Дарко Грујичић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу 3. др Снежана Марковић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу 4. др Гордана Јоксић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду 	
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. др Гордана Јоксић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду 2. др Дарко Грујичић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу 3. Др Милан Станковић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу 	
Датум одбране дисертације:	

Посвећено

Родитељима и деци

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација рађена је у Институту за биологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу (део је пројекта који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат: III41010)) под менторским руководством др Оливере Милошевић-Ђорђевић, редовног професора, која је предложила тему за овај рад. Искрено се захваљујем ментору на позиву да постанем део њене истраживачке групе, на указаном поверењу и безусловној подршци, помоћи и корисним саветима током писања свих радова, а напослетку и ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем научном саветнику др Гордани Јоксић на указаном поверењу, корисним сугестијама и саветима приликом писања ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем професору др Дарку Грујичићу на стручној помоћи и несебичној подршци, конструктивним саветима и посвећености током целокупног научно-истраживачког рада.

*Захвалност дугујем и професору др Милану Станковићу на несебичној помоћи, сакупљању биљног материјала, као и за уступљене фотографије врста рода *Artemisia* са теренских истраживања.*

Захваљујем се колегиници доценту др Милени Милутиновић, на драгоцепој помоћи приликом извођења експерименталног дела ове дисертације.

Такође, захваљујем се професору др Предрагу Ђурђевићу и др Жељку Тодоровићу Факултета медицинских наука у Крагујевцу на сарадњи и заједничком раду.

Захваљујем се професору др Ненаду Вуковићу и научном сараднику др Милени Вукић Института за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу на сарадњи.

Захваљујем се свим колегама Природно-математичког факултета који су ми на било који начин помогли и пружили подршку.

Својим родитељима, дугујем бескрајну захвалност јер су ми омогућили образовање, пружили неизмерну љубав, захвална сам им на подршци и стрпљењу.

Напослетку, својој породици, Ивану и мојим душама Дари и Искри.

Апстракт

Artemisia врсте се традиционално користе у третману различитих болести. Циљ ове докторске дисертације био је да се испита фитохемијски састав и генотоксични и цитотоксични ефекат екстраката (метанолски, ацетонски и водени) *Artemisia vulgaris* L. и *Artemisia alba* Turra појединачно и у комбинованом третману са митомицином Ц (ММЦ). Фитохемијски састав је утврђен спектрофотометријски и применом HPLC методе. Цитотоксичност је процењена МТТ тестом на ћелијској линији канцера колона (SW-480) и мезенхималним матичним ћелијама периодонцијума (PDLS), док је тип ћелијске смрти утврђен применом проточне цитометрије. Цитокинезис-блок микронуклеус (МН) тест у култивисаним хуманим лимфоцитима је коришћен за процену генотоксичног и антимулагеног ефекта. Екстракти су били богати укупним фенолима и флавоноидима, док су се квантитативном анализом издвојили метанолски екстракти обе биљке као најбогаији. Најјачи цитостатски ефекат посредован раном апоптозом постигнут је након третмана малигнућ ћелија ацетонским екстрактом *A. alba*. Обе биљке оствариле су синергистичко дејство са ММЦ индукујући снажан цитотоксични и проапоптотски ефекат на малигнућ ћелије. Водени екстракт *A. alba* није деловао генотоксично на хумане лимфоците, док су у комбинованом третману са ММЦ екстракти обе биљке испољили антимулагени ефекат. Анализом ефекта најзаступљеније фенолне киселине (3,5-дихидроксибензоове киселине) и флавоноида (кверцетин-3-О-глукопиранозида) уочено је да је фенолна киселина била генотоксична само у највишој, док је флавоноид повећавао МН фреквенцу у свим тестираним концентрацијама. ММЦ-индукована МН фреквенца се редуковала након третмана фенолном киселином, док је флавоноид испољио комулагени ефекат. Добијени резултати указују да је коришћење воденог екстракта *A. alba* у лековите сврхе безбедно.

Кључне речи: генотоксичност; цитотоксичност; биљни екстракти; фенолни састав; цитокинезис-блок микронуклеус тест; апоптоза; МТТ тест.

Abstract

Artemisia species are used in traditional medicine to treat various diseases. The aim of this dissertation was to investigate the phytochemical composition and genotoxic and cytotoxic effect of different extracts (methanolic, acetone, and aqueous) of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra, separately and in combination with mitomycin C (MMC). The phytochemical composition was determined spectrophotometrically and using the HPLC method. Cytotoxicity was assessed by the MTT assay on a colon cancer cell line (SW-480) and stem cells derived from the human periodontal ligament (PDLSCs), while the type of cell death was analyzed by flow cytometry. The cytokinesis-block micronucleus (MN) assay in peripheral blood lymphocytes was used to evaluate the genotoxic and antimutagen effect. The extracts were rich in total phenolic and flavonoid, while quantitative analysis revealed that the methanolic extracts were the most abundant. The great cytostatic effect mediated by early apoptosis was achieved after treatment with acetone extract *A. alba*. Both plants achieved a synergistic effect with MMC, inducing strong cytotoxic and proapoptotic effect on malignant cells. Aqueous extract of *A. alba* was not genotoxic on human lymphocytes, whereas in the combined treatment with MMC, both plants showed antimutagenic effect. Analysis of the effect of the most abundant phenolic acid (3,5- dihydroxybenzoic acid) and flavonoid (quercetin-3-O-glucopyranosid) showed that phenolic acid showed a genotoxic effect in the highest, whereas flavonoid increased MN frequency at all tested concentrations. MMC-induced MN frequency was reduced after treatment with phenolic acid, whereas flavonoid exhibited significant co-mutagenic effect. The results showed that the use of aqueous extract of *A. alba* for medicinal purposes is safe.

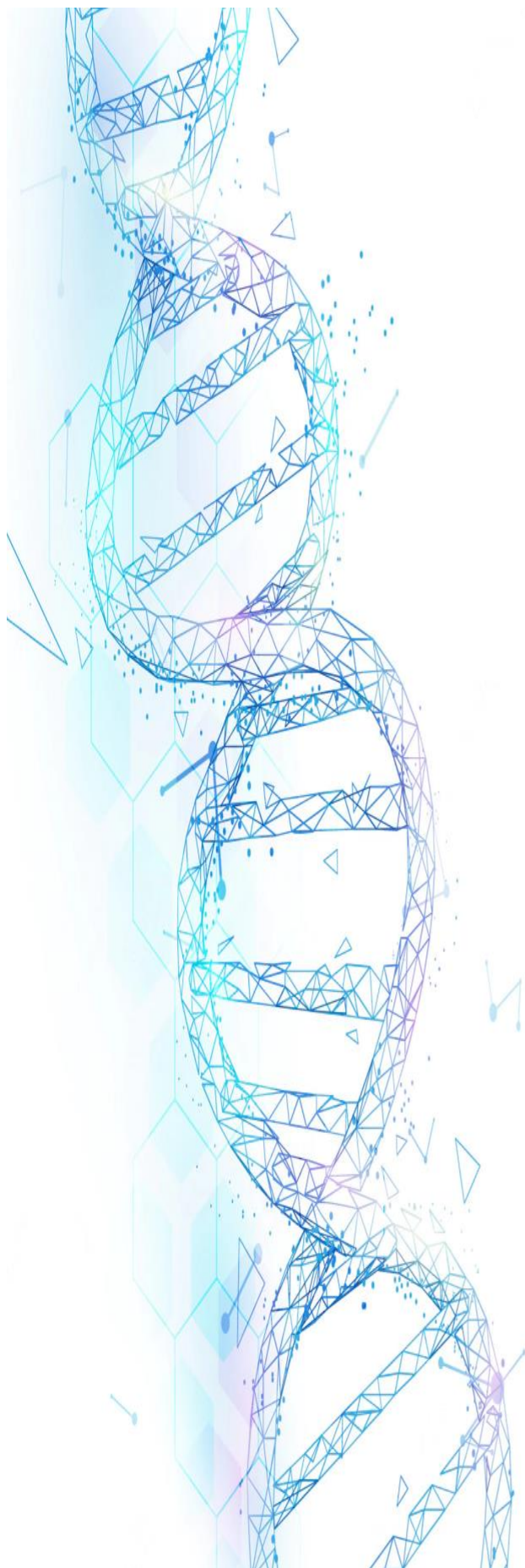
Key words: genotoxicity; cytotoxicity; plant extracts; phenolic content; cytokinesis-block micronucleus assay; apoptosis; MTT assay.

САДРЖАЈ

1.	УВОД	1
1.1.	Врсте рода <i>Artemisia</i> у народној медицини	2
1.1.1.	Основне карактеристике врсте <i>Artemisia vulgaris</i> L	3
1.1.2.	Основне карактеристике врсте <i>Artemisia alba</i> Turra	5
1.2.	Биљни екстракти	6
1.3.	Фенолна једињења	6
1.4.	Испитивање цитотоксичног и апоптотског ефекта	11
1.4.1.	Испитивање цитотоксичног ефекта	11
1.4.2.	Типови ћелијске смрти	12
1.4.3.	Цитотоксични и апоптотски ефекат екстраката испитиваних биљних врста на ћелијске линије колоректалног карцинома	14
1.5.	Тестови за детекцију генотоксичних агенаса	15
1.6.	Цитокинезис блок микронуклеус тест (ЦБМН тест)	16
1.6.1.	Теорије о пореклу микронуклеуса	17
1.6.2.	Предности ЦБМН теста	18
1.6.3.	Фактори који утичу на фреквенцу микронуклеуса	19
1.6.3.1.	Утицај ендогених фактора на фреквенцу микронуклеуса	20
1.6.3.2.	Утицај екзогених фактора на фреквенцу микронуклеуса	20
1.7.	Ефекат врста рода <i>Artemisia</i> на хумани геном	22
2.	ЦИЉ РАДА	23
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	25
3.1.	Материјал	26
3.1.1.	Узорковање, припрема и анализе биљног материјала	26
3.1.1.1.	Узорковање биљака <i>A. vulgaris</i> и <i>A. alba</i>	26
3.1.1.2.	Припрема биљних екстраката	26
3.1.2.	Коришћене ћелијске линије	27
3.1.3.	Узорковање крви	28
3.2.	Методе	28
3.2.1.	Методе за одређивање садржаја укупних фенолних једињења у биљним екстрактима	28
3.2.1.1.	Одређивање садржаја укупних фенолних једињења у биљним екстрактима	28

3.2.1.2.	Одређивање садржаја флавоноида у биљним екстрактима	29
3.2.1.3.	Течна хроматографија високих перформанси (high-performance liquid chromatography или HPLC)	29
3.2.2.	Испитивање цитотоксичног ефекта и одређивање типа ћелијске смрти	30
3.2.2.1.	Поступак одлеђивања ћелија	30
3.2.2.2.	Поступак пасажирања ћелија	30
3.2.2.3.	Поступак одређивања броја и вијабилности ћелија	31
3.2.2.4.	Ћелијски третмани	31
3.2.2.5.	Испитивање цитотоксичног ефекта МТТ тестом	32
3.2.2.6.	Испитивање типа ћелијске смрти проточном цитометријом Annexin V/7-AAD бојењем	33
3.2.3.	Испитивање генотоксичног ефекта биљних врста	34
3.2.3.1.	Процедура ЦБМН теста	34
3.2.3.2.	Третмани лимфоцита периферне крви	34
3.2.3.3.	Препарација и фиксација материјала	34
3.2.3.4.	Анализа фреквенце микронуклеуса	35
3.2.4.	Статистичка анализа	36
4.	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	37
4.1.	Одређивање садржаја укупних фенолних једињења и флавоноида у биљним екстрактима <i>A. vulgaris</i> и <i>A. alba</i>	38
4.2.	HPLC анализа екстраката биљака <i>A. vulgaris</i> и <i>A. alba</i>	39
4.2.1.	HPLC анализа екстраката <i>A. vulgaris</i>	40
4.2.2.	HPLC анализа екстраката <i>A. alba</i>	42
4.3.	Цитотоксични ефекат испитиваних биљних екстраката	44
4.3.1.	Анализа цитотоксичног ефекта различитих екстраката <i>A. vulgaris</i> у појединачном и комбинованом третману са митомицином Ц	44
4.3.2.	Анализа цитотоксичног ефекта различитих екстраката <i>A. alba</i> у појединачном и комбинованом третману са митомицином Ц	49
4.4.	Тип ћелијске смрти индукован екстрактима испитиваних биљних врста.....	54
4.4.1.	Тип ћелијске смрти индукован екстрактима <i>A. vulgaris</i>	54
4.4.2.	Тип ћелијске смрти индукован екстрактима <i>A. alba</i>	55
4.5.	Анализа генотоксичног и антимуутагеног ефекта испитиваних биљних врста у <i>in vitro</i> условима.....	57
4.5.1.	Анализа генотоксичног и антимуутагеног ефекта екстраката <i>A. vulgaris</i> на култивисане лимфоците здравих донора	57

4.5.2.	Анализа генотоксичног и антимулагеног ефекта екстраката <i>A. alba</i> на култивисане лимфоците здравих донора <i>in vitro</i>	66
4.5.3.	Анализа генотоксичног и антимулагеног ефекта 3,5-дихидроксибензоеве киселине у култивисаним лимфоцитима здравих донора	77
4.5.4.	Анализа генотоксичног и антимулагеног ефекта кверцетин-3-О-глукопиранозида у култивисаним лимфоцитима здравих донора	82
5.	ДИСКУСИЈА	87
5.1.	Састав фенолних једињења у биљним екстрактима <i>A. vulgaris</i> и <i>A. alba</i>	88
5.2.	Цитотоксични и апоптотски ефекат биљних екстраката <i>A. vulgaris</i> и <i>A. alba</i>	90
5.3.	Генотоксични и антимулагени ефекат биљних екстраката <i>A. vulgaris</i> и <i>A. alba</i>	92
6.	ЗАКЉУЧЦИ	99
7.	ЛИТЕРАТУРА	101
8.	ПРИЛОЗИ	120



1. Увод

Лековите биљке и биљни производи у великој мери се користе широм света, а терапеутска примена природних производа је све више популарна у модерном друштву као алтернатива синтетичким лековима (*Malik u cap., 2018*). Према подацима Светске здравствене организације (WHO) више од 80% популације ослања се на традиционалну медицину када је примарна здравствена заштита у питању, при чему је у употреби око 50 000 биљних врста које имају лековита својства (*Jamshidi-Kia u cap., 2018; WHO, 2019*). Уобичајеност примене лековитих биљака произилази из њихове релативне безбедности, доступности, могућности култивисања и изолације појединачних активних једињења која поседују терапеутски ефекат (*Anand u cap., 2019*).

Регион Балкана има дугу традицију употребе биљака у лековите сврхе, имајући у виду да са скоро 8000 таксона васкуларних биљака, представља један од значајних центара биодиверзитета (*Stevanović, 2005*). У Србији, за лечење бројних здравствених тегоба, коришћење лековитих биљака има дугу историју, а најстарији документи датирају још из 14. века (Ходохов кодекс) и 16. века (Хиландарски медицински кодекс) (*Živković u cap., 2020*). Геоморфолошка, геолошка и педолошка разноврсност, као и утицај повољне климе омогућавају значајну екосистемску и флористичку разноврсност територије Србије (*Stevanović, 2014*). На овом подручју, за скоро 1000 биљних врста и њихових производа постоје подаци да се примењују у лековите сврхе или као јестиве и зачинске биљке. За извештај број биљака које се користе у ове сврхе не постоје комплетни научни подаци о фитохемијском саставу, обиму биолошке активности, као и потенцијалним штетним ефектима приликом примене.

1.1. Врсте рода *Artemisia* у народној медицини

Род *Artemisia* је један од најпознатијих и најраспрострањенијих родова фамилије Asteraceae. Овај род обухвата око 500 врста које су распрострањене у северним и умереним регионима Северне Америке, Европе и Азије (*Bora u Shama, 2011; Pandey u Singh, 2017*). Научно име рода води порекло од Грчке богиње лова и природе Артемиде, док је народни назив „пелин“ у вези са горким материјама, првенствено терпеноида и лактона које се налазе у листовима и осталим вегетативним деловима ових биљних врста.

Врсте рода *Artemisia* су вишегодишње, веома ретко једногодишње, зељасте или жбунасте врсте (*Abad u cap., 2012*). Стабло је висине до 150 cm, са јаким вретенастим и код неких врста одрвенелим кореном. Врсте овог рода имају етнофармаколошки значај, а због присуства различитих биолошки активних компоненти од давнина се користе у народној медицини (*Sainz u cap., 2017*). Бројне студије су потврдиле да поседују значајне биолошке активности као што су антималаријска (*Kane u cap., 2019*), антиканцерогена (*Gordanian u cap., 2014; Neelamma u cap., 2021*), антибактеријска (*Behbahani u cap., 2017*), антиинфламаторна (*Abdul u cap., 2018*), антиоксидативна (*Behbahani u cap., 2017*). У светлу пандемије SARS-CoV-2, неколико врста овог рода (*Artemisia annua, A. absinthium, A. vulgaris, A. maritima* и *A. indhana*) због својих значајних антиинфламаторних, антивирусних и антиинфективних активности (*Obistioiu u cap., 2014; Ekiert u cap., 2020; Kshirsagar u Rao, 2021*) привукло је пажњу истраживача. Широки спектар деловања произилази из тога да различите врсте рода *Artemisia* поседују значајан квантитативни и квалитативни састав биолошки активних компоненти, као што су флавоноиди, кумарини, монотерпени, стероли и сесквитерпенски лактони (*Ivanescu u cap., 2010; Trendafilova u cap., 2018*). Врсте рода *Artemisia* су познате и по значајном садржају етеричних уља (*Shahrivari u cap., 2022*).

Врсте рода *Artemisia* су значајан објекат у научним истраживањима фитохемијског састава и биолошке активности. Поред примене у народној медицини, значајне су и у фармацеутској и прехранбеној индустрији, посебно у индустрији пића.

A. annua се користи за лечење грознице, жутице, туберкулозе, опекотина, шуге, дизентерије и хемороида, док се у Ирану примењује и као антиспазмолитик и седатив за децу (Feng *u cap.*, 2020; Septembre-Malaterre *u cap.*, 2020). У традиционалној народној медицини, *A. absinthium* се углавном примењује за лечење гастроинтестиналних болести. На Европском континенту позната је употреба ове биљке у лечењу високог притиска, као и за побољшање апетита (Batiha *u cap.*, 2020; Szopa *u cap.*, 2020). *A. afra* је један од најчешће коришћених биљних лекова у Јужној Африци за лечење упале и бола (Liu *u cap.*, 2009). Такође се користи за лечење различитих болести укључујући кашаљ, прехладу, астму, грип, дијабетес и маларију (Liu *u cap.*, 2009). *A. dracunculus* је популарна зачинска биљка која се у традиционалној медицини користи за лечење гастроинтестиналних болести али и као анестетик и антиепилептик (Ekiert *u cap.*, 2021).

Врсте рода *Artemisia* се у Европи традиционално употребљавају углавном као лековите, зачинске или јестиве биљке, за припрему горких напитака и сличних производа. Надземни делови врсте *A. vulgaris* сакупљају се и узгајају у различите прехранбене сврхе (Amidon *u cap.*, 2014), али је коришћење ограничено због токсичности неких испарљивих материја. Ова примена позната је и за врсте *A. dracunculus*, *A. dracunculoides*, *A. vulgaris*, *A. japonica*, *A. capillaris*, *A. carvifolia*, *A. indica*, *A. keiskeana*, *A. montana*, *A. schmidtiana*, *A. tilesii*, *A. tridentata* и *A. wrightii* (Trendafilova *u cap.*, 2021).

1.1.1. Основне карактеристике врсте *Artemisia vulgaris* L.

Artemisia vulgaris L., позната као дивљи или црни пелин, једна је од најпознатијих врста рода *Artemisia*. Широко је распрострањена на подручју Европе, Азије, Северне Африке, Аљаске и на простору Америке (Слика 1).



Слика 1. Распрострањење врсте *Artemisia vulgaris* L. (Abiri *u cap.*, 2018 – модификовано)

A. vulgaris (Слика 2) је вишегодишња зељаста биљка, од 50 до 150 cm висине. Стабло је одрвенело у базалном делу и смеђе до тамно црвене боје, док су горњи делови разгранати и носе цветне изданке на вршним деловима (Weston *u cap.*, 2005).

Листови су од 5 до 10 cm дужине, дубоко перасто дељени, са горње стране најчешће голи и тамнозелене боје, на наличју са белим памучастим индументумом (*Barney u cap., 2003; Anwar u cap., 2016*). Биљка има изражен главни корен и разгранате бочне коренове. Цветови су ружичасто-смеђи или жути, најчешће голи, организовани у ситне главичасте цвасти груписане на разгранатим метличастим цветним изданцима који осим бројних цвасти садрже и нешто измењене копљасте листове (*Anwar u cap., 2016*). Период цветања је од јула до септембра. Надземни делови су изразито ароматични због садржаја горких материја (*Borzabad u cap., 2010*).



Слика 2. Хабитус биљке *Artemisia vulgaris* L.

Због садржаја флавоноида, сесквитерпенских лактона, фенолних киселина, кумарина и других метаболита, ова врста је нашла различиту примену у народној медицини (*Abiri u cap., 2018; Omar u cap., 2021*). *A. vulgaris* је била позната још у старом Египту, Грчкој и Риму, где је коришћена у лечењу рана, гихта и повишене температуре, као и различитих тегоба гастроинтестиналног тракта (*Ekiert u cap., 2020*). У кинеској традиционалној медицини, ова биљка се користи за ублажавање стомачних болова, лечење чира, хепатитиса, као и конвулзивне кризе и жутице (*Fok, 2001; Repetto u Llesuy, 2002*). У народној медицини, користи се у лечењу епилепсије, анксиозности, несанице, дијабетеса, реуматских и дигестивних поремећаја (*Barney u cap., 2003; Terra u cap., 2007; Muheet u cap., 2016; Ekiert u cap., 2020*). Због својствене ароме и горког укуса користи се за побољшање апетита, лечење гастритиса и поремећаја варења (*Wichtl u cap., 2004*). Присуство етеричног уља доприноси примени ове врсте у форми зачина. Важно је напоменути да неке испарљиве компоненте имају токсичан ефекат па се примена ове биљке углавном ограничава на краћи временски период. Последњих година, ова врста се све више користи у козметичкој индустрији (*Anwar u cap., 2019*). Недавна истраживања су показала да *A. vulgaris* испољава антиоксидативни, хиполипидемијски, хепатопротективни, антиспазмолитички, аналгетички, естрогенски, цитотоксични, антибактеријски, антифунгални, хипотензивни и бронхолитички ефекат (*Ekiert u cap., 2020*).

1.1.2. Основне карактеристике врсте *Artemisia alba* Turra

Artemisia alba Turra – бели пелин (синоними: *Artemisia lobelii* All., *Artemisia camphorata* Vill.) је ароматична, полужбунаста вишегодишња биљка (Trendafilova и сар., 2018). Распрострањена је у јужним и југоисточним деловима Европе (Слика 3).



Слика 3. Распрострањење врсте *Artemisia alba* Turra (Blondi и Galdenzi, 2012 – модификовано)

Стабљике биљке су усправне, гранате или једноставне, висине од 30 до 60 см. Листови су беличасте боје, дугачки, двоструко перасто дељени и прекривени ситним трихомама са којих се рефлектује светлост, што биљци омогућава беличаст одсејај. Главичасте цвасти су ситне, обухватају од 2 до 5 дугуљастих жутих хермафродитских цветова који су сужени у својој основи. Биљке цветају у периоду од августа до октобра. Хабитус биљке *A. alba* приказан је на Слици 4.



Слика 4. Хабитус биљке *Artemisia alba* Turra

У народној медицини биљка *A. alba* се користи као спазмолитик и антисептик (Peron *u cap.*, 2017). Антимикробна активност етеричног уља ове врсте је и научно потврђена (Stojanović *u cap.*, 2000). *A. alba* је била предмет многих фитохемијских студија (Trendafilova *u cap.*, 2014; Todorova *u cap.*, 2015; Peron *u cap.*, 2017; Radović Jakovljević *u cap.*, 2019; Ickovski *u cap.*, 2020), али литературни подаци указују на то да су биолошке активности ове биљне врсте мало изучаване. Strzelecka *u cap.* (2005) су утврдили да етанолски екстракт биљке испољава антиинфламаторну активност у микроваскуларним ендотелним ћелијама мишјег мозга. Етилацетатни биљни екстракт показао је снажну антиканцерогену активност на линији малигних ћелија колоне (Radović Jakovljević *u cap.*, 2019).

1.2. Биљни екстракти

Имајући у виду да лековита својства биљака зависе од хемијског састава, било какво испитивање биолошки активних супстанци из лековитих, ароматичних, зачинских и јестивих биљака, захтева да се биљни материјал најпре изложи процесу екстракције (Savić, 2014). С тога, избор растварача је један од важних корака. Избор зависи од биљне врсте, дела биљке, као и хемијских карактеристика биоактивних једињења.

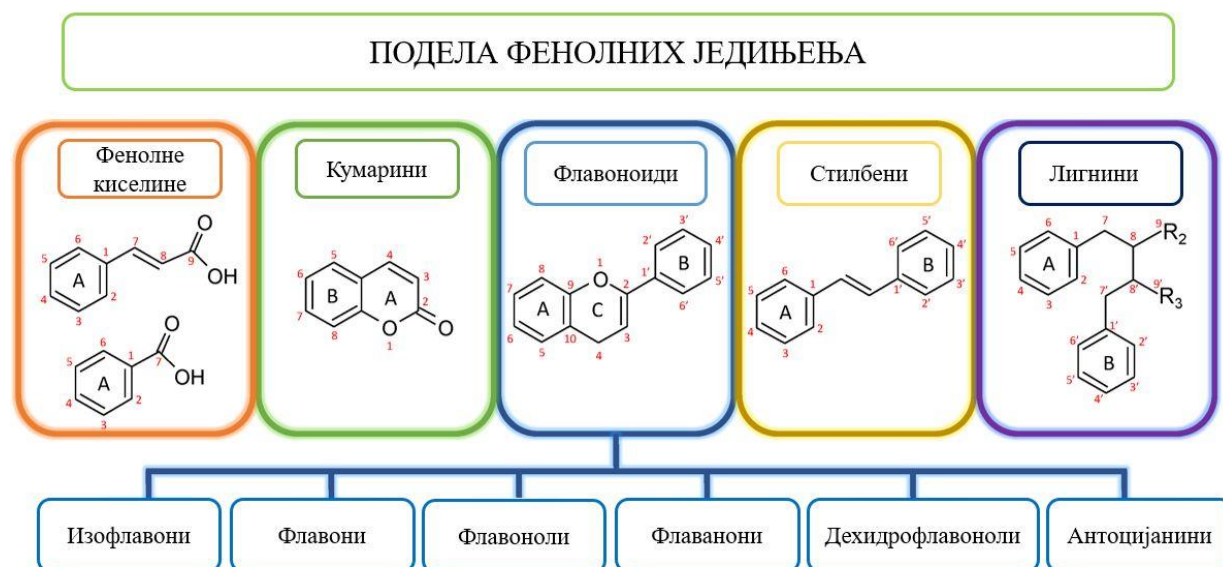
У зависности од поларности, растварачи се деле на поларне као што су вода, ацетон, метанол и етанол и користе се за екстракцију поларних једињења, и неполарне раствараче као што су хексан и дихлорометан који се користе за екстракцију неполарних једињења (Altemimi *u cap.*, 2017; Abubakar *u Haque*, 2020). На основу тога, постоје различите врсте екстраката, а циљ је да се самим поступком екстракције из биљног материјала издвоји што више секундарних метаболита.

Квалитет и састав биљног екстракта одређује врста и поларност растварача који се користи, време екстракције, однос узорка и растварача, као и хемијски састав и физичке особине биљке. Због веће ефикасности, за изоловање фенолних једињења из биљака, најчешће се користе растварачи попут воде, метанола, етанола, етилацетата, ацетона или њихове комбинације (Durling *u cap.*, 2006; Alothman *u cap.*, 2008). Пракса је показала да се екстракција фенола већих молекулских маса боље врши ацетоном или водом као растварачем, док се феноли мање молекулске масе, најбоље екстрахују метанолом (Dai *u Mumper*, 2010). Хемијски састав и физичке карактеристике чине воду универзалним и ефикасним растварачем који се користи за екстракцију широког спектра поларних једињења (Abubakar *u Haque*, 2020). Применом метанола најефикасније се екстрахују фенолна једињења, терпеноиди, лактони, сапонини, танини итд. (Agarwal *u cap.*, 2016). Ацетон раствара липофилне и хидрофилне молекуле, лако је испарљив, па се показао као ефикасан растварач за екстракцију флавонола, алкалоида и агликоне, док етилацетат најбоље екстрахује алкалоиде, агликоне и гликозиде (Gupta *u cap.*, 2012; Zhang *u cap.*, 2018; Alara *u cap.*, 2021).

1.3. Фенолна једињења

Природни производи биљног порекла имају широку примену у исхрани, као и у лековите сврхе. Данас постоје предуслови за употребу ових производа у фармацеутској индустрији у циљу развоја и откривања нових лекова (Huang *u cap.*, 2010; Kumar *u cap.*, 2019). Познато је да исхрана производима биљног порекла значајно смањује ризик од различитих болести, укључујући бројне врсте карцинома, као и кардиоваскуларне болести, што сугерише да извесни дијететски производи могу бити ефикасни агенси за превенцију или лечење различитих болести (Wahle *u cap.*, 2010).

Фенолна једињења обухватају биљне секундарне метаболите различите структуре, од једноставних (фенолне киселине) до полимера великих молекулских маса (проантоцијанидоли) (Kumar *u cap.*, 2020), чија је заједничка карактеристика да садрже ароматични прстен за који је директно везана једна или више хидроксилна група (Chirinos *u cap.*, 2009; Kumar *u cap.*, 2014). Позната су два начина синтезе секундарних метаболита, преко шикимске киселине као интермедијера или путем биосинтезе бензеновог прстена из ацетата (ацетогенински пут). У односу на молекулску структуру, фенолна једињења се деле на фенолне киселине, флавоноиде, стилбене, лигнине и кумарине (Слика 5).



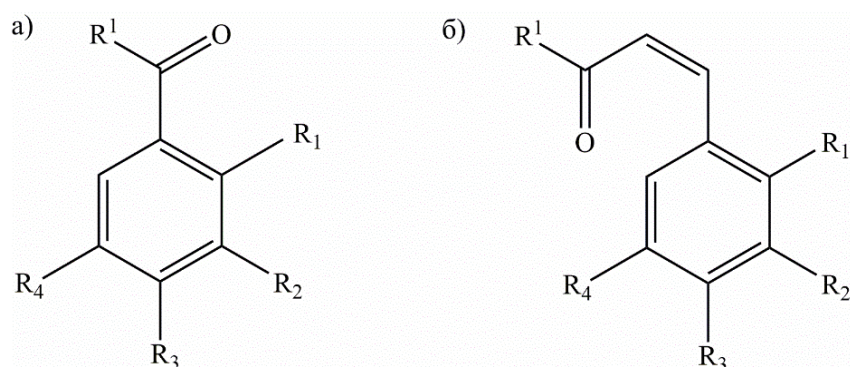
Слика 5. Класификација фенолних једињења (преузето и модификовано Nano Tungmunnithum, 2020)

Фенолна једињења су најчешће главни носиоци биолошке функције биљних производа, захваљујући способности спаривања електрона слободних радикала, хелатног везивања јона прелазних метала, активирања антиоксидативних ензима и инхибирања оксидаза (Kumar *u cap.*, 2015). Неопходна су за раст и репродукцију биљака, а такође су важни и за њихову одбрану од инсеката, биљоједа, патогених микроорганизама, као антибиотици, природни пестициди, сигнални молекули, UV протективни агенси и структурне компоненте ћелијског зида (Ghasemzadeh *u Ghasemzadeh*, 2011).

У новијим истраживањима много је пажње посвећено испитивању потенцијалне примене фенолних једињења у фармацији и медицини. Представљају значајне природне антиоксидансе пошто могу да слободном радикалу донирају атом водоника или електрон, чиме га превode у мање реактивни молекул. Фенолна једињења имају улогу у широком спектру биолошких и фармаколошких активности као што је антиинфламаторна, антиканцерогена, антимикуробна, антиалергијска, антивирусна, антитромботична, хепатопротективна итд. (Ozcan *u cap.*, 2014, Kumar *u cap.*, 2015, Dzialo *u cap.*, 2016, Sytar *u cap.*, 2016; Milutinović *u cap.*, 2019; Petrescu *u cap.*, 2019; Wang *u cap.*, 2019).

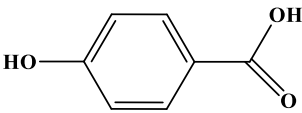
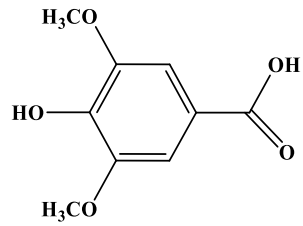
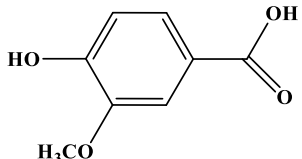
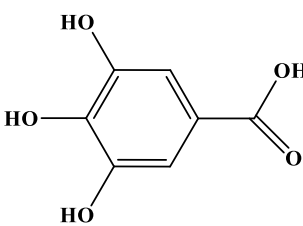
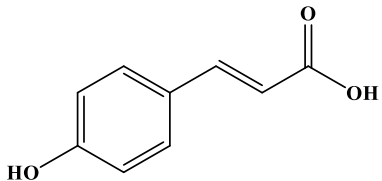
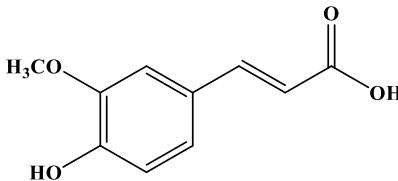
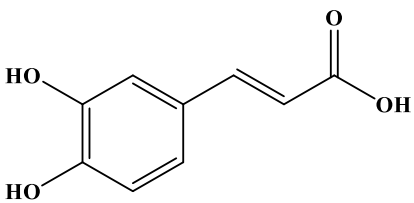
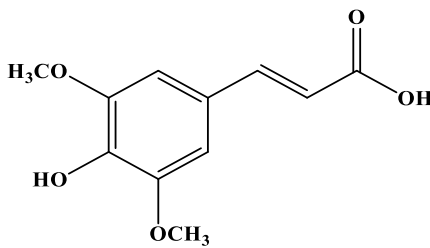
Фенолна једињења могу инхибирати ензиме који су повезани са генезом хуманих болести, па се с тога користе у лечењу различитих обољења, укључујући хипертензију, метаболичке проблеме, инфекције и неуродегенеративне болести. Инхибиција ензима који конвертује ангиотензин фенолним једињењима користи се за лечење хипертензије. Инхибиција ензима који хидролизује угљене хидрате је основа терапије дијабетес мелитуса типа 2, а инхибиција холинестеразе је нашла примену у лечењу Алцхајмерове болести. Такође, због свог антиинфламаторног дејства, фенолна једињења испољавају значајну улогу у лечењу кожних болести, реуматоидног артритиса и инфламаторних болести цревног тракта. Екстракти биљака и фенолна једињења, поред низа антиинфламаторних, антиканцерогених, антибактеријских и антивирусних активности, испољавају заштитне ефекте од оксидативног стреса и запаљења изазваних аерополутантима. Такође се користе за превенцију и лечење болести повезаних са алергијама. Описани су и биолошки доприноси фенолних једињења у лечењу кардиоваскуларних болести (*Rahman u cap., 2022*).

Од свих фенолних једињења, фенолне киселине и флавоноиди најчешће су предмет изучавања. Фенолне киселине се одликују присуством фенолног језгра и бочног низа састављеног од једног (деривати бензоеве киселине) или три (деривати циметне киселине) угљеникова атома. На основу угљениковог скелета најчешће се деле у две подгрупе: хидроксибензоеве (C6-C1) и хидроксициметне киселине (C6-C3) (*Clifford u cap., 1999*) (Слика 6). Хидроксибензоеве киселине карактеришу се присуством карбоксилних група на фенолу. Најприсутнији деривати бензоеве киселине у биљним ткивима су: *p*-хидроксибензоева, ванилинска, сиригинска и гална киселина (*Hidalgo u Almajano, 2017; Durazzo u cap., 2019*). У биљкама, хидроксициметне киселине су заступљеније од деривата хидроксибензоєвих киселина. Најзаступљенији представници су *p*-кумаринска, кафеинска, ферулинска и синапинска киселина (Табела 1). Ретко се налазе слободне у биљкама, већ су најчешће везане у форми естара са различитим једињењима, као што су органске киселине, флавоноиди, терпени, итд.



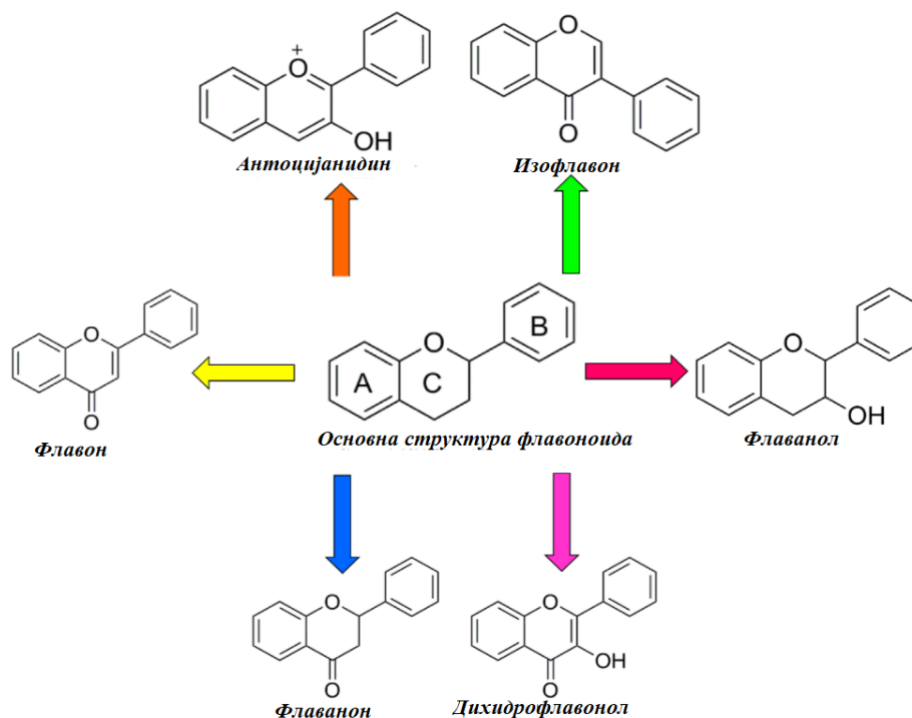
Слика 6. Деривати фенолних киселина: а) хидроксибензоеве киселине; б) хидроксициметне киселине

Табела 1. Класификација фенолних киселина

<i>Хидроксибензоеве киселине</i>	
	
p-хидроксибензоева киселина	Сирингинска киселина
	
Ванилинска киселина	Гална киселина
<i>Хидроксициметне киселине</i>	
	
p-кумаринска киселина	Ферулинска киселина
	
Кафеинска киселина	Синапинска киселина

Флавоноиди (C6-C3-C6), као класа секундарних метаболита биљака мале молекулске масе су веома заступљени у биљном свету. Присутни су у свим биљним органима, при чему је њихова концентрација највећа у епидермису листова, цветова и перикарпу плодова (Crozier *u cap.*, 2006). До данас је описано више од 9000 флавоноида, а њихов дневни унос варира између 20 mg и 500 mg, углавном из воћа, поврћа или суплемената (Panche *u cap.*, 2016; Khan *u cap.*, 2021).

Структура флавоноида се карактерише присуством два бензенова прстена повезана преко С-3 јединице (Crozier *u cap.*, 2006; Dai *u Mumper*, 2010; Durazzo *u cap.*, 2019). Различитим обрасцима супституције добијају се многе подкласе, као што су флаволи, изофлаволи, флаванони, флаваноли, дихидроксифлавоноли и антоцијанини (Слика 7).



Слика 7. Класификација флавоноида

Флавоноиди су незаобилазна компонента у разним фармацеутским, медицинским и козметичким производима. Ово се приписује њиховом антиоксидативном (Andreu *u cap.*, 2018; Hernández-Rodríguez *u cap.*, 2019), антиинфламаторном (Chen *u cap.*, 2019), антимуtagenом (Okuno *u cap.*, 2019) и антиканцерогеном (Kopustinskiene *u cap.*, 2020) дејству у комбинацији са њиховим капацитетом да модулишу кључне функције ћелијских ензима (Kim *u cap.*, 2004). Многе студије сугеришу да флавоноиди показују биолошке активности, укључујући антиалергијско, антивирусно, антиинфламаторно и вазодилататорно дејство.

Највише интересовања је посвећено антиоксидативној активности флавоноида која је последица њихове способности да смање формирање слободних радикала, као и да неутралишу слободне радикале. Такође, утврђено је да су флавоноиди веома ефикасни у спречавању липидне пероксидације, која је одговорна за различите болести као што су атеросклероза, дијабетес, инфламација и старење (Panche *u cap.*, 2016; Abou Baker *u cap.*, 2020). Флавоноиди су такође познати и по својој антимикуробној активности (da Silva *u cap.*, 2013; Górnjak *u cap.*, 2019; Duda-Madej *u cap.*, 2020). Бројне студије су показале да изоловани флавоноиди имају антифунгално, антивирусно и антибактеријско својство због чега се интензивно користе у области исхране, безбедности хране и здравља (Panche *u cap.*, 2016). Литературни подаци указују на то да бројни флавоноиди имају хемопревентивна својства као и да доприносе индуковању апоптозе заустављањем ћелијског циклуса, регулацијом метаболизма канцерогена и експресије онкогенезе (Panche *u cap.*, 2016; Abou Baker *u cap.*, 2020).

1.4. Испитивање цитотоксичног и апоптогског ефекта

1.4.1. Испитивање цитотоксичног ефекта

Примена биљних врста у лековите сврхе све више је популарна јер се биљке могу користити у терапији различитих болести као природне алтернативе синтетичким лековима (Malik *u cap.*, 2018). Такође, коришћење природних производа као антиканцерогених средстава је прихватљив терапијски приступ због приступачности, применљивости и смањене цитотоксичности. Уз њихове деривате и аналоге, природни производи имају важну улогу у лечењу карцинома модулацијом микроокружења самог карцинома и различитим сигналним путевима, што је повећало интересовање научника за њихов потенцијал као хемопреентивних и хемотерапеутских агенаса (Safe *u Kasiappan*, 2016; Hashem *u cap.*, 2022).

Важан аспект у истраживању биљака, њихових екстраката или препарата, представља цитотоксични скрининг. Цитотоксичност представља утицај неког агенса на преживљавање и пролиферацију ћелија или ћелијски метаболизам. У зависности од тога да ли се анализа цитотоксичног ефекта неког агенса заснива на мерењу вијабилности ћелија на основу промене интегритета мембране ћелија или ћелијског метаболизма, данас је у употреби је велики број тестова.

Једна од најчешће примењиваних стратегија у испитивању цитотоксичности јесте мерење вијабилности ћелија на основу активности митохондрија, где МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид) тест представља златни стандард који се примењује широм света. Примена МТТ теста у истраживању цитотоксичног ефекта има многоструке предности. Превасходно то је једноставност и лакоћа извођења самог теста, прецизност одређивања али и утврђивање више параметара цитотоксичности неког агенса. Тестом је могуће одређивање и квантификација раста и виталности ћелија (Buranaamniay *u cap.*, 2021; Ghasemi *u cap.*, 2021), мерење пролиферације ћелија као одговор на факторе раста, цитокине и хранљиве материје (Jimi *u cap.* 2020; Ghasemi *u cap.*, 2021), процена цитотоксичности неких агенаса који инхибирају раст ћелија (Munia *u cap.*, 2020) али и мерење активности ћелија (Rai *u cap.*, 2018).

Тест се заснива на редукцији жуте тетразолијумове соли (МТТ реагенс) митохондријалном редуктазом у метаболичким активним ћелијама, при чему се формира формазан, нерастворљиви кристални производ тамнољубичасте боје (Ghasemi *u cap.*, 2021) (Слика 8). МТТ реагенс може да прође кроз ћелијску и митохондријалну мембрану вијабилних ћелија због свог позитивног наелектрисања (Berridge *u cap.*, 2005) и липофилне структуре (Stockert *u cap.*, 2018) и да се у метаболички активним ћелијама редукује у формазан (Berridge *u cap.*, 2005). Природа ове редокс хемијске реакције обезбеђује колориметријско мерење интрацелуларне производње формазана на основу које су Mosmann *u cap.* развили МТТ тест 1983. године (Mosmann *u cap.*, 1983).



Слика 8. Редукација тетразолијумове соли у формазан

1.4.2. Типови ћелијске смрти

Препознавање процеса апоптозе као главног механизма деловања многих цитотоксичних агенаса довело је до нових експерименталних приступа који су усмерени на стимулисање апоптотских путева у циљу побољшања терапијског одговора. Улога природних једињења у регулисању ћелијске пролиферације и диференцијације су давно позната, али њихов значај као физиолошких и фармаколошких регулатора ћелијске смрт тек су онедавно у свери интересовања научника.

Апоптоза (програмирана ћелијска смрт) представља енергетски зависни и генетички регулисан процес који се карактерише низом морфолошких промена ћелије. То је ирверзибилан физиолошки процес који је присутан у свим ткивима још од стадијума ембриогенезе и неопходан је за одржавање ћелијске хомеостазе.

Апоптозу карактерише низ морфолошких промена које се могу поделити у три фазе. У првој фази апоптотске ћелије смањују волумен и садржај воде, уједно повећавајући број белих крвних зрнаца и густину цитоплазме. Апоптотске ћелије се издвајају од околне популације нормалних ћелија. Друга фаза апоптозе укључује промене на нивоу једра када долази до фрагментације молекула ДНК и кондензације хроматина. Услед деградације актинских филамената цитоскелета (трећа фаза апоптозе) долази до инвагинација у ћелијској мембрани и формирања везикула тзв. апоптотских телашаца које су оивичене мембраном и садрже фрагменте ћелије (Слика 9). Премештање фосфатидил-серина на спољашњу површину ћелијске мембране омогућава околним ћелијама и ткивним макрофазима да уз помоћ специфичних рецептора препознају апоптотске ћелије и да их фагоцитирају. С тога, током процеса апоптозе не долази до ослобађања интрацелуларног садржаја у околна ткива, односно до настанка инфламаторног одговора организма из разлога што се сви процеси одвијају на нивоу апоптотске ћелије (*D'Arcy, 2019; Guo и сар., 2021; Kari и сар., 2022*).

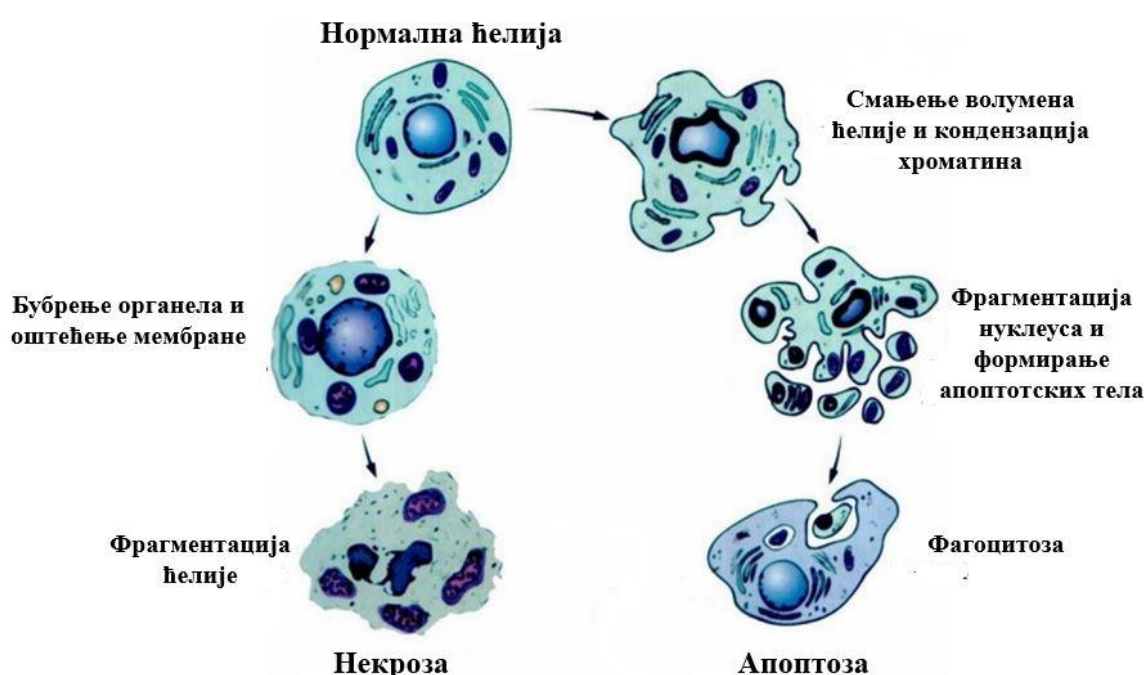
Поред наведених морфолошких промена, процес апоптозе прати и низ биохемијских процеса који укључују промене у ћелијским сигналним путевима. Апоптоза се може иницирати *спољашњим (рецептоским) путем и унутрашњим (митохондријалним) путем*. Оба сигнална пута апоптозе захтевају активацију протеолитичких ензима каспаза које се могу поделити у две групе: иницијаторске (каспаза -8 и -10 у спољашњем путу и каспаза -9 у унутрашњем путу) које започињу процес апоптозе и активирају ефекторне каспазе (каспаза -3, -6 и -7) које даље доводе до разградње циљаних протеина и програмиране ћелијске смрти (*Hussar, 2022*).

Спољашњи пут апоптозе започиње везивањем специфичних лиганата тумор-некрозе фактора (TNF, Fas ligand) за комплементарне мембранске рецепторе смрти (Dead Receptors - DR) који се налазе на површини ћелије. Делови рецептора смрти (домени смрти) су лоцирани у цитоплазми и учествују у самом преносу сигнала и иницијацији процеса апоптозе својим везивањем за интраћелијске протеине (адаптери: Fas-associated-death-domain; TNFR-associated death-domain). Овако формиран сигнални комплекс индукује ћелијску смрт посредством својих домена који ступају у интеракцију са доменима прокаспаза 8 и 10 и активирају иницијалне каспазе. Оне даље активирају ефекторне каспазе 3 и 7 и доводе до програмиране ћелијске смрти.

Апоптоза посредована унутрашњим или митохондријалним путем настаје као одговор на унутрашње ћелијске сигнале. Унутрашњи пут апоптозе се заснива на активности различитих проапоптотских и антиапоптотских гена Bcl-2 фамилије. Приликом иницијације процеса апоптозе посредством оштећења молекула ДНК важну улогу има тумор супресорски ген p53 који врши експресију протеина Bcl-2 фамилије чијом активацијом долази до стварања пора у мембрани митохондрија и ослобађања цитохрома Ц у цитоплазму. Даљом интеракцијом цитохрома Ц са адапторским

протеином (Araf-1; Apoptotic Protease Activating Factor-1) долази до активације ефекторне каспазе -3 које даље воде ћелију у апоптозу (Kari *u cap.*, 2022).

Некроза је пасиван тип ћелијске смрти који настаје услед промена физиолошких услова као последица деловања различитих физичко-хемијских агенаса. Први корак у процесу некрозе је бубрење органела као што су ендоплазматични ретикулум и митохондрије. Услед недостатка снабдевања ћелија кисеоником и смањене производње аденозин три фосфата (АТФ) долази до нарушавања натријум-калијумове пумпе у мембрани ћелије. То последично доводи до неконтролисаног уласка калцијума и воде у ћелију, односно до њеног бубрења и одвајања рибозома од ендоплазматичног ретикулума. Цитосолни калцијум такође доводи и до активације неколико ензима као што су протеазе и фосфолипазе што доводи до разградње мембране и изливања садржаја у околно ткиво (Слика 9). Као последица некрозе настаје инфламаторни одговор (Sarhan *u cap.*, 2018).



Слика 9. Разлика у морфолошким променама ћелије у апоптози и некрози

Методе које се заснивају на уочавању разлика између апоптозе и некрозе поред примене флуоресцентне и електронске микроскопије, обухватају и проточну цитометрију.

Проточна цитометрија је савремена метода која заузима значајно место како у дијагностици бројних обољења, тако и у истраживачке сврхе (Zattoni *u cap.*, 2022). Метода се може користити за праћење ефеката терапије цитостатицима или имуноterapiје која се користе у лечењу различитих тумора (Catitti *u cap.*, 2023). Методом је могуће праћење раних промена на нивоу саме ћелије као што је детекција оксидативног стреса, оштећења митохондрија, али такође и каснијих ефеката као што је цитотоксичност и генотоксичност (Sabido *u cap.*, 2020). Испитивање процеса апоптозе проточном цитометријом омогућава не само резумевање механизма саме апоптозе, него и идентификацију фактора који утичу на овај процес, што је неоспорно битно за развој нових стратегија у лечењу различитих болести у којима је процес апоптозе важан (Guo *u cap.*, 2020).

Проточном цитометријом је омогућено аутоматско бројање ћелија и њихова класификација у различитим фазама ћелијског циклуса, као и идентификација специфичних маркера који се током процеса апоптозе јављају на површини ћелије. Бојењем различитих ћелијских компоненти омогућена је анализа ћелијског циклуса, миграција и пролиферација ћелија. Један од најзначајних маркера који се користи у проточној цитометрији у сврху детекције апоптозе је фосфодилсерин који се током процеса апоптозе премешта са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. За детекцију апоптотских ћелија користи се флуоресцентно обележен протеин (Annexin-V) који се везује за фосфодилсерин али који истовремено може да приступи мембрани некротских ћелија и да их обоји. Истовременим бојењем ћелија са Annexin-V и 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) могуће је са сигурношћу разликовати вијабилне од апоптотских (рана или касна апоптоза) и некротских ћелија. 7-AAD је флуоресцентна боја која се најчешће користи за анализу ћелијског циклуса као и за детекцију процеса апоптозе због могућности саме боје да се селективно везује за гуанин-цитозинске регионе молекула ДНК. Бојењем ћелија овом бојом детектују се некротске и касно апоптотске ћелије због нарушене пропустљивости њихових мембрана и могућношћу везивања боје за ДНК тако оштећених ћелија (Voronin *u cap.*, 2020; Kari *u cap.*, 2022).

1.4.3. Цитотоксични и апоптотски ефекат екстраката испитиваних биљних врста на ћелијске линије колоректалног карцинома

Лекови природног порекла чинили су основу традиционалне медицине, док у данашње време лековите биљке представљају један од најзначајнијих извора нових лекова. Хемопревентивне компоненте биљног порекла, за које је познато да циљају специфичне онкогене или малигне ћелије, прекидају канцерогенезу и спречавају раст тумора, тренутно се опширно истражују (Mazumder *u cap.*, 2020). За потребе лечења преко 200 врста карцинома, само око 140 одобрених антиканцерогених лекова је доступно, због чега постоји недостатак ефикасних терапија за већину тумора (Latosinska *u cap.*, 2013; Mazumder *u cap.*, 2020).

Колоректални карцином представља канцерозну лезију која се формира у зиду колоне или ректума. Најчешће, почиње као аденоматозни полип (аденом) који се развија у мукозном слоју дебелог црева или ректума. Иако су полипи веома чести, процењује се да мање од 10% формираних полипа прелази у карцином (Levine *u cap.*, 2006, Risio *u cap.*, 2010). Најзначајнији пораст инциденце и морталитета услед овог карцинома јавља се у економски развијеним земљама (превасходно у западним земљама) (Wong *u cap.*, 2020, World Health Organization, 2020). Према бази података (GLOBOCAN- Global Cancer Observatory) Светске здравствене организације, трећи је најчешће дијагностиковани карцином и четврти главни узрок смрти од карцинома у свету (Bray *u cap.*, 2018). Процењује се да ће до 2035. године број преминулих од карцинома колоне значајно порастати, чак за 60% (Douaiher *u cap.*, 2017). У 2020. години дијагностиковано је 1,9 милиона нових случајева (Bray *u cap.*, 2021). Инциденца карцинома колоне је такође висока у нашој земљи. Број новооболелих у 2020. години износио је 5059, док је број преминулих био 2430 (Регистар за рак у Републици Србији, 2022).

Подаци који се фокусирају на токсичне исходе хемиотерапије довели су до карактеризације нових стратегија, укључујући експлоатацију природних једињења као алтернативних и безбедних лекова и/или метода лечења канцера. Једињења биљног порекла имају велики утицај као терапијски агенси, и сама, али и у комбинацији са конвенционалним лековима. Штавише, ћелије канцера могу развити отпорност на лекове током хемиотерапије. Циљеви укључивања природних једињења у

хемиотерапији канцера су следећи: (а) да се прошири терапијски оквир хемиотерапеутских лекова и (б) да се смањи појава резистенције на хемиотерапију (Ouyang *u cap.*, 2014). Током последње две деценије постоји велико интересовање за испитивање и све је већа употреба конвенционалних лекова у комбинацији са антитуморским лековима пореклом из природних извора.

У досадашњим истраживањима од стране већег броја аутора, уочено је да врсте рода *Artemisia* испољавају снажно антиканцерогено дејство на различитим ћелијским линијама колоректалног карцинома. Ferrante *u cap.* (2019) су показали да етил-ацетатни екстракт биљке *A. santonicum* значајно редукује вијабилност ћелија колоректалног карцинома (НСТ116). *A. aucheri* испољава цитотоксичне ефекте на НСТ116 ћелијама индукцијом апоптозе (Ali *u cap.*, 2020). *A. absinthium* поседује значајну антиканцерогену активност на DLD-1 ћелијској линији колоректалног карцинома, док цитотоксични ефекти на ембрионалним ћелијама бубрега (НЕК-293) су били веома слаби (Koynisi, 2018). Kim *u cap.* (2018) су показали да метанолски екстракт *A. annua* редукује вијабилност НСТ116 ћелија колона путем апоптозе коју карактерише повећање лактат-деhidрогеназе и апоптотских тела, активирање каспазе-3 и каспазе-7, смањење мембранског потенцијала као и повећано ослобађање цитохрома Ц.

Иако се биљка *A. vulgaris* традиционално користи у лечењу различитих болести (Pandey *u cap.*, 2017; Ekiert *u cap.*, 2020), веома је мало доступних литературних података о њеним антитуморским својствима на ћелијским линијама колоректалног карцинома. Nawab *u cap.* (2011) у својој студији, испитујући антиканцерогена својства *A. vulgaris* екстракта, показали су да водени биљни екстракт значајно смањује пролиферацију ћелија колоректалног канцера (РКО) у дозно-зависном ефекту. Такође, Lian *u cap.* (2018) спровели су студију о антиканцерогеној активности метанолског екстракта биљке на ћелијској линији колоректалног карцинома (НСТ-15). Резултати студије су показали да је екстракт испољио значајну антиканцерогену активност са IC_{50} вредношћу од 50 $\mu\text{g/mL}$.

Са друге стране, антитуморска својства биљке *A. alba* до сада нису испитивана и ово је прва студија која је имала за циљ да анализира цитотоксични и проапоптотски ефекат различитих екстраката ове биљне врсте.

1.5. Тестови за детекцију генотоксичних агенаса

Генотоксикологија (генетичка токсикологија) је интердисциплинарна наука чији је основни циљ детекција генотоксичних агенаса присутних у човековој животној и радној средини. Бави се проучавањем интеракција између агенаса (физичких, хемијских и биолошких) са генетичким материјалом, механизмима одговора на изазвана оштећења и свеукупним утицајем на организам. Како би се детектовале промене у генетичком материјалу и проценио генотоксични потенцијал неког агенса развијен је велики број тестова, који се на основу нивоа организације генетичког материјала на коме се врши детекција могу поделити у три групе:

- Тестови за детекцију промена на нивоу гена
- Тестови за детекцију промена на нивоу хромозома
- Тестови за детекцију промена на нивоу молекула ДНК.

Већина ових тестова је нашла примену у истраживању генотоксичног ефекта одређеног агенса. Способност неког агенса да узрокује промене у генетичком материјалу представља генотоксичност и такви агенси се према свом пореклу деле се на

физичке, хемијске и биолошке. Физички агенси су температура и различити типови зрачења. Друга група укључује хемијске супстанце, природне и синтетисане, које узрокују промене у генетичком материјалу, као што су нумеричке и структурне аберације хромозома, повећање фреквенце измене сестринских хроматида (SCE), повећање фреквенце микронуклеуса и генске мутације. Своје ефекте могу да испоље као директни мутагени, индиректни мутагени, немутагене супстанце и агенси који појачавају мутагеност друге супстанце и остварују комутагено дејство. Трећу групу мутагена чине вируси, бактерије, гљиве, биљке (*Ferguson i Philpott, 2008*).

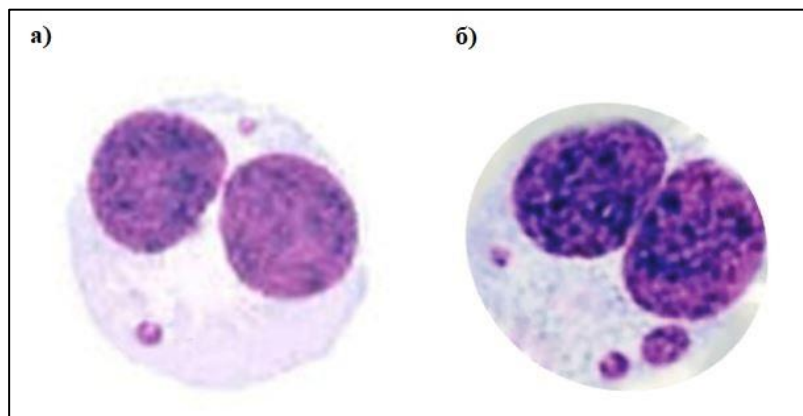
1.6. Цитокинезис блок микронуклеус тест (ЦБМН тест)

ЦБМН тест је један од најчешће примењивањих тестова у лабораторијама широм света који се употребљава за анализу како спонтаних тако и индукованих хромозомских аберација (*Kato u cap., 2023*). Тест се успешно примењује и у *in vivo* и у *in vitro* условима. Заснива се на детекцији екстрануклеарних хроматинских маса која се у цитоплазми уочавају у форми малих једара – микронуклеуса (МН) (*Fenech, 2020a*) (Слика 10).

Појам геномска нестабилност односи се на високу учесталост мутација у геному које настају услед дејства различитих агенаса из ендогених и егзогених извора којима је људска популација константно изложена. Многобројни фактори утичу на стабилност хуманог генома и могу допринети развоју различитих болести, као што су малигне болести, кардиоваскуларне болести, хронична опструктивна болест плућа или неуродегенеративне болести (*Tiwari u Wilson, 2019; Asanov u cap., 2021; Scheijen u Wilson, 2022*).

Иако се оштећења молекула ДНК дешавају у ћелијама нашег организма, посредством механизма репарације ова оштећења је могуће поправити. Оштећења наследног материјала која настају посредством мутација, могу се манифестовати на нивоу гена (генске мутације – промене у структури гена), или на нивоу читавог хромозома (хромозомске аберације – промене у броју и структури хромозома). Уколико се оштећења наследног материјала не поправе урођеним репер-механизмима, мутације се нагомилавају и могу бити увод у различита патолошка стања.

ЦБМН тест се користи као проба за кластогене агенсе који изазивају прекиде у хромозомима, услед чега настају МН који се састоје од ацентричних фрагмената, као и проба за анеугене агенсе који ремете правилну сегрегацију хромозома и доводе до губитка целих хромозома услед чега настају МН који се састоје од целих хромозома (*Milošević-Dorđević, 2010; Nersesyan u cap., 2016*). ЦБМН тестом се детектује геномска нестабилност, укључујући прекиде, губитак делова хромозомама или реаранжмани хромозома, пупољци и мостови. Детектовање МН је реални показатељ хромозомских аберација, а њихова фреквенца је директно пропорционална степену хромозомских аберација. Последњих деценија МН се користе као биомаркери хромозомских оштећења, нестабилности генома и ризика за различите типове канцера (*Iarmarcovai u cap., 2008; Samanta u Dey, 2010; Fenech, 2020a*).



Слика 10. Бинуклеусна (БН) ћелија: а) са два микронуклеуса; б) са три микронуклеуса

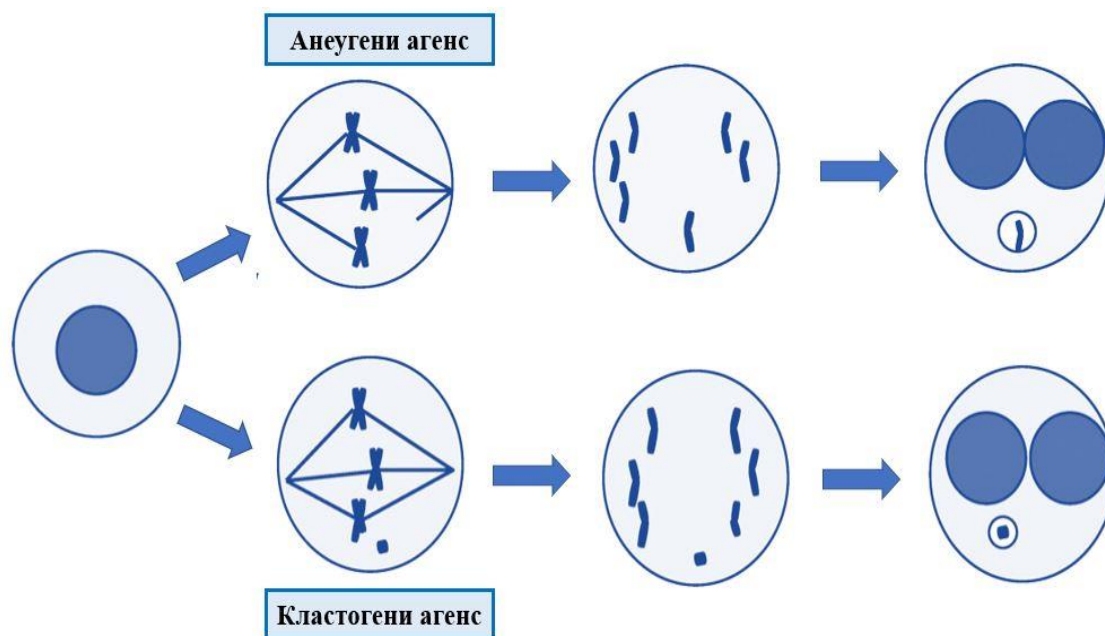
МН имају исту текстуру хроматина и обојеност као главно једро у чијој су близини локализовани. Углавном су овалног или округлог облика, величине између $1/3$ до $1/16$ пречника главног једра, али могу бити и пирамидалне, хемисферне, цилиндричне или врло ретко неправилне структуре (Grujić *u cap.*, 2016, Sommer *u cap.*, 2020).

МН представљају највише проучаване биомаркере оштећења ДНК и хромозомске нестабилности код људи. Од када су Howell и Jolly први пут известили о њиховом постојању у еритроцитима (Sears *u cap.*, 2012), а касније студије потврдиле њихово порекло од хромозомских аберација у лимфоцитима периферне крви (Fenech *u cap.*, 2011; 2016), МН су постали један од најважнијих биомаркера геномске патологије повезане са широким спектром развојних и дегенеративних болести (Bonassi *u cap.*, 2019; Fenech *u cap.*, 2020b). Иако је раније показано да МН у еритроцитима и лимфоцитима код људи воде порекло од структурних хромозомских аберација, интересовање за анализу МН интензивно је расло до данас, па се тако МН могу детектовати не само у хематопоетским ћелијама него и у различитим врстама хуманих ћелија као што су фибробласти, кератиноцити (Kawanishi *u cap.*, 2020), ексфолиатне епителне ћелије, односно ћелије букалне, назалне и уротелијалне мукозе (Hopf *u cap.*, 2020; Panico *u cap.*, 2020). Ипак, најчешће коришћене ћелије за анализу МН су лимфоцити периферне крви управо због већег разумевања механизма формирања МН у таквим ћелијама, а такође и једноставности узимања узорка. Лимфоцити су ћелије које веома дуго живе и у стању су да годинама акумулирају различита цитогенетичка оштећења што их чини изузетним маркерима изложености генотоксичним агенсима. Око 80% од укупног броја лимфоцита у периферној крви чине рециклирајући лимфоцити, који повремено излазе из циркулације, пролазе кроз слезину, лимфне жлезде и остала ткива, а затим се поново враћају у циркулацију. На основу овога се долази до закључка да хромозомске аберације нису само одраз стања лимфоцита у циркулацији, већ могу бити индуковане у било ком делу организма (Fenech, 2000).

1.6.1. Теорије о пореклу микронуклеуса

Постоје два најчешћа механизма који доводе до формирања МН у телесној ћелији: (1) прекиди на хромозомима и (2) поремећена функција деобног вретена. Кластогени агенси изазивају прекиде хромозома када настају ацентрични фрагменти који који улазе у састав МН. У другом механизму, анеугени агенси спречавају формирање деобног вретена током митозе, а резултат тога је заостајање целог хромозома

у анафази. Такви хромозоми или њихови фрагменти у току анафазе ћелијског циклуса губе оријентацију у односу на нити деобног вретена и не мигрирају ка половима ћелије. Како не улазе у састав нуклеуса у телофази ћелијске деобе формирају појединачне или вишеструке МН у цитоплазми бинуклеусне (БН) ћелије (Norrpa и Falck, 2003). Механизми формирања МН приказани су на Слици 11.



Слика 11. Шематски приказ настанка микронуклеуса

Да би се хромозомско оштећење испољило као МН неопходно је да се ћелија подели. Међутим, проласком ћелије кроз више од једне деобе, микронуклеуси настали као последица оштећења генетичког материјала се расподељују ћеркама ћелијама и самим тим њихова фреквенца се смањује. *Fenech и Morley (1985)*, аустралијски истраживачи, су поправили овај недостатак конвенционалног микронуклеус теста и увели су цитокинезис – блок МН тест. Овом методом се врши анализа ћелија које су се у култури само једном поделиле. Додавањем цитохалазина Б култивисаним ћелијама пре прве митотичке деобе, долази до заустављања цитокинезе, док кариокинеза тече неометано и као резултат настаје бинуклеусна ћелија (БН). Цитохалазин Б инхибира полимеризацију актинских филамената чиме је онемогућено формирање контрактилног прстена који је изграђен од актинских и миозинских филамената. Пошто су се ћелије само једном поделиле, као резултат хромозомских оштећења могу да настану МН (*Zalacain и сар., 2005*).

1.6.2. Предности ЦБМН теста

Поред брзине и једноставности извођења, ЦБМН тест поседује многоструке предности у односу на друге тестове који се користе за детекцију хромозомских абериација. Овај тест омогућава да се из једног узорка анализира више хиљада лимфобласта, па се добија објективнија слика о насталим оштећењима. Овим тестом се доста прецизније и једноставније утврђује фреквенца МН него конвенционалном МН методом, пошто је отклоњен проблем ћелијске кинетике. Применом конвенционалне МН методе у мононуклеусним ћелијама утврђује се дупло мања фреквенца МН него у

БН ћелијама, што иде у прилог поузданости ЦБМН теста. Тест омогућава испитивање мутагенног ефекта како физичких, тако и хемијских и биолошких агенаса, што је довело до повећаног интересовања цитогенетичара за примену овог теста у детекцији генотоксичних агенаса и његову широку примену.

Поред детекције МН, ЦБМН тест се користи и за анализу других цитогенетичких параметара генотоксичног оштећења као што су нуклеоплазматски мостови, нуклеусни пупољци, али и за израчунавање нуклеусног деобног индекса (НДИ) (*Fenech, 2007*). Израчунавањем НДИ, ЦБМН тестом се омогућава и детекција цитотоксичног ефекта. На основу односа мононуклеусних, бинуклеусних и полинуклеусних ћелија омогућена је анализа евентуалног цитотоксичног ефекта испитиваног агенса. Смањена фреквенца БН ћелија и успорена ћелијска кинетика могу бити индикатор антипролиферативног ефекта испитиваног агенса (*Fenech, 2007; Istifli u cap., 2019*). Нуклеоплазматски мостови представљају мостове између једара БН ћелије. Формирају се од дицентричних хромозома који се могу појавити због неисправног механизма поправке ДНК, фузије крајева теломера или услед неодвајања сестринских хроматида у анафазу (*Fenech u cap., 2011*). Настају услед дејства агенаса који стварају слободне радикале, попут јонизујућег зрачења или водоник-пероксида. Применом центромерних хромозом-специфичних проба, можемо утврдити да ли су центромере лоциране на крајевима оваквих дицентричних мостова (*Fenech, 2020a; Hill u Golic, 2022*). Нуклеоплазматски пупољци морфолошки веома личе на МН, али су спојени са једром ћелије тањом или дебљом дршком (*Fenech, 2007*). Настају елиминацијом амплификоване ДНК или од ослобођених ДНК репарираних комплекса (*Fenech u cap., 2011*).

1.6.3. Фактори који утичу на фреквенцу микронуклеуса

Хумани биомониторинг је од суштинског значаја за процену да ли и у којој мери материје присутне у животној средини утичу на популације, па с тога пружа драгоцене информације о изложености штетним факторима животне средине и помаже да се идентификују потенцијални здравствени ризици. Цитогенетичке методе играју пресудну улогу у биомониторингу када желимо да проценимо присуство и обим хромозомског оштећења у популацијама које су биле изложене генотоксичним агенсима. Осим индуковане постоје и базалне фреквенце различитих цитогенетичких параметара могу пружити вредне информације о акумулираним генетским оштећењима која се јављају током живота појединца (*Nefić u Hadzić, 2013; Araldi u cap., 2015; Gajski u cap., 2018*). ЦБМН тест у лимфоцитима периферне крви је метода помоћу које се, одређивањем фреквенце МН, пружају важне информације о генетичком интегритету на нивоу хромозома. До спонтаног настанка МН долази услед оштећења у лимфоцитима посредством акумулираних генетичких оштећења, која спонтано настају у току животног века циркулишућих Т-лимфоцита.

У циљу побољшања примене, разумевања и стандардизације ЦБМН теста, настао је HUMN (HUMAN Micronucleus) пројекат. Један од главних циљева овог интернационалног пројекта који је укључивао преко 50 лабораторија широм света било је утврђивање базалне МН фреквенце и дефинисање критеријума за бројање МН у БН ћелијама. Истраживање је вршено на приближно 7 000 здравих људи и утврђено је да је просечна базална фреквенца МН износила 6,5 МН на 1000 анализираних БН ћелија (*Bonassi u cap., 2001*). Овим пројектом су сагледани и различити егзогени и ендогени фактори који потенцијално доводе до промене у базалној МН фреквенци.

1.6.3.1. Утицај ендогених фактора на фреквенцу микронуклеуса

Анализа утицаја потенцијалних ендогених фактора који могу да модификују фреквенцу МН, представљају предмет интересовања многих научника. Доступни литературни подаци указују на то да постоје опречна мишљења о утицају старости на фреквенцу МН. *Neri u cap. (2006)* у студији која је укључивала 170 индивидуа, старости од 0-18 година, показали су да не постоји узрочно-последична веза година са фреквенцом МН. До истих закључака су дошли *Wojda u cap. (2007)* испитујући фреквенцу МН у популацији старијој од 60 година.

Супротно томе, већина аутора се слаже да са повећањем година старости, долази до повећане учесталости хромозомских аберација и да ефекти старења представљају комбинацију генетички програмираних процеса и генетичких промена изазваних комбинацијом егзогених и ендогених фактора. Током процеса старења, услед смањења репаративних способности ћелија да поправе оштећења ДНК, долази до повећања осетљивости ћелија на генотоксичне агенсе што последично може акумулирати мутације (*Chen u cap., 2003; Nassour u cap., 2016*). Постојање позитивне корелације између година старости и МН фреквенце утврдиле су бројне студије (*Milošević-Djordjević u cap., 2002; Ferraz u cap., 2016; Cho u cap., 2017*). *Milošević-Djordjević u cap. (2002)* су показали да до 40. године старости повећава се фреквенца МН, а да након 40. године долази до смањења пролиферационог капацитета и до опадања МН фреквенце. Резултати истраживања *Franzke u cap. (2014)* старије популације (65-98) показују да око 60. године старости долази до уједначавања у расту и да не постоји промена у МН фреквенци, што су аутори објаснили могућношћу да су старије особе развиле отпорност на хромозомска оштећења и формирање МН или се микронуклеусне ћелије чешће подвргавају процесу апоптозе. Студија која је спроведена у Италији 2020. године од стране *Santovito u Gendusa* је показала да годинама старости долази до прогресивног накупљања геномског оштећења, што за последицу има пораст МН фреквенце. Такође, у недавно објављеној студији, *Laffon u cap. (2021)* су закључили да је учесталост МН погодан биомаркер геномске нестабилности у старењу.

Веза између пола и фреквенце МН проучавана је од стране великог броја аутора, а доступни литературни подаци указују на то да је дистрибуција МН различита код мушког и женског пола (*Bonassi u cap., 2001; Wojda u cap., 2007; Garaj-Vrhovac u cap., 2008; Nefić u Handzić, 2013*). На основу података добијених из многобројних студија дошло се до закључка да жене имају повећан број МН у односу на мушкарце и да се повећана учесталост МН код жена приписују анеуплоидији, најчешће полног X хромозома (*Fenech u Bonassi, 2011; Nefić u Handzić, 2013; Gajski u cap., 2018; Fenech, 2020a*).

1.6.3.2. Утицај егзогених фактора на фреквенцу микронуклеуса

Утицај животних навика као што је конзумирање цигарета на фреквенцу МН, биле су предмет интересовања многих студија, од којих су само поједине показале да особе које конзумирају цигарете имају повишену фреквенцу МН у односу на контролну групу, односно групу непушача (*Pereira da Silva u cap., 2015; Dosi u cap., 2016; Mohammed u cap., 2020*).

Са друге стране, у већини спроведених студија није пронађена позитивна корелација између конзумирања цигарета и фреквенце МН (*Bonassi u cap., 2003; Milošević-Djordjević u cap., 2012; Coskun u cap., 2013; Siama u cap., 2019; Vital u cap., 2021*). Подаци о утицају пушења на фреквенцу МН сумирани су из бројних и обимних биомониторинг студија окупљених око HUMAN пројекта (*Bonassi u cap., 2003*). У

истраживању је учествовало 5710 испитаника, од тога 3501 непушача и 1409 активних пушача и 800 повремених пушача. На основу добијених података из 25 лабораторија показано је да пушачи немају значајно вишу МН фреквенцу у односу на непушаче и да је значајно повећање МН фреквенце запажено само код тешких пушача (оних који конзумирају више од 30 цигарета дневно).

Генотоксични ефекат алкохола анализирали су *Reis u cap. (2002)*. Студија је укључивала 40 индивидуа од којих су 20 били апстиненти од алкохола и дувана, док су других 20 конзумирали алкохол. Учесталост МН је била значајно већа код особа које су конзумирале алкохол у односу на апстиненте. Супротно, на узорку хрватске популације *Gajski u cap. (2018)* су показали да алкохол нема ефекта на МН фреквенцу. Такође, једна недавна студија, *Reimann u cap. (2020)* је дошла до истог закључка да конзумирање алкохола нема ефекта на фреквенцу МН код 327 индивидуа, од којих 214 нису конзумирали алкохол, док су 113 били конзументи.

Идентификовано је око 40 микронутријената укључујући витамин В12, фолну киселину, гвожђе, калцијум, магнезијум чији је оптималан унос у организам неопходан за одржавање здравља. Многи од њих, сами или у комбинацији, неопходни су у синтези и репарацији ДНК, као и у спречавању оксидативног оштећења. Све више литературних података указује на то да недостатак микронутријената доводи до грешака у репликацији и репарацији, што за последицу има геномску нестабилност (*Ladeira u cap. 2017; Fenech, 2020b; Kaźmierczak-Barańska u cap., 2020; Alnabbat u cap., 2022*).

Повезаност МН са исхраном забележено је још давне 1961. године. Аутори су, испитујући повезаност анемије са недостатком витамина В12, учили формирање МН у еритроцитима. Формирање МН у лимфоцитима периферне крви повезано је са концентрацијом фолата, витамина В12, рибофлавина у плазми, бета-каротена, витамина Е, ретинола, калцијума (*Fenech u cap., 2011; Ladeira u cap., 2017; Wlodarczyk u cap., 2018; Wagner u cap., 2020; Alnabbat u cap., 2022*). Витамини, минерали и фолна киселина укључени су у процес репликације и репарације ДНК, али учествују и у превенцији оксидативних оштећења, па самим тим поремећај у уношењу ових једињења може довести до повећане фреквенце МН. Конзумација воћа и поврћа и суплементација изолованим дијететским једињењима или мултивитаминима имају позитиван утицај на смањење оштећења ДНК (*dos Santos u cap., 2020*). *Huang u cap. (2009)* су показали да особе чија је исхрана била богата поврћем, воћем и рибом имају нижу МН фреквенцу, док је исхрана богата протеинима и угљеним хидратима повећавала ниво хромозомских аберација (*Ladeira u cap., 2017*). *Prado u cap. (2010)* су потврдили да начин исхране заснован на интегралним житарицама, воћу, поврћу и мало прерађене хране може допринети мањем оштећењу ДНК. *Ožvald u cap. (2021)* су испитивали утицај нискокалоричне дијете на фреквенцу МН код високогोजазних особа применом ЦБМН теста. Резултати су показали да су се сви параметри геномске нестабилности значајно смањили након тронедељне дијете.

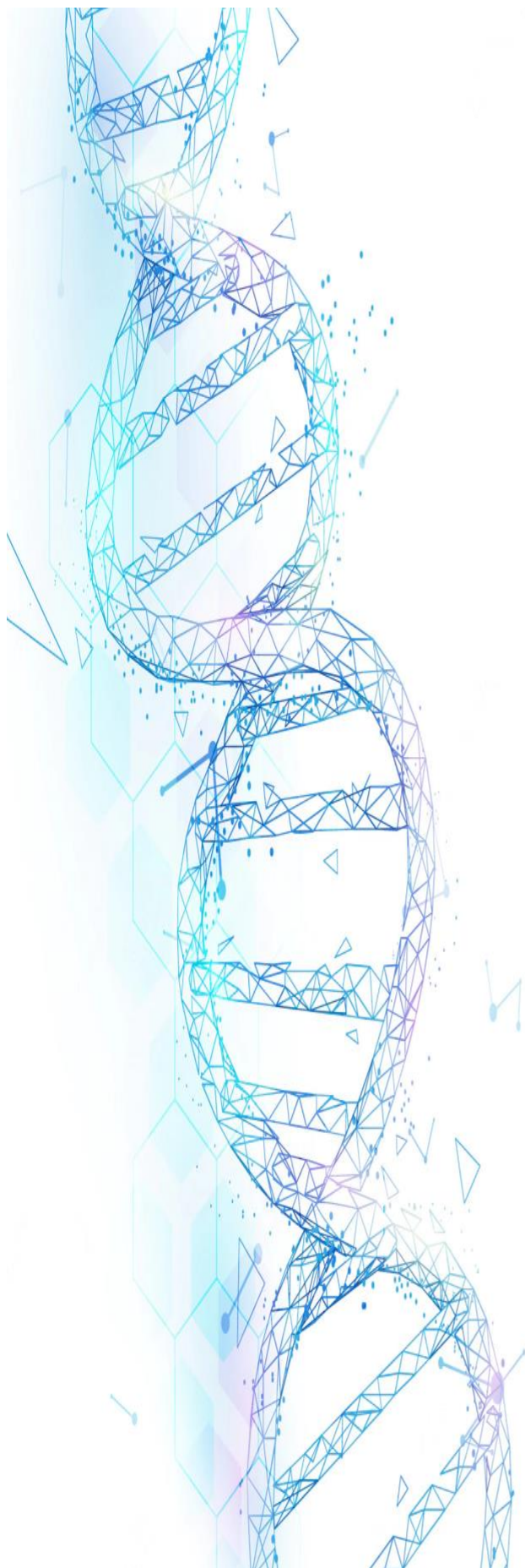
Поред наведених егзогених фактора, веома важан фактор у инциденци хромозомских оштећења је и физичка активност, односно ниво кондиције. Интензивно физичко вежбање изазива стрес који услед пораста стварања слободних радикала повећава ризик од оштећења ДНК (*Sharma u Gandhi, 2012*). Са друге стране, умерено и редовно вежбање појачава одбрамбене механизме против оксидативног стреса и редукује фреквенцу МН, односно доводи до стабилности генома (*Fenech u cap., 2011; Radak u cap., 2013; Šošić u Varjačić, 2015*).

1.7. Ефекат врста рода *Artemisia* на хумани геном

Иако се људска популација ослања на употребу биљака у лечењу различитих болести, процена могућег генотоксичног ефекта биљака, њихових екстраката или састојака није увек темељно испитана. Из тог разлога, много више пажње треба посветити испитивању биолошких ефекта медицинских биљака, укључујући и њихове евентуалне штетне ефекте на здравље људи и генетички материјал. Многе биљне врсте које се традиционално користе у народној медицини поседују генотоксичне особине или друге штетне ефекте по здравље људи (*Rietjens u cap., 2005; Rody u cap., 2018*).

Литературни подаци указују на то да генотоксични и антимулагени ефекат биљака *A. vulgaris* и *A. alba* није истраживан. Генерално, испитивање потенцијалног генотоксичног дејства ефекта биљака рода *Artemisia* било је предмет само неколико студија. *Aberrahman u Shbailat (2014)* су показали да етанолски екстракт *A. herba-alba* индукује SCE и МН у коштаном сржи и мононуклеусним ћелијама периферне крви. Друга група аутора је показала да етанолски екстракт *A. absinthium* производи снажну генотоксичну активност и индукује значајно повећање МН фреквенце у лимфоцитима периферне крви *in vitro* (*Harutyunyan u cap., 2019*). Такође, излагање високим дозама етанолског екстракта исте биљке доводи до хромозомских аберација у ћелијама коштане сржи мишева, те је препоручена употреба само у малим дозама (*Yousef, 2014*). Недавно истраживање *Ћetković u cap. (2021)* применом комет теста показало је да алкохолна тинктура *A. annua* значајно повећава ниво оштећења ДНК у лимфоцитима периферне крви *in vitro*.

Применом различитих параметара за процену генотоксичности (митотски и индекс репликације, хромозомске аберације и SCE) *Daradka u Alshibly (2012)* су известили да ацетонски екстракт *A. herba-alba* није узроковао мутагени ефекат у лимфоцитима периферне крви. Исти аутори су показали да биљка поседује протективни ефекат на етинилестрадиолом индуковану генотоксичност у култивисаним лимфоцитима. Као објашњење својих резултата, аутори су навели могућност да једињења присутна у екстракту могу деловати као блокатори, спречавајући на тај начин метаболичку активацију промутагена. *Yun u cap. (2017)* су показали да екстракт биљке *A. capillaris* није испољио генотоксично дејство у низу примењених тестова (Ејмсов тест, тест хромозомских аберација *in vitro* и *in vivo*, МН тест).



2. Циљ рада

Имајући у виду да се биљке *A. vulgaris* и *A. alba* користе у народној медицини у лечењу различитих обољења, а такође и недовољну истраженост њихових ефеката постављени су циљеви ове докторске дисертације:

- ❖ Одређивање количине укупних фенолних једињења и флавоноида у метанолским, ацетонским и воденим екстрактима
- ❖ Идентификација и квантификација фенолних једињења присутних у метанолским, ацетонским и воденим екстрактима применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC)
- ❖ Анализа цитотоксичног ефекта екстраката на линији ћелија колоректалног карцинома (SW-480) и линији мезенхималних матичних ћелија периодонцијума (PDLS), применом МТТ теста
- ❖ Анализа потенцијалног синергистичког ефекта екстраката и цитостатика (митомицин Ц) у ћелијама колоректалног карцинома (SW-480) и мезенхималним матичним ћелијама периодонцијума (PDLS), применом МТТ теста
- ❖ Утврђивање типа ћелијске смрти индукованог изабраним биљкама у појединачним и комбинованим третманима на линији SW-480 ћелија применом проточне цитометрије
- ❖ Анализа генотоксичног ефекта екстраката (метанолски, ацетонски и водени) у култивисаним хуманим лимфоцитима периферне крви, применом ЦБМН теста као валидног теста за процену геномске нестабилности
- ❖ Анализа потенцијалног комутагеног/антимутагеног ефекта екстраката на митомицином Ц индуковану геномску нестабилност у лимфоцитима периферне крви *in vitro* применом ЦБМН теста
- ❖ Анализа ефекта најзаступљенијег фенола и флавоноида у екстрактима биљке



3. Материјал и методе

3.1. Материјал

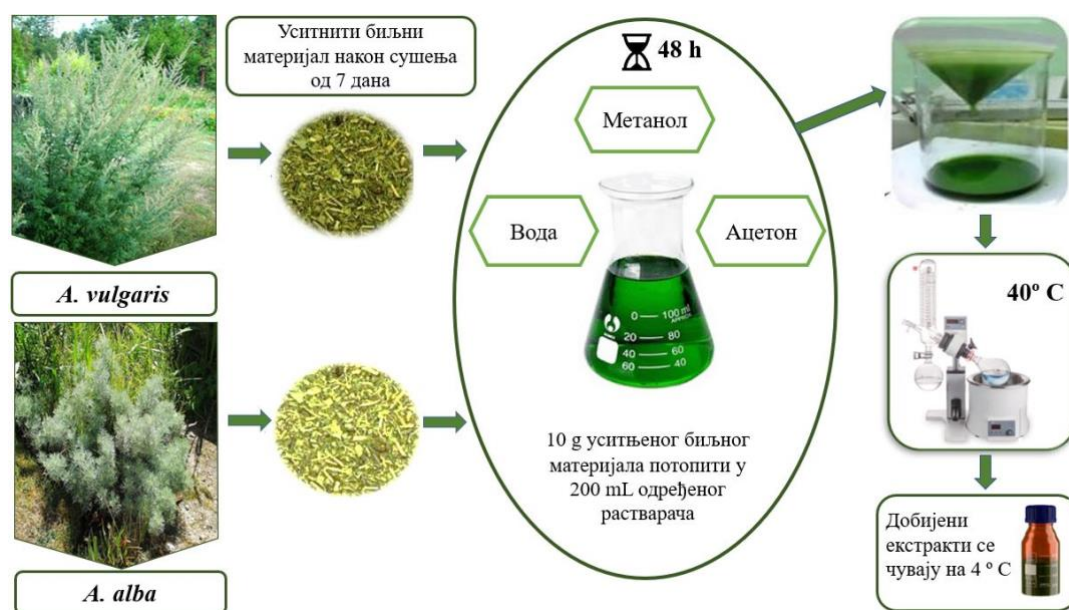
3.1.1. Узорковање, припрема и анализе биљног материјала

3.1.1.1. Узорковање биљака *A. vulgaris* и *A. alba*

Надземни делови биљака су сакупљени у централном делу Србије, на планини Гоч (*A. vulgaris*: 43°36'44"N 20°41'58"E; *A. alba*: 43°34'19"N 20°41'24"E), у августу 2018. године. Сакупљени материјал биљака је систематисан и депонован у хербаријуму Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и води се под систематским бројем 137/22 за *A. alba* и 138/22 за *A. vulgaris*. Прикупљени узорци биљака су коришћени за припрему метанолских, ацетонских и водених екстраката.

3.1.1.2. Припрема биљних екстраката

Сакупљени биљни материјал је сушен је у лабораторијским условима на тамном и промајном месту, у танком слоју, у температурним условима од 18 до 22°C, са варирањем влажности ваздуха од 55 до 65%. Након седмодневног процеса сушења, биљни материјал је уситњен и до процеса екстракције се налазио у тамним стакленим посудама. Од уситњеног биљног материјала је измерено 10 g узорка који је пребачен у тамне бочице и потопљен у 200 mL метанола, ацетона или воде (у зависности од врсте екстракта) и као такав је чуван у лабораторијским условима. Након 48 сати добијени екстракти су филтрирани уз помоћ Whatman No. 1 филтер папира и упарени под сниженим притиском на ротационом вакуум упаривачу (ИКА Rotary Evaporator – WU-28710-00) при температури од 40°C до постизања сувог стања. Добијени биљни екстракти су чувани до даљег коришћења у тамним реагенс бочицама, на температури од 4°C, (Stanković и сар., 2011). Шематски приказ екстракције биљака приказан је на Слици 12.



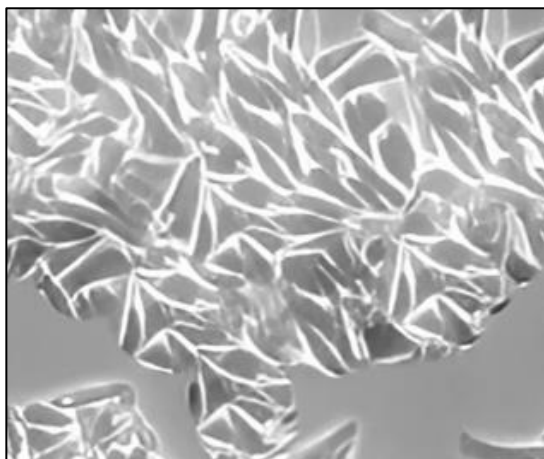
Слика 12. Поступак припремања екстраката испитиваних биљних врста

3.1.2. Коришћене ћелијске линије

Ћелије су гајене у строго контролисаним, стерилним и дефинисаним условима који су специфични за сваку ћелијску линију и опонашају средину из које дате ћелије потичу. За потребе истраживања, коришћени су фласкови, површине 25 и 75 cm², а ћелије су одржаване у хранљивом медијуму -DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) са додатком 10% феталног говеђег серума и 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Ћелије су гајене у инкубатору у којем су дефинисани услови средине за раст и размножавање ћелија који подразумевају влажну атмосферу са концентрацијом 5% CO₂ и температуром од 37°C.

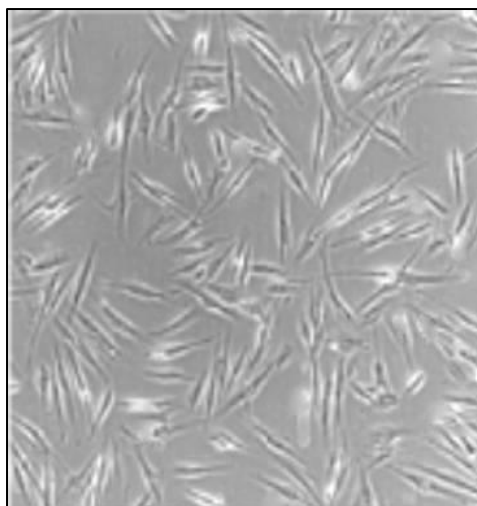
Испитивање цитотоксичног дејства метанолских, ацетонских и водених екстраката биљака *A. vulgaris* и *A. alba* вршено је на две ћелијске линије - ћелијска линија хуманог карцинома колона (SW-480) и мезенхималне матичне ћелије периодонцијума (PDLs).

SW-480 је имортализована, адхерентна ћелијска линија колоректалног аденокарцинома која поседује експримирани ген за епидермални фактор раста и мутацију у кодону 12 за *RAS* протоонкоген. Морфолошки изглед SW-480 ћелија приказан је на Слици 13.



Слика 13. Морфолошки изглед SW-480 ћелијске линије колоректалног карцинома

Као здрава ћелијска линија коришћене су мезенхималне матичне ћелије периодонцијума (PDLs), добијене примарном култивацијом (*Miletić u cap., 2014*) (Слика 14). Изоловане ћелије из здравих ткива периодонцијума морфолошки подсећају на фибробласте, имају способност адхерентности и формирања колонија, као и мултипотентни потенцијал диференцијације.



Слика 14. Морфолошки изглед мезенхималних матичних ћелија периодонцијума

3.1.3. Узорковање крви

Експериментални узорак чинила су четири здрава донора (2 жене и 2 мушкарца) старости 24-32 године. Донори предходно нису били изложени познатим мутагенима животне средине. Пуна хепаринизована периферна крв (0,5 mL) је засејана је у 5 mL комплетног медијума за култивацију лимфоцита (PB-Max Karyotyping Medium, Ivitrogen, California, USA). Експерименти су изведени у складу са смерницама Декларације Светског медицинског удружења из Хелсинкија.

3.2. Методе

3.2.1. Методе за одређивање садржаја укупних фенолних једињења у биљним екстрактима

Количина укупних фенола и флавоноида у различитим (метанолски, ацетонски и водени) екстрактима биљака *A. vulgaris* и *A. alba* утврђена је спектрофотометријским методама коришћењем UV/Vis спектрофотометара Nanocolor (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Duren, Germany) и Agilent (St. Clara, USA).

3.2.1.1. Одређивање садржаја укупних фенолних једињења у биљним екстрактима

Применом Фолин-Чиокалте (Folin-Ciocalteu, Sigma-Aldrich, Chemie, Steinheim, Germany) реагенса утврђена је укупна количина фенолних једињења у испитиваним биљним екстрактима, према методи који су описали Singleton и сар. (1999). Метода се темељи на мерењу редуccionе способности фенолних једињења из раствореног екстракта. Дисосовањем фенолних једињења настаје протон и феноксидни анјон који редукује Фолин-Чиокалте реагенс до плаво обојеног продукта.

За анализу су коришћени биљни екстракти, добијени описаним методама екстракције у концентрацији 1 mg/mL. Узорак је припремљен мешањем 0,5 mL одређеног раствора екстракта, 2,5 mL 10% Фолин-Чиокалте реагенса раствореног у води и 2,5 mL раствора NaHCO₃ концентрације 7,5%. Као следеће пробе уместо екстракта биљака коришћена је иста запремина растварача (0,5 mL). Након припреме узорака, они

се даље инкубирају у термостату 15 минута на температури од 45°C након чега се читава апсорбанца на спектрофотометру (ISKRA, MA 9523-SPEKOL 211), на таласној дужини од 765 nm.

Коришћењем калибрационе праве галне киселине детектован је садржај укупних фенола у добијеним екстрактима. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве прочитана је количина укупних фенолних једињења у испитиваним екстрактима и изражена као еквивалент галне киселине (mg/mL GA/g екстракта).

3.2.1.2. Одређивање садржаја флавоноида у биљним екстрактима

Применом спектрофотометријске методе, коришћењем $AlCl_3$ утврђен је укупан садржај флавоноида у испитиваним биљним екстрактима, према методи који су описали *Quettier и сар. (2000)*. Метода се базира на могућности флавоноида из раствора екстракта да са $AlCl_3$ формира металокомплекс, чији интензитет боје је пропорционалан количини присутних флавоноида.

За анализу су коришћени метанолски, ацетонски и водени биљни екстракти, добијени описаним методама екстракције у концентрацији 1 mg/mL. Узорак је припремљен мешањем 0,5 mL одређеног раствора екстракта, и 1 mL 2% раствора $AlCl_3$. Слепа проба је припремљена на исти начин, без додатка $AlCl_3$. Након припреме, узорци су инкубирани 1 сат на температури од 22°C и читавана је апсорбанца на спектрофотометру (ISKRA, MA 9523-SPEKOL 211), на таласној дужини од 415 nm.

Коришћењем калибрационе праве за стандардни раствор рутина, одређен је садржај укупних флавоноида у испитиваним екстрактима. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве прочитана је количина флавоноида у испитиваним екстрактима и изражена као еквивалент рутина (mg Ru/g екстракта).

3.2.1.3. Течна хроматографија високих перформанси (*high-performance liquid chromatography* или *HPLC*)

За идентификацију и квантификацију фенола и флавоноида у екстрактима биљака *A. vulgaris* и *A. alba* коришћен је Shimadzu Prominence HPLC апарат који се састоји од LC-20АТ пумпе, DGU-20А дегасера, СТО-20А пећи за колону, мануелног ињекторског система са петљом од 20 μ L, SPD-M20А PDA („Photo Diode Array detector“) детектора и CBM-20А Prominence 3 контролера система. За анализу узорака коришћена је Luna C18 колона (димензија 250 x 4,6 mm, величина честице 5 mm, Phenomenex, USA). Мобилна фаза састојала се од (А) ацетонитрила (MeCN) и (Б) воде (H_2O) : сирћетне киселине (AcOH) = 100 : 1 (v/v). Проток мобилне фазе подешен је на 1 mL/min, док је пећница подешена на 34°C. При анализи која је трајала 80 минута коришћен је следећи програм: изократско елуирање са 95% В (0-10 min), линеарно градијентно од 95% до 91% В (10-15 min), линеарно градијентно од 91% до 87% В (15-18 min), линеарно градијентно од 87% до 85% В (18-24 min), линеарно градијентно од 85% до 80% В (24-30 min), линеарно градијентно од 80% до 77% В (30-35 min), линеарно градијентно од 77% до 72% В (35-40 min), линеарно градијентно од 72% до 65% В (40-45 min), линеарно градијентно од 65% до 60% В (45-50 min), линеарно градијентно од 60% до 55% В (50-55 min), линеарно градијентно од 5% до 50% В (55-60 min), линеарно градијентно од 50% до 30% В (60-65 min), линеарно градијентно од 30% до 10% В (65-75 min), и изократско на 95% В (75-80 min).

Коришћењем PDA детектора пратила се апсорпција у области од 200 до 800 nm, док су UV-Vis спектри фенолних једињења детектовани на 260 nm за протекатехинску,

ванилинску, 3,5-дихидроксибензоєву киселину и за сиригин, рутин, и кверцетин 3-О-глукопиранозид. На 280 nm детектовани су сиригинска и *trans*-цинаметна киселина, на 320 nm *p*-кумаринска, 2,5-дихидроксибензоєва, хлорогенска и ферулинска киселина и на 340 nm детектован је фисетин. Феноли и флавоноиди за потребе истраживања набављени су од Sigma-Aldrich (Chemie, Steinheim, Germany).

Биљни екстракти (50 mg) *A. vulgaris* и *A. alba* коришћени за квантификацију, првобитно су растворени у 1 mL метанола како би се добила концентрација од 50 mg/mL. Тако добијени екстракти су, затим, филтрирани преко 0,45 μ m филтера (Millipore, Billerica, MA, USA) пре HPLC анализе.

Полазни раствори стандарда су направљени у метанолу (1000 mg/mL), а потом су филтрирани преко 0,45 μ m филтера (Millipore, Billerica, MA, USA). Радни раствори стандарда (500 mg/mL у метанолу) су употребљени за одређивање ретенционих времена по горе наведеним условима елуирања, као и таласним дужинама на којима се прате хроматографски пикови. За квантитативну анализу испитиваних екстраката направљен је полазни раствор који садржао све стандарде у метанолу, при чему је концентрација сваког износила 1000 mg/mL. Од тако направљеног полазног раствора, даље је прављена серија радних раствора концентрација у опсегу од 500 mg/mL до 1 mg/mL како би се направила калибрациона крива. Сви раствори стандарда су чувани на температури од 4°C.

За идентификацију појединачних супстанци у испитиваним екстрактима вршена су упоређивања ретенционих времена и UV-Vis спектра раздвојених компоненти испитиваног узорка и стандарда. Избор коришћених стандардних једињења утврђен је на основу литературних података и доступних стандардних једињења.

Концентрације свих једињења у анализираним екстрактима су израчунате из површине пика коришћењем једначине за линеарну регресију која је добијена из калибрационе криве.

Граница детекције (LOD) за однос сигнал : шум = 3 и граница квантификације (LOQ) за однос сигнал : шум = 10 за свако једињење одређена је по већ описаним хроматографским условима. Опсег линеарности је дефинисан на основу конструисане калибрационе криве, као функционална зависности површине пика према концентрацији.

3.2.2. Испитивање цитотоксичног ефекта и одређивање типа ћелијске смрти

3.2.2.1. Поступак одлеђивања ћелија

Ћелије се чувају у кријовајлицама у посебним посудама испуњеним течним азотом (Spectrum Series 20) на -196°C. Пре сваког експеримента приступа се процесу одлеђивања ћелија при чему се 1 mL ћелијске суспензије ресуспендује у 5 mL хранљивог медијума. Даље је неопходно ћелијску суспензију центрифугирати у трајању од 10 минута на 1200 rpm. Супернатант се аспирира вакуум пумпом, док се преостали талог ћелија ресуспендује у 5 mL медијума и пребацује у фласк површине 25 cm².

3.2.2.2. Поступак пасажирања ћелија

Коришћене ћелијске линије су адхерентне, односно везују се за површину флашка. Када ћелије достигну конфлуентност од 80-90%, потребно је извршити пренос ћелија у нов фласк (пасажирати) јер услед искоришћених хранљивих супстанци из медијума, почињу да умиру (Freshney, 1983). Употребом трипсина, који раскида

пептидне везе, са додатком EDTA који везује јоне магнезијума и калцијума неопходне за формирање међућелијских веза, раскидају се везе ћелија са површином. Трипсинизација укључује процес испирања ћелија са 1 mL 0,25% трипсин/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), за фласк површине 25 cm², односно 2 mL за фласк површине 75 cm². Након 3-5 минута, ћелије су одлепљене од површине и плутају као појединачне ћелије. Додавањем свежег хранљивог медијума (DMEM- Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) омогућено је неутралисање активности трипсина.

3.2.2.3. Поступак одређивања броја и вијабилности ћелија

Број вијабилних односно живих ћелија је одређиван тестом са трипан плавим чији се принцип заснива на селективности ћелијских мембрана које су непропусне за ову боју, па с тога се у цитоплазми вијабилних ћелија не уочава плава боја. Уколико је пермеабилност ћелијских мембрана нарушена услед ћелијске смрти, трипан плаво боји је омогућен пролазак кроз мембрану при чему се под микроскопом може уочити плава боја у цитоплазми ових ћелија. Поступак започиње мешањем 10 µL ћелијске суспензије са 10 µL трипан плавим. Након тога, смеша је наливана у коморицу за бројање ћелија на хемоцитометру (Improved Neubauer cell counting chamber). Бројање ћелија је вршено у два велика дијагонална квадрата, површине 0,0003 mm² на хемоцитометру под светлосним инвертним микроскопом. Средње вредности броја из два квадрата коришћене су у прерачуна за одређивање броја ћелија по милилитру суспензије, узимајући у обзир разблажење и димензије коморе. Број и вијабилност ћелија су прерачуната према следећим формулама:

Број ћелија/mL = средња вредност броја ћелија у оба квадрата x разблажење x 10⁻⁴ (корекциони фактор - дубина коморе и запремина у 1 mL)

% Живих ћелија = број живих ћелија/укупан број ћелија (живе и неживе) x 100.

Број ћелија потребних за експерименте је варирао у односу на експеримент, док је вијабилност ћелија коришћених у експериментима увек била већа од 90%.

3.2.2.4. Ћелијски третмани

У третманима ћелија коришћени су метанолски, ацетонски и водени екстракти биљака *A. vulgaris* и *A. alba*, док су у комбинованим третманима коришћени екстракти биљака у комбинацији са ММЦ (0,5 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Предходно припремљени екстракти првобитно су растворени у DMSO-у (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), након чега су се додатно разблаживали хранљивим медијумом, тако да радни раствор буде концентрације 1 mg/mL. Добијени радни раствори су филтрирани кроз стерилан филтер, са порама од 0,2 µm. Концентрација DMSO-а у највишој коришћеној концентрацији је 0,5%.

За одређивање цитотоксичних ефеката *A. vulgaris* и *A. alba*, SW-480 и PDLС ћелије засејане су у микротитар плоче са 96 отвора (1x10⁵ ћелија по бунарићу). Након 24 сата од почетка инкубационог периода, ћелије су третиране са 100 µL метанолског, ацетонског и воденог екстракта биљака (концентрација 1, 10, 50, 100, 250 и 500 µg/mL) и ММЦ (концентрација 0,1, 1, 10, 50, 100 и 500 µM). Нетретираним (контролним) ћелијама је замењен хранљиви медијум.

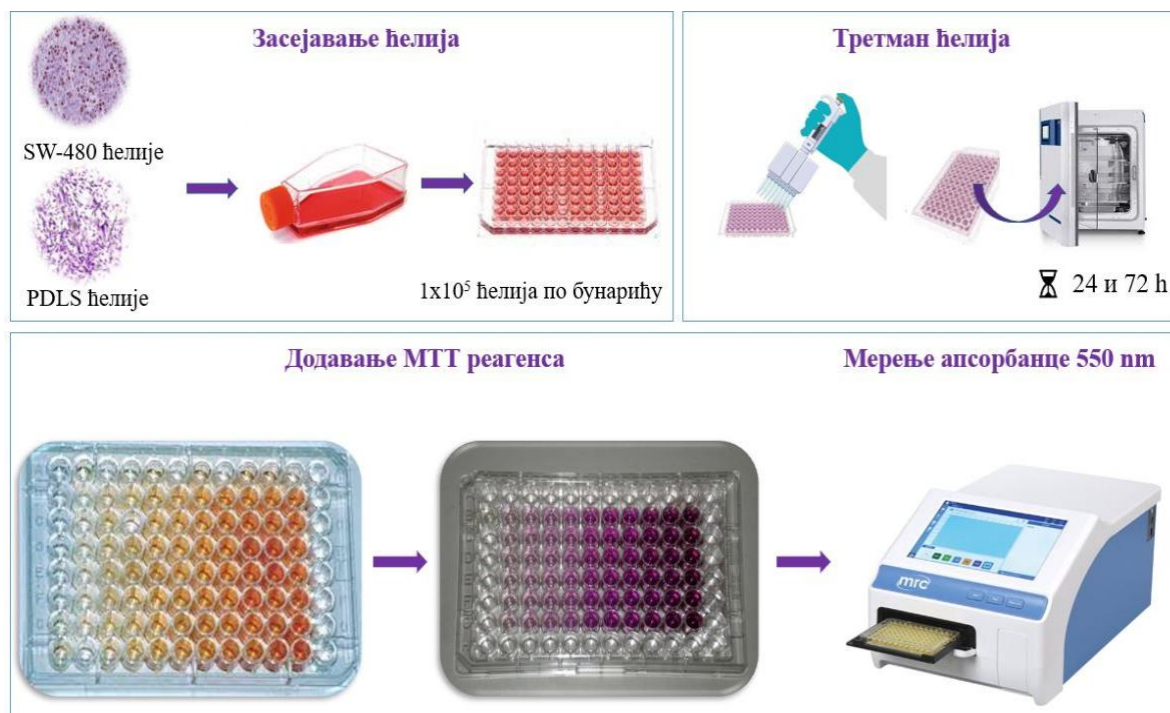
За испитивање потенцијалних синергистичких цитотоксичних ефеката између испитиваних биљних екстраката и ММЦ, SW-480 и PDL5 ћелије су третиране са 50 μL метанолског, ацетонског и воденог екстракта биљака одговарајућих концентрација (1, 50, 100, 250 и 500 $\mu\text{g/mL}$) и 50 μL одговарајуће концентрације ММЦ (0,5 $\mu\text{g/mL}$).

За одређивање типа ћелијске смрти, засејане SW-480 и PDL5 ћелије су након 24 сата инкубације третиране са 100 μL екстракта биљака (концентрација 10 и 100 $\mu\text{g/mL}$). У циљу утврђивања типа ћелијске смрти у комбинованим третманима ћелијама је упоредо додаван и ММЦ у концентрацији од 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Контролним ћелијама је замењен хранљиви медијум.

3.2.2.5. Испитивање цитотоксичног ефекта МТТ тестом

Цитотоксични ефекат испитиваних биљних врста анализиран је применом МТТ теста који се заснива на способности вијабилних ћелија да преузму МТТ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) и да га затим редукују до формаза, који је нерастворан у води (Mosmann, 1983). Количина редукованог формаза директно је пропорционална броју вијабилних ћелија. Резултат реакције је промена боје од жуте ка љубичастој, коју заправо даје редуковани формазан и може се квантификовати мерењем на спектрофотометру на одређеној таласној дужини (Слика 15).

Раствор МТТ-а (5 mg/mL) у запремини од 25 μL додаје се у сваки бунарић микротитар плоче са засејаним ћелијама, након чега се плоче инкубирају 2 сата на 37°C. По истеку инкубационог периода, садржај је аспириран, а формиран формазан се раствара додавањем 150 μL DMSO-а. Интензитет боје је директно пропорционалан количини активних ензима, односно вијабилности ћелија. Апсорбанца је мерена на ELISA спектрофотометру (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Shenzhen, China) на таласној дужини од 550 nm.



Слика 15. Шематски приказ извођења МТТ теста

Да би се одредио проценат ћелијске вијабилности (%), апсорбанца (A) ћелија третираних различитим концентрацијама испитиваних екстраката се подели са апсорбанцом контролних (нетретираних ћелија) и помножи са 100. Такође је израчунавана половина максималне инхибиторне концентрације (IC₅₀), која представља концентрацију супстанце која инхибира ћелијски раст за 50% у поређењу са контролним ћелијама.

У циљу испитивања интеракције између екстраката и ММЦ примењен је комбиновани индекс (CI) при чему су упоређивани ефекти сваке појединачне коришћене концентрације добијене у комбинованим третманима са ефектима добијеним у појединачним третманима. CI индекс се израчунава према формули коју су предложили *Hemaiswarya u cap. (2013)*:

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} + \alpha(D)_1(D)_2(Dx)_1(D)_2$$

где (D)₁ представља ефекат концентрације која је добијена у комбинованом третману, (Dx)₁ ефекат концентрације у појединачном третману и (Dx)₂ ефекат ММЦ. Вредности веће од 1 представљају синергистички ефекат, а вредности испод 1 антагонистички ефекат (*Hemaiswarya u cap., 2013*).

3.2.2.6. Испитивање типа ћелијске смрти проточном цитометријом Annexin V/7-AAD бојењем

Тип ћелијске смрти утврђен је проточном цитометријом, коришћењем Annexin-V-FITC кита (Apoptosis Detection Kit, Beckman Coulter, USA). Annexin-V-FITC (Beckman Coulter, USA) је флуоресцентна боја која се везује за фосфатидилсерине који се у вијабилним ћелијама налазе на унутрашњем делу плазма мембране. На самом почетку процеса апоптозе, они се транслоцирају на њену спољашњост чиме постају доступни да се вежу за Annexin-V-FITC. За ДНК ћелија код којих је ћелијска мембрана потпуно оштећена, везује се друга боја, 7-аминоактиномицин D (*Shounan et al., 1998*). Генерално, разликујемо четири типа ћелија: (а) вијабилне ћелије које су Annexin-V-FITC (-) и 7-AAD (-); (б) ћелије у раним фазама апоптозе које су Annexin-V-FITC (+) и 7-AAD (-); (в) ћелије у касним стадијумима апоптозе које су Annexin-V-FITC (+) и 7-AAD (+) и (г) некротичне ћелије које су Annexin-V-FITC (-) и 7-AAD (+). Након одређеног времена инкубације са третманима, ћелије су трипсинизирани, испране PBS-ом (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) и ресуспендоване у ледено-хладном пуферу за везивање. Сваком узорку се додају боје Annexin-V-FITC и 7-AAD, након тога се инкубирају у мраку 15 минута. Процент вијабилних ћелија и ћелија у раној апоптози, касној апоптози и некрози одређен је коришћењем Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>) на проточном цитометру (FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer, Nyon, Switzerland).

3.2.3. Испитивање генотоксичног ефекта биљних врста

3.2.3.1. Процедура ЦБМН теста

За процену генотоксичног ефекта *A. vulgaris* и *A. alba* коришћен је ЦБМН тест по модификованој процедури коју су описали *Fenech u Morley* (1985). Пуна хепаринизована периферна крв (0,5 mL) засејана је у 5 mL комплетног медијума за култивацију лимфоцита РВ-Мах Karyotyping (Invitrogen, California, USA). Културе су инкубиране 72 сата на 37°C. У циљу заустављања цитокинезе, 44 сата од почетка инкубације културама је додаван цитохалазин Б (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), у финалној концентрацији од 4 µg/mL. Ћелије су инкубиране још 28 сати у инкубатору.

3.2.3.2. Третмани лимфоцита периферне крви

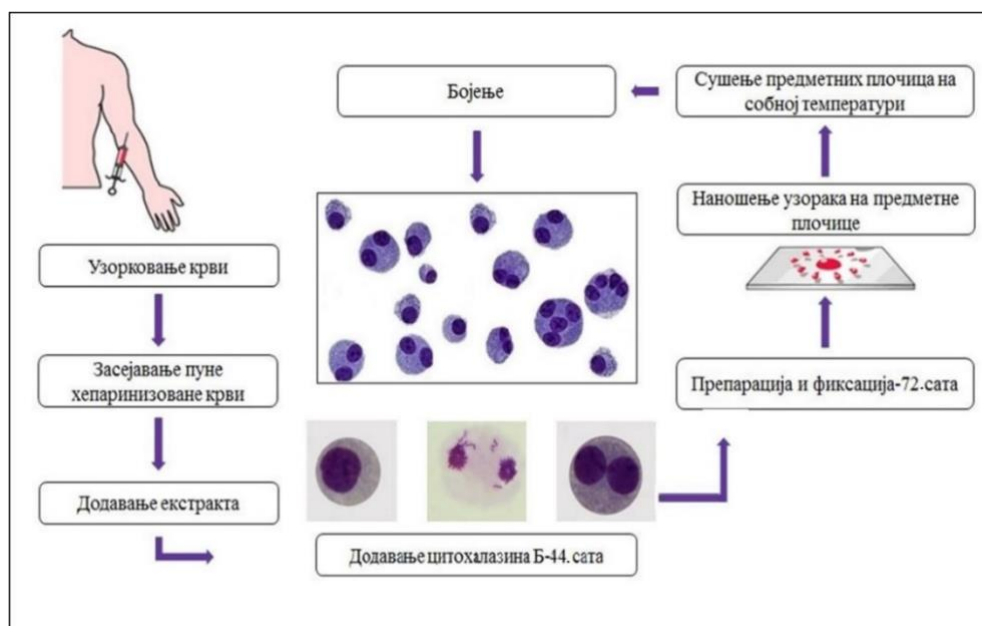
Након 24 сата инкубације вршен је третман екстрактима (метанолски, ацетонски и водени) испитиваних биљних врста *A. vulgaris* и *A. alba* у четири различите концентрације: 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL и 250 µg/mL у запремини од по 0,1 mL. С обзиром на веома важну улогу фенолског састава у биолошким активностима биљака, укључујући и генотоксични ефекат испитивали смо генотоксични потенцијал 3,5-дихидроксибензојеве киселине и кверцетин-3-О-глукопиранозида као најзаступљенијег фенолног једињења и флавоноида у воденом екстракту биљке *A. alba*. Културе лимфоцита су третиране 50, 100 и 200 µg/mL 3,5-дихидроксибензојевом киселином и 3, 11, 22 µg/mL кверцетин-3-О-глукопиранозида.

У циљу утврђивања комутагеног и синергистичког ефекта, културама је упоредо додаван и ММЦ у концентрацији од 0,5 µg/mL. Истовремено су постављане и нетретиране културе (негативна контрола) како би се утврдиле базалне МН фреквенце и НДИ вредности донора, као и културе третиране само ММЦ, које су била позитивна контрола.

3.2.3.3. Препарација и фиксација материјала

Након завршене инкубације, вршена је препарација по стандардном протоколу. Ћелијске културе су центрифугиране 12 минута на 1800 обртаја, а затим су два пута третиране хладним (4°C) хипотоничним раствором (0,56% KCl). Материјал је потом три пута фиксиран са свеже припремљеним Карнојевим фиксативом који се састоји од глацијалне сирћетне киселине и метанола у односу 1:3, 3 x 15 мин. Након последњег центрифугирања, супернатант је пажљиво одливен, а беличаст талог лимфоцита је ресуспендован у малој количини фиксатива.

Добијени материјал је потом пажљиво разливен на чисте, суве и хладне предметне плочице, које су сушене под лампом, а затим и на ваздуху у трајању од 3-4 дана. Добро осушени препарати су бојени 2% раствором гимзе (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) у трајању од 12 минута. Процедура цитокинезис блок микронуклеус теста приказан је на Слици 16.



Слика 16. Процедура цитокинезис блок микронуклеус теста

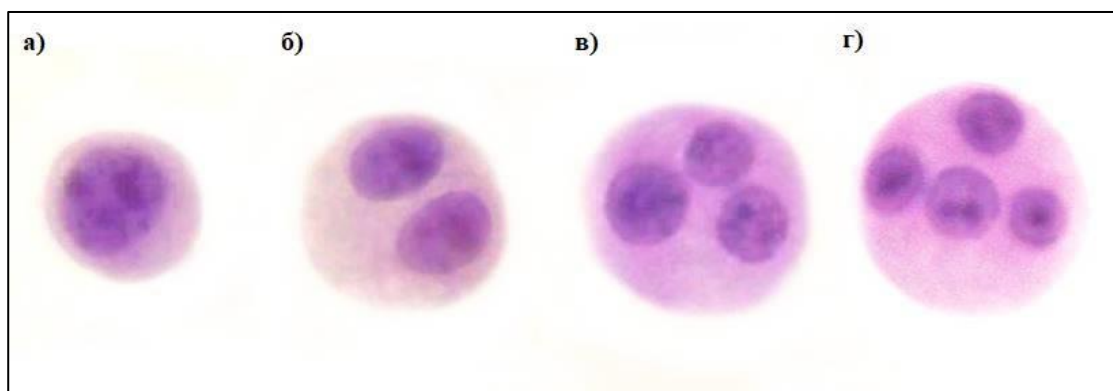
3.2.3.4. Анализа фреквенце микронуклеуса

Уз помоћ светлосног микроскопа (Nikon E50i) на увећању од 400x препарати су анализирани. Анализа МН фреквенце је вршена на 1000 бинуклеусних (БН) ћелија по донору, укупно 4000 БН ћелија по тестираној концентрацији, уважавајући критеријуме које је описао *Fenech (2007)*.

За израчунавање нукеусног деобног индекса (НДИ) анализирано је 500 додатних ћелија са 1, 2, 3 и 4 једра (Слика 17). НДИ се израчунаван према формули коју је установио *Fenech (2007)*:

$$\text{НДИ} = ((1 \times M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4))/N),$$

при чему M1 - M4 представља број ћелија са 1 - 4 једра, а N - укупан број анализираних ћелија (N=500).



Слика 17. Приказ: а) ћелија са једним једром, б) ћелија са два једра, в) ћелија са три једра и г) ћелија са четири једра

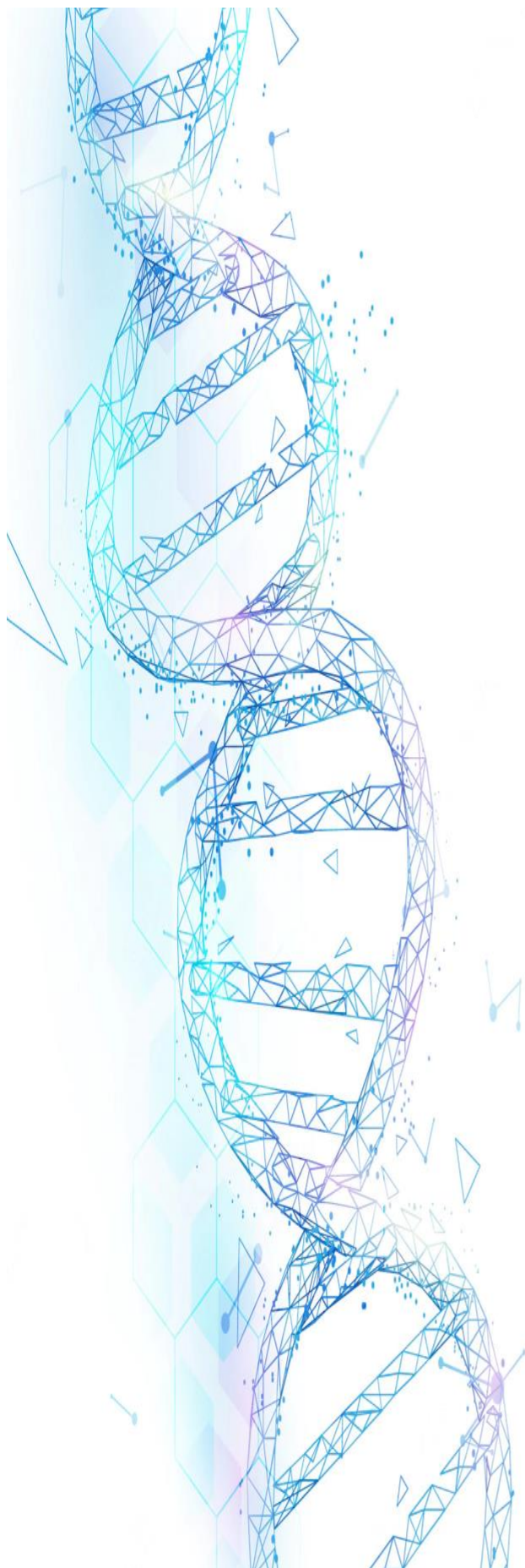
3.2.4. Статистичка анализа

Резултати укупних фенола и флавоноида приказани су као просечна вредост \pm стандардна грешка и обрађивани су применом SPSS 20.0 пакета (IBM SPSS Statistics 20), док је за обраду добијених резултата HPLC анализом коришћен софтверски програм Excel 2010.

IC₅₀ вредности су израчунате из добијених дозно зависних крива у компјутерском програму CalcuSyn, док је потенцијални синергистички или антагонистички ефекат биљних екстраката и ММЦ утврђен поређењем ефекта сваке појединачне концентрације добијене у комбинованим третманима, са ефектом добијеним у појединачним третманима. Вредности ниже од 1 означавају синергизам, док вредности више од 1 указују на антагонистички ефекат (*Hemaiswarya u cap.*, 2013).

Применом софтвера за проточну цитометрију (СХР Software for FC500 Flow Cytometry System) детектован је проценат вијабилних, рано и касно апоптотских, као и некротских ћелија.

За поређење просечних вредности фенолних компоненти, МН и НДИ примењен је Студентов *t* тест, а резултати су приказани као просечна вредост \pm стандардна девијација ($X \pm С.Д.$). Однос између тестираних концентрација екстраката и МН и НДИ је одређен Пирсоновим коефицијентом корелације. Нивои значаја су били $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.



4. Резултати истраживања

4.1. Одређивање садржаја укупних фенолних једињења и флавоноида у биљним екстрактима *A. vulgaris* и *A. alba*

Узоркован и припремљен биљни материјал је подвргнут екстракцији при чему су коришћена три растварача различите поларности: метанолски, ацетонски и водени. Резултати истраживања приказани су у Табелама 2 и 3.

Резултати анализе укупних фенолних једињења у анализираним екстрактима биљке *A. vulgaris* показали су да је метанол био најефикаснији растварач за њихову екстракцију ($117,14 \pm 0,47$ mg GaE/g), док се као најслабији растварач показала вода, где је укупна количина фенолних једињења износила $40,33 \pm 0,28$ mg GaE/g. Највећа количина флавоноида у екстрактима биљке *A. vulgaris* добијена је екстракцијом ацетонским ($137,14 \pm 0,71$ mg RuE/g), скоро дупло мања метанолским ($79,47 \pm 0,77$ mg RuE/g), а најмања количина је детектована у воденом екстракту ($12,01 \pm 0,33$ mg RuE/g) (Табела 2) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2023).

Табела 2. Количина укупних фенолних једињења и флавоноида у метанолском, ацетонском и воденом екстракту *A. vulgaris*

Врста екстракта	Укупни феноли (mg GaE/g)	Флавоноиди (mg RuE/g)
<i>метанолски</i>	$117,14 \pm 0,47$	$79,47 \pm 0,77$
<i>ацетонски</i>	$70,08 \pm 0,75$	$137,14 \pm 0,71$
<i>водени</i>	$40,33 \pm 0,28$	$12,01 \pm 0,33$

У Табели 3 су приказане добијене количине укупних фенолних једињења и флавоноида у екстрактима биљке *A. alba*. Као најефикаснији растварач за екстракцију фенолних једињења показао се метанол, у коме је укупна количина фенола била $110,21 \pm 0,58$ mg GaE/g. Флавоноиди су били у највећој количини заступљени у ацетонском *A. alba* екстракту $58,08 \pm 0,52$ mg RuE/g. Значајну количину флавоноида садржао је и метанолски екстракт ($49,91 \pm 0,95$ mg RuE/g), док се вода показала као најслабији растварач за њихову екстракцију ($6,12 \pm 0,16$ mg RuE/g).

Табела 3. Количина укупних фенолних једињења и флавоноида у метанолском, ацетонском и воденом екстракту *A. alba*

Врста екстракта	Укупни феноли (mg GaE/g)	Флавоноиди (mg RuE/g)
<i>метанолски</i>	$110,21 \pm 0,58$	$49,91 \pm 0,95$
<i>ацетонски</i>	$68,15 \pm 0,97$	$58,08 \pm 0,52$
<i>водени</i>	$30,27 \pm 0,50$	$6,12 \pm 0,16$

Када се упореде добијене вредности укупних фенола биљака, највећи садржај је детектован у метанолском екстракту биљке *A. vulgaris* ($117,14 \pm 0,47$ mg GaE/g), а најмањи у воденом *A. alba* ($30,27 \pm 0,50$ mg RuE/g). Ацетонски и метанолски екстракти биљке *A. vulgaris* били су најбогатији флавоноидима. Код обе испитиване биљне врсте најмањи садржај флавоноида детектован је у воденим екстрактима обе биљке ($12,01 \pm 0,33$ mg RuE/g код биљке *A. vulgaris* и $6,12 \pm 0,16$ mg RuE/g код биљке *A. alba*) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2023).

4.2. HPLC анализа екстраката биљака *A. vulgaris* и *A. alba*

За идентификацију и квантификацију појединих фенолних једињења присутних у метанолском, ацетонском и воденом екстракту биљака *A. vulgaris* и *A. alba* коришћена је течна хроматографија високих перформанси (HPLC) применом PDA детектора.

Идентификација појединачних супстанци у испитиваним екстрактима вршена су упоређивањем ретенционих времена и UV-Vis спектра раздвојених компоненти испитиваног узорка и стандарда. Избор примењених стандардна утврђен је на основу литературних података и доступних стандардних једињења. Као стандарди коришћена су чиста фенолна једињења која су идентификована на основу детекције раздвојених пикова на 260 nm (протекатехинска киселина, 3,5-дихидроксибензоева киселина, ванилинска киселина, кверцетин-3-*O*-глукопиранозид, сиригин, рутин и кверцетин), 280 nm (сиригинска киселина и *trans*-циметна киселина), 320 nm (хлорогенска киселина, 2,5-дихидроксибензоева киселина, ферулинска киселина и *p*-кумаринска) и 340 nm (фисетин).

У Табели 4 дати су подаци ретенционих времена, таласних дужина квантификације и њених једначина калибрационих крива. Добијени резултати показују да сва једињења имају добру линеарну корелацију, са коефицијентом $R^2 > 0,978$. LOD и LOQ су сумирани у Табели 4. Најнижа граница детекције (0,04 $\mu\text{g/mL}$) и квантификације (0,15 $\mu\text{g/mL}$) добијена је за рутин. Сиригинска киселина имала је највишу границу детекције (0,65 $\mu\text{g/mL}$), док је највиша граница квантификације добијена за *p*-кумаринску киселину (0,86 $\mu\text{g/mL}$) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020).

Табела 4. Једначине калибрационих крива за фенолна једињења и лимити детекције и квантификације

Једињење	Једначина калибрације	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
протекатехинска киселина	$Y=1,23 \times X + 1,9$	0,989	0,64	0,81
3,5-дихидроксибензоева киселина	$Y=0,23 \times X + 0,3$	0,979	0,59	0,78
сиригин	$Y=0,47 \times X + 1,1$	0,991	0,64	0,84
2,5-дихидроксибензоева киселина	$Y=0,39 \times X + 0,6$	0,993	0,61	0,79
хлорогенска киселина	$Y=0,46 \times X + 0,1$	0,991	0,09	0,19
ванилинска киселина	$Y=0,69 \times X + 1,1$	0,988	0,18	0,51
сиригинска киселина	$Y=0,49 \times X + 1,3$	0,993	0,65	0,82
<i>p</i> -кумаринска киселина	$Y=0,94 \times X + 1,8$	0,992	0,38	0,86
ферулинска киселина	$Y=0,58 \times X + 0,1$	0,998	0,32	0,72
рутин	$Y=0,32 \times X + 0,7$	0,994	0,04	0,15
кверцетин-3- <i>O</i> -глукопиранозид	$Y=0,41 \times X + 1,4$	0,997	0,11	0,15
фисетин	$Y=0,79 \times X + 1,3$	0,991	0,13	0,18
кверцетин	$Y=0,52 \times X + 1,2$	0,987	0,09	0,16
<i>trans</i> -циметна киселина	$Y=0,67 \times X + 1,4$	0,991	0,18	0,21

Параметри једначина калибрационе криве: Y -површина пика, X -концентрација анализата ($\mu\text{g/mL}$) (n = 3), R^2 -коефицијент корелације; LOD-граница детекције; LOQ-граница квантификације

4.2.1. HPLC анализа екстраката *A. vulgaris*

Резултати HPLC анализе екстраката биљке *A. vulgaris* приказани су у Табели 5 и на Слици 18.

На основу доступних стандарда фенолних једињења у метанолском екстракту *A. vulgaris* идентификовано је 8 фенолних једињења, од укупно 14 коришћених у анализи. Од фенолних киселина идентификоване су: хлорогенска, сиригинска, *p*-кумаринска, ферулинска, *trans*-циметна киселина, а од флавоноида кверцетин-3-*O*-глукопиранозид, фисетин и сиригин. Најзаступљеније фенолне киселине биле су хлорогенска ($487,25 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$) и сиригинска ($79,58 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$), а од флавоноида кверцетин-3-*O*-глукопиранозид ($85,20 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020).

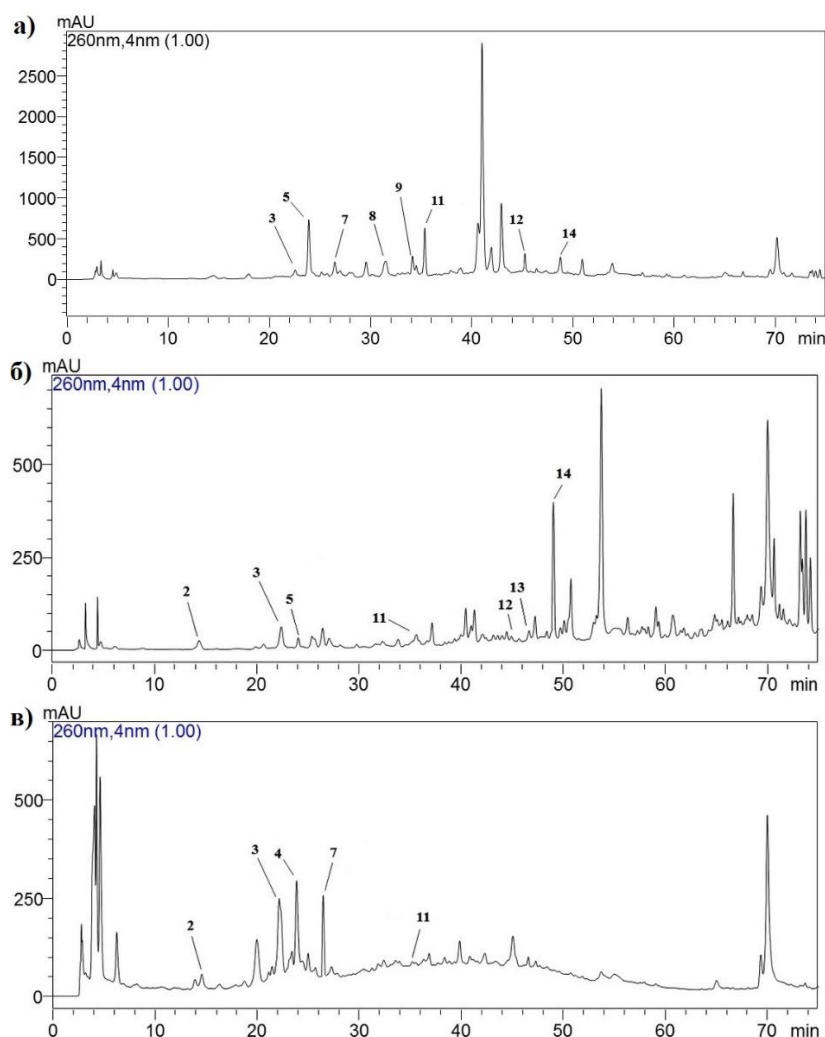
Седам фенолних једињења детектовано је у ацетонском екстракту биљке *A. vulgaris*. Од фенолних киселина то су 3,5-дихидроксибензоева, хлорогенска и *trans*-циметна киселина, а од флавоноида детектовани су кверцетин-3-*O*-глукопиранозид, фисетин, кверцетин и сиригин. Доминантно заступљена компонента у ацетонском екстракту је *trans*-циметна киселина ($49,56 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$), док су остала идентификована фенолна једињења квантитативно мало заступљена (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022).

Од укупно 14 фенолних једињења чија је количина анализирана у истраживању, у воденом екстракту биљке *A. vulgaris* идентификоване су три фенолне киселине (3,5-дихидроксибензоева, 2,5-дихидроксибензоева и сиригинска киселина) и два флавоноида (кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сиригин). Најзаступљенија фенолна киселина је била сиригинска киселина ($64,22 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$), а од флавоноида сиригин ($16,39 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022).

Табела 5. Фенолни састав метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. vulgaris*

Једињење		t (мин)	Врста екстракта		
			метанолски	ацетонски	водени
Феноли ($\mu\text{g/mL}$)					
1	протекатехинска киселина	8,94	/	/	/
2	3,5-дихидроксибензоева киселина	14,19	/	$1,11 \pm 0,11$	$2,11 \pm 0,11$
4	2,5-дихидроксибензоева киселина	23,25	/	/	$36,28 \pm 0,22$
5	хлорогенска киселина	23,62	$487,25 \pm 0,61$	$3,98 \pm 0,15$	/
6	ванилинска киселина	24,61	/	/	/
7	сиригинска киселина	26,10	$79,58 \pm 0,47$	/	$64,22 \pm 0,18$
8	<i>p</i> -кумаринска киселина	31,41	$19,23 \pm 0,34$	/	/
9	ферулинска киселина	34,24	$7,15 \pm 0,22$	/	/
14	<i>trans</i> -циметна киселина	48,17	$21,12 \pm 0,36$	$49,56 \pm 0,12$	/
Флавоноиди ($\mu\text{g/mL}$)					
10	рутин	34,33	/	/	/
11	кверцетин-3- <i>O</i> -глукопиранозид	35,24	$85,20 \pm 0,53$	$3,09 \pm 0,09$	$1,26 \pm 0,09$
12	фисетин	44,57	$1,35 \pm 0,09$	$1,29 \pm 0,15$	/
13	кверцетин	46,15	/	$2,29 \pm 0,12$	/
3	сиригин	22,14	$1,23 \pm 0,25$	$7,56 \pm 0,25$	$16,39 \pm 0,15$

Упоредном анализом добијених концентрација фенолних једињења у испитиваним екстрактима биљке *A. vulgaris*, највиша концентрација фенолних једињења присутна је у метанолском екстракту. Најзаступљеније фенолно једињење била је хлорогенска киселина, присутна у метанолском и ацетонском биљном екстракту, али у значајно већој концентрацији у метанолском ($487,25 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$), него у ацетонском екстракту ($3,98 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$). У воденом екстракту она није идентификована. Метанолски и водени екстракт садржао је и сиригинску киселину у високој концентрацији ($79,58 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ за метанолски и $64,22 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ за водени). Од флавоноида кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сиригин били су присутни у сва три испитивана екстракта, али квантитативно, метанолски екстракт је садржао највише кверцетин-3-*O*-глукопиранозид у односу на ацетонски и водени екстракт биљке, док је сиригина највише било у воденом екстракту.



Слика 18. HPLC-PDA хроматограми фенолних киселина и флавоноида присутних у различитим екстрактима *A. vulgaris*: а) метанолски екстракт, б) ацетонски екстракт, в) водени екстракт: 2. 3,5-дихидроксибензоева киселина, 3. сиригин, 4. 2,5-дихидроксибензоева киселина, 5. хлорогенска киселина, 6. ванилинска киселина, 7. сиригинска киселина, 8. *p*-кумаринска киселина, 9. ферулинска киселина, 11. кверцетин-3-*O*-глукопиранозид, 12. фисетин, 13. кверцетин, 14. *trans*-диметна киселина

4.2.2. HPLC анализа екстракта *A. alba*

У Табели 6 и на Слици 19 приказани су резултати HPLC анализе метанолског, ацетонског и воденог екстракта биљке *A. alba*.

У метанолском екстракту *A. alba* идентификовано је свих 14 фенолних једињења чија је заступљеност анализирана применом стандарда. Од фенолних киселина у високој концентрацији присутне су хлорогенска ($298,33 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$) и 2,5-дихидроксибензоева киселина ($189,97 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$), а од флавоноида кверцетин-3-*O*-глукопиранозид ($264,13 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020).

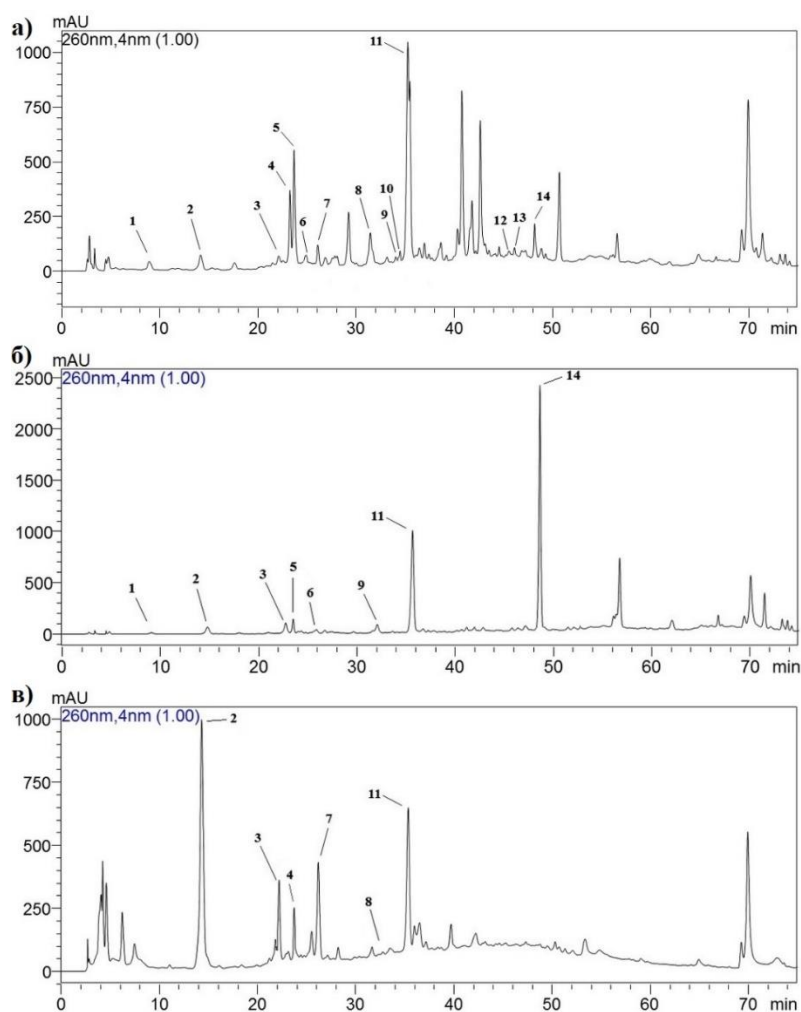
У ацетонском екстракту биљке идентификовано је шест фенолних киселина (протекатехинска, 3,5-дихидроксибензоева, хлорогенска, ванилинска, ферулинска и *trans*-циметна киселина) и два флавоноида (кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сиригин). Најзаступљенија фенолна киселина била је *trans*-циметна киселина ($298,12 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$), док је од флавоноида квантитативно најзаступљенији био кверцетин-3-*O*-глукопиранозид ($234,12 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022).

Шест фенолних једињења идентификовано је у воденом екстракту биљке од укупно 14 чија је количина анализирана у истраживању. Од фенолних киселина то су 3,5-дихидроксибензоева, 2,5-дихидроксибензоева, сиригинска и *p*-кумаринска киселина, а од флавоноида детектовани су кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сиригин. Доминантно заступљена компонента у воденом екстракту била је 3,5-дихидроксибензоева киселина ($198,98 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$). У високој концентрацији идентификована је и сиригинска киселина ($89,58 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$). Од флавоноида, једино присутни су били кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сиригин, при чему је кверцетин-3-*O*-глукопиранозида било 2,2 пута више ($75,28 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ наспрам $33,28 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022).

Табела 6. Фенолни састав метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. alba*

Једињење		t (мин)	Врста екстракта		
			метанолски	ацетонски	водени
Феноли ($\mu\text{g/mL}$)					
1	протекатехинска киселина	8,94	$1,88 \pm 0,22$	$1,11 \pm 0,25$	/
2	3,5-дихидроксибензоева киселина	14,19	$2,54 \pm 0,31$	$1,64 \pm 0,12$	$198,98 \pm 0,77$
4	2,5-дихидроксибензоева киселина	23,25	$189,97 \pm 0,12$	/	$21,99 \pm 0,31$
5	хлорогенска киселина	23,62	$298,33 \pm 0,53$	$12,55 \pm 0,75$	/
6	ванилинска киселина	24,61	$1,57 \pm 0,15$	$1,23 \pm 0,11$	/
7	сиригинска киселина	26,10	$39,57 \pm 0,28$	/	$89,58 \pm 0,12$
8	<i>p</i> -кумаринска киселина	31,41	$21,84 \pm 0,46$	/	$3,98 \pm 0,20$
9	ферулинска киселина	34,24	$4,13 \pm 0,18$	$2,35 \pm 0,08$	/
14	<i>trans</i> -циметна киселина	48,17	$42,34 \pm 0,14$	$298,12 \pm 0,88$	/
Флавоноиди ($\mu\text{g/mL}$)					
10	рутин	34,33	$2,38 \pm 0,26$	/	/
11	кверцетин-3- <i>O</i> -глукопиранозид	35,24	$264,13 \pm 0,58$	$234,12 \pm 0,97$	$75,28 \pm 0,18$
12	фисетин	44,57	$1,23 \pm 0,11$	/	/
13	кверцетин	46,15	$3,54 \pm 0,09$	/	/
3	сиригин	22,14	$1,99 \pm 0,41$	$13,23 \pm 0,60$	$33,28 \pm 0,18$

Упоредном анализом добијених концентрација фенолних једињења у метанолском, ацетонском и воденом екстракту *A. alba*, највиша концентрација фенолних једињења присутна је у метанолском екстракту, где смо идентификовали и квантификовали свих 14 фенолних једињења коришћених у анализи. Најзаступљеније фенолне киселине биле су хлорогенска ($298,33 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$) у метанолском екстракту биљке и *trans*-циметна киселина ($298,12 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$) детектована у ацетонском биљном екстракту. 3,5-дихидроксибензоева киселина идентификована је у сва три испитивана екстракта, али у значајно већој концентрацији у воденом ($198,98 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$), него у осталим анализираним екстрактима ($2,54 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ у метанолском и $1,64 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ у ацетонском екстракту). Од флавоноида, кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сирингин су идентификовани и квантификовани у сва три екстракта. Квантитативно, метанолски и ацетонски екстракти биљке садржали су значајно више кверцетин-3-*O*-глукопиранозид у поређењу са воденим биљним екстрактом.



Слика 19. HPLC-PDA хроматограми фенолних киселина и флавоноида присутних у различитим екстрактима *A. alba*: а) метанолски екстракт, б) ацетонски екстракт, в) водени екстракт: 1. протекатехинска киселина, 2. 3,5-дихидроксибензоева киселина, 3. сирингин, 4. 2,5-дихидроксибензоева киселина, 5. хлорогенска киселина, 6. ванилинска киселина, 7. сирингинска киселина, 8. *p*-кумаринска киселина, 9. ферулинска киселина, 10. рутин, 11. кверцетин-3-*O*-глукопиранозид, 12. фисетин, 13. кверцетин, 14. *trans*-циметна киселина

4.3. Цитотоксични ефекат испитиваних биљних екстраката

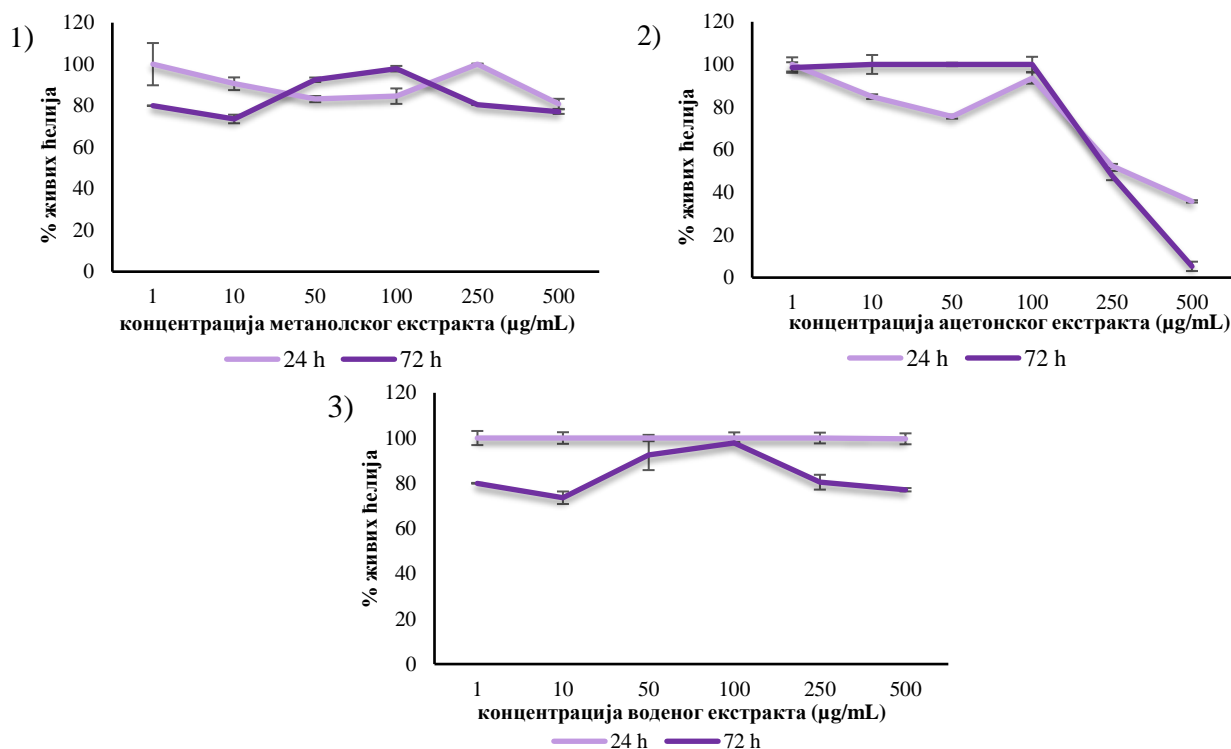
4.3.1. Анализа цитотоксичног ефекта различитих екстраката *A. vulgaris* у појединачном и комбинованом третману са митомицином Ц

У циљу испитивања цитотоксичног ефекта биљке *A. vulgaris*, МТТ тестом је анализирана вијабилност хуманих ћелија карцинома колона (SW-480) и мезенхималних матичних ћелија периодонцијума (PDLs) након излагања различитим екстрактима биљке (метанолски, ацетонски и водени) у концентрацијама (1, 10, 50, 100, 250 и 500 $\mu\text{g/mL}$). Ефекат је праћен у временским интервалима 24 и 72 сата, а резултати су изражени као IC_{50} вредности ($\mu\text{g/mL}$). IC_{50} вредности на SW-480 и PDLs ћелијским линијама приказани су у Табели 7.

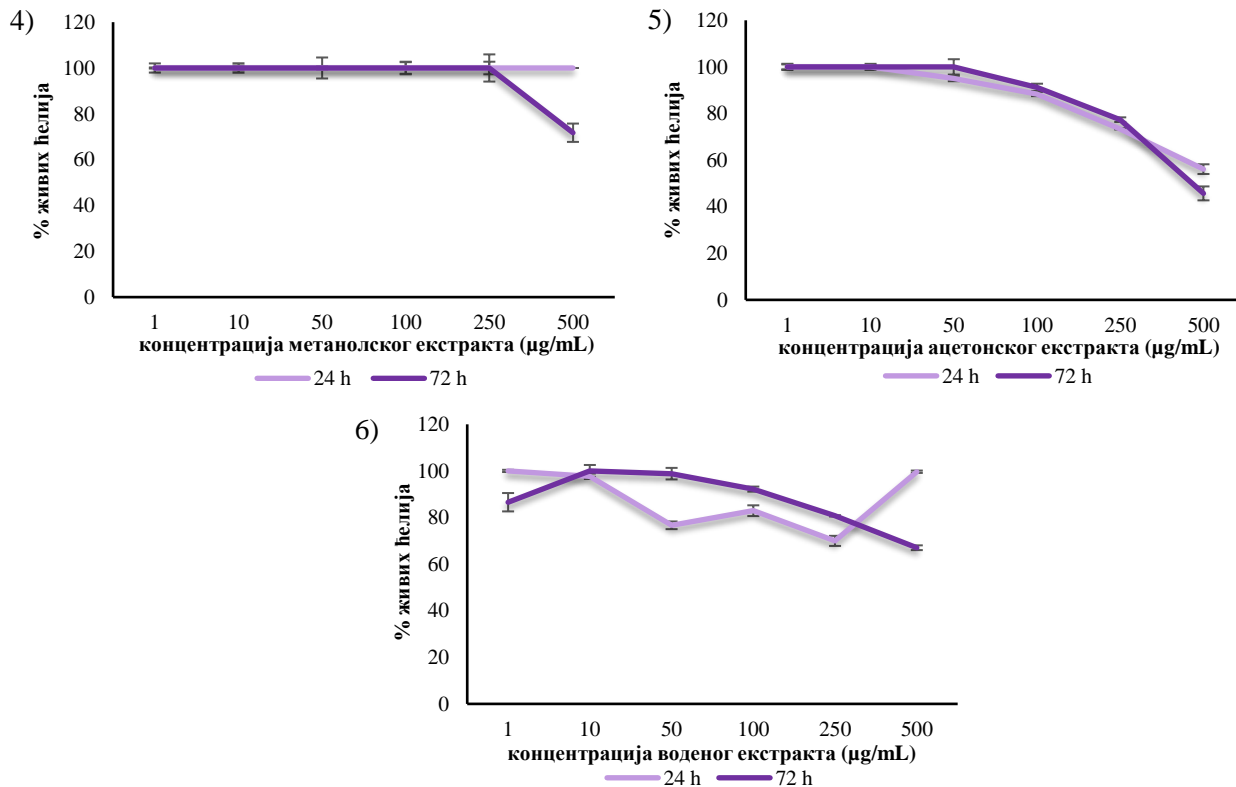
Табела 7. Цитотоксични ефекат анализираних екстраката *A. vulgaris* у појединачним и комбинованим третманима са митомицином Ц (ММЦ) на PDLs и SW-480 ћелијским линијама изражени као IC_{50} вредности

Третман	PDLs		SW-480	
	24h	72h	24h	72h
Метанолски екстракт				
<i>A. vulgaris</i>	>500	>500	>500	>500
<i>A. vulgaris</i> + ММЦ	>500	>500	410,71 ± 14,93	<1
Ацетонски екстракт				
<i>A. vulgaris</i>	>500	382,97 ± 6,08	283,62 ± 51,76	240,12 ± 25,49
<i>A. vulgaris</i> + ММЦ	>500	>500	247,07 ± 23,56	<1
Водени екстракт				
<i>A. vulgaris</i>	>500	>500	>500	>500
<i>A. vulgaris</i> + ММЦ	>500	>500	>500	<1

На Графиконима 1-3 приказане су дозно-зависне криве ефеката различитих екстраката *A. vulgaris* након третмана SW-480 ћелија. Резултати су показали да након 24 сата излагања екстрактима највећи цитотоксични ефекат је испољавао ацетонски екстракт (IC_{50} вредност је износила 283,62 ± 51,76 $\mu\text{g/mL}$). Са продужавањем дужине излагања ћелија до 72 сата, интензитет цитотоксичности се повећавао (временски зависан ефекат), па је тако након третмана ацетонским екстрактом IC_{50} вредност износила 240,12 ± 25,49 $\mu\text{g/mL}$. Метанолски и водени екстракти нису испољили значајне цитотоксичне ефекте у оба испитивана временска интервала. IC_{50} вредности су биле >500. Сви тестирани екстракти нису значајно утицали на вијабилност PDLs ћелија (Графикони 4-6) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2023).



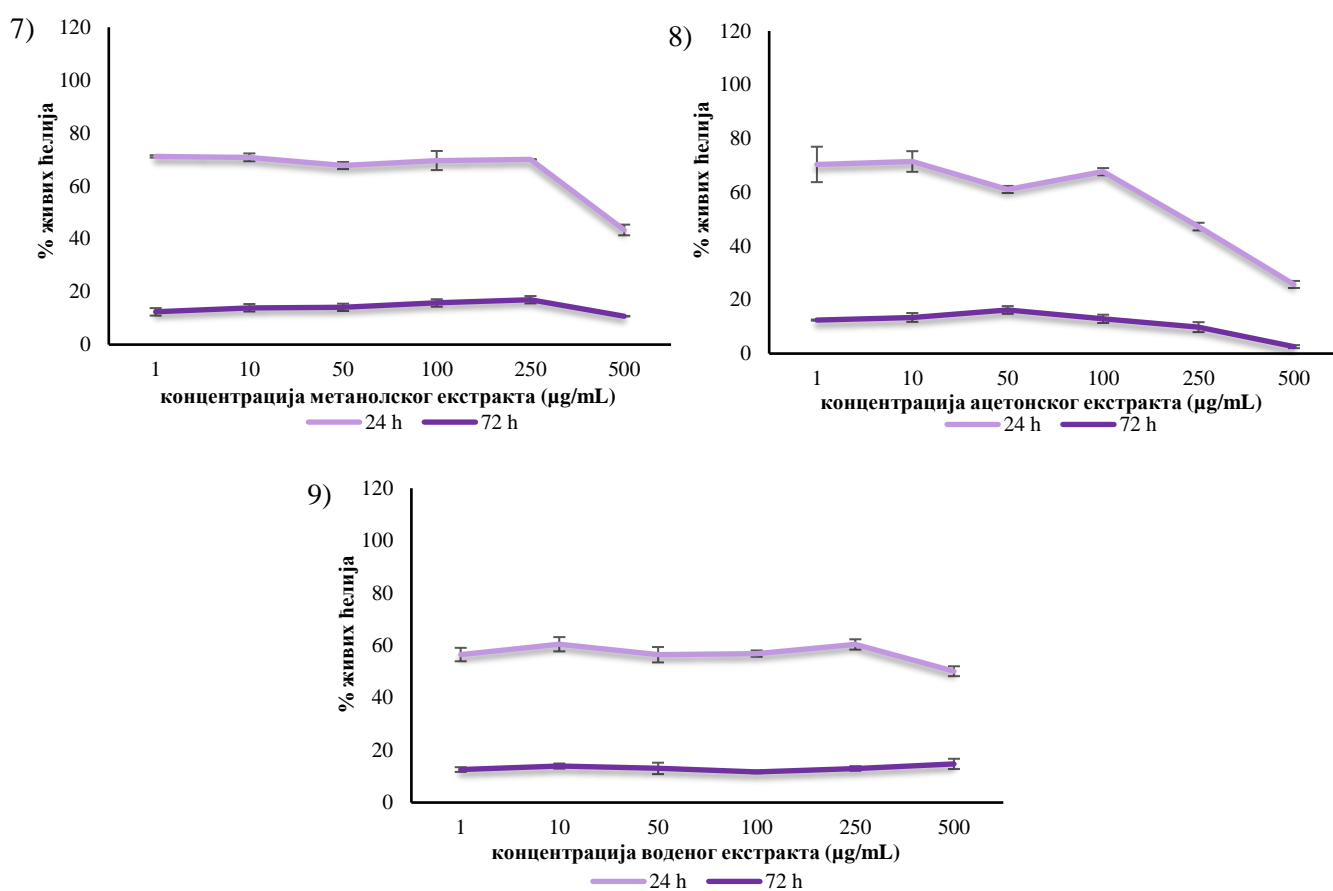
Графикони 1-3. Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након третмана екстрактима *A. vulgaris* на SW-480 ћелијској линији: 1) метанолски екстракт, 2) ацетонски екстракт и 3) водени екстракт



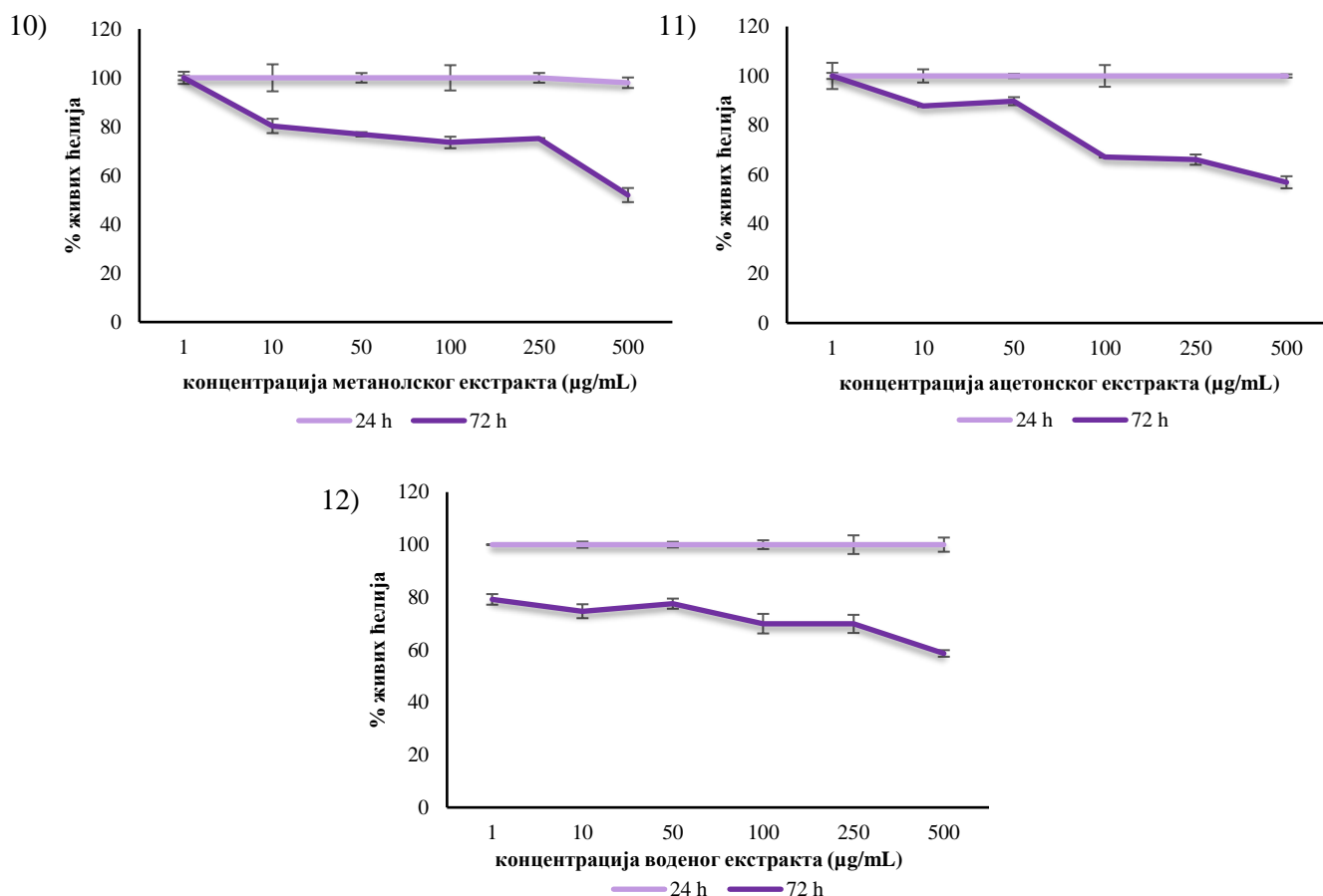
Графикони 4-6. Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након третмана екстрактима *A. vulgaris* на PDL5 ћелијској линији: 4) метанолски екстракт, 5) ацетонски екстракт и 6) водени екстракт

У циљу испитивања потенцијалних синергистичких ефеката, SW-480 и PDLS ћелијске линије третиране су биљним екстрактом у комбинованом третману са 0,5 µg/mL ММЦ. На Графиконима 7-12 приказане су дозно-зависне криве ефеката различитих екстраката *A. vulgaris* на SW-480 и PDLS ћелијској линији. Ћелије су истовремено третиране анализираним екстрактима биљке (метанолски, ацетонски и водени) одговарајућих концентрација (1, 10, 50, 100, 250 и 500 µg/mL) и 0,5 µg/mL ММЦ.

Поређењем добијених IC₅₀ вредности у третманима екстраката и комбинованим третманима екстраката са ММЦ (Табела 7), запажено је да су сви анализирани биљни екстракти у комбинованим третманима са ММЦ показали интензивније цитотоксичне ефекте на линији ћелија карцинома колона, посебно након 72 сата излагања. IC₅₀ вредности биле су < 1.



Графикони 7-9. Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима *A. vulgaris* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на SW-480 ћелијској линији: 7) метанолски екстракт, 8) ацетонски екстракт и 9) водени екстракт



Графикони 10-12. Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима *A. vulgaris* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на PDLS ћелијској линији: 10) метанолски екстракт, 11) ацетонски екстракт и 12) водени екстракт

У циљу испитивања интеракције између екстраката и ММЦ, коришћен је CI чије су вредности дате у Табели 8. Резултати су показали да су комбиновани третмани у малигним ћелијама након 24 сата излагања испољавали антагонистички ефекат у свим тестираним концентрацијама. Након 72 сата излагања анализираним екстрактима запажено је да антагонизам прелази у синергизам, тако да су сви екстракти углавном изазивали синергистички ефекат са ММЦ (осим метанолског екстракта у концентрацији 250 µg/mL у комбинацији са ММЦ, када је детектован антагонистички ефекат). Добијене CI вредности за комбиноване третмане свих тестираних екстраката биљке и ММЦ на PDLS ћелијама показивале су антагонистични ефекат.

Табела 8. Интеракције између анализираних екстраката *A. vulgaris* и митомицина Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)

Третман	Дужина третмана	Интеракција у PDLs	CI	Дужина третмана	Интеракција у SW-480	CI
Метанолски екстракт						
1 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	7001,7
	72 h	Антагонизам	2,71	72 h	Синергизам	0,27
10 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	7082,78
	72 h	Антагонизам	2,17	72 h	Синергизам	0,30
50 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	6771,87
	72 h	Антагонизам	2,08	72 h	Синергизам	0,31
100 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	6961,82
	72 h	Антагонизам	1,98	72 h	Синергизам	0,36
250 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	6998,69
	72 h	Антагонизам	2,03	72 h	Антагонизам	4,27
500 µg/mL + ММЦ	24h	Антагонизам	2,19	24 h	Антагонизам	4078,50
	72h	Антагонизам	1,61	72 h	Синергизам	0,38
Ацетонски екстракт						
1 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,34	24 h	Антагонизам	7036,7
	72 h	Антагонизам	2,71	72 h	Синергизам	0,28
10 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	7145,84
	72 h	Антагонизам	2,38	72 h	Синергизам	0,30
50 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,29	24 h	Антагонизам	6105,81
	72 h	Антагонизам	2,43	72 h	Синергизам	0,36
100 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,37	24 h	Антагонизам	6936,74
	72 h	Антагонизам	1,89	72 h	Синергизам	0,36
250 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,58	24 h	Антагонизам	5329,01
	72 h	Антагонизам	1,98	72 h	Синергизам	0,33
500 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	3,02	24 h	Антагонизам	2571,99
	72 h	Антагонизам	2,21	72 h	Синергизам	0,52
Водени екстракт						
1 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	5650,56
	72 h	Антагонизам	2,57	72 h	Синергизам	0,32
10 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,19	24 h	Антагонизам	6044,60
	72 h	Антагонизам	3,05	72 h	Синергизам	0,36
50 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,72	24 h	Антагонизам	5644,56
	72 h	Антагонизам	2,96	72 h	Синергизам	0,25
100 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,86	24 h	Антагонизам	5687,57
	72 h	Антагонизам	2,89	72 h	Синергизам	0,30
250 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,57	24 h	Антагонизам	6036,60
	72 h	Антагонизам	2,93	72 h	Синергизам	0,27
500 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	5014,50
	72 h	Антагонизам	2,28	72 h	Синергизам	0,37

CI < синергистички ефекат CI > антагонистички ефекат

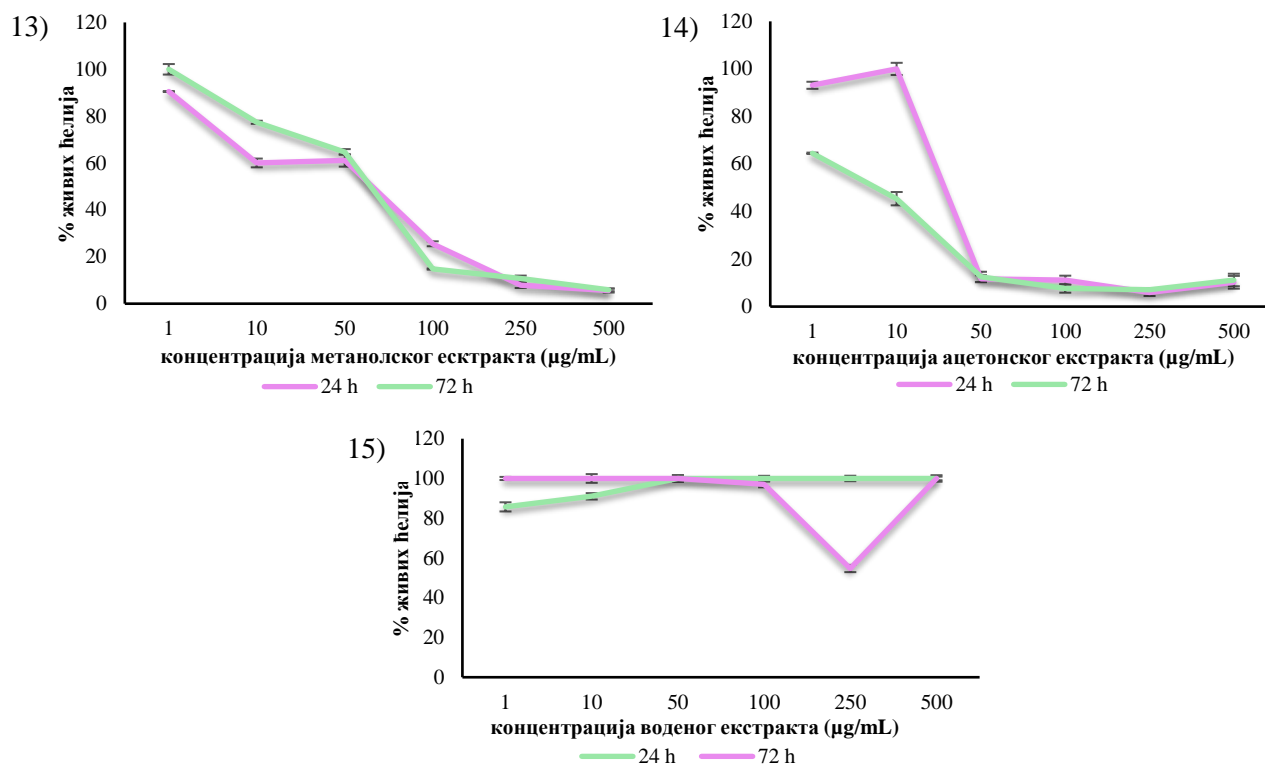
4.3.2. Анализа цитотоксичног ефекта различитих екстраката *A. alba* у појединачном и комбинованом третману са митомицином Ц

Резултати цитотоксичног ефекта анализираних екстраката *A. alba* на SW-480 и PDLS ћелијским линијама приказани су у Табели 9.

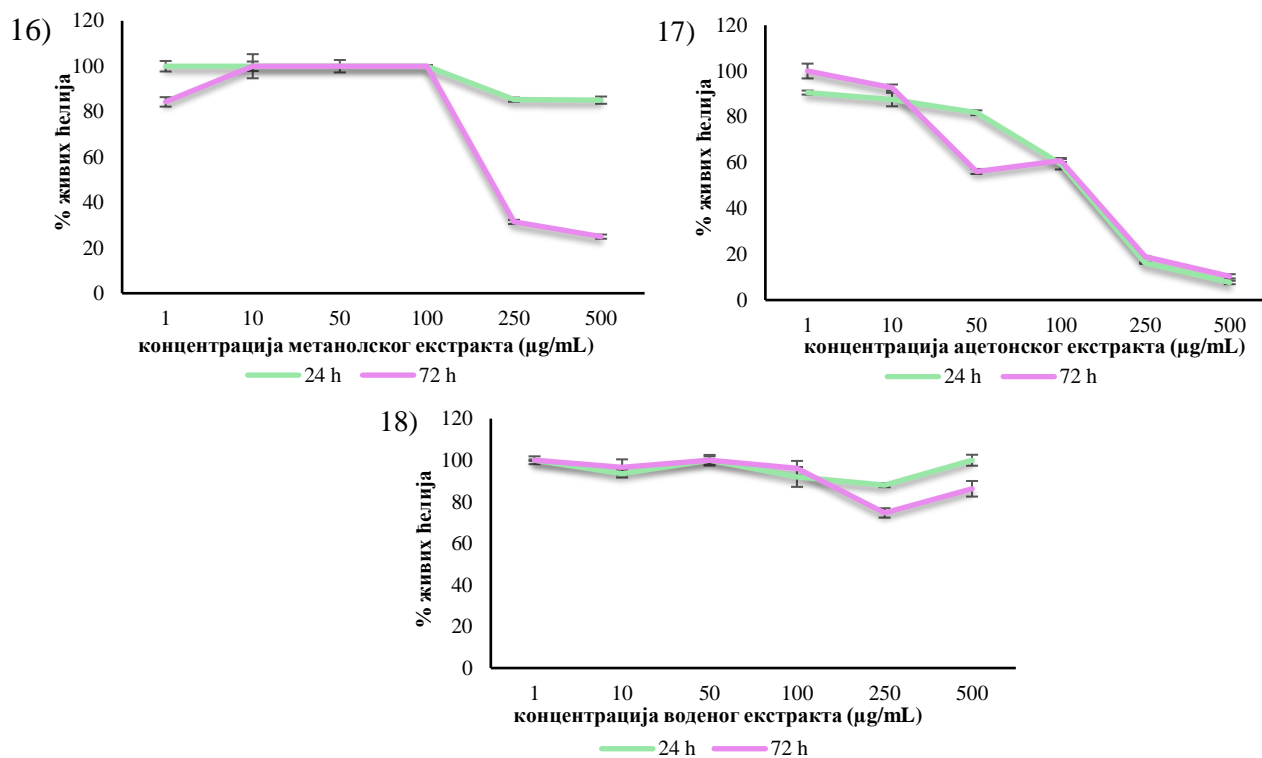
Након излагања SW-480 ћелија различитим концентрацијама (1, 10, 50, 100, 250 и 500 µg/mL) биљних екстраката у трајању од 24 сата, метанолски и ацетонски екстракти биљке су испољили цитотоксичне ефекте ($IC_{50} = 57,11 \pm 2,35$ за метанолски екстракт, $IC_{50} = 51,08 \pm 5,45$ за ацетонски екстракт). Продужавањем третмана до 72 сата, цитотоксичност се повећавала (временски зависан ефекат), па је тако након третмана метанолским екстрактом IC_{50} вредност износила $47,65 \pm 3,83$ µg/mL, а након третмана ацетонским екстрактом *A. alba* била је $3,89 \pm 1,47$ µg/mL. Водени екстракт биљке није испољавао цитотоксични ефекат на ћелијској линији карцинома колона (Графикони 13-15). Исти екстракти нису значајно утицали на вијабилност PDLS ћелија (Графикони 16-18) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2023).

Табела 9. Цитотоксични ефекат анализираних екстраката *A. alba* у појединачним и комбинованим третманима са митомицином Ц (ММЦ) на PDLS и SW-480 ћелијским линијама, изражени као IC_{50} вредности

Третман	PDLS		SW-480	
	24h	72h	24h	72h
Метанолски екстракт				
<i>A. alba</i>	>500	$324,66 \pm 1,52$	$57,11 \pm 2,35$	$47,65 \pm 3,83$
<i>A. alba</i> + ММЦ	>500	$169,49 \pm 0,12$	$269,00 \pm 11,20$	<1
Ацетонски екстракт				
<i>A. alba</i>	$232,57 \pm 9,70$	$215,05 \pm 14,44$	$51,08 \pm 5,45$	$3,89 \pm 1,47$
<i>A. alba</i> + ММЦ	$367,81 \pm 0,21$	$108,94 \pm 1,27$	$4,94 \pm 1,93$	<1
Водени екстракт				
<i>A. alba</i>	>500	>500	>500	>500
<i>A. alba</i> + ММЦ	>500	>500	>500	<1



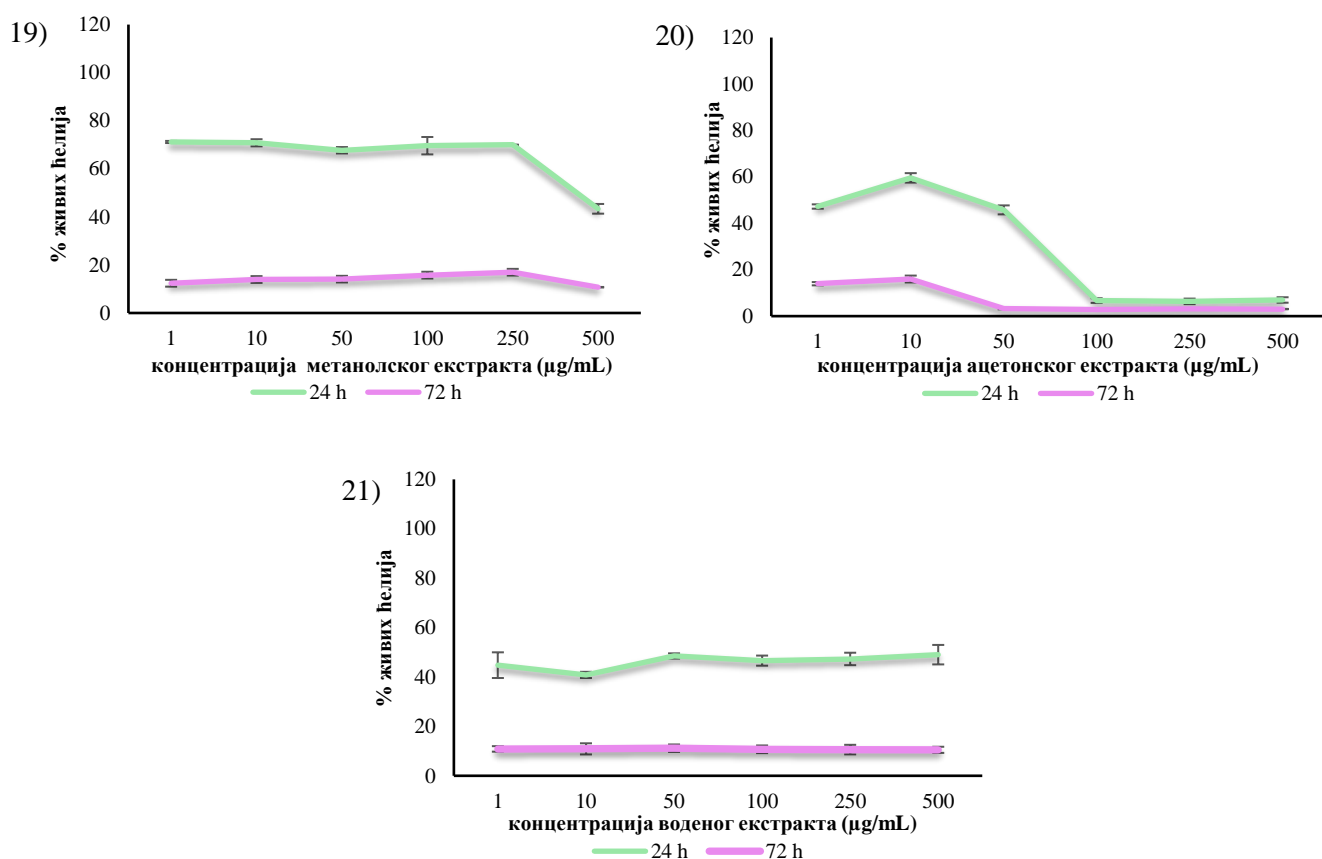
Графикони 13-15. Дозно-зависне криве цитотоксичног ефекта након третмана екстрактима *A. alba* на SW-480 ћелијској линији: 13) метанолски екстракт, 14) ацетонски екстракт и 15) водени екстракт



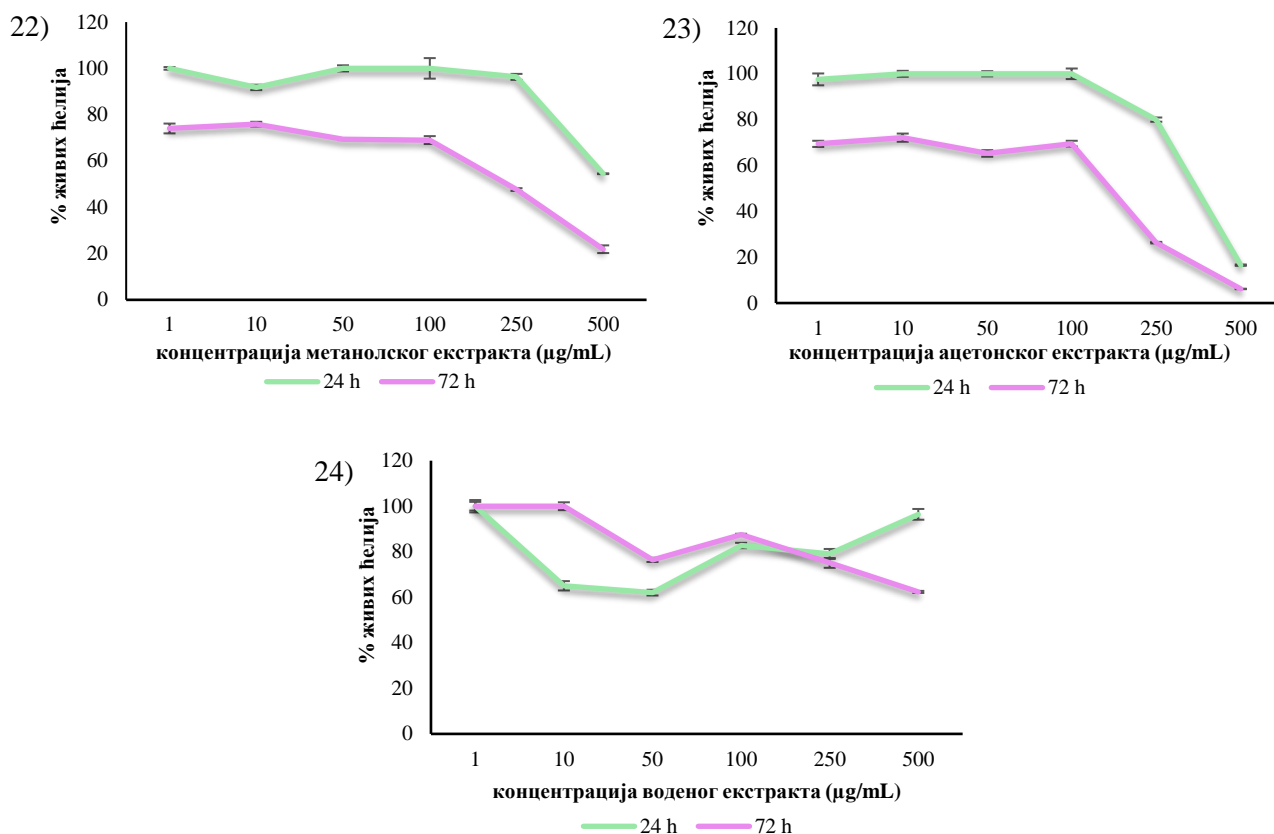
Графикони 16-18. Дозно-зависне криве цитотоксичног ефекта након третмана екстрактима *A. alba* на PDL5 ћелијској линији: 16) метанолски екстракт, 17) ацетонски екстракт и 18) водени екстракт

Ефекти комбинованих третмана екстрактима *A. alba* и ММЦ на вијабилност SW-480 и PDLS ћелија приказани су на Графиконима 19-24, док су IC_{50} вредности ($\mu\text{g/mL}$) приказане у Табели 9. Комбиновани третмани показују дозно и временски зависно смањење вијабилности SW-480 ћелија (Графикони 19-21). Најинтензивнији цитотоксични ефекат на ћелијској линији карцинома колона добијен је након третмана ацетонским екстрактом *A. alba* и $0,5 \mu\text{g/mL}$ ММЦ. Након 24 сата излагања, IC_{50} вредност износила је $4,94 \pm 1,93 \mu\text{g/mL}$, док је након 72 сата третмана била < 1 . Значајни цитотоксични ефекти добијени су и након третмана метанолским и воденим екстрактом *A. alba*, али само након 72 сата излагања, када је IC_{50} вредност била < 1 . Испитивани екстракти *A. alba* у комбинованим третманима са ММЦ нису испољавали значајне цитотоксичне ефекте на PDLS ћелијској линији након 24 и 72 сата излагања третманима (Графикони 22-24).

Поређењем добијених IC_{50} вредности у појединачним и комбинованим третманима са ММЦ (Табела 9), уочава се да сви испитивани биљни екстракти у комбинованим третманима са ММЦ показују веће цитотоксичне ефекте на ћелије карцинома колона, посебно након дужег временског излагања (72 сата).



Графикони 19-21. Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима *A. alba* и митомицином Ц (ММЦ, $0,5 \mu\text{g/mL}$) на SW-480 ћелијској линији: 19) метанолски екстракт, 20) ацетонски екстракт и 21) водени екстракт



Графикони 22-24. Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима *A. alba* и митомоцином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на PDLS ћелијској линији: 22) метанолски екстракт, 23) ацетонски екстракт и 24) водени екстракт

Потенцијални синергистички или антагонистички ефекат у комбинованим третманима са ММЦ на SW-480 и PDLS ћелијској линији утврђивани су израчунавањем вредности CI које су дате у Табели 10. Након 24 сата излагања SW-480 ћелија свим биљним екстрактима и ММЦ, запажа се антагонистички ефекат. Према резултатима CI вредности након 72 сата комбинованог третмана метанолским екстрактом биљке и ММЦ запажен је у већини концентрација синергистички ефекат, осим у концентрацијама 100 и 250 µg/mL када је детектован антагонизам. У комбинованом третману ацетонским или воденим биљним екстрактом и ММЦ испољен је синергистички ефекат у свим испитиваним концентрацијама након 72 сата третмана SW-480 ћелија. Резултати интеракција на PDLS ћелијама указују на антагонистички ефекат (осим у третману највишим концентрацијама метанолског и ацетонског екстракта када је испољен синергистички ефекат) након 24 и 72 сата излагања.

Табела 10. Интеракције између анализираних екстраката *A. alba* и митомицина Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)

Третман	Дужина тетмана	Интеракција у PDLs	CI	Дужина тетмана	Интеракција у SW-480	CI
Метанолски екстракт						
1 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	6,23
	72 h	Антагонизам	2,06	72 h	Синергизам	0,87
10 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,06	24 h	Антагонизам	6,46
	72 h	Антагонизам	2,05	72 h	Синергизам	0,49
50 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	6,90
	72 h	Антагонизам	1,87	72 h	Синергизам	0,37
100 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	8,46
	72 h	Антагонизам	1,87	72 h	Антагонизам	1,39
250 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,57	24 h	Антагонизам	14,09
	72 h	Антагонизам	2,29	72 h	Антагонизам	1,21
500 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,32	24 h	Антагонизам	938,67
	72 h	Синергизам	0,48	72 h	Синергизам	0,21
Ацетонски екстракт						
1 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,29	24 h	Антагонизам	5451,58
	72 h	Синергизам	0,80	72 h	Синергизам	0,38
10 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,38	24 h	Антагонизам	5956,59
	72 h	Антагонизам	2,20	72 h	Синергизам	0,35
50 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,48	24 h	Антагонизам	4611,99
	72 h	Антагонизам	2,26	72 h	Синергизам	0,30
100 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,92	24 h	Антагонизам	671,60
	72 h	Антагонизам	2,34	72 h	Синергизам	0,41
250 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	6,00	24 h	Антагонизам	637,07
	72 h	Антагонизам	1,84	72 h	Синергизам	0,48
500 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,67	24h	Антагонизам	697,68
	72 h	Синергизам	0,69	72h	Синергизам	0,34
Водени екстракт						
1 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,24	24 h	Антагонизам	4478,52
	72 h	Антагонизам	2,87	72 h	Синергизам	0,24
10 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,50	24 h	Антагонизам	4872,53
	72 h	Антагонизам	3,08	72 h	Синергизам	0,24
50 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,39	24 h	Антагонизам	4851,49
	72 h	Антагонизам	2,09	72 h	Синергизам	0,25
100 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,04	24 h	Антагонизам	4662,47
	72 h	Антагонизам	2,36	72 h	Синергизам	0,24
250 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	1,87	24 h	Антагонизам	4730,47
	72 h	Антагонизам	2,06	72 h	Синергизам	0,22
500 µg/mL + ММЦ	24 h	Антагонизам	2,16	24 h	Антагонизам	4903,49
	72 h	Антагонизам	1,68	72 h	Синергизам	0,24

CI < синергистички ефекат CI > антагонистички ефекат

Поређењем добијених цитотоксичних ефеката на испитиваним ћелијским линијама запажа се да су SW-480 ћелије биле знатно осетљивије посебно након дужег временског излагања при третману екстрактима биљака. Такође, у зависности од врсте растварача, уочено је да су највећи цитотоксични ефекти остварени након третмана ацетонским екстрактом биљке, док су водени екстракти испољили најмању цитотоксичност. Уочене су и разлике у цитотоксичности између испитиваних биљних врста на ћелијама карцинома колона. Ацетонски и метанолски екстракти *A. alba* били су значајно ефикаснији у односу на исте екстракте *A. vulgaris*.

4.4. Тип ћелијске смрти индукован екстрактима испитиваних биљних врста

4.4.1. Тип ћелијске смрти индукован екстрактима *A. vulgaris*

Тип ћелијске смрти SW-480 ћелија након третмана метанолским, ацетонским и воденим екстрактима *A. vulgaris*, одређен је проточном цитометријом, применом Annexin V-FITC/7-AAD кита. SW-480 ћелије су третиране различитим екстрактима биљке у две тестиране концентрације 10 $\mu\text{g/mL}$ и 100 $\mu\text{g/mL}$ у 24-часовном временском периоду. Нетретиране ћелије представљале су контролни узорак. Добијени резултати приказани су у Табели 11.

Резултати су показали да су сви анализирани екстракти индуковали највећи проценат SW-480 ћелија у раној апоптози. Процент ћелија у раној апоптози након третмана нижом тестираном концентрацијом метанолским екстрактом износио је $6,75 \pm 0,45\%$. Са порастом концентрације екстракта (100 $\mu\text{g/mL}$) уједно је растао и проценат апоптотских ћелија ($11,09 \pm 0,99\%$ за рану апоптозу и $2,33 \pm 0,06\%$ за касну апоптозу), што указује на дозно-зависан проапоптотски ефекат. Након третмана нижом тестираном концентрацијом (10 $\mu\text{g/mL}$), највеће повећање процената ћелија у раној апоптози узроковао је ацетонски биљни екстракт ($7,91 \pm 0,13\%$), што је било значајно више у односу на спонтану апоптозу детектовану у контролним ћелијама ($0,06 \pm 0,03\%$) ($p < 0,05$). Са порастом тестиране концентрације (100 $\mu\text{g/mL}$) ацетонски и водени екстракти биљке смањивали су процентуалну заступљеност ћелија у раној апоптози ($3,66 \pm 0,08\%$ за ацетонски и $4,59 \pm 0,49\%$ за водени екстракт) уз истовремено значајно повећање процената ћелија у некрози ($2,61 \pm 0,23\%$ за ацетонски и $2,07 \pm 0,17\%$ за водени екстракт), у односу на спонтану некрозу детектовану у контролим ћелијама ($0,05 \pm 0,03\%$) ($p < 0,05$).

ММЦ је индуковао највећи проценат ћелија у раној апоптози $7,80 \pm 0,20\%$ за концентрацију од 0,5 $\mu\text{g/mL}$, у поређењу са спонтаном апоптозом добијеном у контролним ћелијама ($0,06 \pm 0,03\%$).

Тип ћелијске смрти SW-480 ћелија утврђен је и након комбинованог третмана екстраката биљке и ММЦ (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Метанолски и водени екстракти биљке у обе испитиване концентрације индуковали су рану апоптозу као примарни тип ћелијске смрти (10 $\mu\text{g/mL}$: $5,55 \pm 0,65\%$; 100 $\mu\text{g/mL}$: $8,10 \pm 0,50\%$ за метанолски и 10 $\mu\text{g/mL}$: $7,64 \pm 0,45\%$; 100 $\mu\text{g/mL}$: $6,93 \pm 0,45\%$ за водени екстракт) што је било значајно више у односу на рану апоптозу детектовану у контролној групи ћелија ($p < 0,05$). Резултати комбинованог третмана ацетонског биљног екстракта и ММЦ су показали да је такође највећи проценат ћелија био у раној апоптози, али је третман истовремено индуковао и повећање процената ћелија у некрози ($3,74 \pm 0,68\%$ за концентрацију од 10 $\mu\text{g/mL}$ и $1,95 \pm 0,30\%$ за концентрацију од 100 $\mu\text{g/mL}$) у односу на остале анализирани екстракте (Radović Jakovljević *u cap.*, 2023).

Табела 11. Процент вијабилних, апоптотских и некротских SW-480 ћелија мерених методом проточне цитометрије (Annexin V/7-AAD), након појединачног и комбинованог третмана екстрактом *A. vulgaris* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)

Третман	Вијабилне ћелије (%)	Рана апоптоза (%)	Касна апоптоза (%)	Некроза (%)
Негативна контрола (без третмана)	99,94 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03
Позитивна контрола ММЦ (0,5 µg/mL)	88,84 ± 0,11	7,80 ± 0,20*	3,03 ± 0,14*	0,32 ± 0,22*
Метанолски екстракт				
10 µg/mL	92,25 ± 0,78	6,75 ± 0,45*	0,69 ± 0,20*	0,30 ± 0,15*
100 µg/mL	85,59 ± 0,73	11,09 ± 0,99*	2,33 ± 0,06*	0,52 ± 0,02*
10 µg/mL + ММЦ	90,79 ± 0,76	5,55 ± 0,65*	3,13 ± 0,14*	0,52 ± 0,02*
100 µg/mL + ММЦ	86,84 ± 0,41	8,10 ± 0,50*	4,53 ± 0,06*	0,52 ± 0,02*
Ацетонски екстракт				
10 µg/mL	90,81 ± 0,09	7,91 ± 0,13*	0,67 ± 0,01*	0,60 ± 0,02*
100 µg/mL	92,95 ± 0,06	3,66 ± 0,08*	0,72 ± 0,03*	2,61 ± 0,23*
10 µg/mL + ММЦ	89,42 ± 0,04	5,38 ± 0,43*	1,46 ± 0,20*	3,74 ± 0,68*
100 µg/mL + ММЦ	93,66 ± 2,08	3,77 ± 1,53*	0,62 ± 0,25*	1,95 ± 0,30*
Водени екстракт				
10 µg/mL	92,05 ± 0,01	5,07 ± 0,52*	1,09 ± 0,10*	1,79 ± 0,43*
100 µg/mL	92,77 ± 0,63	4,59 ± 0,45*	0,55 ± 0,00*	2,07 ± 0,17*
10 µg/mL + ММЦ	89,83 ± 0,51	7,64 ± 0,25*	0,89 ± 0,02*	1,63 ± 0,24*
100 µg/mL + ММЦ	90,14 ± 0,19	6,93 ± 0,45*	1,24 ± 0,37*	1,67 ± 0,28*

* Статистички значајна разлика између нетретираних SW-480 ћелија и рано апоптотских, касно апоптотских или некротских SW-480 ћелија третираних различитим екстрактима биљке *A. vulgaris* (Студентов t-тест, $p < 0,05$)

4.4.2. Тип ћелијске смрти индукован екстрактима *A. alba*

У Табели 12 приказани су резултати испитивања типа ћелијске смрти након третмана SW-480 ћелија метанолским, ацетонским и воденим екстрактима *A. alba*. Резултати су показали да је апоптоза примарни начин ћелијске смрти. Сви испитивани екстракти биљке у концентрацијама од 10 и 100 µg/mL, индуковали су највећи проценат ћелија у раној апоптози што је било значајно више у односу на апоптозу детектовану у контролним ћелијама ($p < 0,05$). Уочен је и дозно-зависан проапоптотски ефекат, односно забележен је већи проценат апоптотских SW-480 ћелија након третмана вишом тестираном концентрацијом. У односу на спонтану рану апоптозу детектовану у контролним ћелијама, највеће повећање ћелија у раној апоптози узроковао је ацетонски екстракт (7,67 ± 0,68% за концентрацију од 10 µg/mL и 8,34 ± 1,32% за концентрацију од 100 µg/mL), док је некротских ћелија највише било након третмана вишом тестираном концентрацијом воденим биљним екстрактом (1,69 ± 0,04%).

У комбинованом третману са ММЦ, сви анализирани екстракти у обе тестиране концентрације (10 µg/mL и 100 µg/mL) значајно су повећавали проценат ћелија у раној апоптози у поређењу са контролним ћелијама ($p < 0,05$). Поред повећања процентуалне заступљености ћелија у раној апоптози, ацетонски и водени биљни екстракти у комбинованом третману са ММЦ значајно су повећавали и проценат малигнућ ћелија у некрози у поређењу са спонтаном некрозом детектованом у контролној групи ћелија ($0,05 \pm 0,03\%$) ($p < 0,05$) (Radović Jakovljević u sar., 2023).

Табела 12. Процент вијабилних, апоптотских и некротских SW-480 ћелија мерених методом проточне цитометрије (Annexin V/7-AAD), након појединачног и комбинованог третмана екстрактом *A. alba* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)

Третман	Вијабилне ћелије (%)	Рана апоптоза (%)	Касна апоптоза (%)	Некроза (%)
Негативна контрола (без третмана)	99,94 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03
Позитивна контрола ММЦ (0,5 µg/mL)	88,84 ± 0,11	7,80 ± 0,20*	3,03 ± 0,14*	0,32 ± 0,22*
Метанолски екстракт				
10 µg/mL	97,59 ± 0,33	0,30 ± 0,20*	1,58 ± 0,11*	0,53 ± 0,02*
100 µg/mL	92,19 ± 0,63	6,20 ± 0,40*	1,43 ± 0,16*	0,17 ± 0,07*
10 µg/mL + ММЦ	91,74 ± 0,11	5,55 ± 0,05*	2,18 ± 0,01*	0,52 ± 0,07*
100 µg/mL + ММЦ	93,37 ± 0,56	4,10 ± 0,01*	2,38 ± 0,05*	0,15 ± 0,05*
Ацетонски екстракт				
10 µg/mL	90,83 ± 0,86	7,67 ± 0,68*	0,77 ± 0,17*	0,72 ± 0,00*
100 µg/mL	90,45 ± 1,31	8,34 ± 1,32*	0,32 ± 0,04*	0,87 ± 0,04*
10 µg/mL + ММЦ	92,63 ± 0,15	4,47 ± 0,18*	0,92 ± 0,08*	1,98 ± 0,05*
100 µg/mL + ММЦ	93,76 ± 0,46	4,17 ± 0,27*	0,36 ± 0,08*	1,73 ± 0,10*
Водени екстракт				
10 µg/mL	94,73 ± 0,20	4,09 ± 0,15*	0,59 ± 0,02*	0,58 ± 0,03*
100 µg/mL	93,04 ± 0,14	4,01 ± 0,08*	1,25 ± 0,02*	1,69 ± 0,04*
10 µg/mL + ММЦ	91,30 ± 0,11	5,16 ± 0,09*	1,72 ± 0,03*	1,81 ± 0,01*
100 µg/mL + ММЦ	92,19 ± 0,76	4,86 ± 0,60*	1,29 ± 0,49*	1,65 ± 0,03*

* Статистички значајна разлика између нетретираних SW-480 ћелија и рано апоптотских, касно апоптотских или некротских SW-480 ћелија третираних различитим екстрактима биљке *A. alba* (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

4.5. *Анализа генотоксичног и антимуtagenог ефекта испитиваних биљних врста у in vitro условима*

4.5.1. *Анализа генотоксичног и антимуtagenог ефекта екстраката *A. vulgaris* на култивисане лимфоците здравих донора*

Појединачне и просечне фреквенце МН и НДИ у лимфоцитима четири здрава донора пре и након третмана различитим концентрацијама (10, 50, 100 и 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) екстрактима биљке *A. vulgaris* приказане су у Табелама 13 и 14 и на Графиконима 25 и 26. За контролне (нетретирани) ћелије просечна фреквенца МН износила је $7,00 \pm 1,41$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 6 до 9). Након третмана ћелија метанолским екстрактом биљке уочено је да најнижа тестирана концентрација (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) екстракта није мењала МН фреквенцу, док су остале тестиране концентрације (50, 100 и 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) значајно повећавале МН фреквенцу, у поређењу са нетретираним ћелијама ($p < 0,05$).

Слични резултати уочени су и након третмана ацетонским и воденим екстрактом. Све тестиране концентрације значајно су повећавале МН фреквенцу, при чему се након третмана највишом тестираном концентрацијом (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) МН фреквенца повећала на 18,25 МН/1000 БН ћелија за оба тестирана екстракта са опсегом варирања МН од 18 до 19 МН за ацетонски, односно од 16 до 20 МН/1000 БН ћелија за водени биљни екстракт (Табела 13) (*Radović Jakovljević u cap., 2022a*).

Анализом дистрибуције МН након третмана лимфоцита различитим екстрактима биљке уочено је да су БН ћелије са 1 МН биле најзаступљеније, док су БН ћелије са 2 МН биле знатно ређе заступљене. Број БН ћелија са МН је растао пропорционално са порастом концентрације екстраката (Слика 20). Највећи број БН ћелија са 2 МН уочен је након третмана ћелија највишом тестираном концентрацијом (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ацетонског екстракта (6 БН ћелија са 2 МН-0,15%). При третману ћелија метанолским и воденим екстрактом истом концентрацијом запажена је 1 БН (0,03%), односно 5 БН (0,15%) ћелија са 2 МН. БН ћелије са 3 МН (1 БН ћелија-0,03%) уочене су само код једног донора чије су ћелије третиране концентрацијом од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ацетонским и воденим екстрактом и 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ метанолским екстрактом.

Пирсонов коефицијент корелације показао је да постоји позитивна статистички значајна корелација између концентрације екстракта и МН фреквенце ($r = 0,800$, $p = 0,000$ за метанолски, $r = 0,878$, $p = 0,000$ за ацетонски и водени $r = 0,893$, $p = 0,000$).

Резултати анализе НДИ у лимфоцитима здравих донора пре и након третмана различитим екстрактима *A. vulgaris* приказани су у Табелама 13 и 14 и на Графикону 26. За нетретирание ћелије просечна НДИ вредност је износила $1,67 \pm 0,08$ са опсегом варирања од 1,60 до 1,75. Метанолски екстракт биљке није значајно мењао НДИ, док је ацетонски екстракт снижавао НДИ, али значајно само у највишој тестираној концентрацији (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) где је просечна НДИ вредност била $1,36 \pm 0,14$ (опсег варирања од 1,22 до 1,51). Дозно-зависно смањење НДИ ($r = -0,756$, $p = 0,001$) уочено је након третмана воденим екстрактом у свим тестираним концентрацијама, осим у најнижој (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), где је просечна НДИ вредност износила $1,57 \pm 0,10$ (опсег варирања од 1,46 до 1,69) (*Radović Jakovljević u cap., 2020; 2022a*).

Табела 13. Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. vulgaris in vitro*

Третман	Донор	МН на 1000 БН	Број БН ћелија	Број БН ћелија са МН	Дистрибуција (%)			НДИ
					1 МН	2 МН	3 МН	
Негативна контрола (без третмана)								
0 µg/mL	1	6	1000	6	6			1,60
	2	6	1000	6	6			1,75
	3	7	1000	7	7			1,60
	4	9	1000	9	9			1,74
	Σ	28	4000	28 (0,70)	28 (0,70)			
Метанолски екстракт								
10 µg/mL	1	7	1000	7	7			1,52
	2	8	1000	7	6	1		1,62
	3	9	1000	7	5	2		1,51
	4	9	1000	8	7	1		1,70
	Σ	33	4000	29 (0,73)	25 (0,62)	4 (0,10)		
50 µg/mL	1	8	1000	8	8			1,55
	2	11	1000	11	11			1,60
	3	10	1000	10	10			1,51
	4	9	1000	8	7	1		1,62
	Σ	38	4000	37 (0,93)	36 (0,90)	1 (0,03)		
100 µg/mL	1	9	1000	8	7	1		1,55
	2	14	1000	13	12	1		1,53
	3	11	1000	10	9	1		1,45
	4	10	1000	9	8	1		1,66
	Σ	44	4000	40 (1,00)	36 (0,90)	4 (0,10)		
250 µg/mL	1	11	1000	11	11			1,50
	2	15	1000	15	15			1,43
	3	13	1000	12	11	1		1,36
	4	12	1000	10	9		1	1,66
	Σ	51	4000	48 (1,20)	46 (1,15)	1 (0,03)	1 (0,03)	
Ацетонски екстракт								
10 µg/mL	1	14	1000	14	14			1,46
	2	14	1000	13	12	1		1,56
	3	12	1000	11	10	1		1,37
	4	12	1000	12	12			1,45
	Σ	52	4000	50 (1,25)	48 (1,20)	2 (0,05)		
50 µg/mL	1	14	1000	14	14			1,43
	2	16	1000	14	12	2		1,47
	3	14	1000	14	14			1,23
	4	14	1000	14	14			1,71
	Σ	58	4000	56 (1,40)	54 (1,35)	2 (0,05)		
100 µg/mL	1	14	1000	11	9	1	1	1,33
	2	16	1000	16	16			1,47
	3	15	1000	14	13	1		1,24
	4	15	1000	14	13	1		1,74
	Σ	60	4000	55 (1,38)	51 (1,28)	3 (0,08)	1 (0,03)	

Наставак Табеле 13

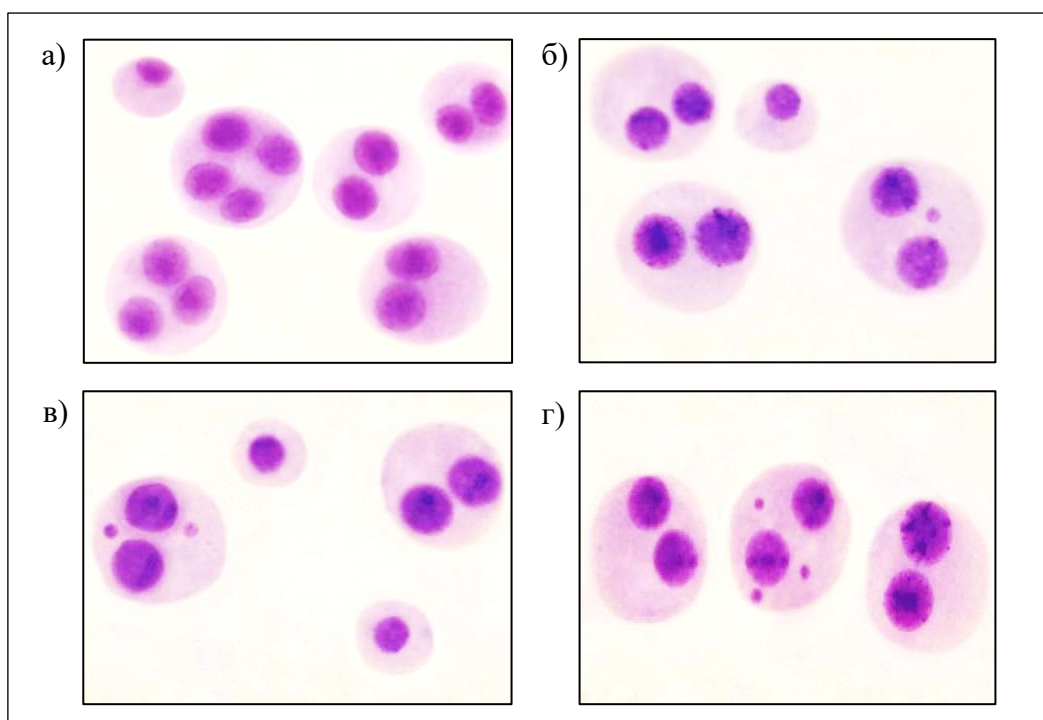
250 µg/mL	1	18	1000	16	14	2		1,26
	2	19	1000	18	17	1		1,44
	3	18	1000	16	14	2		1,22
	4	18	1000	17	16	1		1,51
	Σ	73	4000	67 (1,68)	61(1,63)	6 (0,15)		
Водени екстракт								
10 µg/mL	1	9	1000	9	9			1,51
	2	10	1000	10	10			1,46
	3	11	1000	11	11			1,62
	4	9	1000	8	7	1		1,69
	Σ	39	4000	38 (0,95)	37 (0,93)	1 (0,03)		
50 µg/mL	1	14	1000	12	10	2		1,41
	2	12	1000	12	12			1,39
	3	15	1000	12	9	3		1,37
	4	10	1000	10	10			1,60
	Σ	51	4000	46 (1,15)	41 (1,03)	5 (0,13)		
100 µg/mL	1	15	1000	14	13	1		1,43
	2	14	1000	14	14			1,41
	3	19	1000	18	17	1		1,37
	4	17	1000	14	12	1	1	1,53
	Σ	65	4000	60 (1,50)	56 (1,40)	3 (0,08)	1 (0,03)	
250 µg/mL	1	20	1000	19	18	1		1,33
	2	16	1000	16	16			1,35
	3	19	1000	17	15	2		1,28
	4	18	1000	16	14	2		1,24
	Σ	73	4000	68 (1,70)	63 (1,58)	5 (0,13)		

% је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

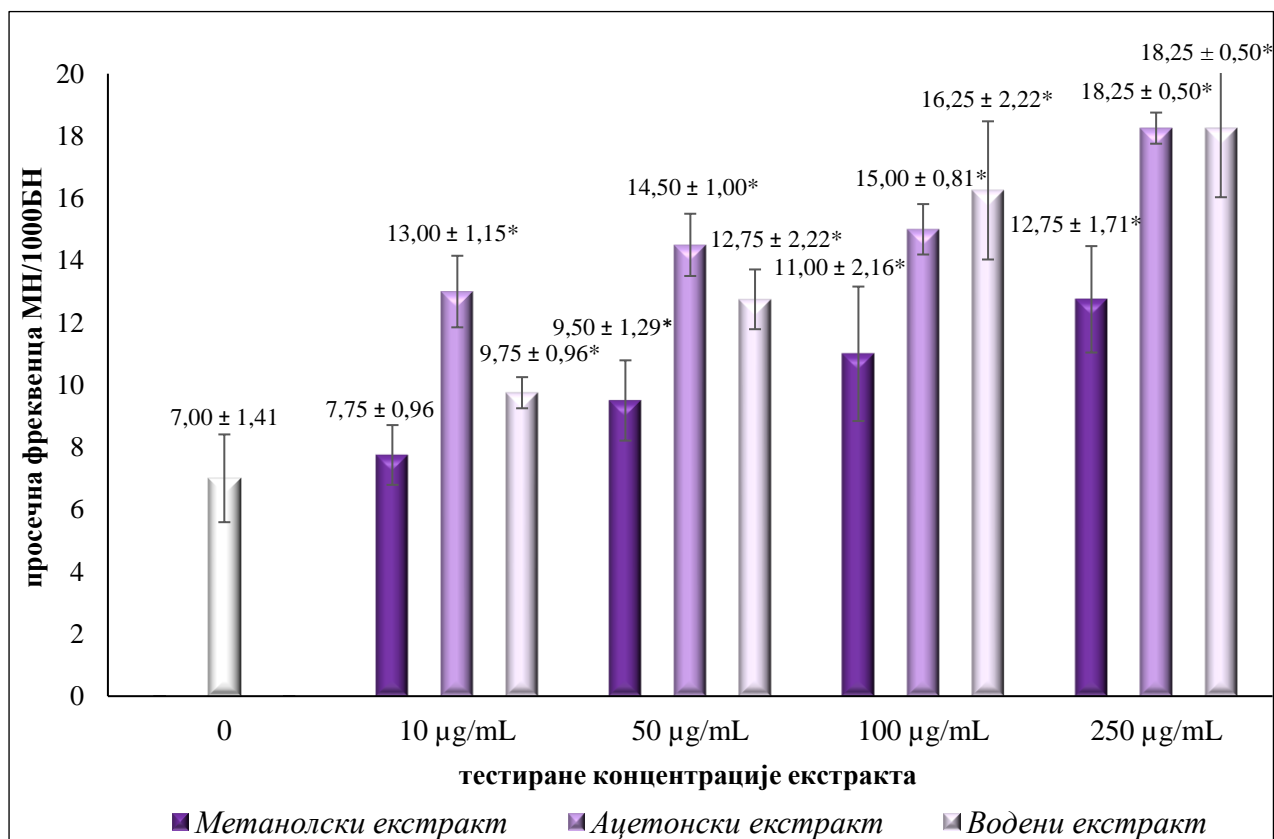
Табела 14. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. vulgaris in vitro*

Третман	Концентрација	МН/1000БН ћелија (X ± С.Д.)	НДИ (X ± С.Д.)
Негативна контрола (без третмана)	0 µg/mL	7,00 ± 1,41	1,67 ± 0,08
Позитивна контрола (ММЦ)	0,5 µg/mL	42,25 ± 2,75*	1,42 ± 0,09*
Метанолски екстракт	10 µg/mL	7,75 ± 0,96	1,59 ± 0,09
	50 µg/mL	9,50 ± 1,29*	1,57 ± 0,05
	100 µg/mL	11,00 ± 2,16*	1,55 ± 0,09
	250 µg/mL	12,75 ± 1,71*	1,49 ± 0,13
Ацетонски екстракт	10 µg/mL	13,00 ± 1,15*	1,46 ± 0,08
	50 µg/mL	14,50 ± 1,00*	1,46 ± 0,19
	100 µg/mL	15,00 ± 0,81*	1,45 ± 0,22
	250 µg/mL	18,25 ± 0,50*	1,36 ± 0,14*
Водени екстракт	10 µg/mL	9,75 ± 0,96*	1,57 ± 0,10
	50 µg/mL	12,75 ± 2,22*	1,44 ± 0,11*
	100 µg/mL	16,25 ± 2,22*	1,43 ± 0,07*
	250 µg/mL	18,25 ± 1,71*	1,30 ± 0,05*

*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце и статистички значајно смањење просечне НДИ у односу на нетретмане ћелије (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

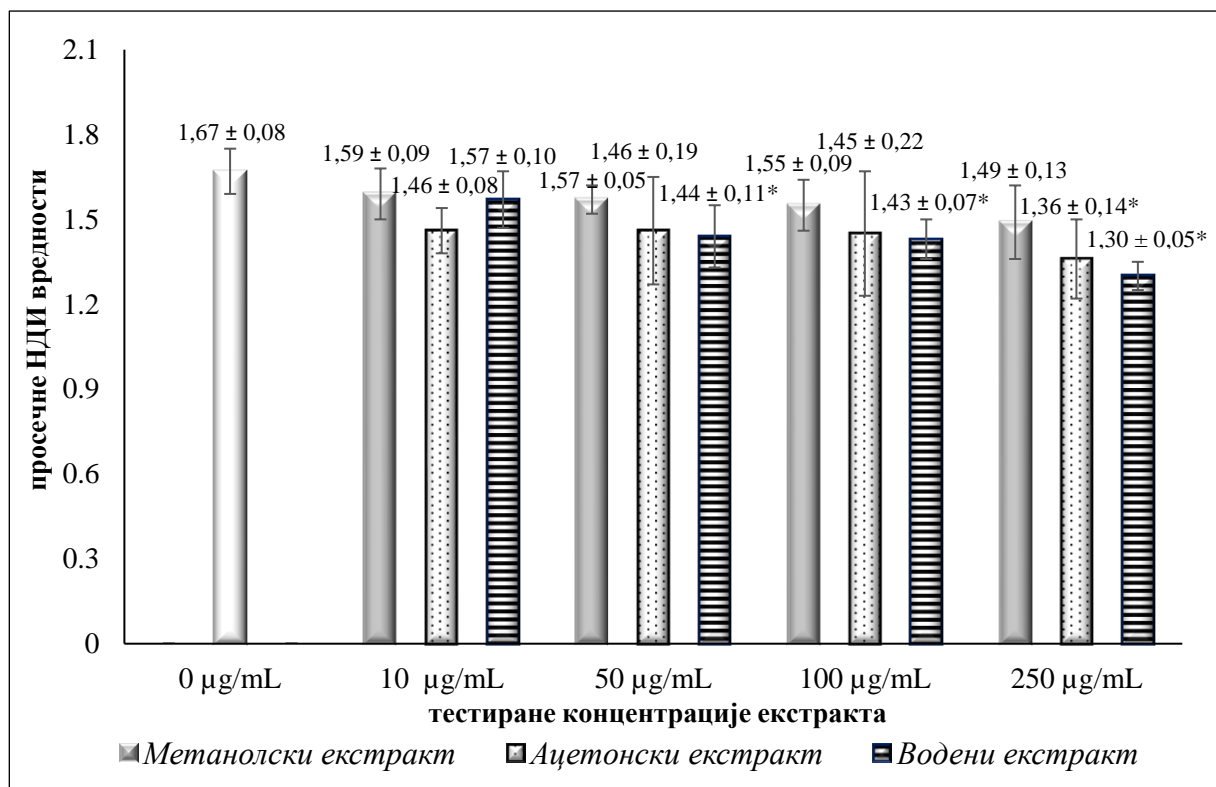


Слика 20. Фотографије бинуклеусних ћелија пре и након третмана лимфоцита различитим концентрацијама метанолског екстракта *A. vulgaris*: а) негативна контрола – нетретиране ћелије; б) 10 µg/mL; в) 100 µg/mL; г) 250 µg/mL



Графикон 25. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви здравих донаора након третмана екстрактима *A. vulgaris*

*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце у односу на нетретиране ћелије (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)



Графикон 26. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. vulgaris*

*Статистички значајно смањење просечне НДИ у односу на нетретиране ћелије (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

У циљу испитивања евентуалног комутагеног и синергистичког ефекта, лимфоцити здравих донора су истовремено третираны ММЦ и метанолским, ацетонским или воденим екстрактом *A. vulgaris*. У Табели 15 су наведене фреквенце МН и опсег варијабилности, док су у Табели 16 и на Графикону 27 приказане просечне фреквенце МН. У културама третираним само ММЦ (позитивна контрола) просечна фреквенца МН износила је $42,25 \pm 2,75$ МН/1000 БН (опсег варирања од 39 до 45) и била је значајно виша ($p < 0,05$) у поређењу са нетретираним ћелијама ($7,00 \pm 1,41$; опсег варирања од 6 до 9). Тестиране концентрације свих испитиваних екстраката *A. vulgaris* значајно су снижавале ММЦ-индуковану МН фреквенцу у односу на ММЦ третиране ћелије ($p < 0,05$). Након третмана најнижом тестираном концентрацијом (10 µg/mL) метанолског, ацетонског и воденог екстракта просечна фреквенца МН износила је $26,00 \pm 5,58$ (опсег варирања од 21 до 34); $27,00 \pm 2,16$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 24 до 29) и $34,75 \pm 2,99$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 31 до 38) (Табела 15 и 16). Највеће смањење ММЦ-индуковане МН фреквенце уочено је након третмана лимфоцита највишом тестираном концентрацијом (250 µg/mL) испитиваних екстраката, где је МН фреквенца снижена око 2,3 пута за ацетонски и водени екстракт ($18,25 \pm 0,96$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 17 до 19) за ацетонски и $18,25 \pm 2,99$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 14 до 21) за водени екстракт) и око 2,8 пута за метанолски екстракт ($15,25 \pm 2,22$ МН/1000 БН; опсег варирања од 13 до 18), у односу на позитивну контролу ($42,25 \pm 2,75$ МН/1000 БН ћелија). Израчунавањем Пирсоновог коефицијента корелације показано је да постоји значајна негативна корелација између концентрације екстракта и МН фреквенце ($r = -0,766$, $p = 0,001$ за метанолски, $r = -0,915$, $p = 0,000$ за ацетонски и $r = -0,733$, $p = 0,001$ за водени екстракт).

Дистрибуција МН код сва четири донора (Табела 15) указује да се број микронуклеусних БН ћелија након комбинованих третмана анализираним екстрактима биљке и ММИЦ дозно-зависно смањивао у односу на позитивну контролу где је уочено 137 БН ћелија са 1 МН (3,43%) и 16 БН ћелија са 2 МН (0,40%). Највеће смањење у броју БН ћелија са 1 МН уочено је након третмана ћелија највишом тестираном концентрацијом (250 µg/mL) ацетонског и метанолског екстракта (56 БН ћелија са 1 МН (1,40%) за ацетонски и 59 БН ћелија са 1 МН (1,50%) за метанолски екстракт). БН ћелија са 2 МН биле су најмање заступљене након третмана највишом тестираном концентрацијом метанолским екстрактом (1 БН ћелија са 2 МН – 0,03%). Након третмана ацетонским и воденим екстрактом *A. vulgaris* при истој концентрацији уочено је 7 БН (0,18%), односно 2 БН (0,05%) ћелије са 2 МН. БН ћелије са 3 МН и 4 МН биле су присутне само након третмана ћелија воденим биљним екстрактом и ММИЦ, где је при концентрацији од 10 µg/mL уочено по 2 БН ћелије са 3 МН (0,05%) и 4 МН (0,05%) од 4000 анализираних ћелија. Фотографије бинуклеусних ћелија након комбинованог третмана воденим екстрактом *A. vulgaris* и ММИЦ приказане су на Слици 21.

Табела 15. Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима *A. vulgaris* и митомицином Ц (ММИЦ, 0,5 µg/mL) *in vitro*

Третман	Донор	МН на 1000 БН	Број БН ћелија	Број БН ћелија са МН	Дистрибуција (%)				НДИ
					1 МН	2 МН	3 МН	>3 МН	
Позитивна контрола (митомицин Ц 0,5 µg/mL)									
ММИЦ (0,5 µg/mL)	1	45	1000	41	37	4			1,37
	2	44	1000	41	38	3			1,49
	3	41	1000	38	35	3			1,50
	4	39	1000	33	27	6			1,32
	Σ	169	4000	153(3,82)	137(3,43)	16(0,40)			
Метанолски екстракт									
10 µg/mL + ММИЦ	1	21	1000	19	17	2			1,66
	2	34	1000	32	30	2			1,63
	3	24	1000	23	22	1			1,61
	4	25	1000	23	22		1		1,37
	Σ	104	4000	97(2,43)	91(2,28)	5(0,13)	1(0,03)		
50 µg/mL + ММИЦ	1	19	1000	18	17	1			1,51
	2	30	1000	30	30				1,59
	3	23	1000	23	23				1,45
	4	23	1000	23	23				1,38
	Σ	95	4000	94(2,35)	93(2,33)	1(0,03)			
100 µg/mL + ММИЦ	1	17	1000	17	17				1,52
	2	20	1000	20	20				1,56
	3	22	1000	20	18	2			1,44
	4	18	1000	17	16	1			1,37
	Σ	77	4000	74(1,85)	71(1,78)	3(0,08)			
250 µg/mL + ММИЦ	1	14	1000	14	14				1,49
	2	16	1000	16	16				1,60
	3	18	1000	17	16	1			1,60
	4	13	1000	13	13				1,34
	Σ	61	4000	60(1,53)	59(1,50)	1(0,03)			

Наставак Табеле 15

<i>Ацетонски екстракт</i>									
10 µg/mL + ММЦ	1	24	1000	20	16	4			1,26
	2	28	1000	23	18	5			1,32
	3	29	1000	29	29				1,58
	4	27	1000	25	23	2			1,68
	Σ	108	4000	97(2,43)	86(2,15)	11(0,28)			
50 µg/mL + ММЦ	1	22	1000	21	20	1			1,23
	2	24	1000	21	18	3			1,42
	3	25	1000	24	23	1			1,61
	4	22	1000	21	20	1			1,70
	Σ	93	4000	87(2,18)	81(2,03)	6(0,15)			
100 µg/mL + ММЦ	1	20	1000	16	12	4			1,24
	2	20	1000	19	18	1			1,36
	3	23	1000	21	19	2			1,39
	4	20	1000	18	16	2			1,56
	Σ	83	4000	74(1,85)	65(1,63)	9(0,23)			
250 µg/mL + ММЦ	1	19	1000	16	13	3			1,20
	2	19	1000	17	15	2			1,26
	3	18	1000	17	16	1			1,28
	4	17	1000	14	12	1	1		1,56
	Σ	73	4000	64(1,60)	56(1,40)	7(0,18)	1(0,03)		
<i>Водени екстракт</i>									
10 µg/mL + ММЦ	1	38	1000	33	29	3	1		1,44
	2	36	1000	30	26	3		1	1,35
	3	34	1000	27	23	2	1	1	1,67
	4	31	1000	29	27	2			1,42
	Σ	139	4000	119(2,98)	105(2,63)	10(0,25)	2(0,05)	2(0,05)	
50 µg/mL + ММЦ	1	26	1000	24	22	2			1,40
	2	19	1000	18	17	1			1,30
	3	21	1000	18	15	3			1,55
	4	23	1000	22	21	1			1,47
	Σ	89	4000	82(2,05)	75(1,88)	7(0,18)			
100 µg/mL + ММЦ	1	23	1000	22	21	1			1,42
	2	17	1000	16	15	1			1,35
	3	20	1000	18	17		1		1,39
	4	22	1000	21	20	1			1,45
	Σ	82	4000	77(1,93)	73(1,83)	3(0,08)	1(0,03)		
250 µg/mL + ММЦ	1	21	1000	18	16	1	1		1,28
	2	19	1000	19	19				1,34
	3	19	1000	17	16		1		1,34
	4	14	1000	13	12	1			1,38
	Σ	73	4000	67(1,68)	63(1,58)	2(0,05)	2(0,05)		

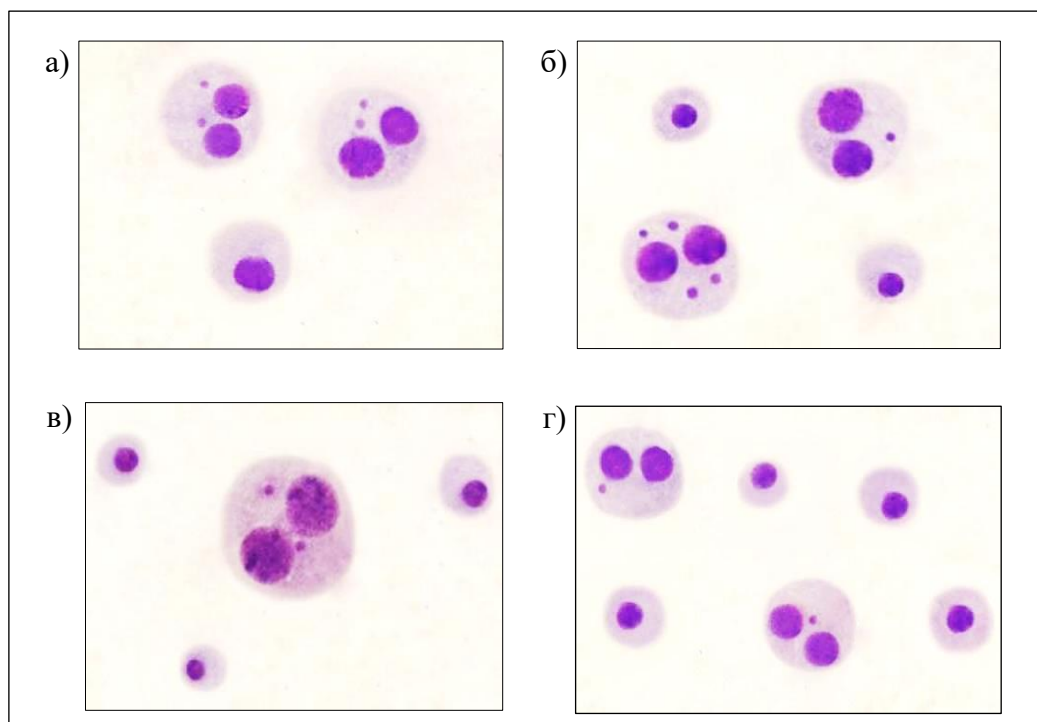
% је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

Резултати анализе НДИ у лимфоцитима након комбинованог третмана екстракта *A. vulgaris* и ММЦ приказани су у Табелама 15 и 16 и на Графикону 28. У културама третираним само ММЦ (позитивна контрола) просечна НДИ вредност износила је $1,42 \pm 0,09$ са опсегом варирања од 1,32 до 1,50. Тестиране концентрације метанолског екстракта повећавале су ММЦ већ снижене НДИ вредности, али значајно само у највишој тестираној концентрацији ($250 \mu\text{g/mL}$), где је просечна НДИ вредност износила $1,51 \pm 0,12$ (опсег варирања од 1,34 до 1,60) ($p < 0,05$). Са друге стране, ацетонски и водени екстракти нису значајно утицали на НДИ вредност (Табела 16, Графикон 28) (*Radović Jakovljević u sar., 2020; 2022b*).

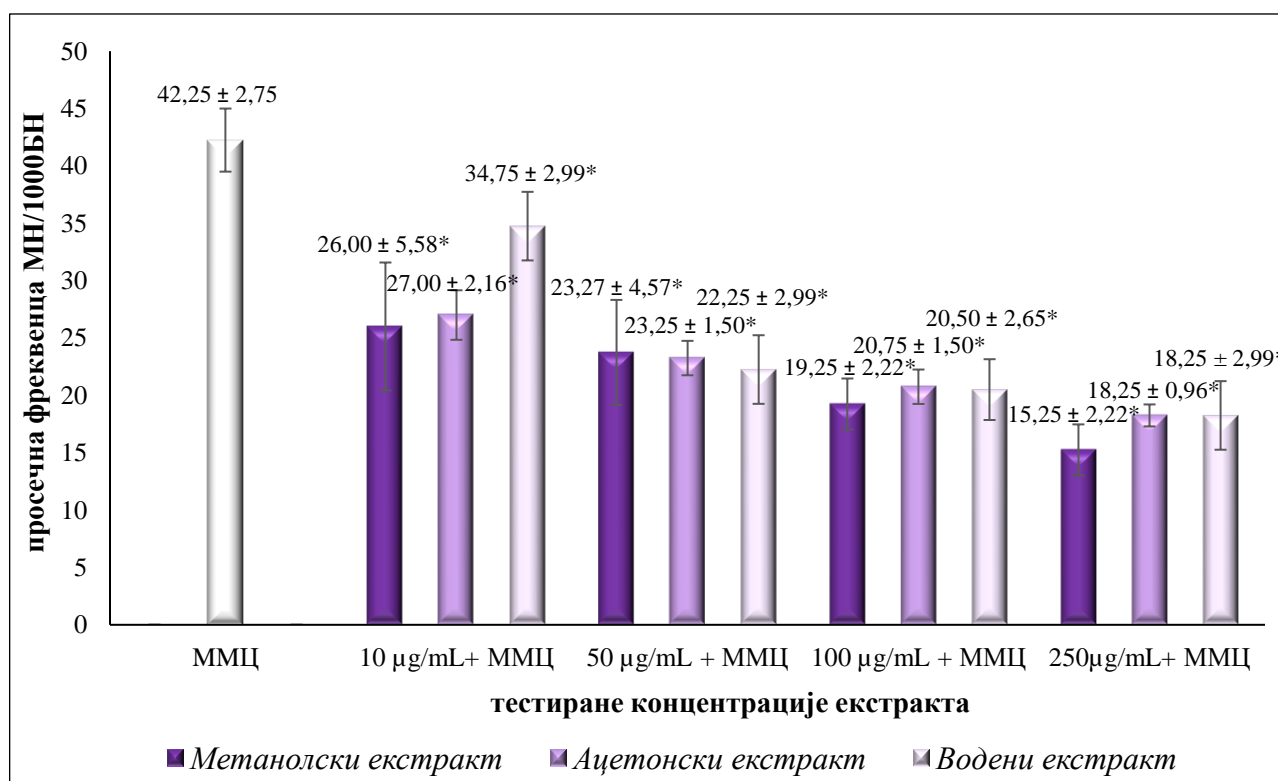
Табела 16. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстракта *A. vulgaris* и митомицином Ц (ММЦ, $0,5 \mu\text{g/mL}$) *in vitro*

Третман	Концентрација	МН/1000БН ћелија ($X \pm \text{С.Д.}$)	НДИ ($X \pm \text{С.Д.}$)
Негативна контрола (без третмана)	$0 \mu\text{g/mL}$	$7,00 \pm 1,41$	$1,67 \pm 0,08$
Позитивна контрола (ММЦ)	$0,5 \mu\text{g/mL}$	$42,25 \pm 2,75^*$	$1,42 \pm 0,09^*$
Метанолски екстракт	$10 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$26,00 \pm 5,58^*$	$1,57 \pm 0,13$
	$50 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$23,75 \pm 4,57^*$	$1,48 \pm 0,09$
	$100 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$19,25 \pm 2,22^*$	$1,47 \pm 0,08$
	$250 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$15,25 \pm 2,22^*$	$1,51 \pm 0,12^*$
Ацетонски екстракт	$10 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$27,00 \pm 2,16^*$	$1,46 \pm 0,20$
	$50 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$23,25 \pm 1,50^*$	$1,42 \pm 0,09$
	$100 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$20,75 \pm 1,50^*$	$1,39 \pm 0,13$
	$250 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$18,25 \pm 0,96^*$	$1,32 \pm 0,16$
Водени екстракт	$10 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$34,75 \pm 2,99^*$	$1,47 \pm 0,14$
	$50 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$22,25 \pm 2,99^*$	$1,43 \pm 0,11$
	$100 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$20,50 \pm 2,65^*$	$1,40 \pm 0,04$
	$250 \mu\text{g/mL} + \text{ММЦ}$	$18,25 \pm 2,99^*$	$1,33 \pm 0,04$

*Статистички значајно смањење просечне МН фреквенце и статистички значајно повећање просечне НДИ у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

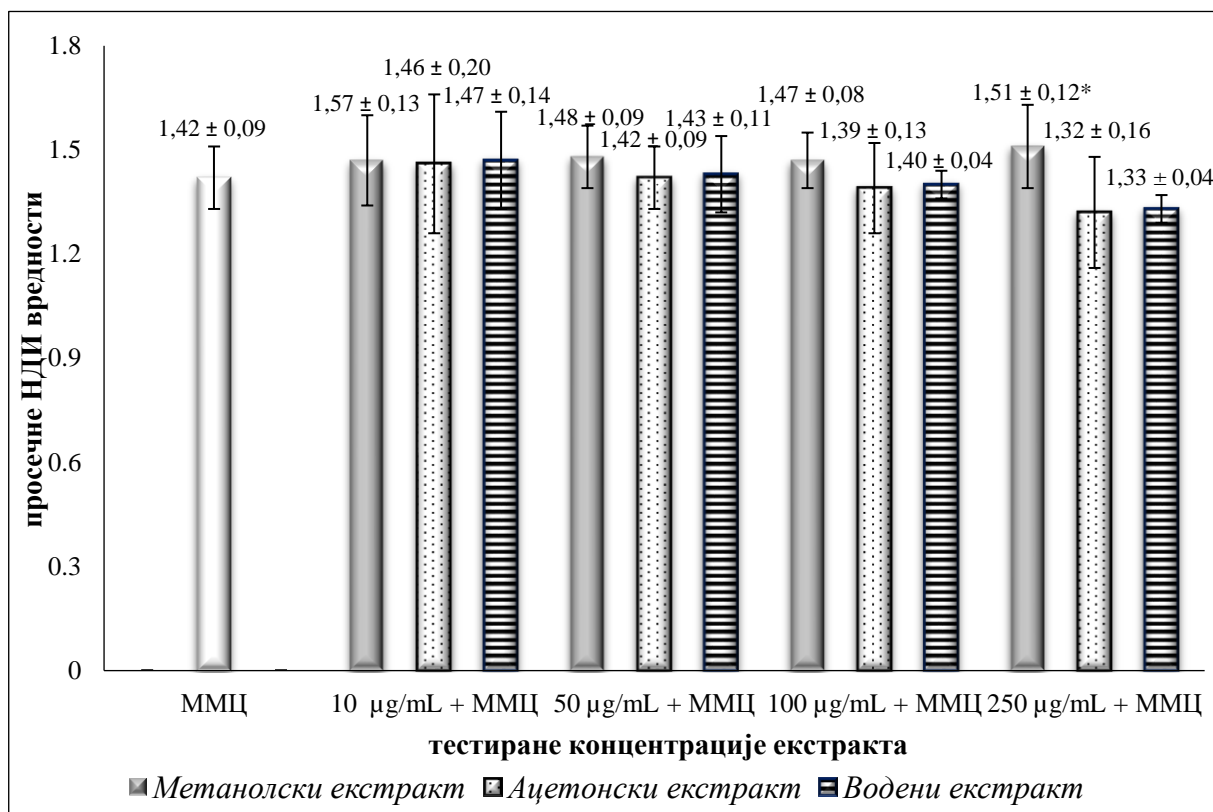


Слика 21. Фотографије бинуклеусних ћелија након комбинованог третмана лимфоцита различитим концентрацијама воденог екстракта *A. vulgaris* и митомоцином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL): а) позитивна контрола – ММЦ; б) 10 µg/mL; в) 100 µg/mL; г) 250 µg/mL



Графикон 27. Ефекат метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. vulgaris* на митомоцином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу

*Статистички значајно смањење просечне МН фреквенце у односу на позитивну контролу (Студентов t-тест, $p < 0,05$)



Графикон 28. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима *A. vulgaris* и митомцином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)

*Статистички значајно повећање просечне НДИ у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

4.5.2. Анализа генотоксичног и антимуtagenог ефекта екстракта *A. alba* на култивисане лимфоците здравих донора

Резултати анализе МН и НДИ у лимфоцитима четири здрава донора пре и након третмана различитим концентрацијама (10, 50, 100 и 250 µg/mL) екстрактима *A. alba* приказане су у Табелама 17 и 18 и на Графиконима 29 и 30. Просечна фреквенца МН у негативној контроли (нетретирани хелије) је износила $7,00 \pm 1,41$ МН/1000 БН хелија (опсег варирања од 6 до 9). Све тестиране концентрације метанолског биљног екстракта дозно-зависно ($r = 0,805$, $p = 0,000$) и значајно су повећавале просечне МН фреквенце, при чему је највиша тестирана концентрација (250 µg/mL) повећала МН фреквенцу на $16,50 \pm 2,38$ (опсег варирања од 13 до 18). Дозно-зависно повећање МН фреквенце добијено је и након третмана тестираним концентрацијама ацетонског екстракта, у односу на нетретирани хелије ($r = 0,848$, $p = 0,000$). Само најнижа тестирана концентрација (10 µg/mL) није значајно мењала МН фреквенцу, док се након третмана лимфоцита осталим тестираним концентрацијама просечна МН фреквенца значајно повећала на $11,00 \pm 1,82$ (опсег варирања од 9 до 13) за концентрацију 50 µg/mL, $12,00 \pm 2,16$ (опсег варирања од 10 до 15) за концентрацију 100 µg/mL и $15,25 \pm 1,26$ МН/1000 БН хелија (опсег варирања од 14 до 17) за највишу тестирану концентрацију. Водени екстракт *A. alba* није значајно утицао на МН фреквенцу у свим тестираним концентрацијама ($p > 0,05$). Корелација између тестираних концентрација екстракта и МН фреквенце била је позитивна и статистички значајна ($r = 0,756$, $p = 0,001$).

Анализом дистрибуције МН уочено је да се са порастом тестиране концентрације екстракта повећавао број МН у БН ћелијама као и број БН ћелија са МН. Највећи број БН ћелија са 1 МН уочен је након третмана ћелија метанолским биљним екстрактом (34-0,85% при концентрацији од 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 44-1,10% при концентрацији 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 46-1,15% при концентрацији 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и 58-1,45% при концентрацији од 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). БН ћелије са 2 МН биле су најзаступљеније након третмана лимфоцита метанолским (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) и воденим (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) биљним екстрактом, када су детектоване 4 БН ћелије са 2 МН (0,10%). БН ћелије са 3 МН биле су присутне само при тестирању метанолским екстрактом, где је при концентрацији од 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ уочена 1 БН (0,03%) ћелија са 3 МН на 4000 анализираних ћелија (Табела 17). Фотографије бинуклеусних ћелија пре и након третмана метанолским екстрактом биљке *A. alba* приказане су на Слици 22.

Резултати анализе НДИ у лимфоцитима здравих донора пре и након третмана различитим концентрацијама метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. alba*, приказани су у Табели 17 и 18 и на Графикону 30. У нетретираним ћелијама (негативна контрола) НДИ вредности су варирале од 1,60 до 1,75, при чему је просечна вредност износила $1,67 \pm 0,08$. Све тестиране концентрације метанолског екстракта дозно-зависно ($r = -0,826$, $p = 0,001$) снижавале су просечне НДИ вредности, у поређењу са нетретираним ћелијама ($p < 0,05$). НДИ вредност при концентрацији од 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ износила је $1,42 \pm 0,04$ (опсег варирања од 1,37 до 1,46), при концентрацији од 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ је износила $1,36 \pm 0,04$ (опсег варирања од 1,31 до 1,40), за концентрацију од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ је износила $1,25 \pm 0,03$ (опсег варирања од 1,24 до 1,30) и $1,28 \pm 0,03$ (опсег варирања од 1,22 до 1,28) за концентрацију од 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ацетонски екстракт *A. alba* снижавао је НДИ вредност, али значајно само у највишој тестираној концентрацији (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), где је просечна НДИ вредност износила $1,35 \pm 0,08$ (опсег варирања од 1,25 до 1,43). Пирсонов коефицијент корелације између тестираних концентрација и НДИ био је негативан и статистички значајан ($r = -0,884$, $p = 0,05$). Водени екстракт *A. alba* није значајно утицао на НДИ вредност (Radović Jakovljević u cap., 2020; 2022a).

Табела 17. Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. alba in vitro*

Третман	Донор	МН на 1000 БН	Број БН ћелија	Број БН ћелија са МН	Дистрибуција (%)			НДИ
					1 МН	2 МН	3 МН	
Негативна контрола (без третмана)								
0 µg/mL	1	6	1000	6	6			1,60
	2	6	1000	6	6			1,75
	3	7	1000	7	7			1,60
	4	9	1000	9	9			1,74
	Σ	28	4000	28 (0,70)	28 (0,70)			
Метанолски екстракт								
10 µg/mL	1	8	1000	7	6	1		1,45
	2	10	1000	10	10			1,40
	3	12	1000	12	12			1,37
	4	8	1000	7	6	1		1,46
	Σ	38	4000	36 (0,90)	34 (0,85)	2 (0,05)		
50 µg/mL	1	10	1000	9	8	1		1,40
	2	13	1000	11	10		1	1,38
	3	15	1000	15	15			1,36
	4	11	1000	11	11			1,31
	Σ	49	4000	46 (1,15)	44 (1,10)	1 (0,03)	1 (0,03)	
100 µg/mL	1	11	1000	10	9	1		1,30
	2	14	1000	13	12	1		1,24
	3	14	1000	13	12	1		1,30
	4	15	1000	14	13	1		1,26
	Σ	54	4000	50 (1,25)	46 (1,15)	4 (0,10)		
250 µg/mL	1	13	1000	11	9	2		1,28
	2	17	1000	17	17			1,22
	3	18	1000	17	16	1		1,27
	4	18	1000	17	16	1		1,23
	Σ	66	4000	62 (1,55)	58 (1,45)	4 (0,10)		
Ацетонски екстракт								
10 µg/mL	1	8	1000	8	8			1,82
	2	9	1000	9	9			1,64
	3	9	1000	8	7	1		1,75
	4	9	1000	9	9			1,69
	Σ	35	4000	34 (0,85)	35 (0,33)	1 (0,03)		
50 µg/mL	1	9	1000	9	9			1,67
	2	13	1000	13	13			1,60
	3	10	1000	8	6	2		1,71
	4	12	1000	11	10	1		1,65
	Σ	44	4000	41 (1,03)	38 (0,95)	3 (0,07)		
100 µg/mL	1	10	1000	10	10			1,51
	2	15	1000	14	13	1		1,61
	3	11	1000	11	11			1,50
	4	12	1000	11	10	1		1,64
	Σ	48	4000	46 (1,15)	44 (1,10)	2 (0,05)		

Наставак Табеле 17

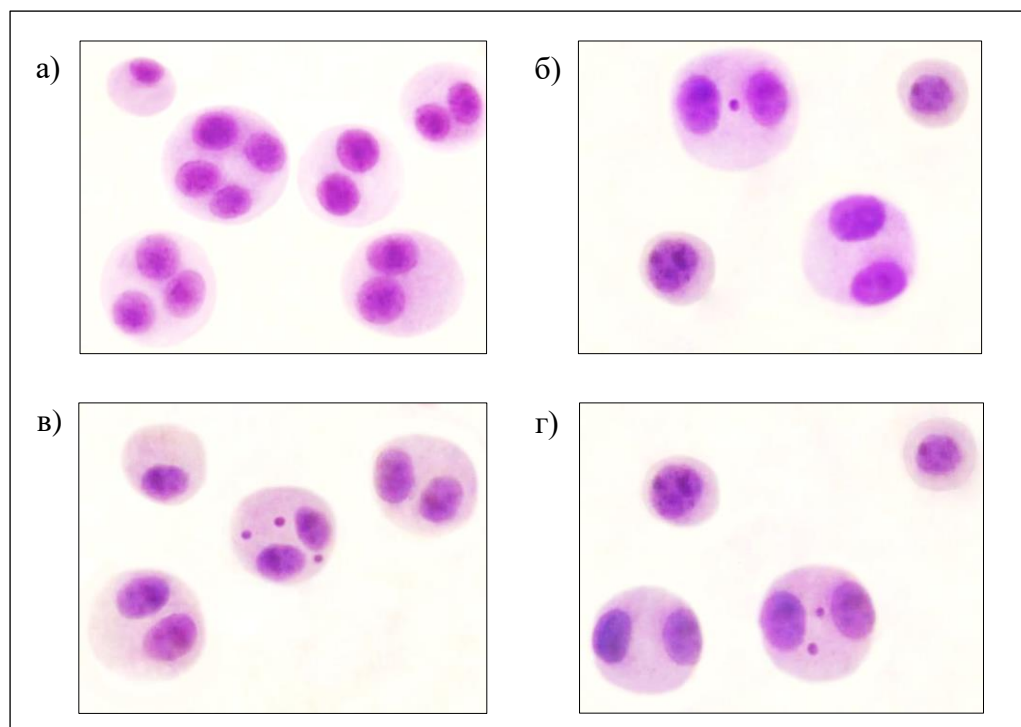
250 µg/mL	1	15	1000	15	15			1,25
	2	17	1000	17	17			1,40
	3	14	1000	14	14			1,32
	4	15	1000	13	11	2		1,43
	Σ	61	4000	59 (1,48)	57 (1,43)	2 (0,05)		
Водени екстракт								
10 µg/mL	1	8	1000	7	6	1		1,70
	2	7	1000	6	5	1		1,62
	3	7	1000	7	7			1,75
	4	6	1000	6	6			1,72
	Σ	28	4000	26 (0,65)	24 (0,60)	2 (0,05)		
50 µg/mL	1	7	1000	7	7			1,55
	2	9	1000	9	9			1,86
	3	7	1000	7	7			1,70
	4	8	1000	8	8			1,59
	Σ	31	4000	31 (0,78)	31 (0,78)			
100 µg/mL	1	7	1000	7	7			1,63
	2	9	1000	9	9			1,74
	3	9	1000	8	7	1		1,66
	4	7	1000	6	5	1		1,46
	Σ	32	4000	30 (0,75)	28 (0,70)	2 (0,05)		
250 µg/mL	1	11	1000	9	7	2		1,50
	2	11	1000	10	9	1		1,28
	3	10	1000	9	8	1		1,65
	4	9	1000	9	9			1,34
	Σ	41	4000	37 (0,93)	33 (0,83)	4 (0,10)		

% је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

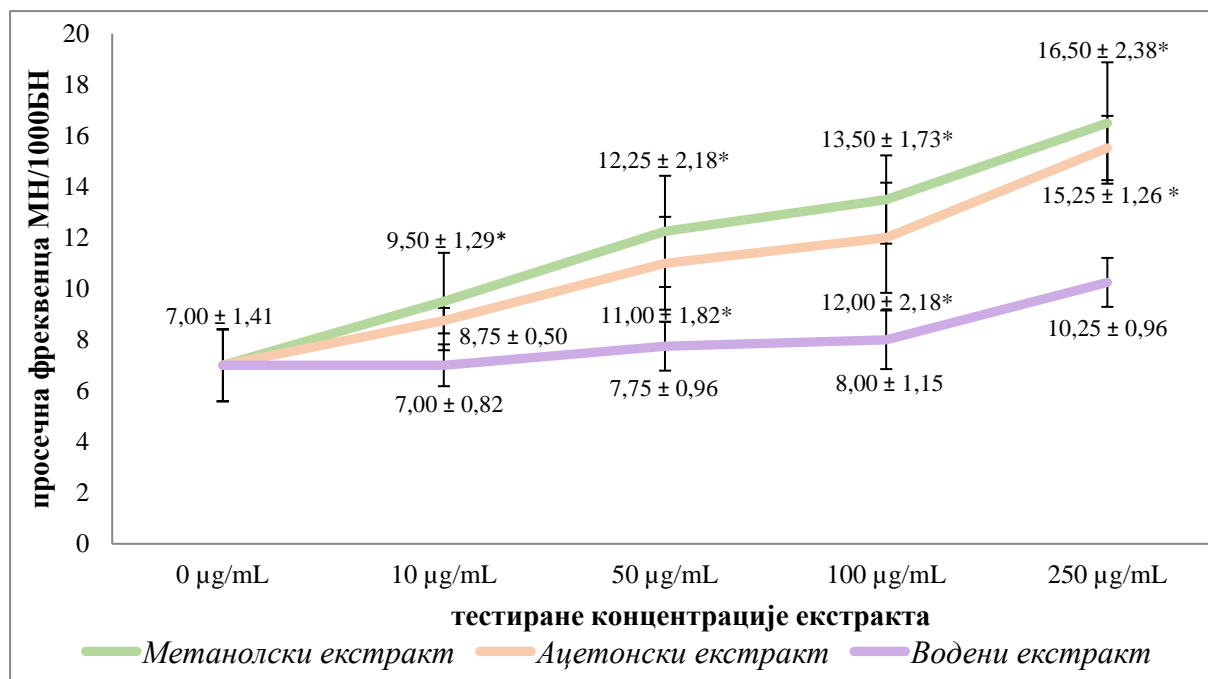
Табела 18. Просечне фреквенце (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. alba in vitro*

Третман	Концентрација	МН/1000БН ћелија ($\bar{X} \pm \text{С.Д.}$)	НДИ ($\bar{X} \pm \text{С.Д.}$)
Негативна контрола (без третмана)	0 $\mu\text{g/mL}$	7,00 \pm 1,41*	1,67 \pm 0,08*
Позитивна контрола (ММЦ)	0,5 $\mu\text{g/mL}$	42,25 \pm 2,75	1,42 \pm 0,09
Метанолски екстракт	10 $\mu\text{g/mL}$	9,50 \pm 1,91*	1,42 \pm 0,04*
	50 $\mu\text{g/mL}$	12,25 \pm 2,18*	1,36 \pm 0,04*
	100 $\mu\text{g/mL}$	13,50 \pm 1,73*	1,25 \pm 0,03*
	250 $\mu\text{g/mL}$	16,50 \pm 2,38*	1,28 \pm 0,03*
Ацетонски екстракт	10 $\mu\text{g/mL}$	8,75 \pm 0,50	1,72 \pm 0,08
	50 $\mu\text{g/mL}$	11,00 \pm 1,82*	1,66 \pm 0,05
	100 $\mu\text{g/mL}$	12,00 \pm 2,16*	1,56 \pm 0,07
	250 $\mu\text{g/mL}$	15,25 \pm 1,26*	1,35 \pm 0,08*
Водени екстракт	10 $\mu\text{g/mL}$	7,00 \pm 0,82	1,70 \pm 0,06
	50 $\mu\text{g/mL}$	7,75 \pm 0,96	1,67 \pm 0,14
	100 $\mu\text{g/mL}$	8,00 \pm 1,15	1,62 \pm 0,12
	250 $\mu\text{g/mL}$	10,25 \pm 0,96	1,44 \pm 0,17

*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце и статистички значајно смањење просечне НДИ у односу на нетретирание ћелије (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

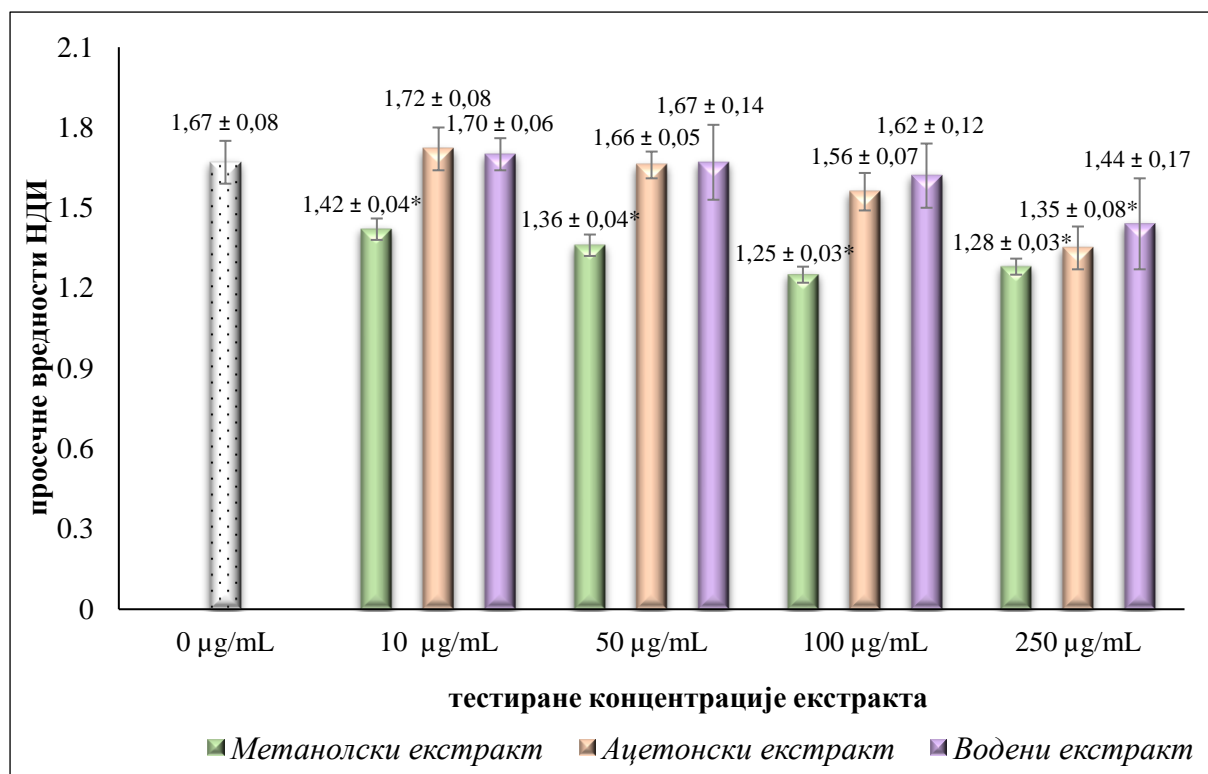


Слика 22. Фотографије бинуклеусних ћелија пре и након третмана лимфоцита различитим концентрацијама метанолског екстракта *A. alba*: а) негативна контрола – нетретирание ћелије; б) 10 $\mu\text{g/mL}$; в) 50 $\mu\text{g/mL}$; г) 250 $\mu\text{g/mL}$



Графикон 29. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. alba*

*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце у односу на нетретирание ћелије (Студентов t-тест, $p < 0,05$)



Графикон 30. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима *A. alba*

*Статистички значајно смањење просечне НДИ у односу на нетретирание ћелије (Студентов t-тест, $p < 0,05$)

У Табелама 19 и 20 и на Графикону 31 приказан је ефекат метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. alba* на ММЦ-индуковану генотоксичност. ММЦ је значајно повећавао фреквенцу МН у поређењу са нетретираним ћелијама ($42,25 \pm 2,75$ МН/1000 БН у односу на $7,00 \pm 1,41$ МН/1000 БН). Опсег варирања МН фреквенце код сва четири здрава донора износио је од 39 до 45 МН/1000 БН. Након третмана лимфоцита метанолским екстрактом уочено је значајно дозно-зависно ($r = -0,934$, $p = 0,000$) смањење ММЦ-индуковане МН фреквенце у свим тестираним концентрацијама, при чему је највиша концентрација ($250 \mu\text{g/mL}$) редуковала МН фреквенцу на $20,00 \pm 1,63$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 18 до 22). Дозно-зависно смањење ММЦ-индуковане МН фреквенце добијено је и након третмана тестираним концентрацијама ацетонским и воденим екстрактом, у односу на нетретираним ћелијама. Најнижа тестирана концентрација ($10 \mu\text{g/mL}$) ацетонског и воденог екстракта редуковала је ММЦ-индуковану МН фреквенцу на $26,50 \pm 2,08$ (опсег варирања од 24 до 29) и $27,25 \pm 4,57$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 22 до 32), док је након третмана $250 \mu\text{g/mL}$ МН фреквенца редукована на $17,75 \pm 1,26$ (опсег варирања од 16 до 19) и $14,50 \pm 1,91$ МН/1000 БН ћелија (опсег варирања од 13 до 17) за оба екстракта. Израчунавањем Пирсоновог коефицијента корелације показано је да постоји значајна негативна корелација између концентрације екстракта и МН фреквенце ($r = -0,883$; $p = 0,000$ за ацетонски и $r = -0,859$ $p = 0,000$ за водени екстракт).

Анализом дистрибуције МН уочено је да се број микронуклеусних БН ћелија након комбинованих третмана анализираним екстрактима биљке и ММЦ дозно-зависно смањивао. Највећи број БН ћелија са 1 МН уочен је при третману метанолским екстрактом (96-2,40% при концентрацији од $10 \mu\text{g/mL}$; 88-2,20% при концентрацији $50 \mu\text{g/mL}$; 75-1,88% при концентрацији $100 \mu\text{g/mL}$ и 69-1,73% при концентрацији од $250 \mu\text{g/mL}$). Са порастом концентрације екстракта смањивао се и број БН ћелија са већим бројем МН. Након третмана лимфоцита најнижом тестираним концентрацијом ($10 \mu\text{g/mL}$) метанолског биљног екстракта, уочено је 14 БН ћелија са 2 МН (0,35%) и 2 БН ћелије са 3 МН (0,05%), док смо при концентрацији од $250 \mu\text{g/mL}$ детектовали 7 БН ћелија са 2 МН (0,18%). Слични резултати су уочени и након третмана осталим биљним екстрактима. При најнижој концентрацији ($10 \mu\text{g/mL}$) ацетонског и воденог екстракта *A. alba*, уочено је 13 БН (0,33%), односно 11 БН (0,26%) ћелија са 2 МН, док је при концентрацији од ($250 \mu\text{g/mL}$) детектовано само 3 БН (0,08%), односно 1 БН (0,03%) ћелија са 2 МН (Табела 19). Фотографије бинуклеусних ћелија након комбинованог третмана лимфоцита различитим концентрацијама воденог екстракта *A. alba* и ММЦ приказане су на Слици 23.

Резултати анализе НДИ вредности након комбинованог третмана различитим концентрацијама метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. alba* и ММЦ приказани су у Табелама 19 и 20 и на Графикону 32. У културама третираним ММЦ (позитивна контрола), просечна НДИ вредност је износила $1,42 \pm 0,09$ са опсегом варирања од 1,32 до 1,50. Метанолски екстракт биљке дозно-зависно ($r = -0,787$, $p = 0,00$) редуковао је већ ММЦ-снижене НДИ вредности, али значајно само у највишој тестираној концентрацији ($250 \mu\text{g/mL}$), где је НДИ вредност износила $1,15 \pm 0,04$ (опсег варирања од 1,12 до 1,20). Супротно, ацетонски и водени биљни екстракти повећавали су ММЦ-снижене НДИ вредности, али је ефекат био значајан у концентрацијама од 10 до $100 \mu\text{g/mL}$ са вероватноћом, $p < 0,05$. У културама које су третиране ацетонским екстрактом, НДИ је варирао од $1,62 \pm 0,08$ до $1,54 \pm 0,07$, а у културама које су третиране воденим екстрактом од $1,67 \pm 0,02$ до $1,50 \pm 0,07$ (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020;2022b).

Табела 19. Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима *A. alba* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) *in vitro*

Третман	Донор	МН на 1000 БН	Број БН ћелија	Број БН ћелија са МН	Дистрибуција (%)			НДИ
					1 МН	2 МН	3 МН	
Позитивна контрола (митомицин Ц 0,5 µg/mL)								
ММЦ (0,5 µg/mL)	1	45	1000	41	37	4		1,37
	2	44	1000	41	38	3		1,49
	3	41	1000	38	35	3		1,50
	4	39	1000	33	27	6		1,32
	Σ	169	4000	153(3,82)	137(3,43)	16(0,40)		
Метанолски екстракт								
10 µg/mL + ММЦ	1	31	1000	27	23	4		1,29
	2	33	1000	26	21	3	2	1,28
	3	34	1000	31	28	3		1,23
	4	32	1000	28	24	4		1,33
	Σ	130	4000	112(2,80)	96(2,40)	14(0,35)	2(0,05)	
50 µg/mL + ММЦ	1	26	1000	26	26			1,27
	2	30	1000	25	21	3	1	1,27
	3	26	1000	23	20	3		1,22
	4	29	1000	25	21	4		1,30
	Σ	111	4000	99(2,48)	88(2,20)	10(0,18)	1(0,03)	
100 µg/mL + ММЦ	1	22	1000	21	20	1		1,23
	2	25	1000	21	17	4		1,18
	3	23	1000	22	21	1		1,23
	4	24	1000	20	17	2	1	1,29
	Σ	94	4000	84(2,10)	75(1,88)	8(0,20)	1(0,03)	
250 µg/mL + ММЦ	1	18	1000	18	18			1,13
	2	20	1000	20	17	3		1,12
	3	20	1000	18	16	2		1,20
	4	22	1000	20	18	2		1,15
	Σ	83	4000	76(1,90)	69(1,73)	7(0,18)		
Ацетонски екстракт								
10 µg/mL + ММЦ	1	29	1000	21	14	6	1	1,66
	2	26	1000	24	22	2		1,51
	3	27	1000	24	21	3		1,64
	4	24	1000	22	20	2		1,69
	Σ	106	4000	91(2,28)	77(1,93)	13(0,33)	1(0,03)	
50 µg/mL + ММЦ	1	25	1000	22	20	1	1	1,65
	2	22	1000	21	20	1		1,50
	3	21	1000	21	21			1,63
	4	20	1000	20	20			1,68
	Σ	88	4000	84(2,10)	81(2,03)	2(0,05)	1(0,03)	
100 µg/mL + ММЦ	1	20	1000	18	16	2		1,64
	2	19	1000	19	19			1,54
	3	19	1000	19	19			1,52
	4	17	1000	17	17			1,62
	Σ	75	4000	73(1,83)	71(1,78)	2(0,05)		

Наставак Табеле 19

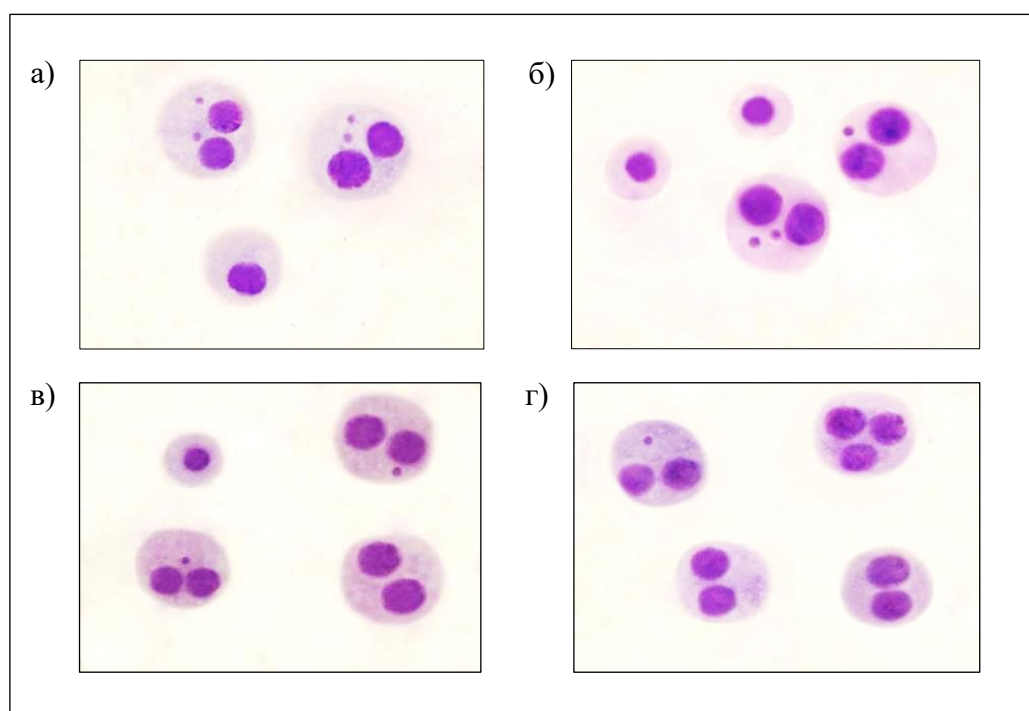
250 µg/mL + ММЦ	1	19	1000	18	17	1		1,64
	2	18	1000	18	18			1,47
	3	18	1000	17	16	1		1,56
	4	16	1000	15	14	1		1,61
	Σ	71	4000	68(1,70)	65(1,63)	3(0,08)		
Водени екстракт								
10 µg/mL + ММЦ	1	30	1000	25	21	3	1	1,70
	2	25	1000	20	16	3	1	1,67
	3	22	1000	21	20	1		1,65
	4	32	1000	28	24	4		1,68
	Σ	109	4000	94(2,35)	81(2,03)	11(0,26)	2(0,05)	
50 µg/mL+ ММЦ	1	18	1000	17	16	1		1,62
	2	24	1000	24	24			1,58
	3	20	1000	19	18	1		1,63
	4	21	1000	20	19	1		1,61
	Σ	83	4000	80(2,00)	77(1,93)	3(0,08)		
100 µg/mL + ММЦ	1	16	1000	16	16			1,66
	2	21	1000	19	17	2		1,50
	3	18	1000	17	16	1		1,60
	4	17	1000	14	11	3		1,59
	Σ	72	4000	66(1,65)	60(1,50)	6(0,15)		
250 µg/mL + ММЦ	1	13	1000	13	13			1,51
	2	17	1000	16	15	1		1,43
	3	13	1000	13	13			1,59
	4	15	1000	15	15			1,48
	Σ	58	4000	57(1,42)	56(1,40)	1(0,03)		

% је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

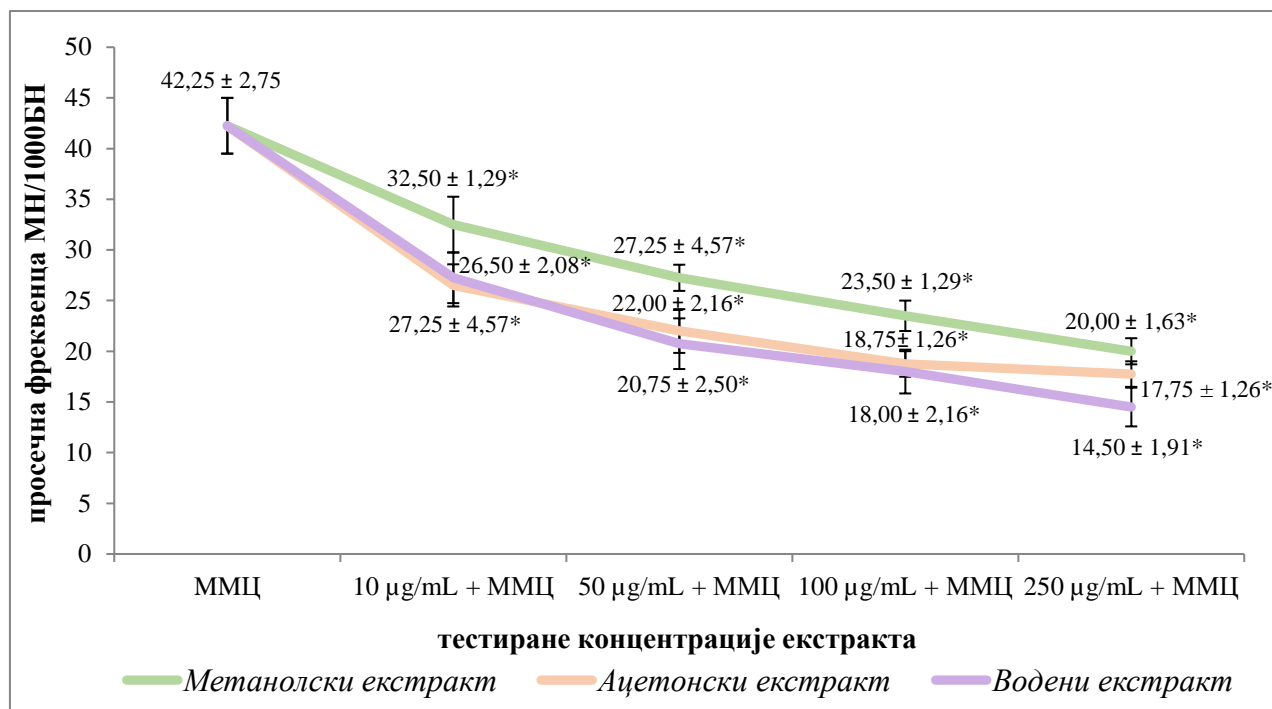
Табела 20. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима *A. alba* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) *in vitro*

Третман	Концентрација	МН/1000БН ћелија ($\bar{X} \pm С.Д.$)	НДИ ($\bar{X} \pm С.Д.$)
Негативна контрола (без третмана)	0 µg/mL	7,00 ± 1,41*	1,67 ± 0,08*
Позитивна контрола (ММЦ)	0,5 µg/mL	42,25 ± 2,75	1,42 ± 0,09
Метанолски екстракт	10 µg/mL + ММЦ	32,50 ± 1,29*	1,28 ± 0,04
	50 µg/mL + ММЦ	27,25 ± 1,50*	1,27 ± 0,03
	100 µg/mL + ММЦ	23,50 ± 1,29*	1,23 ± 0,05
	250 µg/mL + ММЦ	20,00 ± 1,63*	1,15 ± 0,04*
Ацетонски екстракт	10 µg/mL + ММЦ	26,50 ± 2,08*	1,62 ± 0,08*
	50 µg/mL + ММЦ	22,00 ± 2,16*	1,61 ± 0,08*
	100 µg/mL + ММЦ	18,75 ± 1,26*	1,58 ± 0,06*
	250 µg/mL + ММЦ	17,75 ± 1,26*	1,54 ± 0,07
Водени екстракт	10 µg/mL + ММЦ	27,25 ± 4,57*	1,67 ± 0,02*
	50 µg/mL + ММЦ	20,75 ± 2,50*	1,61 ± 0,02*
	100 µg/mL + ММЦ	18,00 ± 2,16*	1,59 ± 0,07*
	250 µg/mL + ММЦ	14,50 ± 1,91*	1,50 ± 0,07

*Статистички значајно смањење просечне МН фреквенце и статистички значајна разлика просечне НДИ у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

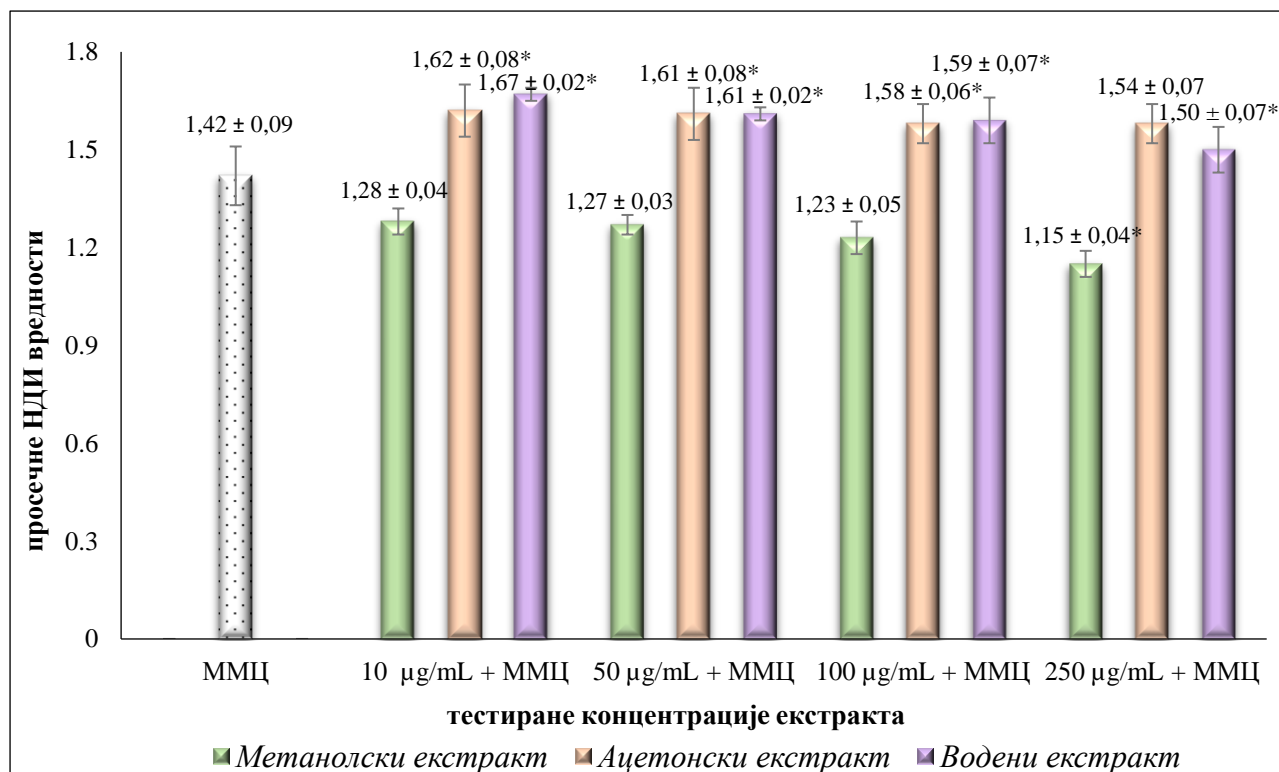


Слика 23. Фотографије бинуклеусних ћелија након комбинованог третмана лимфоцита различитим концентрацијама воденог екстракта *A. alba* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL): а) позитивна контрола – ММЦ; б) 10 µg/mL; в) 100 µg/mL; г) 250 µg/mL



Графикон 31. Ефекат метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. alba* на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу

*Статистички значајно смањење просечне МН фреквенце у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)



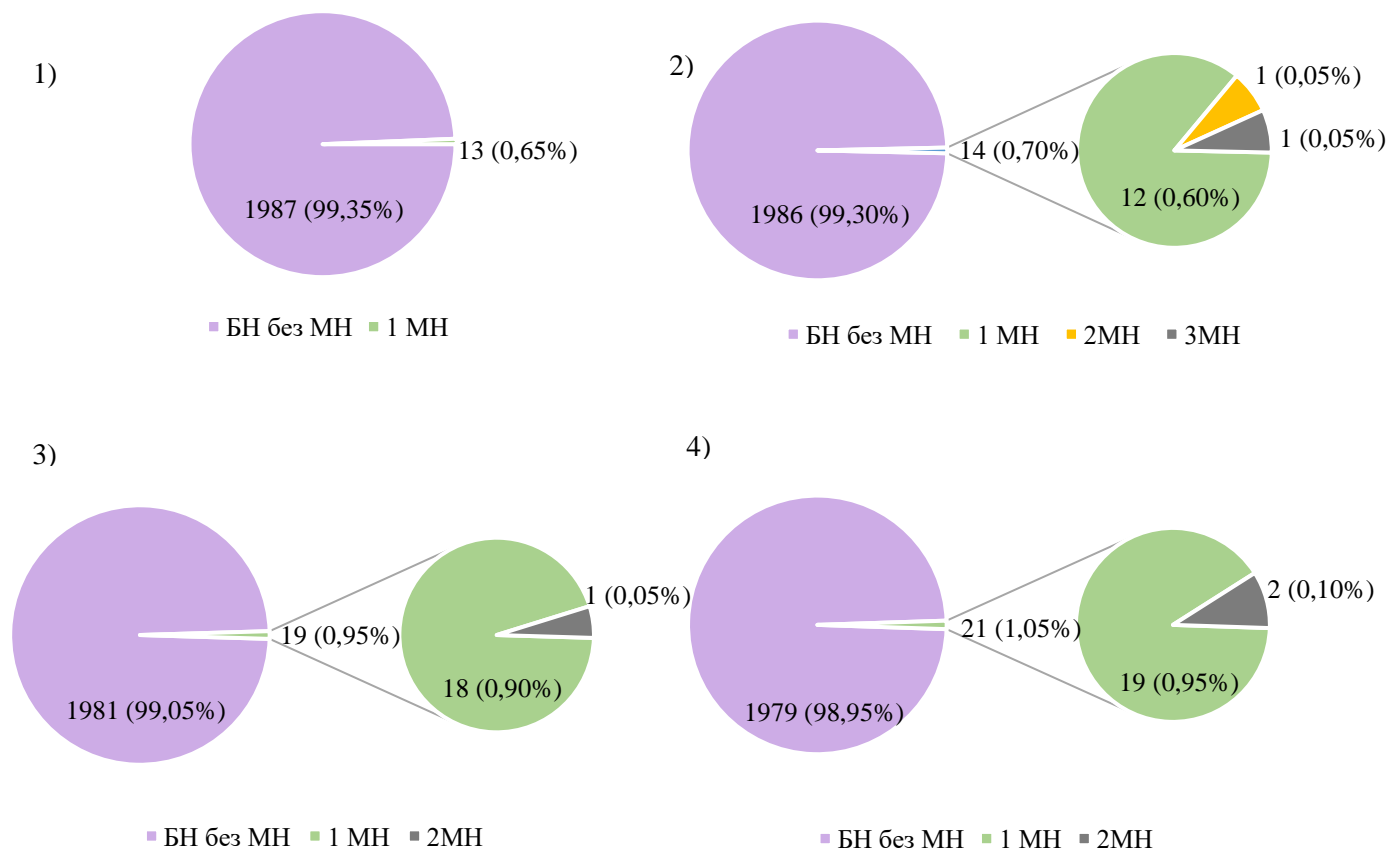
Графикон 32. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима *A. alba* и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)

*Статистички значајна разлика просечне НДИ у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

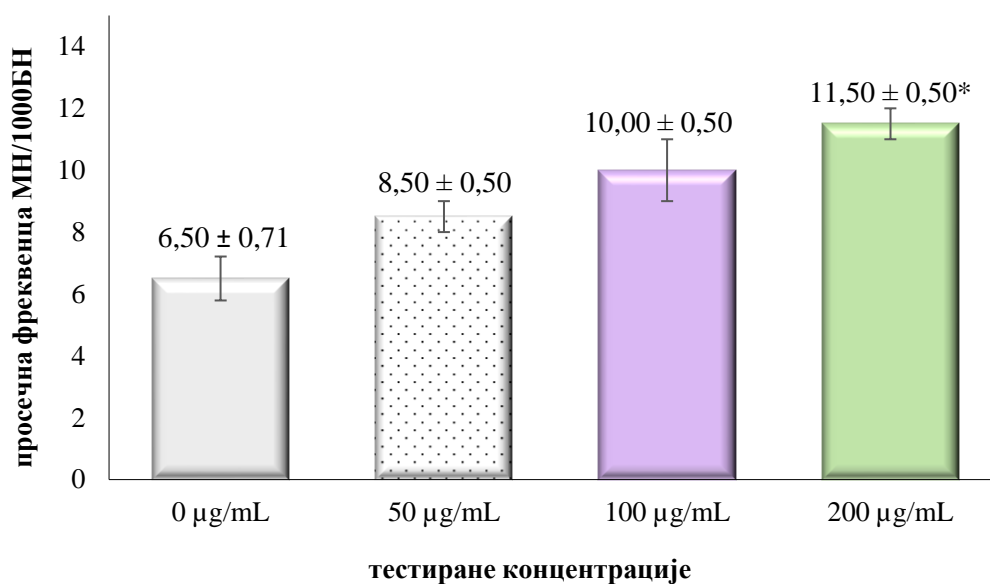
4.5.3. Анализа генотоксичног и антимуtagenог ефекта 3,5-дихидроксибензојеве киселине у култивисаним лимфоцитима здравих донора

Појединачне и просечне фреквенце МН у лимфоцитима здравих донора пре и након третмана различитим концентрацијама (50, 100 и 200 $\mu\text{g/mL}$) 3,5-дихидроксибензојеве киселине приказане су на Графиконима 33 и 34. Резултати су показали да се са порастом тестиране концентрације повећавао број БН ћелија са МН, као и број БН ћелија са већим бројем МН (Графикон 33). Након третмана ћелија 3,5-дихидроксибензојевом киселином у концентрацији од 200 $\mu\text{g/mL}$, фреквенца МН је износила 12 и 11 МН/1000 БН ћелија по донору, где је укупан број БН ћелија са МН износио 21 (1,05%), 19 БН ћелија са 1 МН (0,95%) и 2 БН ћелије са 2 МН (0,10%).

3,5-дихидроксибензојева киселина значајно је повећала просечну МН фреквенцу ($11,50 \pm 0,50$ МН/1000 БН) само у највишој тестираној концентрацији (200 $\mu\text{g/mL}$) са вероватноћом $p < 0,05$, док ниже концентрације (50 и 100 $\mu\text{g/mL}$) нису утицале на МН фреквенцу, у поређењу са нетретираним ћелијама ($6,50 \pm 0,71$ МН/1000 БН) (Графикон 34). Пирсонов коефицијент корелације показао је значајно дозно-зависно повећање МН фреквенце ($r = 0,866$, $p = 0,03$).



Графикон 33. Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине: 1) негативна контрола – нетретиране ћелије; 2) 50 $\mu\text{g/mL}$; 3) 100 $\mu\text{g/mL}$; 4) 200 $\mu\text{g/mL}$. % је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија



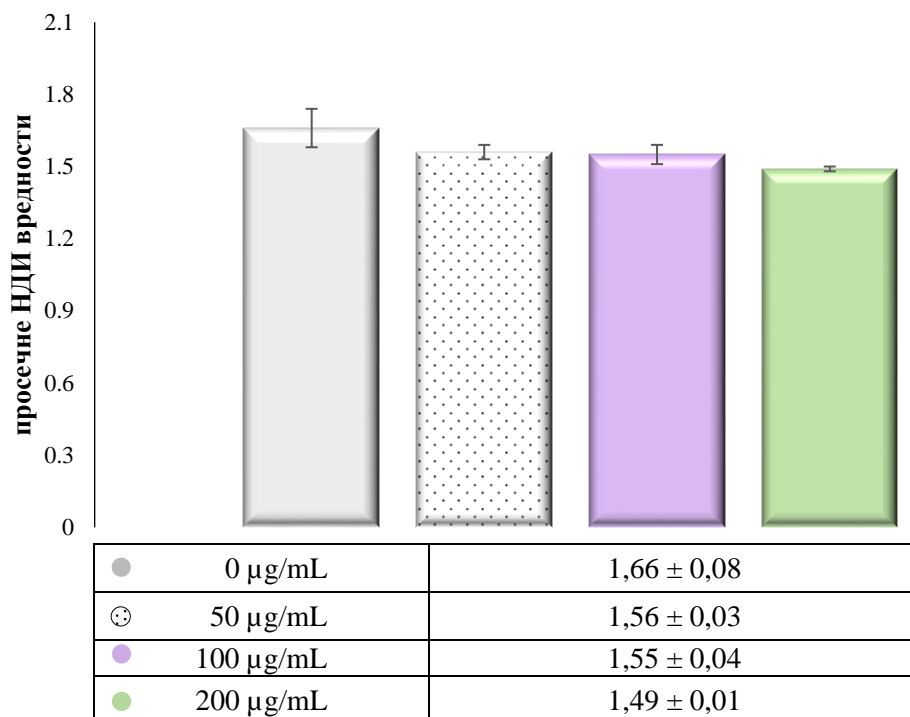
Графикон 34. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине

*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце у односу на нетретиране ћелије (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

Резултати анализе НДИ у лимфоцитима здравих донора пре и након третмана 3,5-дихидроксибензојевом киселином приказани су у Табели 21 и на Графикону 35. У нетретираним ћелијама НДИ вредности су износиле 1,60 и 1,74. Све тестиране концентрације 3,5-дихидроксибензојеве киселине су у поређењу са контролном групом нетретираних ћелија, смањивале НДИ вредности, али без статистичке значајности ($p > 0,05$) (Графикон 35) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022a).

Табела 21. Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине

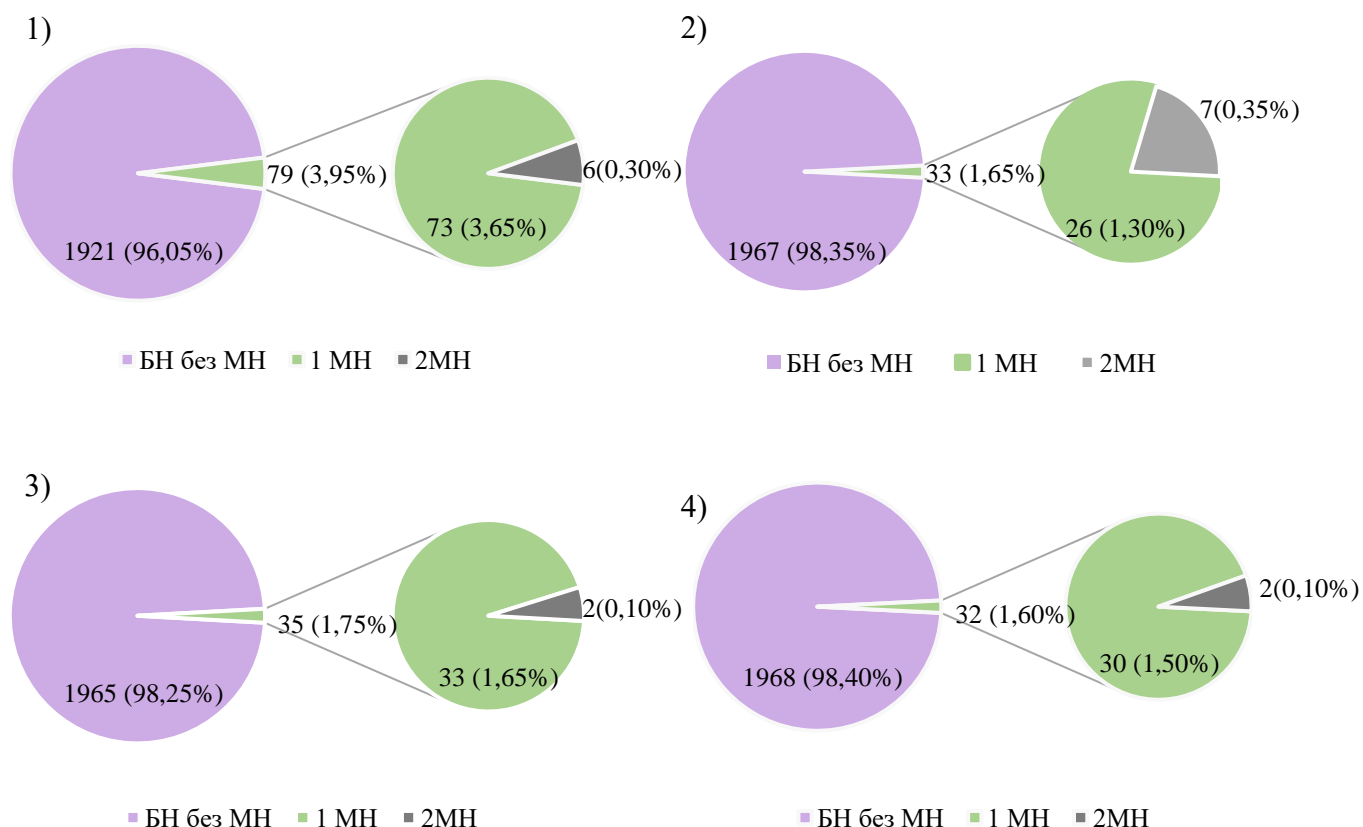
Концентрација	Донор	Број анализираних ћелија	НДИ
0 µg/mL	1	500	1,60
50 µg/mL		500	1,53
100 µg/mL		500	1,52
200 µg/mL		500	1,48
0 µg/mL	2	500	1,74
50 µg/mL		500	1,59
100 µg/mL		500	1,59
200 µg/mL		500	1,50



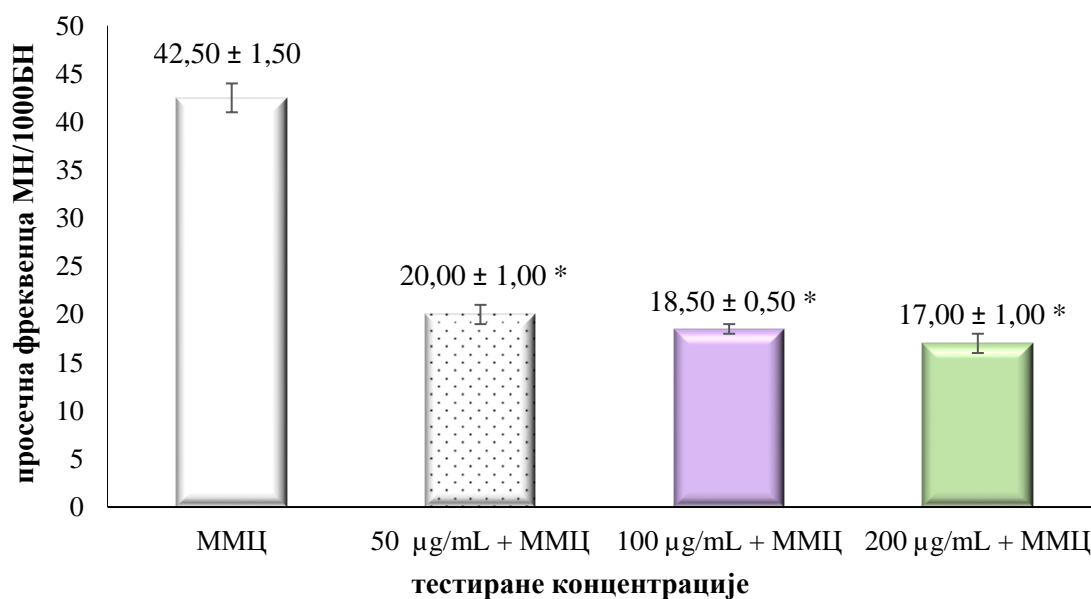
Графикон 35. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине

У Табели 22 и на Графиконима 36-38 приказан је ефекат 3,5-дихидроксибензојеве киселине на ММЦ-индуковану геномску нестабилност. Са порастом концентрације 3,5-дихидроксибензојеве киселине број МН у БН ћелијама се редуковао, као и број БН ћелија са МН. У позитивној контроли (само ММЦ) укупан број БН ћелија са МН је износио 79 (3,95%), од којих је 73 БН ћелија било са 1 МН (3,65%) и 6 БН ћелија са 2 МН (0,30%). БН ћелије са 2 МН уочене су и у културама третираним најнижом концентрацијом 3,5-дихидроксибензојеве киселине (7 БН ћелија са 2 МН (0,35%)) (Графикон 36).

У позитивној контроли (само ММЦ) просечна фреквенца МН је износила $42,50 \pm 1,50$ МН/1000 БН. 3,5-дихидроксибензојева киселина дозно-зависно ($r = -0,816$, $p = 0,047$) и значајно је снижавала ММЦ-индуковану фреквенцу МН у свим тестираним концентрацијама, у поређењу са позитивном контролом. Најнижа тестирана концентрација (50 µg/mL) редуковала је ММЦ-индуковану МН фреквенцу око 2 пута ($20,00 \pm 1,00$ МН/1000 БН), а највеће смањење детектовано је након комбинованог третмана највишом тестираном концентрацијом (200 µg/mL), где је вредност просечне МН фреквенце износила $17,00 \pm 1,00$ МН/1000 БН (Графикон 37).



Графикон 36. Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензоеве киселине: 1)) позитивна контрола – ММЦ; 2) 50 µg/mL + ММЦ; 3) 100 µg/mL + ММЦ; 4) 200 µg/mL + ММЦ
% је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

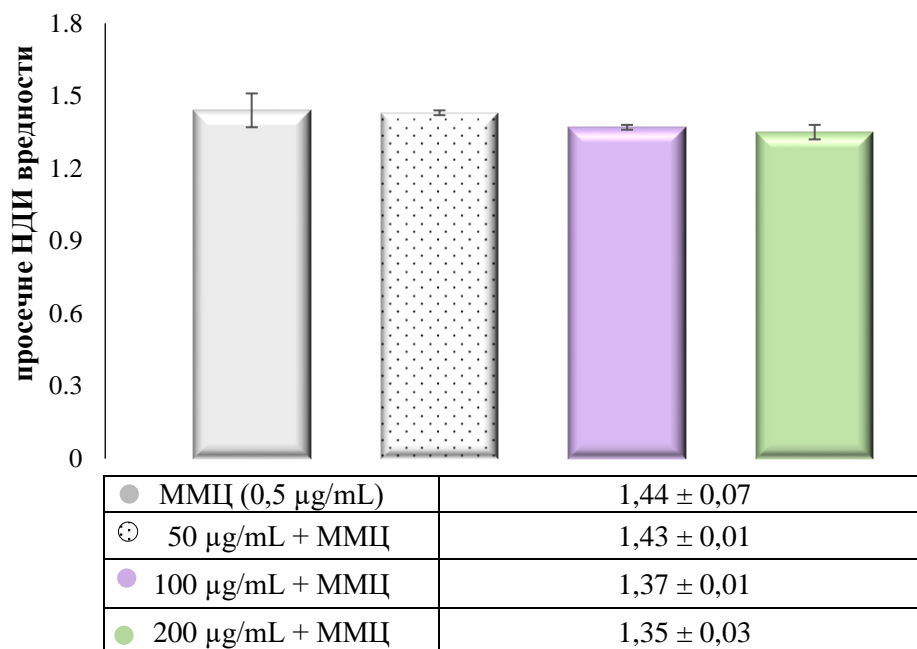


Графикон 37. Ефекат 3,5-дихидроксибензоеве киселине на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу
*Статистички значајно смањење просечне МН фреквенце у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

Резултати појединачних и просечних НДИ вредности су приказани у Табели 22 и на Графикону 38. У позитивној контроли просечна НДИ вредност износила је $1,44 \pm 0,07$. Тестиране концентрације 3,5-дихидроксибензојеве киселине нису значајно мењале већ ММЦ-снижене НДИ вредности. При концентрацији од $50 \mu\text{g/mL}$ вредност НДИ је износила $1,43 \pm 0,01$, при концентрацији од $100 \mu\text{g/mL}$ $1,37 \pm 0,01$, а за концентрацију од $200 \mu\text{g/mL}$ НДИ је износила $1,35 \pm 0,03$. Пирсонов коефицијент корелације је показао да постоји негативна и значајна корелација између концентрације стандарда и НДИ ($r = -0,859$, $p = 0,03$) (Radović Jakovljević u sar., 2022b).

Табела 22. Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, $0,5 \mu\text{g/mL}$) и различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине

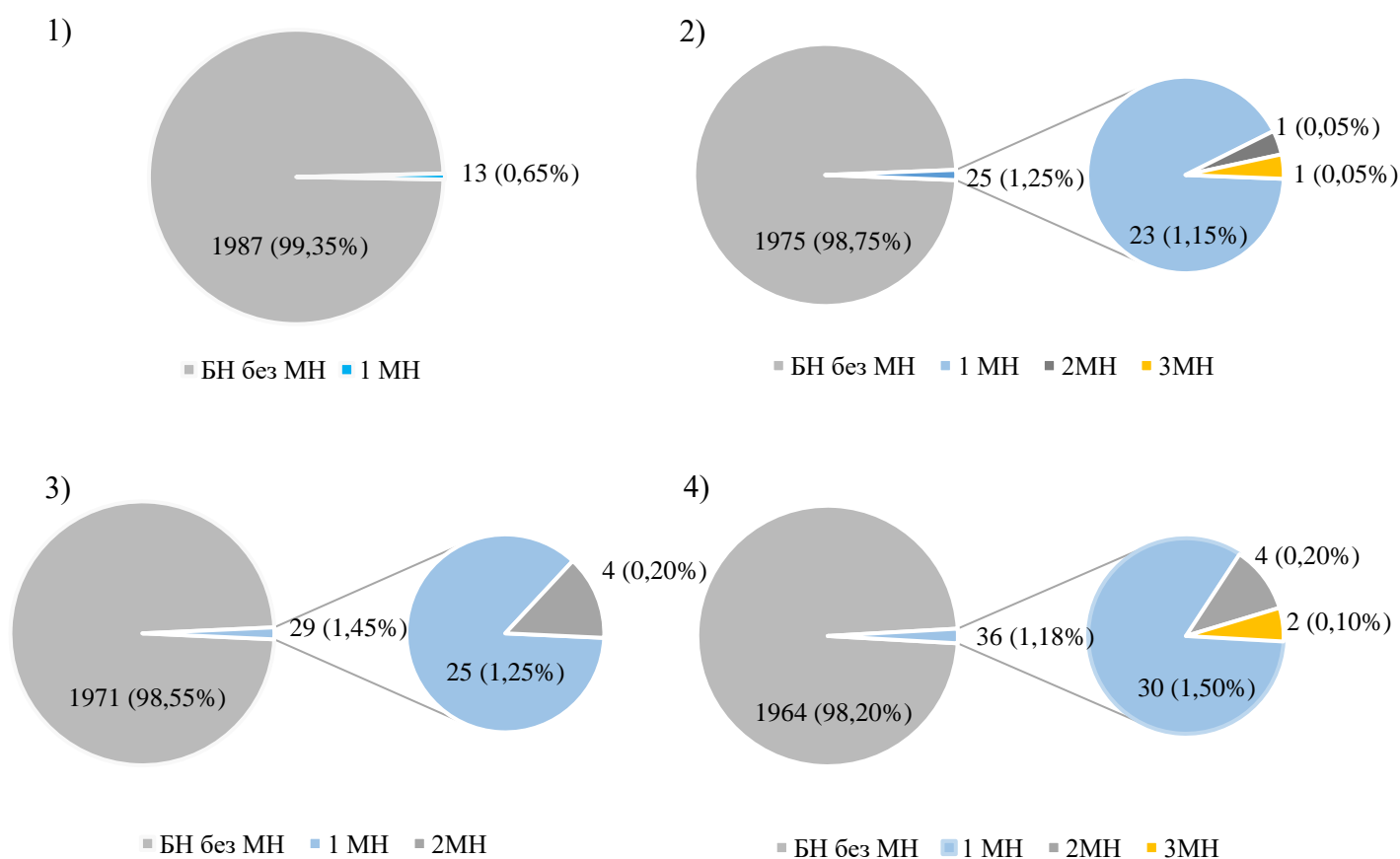
Концентрација	Донор	Број анализираних ћелија	НДИ
ММЦ ($0,5 \mu\text{g/mL}$)	1	500	1,37
$50 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,42
$100 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,35
$200 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,32
ММЦ ($0,5 \mu\text{g/mL}$)	2	500	1,50
$50 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,43
$100 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,38
$200 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,37



Графикон 38. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, $0,5 \mu\text{g/mL}$) и различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине

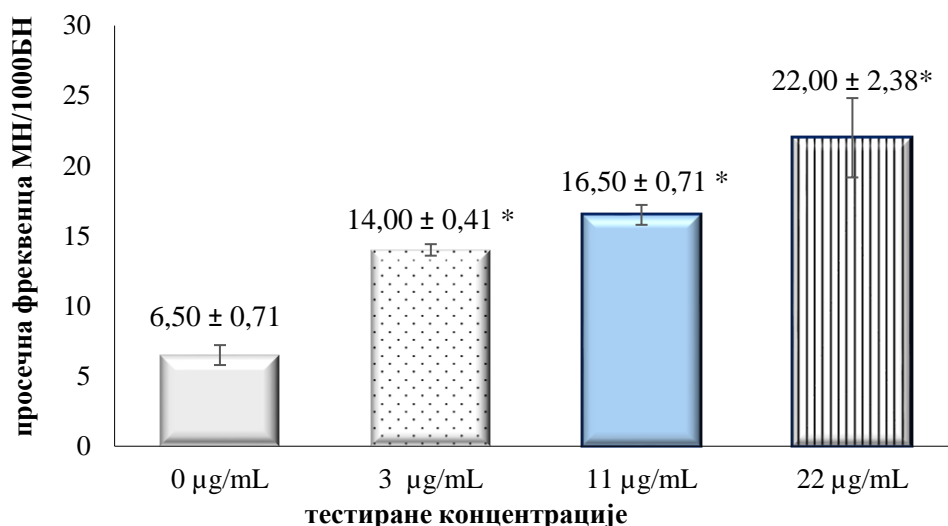
4.5.4. Анализа генотоксичног и антимуtagenог ефекта кверцетин-3-О-глукопиранозида у култивисаним лимфоцитима здравих донора

Појединачне и просечне фреквенце МН у лимфоцитима здравих донора пре и након третмана различитим концентрацијама (3, 11 и 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) кверцетин-3-О-глукопиранозида приказане су на Графиконима 39 и 40. У контролним (нетретираним) ћелијама, појединачне фреквенце МН износиле су 7 и 6 МН/1000 БН. Резултати су показали да је са порастом концентрације кверцетин-3-О-глукопиранозида, растао и број микронуклеусних БН ћелија, као и број БН ћелија са већим бројем МН. Микронуклеусне БН ћелије биле су највише заступљене након третмана највишом тестираном концентрацијом (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) - 36 (1,80%), од тога 30 (1,50%) БН ћелија са 1МН, 4 (0,20%) БН ћелија са 2 МН и 2 (0,10%) БН ћелија са 3 МН (Графикон 39).



Графикон 39. Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида: 1) негативна контрола – нетретиране ћелије 2) 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3) 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4) 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ % је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

Све тестиране концентрације кверцетин-3-О-глукопиранозида значајно дозно-зависно ($r = 0,909$, $p = 0,01$) повећавале МН фреквенцу. Највиша тестирана концентрација ($22 \mu\text{g/mL}$) индуковала је повећање просечних МН фреквенци здравих донора око 3,4 пута ($22,00 \pm 2,83$ МН/1000 БН) у поређењу са нетретираним ћелијама ($6,50 \pm 0,71$ МН/1000 БН) (Графикон 40).



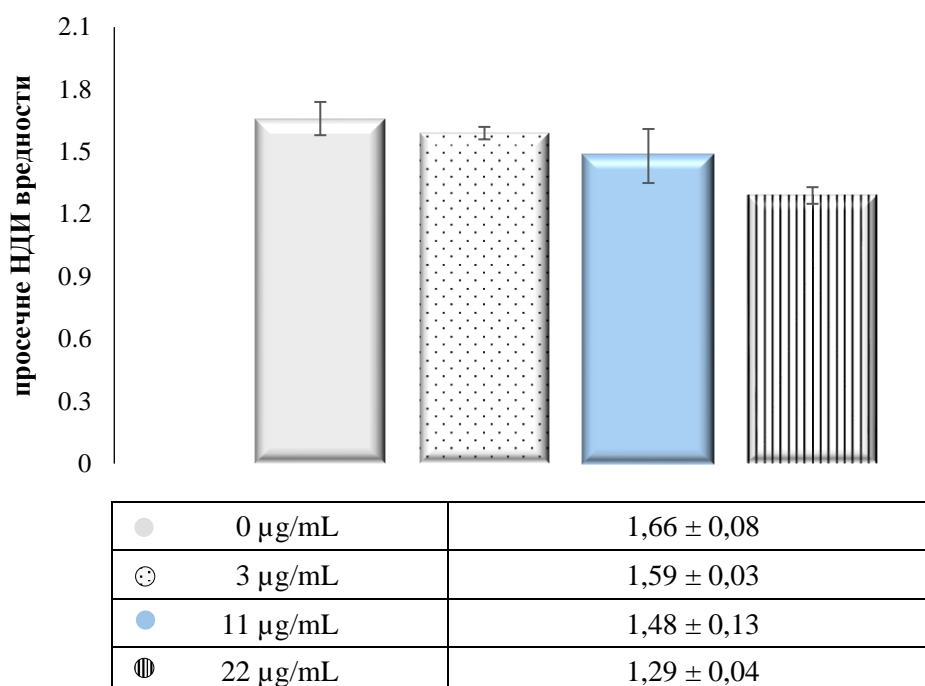
Графикон 40. Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида

*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце у односу на нетретиране ћелије (Студентов t -тест, $p < 0,05$)

Резултати појединачних и просечних НДИ вредности су приказани у Табели 23 и на Графикону 41. У нетретираним културама НДИ вредност је износила 1,60 и 1,74. Са порастом концентрације кверцетин-3-О-глукопиранозида НДИ вредности су се смањивале (при највишој тестираној концентрацији НДИ вредност била 1,26 и 1,32), али без значајности у поређењу са нетретираним ћелијама ($p > 0,05$) (Radović Jakovljević *u sar.*, 2022a).

Табела 23. Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида

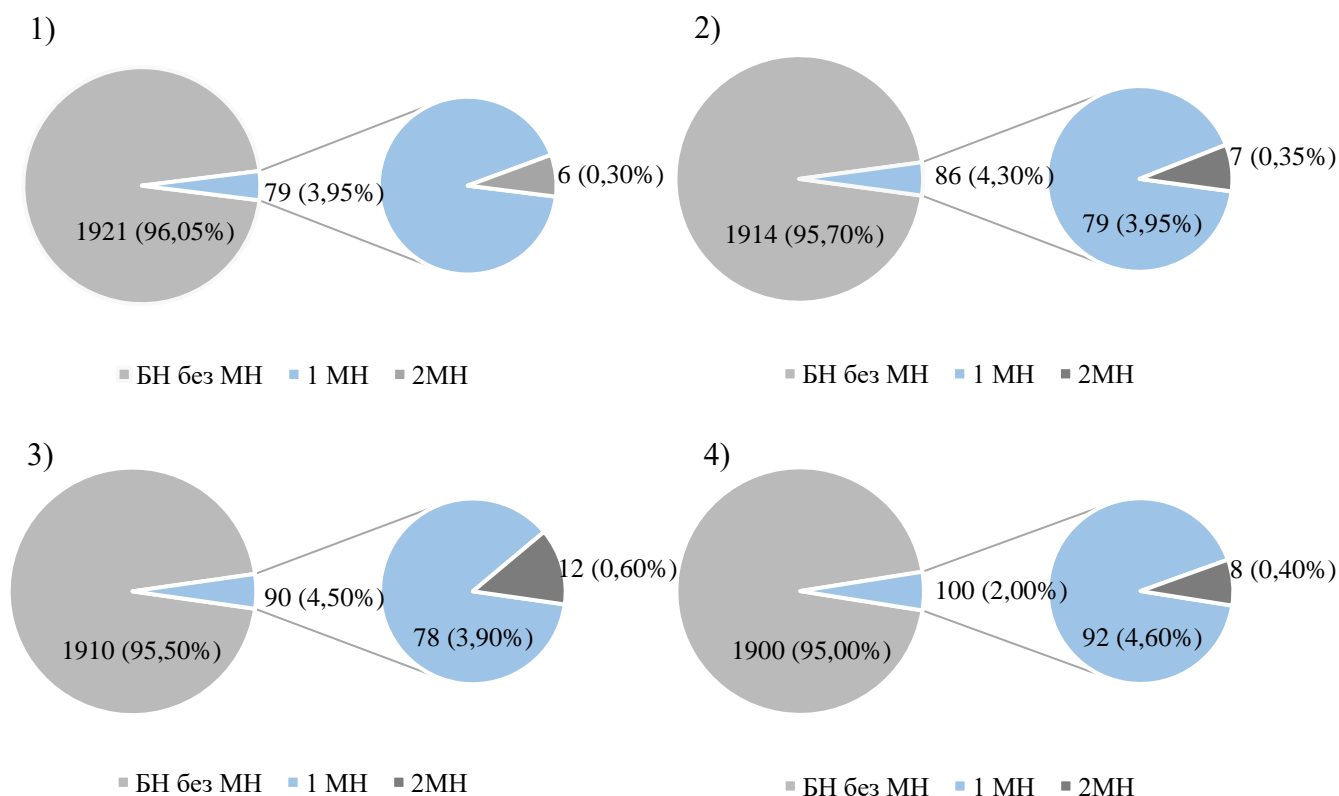
Концентрација	Донор	Број анализираних ћелија	НДИ
0 $\mu\text{g/mL}$	1	500	1,60
3 $\mu\text{g/mL}$		500	1,57
11 $\mu\text{g/mL}$		500	1,39
22 $\mu\text{g/mL}$		500	1,26
0 $\mu\text{g/mL}$	2	500	1,74
3 $\mu\text{g/mL}$		500	1,61
11 $\mu\text{g/mL}$		500	1,57
22 $\mu\text{g/mL}$		500	1,32



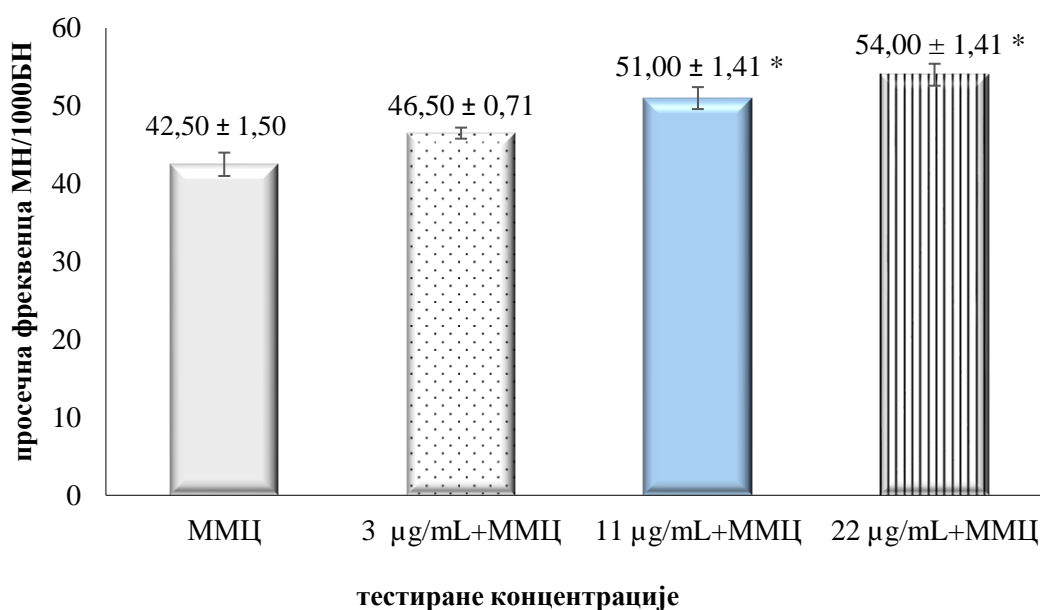
Графикон 41. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида

Ефекат кверцетин-3-О-глукопиранозида на ММЦ-индуковану геномску нестабилност приказани су у Табели 24 и на Графиконима 42-44. Кверцетин-3-О-глукопиранозид индуковао је повећање БН ћелија са микронуклеусима, али и број БН ћелија са 2 МН. У културама третираним само ММЦ (позитивна контрола) број БН ћелија са МН износио је 79 (3,95%), од којих је 73 БН ћелија било са 1 МН (3,65%) и 6 БН ћелија са 2 МН (0,30%). Највише БН ћелија са 2 МН уочили смо након третмана концентрацијом 11 µg/mL, где је било 12 БН ћелија са 2 МН од укупно 2000 анализираних БН ћелија (0,60%). Ћелије са 3 или више МН нису детектоване (Графикон 42).

ММЦ-индукована МН фреквенца повећавала се након третмана кверцетин-3-О-глукопиранозидом у дозно-зависном маниру ($r = 0,956$; $p = 0,003$) и значајно у вишим тестираним концентрацијама (11 µg/mL – $51,00 \pm 1,41$ и 22 µg/mL – $54,00 \pm 1,41$) у поређењу са позитивном контролом ($42,50 \pm 1,50$ МН/1000 БН) (Графикон 43).



Графикон 42. Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида: 1)) позитивна контрола – ММЦ; 2) 3 µg/mL + ММЦ; 3) 11 µg/mL + ММЦ; 4) 22 µg/mL + ММЦ
% је израчунаван у односу на укупан број анализираних БН ћелија

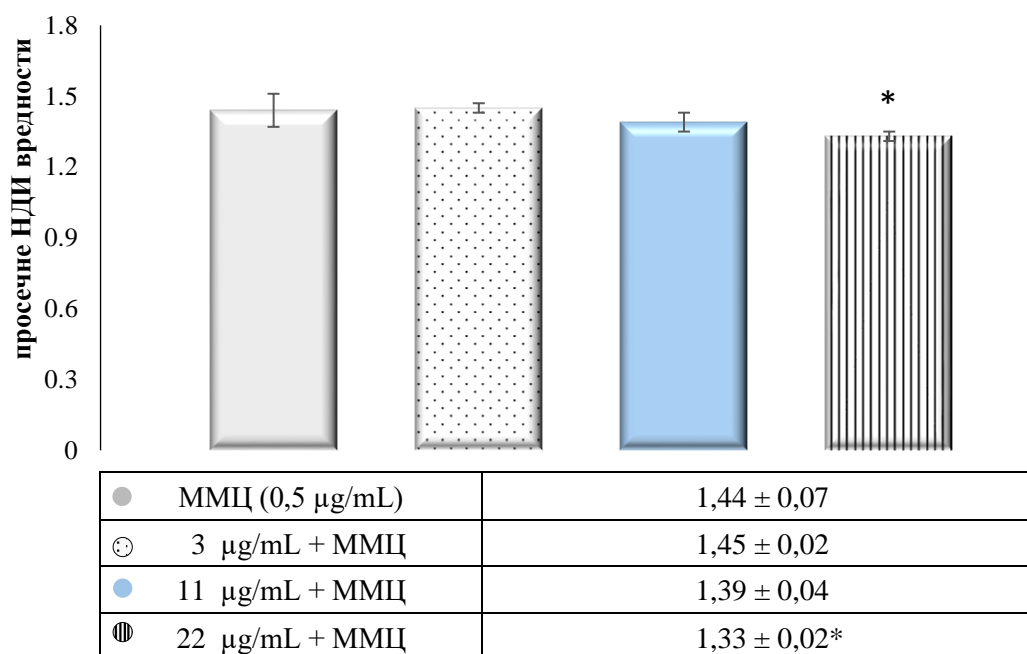


Графикон 43. Ефекат кверцетин-3-О-глукопиранозида на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу
*Статистички значајно повећање просечне МН фреквенце у односу на позитивну контролу (Студентов *t*-тест, $p < 0,05$)

Резултати анализе НДИ у култивисаним лимфоцитима здравих донора након комбинованог третмана различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида и ММЦ, приказани су у Табели 24 и на Графикону 44. Просечна НДИ вредност у позитивној контроли износила је $1,44 \pm 0,07$. Све тестиране концентрације кверцетин-3-О-глукопиранозида снижавале су већ ММЦ-снижене НДИ вредности, али значајно само у највишој тестираној концентрацији ($22 \mu\text{g/mL}$) у односу на позитивне ММЦ третиране ћелије ($1,33 \pm 0,02$ у односу на $1,44 \pm 0,07$), (Графикон 44). Пирсонов коефицијент корелације је показао да постоји негативна и значајна корелација између концентрације стандарда и НДИ ($r = -0,917$, $p = 0,01$) (Radović Jakovljević u cap., 2022b).

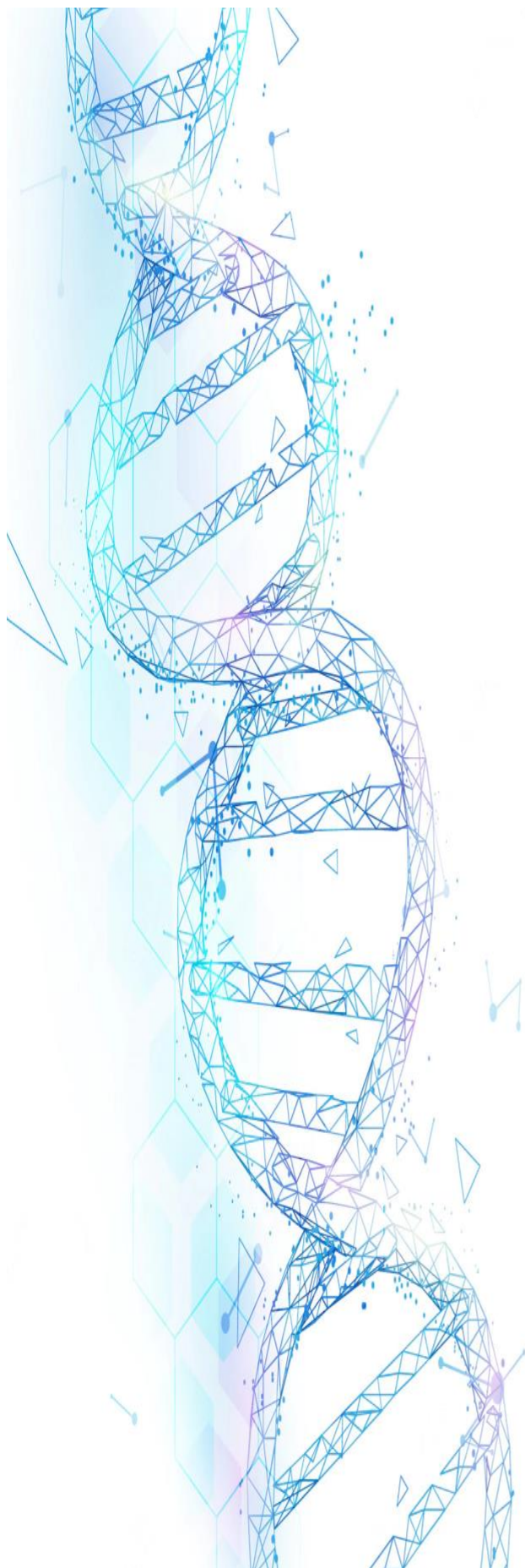
Табела 24. Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, $0,5 \mu\text{g/mL}$) и различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида

Концентрација	Донор	Број анализираних ћелија	НДИ
ММЦ ($0,5 \mu\text{g/mL}$)	1	500	1,37
$3 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,43
$11 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,36
$22 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,31
ММЦ ($0,5 \mu\text{g/mL}$)	2	500	1,50
$3 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,46
$11 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,42
$22 \mu\text{g/mL}$ + ММЦ		500	1,34



Графикон 44. Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, $0,5 \mu\text{g/mL}$) и различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида

*Статистички значајно смањење просечне НДИ у односу на позитивну контролу (Студентов t -тест, $p < 0,05$)



5. Дискусија

5.1. Састав фенолних једињења у биљним екстрактима *A. vulgaris* и *A. alba*

Лековита својства биљака зависе од заступљености секундарних метаболита који су носиоци биолошких активности, стога познавање количине ових једињења у анализираним биљним узорцима је од велике важности. Секундарни метаболити изоловани из биљака данас се могу директно користити као лекови, као прототип за синтезу нових – синтетисаних лекова, али и као фармаколошки и биохемијски алати за откривање молекуларних механизма неких болести. Њихова истраживања су интензивна због широког спектра корисних особина и примене, као и због саме претпоставке да је до данас, од укупног броја идентификованих, у фармаколошке сврхе тестирано свега 10% (*Dias u cap., 2012; Kumar u cap., 2019; Abou Baker u cap., 2020*).

Једну од најбројнијих и широко распрострањених група секундарних метаболита чине фенолна једињења са више од 8000 идентификованих једињења (*Ahmed u cap., 2013; Kumar u cap., 2013*). Фенолна једињења су присутна у свим биљним органима, листовима, цветовима, стаблу, корену, плодовима и семенима биљака. Имају широку употребу у фармацији, медицини и пољопривреди. Бројна истраживања су показала да флавоноиди и друга фенолна једињења имају позитивне ефекте на људско здравље и да поседују широк спектар биолошких активности као што су антиоксидативна, антиканцерогена, антибактеријска, антивирусна, што оправдава њихову фармацеутску и медицинску примену (*Kumar u cap., 2013; Dzialo u cap., 2016; Andreu u cap., 2018; Meng u cap., 2018; Chen u cap., 2019*).

Врсте из рода *Artemisia* су познате по свом благотворном дејству и све је веће интересовање усмерено на њих јер поседују лековита својства и користе се у превенцији и смањењу ризика за разне болести. Врсте овог рода су један од најбогатијих извора биолошки активних једињења, као што су флавоноиди, кумарини, монотерпени, лактони, стероли сесквитерпени, полиацетилени, каротеноиди и витамини, која испољавају широк спектар биолошких активности и доприносе њиховој практичној примени (*Bora u Sharma, 2011; Trendafilova u cap., 2018; Trifan u cap., 2018; Ickovski u cap., 2020; Ekiert u cap., 2022*).

Приказани резултати испитивања садржаја укупних фенолних једињења и флавоноида су показали да су *A. vulgaris* и *A. alba* веома богате овим секундарним метаболитима, при чему се као најбољи растварач за екстракцију фенолних једињења показао метанол, док је највише флавоноида детектовано у ацетонским екстрактима обе биљке (*Radović Jakovljević u cap., 2020; 2023*). Добијени резултати су у складу са публикованим резултатима других аутора, који су, такође, показали да врсте *Artemisia* поседују богат фенолни састав (*Fidrianny u cap., 2015; Irda u cap., 2015; Khezrili Bandli u cap., 2017; Joshi u cap., 2021; Ickovski u cap., 2020; Babayan u cap., 2022*). Недавна студија *Babayan u cap. (2022)* дошла је до сличног закључка. Наиме, аутори су, анализирајући фенолни састав различитих врста рода *Artemisia*, навели да је највише фенолних једињења детектовано у метанолском екстракту, у поређењу са ацетонским и хлороформним *A. vulgaris* биљним екстрактом. Такође, *Joshi u cap. (2021)*, анализирајући фенолни састав 21 биљне врсте сакупљене на територији Непала, показали су да је највећа количина укупних фенолних једињења, као и значајна количина флавоноида детектована у метанолском екстракту *A. vulgaris*.

Одређивање укупних фенолних једињења и флавоноида биљке *A. alba* било је предмет истраживања малог броја аутора (*Todorova u cap., 2015; Peron u cap., 2017; Trendafilova u cap., 2018; Ickovski u cap., 2020*). Студија *Ickovski u cap. (2020)* анализирала је два метанолска екстракта биљке *A. alba* сакупљене на различитим локалитетима у

Србији. Резултати су показали да су оба биљна екстракта садржала значајну количину укупних фенолних једињења и флавоноида.

Различитим биолошким активностима екстракта доприносе не само укупни садржај фенолних једињења, него и количина појединачних једињења детектованих у екстракту (*Dai u Mumper, 2010*). Резултати HPLC анализе биљке *A. vulgaris* показали су да је највиша концентрација фенолних једињења присутна у метанолском екстракту, где је детектовано 7 једињења од укупно 14 чија је заступљеност анализирана применом стандарда (*Radović Jakovljević u cap., 2020*). Најзаступљеније фенолно једињење била је хлорогенска киселина ($487,25 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$) која је детектована и у ацетонском биљном екстракту, али у значајно мањој концентрацији ($3,98 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$). Доминантно заступљена компонента у ацетонском екстракту била је *trans*-циметна киселина ($49,56 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$). У воденом екстракту биљке хлорогенска и *trans*-циметна киселина нису идентификоване, већ је у највишој концентрацији детектована сиригинска киселина ($64,22 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$). Када су у питању флавоноиди, кверцетин 3-*O*-глукопиранозид и сиригин били су присутни у сва три испитивана екстракта, при чему је квантитативно кверцетин-3-*O*-глукопиранозид био најзаступљенији у метанолском екстракту ($85,20 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$), док је сиригина највише било у воденом екстракту биљке ($16,39 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$) (*Radović Jakovljević u cap., 2022a*).

Бројна фенолна једињења детектована су у биљци *A. vulgaris*. *Abiri u cap. (2018)* навели су да су примарне класе флавоноида у биљци: флавоноли (рицин, апигенин, еупафолин, лутеолин, диосметин, јацеозидин, и кризоериол), флавоноски гликозиди (витексин и лутеолин-7-глукозид), флаваноли (изорхамнетин) и флавонол гликозиди (кемпферол-3-глукозид, рутин, кемпферол-3-рамнозид, кверцитрин, кемпферол-3-рутинозид и кверцетин-3-галактозид). *Nikolova u cap. (2004)*, у ацетонском екстракту листа, детектовали су кверцетин и кверцетагин у највећој концентрацији. *Ivanescu u cap. (2018)* у надземном делу биљке утврдили су присуство кафеинске, хлорогенске, *p*-кумаринске и гентизинске киселине, а од флавоноида кверцитрин, изокверцетин, лутеолин и кемпферол. *Melguizo-Melguizo u cap. (2014)*, приликом идентификације фенолних једињења у метанолском екстракту биљке која је сакупљана у Србији, идентификовали су 15 фенолних једињења, при чему су деривати хлорогенске киселине били најзаступљенији.

Испитивање квалитативног и квантитативног састава биљке *A. alba* је показало да је највиша концентрација фенолних једињења детектована у метанолском екстракту, где је идентификовано и квантификовано свих 14 фенолних једињења чија је количина анализирана у истраживању. У највећој концентрацији је била хлорогенска киселина ($298,33 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$), док је доминантно једињење у ацетонском екстракту биљке била *trans*-циметна киселина ($298,12 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$). Присуство 3,5-дихидроксибензојеве киселине потврђено је у сва три испитивана екстракта, али у значајно већој концентрацији у воденом ($198,98 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$), него у осталим анализираним екстрактима ($2,54 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ у метанолском и $1,64 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ у ацетонском екстракту). Од флавоноида, кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сиригин су идентификовани и квантификовани у сва три испитивана екстракта, али квантитативно, метанолски екстракт је садржао највише кверцетин-3-*O*-глукопиранозида у односу на остале екстракте биљке, док је сиригина највише било у воденом екстракту *A. alba* (*Radović Jakovljević u cap., 2020, 2022a*). Доступни литературни подаци о хемијском саставу врсте показали су велику разноликост међу популацијама ове биљке. Сесквитерпеноиди (*Maggio u cap., 2011, 2013; Todorova u cap., 2015; Peron u cap., 2017*), кумарини (*Maggio u cap., 2011, 2013*), флавоноиди (*Djordjević u cap., 2013; Peron u cap., 2017*) детектовани су у биљци сакупљаној на различитим локалитетима. Биљке из Србије, поред флавонол-гликозида, одликује и присуство флавонола (*Trendafilova u cap.,*

2018). Djordjević *u cap.* (2013) су утврдили да су најзаступљеније компоненте у *A. alba* екстракту кемферол, хлорогенска киселина и рутин. Лутеолин и кверцетин су били најчешће заступљени флавоноиди у биљци узоркованој са територије Македоније, док су за биљке са подручја Бугарске уобичајени били лутеолин и рутин (Marco *u cap.*, 1987).

5.2. Цитотоксични и апоптоски ефекат биљних екстраката *A. vulgaris* и *A. alba*

Повећање инциденце различитих врста карцинома ствара потребу за новим лековима који су токсични за канцерогене ћелије, а да уједно немају штетан утицај на здраве ћелије. Лековите биљке се традиционално користе као природни лекови са доказаним терапеутским ефектима у многим областима, укључујући и антиканцерогена дејства. Иако се многа изолована једињења из биљака подвргавају ригорозном тестирању њихове антиканцерогене активности, све више се признаје да су корисни ефекти биљака последица сложених интеракција једињења присутних у целој биљци тј. екстракту (синергистичких или антагонистичких) (Liu *u cap.*, 2003; Karna *u cap.*, 2012). Због тога смо настојали да извршимо процену *in vitro* антиканцерогене активности тестираних екстраката (метанолски, ацетонски и водени) *A. vulgaris* и *A. alba* у појединачном и комбинованом третману са ММЦ.

Резултати испитивања цитотоксичног ефекта биљака на линији хуманог карцинома колона (SW-480) су показали да је биљка *A. alba* испољила јачу цитотоксичност, у поређењу са *A. vulgaris*. Најбољи ефекат показао је ацетонски, а затим метанолски екстракт *A. alba* ($IC_{50} = 3,89 \pm 1,47 \mu\text{g/mL}$ за ацетонски, $IC_{50} = 47,65 \pm 3,83 \mu\text{g/mL}$ за метанолски екстракт), док је од *A. vulgaris* екстраката само ацетонски смањивао пролиферацију ћелија ($IC_{50} = 240,12 \pm 25,49 \mu\text{g/mL}$). Механизам цитотоксичног ефекта анализираних екстраката даље је утврђиван одређивањем типа ћелијске смрти. Резултати су показали да је цитотоксични ефекат екстраката последица смрти SW-480 ћелија посредоване раном апоптозом. Сви тестирани екстракти допринели су да највећи проценат малигнућ ћелија буде у раној апоптози, уз истовремено повећање процента некротичних ћелија након третмана ацетонским и воденим екстрактом обе биљке.

Досадашњи литературни подаци указују да антитуморска својства екстраката добијених из биљке *A. alba* до сада нису испитивана. Ипак, постоје подаци о цитотоксичном ефекту биљке *A. vulgaris* на ћелијске линије различитих карцинома који су у сагласности са приказаним резултатима. Тако су Erel *u cap.* (2011) анализирали ефекат метанолског екстракта надземног дела *A. vulgaris* на три хумане ћелијске линије карцинома (естроген зависни аденокарцином дојке - MCF7, ћелије карцинома плућа - A549 и грлића материце - HeLa), и две здраве ћелијске линије (васкуларни глатки мишић - A7R5 и ћелијска линија хуманог ембрионалног бубрежног ткива трансформисана са SV40 Т антигеном - 293Т). Утврдили су да је екстракт испољавао значајан инхибиторни ефекат на ћелије A549 ($IC_{50} = 190 \text{ ng/mL}$), HeLa ($IC_{50} = 284 \text{ ng/mL}$), A7R5 ($IC_{50} = 382 \text{ ng/mL}$), и 293Т ($IC_{50} = 317 \text{ ng/mL}$) (Erel *u cap.*, 2011). До сличног закључка су дошли Gordanian *u cap.* (2014), који су испитујући цитотоксичне активности пет врста рода *Artemisia* (*A. absinthium*, *A. vulgaris*, *A. incana*, *A. fragrans* и *A. spicigera*) утврдили да метанолски екстракти цвета, листа, стабљике и корена *A. vulgaris* испољавају добру цитотоксичну активност на ћелијској линији карцинома дојке (MCF7). Такође, водени екстракт *A. vulgaris* испољио је цитотоксични ефекат и индуковао апоптозу у ћелијама канцера колона (RKO), канцера простате (PC3) и дојке (T47) (Nawab *u cap.*, 2011). Lian *u cap.* (2018) су показали да метанолски екстракт *A. vulgaris* испољава значајан антиканцерогени ефекат на ћелијској линији хуманог карцинома колона (HCT-15; IC_{50} вредност $50 \mu\text{g/mL}$) индукујући аутофагију и инхибирајући миграцију ћелија. С тога су

аутори сугерисали да екстракт представља добар извор за изолацију нових молекула са израженим антиканцерогеним ефектом. Недавна студија је известила да је метанолски екстракт *A. vulgaris* испољио цитотоксични ефекат на неуробластом (ћелијска линија N2a), са IC₅₀ вредношћу 80,81 µg/mL (Neelamma *u cap.*, 2021).

Да би се избегли нежељени ефекти цитостатика и постигла већа ефикасност, све је већа пажња посвећена испитивању синергистичких ефеката биљака и цитостатика. Употреба биљних препарата (укључујући сирове екстракте и чиста једињења добијена из биљака) у комбинацији са одређеним цитостатиком има позитивне ефекте на здравље људи и потенцијалну улогу у превенцији и/или лечењу карцинома (Kelloff *u cap.*, 2000; Sanders *u cap.*, 2016). Из тих разлога, екстракти *A. vulgaris* и *A. alba* и ММЦ испитивани су на могуће синергистичке ефекте.

Приказани резултати су показали да тестирани екстракти обе биљке (*A. vulgaris* и *A. alba*) у комбинованом третману са ММЦ дозно-зависно редукују вијабилност ћелија карцинома колоне (SW-480). Иако је само ацетонски екстракт биљке *A. vulgaris* утицао на пролиферацију SW-480 ћелија у самосталном третману, у комбинованом третману са ММЦ сви анализирани екстракти *A. vulgaris* деловали су синергистички и редуковали су ћелијску вијабилност, нарочито након 72 сата излагања (IC₅₀ вредност је била < 1 µg/mL). Резултати CI након 72 сата третмана указали су на значајан синергистички ефекат испитиваних биљних екстраката. Сличне резултате је испољио и комбиновани третман екстраката биљке *A. alba* са ММЦ. Биљни екстракти испољили су значајније и јаче цитотоксичне ефекте у комбинованим третманима, у поређењу са појединачним, нарочито након 72 сата излагања, где је IC₅₀ вредност била < 1 µg/mL. Испитивање интеракције између тестираних *A. alba* екстраката и ММЦ показало је да је углавном након 72 сата излагања детектован синергистички ефекат. Одређивањем типа ћелијске смрти можемо закључити да је цитотоксични ефекат комбинованих третмана екстраката и ММЦ последица смрти малигнућ ћелија посредоване раном апоптозом (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2023).

Иако постоје бројне студије које су испитивале цитотоксичну активност различитих врста *Artemisia*, мало је доступних података о ефектима на здравим ћелијама. Khlifi *u cap.* (2013) су показали да метанолски екстракт *A. herba-alba* не индукује цитотоксични ефекат у култури хуманих моноклеарних ћелија крви, док су Moacă *u cap.* (2019) дошли до истог закључка испитујући ефекат *A. absinthium* на линији хуманих кератиноцита. Добијени резултати су показали да биљни екстракти нису испољили цитотоксичне ефекте на мезенхималне матичне ћелије периодонцијума (PDLs) како у самосталном третману, тако и у третману са ММЦ. Добијене CI вредности за комбиноване третмане екстраката обе биљне врсте и ММЦ показују, углавном, антагонистичке цитотоксичне ефекте. Метанолски и ацетонски екстракти *A. alba* су испољили синергистички ефекат само у највишој тестираној концентрацији (500 µg/mL) са ММЦ. Добијени антагонистички ефекат у комбинованим третманима екстрактима биљака и ММЦ је веома важан резултат, који указује на то да тестирани екстракти умањују штетно дејство цитостатика на здравим ћелијама. Осим тога, различити цитотоксични ефекти на здраве и малигне ћелије представљају веома користан резултат, јер указују на потенцијалну безбедну употребу *A. vulgaris* и *A. alba* као комплементарне и алтернативне биљне терапије (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2023).

Анализом цитотоксичног ефекта екстраката *A. vulgaris* и *A. alba* можемо закључити да су екстракти обе биљне врсте индуковали рану апоптозу као доминантан тип ћелијске смрти, као и то да је биљка *A. alba* поседовала већи цитотоксични потенцијал у поређењу са *A. vulgaris*. Висок садржај појединих компоненти у екстрактима биљке *A. alba* потенцијално се може употребити за објашњење добијених резултата. HPLC анализа је показала да су метанолски и водени екстракти биљке *A. alba*

садржали хидроксибензоеле киселине у високим концентрацијама. Квантитативно најзаступљенија фенолна компонента у воденом екстракту *A. alba* била је 3,5-дихидроксибензоелева киселина, док је метанолски екстракт биљке садржао највише 2,5-дихидроксибензоеле киселине. Бројне студије су известиле да хидроксибензоелева киселина инхибира раст малигнух ћелија пореклом из различитих органа (*Marceila u cap., 2018; Moghtaderi u cap., 2018; Sherin u cap., 2019*), док су резултати испитивања цитотоксичних активности дихидроксибензоеле киселине показали да има способност инхибиције раста канцера дојке (MCF7), плућа (A549), јетре (HepG2), карцинома грлића материце (HeLa) и простате (LNCaP) (*Yin u cap., 2009*). Дихидроксибензоелева киселина индуковала је апоптозу као доминантан тип ћелијске смрти у ћелијама канцера колона (HCT-116 and HCT-15) (*Anantharaju u cap., 2017*).

Ацетонски екстракти обе биљке садржали су *trans*-циметну киселину, али је њена концентрација у екстракту *A. alba* била скоро шест пута већа. Такође, детектована је и три пута већа концентрација хлорогенске киселине у истом екстракту. Литературни подаци су показали да циметна киселина редукује ћелијску пролиферацију *in vitro* за скоро 50% у различитим карциномима, као што су глиобластом, меланом, канцер простате и плућа (*Liu u cap., 1995*). Такође *Niero u cap. (2013)* су известили да ова киселина поседује антиканцерогени ефекат на ћелије меланома као и способност да индукује апоптозу у ћелијама карцинома колона. Студије које су испитивале цитотоксичну активност хлорогенске киселине показале су да она испољава цитотоксични ефекат на различитим ћелијским линијама хуманог карцинома колона (*Ekbatan u cap., 2018; Santana-Gálvez u cap., 2020; Villota u cap., 2021*). Применом МТТ теста, *Ekbatan u cap. (2018)* испитујући утицај ове киселине на Сасо-2 ћелиској линији хуманог колон канцера, указали су да смањује пролиферацију ћелија карцинома за скоро 60%. *Santana-Gálvez u cap. (2020)* су закључили да је хлорогенска киселина потенцијални кандидат за превенцију и третман канцера управо због испољавања значајног цитотоксичног ефекта на ћелијским линијама различитих типова хуманог канцера (дојке-MCF-7, јетре-Hep-G2, простате-PC-3, и колона- HCT-116). Такође, недавна студија је известила да испољава цитотоксични ефекат на SW-480 и SW-620 ћелијске линије карцинома колона и да смањује вијабилност ћелија канцера у дозно-зависном ефекту (*Villota u cap., 2021*).

Флавоноиди кверцетин-3-*O*-глукопиранозид и сирингин били су заступљени у свим анализираним екстрактима, али је њихова концентрација у екстрактима биљке *A. alba* била значајно већа од оне која је детектована у екстрактима *A. vulgaris*. Неколико студија је испитивало цитотоксичне и апоптотске ефекте кверцетин-3-*O*-глукопиранозида и резултати су показали да овај флавоноид индукује апоптозу и инхибира раст у различитим ћелијским линијама канцера (*Amado u cap., 2014; Sudan u Rupasinghe, 2014; Maiyo u cap., 2016*). Цитотоксични ефекат сирингина описан је на ћелијским линијама хуманог карцинома као што су дојка (*Lee u cap., 2019*), грлић материце, мокраћна бешика, простата и глиобластом (*Lall u cap., 2015*).

5.3. Генотоксични и антимулагени ефекат биљних екстраката *A. vulgaris* и *A. alba*

Постоји опште мишљење да су биљни препарати безбедни за употребу, али генерално, нема много информација о потенцијалном ризику по здравље људи. Бројна истраживања генотоксичних ефеката указују на то да иако се веома често користе у народној медицини, неке биљке потенцијално могу бити генотоксичне (*Melo-Reis u cap., 2011; Regner u cap., 2011; Shin u cap., 2011; Milošević-Djordjević u cap., 2018*). Сходно

томе, укључивање генотоксичног приступа у процени потенцијалних ризика за употребу биљака и биљних препарата је веома важно.

ЦБМН тест се користи у детекцији потенцијалних мутагена и постао је стандардна процедура у бројним студијама. Тест укључује анализу БН ћелија које су прошле само једну деобу и које ће реаговати формирањем МН уколико је дошло до оштећења генетичког материјала (Fenech, 2000; Kirsch–Volders *u cap.*, 2002).

МН, као цитогенетички биомаркери, већ дужи низ година се користе као индикатори хромозомског оштећења у лимфоцитима периферне крви (Fenech *u Morley*, 1985; Grujić *u cap.*, 2016). Тест је брз и једноставан, а хумани лимфоцити су погодни за култивацију из више разлога: њихово узорковање је једноставно, на њиховом генетичком материјалу се одсликавају сви догађаји у организму, лако се гаје у култури и имају дуг животни век (од 1,5 до 10 година) (Evans, 1977; Krunić *u cap.*, 2005). ЦБМН тест омогућава истовремену процену генотоксичности и цитотоксичности, пружајући информације о апоптози и некрози у тестираним ћелијским културама (Fenech, 2006; Fenech *u cap.* 2011; Rodrigues *u cap.*, 2018).

Добијени резултати анализе фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви здравих донора након *in vitro* третмана екстрактима биљке *A. vulgaris* су показали да су све тестиране концентрације испитиваних екстраката, осим најниже концентрације метанолског екстракта *A. vulgaris* (10 µg/mL) значајно повећавале просечне фреквенце МН у односу на контролну групу нетретираних ћелија. При тестирању генотоксичног ефекта врсте *A. alba* можемо увидети да су метанолски и ацетонски екстракт испољавали генотоксичне ефекте и дозно-зависно повећавали просечне МН фреквенце, у поређењу са нетретираним ћелијама, док водени екстракт није значајно мењао просечне МН фреквенце у анализираним лимфоцитима *in vitro*.

Анализом дистрибуције ћелија са микронуклеусима уочили смо да су БН ћелије са 2 МН биле најзаступљеније у културама које су третиране високим концентрацијама ацетонским и воденим *A. vulgaris* и метанолским екстрактом *A. alba*, где смо, уједно, и детектовали највеће повећање МН фреквенце у односу на контролну групу нетретираних ћелија. БН ћелије са 3 МН уочене су само након третмана ћелија вишим тестираним концентрацијама *A. vulgaris* (100 µg/mL за ацетонски и водени и 250 µg/mL за метанолски- 0,03%) и *A. alba* екстраката (250 µg/mL за метанолски- 0,03%). Генерално, резултати дистрибуције МН су показали да су тестиране концентрације биљних екстраката повећавале не само фреквенцу БН ћелија са МН, већ и број МН у БН ћелијама (2 МН и 3 МН) (Radović Jakovljević *u cap.*, 2020; 2022a).

Познато је да су НДИ значајан показатељ пролиферативног статуса ћелија, тако да његовим израчунавањем може да се утврди цитостатски и цитотоксични ефекат испитиване супстанце, што код лимфоцита може бити ниво њиховог мутагеног одговора (Fenech, 2007). Наши резултати су показали метанолски екстракт *A. vulgaris* није утицао на ћелијску кинетику, док се након третмана лимфоцита ацетонским и воденим екстрактима исте биљке, са порастом концентрације екстраката НДИ снижавао, али значајно при 250 µg/mL ацетонског и при 10-100 µg/mL воденог екстракта. Добијени резултати указују да ацетонски и водени екстракт биљке *A. vulgaris* у анализираним концентрацијама значајно утичу на ћелијску кинетику, испољавајући цитотоксичне ефекте. Метанолски и ацетонски екстракт *A. alba* са повећањем концентрације редуковали су НДИ и значајно у свим тестираним концентрацијама за метанолски, односно само у највишој тестираној концентрацији за ацетонски екстракт. Водени екстракт биљке није значајно мењао НДИ, односно екстракт није утицао на ћелијску кинетику третираних лимфоцита *in vitro*.

Биолошки ефекти биљака *A. vulgaris* и *A. alba* на хуманом генетичком материјалу нису истражени, па нема доступних литературних података о генотоксичном

потенцијалу ових врста, мада постоје подаци о другим, сродним врстама из рода *Artemisia* који су у сагласности са добијеним резултатима. *Abderrahman u Shbailat (2014)* анализирали су генотоксичну активност етанолског екстракта *A. herba-alba* и дошли су до закључка да екстракт индукује SCE и МН у коштаном сржи и ћелијама периферне крви. До сличног закључка су дошли *Harutyunyan u cap. (2019)*, који су показали да етанолски екстракт биљке *A. absinthium* индукује генотоксичну активност значајно повећавајући МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви *in vitro*. Раније истраживање *Yousef (2014)* показало је да излагање високим дозама екстракту биљке *A. absinthium* током дужег временског периода доводи до хромозомских аберација у ћелијама коштане сржи мишева. Иако је мало студија спроведено, сви аутори су сагласни да је потребан опрез приликом коришћења биљака из рода *Artemisia*, због потенцијалног генотоксичног дејства, посебно у високим концентрацијама (*Abderrahman u Shbailat, 2014; Harutyunyan u cap. 2019*).

Испитивање антимуутагеног потенцијала екстракта биљака је веома важно, јер екстракти са способношћу модификације генома могу омогућити појаву нових лекова и терапијских приступа у лечењу различитих болести (*Verschaeve, 2015*). Многи природни производи, укључујући и биљке, имају висок антиоксидативни капацитет и могу инхибирати оксидативни стрес који је резултат дејства бројних мутагених агенаса који изазивају оштећење ДНК.

Упркос познатом терапеутском ефекту врста рода *Artemisia*, мало је доступних података о могућем антимуутагеном ефекту њихових природних производа на хуманим ћелијама. Стога, у овој студији је један од циљева да се процени антимуутагени потенцијал метанолског, ацетонског и воденог екстракта *A. vulgaris* и *A. alba*, након комбинованог третмана лимфоцита периферне крви *in vitro* познатим мутагеном ММЦ и различитим концентрацијама екстракта, применом ЦБМН теста, као валидног показатеља степена оштећења генетичког материјала на нивоу хромозома.

Добијени резултати комбинованих *in vitro* третмана лимфоцита периферне крви ММЦ-ом и различитим концентрацијама метанолског, ацетонског или воденог екстракта *A. vulgaris* и *A. alba* показали су да су сви испитивани екстракти у тестираним концентрацијама испољили антимуутагени ефекат. Корелација између концентрације екстракта и МН фреквенце била је негативна и статистички значајна, што значи да је са порастом концентрације екстракта ММЦ-индукована фреквенца МН у БН ћелијама била све мања. Највећа редукција ММЦ-индуковане МН фреквенце уочена је у третманима највишом тестираним концентрацијом метанолског *A. vulgaris* и воденог *A. alba* екстракта, када се МН фреквенца редуковала око 2,8 пута за метанолски, односно 2,9 пута за водени екстракт.

Анализом дистрибуције МН показано је да је са порастом концентрације испитиваних екстракта опадао број БН ћелија које су садржале МН. Најнижа тестирана концентрација је најмање редуковала ММЦ-индуковану геномску нестабилност где је уочен највећи број БН ћелија са МН. Са порастом концентрације екстракта број БН ћелија са већим бројем МН је такође опадао, па је највеће смањење броја БН ћелија са 2 МН уочено након третмана лимфоцита највишом тестираним концентрацијом метанолским *A. vulgaris* и воденим екстрактом *A. alba* (1 БН ћелија са 2 МН - 0,03% за екстракт у односу на 16 БН ћелија са 2 МН - 0,40% за ММЦ).

Тачан механизам којим су екстракти *A. vulgaris* и *A. alba* редуковали ММЦ-индуковану геномску нестабилност није потпуно јасан. У циљу добијања одговора анализирана је НДИ вредност. Резултати су показали да највиша тестирана концентрација метанолског екстракта *A. vulgaris* и концентрације од 10-100 µg/mL воденог и ацетонског екстракта *A. alba* значајно повећавале ММЦ-снижене НДИ вредности. Добијени резултати могу се објаснити могућношћу да су лимфоцити

периферне крви у тестираним концентрацијама екстракта прилагођени генотоксичним оштећењима изазваним ММЦ. Могуће је да екстракти у третманима са ММЦ утичу на протеине центромера који контролишу њихову сегрегацију у анафази и на тај начин индукују прерано одвајање центромера. Механизми који надзиру прогресију ћелијског циклуса и заустављају или успоравају ћелијску деобу уколико се детектује оштећење ДНК или грешке у претходним догађајима ћелијског циклуса називају се *checkpoint* механизми (*Radović Jakovljević u cap., 2022b*). Међутим, анафаза се и даље може одвијати и након излагања ћелија агенсима који ометају микротубуле и у одсуству вретена. До сличних запажања су дошли и *Vajić u cap., (2005)*.

Насупрот томе, ацетонски и водени екстракти *A. vulgaris* нису утицали на ћелијску кинетику што указује на могућност да су тестиране концентрације екстраката у лимфоцитима здравих донора оствариле антиоксидативно дејство, везујући се за слободне радикале који настају дејством ММЦ. На тај начин спречавају слободне радикале да остваре мутагени ефекат на молекулу ДНК, што је регистровано као смањење просечних МН фреквенци.

Метанолски екстракт *A. alba* значајно је снижавао НДИ, што може навести на закључак да је екстракт у комбинацији са ММЦ-ом испољио проапоптотско дејство. Наиме, у ћелијама које су сакупиле велику количину оштећења генетичког материјала активирани су природни процеси апоптозе, што је регистровано као значајно смањење фреквенце МН и НДИ вредности лимфоцита третираних највишом тестираним концентрацијом метанолског екстракта (*Radović Jakovljević u cap., 2020*).

Антимутагени ефекат биљака *A. vulgaris* и *A. alba* до сада није испитиван. *Daradka u Alshibly (2012)* анализирали су ефекат екстракта добијеног из *A. herba alba* на етинилестрадиолом индуковано геномско оштећење у култури хуманих лимфоцита. Закључили су да је екстракт испољио значајну протективну активност директном интеракцијом природних компоненти које су биле присутне у екстракту са етинилестрадиолом и његовом хемијском или ензимском инактивацијом.

Резултати добијени у овој студији јасно указују да су сви тестирани екстракти, осим воденог екстракта *A. alba*, испољили генотоксичне ефекте на хумане лимфоците периферне крви *in vitro*. Анализом фенолног састава може се уочити да је управо водени екстракт *A. alba* био најсиромашнији укупним фенолним једињењима и флавоноидима, у поређењу са другим анализираним екстрактима. На основу тога можемо закључити да биолошком ефекту екстракта доприноси не само укупни садржај фенолних једињења, него и количина појединачних једињења детектованих у екстракту. У циљу утврђивања које фенолно једињење је допринео биолошком ефекту испитиван је ефекат најзаступљеније фенолне киселине (3,5-дихидроксибензојева киселине) и флавоноида (кверцетин-3-О-глукопиранозид) у воденом екстракту *A. alba*.

Добијени резултати су показали да 3,5-дихидроксибензојева киселина није била генотоксична, осим у највишој тестираној концентрацији. Са порастом концентрације дошло је до пораста фреквенце МН, што показује позитивна и статистички значајна корелација, али без значајног генотоксичног ефекта у свим концентрацијама осим у највишој. Са друге стране, кверцетин-3-О-глукопиранозид индуковао је значајно и дозно-зависно повећање просечних фреквенци МН. Тестиране концентрације кверцетин-3-О-глукопиранозид су повећавале не само број БН ћелија које садрже МН, већ и број МН у БН ћелијама. Највиша тестирана концентрација индуковала је 4 пута више ћелија са 2 МН и 2 пута више ћелија са 3 МН у односу на контролне нетретиране ћелије (*Radović Jakovljević u cap., 2022a*). 3,5-дихидроксибензојева киселина и кверцетин-3-О-глукопиранозид у тестираним концентрацијама нису значајно утицали на ћелијску кинетику.

На основу резултата комбинованог ефекта може се уочити да је 3,5-дихидроксibenзоева киселина значајно и дозно-зависно снижавала ММЦ-индуковане МН фреквенце и испољила антимулагени ефекат. Ефекат је био већи са порастом концентрације, тако да је највећи пад ММЦ-индуковане МН фреквенце уочен у културама ћелија третираним највишом тестираном концентрацијом. Како у исто време тестиране концентрације нису додатно смањивале ММЦ-снижен НДИ, резултати наводе на закључак да су тестиране концентрације наведеног фенолног једињења у лимфоцитима периферне крви здравих донора *in vitro* оствариле антиоксидативно дејство (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022b).

Супротно, кверцетин-3-О-глукопиранозид дозно-зависно је повећавао просечне МН фреквенце у ММЦ-индукованим лимфоцитима и јасно испољио комулагени ефекат. Фреквенца МН у највишој тестираној концентрацији била је 1,3 пута већа у односу на позитивну контролу (ћелије третиране само ММЦ). Анализом дистрибуције МН можемо уочити да је са порастом концентрације наведеног флавоноида растао и број БН ћелија са МН, као и број МН у БН ћелијама. Број БН ћелија са 2 МН био је виши у свим третманима у поређењу са позитивном контролом. БН ћелије са 3 и више МН нису запажене. Кверцетин-3-О-глукопиранозид је дозно-зависно снижавао ММЦ-редуковане НДИ и значајно само у највишој тестираној концентрацији (Radović Jakovljević *u cap.*, 2022b).

С обзиром да само водени екстракт добијен из биљке *A. alba* није испољио генотоксични ефекат на хумане лимфоците периферне крви, а истовремено је садржао високу концентрацију 3,5-дихидроксibenзоеве киселине која је детектована у траговима у осталим екстрактима, може се предпоставити да је висок садржај овог фенолног једињења значајан фактор добијене активности. У воденом екстракту *A. alba* била је присутна и значајна концентрација кверцетин-3-О-глукопиранозида. Међутим, концентрација наведеног флавоноида у воденом екстракту била је три пута нижа у поређењу са метанолским и ацетонским екстрактом *A. alba*. Иако је кверцетин-3-О-глукопиранозид јасно испољио мутагени ефекат на хумане лимфоците периферне крви, могуће је да је његов допринос у ефекту самог екстракта ублажен ефектом 3,5-дихидроксibenзоеве киселине или неког другог фенолног једињења. Неколико студија је показало да генотоксична или комулагена дејства једињења присутних у екстракту могу бити ублажена другим једињењем када се нађу заједно (De Marino *u cap.*, 2014; Andrade *u cap.*, 2016) па тај екстракт често има бољу активност од једног биоактивног једињења (Dettweiler *u cap.*, 2020; Chassagne *u cap.*, 2021).

Метанолски и ацетонски екстракти обе биљке и водени екстракт *A. vulgaris* испољили су генотоксични ефекат посебно у високим концентрацијама, док су у комбинованом третману са ММЦ сви анализирани екстракти биљака индуковали снажни протективни ефекат на ММЦ-индуковану геномску нестабилност. Добијени резултати могу бити последица интеракције различитих једињења која су присутна у екстрактима. Ово наглашава важност комплексног састава биљних екстраката и потенцијални синергистички или антагонистички ефекат између компоненти. Лековите биљке у свом саставу могу укључивати и компоненте са мутагеним, тератогеним и/или канцерогеним деловањем, које као такве могу изазвати озбиљне нежељене ефекте, укључујући и генотоксичне активности (Rietjens *u cap.*, 2005; Rody *u cap.*, 2018). Уколико су присутна у биљкама, генотоксична једињења могу да ступе у интеракцију са молекулом ДНК, што последично доводи до генетског оштећења. Поред тога, фенолна једињења су карактеристична по својој двострукој улози. Многа фенолна једињења имају антиоксидативне или прооксидативне активности зависне од концентрације (Maurya *u Devasagayam*, 2010; Azqueta *u Collins*, 2016). Једињења присутна појединачно или у комбинацији могу испољити штетне или заштитне ефекте на ДНК. Уочена је и

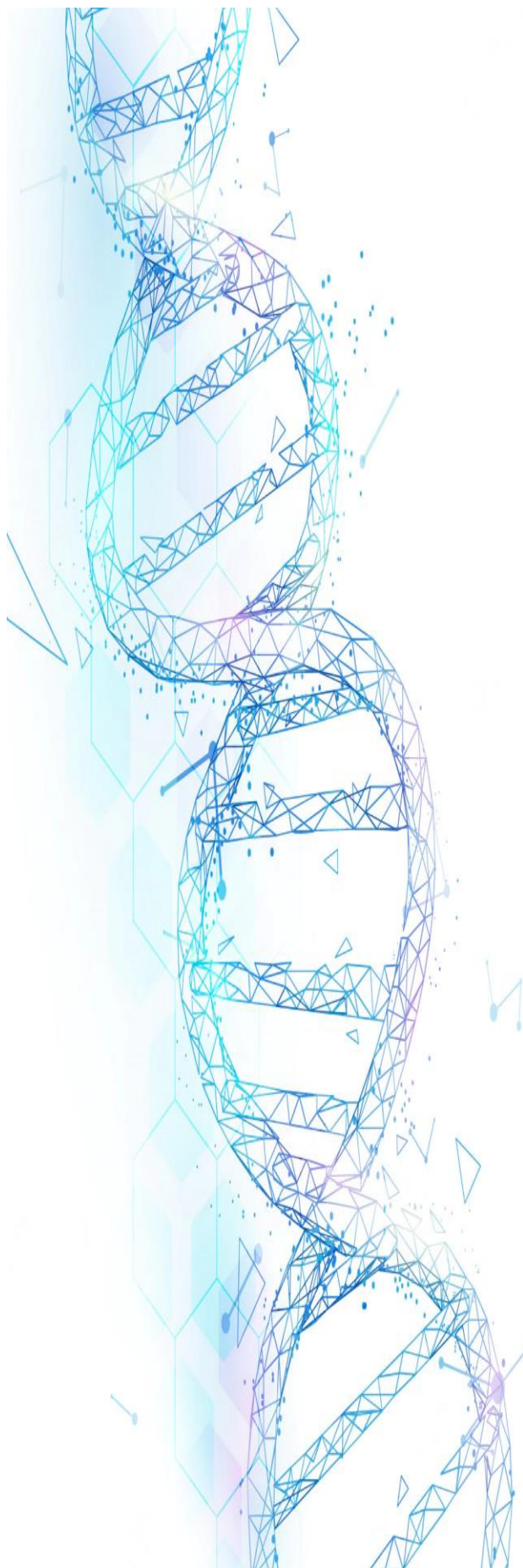
двострука биолошка активност флавоноида, која указује на то да они могу бити истовремено заштитни или мутагени (*Baldim u cap., 2017*). Доступни литературни подаци сугеришу да флавоноиди, такође, могу деловати као прооксиданси и могу ослабити одбрану нуклеусних антиоксиданата и довести до оксидативног оштећења ДНК, што може бити разлог за њихову мутагеност (*Sahu u Gray, 1996*). Осим тога, веће концентрације флавоноида могу да испоље генотоксичну активност интеркалацијом у ДНК или инхибирањем ДНК топоизомеразе и прекидом процеса репликације ДНК (*Zhang u cap., 2015*). С обзиром да екстракт садржи стотине појединачних једињења, идентификација једињења одговорних за дати биолошки ефекат представља значајан корак. Као сложена мешавина различитих класа природних једињења, ефекти екстракта зависе од различитих активности како појединачних једињења тако и од њихове интеракције.

Већи садржај хлорогенске киселине који смо детектовали у метанолском екстракту обе биљке, може бити значајан фактор добијене протективне активности на генотоксични ефекат изазван ММЦ у спроведеном истраживању. Доступни литературни подаци указују на то да хлорогенска киселина испољава широк спектар различитих биолошких активности укључујући антиканцерогено и антимулагено дејство (*Farah u cap., 2008; Moon u cap., 2017; Naveed u cap., 2018*). *Abraham u cap. (2012)*, користећи ЦБМН тест у ММЦ-индукованим лимфоцитима, показали су да је ова киселина смањила оштећење ДНК изазвано рендгенским зрацима. Такође, *Cinkilic u cap., (2008)* утврдили су њену радиопротективну улогу, јер смањује негативно дејство гама зрачења на лимфоците периферне крви и то смањењем фреквенце МН и дицентричних хромозома.

Ацетонски екстракти обе биљке садржали су *trans*-циметну киселину као доминантно фенолно једињење које је било присутно у скоро шест пута већој концентрацији у *A. alba* него у *A. vulgaris*. *Maistro u cap. (2011)* су применом ЦБМН теста, показали да циметна киселина и њени деривати могу повећати фреквенцу МН. Неколико студија је испитивало антимулагену активност ове киселине. Тако, *Kitsati u cap. (2012)* у својој студији испитивали су потенцијалну улогу циметне киселине и њених деривата на ДНК оштећење индуковано водоник-пероксидом (H_2O_2). Добијену протективну активност објаснили су тиме што ово фенолно једињење због присуства орто-хидрокси групе на ароматичном прстену има способност хелатирања гвожђа које штити молекул ДНК од услова оксидативног стреса. Такође *Taner u cap. (2017)* су показали да циметна киселина редукује H_2O_2 индуковано геномско оштећење у хуманим лимфоцитима периферне крви.

Сирингинска и 2,5-дихидроксибензоева киселина биле су најзаступљеније фенолне компоненте у воденом екстракту *A. vulgaris*, док је висока концентрација 3,5-дихидроксибензоеве киселине детектована једино у воденом екстракту *A. alba*. Досадашњи литературни подаци указују да генотоксични потенцијал сирингинске киселине још увек није испитан, док је испитивање ефекта бензоеве киселине било је предмет истраживања малог броја аутора (*Yilmaz u cap., 2008, 2009; Zengin u cap., 2011; Patel u Ramani, 2017; Bogar u Tuylu, 2019*). Бензоева киселина је повећавала фреквенцу хромозомских аберација код *A. sativum* (*Yilmaz u cap., 2008*) и фреквенцу хромозомских аберација, SCE и МН у хуманим лимфоцитима (*Yilmaz u cap., 2009; Zengin u cap., 2011*). Такође, истраживања *Patel and Ramani (2017)* су показала да је бензоева киселина индуковала фреквенцу хромозомских аберација и SCE, док су *Bogar u Tuylu, (2019)* указали да само високе дозе бензоеве киселине испољавају генотоксичне и цитотоксичне ефекте у лимфоцитима периферне крви *in vitro*. Бензоева киселина индуковала је и слабу генотоксичност у ћелијској линији фибробласта кинеског хрчка (*Sasaki u cap., 2002*). Механизам ДНК оштећења посредством бензоеве киселине још увек није познат. Једна група аутора сматра да бензоева киселина остварује генотоксични

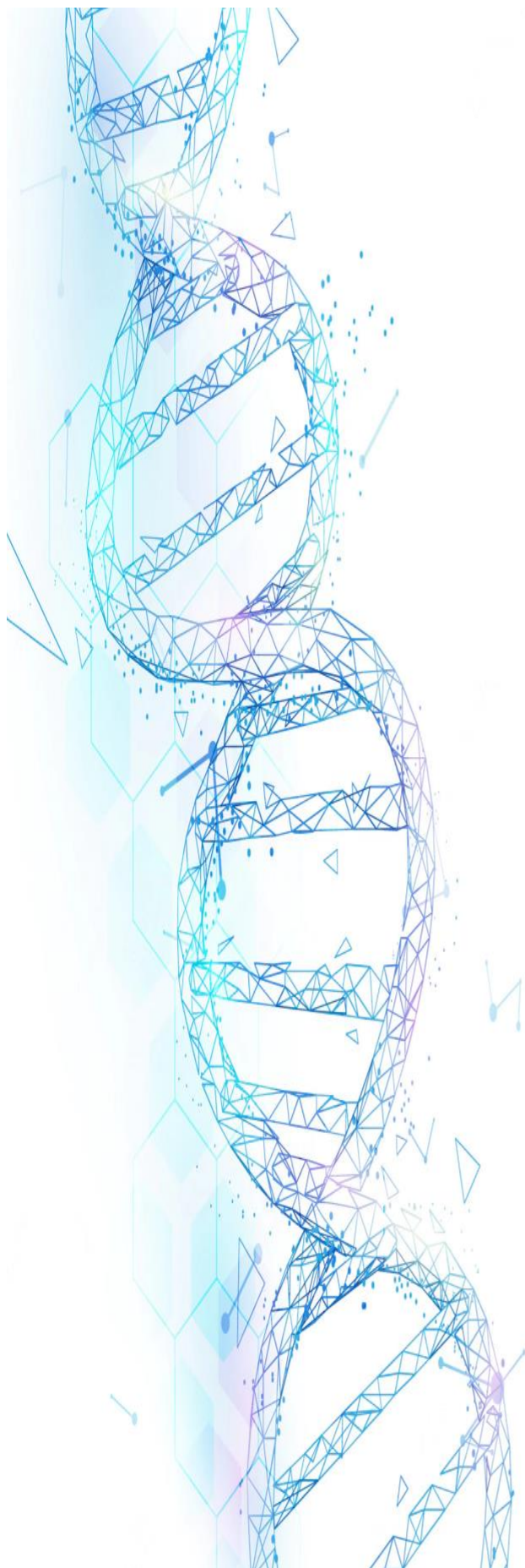
ефекат инхибицијом топоизомеразе II, ензима који пресеца и поново спаја оба ланца ДНК, што последично доводи до оштећења генетичког материјала (*Fukuda и сар., 1996.*). Други аутори сматрају да генотоксични ефекат бензоеве киселине настаје инхибицијом синтезе протеина неопходних за поправку ДНК оштећења као што су RSC1, PARP-1 и LIG3 или OP18 статмина који регулише микротубуле (*Yilmaz и сар., 2009.*).



6. Закључци

У складу са постављеним циљевима, а на основу добијених резултата испитивања фитохемијског састава и ефеката биљних врста *A. vulgaris* и *A. alba* могу се извести следећи закључци:

- Екстракти *A. vulgaris* били су богатији укупним фенолним једињењима и флавоноидима, у поређењу са екстрактима *A. alba*. Квантификацијом и квалификацијом састава фенолних једињења екстракта уочава се да су метанолски екстракти обе биљне врсте најбогатији при чему је од фенолних киселина највише било хлорогенске киселине, а од флавоноида кверцетин-3-*O*-глукопиранозида.
- Екстракти *A. vulgaris* нису испољили значајан цитотоксични ефекат на ћелијској линији SW-480 колоректалног карцинома и линији мезенхималиних ћелија периодонцијума PDLs. У здравим ћелијама (лимфоцитима периферне крви) дозно-зависно су индуковали генотоксични ефекат посебно у високим концентрацијама. Када су комбиновани са ММЦ, сви анализирани екстракти *A. vulgaris* остварили су селективно дејство индукујући значајан цитостатски и проапоптотски ефекат у ћелијама карцинома, док су у PDLs ћелијама остварили антагонистички ефекат. У комбинованом третману са ММЦ, екстракти су испољили снажни антимулагени ефекат на лимфоците периферне крви здравих донора.
- Екстракти *A. alba* испољили су већи цитотоксични ефекат на ћелије карцинома, у поређењу са екстрактима *A. vulgaris*, при чему је највећи цитостатски ефекат посредован раном апоптозом постигнут након третмана ацетонским екстрактом *A. alba*. Екстракти *A. alba* нису остварили цитотоксични ефекат на PDLs ћелије. У култивисаним хуманим лимфоцитима периферне крви само водени екстракт биљке није деловао генотоксично. Сви анализирани екстракти *A. alba* остварили су селективно синергистичко дејство са ММЦ и индуковали само већи цитотоксични и проапоптотски ефекат на ћелије карцинома. У лимфоцитима периферне крви екстракти *A. alba* значајно су редуковали ММЦ-индуковано хромозомско оштећење и испољили снажни антимулагени ефекат остваривањем антагонистичког дејства, при чему је највећи ефекат показао водени екстракт биљке.
- Водени екстракт биљке *A. alba* може се безбедно користити. Због изразитог цитостатског ефекта остваривањем синергистичког дејства са хемиотерапеутским агенсом у малигним ћелијама и снажног антимулагеног ефекта у здравим ћелијама, може се препоручити његова употреба у циљу одржавања хомеостазе здравих ћелија организма.



7. Литература

1. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*. 2012; 17: 2542-2566.
2. Abderrahman SM, Shbailat SJ. Genotoxic and cytotoxic effects of *Artemisia herba-alba* on mammalian cells. *Cariologia*. 2014; 67: 265-272.
3. Abdul QA, Seong SH, Hui S, Ahn BR, Islam MN, Jung H.A, Choi JS. Anti-inflammatory potential of *Artemisia capillaris* and its constituents in LPS-induced RAW264.7 cells. *Natural Product Sciences*. 2018; 24: 171-180.
4. Abiri R, Silva ALM, de Mesquita LSS, de Mesquita JWC, Atabaki N, de Almeida EB, Shaharuddin NA, Malik S. Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. *Food Research International*. 2018; 109: 403-415.
5. Abou Baker DH. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge. *Toxicology Reports*. 2022; 9: 445-469.
6. Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*. 2020; 12: 1-10.
7. Agarwal A, Kumar A, Singh BK. A review on extraction and phytochemical screening methods. *Research in Pharmacy and Health Sciences*. 2016; 2: 130-137.
8. Ahmed S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Science World Journal*. 2013; 2013: 162750.
9. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. 2021; 4: 200-214.
10. Ali ANM, Saeed NAAAH, Omear HA. The anticancer properties of *Artemisia aucheri* Boiss extract on HT29 colon cancer cells. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2021; 52: 113-119.
11. Alnabbat KI, Fardous AM, Shahab S, James AA, Bahry MR, Heydari AR. High dietary folic acid intake is associated with genomic instability in peripheral lymphocytes of healthy adults. *Nutrients*. 2022; 14: 3944.
12. Alothman M, Bhat R, Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 2009; 115: 785-788.
13. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*. 2017; 6: 42.
14. Amado NG, Predes D, Fonseca BF, Cerqueira DM, Reis AH, Dudenhoefter AC, Borges HL, Mendes FA, Abreu JG. Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth *in vitro* by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289: 35456-35467.
15. Amidon C, Barnett R, Cathers J, Chambers B, Hamilton L, Kellett A, Kennel E, Montowski J, Thomas MA, Watson B. *Artemisia*: An essential guide from the herb society of America In: Caroline A., Thomas M., Kennel E., editors. The Herb Society of America. Kirtland, USA, 2014.
16. Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*. 2019; 9: 258.
17. Anantharaju PG, Reddy BD, Padukudru MA, Chitturi CHMK, Vimalambike MG, Madhunapantulaa SV. Naturally occurring benzoic acid derivatives retard cancer cell growth by inhibiting histone deacetylases (HDAC). *Cancer Biology & Therapy*. 2017; 18: 492-504.

18. Andrade AF, Alves JM, Corrêa MB, Cunha WR, Veneziani RC, Tavares DC. *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of *Solanum lycocarpum* hydroalcoholic extract. *Pharmaceutical Biology*. 2016; 54: 2786-2790.
19. Andreu L, Nuncio-Jáuregui N, Carbonell-Barrachina ÁA, Legua P, Hernández F. Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018; 98: 1566-1573.
20. Anwar F, Ahmad N, Alkharfy KM, Gilani AH. Mugwort (*Artemisia vulgaris*) oils. In: Preedy VR, editor. *Essential oils in food preservation, flavor, and safety*; London, UK, 2016; pp. 573-579.
21. Anwar S, Asif N, Naqvi SAH, Malik S. Evaluation of multiple risk factors involved in the development of diabetic retinopathy. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2019; 35: 156-160.
22. Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, de Carvalho RF, de Souza EB, de Cassia Stocco R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015; 72: 74-82.
23. Asanov M, Bonassi S, Proietti S, Minina VI, Tomino C, El-Zein R. Genomic instability in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: A systematic review and meta-analysis of studies using the micronucleus assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2021; 787: 108344.
24. Azqueta A, Collins A. Polyphenols and DNA Damage: A Mixed Blessing. *Nutrients*. 2016; 8: 785.
25. Babayan AM, Petrosyan MT, Sahakyan NY. The chemical composition and antioxidant properties of some species of *Artemisia* genus, represented in Armenian flora. *Proceedings of Yerevan State University*. 2022; 56: 161-168.
26. Bajić V, Milicević Z, Stremo-Potparević B. A negative adaptive response is expressed in peripheral blood lymphocytes that are exposed to mitomycin C and cycloheximide. *Journal of BUON*. 2005; 10: 111-117.
27. Baldim JL, de Alcântara BGV, Domingos ODS, Soares MG, Caldas IS, Novaes RD, Oliveira TB, Lago JHG, Chagas-Paula DA. The correlation between chemical structures and antioxidant, prooxidant, and antitrypanosomatid properties of flavonoids. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 2017: 1-12.
28. Kaźmierczak-Barańska J, Boguszewska K, Karwowski BT. Nutrition can help DNA repair in the case of aging. *Nutrients*. 2020; 2: 3364.
29. Barney JN, Di Tommaso A. The biology of Canadian weeds. 118. *Artemisia vulgaris* L. *Canadian Journal of Plant Science*. 2003; 83: 205-215.
30. Batiha GES, Olatunde A, El-MLeeh A, Hetta HF, Al-Rejaie S, Alghamdi S, Zahoor M, Beshbishy AM, Murata T, Zaragoza-Bastida A, Rivero-Perez N. Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of Wormwood (*Artemisia absinthium*). *Antibiotics*. 2020; 9: 353-378.
31. Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017; 11: 847-863.
32. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 2005; 11: 127-152.

33. Biondi E, Galdenzi D. Phytosociological analysis of the grasslands of Montagna dei Fiori (central Italy) and syntaxonomic review of the class Festuco-Brometea in the Apennines. *Plant Sociology*. 2012; 49: 91-112.
34. Bogar F, Tuylu BA. Determination of genotoxic effects of some food additives with help of cbmn technique. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2019; 28: 6601-6611.
35. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, KirschVolders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: i. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001; 37: 31-45.
36. Bonassi S, M Fenech M. 2019. Chapter 4. Micronuclei and their association with infertility, pregnancy complications, developmental defects, anaemias, inflammation, diabetes, chronic kidney disease, obesity, cardiovascular disease, neurodegenerative diseases and cancer. *Toxicology*, 2019, 38–78.
37. Bora KS, Shama A. The genus *Artemisia*: A comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*. 2011; 49: 101-109.
38. Borzabad RK, Sudarshana MS, Niranjana MH. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Artemisia vulgaris* L.–a medicinal herb. *Modern Applied Science*. 2010; 4: 130-134.
39. Bray F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor AZ, Zanetti R, Ferlay J. Cancer incidence in five continents volume XI. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 2021.
40. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68: 394-424.
41. Buranaamnuay K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*. 2021; 11: 251-269.
42. Cassas AI, VTV, Daiber A, Maghzal GJ, Di Lisa F, Kaludercic N, Leach S, Cuadrado A, Jaquet V, Seredenina T, Krause KH, López MG, Stocker R, Ghezzi P, Schmidt HHW. Reactive oxygen-related diseases: therapeutic targets and emerging clinical indications. *Antioxidant & Redox Signaling*. 2015; 23: 1171-1185.
43. Catitti G, De Fabritiis S, Brocco D, Simeone P, De Bellis D, Vespa S, Veschi S, De Lellis L, Tinari N, Verginelli F, Marchisio M, Cama A, Patruno A, Lanuti P. Flow cytometry detection of anthracycline-treated breast cancer cells: an optimized protocol. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023; 45: 164-174.
44. Chassagne F, Samarakoon T, Porras G, Lyles JT, Dettweiler M, Marquez L, Salam AM, Shabih S, Farrokhi DR, Quave CL. A systematic review of plants with antibacterial activities: A taxonomic and phylogenetic perspective. *Frontiers in Pharmacology*. 2021; 11: 586548.
45. Chen GL, Fan MX, Wu JL, Li N, Guo MQ. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. *Food Chemistry*. 2019; 277: 706-712.
46. Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH, Chen CC, Hong AI, Wei YH, Chang WP. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *Journal of Radiation Research*. 2003; 44: 31-35.

47. Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huamán A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2009; 113: 1243-1251.
48. Cho NY, Kim KW, Kim KK. Genomic health status assessed by a cytokinesis-block micronucleus cytome assay in a healthy middle-aged Korean population. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2017; 814: 7-13.
49. Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T, Vatan O, Yilmaz D, Cavas T, Tunc S Ozkan L, Bilaloglu R. Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 53: 359-363.
50. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999; 79: 362-372.
51. Coskun M, Cayır A, Coşkun M, Tok H. Evaluation of background DNA damage in a Turkish population measured by means of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research*. 2013; 757: 23-27.
52. Crozier I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*. 2019; 18: 241-272.
53. Ćetković T, Havari A, Klacar LC, Omanović MH, Haverić S. *In vitro* assessment of genotoxic and cytotoxic effects of *Artemisia annua* L. tincture. *Genetics & Applications*. 2021. 5: 1-9.
54. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019; 43: 582-592.
55. Da Silva CR, de Andrade Neto JB, de Sousa Campos R, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HIF, Cavalcanti BC, Gaspar DM, de Andrade GM, Lima ISP, de Barros Viana GSV, de Moraes MO, Lobo MDP, Grangeiro TB, Júnior HVN. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 58: 1468-1478.
56. Dai J, Mumber RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15: 7313-7352.
57. Daradka HM, Alshibly NMY. Effect of *Artemisia alba* L. extract against ethinylestradiol induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes. *African Journal and Biotechnology*. 2012; 11: 15246-15250.
58. De Marino S, Festa C, Zollo F, Nini A, Antenucci L, Raimo G, Iorizzi M. Antioxidant activity and chemical components as potential anticancer agents in the olive leaf (*Olea europaea* L. cv Leccino) decoction. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014; 14: 1376-1385.
59. Dettweiler M, Melander RJ, Porras G, Risener C, Marques L, Samarakoon T, Melander C, Quave CL. A clerodane diterpene from *Callicarpa americana* resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. *ACS Infectious Diseases*; 2020; 6: 1667-1673.
60. Dias D, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012; 2: 303-336.
61. Djordjević S, Stanisavljević D, Ristić M, Milenković M, Veličković D, Stojičević S, Zlatković B. Chemical, antioxidant and antimicrobial analysis of the essential oil and extracts of *Artemisia alba* Turra. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2013; 8: 1377-1388.

62. Dos Santos M, Penteado JU, Fernandes CLF, da Silva Junior FMR. Effect of diet on DNA damage: critical review. *Research, Society and Development*. 2020; 9: e52963364.
63. Dosi T, Gupta D, Hazari A, Rajan R, Prabhav C, Anushri SR. Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 2016; 6: 143-147.
64. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatis O, Are C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *Journal of Surgical Oncology*. 2017; 115: 619-630.
65. Duda-Madej A, Kozłowska J, Krzyżek P, Anioł M, Seniuk A, Jermakow K, Dworniczek E. Antimicrobial o-alkyl derivatives of naringenin and their oximes against multidrug-resistant bacteria. *Molecules*. 2020; 25: 3642.
66. Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, Novellino E, Santini A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 2019; 33: 2221-2243.
67. Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, Perry NB. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*. 2006; 101: 1417-1424.
68. Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17: 160-201.
69. Ekbatan S, Iskandar MM, Sleno L, Sabally K, Khairallah J, Prakash S, Kubow S. Absorption and metabolism of phenolics from digests of polyphenol-rich potato extracts using the Caco-2/HepG2 co-culture system. *Food*. 2018; 7: 8.
70. Ekiert H, Pajor J, Klin P, Rzeplia A, Ślesak H, Szopa A. Significance of *Artemisia vulgaris* L. (common Mugwort) in the history of medicine and its possible contemporary applications substantiated by phytochemical and pharmacological studies. *Molecules*. 2020; 25: 4415.
71. Ekiert H, Klimek-Szczykutowicz M, Knut E, Klin P, Rzeplia A, Tomczyk M, Szopa A. *Artemisia dracunculus* (Tarragon): A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Frontier in Pharmacology*. 2021; 12: 653993.
72. Ekiert H, Klimek-Szczykutowicz M, Rzeplia A, Klin P, Szopa A. *Artemisia* species with high biological values as a potential source of medicinal and cosmetic raw materials. *Molecules*. 2022; 27: 6427.
73. Erel B, Aydin F, Ballar P. *In vitro* cytotoxic properties of six *Artemisia* L. species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 8: 247-251.
74. Evans HJ. Chromosome anomalies among livebirths. *Journal of Medical Genetics*. 1977; 14: 309-312.
75. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *The Journal of Nutrition*. 2008; 138: 2309-2315.
76. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 1985; 147: 29-36.
77. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.
78. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*. 2006; 600: 58-66.

79. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2007; 2: 1084-1104.
80. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26: 43-49.
81. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011; 26: 125-132.
82. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes*. 2020a; 11: 1203.
83. Fenech M. Chapter 4 - The role of nutrition in DNA replication, DNA damage prevention and DNA repair. In: Caterina RDE, Martinez JA, Kohlmeier M, editors. Principles of nutrigenetics and nutrigenomics. Cambridge (CA): Academic Press; 2020b; pp. 27-32.
84. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Migliore L, Palitti F, Natarajan AT, Kirsch-Volders M. Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. *Mutation Research*. 2016; 770: 12-25.
85. Feng X, Cao S, Qiu F, Zhang BL. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020; 216: 107650.
86. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Annual Review of Nutrition*. 2008; 28: 313-29.
87. Ferrante C, Zengin G, Menghini L, Diuzheva A, Jekò J, Cziáky Z, Recinella L, Chiavaroli A, Leone S, Brunetti L, Lobine D, Senkardes I, Mahomoodally MF, Orlando G. Qualitative fingerprint analysis and multidirectional assessment of different crude extracts and essential oil from weild *Artemisia santonicum* L. *Processes*. 2019; 7: 522.
88. Ferraz GA, Neto AOC, Cerqueira EMM, Meireles JRC. Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. 2016; 19: 627-634.
89. Fidrianny I, Nadia E, Ruslan WK. *In vitro* antioxidant activities, total flavonoid, phenolic and carotenoid content from various extracts of four species Asteraceae herb. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015; 7: 192-197.
90. Fok TF. Neonatal jaundice-traditional Chinese medicine approach. *Journal of Perinatology*. 2001; 21: 91-100.
91. Franzke B, Halper B, Hofmann M, Oesen S, Peherstorfer H, Krejci K, Koller B, Geider K, Baiertl A, Tosevska A, Strasser EV, Wessner B, Wagner KH. Active ageing study group the influence of age and aerobic fitness on chromosomal damage in Austrian institutionalised elderly. *Mutagenesis*. 2014; 29: 441-445.
92. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, New York, 1983; pp. 293.
93. Fukuda M, Inomata M, Nishio K, Fukuoka K, Kanzawa F, Arioka H, Ishida T, Fukumoto H, Kurokawa H, Oka M, Saijo N. A topoisomerase II inhibitor, NK109, induces DNA single- and double-strand breaks and apoptosis. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1996; 87: 1086-1091.
94. Gajski G, Gerića M, Oreščanin V, Garaj-Vrhovaca V. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in peripheral blood lymphocytes of the general population: Contribution of age, sex, seasonal variations and lifestyle factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018; 148: 561-570.

95. Gao L, Zhao F, Jiang W, Niu C, Yuan K, Lin W, Hu X, Ma R, Huang Z. Immortalization of human periodontal ligament stem cells by transferring human telomerase reverse transcriptase gene. *Frontiers of Oral and Maxillofacial Medicine*. 2019; 1: 6.
96. Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Pažanin S, Šarolić A, Domijan AM, Flajs D, Peraica M. Assessment of cytogenetic damage and oxidative stress in personnel occupationally exposed to the pulsed microwave radiation of marine radar equipment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011; 214: 59-65.
97. Ghasemi M, Turnbull T, a Sebastian S, Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 12827.
98. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5: 6697-6703.
99. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. *In vitro* evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014; 9: 91-96.
100. Górnjak I, Rafal Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*. 2019; 18: 241-272.
101. Grujičić D, Radović M, Arsenijević S, Milošević-Djordjević O. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Medical Genetics*. 2016; 59: 624-633.
102. Guo M, Lu B, Gan J, Wang S, Jiang X, Li H. Apoptosis detection: a purpose-dependent approach selection. *Cell cycle*. 2021; 20: 1033-1040.
103. Gurta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*. 2012; 1: 8-26.
104. Harutyunyan K, Balayan K, Tadevosyan G, Hayrapetyan M, Musayelyan R, Grigoryan R, Khondkaryan L, Sarkisyan N, Babayan N. Genotoxic potential of selected medicinal plant extracts in human whole blood cultures. *Journal of Herbmед Pharmacology*. 2019; 8: 160-162.
105. Hano C, Tungmunnithum D. Plant polyphenols, more than just simple natural antioxidants: oxidative stress, aging and age-related diseases. *Medicines*. 2020; 7: 26.
106. Hashem S, Ali TA, Akhtar S Nisar S, Sageena G, Ali S, Al-Mannai S, Therachiyil L, Mir R, Elfaki I. Targeting cancer signaling pathways by natural products: Exploring promising anti-cancer agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 150: 113054.
107. Hidalgo GI, Almajano MP. Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants*, 2017; 6: 7.
108. Hill H, Golic K. Chromosome tug of war: dicentric chromosomes and the centromere strength hypothesis. *Cells*. 2022; 11: 3550.
109. Hemaiswarya S, Doble M. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. *Phytomedicine*. 2013; 20: 151-158.
110. Hernández-Rodríguez P, Baquero L, Larrota HR. Flavonoids: potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. *Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications*. 2019; 14: 265-288.

111. Hopf NB, Danuser B, Bolognesi C, Wild P. Age related micronuclei frequency ranges in buccal and nasal cells in a healthy population. *Environmental Research*. 2020; 180: 108824.
112. Huang P, Huang B, Weng H, Nakayama K, Morimoto K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Preventive Medicine*. 2009; 48: 383-388.
113. Hussar P. Apoptosis regulators Bcl-2 and caspase-3. *Encyclopedia*. 2022; 2: 1624-1636.
114. Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutation Research*. 2008; 659: 274-283.
115. Ickovski JD, Mitić MN, Stojković MB, Stojanović GS. Comparative analysis of HPLC profiles and antioxidant activity of *Artemisia alba* Turra from two habitats in Serbia. *Chemia Naissensis*. 2020; 3: 89-99.
116. Irda F, Evelyne N, Komar RW. *In vitro* antioxidant activities, total flavonoid, phenolic and carotenoid content from various extracts of four species Asteraceae herb. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015; 7: 192-197.
117. Istifli ES, Hüsünet MT, İla HB. Cell Division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity. In: Erman Salih Istifli and Hasan Basri İla, editors. Cytotoxicity - definition, identification, and cytotoxic compounds. 2019; pp. 87-105.
118. Ivanescu B, Vlase L, Corciova A, Lazar MI. HPLC-DAD-MS study of polyphenols from *Artemisia absinthium*, *A. annua* and *A. vulgaris*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2010; 46: 468-470.
119. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmед Pharmacology*. 2018; 7: 1-7.
120. Jimi S, Jaguparov A, Nurkesh A, Sultankulov B, Saparov A. Sequential delivery of cryogel released growth factors and cytokines accelerates wound healing and improves tissue regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020; 8: 345.
121. Joshi B, Bhandari NL, Shrestha S, Gyawali R, Thapa P. Comparative study of polyphenol, flavonoid and antioxidant activity of various medicinal plants collected from different altitudes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2021; 14: 2455-3891.
122. Kane NF, Kyama MC, Nganga JK, Hassanali A, Diallo M, Kimani FT. Comparison of phytochemical profiles and antimalarial activities of *Artemisia afra* plant collected from five countries in Africa. *South African Journal of Botany*. 2019; 125: 126-133.
123. Kari S, Subramanian K, Altomonte AA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M, Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*. 2022; 27:482-508.
124. Karna P, Chagani S, Gundala SR, Rida PCG, Asig G, Sharma V, Gupta MV, Aneja R. Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. *British Journal of Nutrition*. 2012; 107: 473-484.
125. Kato TA. Cytokinesis blocked micronuclei aberration analysis. *Methods in Molecular Biology*. 2023; 2519: 83-91.
126. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes and Environment*. 2020; 42: 16.
127. Kelloff GJ. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. *Advances in Cancer Research*. 2000; 78: 199-334.

128. Khan J, Deb PK, Priya S, Medina KD, Devi R, Walode SG, Rudrapal M. Dietary flavonoids: Cardioprotective potential with antioxidant effects and their pharmacokinetic, toxicological and therapeutic concerns. *Molecule*. 2021; 206: 4021.
129. Khezrilu Bandli J, Heidari R, Mohammadkhani N. Phenolic content and ferric reducing antioxidant power of *Artemisia fragrans* Willd. and *Artemisia vulgaris* L. herbs. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017; 51: 52.
130. Khelifi D, Sghaier RM, Amouri S, Laouini D, Hamdi M, Bouajila J. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55: 202-208.
131. Kim EJ, Kim GT, Kim BM, Lim EG, Kim SY, Kim YM. Apoptosis-induced effects of extract from *Artemisia annua* Linné by modulating PTEN/p53/PDK1/Akt/ signal pathways through PTEN/p53-independent manner in HCT116 colon cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017; 17: 236-247.
132. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004; 96: 229-245.
133. Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Decordier L. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*. 2002; 504:137-148.
134. Kitsati N, Fokas D, Ouzouni MD, Mantzaris MD, Barbouti A, Galaris D. Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H₂O₂-induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60: 7873-7879.
135. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020; 12: 457.
136. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2018; 64: 25-34.
137. Krunic A, Haveric S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. 2005; ;56:227-232.
138. Kshirsagar SG, Rao RV. Antiviral and immunomodulation effects of *Artemisia*. *Medicina*. 2021; 57: 217.
139. Kumar WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*. 2010; 62: 1-20.
140. Kumar N, Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 2014; 4: 86-93.
141. Kumar N, Pruthi V. Structural elucidation and molecular docking of ferulic acid from *Parthenium hysterophorus* possessing COX-2 inhibition activity. *3 Biotech*. 2015; 5: 541-551.
142. Kumar N Gupta S, Yadav TC, Pruthi V. Varadwaj PK, Goel N. Extrapolation of phenolic compounds as multi-target agents against cancer and inflammation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019; 37: 2355-2369.
143. Kumar S, Abedin MM, Singh AK, Das S. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*. 2020; 517-532.
144. Laffon B, Bonassi S, Costa S, Valdiglesias V. Genomic instability as a main driving factor of unsuccessful ageing: potential for translating the use of micronuclei into clinical practice. *Mutation Research*. 2021; 787: 108359.

145. Ladeira C, Carolino E, Gomes MC. Role of macronutrients and micronutrients in DNA damage: results from a food frequency questionnaire. *Nutrition and Metabolic Insights*. 2017; 10:1178638816684666.
146. Lahlou M. The success of natural products in drug discovery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; 4: 17-31.
147. Lall N, Kishore N, Binneman B, Twilley D, van de Venter M, Plessis-Stoman D, Bouker G, Hussein A. Cytotoxicity of syringin and 4-methoxycinnamyl alcohol isolated from *Foeniculum vulgare* on selected human cell lines. *Natural product research*. 2015; 18: 1752-1756.
148. Latosinska JN, Latosinska M. Anticancer drug discovery-from serendipity to rational design. *Drug Discovery*. 2013; 35-74.
149. Lee CH, Huanhb SW, Chang PC, Shiauf JP, Lina IP, Ling MY, Laih CC, Chen CY. Reactive oxygen species mediate the chemopreventive effects of syringin in breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2019; 61: 152844.
150. Levine JS, Ahnen DJ. Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355: 2551-2557.
151. Lian G, Li F, Yin Y, Chen L, Yang J. Herbal extract of *Artemisia vulgaris* (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15 human colon cancer cells via autophagy induction, cell migration suppression and loss of mitochondrial membrane potential. *JBUON*. 2018; 23: 73-78.
152. Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *International Journal of Cancer*. 1995; 62: 345-350.
153. Liu N, Van Der Kooy F, Verpoorte R. *Artemisia afra*: A potential flagship for African medicinal plants? *South African Journal of Botany*. 2009; 75: 185-195.
154. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78: 517-520.
155. Lombardi, VRM, Carrera I, Cacabelos R. In vitro screening for cytotoxic activity of herbal extracts evidence-based. *Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 2017: 2675631.
156. Maeda J, Roybal EJ, Brents CA, Uesaka M, Aizawa Y, Kato TA. Natural and glucosyl flavonoids inhibit poly (ADP-ribose) polymerase activity and inducesynthetic lethality in BRCA mutant cells. *Oncology Reports*. 2014; 31: 551-556.
157. Maggio A, Rosselli S, Brancazio CL, Spadaro V, Raimondo FM, Bruno M. Metabolites from the aerial parts of the Sicilian population of *Artemisia alba*. *Natural Product Communication*. 8: 283-286.
158. Maistro EL, Angeli JPF, Andrade SF, Mantovani MS. *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. *Genetics and Molecular Research*. 2011; 10: 1130-1140.
159. Maiyola FC, Moodleyb R, Singh M. Cytotoxicity, antioxidant and apoptosis studies of quercetin-3-O glucoside and 4-(β-D-glucopyranosyl-1→4-α-L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2016; 16: 648-656.
160. Malik K, Ahmad M, Zhang G, Rashid N, Zafar M, Sultana S, Shas SN. Traditional plant based medicines used to treat musculoskeletal disorders in northern Pakistan. *European Journal of Integrative Medicine*. 2018; 19: 17-64.
161. Marcelia M, Arsianti A, Chan JOT, Stevano JW, Fadilah F, Putrianingsih R, Azizah NN, Bahtiar A, Tanimoto H, Kakiuchi K. *In vitro* cytotoxicity of the synthesized gallic

- acid derivatives (N-Alkyl Gallamide) against breast MCF-7 cancer cells. *Oriental Journal of Chemistry*. 2018; 34: 2268-2272.
162. Marco JA, Barberá O, Sánchez-Parareda J. Flavonol and coumarin glycosides from *Artemisia incanescens*. *Journal of Natural Products*. 1987; 50: 774-775.
163. Maurya DK, Devasagayam TP. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 3369-3373.
164. Mazumder K, Biswas B, Raja IM, Fukase KA. Review of cytotoxic plants of the Indian subcontinent and a broad-spectrum analysis of their bioactive compounds. *Molecules*. 2020; 25: 1904.
165. Melguizo-Melguizo D, Diaz-De-Cerio D, Quirantes-Pine E, Švarc-Gajić J, Segura-Carretero A. The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *Journal Functional Foods*. 2014; 10: 192-200.
166. Melo-Reis PR, Bezerra LSA, Vale M, Canhêto RFR, Chen-Chen L. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*. 2011; 71: 169-174.
167. Meng XH, Liu C, Fan R, Zhu LF, Yang SX, Zhu HT, Wang D, Yang CR, Zhang YJ. Antioxidative flavan-3-ol dimers from the leaves of *Camellia fangchengensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018; 66: 247-254.
168. Miletić M, Mojsilović S, Okić-Đorđević I, Kukulj T, Jauković A, Santibenez JF, Jovčić G, Bugarski D. Mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. *Archives of Biological Sciences*. 2014; 66: 261-271.
169. Milošević-Djordjević O, Grujičić D, Novaković T, Arsenijević S, Marinković D. Micronuclei and ageing in a sample of Yugoslavian population. *Genetika*. 2002; 38: 264-267.
170. Milošević-Đorđević O. Principi kliničke citogenetike. *Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu*. 2010.
171. Milošević-Djordjević O, Stošić I, Grujičić D, Zelen I, Sazdanović P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. 2012; 63: 367-375.
172. Milošević-Djordjević O, Radović Jakovljević M, Marković A, Stanković M, Ćirić A, Marinković D, Grujičić D. Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turkish Journal of Biology*. 2018; 42: 152-162.
173. Milutinović MG, Maksimović VM, Cvetković DC, Nikodijević DD, Stanković MS, Pešić MS, Marković SD. Potential of *Teucrium chamaedrys* L. to modulate apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019; 240: 111951.
174. Moacă EA, Pavel IZ, Danciu C, Crăiniceanu Z, Minda D, Ardelean F, Simona DA, Ghiulai R, Cioca A, Derban M, Simu S, Chioiba R, Szuhanek C, Dehelean CA. Romanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.): physicochemical and nutraceutical screening. *Molecules*. 2019; 24: 3087.
175. Moghtaderi H, Sepehri H, Delphi L, Attari F. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. *BioImpacts*. 2018; 8: 185-194.
176. Mohammed AM, Hussen DF, Rashad H, Hasheesh A. The micronuclei scoring as a biomarker for early detection of genotoxic effect of cigarette smoking. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2020; 21: 87-92.

177. Moon A, Agrawa T, Gupta P, Kondlekar N, Taksande A. Anti-cancer therapy: chlorogenic acid, gallic acid and ellagic acid in synergism. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2017; 12: 48-52.
178. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: 55-63.
179. Muheem A, Shakeel F, Jahangir MA, Anwar M, Mallick N, Jain GK, Warsi MH, Ahmad FJ. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016; 24: 413-428.
180. Munia I, Gafray L, Bringer MA, Goldschmidt P, Proukhnitzky L, Jacquemot N, Cercy C, Otman KRB, Errera MH, Ranchon-Cole I. Cytoprotective effects of natural highly bio-available vegetable derivatives on human-derived retinal cells. *Nutrients*. 2020; 12: 879.
181. Nassour J, Martien S, Martin N, Deruy E, Tomellini E, Malaquin N, Tomellini E, Malaquin N, Bouali F, Sabatier L, Wernert N, Pinte S, Gilson E, Pourtier A, Pluquet O, Abbadie C. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nature Communications*. 2016; 29: 10399.
182. Naveed M, Hejaz V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 97: 67-74.
183. Nawab A, Yunus M, Mahdi AA, Gupta S. Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the Indian sub-continent. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2011; 3: 21-22.
184. Neelamma G, Rasheed SH, Vinukonda A, Aruna M. *In-vitro* screening for cytotoxic activity of herbal plant extracts on N2a cell lines. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021; 14.
185. Nefić H, Handzić I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutation Research*. 2013; 753: 1-11.
186. Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, Knudsen LE, Srám RJ, Ceppi M, Bocchini V, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research*. 2006; 612: 14-39.
187. Nersesyan A, Fenech M, Bolognesi C, Mišić M, Setayesh T, Wultsch G, Bonassi S, Thomas P, Knasmüller S. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by *in vivo* exposure to chemical genotoxins: past, present and future. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016; 770: 1-11.
188. Niero ELO, Machado-Santelli GM. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2013; 32: 31.
189. Nikolova M, Gevrenova R, Ivanecheva S. High-performance liquid chromatographic separation of surface flavonoid aglycones in *Artemisia annua* L. and *Artemisia vulgaris* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2004; 69: 571-574.
190. Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003; 18: 221-233.
191. Obistioiu D, Cristina RT, Schmerold I, Chizzola R, Stolze K, Nichita I, Chiurciu V. Chemical characterization by GC-MS and *in vitro* activity against *Candida albicans*

- of volatile fractions prepared from *Artemisia dracunculus*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Chemistry Central Journal*. 2014; 8: 6.
192. Okuno Y, Marumoto S, Miyazawa M. Antimutagenic activity of flavonoids from Sozuku. *Natural Product Research*. 2019; 33: 862-865.
 193. Omar AM, Dibwe DF, Tawila AM, Sun S, Kim MJ, Awale S. Chemical constituents from *Artemisia vulgaris* and their antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Natural product Research*. 2021; 35: 4279-4285.
 194. Ouyang L, Luo Y, Tian M, Zhang SY, Lu R, Wang JH, Li X. Plant natural products: From traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell Proliferation*. 2014; 47: 506-515.
 195. Ozcan T, Akpinar-Bayazit A, Yilmaz-Ersan L, Delikanli B. Phenolics in human health. *International Journal of Civil Engineering and Applications*. 2014; 5: 393-396.
 196. Ožvald I, Dragan Božičević D, Duh L, Vinković Vrček, I, Pavičić I, Domijan A, Milić M. Effects of a 3-week hospital-controlled very-low-calorie diet in severely obese patients. *Nutrients*. 2021; 13: 4468.
 197. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016; 5: e47.
 198. Pandey AK, Singh P. The genus *Artemisia*: A 2012–2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils. *Medicines*. 2017; 4: 68.
 199. Panico A, Grassi T, Bagordo F, Idolo A, Serio F, Tumolo MR, Giorgi MD, Guido M, Tutino M, De Donno A. Micronucleus frequency in exfoliated buccal cells of children living in an industrialized area of Apulia (Italy). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17: 1208.
 200. Patel D, Ramani R. *In vitro* determination of genotoxic effects of sodium benzoate preservative on human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Biological Sciences*. 2017; 6: 20-26.
 201. Peron G, Baldan V, Sut S, Faggian M, Roccabruna L, Zanini D, Manzini P, Maggi F, Dall'Acqua S. Phytochemical investigations on *Artemisia alba* Turra growing in the North-East of Italy. *Natural Product Research*. 2017; 31: 1861-1868.
 202. Petrescu AM, Paunescu V, Iliu G. The antiviral activity and cytotoxicity of 15 natural phenolic compounds with previously demonstrated antifungal activity. *Journal of Environmental Science and Health*, 2019; Part B 54: 498-504.
 203. Prado RP, dos Santos BR, de Souza Pinto CL, de Assis KLC, Salvadori DMF, Ladeira MSP. Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis*. 2010; 25 :483-487.
 204. Quettier DC, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx MC, Cayin JC, Bailleul F, Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72: 35-42.
 205. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013; 18: 1208-1246.
 206. Radović Jakovljević M, Grujičić D, Živanović M, Stanković M, Ćirić A, Djurdjević P, Todorović Ž, Živančević-Simonović S, Mihaljević O, Milošević-Djordjević O. Ethyl acetate extracts of two *Artemisia* species: analyses of phenolic profile and anticancer activities against SW-480 colon cancer cells. *Natural Product Communications*. 2019; 1-6.
 207. Radović Jakovljević M, Grujičić D, Tubić Vukajlović J, Marković A, Milutinović M, Stanković M, Vuković N, Vukić M, Milošević-Djordjević O. *In vitro* study of

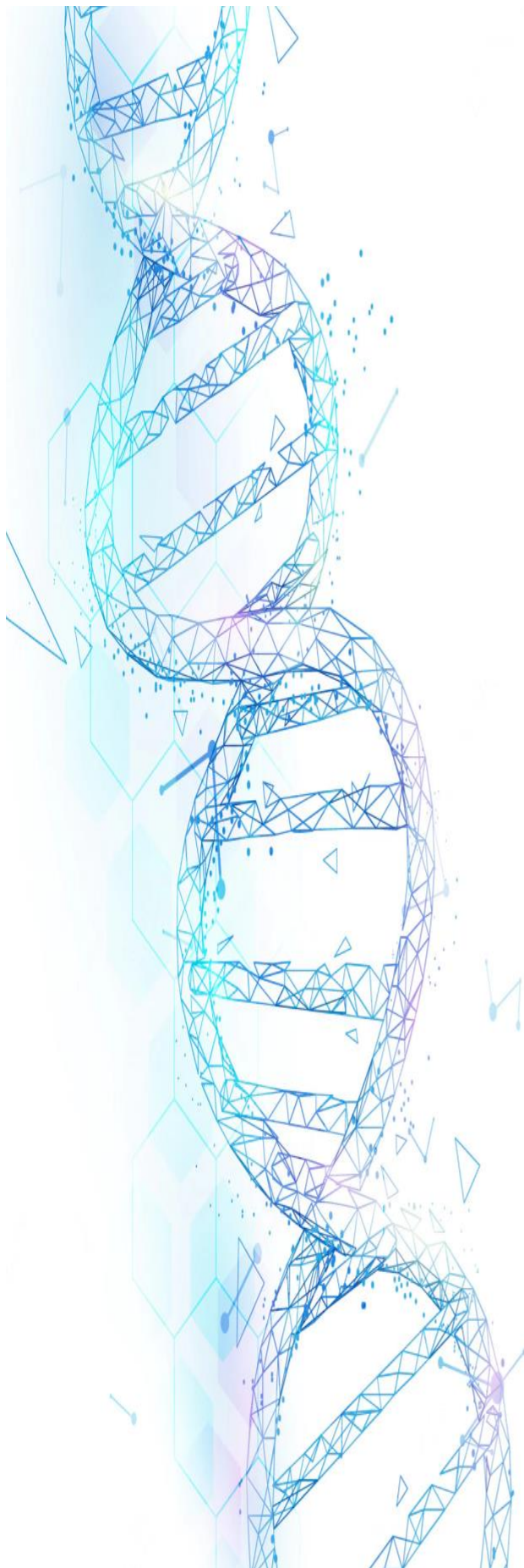
- genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra. *South African Journal of Botany*. 2020; 132: 117-126.
208. Radović Jakovljević M, Grujičić D, Stanković M, Vuković N, Vukić M, Milošević-Djordjević O. Comparative study of the genotoxic activity of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra extracts *in vitro*. *Drug and Chemical Toxicology*. 2022a; 45: 1915-1922.
209. Radović Jakovljević M, Grujičić D, Stanković M, Milošević-Djordjević O. *Artemisia vulgaris* L, *Artemisia alba* Turra and their constituents reduce mitomycin C-induced genomic instability in human peripheral blood lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. 2022b; 8: 1-10.
210. Radović Jakovljević M, Milutinović M, Djurdjević P, Todorović Ž, Stanković M, Milošević-Djordjević O. Cytotoxic and apoptotic activity of acetone and aqueous *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra extracts on colorectal cancer cells. *European Journal of Integrative Medicine*. 2023; 57: 102204.
211. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra, N, Soni R, Dwarakanath BS, Bhatt AN. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*. 2018; 8:1531.
212. Rahman M, Rahaman S, Islam R, Rahman F, Mithi FM, Alqahtani T, Almikhlafi MA, Alghamdi SQ, Alruwaili AS, Hossain MS, Ahmed M, Das R, Emran TB, Uddin MS. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules*. 2022; 27: 233.
213. Regner GG, Giancesini J, Von Borowski RG, Silveira F, Semedo JG, Ferraz Ad BF, Wiilland E, Von Poser G, Allgayer M, Picada JN, Pereira P. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: a medicinal plant with antifungal activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011; 31: 242-249.
214. Reimann H, Stopper H, Polak T, Lauer M, Herrmann MJ, Deckert J, Hintzsche H. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of patients with neurodegenerative diseases. *Scientific Reports*. 2020; 10: 22196.
215. Registar za rak Republike Srbije. Institut za javno zdravlje Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Odeljenje za prevenciju i kontrolu nezaraznih bolesti, Maligni tumori u Republici Srbiji, 2022, Beograd, 2022.
216. Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Santo ARE, Bôas DSV. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Patologia*. 2002; 16: 221-225.
217. Repetto M, Llesuy S. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002; 35: 523-534.
218. Rietjens IM, Martena MJ, Boersma MG, Spiegelberg W, Alink GM. Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005; 49: 131-158.
219. Risio M. The natural history of adenomas. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*. 2010; 24: 271-280.
220. Rodrigues MA, Beaton-Green LA, Wilkins RC, Fenech MF. The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cytome assay using imaging flow cytometry. *Mutation Research*. 2018; 836: 53-64.
221. Rody HVS, Gontijo DC, Coelho VPM, Ventrella MC, Pádua RM, Fietto LG, Leite JPV. Mutagenic activity and chemical composition of phenolic-rich extracts of leaves from two species of *Ficus* medicinal plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2018; 81: 862-872.

222. Sabido O, Figarol A, Klein JP, Bin V, Forest V, Pourchez J, Fubini, B, Cottier M, Tomatis M, Boudard D. Quantitative flow cytometric evaluation of oxidative stress and mitochondrial impairment in RAW 264.7 macrophages after exposure to pristine, acid functionalized, or annealed carbon nanotubes. *Nanomaterials (Basel)*. 2020; 10: 319.
223. Safe S, Kasiappan R. Natural products as mechanismbased anticancer agents: sp transcription factors as targets. *Phytotherapy Research*. 2016. 30: 1723-1732.
224. Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters*. 1996; 104: 193-196.
225. Sainz P, Cruz-Estrada Á, Díaz CE, González-Coloma A. The genus *Artemisia*: Distribution and phytochemistry in the Iberian Peninsula and the Canary and Balearic Islands. *Phytochemistry Reviews*. 2017; 16: 1023-1043.
226. Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology*. 2010; 40: 84-90.
227. Sanders K, Moran Z, Shi Z, Paul R, Greenlee H. Natural products for cancer prevention: clinical update 2016. *Seminars in Oncology Nursing*. 2016; 32: 215-240.
228. Santana-Gálvez J, Castrejón JV, Serna-Saldívar SO, Jacobo-Velázquez DA. Anticancer potential of dihydrocaffeic acid: a chlorogenic acid metabolite. *Cyta – Journal of Food*. 2020; 18: 245-248.
229. Santovito A, Gendusa C. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects living in turin (North-Italy): contribution of body mass index, age and sex. *Annals of Human Biology*. 2020; 47: 48-54.
230. Sarhan M, Land WG, Tonnus W, Hugo CP, Linkermann A. Origin and consequences of necroinflammation. *Physiological Reviews*. 2018; 98:727-780.
231. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Injama K, Taniguchi K, Tsuda C. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*. 2002; 519: 103-119.
232. Savić Lj. Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lekovite sirovine*. 2014; 34: 93-103.
233. Scheijen EEM, Wilson DM. Genome integrity and neurological disease. *International Journal of Molecular Science*. 2022; 23: 4142.
234. Schiebe ME, W. Hoffmann C, Belka M. Bamberg. Mitomycin C-related hemolytic uremic syndrome in cancer patients. *Anticancer Drugs*. 1998; 9: 433-435.
235. Sears DA, Udden MM. Howell-Jolly bodies: a brief historical review. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2012; 343: 407-409.
236. Septembre-Malaterre A, Rakoto ML, Marodon C, Bedoui Y, Nakab J, Simon E, Hoarau L, Savriama S, Strasberg D, Guiraud P, Selamaron J, Gasque P. *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 4986.
237. Shahrivari S, Alizadeh A, Ghassemi-Golezani K, Aryakia E. A comprehensive study on essential oil compositions, antioxidant, anticholinesterase and antityrosinase activities of three Iranian *Artemisia* species. *Scientific Reports*. 2022; 12: 7234.
238. Sharma R, Gandhi, GS. Pre-cancerous (DNA and chromosomal) lesions in professional sports, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2012; 8: 578-585.
239. Sherin L, Sohail A, Shujaat S. Time-dependent AI-Modeling of the anticancer efficacy of synthesized gallic acid analogues. *Computational Biology and Chemistry*. 2019; 79: 137-146.

240. Shin IS, Seo CS, Ha HK, Lee MY, Huang DS, Huh JI, Shin HK. Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 133: 696-703.
241. Siama Z, Zosang-Zuali M, Vanlalruati A, Jagetia GC, Pau KS, Kumar N. Chronic low dose exposure of hospital workers to ionizing radiation leads to increased micronuclei frequency and reduced antioxidants in their peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*. 2019; 95: 697-709.
242. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999; 299: 152-178.
243. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 1534.
244. Stanković M, Ćurčić M, Žižić J, Topuzović M, Solujić S, Marković, S. Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12: 4190-4205.
245. Stevanović ZD, Petrović MM, Ačić S, 2014. Ethnobotanical knowledge and traditional use of plants in Serbia in relation to sustainable rural development. Ch.12. In: Pieroni, A., Quave, C.L., editors, *Ethnobotany and Biocultural Diversities in the Balkans. Perspectives on Sustainable Rural Development and Reconciliation* Publisher. Springer Science Business Media, New York, pp. 229–252.
246. Stevanović V. Biodiversity estimation – from interpretation to conservation - example of endemic vascular flora of the Balkans. In: Andjelkov M, editor. *Biodiversity at the onset of the new millennium. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts*. 2005; 111: 53-73.
247. Stojanović G, Palić R, Mitrović J. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lobelii* All. *Journal of Essential Oil Research*. 2000; 12: 621-624.
248. Strzelecka M, Bzowska M, Koziel J, Szuba B, Dubiel O, Rivera Nunez D, Heinrich M, Bereta J. Anti-inflammatory effects of extracts from some traditional Mediterranean diet plants. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2005; 56: 139-156.
249. Sudan S, Rupasinghe V. Quercetin-3-O-glucoside induces human DNA topoisomerase II inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Research*. 2014; 34: 1691-1700.
250. Sytar O, Hemmerich I, Zivcak M, Rauh C, Brestic M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016; 407-443.
251. Szopa A, Pajor J, Klin P, Rzepiela A, Elansary HO, Al-Mana FA, Mattar MA, Ekiert H. *Artemisia absinthium* L.— importance in the history of medicine, the latest advances in phytochemistry and therapeutical, cosmetological and culinary uses. *Plants*. 2020; 9: 1063.
252. Šošić G, Varjačić M. Uticaj fizičke aktivnosti na stepen hromozonskih aberacija. *Fakultet za sport i turizam, Novi Sad*. 2015; TIMS Acta 9: 49-61.
253. Taner G, Vardar DÖ, Aydin S, Aytaç Z, Başaran A, Başaran N. Use of *in vitro* assays to assess the potential cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of vanillic and cinnamic acid. *Drug and chemical toxicology*. 2017; 40: 183-190.
254. Terra DA, Amorim LdF, Catanho MTJdA, Fonseca AdSd, Santos-Filho SD, Brandão-Neto J, Medeiros AdC, Bernardo-Filho M. Effect of an extract of *Artemisia vulgaris*

- L. (Mugwort) on the *in vitro* labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007; 50: 123-128.
255. Tiwari V, Wilson DM. DNA damage and associated DNA repair defects in disease and premature aging. *The American Journal of Human Genetics*. 2019; 105: 237-257.
256. Todorova M, Trendafilova A, Danova K, Simmons L, Wolfram E, Meier B, Riedl R, Evstatieva L. Highly oxygenated sesquiterpenes in *Artemisia alba* Turra. *Phytochemistry*. 2015; 110: 140-149.
257. Trendafilova A, Todorova M, Genova V, Peter S, Wolfram E, Danova K, Evstatieva L. Phenolic profile of *Artemisia alba* Turra. *Chemistry & Biodiversity*. 2018; 15: e1800109.
258. Trendafilova A, Moujir LM, Sousa PMC, Seca AML. Research advances on health effects of edible *Artemisia* species and some sesquiterpene lactones constituents. *Foods*. 2021; 10: 65.
259. Trifan A, Czerwinska ME, Mardari C, Zengin G, Sinan KI, Korona-Glowniak I, Skalicka-Wozniak K, Luca SV. Exploring the *Artemisia* genus: An insight into the phytochemical and multi-biological potential of *A. campestris* subsp. *lednicensis* (Spreng.) Greuter & Raab-Straube. *Plants*. 2022; 11: 2874.
260. Villota H, Moreno-Ceballos M, Santa-González GA, Uribe D, Castañeda ICH, Preciado LM, Pedroza-Díaz J. Biological impact of phenolic compounds from coffee on colorectal cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021; 14: 761.
261. Vital N, Antunes S, Louro H, Vaz F, Simões S, Penque D, João Silva M. Environmental tobacco smoke in occupational settings: effect and susceptibility biomarkers in workers from Lisbon restaurants and bars. *Frontiers and Public Health*. 2021; 9: 674142.
262. Verschaeve L. Genotoxicity and antigenotoxicity studies of traditional medicinal plants: how informative and accurate are the results?. *Natural product communications*. 2015; 10: 1489-1493.
263. Voronin DV, Kozlova AA, Verkhovskii RA, Ermakov AV, Makarkin MA, Inozemtseva OA, Bratashov DN. Detection of rare objects by flow cytometry: imaging, cell sorting, and deep learning approaches. *International Journal of Molecular Science*. 2020; 21: 2323.
264. Wagner KH, Schwingshackl L, Draxlera A, Franzke B. Impact of dietary and lifestyle interventions in elderly or people diagnosed with diabetes, metabolic disorders, cardiovascular disease, cancer and micronutrient deficiency on micronuclei frequency – A systematic review and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2020; 787: 108367.
265. Wahle KW, Brown I, Rotondo D, Heys SD. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010; 698: 36-51.
266. Wang SR, Yang W, Fan Y, Dehaen W, Li Y, Li H, Wang W, Zheng Q, Huai Q. Design and synthesis of the novel oleanolic acid-cinnamic acid ester derivatives and glycyrrhetic acid-cinnamic acid ester derivatives with cytotoxic properties. *Bioorganic Chemistry*. 2019; 88: 1-15.
267. Weston LA, Barney JN, Ditommaso A. A review of the biology and ecology of three invasive perennials in New York State: Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*), mugwort (*Artemisia vulgaris*) and pale swallow-wort (*Vincetoxicum rossicum*). *Plant Soil*. 2005; 277: 53-69.
268. Who, (2019). World Health Organization Global Report on Traditional and Complementary Medicine.

269. Włodarczyk M, Jabłonowska-lietz B, Olejarz W, Nowicka G. Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients*. 2018; 10: 578.
270. Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific Basis, 3rd ed.; Medpharm: Marburg, Germany, 2004.
271. Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis*. 2007; 22: 195-200.
272. Wong MCS, Huang J, Lok V, Wang J, Fung F, Ding H, Zheng ZJ. Differences in incidence and mortality trends of colorectal cancer worldwide based on sex, age, and anatomic location. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2020; 19: 955-966.
273. World Health Organisation. World Health Statistics 2020: Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals; World Health Organisation: Geneva, Switzerland, 2020.
274. Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X, He K. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*. 2014; 92: 133-47.
275. Yılmaz S, Ünal F, Aksoy H, Yüzbaşıoğlu D, Çelik M. Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on *Allium* chromosomes. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2008; 17: 1029-1037.
276. Yılmaz S, Ünal F, Yüzbaşıoğlu D. The *in vitro* genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*. 2009; 60: 55-61.
277. Yılmaz S, Ünal F, Yüzbaşıoğlu D, Çelik M. DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives *in vitro*. *Toxicology and Industrial Health*. 2014; 30: 926-937.
278. Yousef Alshibly NM. Effect of *Artemisia absinthium* L. on genotoxicity on mice bone marrow cells. *World Applied Sciences Journal*. 2014; 30: 770-777.
279. Yun YW, Kim SH, Kim SY, You JR, Cho EY, Hun JH, Yoon JH, Kwon E, Ahn JH, Jang JJ, Che JH, Kang BC. A comprehensive study on *in vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of *Artemisia capillaris*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017; 88: 87-95.
280. Zattoni IF, Huergo LF, Gerhardt ECM, Nardin JM, dos Santos AMF, Rego FGM, Picheth G, Moure VR, Valdameri G. Multiplexed flow cytometric approach for detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, IgM and IgA using beads covalently coupled to the nucleocapsid protein. *Letters in Applied Microbiology*, 2022; 74: 863-872.
281. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005; 28: 227-236.
282. Zengin N, Yüzbaşıoğlu D, Unal F, Yılmaz S, Aksoy H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 763-769.
283. Zhang Q, Lin L, Ye W. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018; 13: 20.
284. Zhang Z, Chen S, Mei H, Xuan J, Guo X, Couch L, Dobrovolsky VN, Guo L, Mei N, 2015. *Ginkgo biloba* leaf extract induces DNA damage by inhibiting topoisomerase II activity in human hepatic cells. *Scientific Reports*, 2015: 5: 14633.
285. Živković J, Ilić M, Šavikin K, Zdunić, G, Ilić A, Stojković D. Traditional use of medicinal plants in south-eastern Serbia (Pčinja District): ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11: 1020.



8. Прилози

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

AlCl ₃	Алуминијум-хлорид
БН	Бинуклеусна ћелија
ЦБМН	Цитокинезис-блок микронуклеус тест
СI	Комбиновани индекс
DMEM	Дулбеков модификовани игл медијум (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
DMSO	Диметил-сулфоксид
EDTA	Етилендиаминтетрасирћетна киселина
FBS	Фетални говеђи серум (Fetal Bovine Serum)
FITC	Флуоресцеин-изотиоцијанат
HPLC	Течна хроматографија високих перформанси (High-performance liquid chromatography)
IC ₅₀	Концентрација једињења која је неопходна за 50% инхибиције <i>in vitro</i>
LOD	Граница детекције (Limit of Detection)
LOQ	Граница квантификације (Limit of Quantification)
ММЦ	Митомицин Ц
МН	Микронуклеус
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид
NaHCO ₃	Натријум-хидрогенкарбонат
НДИ	Нуклеусни деобни индекс
PDLs	Мезенхималне матичне ћелије периодонцијума (Periodontal ligament stem cells)
PBS	Фосфатни пуфер (Phosphate-buffered Saline)
ROS	Реактивне врсте кисеоника (Reactive Oxygen Species)
SCE	Размена сестринских хроматида (Sister Chromatid Exchange)
SPSS	Статистички програм за обраду података (Statistical Package for Social Sciences)
($\bar{X} \pm SE$)	Средња вредност \pm стандардна грешка
($\bar{X} \pm SD$)	Средња вредност \pm стандардна девијација
7-AAD	7-амино-актиномицин D

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1.	Распрострањење врсте <i>Artemisia vulgaris</i> L	3
Слика 2.	Хабитус биљке <i>Artemisia vulgaris</i> L	4
Слика 3.	Распрострањење врсте <i>Artemisia alba</i> Turra	5
Слика 4.	Хабитус биљке <i>Artemisia alba</i> Turra	5
Слика 5.	Класификација фенолних једињења	7
Слика 6.	Деривати фенолних киселина: а) хидроксибензојеве киселине; б) хидроксициметне киселине	8
Слика 7.	Класификација флавоноида	10
Слика 8.	Редукција тетразолијумове соли у формазама	11
Слика 9.	Разлика у морфолошким променама ћелије у апоптози и некрози	13
Слика 10.	Бинуклеусна (БН) ћелија: а) са два микронуклеуса; б) са три микронуклеуса	17
Слика 11.	Шематски приказ настанка микронуклеуса	18
Слика 12.	Поступак припремања екстракта испитиваних биљних врста.....	26
Слика 13.	Морфолошки изглед SW-480 ћелијске линије колоректалног карцинома	27
Слика 14.	Морфолошки изглед мезенхималних матичних ћелија периодонцијума	28
Слика 15.	Шематски приказ извођења МТТ теста	32
Слика 16.	Процедура цитокинезис блок микронуклеус теста.....	35
Слика 17.	Приказ: а) ћелија са једним једром, б) ћелија са два једра, в) ћелија са три једра и г) ћелија са четири једра	35
Слика 18.	НPLC-PDA хроматограми фенолних киселина и флавоноида присутних у различитим екстрактима <i>A. vulgaris</i>	41
Слика 19.	НPLC-PDA хроматограми фенолних киселина и флавоноида присутних у различитим екстрактима <i>A. alba</i>	43
Слика 20.	Фотографије бинуклеусних ћелија пре и након третмана лимфоцита различитим концентрацијама метанолског екстракта <i>A. vulgaris</i> : а) негативна контрола – нетретиране ћелије; б) 10 µg/mL; в) 100 µg/mL; г) 250 µg/mL.....	60
Слика 21.	Фотографије бинуклеусних ћелија након комбинованог третмана лимфоцита различитим концентрацијама воденог екстракта <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL): а) позитивна контрола – ММЦ; б) 10 µg/mL; в) 100 µg/mL; г) 250 µg/mL.....	65
Слика 22.	Фотографије бинуклеусних ћелија пре и након третмана лимфоцита различитим концентрацијама метанолског екстракта <i>A. alba</i> : а) негативна контрола – нетретиране ћелије; б) 10 µg/mL; в) 50 µg/mL; г) 250 µg/mL.....	70
Слика 23.	Фотографије бинуклеусних ћелија након комбинованог третмана лимфоцита различитим концентрацијама воденог екстракта <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL): а) позитивна контрола – ММЦ; б) 10 µg/mL; в) 100 µg/mL; г) 250 µg/mL.....	75

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1.	Класификација фенолних киселина	9
Табела 2.	Количина укупних фенолних једињења и флавоноида у метанолском, ацетонском и воденом екстракту <i>A. vulgaris</i>	38
Табела 3.	Количина укупних фенолних једињења и флавоноида у метанолском, ацетонском и воденом екстракту <i>A. alba</i>	38
Табела 4.	Једначине калибрационих крива за фенолна једињења и лимити детекције и квантификације	39
Табела 5.	Фенолни састав метанолског, ацетонског и воденог екстракта <i>A. vulgaris</i>	40
Табела 6.	Фенолни састав метанолског, ацетонског и воденог екстракта <i>A. alba</i>	42
Табела 7.	Цитотоксични ефекат анализираних екстраката <i>A. vulgaris</i> у појединачним и комбинованим третманима са митомицином Ц (ММЦ) на PDLS и SW-480 ћелијским линијама изражени као IC ₅₀ вредности.....	44
Табела 8.	Интеракције између анализираних екстраката <i>A. vulgaris</i> и митомицина Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)	48
Табела 9.	Цитотоксични ефекат анализираних екстраката <i>A. alba</i> у појединачним и комбинованим третманима са митомицином Ц (ММЦ) на PDLS и SW-480 ћелијским линијама, изражени као IC ₅₀ вредности.....	49
Табела 10.	Интеракције између анализираних екстраката <i>A. alba</i> и митомицина Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL).....	53
Табела 11.	Процент вијабилних, апоптотских и некротских SW-480 ћелија мерених методом проточне цитометрије (Annexin V/7-AAD), након појединачног и комбинованог третмана екстрактом <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL).....	55
Табела 12.	Процент вијабилних, апоптотских и некротских SW-480 ћелија мерених методом проточне цитометрије (Annexin V/7-AAD), након појединачног и комбинованог третмана екстрактом <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL)	56
Табела 13.	Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима <i>A. vulgaris in vitro</i>	58
Табела 14.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима <i>A. vulgaris in vitro</i>	59
Табела 15.	Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) <i>in vitro</i>	62
Табела 16.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) <i>in vitro</i>	64

Табела 17.	Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактама <i>A. alba in vitro</i>	68
Табела 18.	Просечне фреквенце (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактама <i>A. alba in vitro</i>	70
Табела 19.	Фреквенце микронуклеуса (МН) и нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактама <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) <i>in vitro</i>	73
Табела 20.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) и просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактама <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) <i>in vitro</i>	75
Табела 21.	Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине.....	78
Табела 22.	Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине.....	81
Табела 23.	Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида.....	83
Табела 24.	Појединачне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида.....	86

ЛИСТА ГРАФИКОНА

Графикони 1-3.	Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> на SW-480 ћелијској линији: 1) метанолски екстракт, 2) ацетонски екстракт и 3) водени екстракт.....	45
Графикони 4-6.	Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> на PDLS ћелијској линији: 4) метанолски екстракт, 5) ацетонски екстракт и 6) водени екстракт.....	45
Графикони 7-9.	Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на SW-480 ћелијској линији: 7) метанолски екстракт, 8) ацетонски екстракт и 9) водени екстракт	46
Графикони 10-12.	Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на PDLS ћелијској линији: 10) метанолски екстракт, 11) ацетонски екстракт и 12) водени екстракт.....	47
Графикони 13-15.	Дозно-зависне криве цитотоксичног ефекта након третмана екстрактима <i>A. alba</i> на SW-480 ћелијској линији: 13) метанолски екстракт, 14) ацетонски екстракт и 15) водени екстракт.....	50
Графикони 16-18.	Дозно-зависне криве цитотоксичног ефекта након третмана екстрактима <i>A. alba</i> на PDLS ћелијској линији: 16) метанолски екстракт, 17) ацетонски екстракт и 18) водени екстракт.....	50
Графикони 19-21.	Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на SW-480 ћелијској линији: 19) метанолски екстракт, 20) ацетонски екстракт и 21) водени екстракт	51
Графикони 22-24.	Дозно-зависне криве цитотоксичних ефеката након комбинованог третмана екстрактима <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) на PDLS ћелијској линији: 22) метанолски екстракт, 23) ацетонски екстракт и 24) водени екстракт.....	52
Графикон 25.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i>	60
Графикон 26.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i>	61
Графикон 27.	Ефекат метанолског, ацетонског и воденог екстракта <i>A. vulgaris</i> на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу.....	65
Графикон 28.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима <i>A. vulgaris</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL).....	66

Графикон 29.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима <i>A. alba</i>	71
Графикон 30.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након третмана екстрактима <i>A. alba</i>	71
Графикон 31.	Ефекат метанолског, ацетонског и воденог екстракта <i>A. alba</i> на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу.....	76
Графикон 32.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у лимфоцитима периферне крви здравих донора након комбинованог третмана екстрактима <i>A. alba</i> и митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL).....	76
Графикон 33.	Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине: 1) негативна контрола – нетретиране ћелије; 2) 50 µg/mL; 3) 100 µg/mL; 4) 200 µg/mL.....	77
Графикон 34.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине.....	78
Графикон 35.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине.....	79
Графикон 36.	Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине: 1)) позитивна контрола – ММЦ; 2) 50 µg/mL + ММЦ; 3) 100 µg/mL + ММЦ; 4) 200 µg/mL + ММЦ	80
Графикон 37.	Ефекат 3,5-дихидроксибензојеве киселине на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу.....	80
Графикон 38.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама 3,5-дихидроксибензојеве киселине.....	81
Графикон 39.	Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3- <i>O</i> -глукопиранозида: 1) негативна контрола – нетретиране ћелије; 2) 3 µg/mL; 3) 11 µg/mL; 4) 22 µg/mL.....	82
Графикон 40.	Просечне фреквенце микронуклеуса (МН) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3- <i>O</i> -глукопиранозида.....	83
Графикон 41.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним различитим концентрацијама кверцетин-3- <i>O</i> -глукопиранозида.....	84

Графикон 42.	Дистрибуција бинуклеусних (БН) ћелија у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида: 1) позитивна контрола – ММЦ; 2) 3 µg/mL + ММЦ; 3) 11 µg/mL + ММЦ; 4) 22 µg/mL + ММЦ.....	85
Графикон 43.	Ефекат кверцетин-3-О-глукопиранозида на митомицином Ц (ММЦ)-индуковану микронуклеусну фреквенцу.....	85
Графикон 44.	Просечне вредности нуклеусног деобног индекса (НДИ) у култивисаним хуманим лимфоцитима третираним митомицином Ц (ММЦ, 0,5 µg/mL) и различитим концентрацијама кверцетин-3-О-глукопиранозида.....	86



In vitro study of genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra

Marina Radović Jakovljević^a, Darko Grujičić^a, Jovana Tubić Vukajlović^a, Aleksandra Marković^a, Milena Milutinović^a, Milan Stanković^a, Nenad Vuković^b, Milena Vukić^b, Olivera Milošević-Djordjević^{a,c,*}

^a Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia

^c Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34 000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article History:

Received 3 December 2019

Revised 5 April 2020

Accepted 9 April 2020

Available online 24 May 2020

Edited by AO Aremu

Keywords:

Artemisia vulgaris

Artemisia alba

Phenols

Flavonoids

Cytotoxicity

Genotoxicity

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate genotoxic and cytotoxic activities of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra methanol extracts concerning their chemical composition, separately and in co-treatment with a known mutagen (mitomycin C, MMC). For these evaluations, the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay as the method for measuring MN frequency in human peripheral blood lymphocytes (PBLs) and MTT assay as the proliferation test in SW-480 human colon cancer cells and human periodontal ligament stem cells (PDLSCs) as normal control, were performed. The total phenol and flavonoid contents were determined using the spectrophotometric method, and identification and quantification of polyphenols were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA). Cytokinesis-block micronucleus assay showed that both extracts significantly increased micronucleus (MN) frequency in the PBLs treated with all tested concentrations (10, 50, 100 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), except the lowest concentration (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of *A. vulgaris*. All the concentrations of *A. alba* significantly influence the nuclear division index (NDI). In treatment against MMC, the extracts dose-dependently reduced MN frequencies and NDI values in comparison with the positive control. *A. alba* extract exhibits significant cytotoxic activity in SW-480 cells, while *A. vulgaris* induces cytotoxic activity only in co-treatment with MMC after long-term exposure. Both extracts did not significantly affect the viability of the PDLSCs. The phytochemical analysis showed that the extracts contained large amounts of total phenols and flavonoids. The most abundant polyphenolic compounds were chlorogenic acid and quercetin-3-O-glucopyranoside, while 2,5-dihydroxybenzoic acid present in higher amount and detected only in *A. alba* extract. High concentrations of certain polyphenolic compounds detected in *A. vulgaris* and *A. alba* extracts can be a significant factor for obtaining genotoxic, cytotoxic and protective activities.

© 2020 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Artemisia* L. (Asteraceae) is very popular in traditional medicines including more than 500 species distributed in Europe, Asia and North America (Oberprieler, 2001). A number of studies have confirmed that *Artemisia* species exhibits different biological activities including antimalarial (Kane et al., 2019), anticancer (Gordanian et al., 2014), antibacterial (Behbahani et al., 2017), antifungal

(Siamak et al., 2013), anti-inflammatory (Abdul et al., 2018), antiseptic, antispasmodic (Bora and Shama, 2011; Nigam et al., 2019) and antioxidant (Behbahani et al., 2017) activities. Previous pharmacological investigations of *Artemisia* species pointed out the significant quantitative and qualitative composition of biologically active compounds such as flavonoids, coumarins, monoterpenes, lactones, sterols and sesquiterpene lactones that exhibit a wide range of biological effects and contribute to their practical application (Ivanescu et al., 2010; Trendafilova et al., 2018).

In the assessment of genome damage the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in cultured human peripheral blood lymphocytes (PBLs) is often used. Its great advantage is reflected in speed and simplicity because of offers tools for a damage assessment at the level of function and mitotic spindle integrity (Mateuca et al., 2006). This assay can be applied to the determination of cell cytotoxicity and cell death (both apoptosis and necrosis) (Rodrigues et al., 2018).

* Corresponding author at: Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia.

E-mail addresses: marina.jakovljevic@pmf.kg.ac.rs (M.R. Jakovljević), darko@kg.ac.rs (D. Grujičić), jovana.tubic@pmf.kg.ac.rs (J.T. Vukajlović), aleksandra.markovic@pmf.kg.ac.rs (A. Marković), milena.milutinovic@pmf.kg.ac.rs (M. Milutinović), mstankovic@kg.ac.rs (M. Stanković), nvukovic@kg.ac.rs (N. Vuković), milena.vukic@kg.ac.rs (M. Vukić), olivera.djordjevic@pmf.kg.ac.rs (O. Milošević-Djordjević).

RESEARCH ARTICLE



Comparative study of the genotoxic activity of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra extracts *in vitro*

Marina Radović Jakovljević^a, Milan Stanković^a, Nenad Vuković^b, Milena Vukić^b, Darko Grujičić^a and Olivera Milošević-Djordjević^{a,c}

^aDepartment of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^cDepartment of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

ABSTRACT

In this study, the genotoxic activity of acetone and aqueous extracts of two species of genus *Artemisia* (*Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra), and possible role of their polyphenolic composition in the observed activities were investigated. Polyphenolic contents were evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA), while the genotoxic activity was tested using cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay on human peripheral blood lymphocytes (PBLs) *in vitro*. HPLC-PDA showed that both *A. alba* extracts were richer in polyphenolic contents than *A. vulgaris* extracts. The acetone *A. alba* extract was the richest of polyphenolic content where we detected six phenolic acids and two flavonoids. CBMN assay showed that aqueous extract of *A. vulgaris* significantly increased micronucleus (MN) frequency in the PBLs treated with all tested concentrations (10, 50, 100, and 250 µg/mL), while *A. alba* did not significantly affect the mean MN frequency. Further, both acetone extracts were genotoxic in all tested concentrations, except the lowest tested (10 µg/mL) of *A. alba*. All tested extracts affected the nuclear division index (NDI) except the aqueous *A. alba* extract ($p < 0.05$). Based on our results, we can conclude that both acetone and aqueous *A. vulgaris* extracts and *A. alba* acetone extract were genotoxic in PBLs *in vitro*. *A. alba* aqueous extract was not genotoxic and cytotoxic in tested concentrations. We suggest that the aqueous extract of *A. alba* can be used in treatment, which has been confirmed by traditional medicine, but with a high dose of caution and not in high concentrations.

ARTICLE HISTORY

Received 2 March 2021
Revised 5 April 2021
Accepted 13 May 2021

KEYWORDS

Artemisia alba Turra;
Artemisia vulgaris L.; CBMN
assay; genotoxicity; HPLC

Introduction

The genus *Artemisia* belongs to the Asteraceae family and comprises over 500 herbs or small shrubs and half shrubs distributed all over the world (Bora and Sharma 2011, Abad *et al.* 2012, Riggins and Seigler 2012). These plants have been used for many years in the management of different ailments (Behbahani *et al.* 2017, Abdul *et al.* 2018, Kane *et al.* 2019, Ekiert *et al.* 2020, Radović Jakovljević *et al.* 2020). *Artemisia* plants have attracted attention over the past few years especially after the 2015 year, when the Nobel Prize was awarded for the discovery of artemisinin which shows effect in combating malaria. Recent scientific studies have further increased interest after *Artemisia* genus has shown significant activity against SARS coronavirus, so it is considering the activity of plants in COVID-19 disease (Haq *et al.* 2020). These species contain different classes of biologically active compounds such as flavonoids, coumarins, monoterpenes, lactones, sterols, and sesquiterpene lactones (Ivanescu *et al.* 2010, Trendafilova *et al.* 2018). Although numerous studies have been confirmed the beneficial properties of these plants, about their potential genotoxic risk for humans,

there are few available data. There are only a few studies that investigated their genotoxic activity (Abderrahman and Shbailat 2014, Harutyunyan *et al.* 2019, Radović Jakovljević *et al.* 2020).

Due to their long-term application, there is a general perception that herbal preparations are safe despite a lack of proof to support their therapeutic efficacy and toxicological effects on the potential risk to human health. Namely, numerous studies indicate that, although frequently used in folk medicine, some plants can potentially be genotoxic (Melo-Reis *et al.* 2011, Regner *et al.* 2011, Shin *et al.* 2011, Milošević-Djordjević *et al.* 2018, Radović Jakovljević *et al.* 2020). Medicinal plants may include components that can cause severe adverse effects, including genotoxic activities, thus raising concerns about their possible dangers to human health (Rietjens *et al.* 2005, Rody *et al.* 2018). Genotoxic compounds present in plants can interact with the DNA molecule leading to genetic damage. Consequently, the inclusion of a genotoxic approach in assessing the potential risks of the use of plants and herbal preparations is very important. One of the most commonly used assay for the evaluation of genotoxicity potential is cytokinesis block micronucleus (CBMN)

RESEARCH ARTICLE



Artemisia vulgaris L., *Artemisia alba* Turra and their constituents reduce mitomycin C-induced genomic instability in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*

Marina Radović Jakovljević^a, Darko Grujičić^a, Milan Stanković^a and Olivera Milošević-Djordjević^{a,b}

^aFaculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^bFaculty of Medical Sciences, Department of Genetics, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of aqueous and acetone extracts from *Artemisia vulgaris* L. (AV) and *Artemisia alba* Turra (AA), and two major polyphenols compounds (3,5-dihydroxybenzoic acid and quercetin-3-O-glucopyranoside) presented in both extracts of the plants against mitomycin C (MMC)-induced genomic instability. Genomic instability was measured using cytokinesis block micronucleus (MN) assay in human peripheral blood lymphocytes (PBLs) *in vitro* by analyzing two biomarkers – MN and nuclear division index (NDI). Extracts were tested in a concentration-dependent manner (10–250 µg/mL), while 3,5-dihydroxybenzoic acid and quercetin-3-O-glucopyranoside were tested in three different concentrations, in combination with 0.5 µg/mL of MMC. Aqueous and acetone extracts obtained from both plants significantly reduced MMC-induced MN frequency in PBLs, compared to positive control cells ($p < 0.05$). Extracts from AV did not affect NDI, whereas the concentrations of 10–100 µg/mL of aqueous and acetone AA extracts significantly elevated MMC-decreased NDI values in comparison to positive control cells ($p < 0.05$). Combined treatment of 3,5-dihydroxybenzoic acid and MMC showed a significant reduction of MMC-induced MN frequency, while quercetin-3-O-glucopyranoside increased MN frequency compared to positive control cells ($p < 0.05$). Both compounds decreased NDI values but only at the highest tested concentration of quercetin-3-O-glucopyranoside it was of greater significance. In conclusion, all extracts from AV and AA and 3,5-dihydroxybenzoic acid showed protective effect, whereby aqueous AA demonstrated the highest protective effect on MMC-induced genomic instability, while quercetin-3-O-glucopyranoside showed co-mutagen effect.

ARTICLE HISTORY

Received 8 June 2022
Revised 23 November 2022
Accepted 27 November 2022

KEYWORDS

Artemisia vulgaris L.;
Artemisia alba Turra;
Micronuclei; MMC; CBMN
assay; genotoxicity

Introduction

Artemisia vulgaris L. (AV) and *Artemisia alba* Turra (AA) belong to the genus *Artemisia*, which consists of more than 500 diverse species originally found in the native temperate zones of Europe, Asia, and North America (Pandey and Singh 2017). *Artemisia* species are well-known plants whose different parts have various applications for the treatment of diseases in folk medicine. AV, commonly known as Mugwort, is a perennial aromatic, weed which in folk medicine has been used in the treatment against cancer, various nervous system and gastric disorders, inflammatory and gynecological diseases (Lian *et al.* 2018, Ekiert *et al.* 2020, Taleghani *et al.* 2020). Due to the presence of a large number of bioactive compounds such as flavonoids, sesquiterpenoids, essential oils, tannins, phenols, and saponins (Melguizo-Melguizo *et al.* 2014, Radović Jakovljević *et al.* 2020, 2022), remarkable biological activity of AV was observed in previous studies (Nigam *et al.* 2019, Pandey *et al.* 2017, 2021). AA (*syn. A. camphorata* Vill., *A. lobelii* All.) is a fragrant shrub distributed in the southern part of Europe. Decoction prepared from aerial parts of the plant have been traditionally used as tonics and

digestives (Danova *et al.* 2020). AA has been the subject of several phytochemical studies (Todorova *et al.* 2015, Peron *et al.* 2017, Trendafilova *et al.* 2018, Ickovski *et al.* 2020, Radović Jakovljević *et al.* 2019, 2020, 2022), but reports dealing with its biological activities are quite rare (Danova *et al.* 2020, Radović Jakovljević *et al.* 2019, 2020, 2022). Strzelecka *et al.* (2005) reported that ethanolic extract of the plant showed anti-inflammatory activity in murine brain microvascular endothelial cells. AA extracts (methanol and ethyl acetate) pronounced a significant anticancer activity against SW-480 colon cancer cells (Radović Jakovljević *et al.* 2019, 2020). Acetone plant extract showed genotoxic and cytotoxic activities, while aqueous extract did not induce chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes (PBLs) *in vitro* (Radović Jakovljević *et al.* 2022).

It is known that phenolic compounds exert a wide range of distinct biological activities (Dias *et al.* 2021, Rahman *et al.* 2021, Zhang *et al.* 2022). Therefore, the investigation of the polyphenolic composition of plants as well as identification of compounds with possible therapeutic potential is the subject of numerous studies (Dziedzinski *et al.* 2020, Zhang *et al.* 2022). In our recently published study, using HPLC-PDA



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Integrative Medicine

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/european-journal-of-integrative-medicine

Research paper

Cytotoxic and apoptotic activity of acetone and aqueous *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra extracts on colorectal cancer cellsMarina Radović Jakovljević^a, Milena Milutinović^a, Predrag Djurdjević^{b,c}, Željko Todorović^{b,c}, Milan Stanković^a, Olivera Milošević-Djordjević^{a,d,*}^a Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia^b Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia^c Clinical Center Kragujevac, Hematology Clinic, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia^d Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Artemisia vulgaris L.
Artemisia alba Turra
 MTT assay
 Cytotoxicity
 Flow cytometry
 Apoptosis

ABSTRACT

Introduction: The cytotoxic and apoptotic activities of two extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra plants individually and in combination with mitomycin C (MMC), were evaluated.

Methods: Total phenolic and total flavonoid contents were determined using spectrophotometric methods. Cytotoxicity of the treatments was investigated using MTT assay, and apoptosis was detected by flow cytometry in SW-480 colon cancer cells and human periodontal ligament stem cells (PDLSCs).

Results: *A. vulgaris* extracts were richer sources of total flavonoids and phenolic acids, than *A. alba*. Acetone extract of *A. vulgaris* exhibited a weak cytotoxic activity in SW-480 cells, while a remarkable effect was detected after cells exposure to *A. alba* extract (IC₅₀ value was 240.12 ± 25.49 for *A. vulgaris* vs. 3.89 ± 1.47 µg/mL for *A. alba*). Both aqueous extracts did not affect SW-480 cells viability. In MMC combination treatment, *A. alba* acetone extract exhibited significant activity in SW-480 cells (IC₅₀ values were 4.94 ± 1.93 µg/mL for 24 h and <1 µg/mL for 72 h). Both extracts of *A. vulgaris* and aqueous extract of *A. alba* showed cytotoxic activity only after long-term exposure (IC₅₀ < 1). The cytotoxic activity in PBLSCs was not detected. The tested extracts concentrations (10 and 100 µg/mL) induced apoptosis in SW-480 cells. Higher levels of apoptotic cells were detected in combined treatments of extracts with MMC compared to individual extract treatments.

Conclusion: Investigated *Artemisia* species could be used as a potential source of anticancer agents for colon cancer therapy.

1. Introduction

Plants have always been used as remedies in folk traditions and many authors have suggested that the use of plants and their products may have protective effects and prevent different ailments [1–5]. Among the numerous plants used in medicine, increasing attention has focused on the use of the genus *Artemisia* due to its curative value in preventing and reducing the risk of various diseases. *Artemisia* spp. are well-known plants that have been reported to have different properties such as antimalarial [6], anticancer [7,8], antibacterial [9], antifungal [10],

anti-inflammatory [10], antiseptic, antispasmodic [11] and antioxidant [12]. Based on data available from the literature, we selected two *Artemisia* plants (*A. vulgaris* L. and *A. alba* Turra) as having potential medicinal value.

A. vulgaris L., commonly known as Mugwort, is widely distributed in the natural habitats of Europe, Asia, North and South America, and Africa [13]. It is traditionally used in folk medicine for alleviating hypertension and treating gastrointestinal discomfort, gynecological diseases and disorders of the nervous system (insomnia, epilepsy, depression, and excessive stress exposure) [5,14]. The plant contains

Abbreviations: MCF7, breast cancer cell line; N2a, neuroblastoma cell line; MMC, mitomycin C; SW-480, colon cancer cells; PDLSCs, human periodontal ligament derived stem cells; DMSO, dimethyl sulfoxide; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; AlCl₃, aluminium chloride; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; PBS, Fetal Bovine Serum; CI, combination index; RUE, rutin equivalent; GA, gallic acid; SD, standard deviation; ROS, reactive oxygen species; RKO, colon cancer; PC3, prostate cancer; T47, human breast cancer cells.

* Corresponding author at: Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia.

E-mail address: olivera.djordjevic@pmf.kg.ac.rs (O. Milošević-Djordjević).

<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2022.102204>

Received 8 September 2022; Received in revised form 7 November 2022; Accepted 8 November 2022

Available online 9 November 2022

1876-3820/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.



Марина Радовић Јаковљевић је рођена 11.03.1988. године у Аранђеловцу. Основну школу и Гимназију „Милош Савковић“ завршила је у Аранђеловцу са одличним успехом. Основне академске студије биологије завршила је 2010. године, док академско звање Мастер биолог стиче 2012. године на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу. Школске 2012/2013. године уписује докторске академске студије Биологије. Бави се научно-истраживачким радом у Лабораторији за генетику Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Од 2013. године, као истраживач-приправник, ангажована је на пројекту Министарства под називом „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“. Од 2016. године је истраживач-сарадник за научну област Биологија у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

Марина Радовић Јаковљевић аутор је и коаутор 25 научне публикација од којих 14 радова има у часописима са SCI листе (3 публикације категорије M22 и 11 публикација категорије M23). Учествовала је на десет међународних и домаћих конференција.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

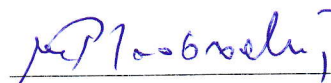
„Испитивање генотоксичних и цитотоксичних ефеката врста *Artemisia vulgaris* и *Artemisia alba* на хумане лимфоците *in vitro* и SW-480 ћелијску линију карцинома колона”

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 22.9.2023. године,



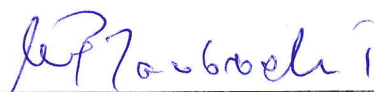
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Испитивање генотоксичних и цитотоксичних ефеката врста *Artemisia vulgaris* и *Artemisia alba* на хумане лимфоците *in vitro* и SW-480 ћелијску линију карцинома колона” истоветне.

У Крагујевцу, 22.9.2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марина Радовић Јаковљевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Испитивање генотоксичних и цитотоксичних ефеката врста *Artemisia vulgaris* и *Artemisia alba* на хумане лимфоците *in vitro* и SW-480 ћелијску линију карцинома колона”

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

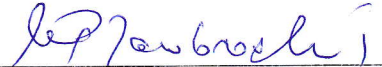
не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

-
- 1) Ауторство
 - 2) Ауторство - делити под истим условима
 - 3) Ауторство - без прерада
 - 4) Ауторство - некомерцијално
 - ⑤ Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
 - 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 22.9.2023. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>