

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Tatjana N. Čebović

**UTICAJ EKSTRAKATA IMELE (*Viscum  
album* L.) SA RAZLIČITIH DOMAĆINA  
NA STVARANJE SLOBODNIH  
RADIKALA KISEONIKA I AKTIVNOST  
ANTIOKSIDANTNIH ENZIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2008

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Tatjana N. Čebović

**EFFECT OF MISTLETOE EXTRACTS  
(*Viscum album* L.) FROM DIFFERENT  
HOSTS ON OXYGEN FREE RADICALS  
PRODUCTION AND ANTIOXIDANT  
ENZYMES ACTIVITIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2008

PA 19543

Uč 33542927  
2008. 12. 12.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Uticaj ekstrakata imele (*Viscum album* L.) sa različitih  
domaćina na stvaranje slobodnih radikala kiseonika i  
aktivnost antioksidantnih enzima

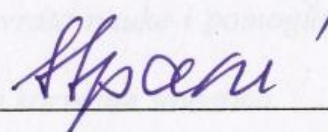
*Doktorska disertacija*

Tatjana N. Čebović

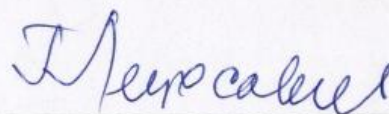
Beograd, 2008

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**

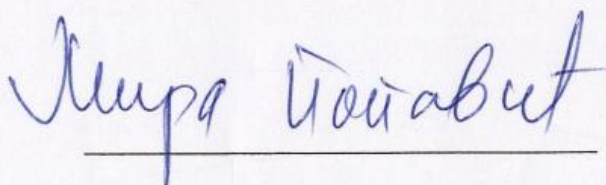
**Komisija za ocenu  
i odbranu doktorske disertacije**



**Prof. dr Slavica Spasić, mentor**  
Farmaceutski fakultet u Beogradu



**Prof. dr Gordana Leposavić**  
Farmaceutski fakultet u Beogradu



**Prof. dr Mira Popović**  
Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu

## **Predgovor**

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Samostalnog odseka za biohemiju, Instituta za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu.*

*Nakon rada na mojoj doktorskoj disertaciji, osećam potrebu da se zahvalim ljudima koji su mi pomagali i podržavali me u toku rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem mentorki, prof. dr Slavici Spasić, koja mi je svojim savetima i razumevanjem pomogla da ovaj rad ugleda svetlost dana.*

*Prof. dr Miri Popović se zahvaljujem što mi je otvorila vrata nauke i pomogla mi da moji prvi naučni koraci dobiju potvrdu u naučnim krugovima.*

*Prof. dr Gordani Lepasavić, zahvaljujem se na strpljenju i korisnim savetima.*

*Veoma ću biti srećna ako sam ovom disertacijom uspela da pokažem da je njihova pomoć bila opravdana.*

Novi Sad, januar 2008. godine

*Tatjana N. Čebović*

## Skraćenice

ALT – alanin transaminaza	
AST – aspartat transaminaza	3
CAT - katalaza	4
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal	5
EAC – Ehrlich-ov ascitni karcinom	5
FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power Assay	5
GSH – redukovani glutation	7
GSHPx – glutation peroksidaza	10
GR – glutation reduktaza	11
LPx – lipidna peroksidacija	13
NALC – N-acetil-L-cistein	16
Px – peroksidaza	17
XOD – ksantin oksidaza	22
2.6. Oksidativno oštećenje osnovnih biomolekula	25
2.6.1. Oksidativno oštećenje lipida – lipidna peroksidacija	26
2.6.2. Oksidativno oštećenje proteina	25
2.6.3. Oksidativno oštećenje DNSK	27
2.7. Molekularni antioksidativne zaštite	28
2.8. Uloga oksidativnog stresa u malignoj transformaciji ćelije	30
3. Cilj istraživanja	35
4. Eksperimentalni dio	36
4.1. Biljni materijal	36
4.2. Priprema biljnih ekstrakata	36
4.3. Fitokemikalno ispitivanje ("screening" test) <i>Vicia cracca</i> L.	36
4.3.1. Određivanje sadržaja karotenoida i niotina	39
4.3.2. Određivanje sadržaja L-askorbinske kiseline (vitamina C)	39
4.3.3. Određivanje ukupnih fenola (po Folin-Ciocalteu)	40
4.3.4. Određivanje ukupnih tanina	41
4.3.5. Određivanje ukupnih flavonoida	42
4.3.6. Određivanje proantocijanidina (kondenzovanih tanina)	43
4.3.7. Određivanje slobodne gvožđe kiseline	44
4.4. <i>In vivo</i> ispitivanje antioksidativnih svojstava <i>Vicia cracca</i> L. u različitim dozama	44
4.4.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije	44
4.4.1.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma u kombinaciji sa rastvorom ugljenatuhlorida	46
4.4.2. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH <sup>•</sup> )	46
4.4.2.1. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH <sup>•</sup> ) u kombinaciji sa rastvorom ugljenatuhlorida	48
4.4.3. Određivanje stepena inhibicije DPPH radikala	48
4.4.4. Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP metodom	49
4.4.5. Određivanje stepena inhibicije stvaranja azot monoksida, NO	50
4.5. <i>In vivo</i> ispitivanje anti/prooksidativnih i prototoksičnih efekata <i>Vicia cracca</i> L. u različitim dozama	51
4.5.1. Eksperimentalne životinje	51
4.5.2. Eksperimentalne metode u <i>in vivo</i> ispitivanju	54

## Sadržaj

	Izvod	1
	Abstract	2
1.	Uvod	3
2.	Karakteristike <i>Viscum album</i> L.	4
2.1.	Biološke karakteristike <i>Viscum album</i> L.	4
2.2.	Fitohemijske karakteristike <i>Viscum album</i> L.	5
2.2.1.	Lektini	5
2.2.2.	Viskotoksini	7
2.2.3.	Flavonoidi	10
2.2.4.	Ostali konstituenti <i>Viscum album</i> L.	11
2.3.	Farmakološka svojstva pojedinih komponenti <i>Viscum album</i> L.	13
2.4.	Farmakološka svojstva ekstrakata <i>Viscum album</i> L.	16
2.5.	Oksidativni stres	17
2.5.1.	Oksidativni stres i NO	22
2.6.	Oksidativna oštećenja osnovnih biomolekula	25
2.6.1.	Oksidativno oštećenje lipida – lipidna peroksidacija	26
2.6.2.	Oksidativno oštećenje proteina	26
2.6.3.	Oksidativno oštećenje DNK	27
2.7.	Mehanizmi antioksidativne zaštite	28
2.8.	Uloga oksidativnog stresa u malignoj transformaciji ćelije	30
3.	Cilj istraživanja	35
4.	Eksperimentalni deo	36
4.1.	Biljni materijal	36
4.2.	Priprema biljnih ekstrakata	36
4.3.	Fitohemijsko ispitivanje ("screening" test) <i>Viscum album</i> L.	36
4.3.1.	Određivanje sadržaja karotenoida i hlorofila	38
4.3.2.	Određivanje sadržaja L-askorbinske kiseline (vitamina C)	39
4.3.3.	Određivanje ukupnih fenola (po Folin-Ciocalteu)	40
4.3.4.	Određivanje ukupnih tanina	41
4.3.5.	Određivanje ukupnih flavonoida	42
4.3.6.	Određivanje proantocijanidina (kondenzovanih tanina)	43
4.3.7.	Određivanje slobodne galne kiseline	44
4.4.	<i>In vitro</i> ispitivanje antioksidantnih svojstava <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina	44
4.4.1.	Merenje intenziteta lipidne peroksidacije	44
4.4.1.1.	Merenje intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida	46
4.4.2.	Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH <sup>•</sup> )	46
4.4.2.1.	Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala (OH <sup>•</sup> ) u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida	48
4.4.3.	Određivanje stepena inhibicije DPPH radikala	48
4.4.4.	Određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP metodom	49
4.4.5.	Određivanje stepena inhibicije stvaranja azot monoksida, NO	50
4.5.	<i>In vivo</i> ispitivanja anti/prooksidantnih i citotoksičnih efekata <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina	51
4.5.1.	Eksperimentalne životinje	51
4.5.2.	Eksperimentalne metode u <i>in vivo</i> ispitivanjima	54

4.6.	Statistička analiza	58
5.	Rezultati	60
5.1.	Fitohemijski sastav <i>Viscum album</i> L. ssp. <i>album</i> sa različitih domaćina	60
5.2.	Kvantitativni sadržaj pojedinih klasa sekundarnih biomolekula u listu <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina	60
5.3.	<i>In vitro</i> antioksidantna svojstva vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina	64
5.3.1.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma	65
5.3.2.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na intenzitet produkcije hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) radikala	67
5.3.3.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na intenzitet inhibicije DPPH $\cdot$ radikala	68
5.3.4.	Ukupna antioksidantna aktivnost vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina merena FRAP metodom	72
5.3.5.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na stepen inhibicije azot monoksida, NO	73
5.4.	Svojstva vodenih ekstrakata <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina u sistemu <i>in vivo</i> oštećenja jetre izazvanih CCl <sub>4</sub> -om	75
5.4.1.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa izazvanog CCl <sub>4</sub> -om	81
5.5.	<i>In vivo</i> citotoksičnost različitih vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. za ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)	85
5.5.1.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na vijabilnost ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)	86
5.5.2.	Uticaj vodenih ekstrakata lista <i>Viscum album</i> L. sa različitih domaćina na antioksidantni status ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)	96
6.	Diskusija	111
7.	Zaključak	135
8.	Literatura	137
9.	Prilog	153



## Izvod

Predmet istraživanja u ovoj disertaciji je bilo ispitivanje *in vitro* i *in vivo* anti/prooksidantnih svojstava ekstrakata *V. album* sa sedam različitih domaćina, *in vivo* ispitivanje uticaja ovih ekstrakata na parametre oksidativnog stresa kod malignih ćelija. Pokazano je da postoje značajne razlike u sadržaju antioksidantnih jedinjenja u listu imele sa sedam različitih domaćina. U daljim eksperimentima je potvrđeno da postoje značajne razlike u *in vitro* antioksidantnim svojstvima ispitivanih ekstrakata imele. Iako je većina ispitivanih ekstrakata pokazala značajna antioksidantna svojstva, ekstraktima imele sa gloga i kleke bi se mogla pripisati prooksidantna svojstva. Ekstrakti *V. album* su ispoljili različit antioksidantni i hepatoprotektivni potencijal kod *in vivo* oksidativnog stresa izazvanog CCl<sub>4</sub>-om kod eksperimentalnih životinja. I ovde su, u skladu sa *in vitro* eksperimentima, ekstrakti imele sa gloga i kleke pokazali mogući prooksidantni *in vivo* efekat. Nameće se zaključak da bi većina primenjenih imelinih ekstrakata mogla da pokaže pozitivne efekte u očuvanju antioksidantne ravnoteže u normalnim tkivima kao efikasni antioksidanti. Naši rezultati pokazuju da bi imela potencijalno mogla da bude korisna u prevenciji oštećenja jetre uzrokovanih oksidativnim stresom. Proverena je hipoteza u kojoj vodeni ekstrakti imele sa različitih domaćina pokazuju citotoksičnu aktivnost u ćelijama Ehrlich-ovog tumora (EAC) *in vivo*, zahvaljujući indukciji oksidativnog stresa ovim ćelijama. Ekstrakti imele su davani eksperimentalnim životinjama na tri načina – kao pretretman, tretman i posttretman. Značajno smanjenje incidence tumora je uočeno u svim grupama životinja koje su primale *V. album* ekstrakte u pređenju sa kontrolnom EAC grupom. Najveće smanjenje broja tumorskih ćelija je uočeno u grupama koje su pretretirane ekstraktima imele, iako se značajno manji broj ćelja EAC uočeva i u grupama sa razvijenim tumorom. Aktivnosti antioksidantnih enzima ukazuju na odsustvo oksidativnog stresa u ćelijama EAC. Međutim, nakon davanja ekstrakata *V. album* uočavaju se značajne promene aktivnosti ovih enzima, što je verovatno posledica indukcij oksidativnog stresa u ćelijama EAC.

## Abstract

The subject of this thesis was to investigate the *in vitro* and *in vivo* anti/prooxidant properties of *V. album* extracts from different host trees, as well as to investigate the *in vivo* oxidative stress of malignant cells and possible mechanism of cytotoxic activity of the mentioned extracts. It has been shown that there are significant differences in antioxidant compounds amount in mistletoe leaves grown on seven different host trees. Due to the mentioned fact, it was further confirmed that there are also significant differences in *in vitro* antioxidant properties of examined mistletoe extracts. Although the majority of examined extracts exhibited significant antioxidant properties, certain prooxidant activity could be ascribed to mistletoe extracts from the hawthorn and juniper host trees. *V. album* extracts exhibited different antioxidant and hepatoprotective potential against *in vivo* CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress in experimental animals. Again, at this point, mistletoe extracts from hawthorn and juniper host trees showed potential prooxidative effects *in vivo*. Our data suggest that mistletoe may be potentially useful in the prevention of the liver injuries caused by oxidative tissue damage, but emphasise the need of further elucidation of mechanisms of its action. We tested the hypothesis that the different aqueous *V. album* extracts exhibit cytotoxic properties in Ehrlich carcinoma (EAC) cells *in vivo* due to the induction of oxidative stress. Mice were implanted with EAC cells before, at the time of or after pretreatment with the extract. A significant reduction in the incidence of cancer was observed in all groups that received the *V. album* extract compared to the EAC control group. The largest decrease was observed in mice pretreated with the *V. album* extract, although significantly reduced numbers of EAC cells were also observed in animals with developed carcinoma. The activities of antioxidative enzymes in the EAC cells suggested the absence of oxidative stress. However, changes in the antioxidative enzymes activities observed after administration of the *V. album* extract might be due to the induction of oxidative stress in the EAC cells.

## 1. UVOD

Pored značajnih dostignuća medicine u oblasti dijagnostike, profilaktike i lečenja malignih bolesti, oni još uvek odnose veliki broj života, zauzimajući po smrtnosti, prema podacima svetske statistike, drugo mesto posle kardiovaskularnih bolesti. U savremenoj etapi razvoja medicinske nauke osnovne metode lečenja malignih bolesti su hirurgija i terapija zračenjem. Ove metode, koje se primenjuju odvojeno, ili češće udruženo, na žalost, ne daju uvek željene rezultate. Danas, antitumorske preparate, delimo na pet grupa: hormonski preparati, alkilirajući agensi, preparati na bazi lekovitih biljaka, antitumorski antibiotici i, na kraju, ostali preparati. Svi ovi preparati su različiti, ne samo po hemijskom sastavu već i po mehanizmu svog delovanja.

Posebno mesto u savremenoj hemoterapiji malignih bolesti zauzimaju preparati biljnog porekla, kao što su kolhamin (omalin), vinblastin, vinkristin, podofilin i njegovi derivati, peucedanin, itd. Treba spomenuti i pokušaj primene u onkološkoj terapiji onih preparata biljnog porekla koji ne poseduju antitumorske osobine, ali sadrže supstance koje imaju analgetski efekat, kao i supstance koje utiču na poboljšanje aktivnosti želudačno-crevnog trakta, jetre, mokraćnog sistema, itd., što objektivno poboljšava opšte stanje bolesnika. Značajno mesto u ovoj grupi preparata bi mogla zauzeti i *V. album* zbog svoje citotoksične aktivnosti i imunomodulišućih svojstava. Međutim, mehanizam dejstva imelinih ekstrakata, kao i postojanje razlika između ekstrakata (u zavisnosti od domaćina) još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Ova disertacija bavi se jednim od mogućih mehanizama – vezom anti/prooksidantne aktivnosti i citotoksičnosti sedam odabranih ekstrakata *V. album*.

## 2. KARAKTERISTIKE *Viscum album* L.

### 2.1. Biološke karakteristike *Viscum album* L.

Evropska imela (*Viscum album* L.) je poluparazitska biljka četinarskog i listopadnog drveća. Rasprostranjena je širom Evrope, Azije i Severne Afrike (severnoamerička imela je potpuno drugačija vrsta). Najčešće se nalazi na hrastu, kestenu, crnoj topoli, i stablima voćki (jabuka, kruška,...), pa čak, mada retko, i na boru i omorici (Barney i sar., 1998). Opšte primenjeni evropski taksonomski sistemi ubrajaju *V. album* u red Santalales, familija Loranthaceae (Tutin i sar., 1964). Mesto Evropske imele u sistematici biljaka je, mnogo godina, izazivalo brojne kontroverze zbog promenljivosti biljaka unutar roda *Viscum*. Problemi su uglavnom bili prouzrokovani morfološkim karakteristikama kao što su veličina i oblik listova odnosno boja i oblik bobica. Na primer, po jednoj dosta prihvaćenoj sistematici, razlikuju se tri vrste imele (*V. album*, *V. abietis* Beck i *V. laxum* Boiss) (Szafer i sar., 1967); *Viscum album* se odlikuje plodom manje ili više sfernog oblika, žute ili bele boje, *Viscum abietis* se javlja samo na drvetu jele (*Abies alba* Miller) sa ovalnim plodom bele boje, dok se *Viscum laxum* može naći na boru (*Pinus* sp.) ili omorici (*Picea* sp.), mnogo je manja od prethodne dve i plodova svetlo žute boje. Ball je u *Flora Europaea* (Tutin i sar., 1964) uveo drugačiju nomenklaturu, koju je kasnije prihvatio i Rutkowski (1998), a po kojoj se pomenute vrste odnose na, redom, podvrste: *V. album* ssp. *album* L., *V. album* ssp. *abietis* (Wiesb.) Abrom., i *V. album* ssp. *austriacum* (Wiesb.) Vollm. Nasuprot *Flora Europaea*, američki sistem koji je opisao Cronquist uključuje *V. album* ne u Loranthaceae već u Viscaceae (Cronquist, 1981). U početku, familija Viscaceae je smatrana subfamilijom Loranthaceae. Tek nakon opsežnih bioloških istraživanja, ona je postala zasebna familija (Calder i Bernhardt, 1983), koja danas broji oko 350 vrsta.

Imela (*Viscum album* L.) je zimzeleni grm (Tucakov, 1997), čiji se prečnik kreće od 0,5 do 1 m, koji kao poluparazit raste u krošnjama drveća. Listovi su uski i duguljasti, jezičastog oblika, dužine 4 do 6 cm, bez peteljki, kožasti i tvrdi sa prugastim žilama. Rašljasto na krajevima

ogranaka stoje po dva lista. Bobice su okrugle, prečnika 6 do 9 mm, sočne, bele i žućkastobele boje, a sazrevaju u periodu od novembra do januara. Sadrže jednu zelenkastu semenku obavijenu sluzavom i lepljivom masom.

Iako bi se pomenute biološke karakteristike i razlike mogle običnom čitaocu učiniti male i zanemarljive, one su jedan od veoma važnih parametara koje svaki istraživač koji radi na parazitskim biljkama mora da poznaje. Jer, od vrste domaćina i prirode bioloških veza koje se ostvaruju, zavisi i fitohemijski sastav biljke parazita, a samim tim i njen kvalitet u smislu zastupljenosti aktivnih komponenti (Kintzios i Barberaki, 2000).

## 2.2. Fitohemijske karakteristike *Viscum album L.*

Prva ispitivanja hemijskog sastava imele sproveo je Reinch, 1860. godine. On je analizirao lepljivu supstancu prisutnu u bobicama imele, koju je nazivao viscin. Danas, znamo da je *V. album* bogat izvor različitih farmakološki aktivnih jedinjenja. Glavne grupe sekundarnih metabolita nađenih u imeli su: lektini, viskotoksini, flavonoidi, fenilkarboksilne kiseline, polisaharidi, biogeni amini (feretilamin, tiramin, histamin, acetilholin), alkaloidi, polipeptidi, terpenoidi, saponini, tanini, aminokiseline, fitosteroli, vitamini, i čitav niz drugih jedinjenja.

U ovoj disertaciji, nekoliko grupa jedinjenja (lektini, viskotoksini, flavonoidi), karakterističnih za imelu, biće detaljno opisano, s obzirom na njihov izuzetan medicinski značaj. Smatra se da su ove grupe jedinjenja odgovorne za citotoksični i imunomodulišući efekat imele, kao i da bi njihovo prisustvo moglo da imeli pripiše i anti/prooksidantna svojstva.

### 2.2.1. Lektini

Najjednostavnija definicija lektina je da su to kompleksne molekule koje sadrže i protein i šećere, i koje imaju sposobnost da se vežu za ćelijsku membranu. Tako mogu da izazovu različite biohemijske promene, što može biti razlog blagotvornim efektima imele. Iako najčešće vezivani za imelu, lektini su molekule prisutne u tkivima gotovo svih živih organizama.

Međutim, lektini iz imele se izdvajaju zbog svog širokog spektra različitih osobina i potencijalnih primena u farmakologiji, poljoprivredi, itd.

*V. album* lektini (VAL) pripadaju tipu 2 ribozom inaktivirajućih proteina (RIP). Za razliku od tipa 1 RIP, koji se sastoji od jednog polipeptidnog lanca, RIP tipa 2 se sastoji od dva polipeptidska lanca, od kojih jedan ima ulogu vezivanja galaktoze (najčešća šećerna komponenta lektina). RIP 2 se originalno sintetizira kao jedan polipeptidski lanac u kome postoji domen za vezivanje galaktoze, a u toku posttranslacionih transformacija ovaj polipeptid se cepa, što rezultuje stvaranjem proteina koji se sastoji od dva lanca povezana hidrofobnim vezama i disulfidnim mostovima (Stirpe i sar., 1992). Ova dva lanca glikoproteina (lektina) označena su kao lanci A i B. Lanac A poseduje visoko specifičnu N-glikozidaznu aktivnost, tj. cepa N-glikozidnu vezu adenina<sub>4324</sub> 28S rRNK u jetri pacova i ostalih eukariota (Endo i sar., 1988), što veliku 60S subjedinicu eukariotskih ribozoma čini nesposobnom da se veže za faktor elongacije 2 (EF-2), što dalje rezultuje inhibicijom sinteze proteina (Stirpe i sar., 1992). S obzirom na aktivnost lanca A, pretpostavlja se da je ovaj molekul sposoban da izazove smrt ćelije. Kako je rRNK veoma očuvana u toku evolucije, tip 2 RIP pokazuje ribozom inaktivirajuće osobine kod širokog spektra organizama, međutim veću aktivnost pokazuje na sisarskim ribozomima. Lanac B ima tzv. "galaktoza-specifični" domen, kojom se lektin vezuje za površinu ćelije, izaziva *in vitro* ćelijsku aglutinaciju i povećani ulazak toksina, a što je razlog veće citotoksičnosti tipa 2 RIP u poređenju sa jednolančanim tipom 1 RIP.

Iz *V. album* su izolovana tri različita lektina (MLI, MLII, MLIII) i opisane su njihove osobine (Franz i sar., 1985). Nedavno, opisan je još jedan lektin, označen kao VisalbcBA (Peumans i sar., 1996). Lektin VisalbcBA se sastoji od dva identična lanca, pokazuje specifičnost za vezivanje N-acetilglukozamin oligomera (slično hitinu), i mnogo je manji (10 kDa) od ostalih lektina izolovanih iz imele. MLI (takođe poznat kao *V. album* aglutinin ili viskumin) ima molekulsku masu od 115 kDa. To je glikoprotein koji specifično vezuje D-galaktozu (Pevzner i sar., 2004; Wacker i sar., 2004), i koji se sastoji od dve identične

nekovalentno vezane subjedinice, tj. od ukupno četiri lanca, po dva lanca iz svake subjedinice. MLII, molekulske mase 60 kDa i sa jednom subjedinicom, je D-galaktoza i *N*-acetil-D-galaktozamin specifični glikoprotein koji se sastoji iz dva lanca. MLIII (50 kDa) ima, takođe, jednu subjedinicu, i dvolančani je glikoprotein koji specifično vezuje *N*-acetil-D-galaktozamin (Tonevitsky i sar., 2004).

MLI se ističe po svojoj širokoj primeni u imunologiji i onkologiji s obzirom da je ovaj lektin pokazao da poseduje najizraženije imunomodulišuće i antitumorske osobine (Hajto i sar., 1989).

Najnovija hemijska ispitivanja se uglavnom bave ispitivanjem strukture lektina (Wacker i sar., 2004; Pevzner i sar., 2004; Tonevitsky i sar., 2004; Kourmanova i sar., 2004; Edlund i sar., 2000).

### 2.2.2. Viskotoksini

Viskotoksini bi se najjednostavnije mogli definisati kao male proteinske molekule koje imaju citotoksično delovanje i moguću ulogu u stimulaciji imunskog sistema. Viskotoksini (VT) pokazuju visoku strukturnu sličnost sa biljnim  $\alpha$ - i  $\beta$ -tioninima, koji su cisteinom bogati polipeptidi, molekulske mase oko 5 kDa, široko rasprostranjeni u endospermu semenki, a takođe i u nekim drugim tkivima (Orru i sar., 1997). Viskotoksini sadrže tri disulfidna mosta (šest cisteinskih ostataka). Raspored disulfidnih mostova je takav da oni grade jednu neobičnu strukturu, označenu kao "koncentrični oblik". Smatra se da ona stabilizuje opštu strukturu, koja se javlja kod različitih malih proteinskih molekula sposobnih da intereaguju sa ćelijskim membranama. Viskotoksini se sintetišu kao veće proteinske molekule (oko 15 kDa), koji se dalje transformišu unutar ćelije (Holtorf i sar., 1998).

Okarakterisano je šest izoformi viskotoksina: A1, A2, A3, B, i 1-PS, kao i U-PS (tabela 2.1), za koji se pokazalo da je proizvod transformacije 1-PS. Dodatno, Schrader-Fisher i Apel (1993) su otkrili postojanje još dve neobične varijante. Ova dva nova viskotoksina, označena kao



Th1Va1 i Th1Va2, sadrže osam umesto šest cisteinskih ostataka. Količina i sastav viskotoksina zavise od podvrste *V. album*, stabla domaćina, kao i godišnjeg doba (tabele 2.1 i 2.2).

**Tabela 2.1.** Prisustvo viskotoksina u pojedinim podvrstama *V. album*

Podvrsta	Prisutni VT	Nisu nađeni
<i>V. album</i> subsp. <i>album</i>	A1, A2, A3, B	1-PS
<i>V. album</i> subsp. <i>austriacum</i>	B, velike količine 1-PS, U-PS, male količine A2, A3	A1
<i>V. album</i> subsp. <i>abietis</i>	A1, A3, B, 1-PS, U-PS	A2

Čini se da su disulfidni mostovi viskotoksina suštinski faktor citotoksičnosti, jer oni određuju trodimenzionalnu strukturu molekule i njenu sposobnost da se vezuje za membranske lipide (Ochocka i Piotrowski, 2002). Ovome u prilog ide i činjenica da raskidanje disulfidnih mostova VT potpuno eliminiše njihovu citotoksičnost. Uz to, Bussing i saradnici (1999) smatraju da značajnu ulogu u citotoksičnosti imaju reaktivni kiseonični intermedijeri.

Najnovija ispitivanja se uglavnom bave ispitivanjem strukture viskotoksina budući da im se, kao i lektinima, pripisuje veliki farmakološki značaj. Na primer, Debreczeni i saradnici (2003) bave se rasvetljavanjem strukture VT A3 sastavljenog od dva monomera povezana hidrofobnim interakcijama, čiji se svaki monomer sastoji od 46 aminokiselina sa tri disulfidna mosta. Dalje, Romagnoli i saradnici su 2003. godine identifikovali i opisali strukturu novog VT C1 iz azijske *V. album* ssp. *coloratum* ohwi i pokazali njegovu antimikrobnu aktivnost kao i visok stepen citotoksičnosti. Da su biohemijski mehanizmi dejstva VT različiti i da su usko vezani za strukturu VT, pokazali su i Coulon i saradnici (2003); ova grupa objašnjava da nemogućnost VT B da interreaguje sa modelom plazma membrane (za razliku od VT A2 i A3) leži u odsustvu aminokiselinskog ostatka Arg25 preko koga se VT verovatno vezuju za membrane i ispoljavaju različite farmakološke efekte.



**Tabela 2.2.** Sadržaj i sastav viskotoksina tri podvrste evropske *V. album* (Ochocka i Piotrowski, 2002)

Podvrsta	Domaćin	Vreme branja	Sadržaj VT (% od ukup)					Ukupni VT (mg/g)
			A1	A2	A3	B	PS-V	
<i>V. album</i>	Malus	jun	15,9	39,0	36,4	8,7	nd	2,6
ssp. <i>album</i>	(jabuka)	decembar	15,6	32,0	42,5	9,9	nd	3,3
	<i>Quercus</i>	jun	15,7	32,6	45,8	5,9	nd	4,0
	(hrast)	decembar	12,4	32,3	46,8	9,6	nd	4,1
	<i>Ulmus</i>	jun	15,7	36,3	35,6	12,4	nd	3,7
	(brest)	decembar	16,2	31,7	36,5	15,6	nd	4,8
	<i>Robinia</i>	ns	12,4	36,1	37,9	13,7	nd	5,7
	(bagrem)							
	<i>Populus</i>	ns	17,9	39,8	37,0	5,3	nd	5,6
	(topola)							
	<i>Betula</i>	ns	14,7	37,7	34,3	13,3	nd	2,2
	(breza)							
	lišćarsko drveće	*	15,1	35,2	39,8	9,9	nd	3,9
<i>V. album</i>	Pinus	jun	nd	1,7	4,2	11,3	85,1	1,4
ssp. <i>austriacum</i>	(bor)	decembar	nd	0,6	8,0	17,2	69,2	1,7
		*	nd	0,9	4,1	14,1	80,7	1,5
<i>V. album</i>	Abies	jun	5,6	nd	72,5	6,5	15,1	3,2
ssp. <i>abietis</i>	(jela)	decembar	6,7	nd	76,5	4,4	12,5	4,8
		*	5,6	nd	75,3	5,1	13,6	3,9

**Napomena:** nd, nije detektovan; ns, nije naznačeno; \*, sve uzorke su izmerili Schaller i sar.

(1998) (uključujući i one koji nisu navedeni u tabeli); PS-V, suma viskotoksina 1-PS i U-PS

### 2.2.3. Flavonoidi

Do sada je u biljkama pronađeno više od 4000 hiljade flavonoida (Ohshima i sar., 1998). Ovako velika raznolikost flavonoida može se objasniti brojnim modifikacijama ove osnovne strukture, a radi lakše sistematizacije, flavonoidi su podeljeni u deset podgrupa (Harborne, 1989).

Fitohemijska ispitivanja *V. album* su ukazala na postojanje niza flavonoida u listovima. Najnoviji rezultati ukazuju da su izvesne količine flavonoida lokalizovane na spoljašnjoj strani listova, u tzv. kutikularnom vosku (Wollenweber i sar., 2000), i da se mogu dobiti kada se biljni materijal ispere sa organskim rastvaračima, kao što su aceton ili hloroform. U stvari, da su flavonoidi značajni konstituenti listova imele, objavili su još Becker i Exner (1980). Oni su dokazali prisustvo kvercetina i još sedam njegovih metil derivata. Ovi flavonoli su, međutim, identifikovani iz metanolnih ekstrakata, a njihova lokalizacija nije razmatrana.

Tri flavanona, naringenin-7-metiletar (sakuranetin), naringenin-5,7-dimetiletar (prilog) i eriodiktiol-3'-metiletar (homoeriodiktiol), su takođe pronađena u ekstraktima lista imele, zajedno sa kvercetin-7,3'-dimetiletrom i kvercetin-3-metil-etrom (Lorch 1993). Ranije su objavljeni podaci o prisustvu tri halkona i dva flavanona kao glikozida (Fukunaga i sar., 1987) (jedan od ovih halkona, 2'-hidroksi-4',6'-dimetoksihalkon-4-glukozid, našli su još 1980. godine Becker i Exner) (prilog). Dokazano je prisustvo flavanon glikozida i flavonol glikozida u *Viscum alniformosanae* (Chou i sar., 1999).

Wollenweber i njegovi saradnici (2000) su sproveli istraživanje o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu listova *V. album*, uzimajući u obzir i promenu tokom vegetacionog perioda, i dobili zanimljive rezultate. Rezultati dobijeni TLC (engl. *thin layer chromatography*) hromatografijom potvrdili su prisustvo kvercetin-3,7,3'-trimetiletra, kvercetin-3,7 i kvercetin-3,3'-dimetiletara, kvercetin-3-metiletra, kamferol-3,7-dimetiletra i kamferol-3-metiletra (prilog). Najveći sadržaj ovih jedinjenja je pronađen kod mladih listova u razvoju, u proleće. Faza intenzivnog razvoja lista prouzrokuje pad koncentracije tokom leta. U toku jeseni, povećana

sekrecija flavonol aglikona se odvija verovatno tokom novembra. Treba napomenuti da su muške biljke imale znatno manje količine flavonoida nego ženske biljke. Ovi rezultati su se malo razlikovali od rezultata koje su dobili Becker i Exner (1980), jer ovi autori navode razlike samo između evropskih i japanskih imela, ali ne i razlike unutar grupe evropske imele (sa različitih stabala domaćina). Naime, Wollenweber i saradnici su u uzorku *V. album* sa domaćina *Abies* i *Pinus*, identifikovali kvercetin-3-metiletar (što isti autori potvrđuju i u kasnijim radovima, Haas i sar., 2003), a koji se ne pominje u radovima Becker-a i Exner-a.

#### 2.2.4. Ostali konstituenti *Viscum album* L.

Već je napomenuto da je u imeli, osim ove tri klase jedinjenja, prisutan i čitav niz drugih jedinjenja: fenilkarboksilne kiseline (gentsinska i kafena, prilog), polisaharidi, biogeni amini (feretilamin, tiramin, histamin, acetilholin), alkaloidi (Capernaros, 1994), polipeptidi, terpenoidi, saponini, tanini, aminokiseline, fitosteroli, vitamini.

Rezultati HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) analiza pokazali su prisustvo različitih fenolnih kiselina u imeli sakupljenoj sa različitih domaćina, poput laktone *o*-kumarinske kiseline, digalne kiseline, vanilne i salicilne kiseline (prilog). Ukupno je hromatografski identifikovana 21 fenolna kiselina u listovima *V. album* sa različitih domaćina. Jedinjenja su bila ili slobodna ili u obliku estara i glikozida. Komparativna hromatografija je pokazala razlike u kvalitativnom sastavu ispitivanih jedinjenja u različitom biljnom materijalu. Na primer, *o*-kumarinska kiselina je nađena samo u imeli sa *Quercus robur*. Digalna kiselina je nađena samo u biljnom materijalu sa *Acer plantanoides*. Kvalitativni i kvantitativni sastav imele sa *Malus domestica* i *Pyrus communis* pokazao je značajne sličnosti što se tiče fenolnih kiselina. Uz to, vanilna kiselina, odsutna u svim ostalim imelama, izgleda da je karakteristika prethodno pomenutih imela. Kvantitativna HPLC analiza pokazala je značajan udeo salicilne kiseline (39,55mg%) u imeli sa *Sorbus aucuparia*. Osim u ovom uzorku, ovo jedinjenje je bilo prisutno samo u malim količinama u biljkama sa *Populus nigra* (15,3mg%) i *Quercus robur* (2,63mg%).



**Tabela 2.3.** Flavonoid aglikoni u *V. album* ssp. *album*, ssp. *abietis* i ssp. *austriacum* sa različitih domaćina (preuzeto iz Haas i sar., 2003)

Vrsta/podvrsta	Flav onoli					Flavanon					
	Kae	Kae-	Kae-	Kae-	Kae-	Qu-	Qu-	Qu-	Qu-	Qu-	Nar
	3-	3-	3,7-	3,4'-	3-	7-	3,7-	3,3'-	7,3'-	3,7,3'-	
	Me	Me	diMe	diMe	Me	Me	diMe	diMe	diMe	triMe	
<i>Viscum album</i> ssp. <i>album</i> sa											
<i>Crataegus prunifolia</i>	X		X		X		X	X		X	
<i>Viscum album</i> ssp. <i>album</i> sa											
<i>Populus balsamifera</i>					X		X	X	X	X	
<i>Viscum album</i> ssp. <i>abietis</i> sa											
<i>Abies alba</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Viscum album</i> ssp. <i>austriacum</i>											
sa <i>Pinus sylvestris</i>			X		X		X	X			X

Kae – kamferol; Qu – kvercetin; Nar – naringenin; Me – metiletar

**Terpenoidi** su klasa jedinjenja koja je veoma rasprostranjena u *V. album*, posebno u listovima. Daleko najdominantnija komponenta iz klase terpenoida je oleanolna kiselina (karofilin,  $C_{30}H_{48}O_3$ ), koja čini 70-80% ukupnih terpenoida. Drugi triterpenoidi, kao betulin (lup-20-en-3,28 $\beta$ -diol) i betulinska kiselina,  $\beta$ -amirin i lupeol (prilog), javljaju se samo u malim količinama (Wollenweber i sar., 2000). Interesantno je pomenuti i jedan od najnovije izolovanih acikličnih monoterpenskih diglukozida iz *V. album* ssp. *album*, čija je struktura rastumačena, 2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol-6-*O*-[6'-*O*- $\beta$ -D-apiofuranozil]- $\beta$ -D-glukopiranozid (Deliorman i sar., 2001). Ovaj monoterpenoid je izolovan iz butanolnog ekstrakta listova i stabla imele (prilog).

Udeo **alifatičnih jedinjenja** je značajno manji, a relativne količine se kreću od 20 do 30%. Alifatična jedinjenja podrazumevaju *alkane* i *primarne alkohole* kao glavne komponente, dok su *aldehidi*, *slobodne masne kiseline* i *alkil estri* prisutni u mnogo manjim količinama (Wollenweber i sar., 2000). Dužine lanca alifatičnih jedinjenja je u opsegu uobičajenom kod biljaka (Bianchi, 1995). Mala odstupanja se mogu uočiti kod estara, gde su predominantni homolozi  $C_{38}$ - $C_{42}$ . Alkani su sastavljeni uglavnom od  $C_{29}$  sa malim varijacijama u toku razvoja lista (Wollenweber i sar., 2000). Profili primarnih alkohola, aldehida i slobodnih masnih kiselina su u opsegu  $C_{22}$ - $C_{30}$  sa  $C_{26}$  kao glavnim konstituentom. Ovi rezultati potvrđeni su i GC/MS (engl. *gas chromatography/mass spectrometry*) analizom  $CO_2$  ekstrakata lista imele (Ćebović, 2003; 2005).

Malo literaturnih podataka postoji o ugljovodonicima, masnim kiselinama (Jung i sar., 2004).

### 2.3. Farmakološka svojstva pojedinih komponenti ekstrakata *Viscum album* L.

I pored relativno velikog broja radova u vezi sa hemijskim sastavom i farmakološkim osobinama *V. album*, do 1951. godine, nije bilo dovoljno jasno koji je aktivni princip zaslužan za delovanje imele na razvoj tumora. Te godine, ruski naučnici Menjšikov i Gurevič su iz *V. album*

izolovli dva biološki aktivna jedinjenja i antagonista, koja su tada dobila naziv *toksomezin* i *nekromelin* (uzeto iz: Balickij i Voroncova, 1994). Toksomezin je kod eksperimentalnih životinja izazivao kratkotrajno povećanje krvnog pritiska, ubrzanje ritma i smanjenje amplitude srčanog ritma, pojavu nekroze na mestima davanja, te različitu sposobnost inhibicije rasta pojedinih tumora – sarkoma M-1 i 180; ove promene su u slučaju nekromelina bile reverzibilne. Kasnije su Wester i Niehaus (1965) izolovali iz *V. album* proteinsku frakciju koja je posedovala snažno inhibitorno dejstvo na rast ćelija sarkoma 180 i HeLa ćelija\*. Danas se zna da su se tadašnje proteinske frakcije sastojale od lektina i viskotoksina, glavnih aktivnih principa ekstrakata *V. album*.

Wenzel-Seifert i saradnici (1997) su u svojim istraživanjima uočili različitu citotoksičnost imelinih lektina, dokazujući da najizraženiji efekat ima MLI. Međutim oni, kao i neki drugi autori pre njih (Urech i sar., 1995; Nicotera i sar., 1994; Gabius i sar., 1992), ukazuju na činjenicu da različite ćelijske kulture pokazuju različitu osetljivost na delovanje MLI, pri čemu su neke potpuno rezistentne. Bussing i saradnici su pokazali (1996, 2000) da je MLIII najaktivniji u indukciji apoptozne smrti limfocita čoveka u kulturi. S druge strane, Hajto i njegovi saradnici (1989) su pokazali da je lanac B (sa vezanim ugljenim-hidratom) odgovoran za stimulaciju aktivnosti urođenoubilačkih ćelija (engl. natural-killer cell, NK) *in vivo*, dok je lanac A potpuno neaktivan.

Fiziološka funkcija viskotoksina je nejasna, iako se pretpostavlja da oni, zbog svoje citotoksičnosti, štite biljke od infekcija mikroorganizmima, verovatno tako što dovode do oštećenja bioloških membrana mikroorganizama. Do danas je sproveden relativno mali broj istraživanja koja za cilj imaju ispitivanje citotoksičnih karakteristika i potencijalne primene viskotoksina u medicini. Konopa i njegovi saradnici (1980) su dokazali citotoksičnost različitih viskotoksina u ćelijskim kulturama, a Hajto i njegovi saradnici. (1989) su ukazali na

---

\* Karakteristika ovi ćelija je abnormalno brza proliferacija, čak i u poređenju sa ostalim malignim ćelijama. HeLa ćelije poseduju aktivni oblik enzima telomeraze koji sprečava skraćivanje telomera koje se javlja tokom procesa starenja ili u slučaju ćelijske smrti. Na ovaj način HeLa ćelije prevazilaze tzv. Hayflick-ov limit, odn. maksimalan broj deoba normalnih ćelija pre odumiranja. Detaljnije u Sharrer (2006) i Masters (2002).

citotoksičnost ekstrakata imele (iz kojih su uklonjeni lektini) *in vivo* kod ljudi. Efekat je uočen na limfocitima, a zaključeno je da on može biti posledica prisustva viskotoksina kao glavnih komponenata "bez-lektinskih" ekstrakata. Međutim, uporednim eksperimentima je pokazano da viskotoksini imaju ipak relativno mali citotoksični efekat u poređenju sa lektinima, posebno lektinom MLI (Urech i sar., 1995). Korisno je napomenuti da ukupna citotoksičnost vezana za viskotoksine zavisi od podvrste *V. album*, s obzirom na razlike kako u kvantitativnom tako i u kvalitativnom sastavu viskotoksina (tabele 2.1 i 2.2). Bussing i njegovi saradnici (1998) su predočili razlike u delovanju različitih viskotoksina na limfocite čoveka. Pronađeno je da su viskotoksini A1, A2, A3 i 1-PS izazivo citotoksični, dok je u slučaju viskotoksina B, ovaj efekat bio znatno manje naglašen.

Za metilovane flavonoide je poznato da poseduju antifungalne i antibakterijske osobine (Tomas-Barberan i sar., 1988). Flavonoidi su takođe sposobni da smanje efekte UV zračenja (Proksch i Rodriguez, 1985). Neka od najnovijih istraživanja dokazuju antioksidantnu aktivnost flavonoida (Areias i sar., 2001), kao i sposobnost ove klase jedinjenja da inhibiraju proces lipidne peroksidacije (Cos i sar., 2001). Pretpostavlja se, da zbog pomenutih svojstava, flavonoidi imaju i čitav niz drugih farmakoloških aktivnosti, kao što su hepatoprotektivna, antimutagena, antiinflamatorna, antialergijska, kardioprotektivna, itd. (Cook i Samman, 1996; Middleton, 1996). Međutim, poslednjih godina pojavile su se indicije da neki flavonoidi, koji su smatrani antioksidansima, mogu, u odgovarajućim *in vitro* uslovima, da iniciraju oštećenja nelipidnih komponenti, kao, na primer, DNK, proteina i ugljenih hidrata (Decker, 1997). Zbog ovoga je neophodno pažljivo utvrditi uslove pod kojima flavonoidi deluju kao antioksidansi.

Fenolne komponente poseduju široki opseg bioloških i farmakoloških aktivnosti. Nađeno je da su glikozidni estri kafene kiseline inhibitori aktivnosti 5-lipooksigenaze i sledstveno sinteze leukotriena iz arahidonske kiseline, te se smatra da mogu da budu potencijalni antialergijski i antiinflamatorni agensi (Harborne, 1989). Za fenolne kiseline je utvrđeno da poseduju antioksidantnu aktivnost, budući da inhibiraju lipidnu peroksidaciju (Ćebović i sar., 2001).

#### 2.4. Farmakološka svojstva ekstrakata *Viscum album* L.

*V. album* se vekovima tradicionalno koristila kao pomoćno lekovito sredstvo. Iako nije naučno potvrđeno, pretpostavlja se da se imela mogla koristiti još od 16. veka za poboljšanje cirkulacije. Druge nepotvrđene primene su se odnosile na terapiju steriliteta, zapaljenja zglobova, reumatizma, gihta, velikog kašlja, astme, ateroskleroze, visokog krvnog pritiska, glavobolje, poremećaja menstrualnog ciklusa i simptoma menopauze, dijareje, tahikardije. Takođe, imela se koristila kao sredstvo za smirenje. Potvrđeno je korisno dejstvo ekstrakta i čajevi *V. album* u lečenju visokog krvnog pritiska, ateroskleroze, problema varenja i uklanjanju simptoma nervne napetosti. Takozvana "imelina voda" se koristi u terapiji promrzlina i varikoziteta. Pretpostavlja se da *V. album* poseduje i antiinflamatorna (Lavastre i sar., 2004), imunomodulišuća (Kovacs, 2004; Klopp i sar., 2001; Chernyshov i sar., 2000) i antivirusna svojstva (Karagoz i sar., 2003).

Najzad, svaka priča o imeli i medicini bi bila nepotpuna ako bi se zanemarila primena ekstrakata imele u terapiji malignih bolesti. Rudolf Steiner (1861-1925), osnivač Društva za istraživanje kancera (Society for Cancer Research), u Arlesheim-u, Švajcarska, prvi put je uveo imelu u terapiju karcinoma još 1921. godine. Učinjeni su znatni naponi da se klasičnim farmakološkim i kliničkim ispitivanjima objasne efekti, i utvrdi efikasnost ovih preparata. Od 50-ih godina prošlog veka do danas dostupno je oko 350 radova, od čega je stotinak objavljeno u poslednjih pet godina, što potvrđuje sve veće interesovanje naučnika za ovu biljku. Objavljeni radovi se uglavnom bave detekcijom i izolovanjem aktivnih principa *V. album* (lektini, viskotoksini, fenolna jedinjenja, i dr.) i farmakološkim ispitivanjima ekstrakata ili pojedinih komponenti u *in vitro* i *in vivo* sistemima.

U poslednjih pet godina velika pažnja je posvećena *in vitro* ispitivanjima antitumorskih svojstava ekstrakata *V. album* ili pojedinih komponenti izolovanih iz ovih ekstrakata. Dokazano je da viscin, betulinska, oleanilna i ursolna kiselina inhibiraju rast i indukuju apoptozu Molt4,



K562 i U937 leukemijskih ćelija (Urech i sar., 2005). Do danas je sprovedeno i nekoliko kliničkih ispitivanja (Bock i sar., 2004; Mansky i sar., 2003; Mamed i sar., 2004; Grossarth-Maticek i sar., 2001), mahom u Nemačkoj. Duong Van Huyen i saradnici (2003) su pokazali da ekstrakti *V. album* sa različitih domaćina imaju različite efekte. Naime, ovi autori su ispitivali citotoksične efekte ekstrakata lista imele sa hrasta, jabuke i bora na limfoblastoidne i monocitne ćelijske linije. Ekstrakti imele sa hrasta i jabuke su dozno zavisno inhibirali proliferaciju T ćelijske linije, dok je B ćelijska linija pokazala rezistenciju na ispitivane ekstrakte. S druge strane, ekstrakt imele sa bora ni u jednom slučaju nije pokazao citotoksični efekat. Postoji malo dostupne literature koja ispituje moguću povezanost antitumorskog delovanja ekstrakata *V. album* sa delovanjem na oksidativni stres i produkciju reaktivnih kiseoničnih čestica (ROS). Kim je, sa svojim saradnicima (2004), pokazao da tretman aglutininom *V. album* ssp. *coloratum* dovodi do značajnog povećanja količine ROS u Hep3B tumorskoj ćelijskoj liniji, do gubitka potencijala membrane mitohondrija, kao i da tretman sa antioksidantom, N-acetil-L-cisteinom, inhibirajući produkciju ROS sprečava apoptozu ovih ćelija. Ranija istraživanja ovih autora (Kim i sar., 2003) su dovela u vezu delovanje imelinog lektina-II sa prekomernim nastankom vodonik peroksida kod U937 leukemijskih ćelija. S druge strane, Timoshenko i njegovi saradnici (2001) ukazuju da bi se primenom imelinih lektina tokom imunoterapije C3H/HeJ adenokarcinoma sa interleukinom-2 mogli izbeći neželjeni efekti prouzrokovani prekomernim nastankom azot monoksida.

## 2.5. Oksidativni stres

Aerobni organizmi, uključujući čoveka, energiju neophodnu za održavanje normalnog metabolizma obezbeđuju putem respiracije. S druge strane, odavno je poznato da je molekularni kiseonik toksičan (Matsuo, 1993). Sa hemijskog aspekta, respiracija predstavlja niz reakcija u kojima dolazi do redukcije molekularnog kiseonika u vodu. U toku normalnog aerobnog metabolizma, u elektron transportnom lancu mitohondrija, jedan deo molekularnog kiseonika

(oko 3%) se delimično redukuje, pri čemu nastaju: superoksid anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\bullet}$ ), i na kraju voda ( $H_2O$ ). Ovo su takozvane reaktivne kiseonične čestice (ROS), a  $O_2^{\bullet-}$  i  $OH^{\bullet}$  su, takođe, i slobodni radikali (tabela 2.4).

**Tabela 2.4.** Reaktivne kiseonične čestice (Đorđević i sar., 2000)

Komponenta	Poluživot	Mehanizmi stvaranja
$O_2^{\bullet-}$ (superoksid anjon radikal)	Spontana i enzimaska dismutacija	Jednoelektronska redukcija $O_2$ (u reakcijama autooksidacije)
$HOO^{\bullet}$ (perhidroksilni radikal)	—	Protonovana forma $O_2^{\bullet-}$
$H_2O_2$ (vodonik-peroksid)	Stabilna enzimaska redukcija	Dvoelektronska redukcija $O_2$
$OH^{\bullet}$ (hidroksil radikal)	$10^{-9}$ s	Troelektronska redukcija $O_2$
$RO^{\bullet}$ (alkoksi radikal)	$10^{-6}$ s	Organski radikal kiseonika
$ROO^{\bullet}$ (peroksi radikal)	7s	Oduzimanje H atoma od organskih hidroperoksida
$ROOH$ (organski hidroperoksid)	—	
$^1O_2$ (singletni kiseonik)	$10^{-6}$ s	Prvo ekscitirano stanje (energija)
$RO^{\bullet}$ (karbonil radikal)	-	Fotoemisija

Ako ove reaktivne čestice nastanu u većoj količini od one koja može da se kontroliše, one dovode do tzv. oksidativnog oštećenja ćelije. Ove čestice, iako su prisutne u malim koncentracijama u ćeliji, stupaju u reakcije sa svim biomolekulima (lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama, šećerima). Stoga se može reći da su svi aerobni organizmi neprestano izloženi oksidativnom stresu. ROS nastaju u različitim ćelijskim odeljcima (tabela 2.5), međutim, kvantitativno gledano, mitohondrije i mikrozomi su odgovorni za nastanak najvećeg dela ROS.

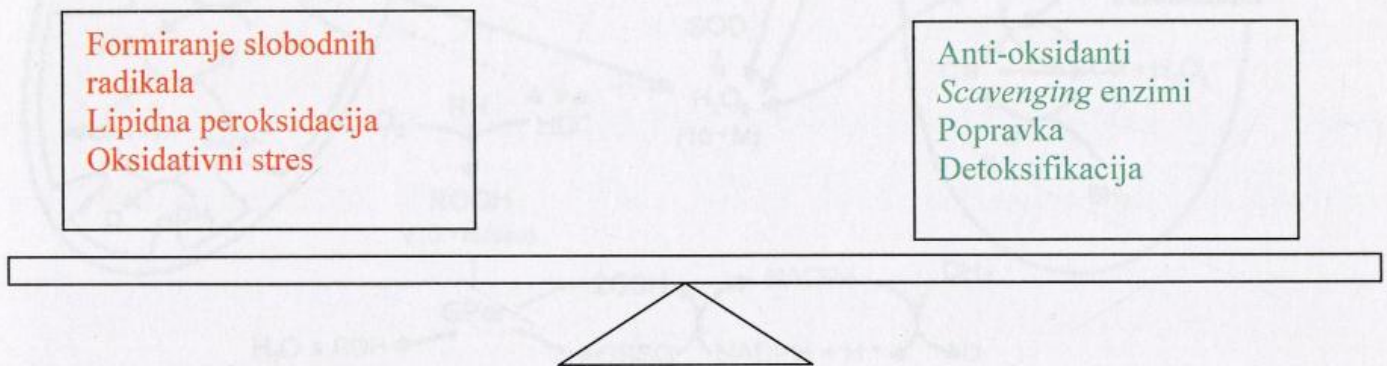
Normalna količina slobodnih radikala u organizmu je veoma mala ( $3-30 \cdot 10^{-14}$  grama superoksid anjon radikala po gramu tkiva). Međutim, efekti su im veoma razorni, pošto lančana reakcija omogućava da jedan slobodan radikal izazove promene na hiljadama molekula i ošteti DNK, RNK, enzime u ćelijskim membranama ili dovede do nastanka produkata lipooksigenacije pre nego što bude inaktivisan. Ovde treba napomenuti ne male poteškoće prilikom detekcije i praćenja ROS, kako zbog velikog broja oblika i intermedijera koje mogu da formiraju, tako i zbog izuzetno velike reaktivnosti i brzine hemijskih reakcija u kojima učestvuju.

Kao odgovor na toksično delovanje kiseonika, kod aerobnih organizama je, u toku evolucije, došlo do stvaranja složenih mehanizama antioksidativne zaštite, kao i mehanizama popravke oksidativnih oštećenja. Ova dva suprotna procesa, oksidativni stres i antioksidativna zaštita, se nalaze u stalnom ekvilibrijumu u ćeliji (slika 2.1), i funkcionišu izuzetno dobro dok ih neki od endogenih ili egzogenih faktora ne promeni.

**Tabela 2.5.** Ćelijski izvori slobodnih radikala (adaptirano iz Freeman, 1984)

Ćelijska komponenta	Molekuli odgovorni za nastanak slobodnih radikala
Plazma membrana	Lipooksigenaza Ciklooksigenaza NADPH oksidaza
Mitohondrije	Elektron transportni lanac Ubihinon (Koenzim Q) NADH dehidrogenaza
Mikrozomi	Elektron transportni lanac Citohrom P <sub>450</sub> Citohrom b <sub>5</sub>
Peroksizomi	Oksidaze Flavoproteini
Ostale komponente	Hemoglobin Ksantin oksidaza Flavini

Antioksidativna zaštita podrazumeva antioksidantne enzime i biološke antioksidanse. Antioksidantni sistemi uključuju superoksid dismutazu (SOD), koja vrši dismutaciju superoksid anjon radikala do molekuskog kiseonika i vodonik peroksida, katalaza (CAT), koja transformiše vodonik peroksid do molekuskog kiseonika i vode, glutation peroksidaza koja redukuje hidroperokside do alkohola i, takođe, redukuje vodonik peroksid do vode, glutation-S-transferaza koja redukuje hidroperokside do alkohola, itd. (slika 2.2). Biološki antioksidansi uključuju vodorastvorne antioksidanse, kao što su glutation (redukovani oblik: GSH, oksidovani oblik: GSSG); askorbinska i mokraćna kiselina, kao i liposolubilne antioksidante, kao što su vitamin E (uglavnom  $\alpha$ -tokoferol), ubihinoni i karotenoidi.

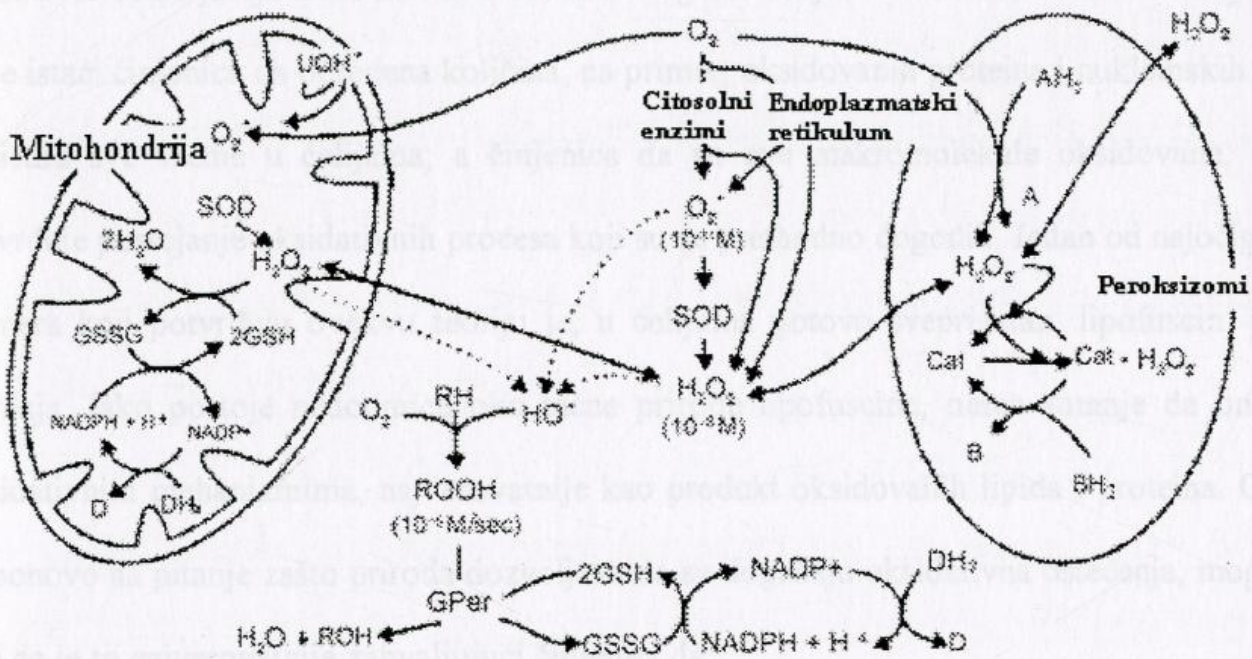


**Slika 2.1.** Šematski prikaz ravnoteže između faktora oksidativnog stresa i sistema antioksidativne zaštite u ćeliji

Takođe se smatra da su mehanizmi popravke oksidativnih oštećenja neophodni za održavanje homeostaze u organizmima. Oksidovana DNK može biti popravljena delovanjem enzima kao što su endonukleaze i glikozilaze. Oksidovani proteini mogu biti uklonjeni dejstvom proteaza. Oksidovani lipidi mogu biti redukovani dejstvom glutacion peroksidaze u toku ili nakon hidrolize sa fosfolipazom.

Kada mehanizmi zaštite od oksidativnog stresa funkcionišu, aerobni organizmi mogu izbeći oštećenja prouzrokovana reaktivnim kiseoničnim česticama i slobodnim radikalima. Teško je, međutim, pretpostaviti da ovakvi sistemi mogu da pruže apsolutnu zaštitu biološkim

sistemima od oštećenja. Reaktivne kiseonične čestice i slobodni radikali koji "umaknu" antioksidantnim sistemima, mogu da izazovu oksidativna oštećenja, a oksidativna oštećenja koja "umaknu" mehanizmima popravke mogu da izazovu patološke promene. Ako je ovo slučaj, narušena ravnoteža između oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, može da ubrza proces starenja, ili uslovi pojavu mnogih bolesti.



**Slika 2.2.** Čelijski izvori ROS i sistemi antioksidantne zaštite

Floyd (1993) daje interesantno tumačenje oksidativnog stresa. Prema ovom autoru, nametnuti oksidativni stres se može označiti kao potencijal oksidativnog oštećenja,  $P_o$ . Već je rečeno da je priroda razvila nekoliko sistema antioksidativne zaštite, koji imaju sposobnost da spreče nastajanje kiseonikovih toksičnih "sporednih proizvoda". Tako, potencijalu oksidativnog oštećenja se suprotstavlja kapacitet antioksidantne zaštite,  $A_c$ . Ova dva suprotna procesa nalaze se u dinamičkoj ravnoteži, kao što je prikazano u jednačini 1:

$$(1) \quad P_o \Leftrightarrow A_c$$

$$(2) \quad P_o - A_c = P_o'$$

U stvarnosti, potencijal oksidativnog oštećenja je veći nego kapacitet antioksidativne zaštite, pa tako postoji mala količina toksičnih kiseonikovih radikala koji uspevaju da izbegnu odbrambeni sistem ćelije. Ova činjenica je prikazana u jednačini 2, gde  $P'$  predstavlja deo toksičnih kiseonikovih radikala koji uspevaju da izbegnu odbrambene sisteme u svakodnevnom životu "normalne" jedinke, što dovodi do starenja, ali ne i do bolesti.

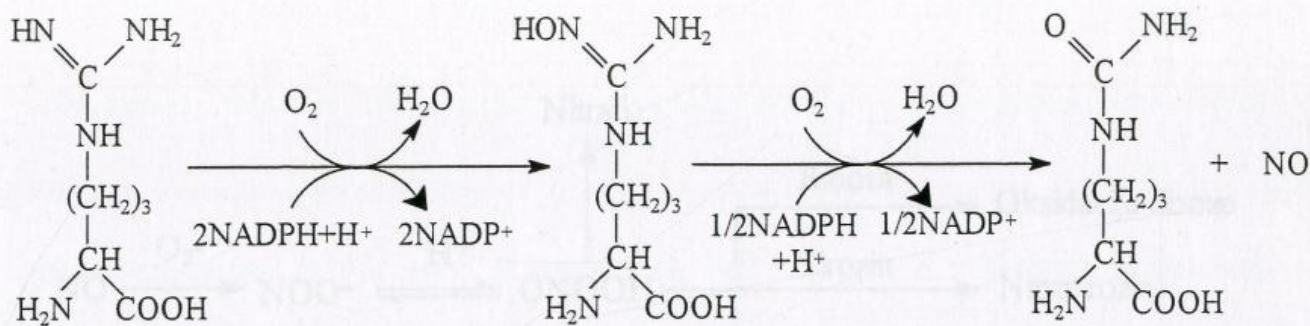
Opravdanost ovakvog tumačenja bi se mogla osporiti pitanjem zašto bi priroda dozvolila da se sve vreme javlja mala količina oksidativnog oštećenja? U odbranu ovakve tvrdnje, mogla bi se istaći činjenica da određena količina, na primer, oksidovanih proteina i nukleinskih kiselina egzistira sve vreme u ćelijama; a činjenica da su ove makromolekule oksidovane, svakako potvrđuje postojanje oksidativnih procesa koji su se prethodno dogodili. Jedan od najočiglednijih primera koji potvrđuju ovakvu teoriju je, u ćelijama gotovo sveprisutan, lipofuscin, pigment starenja. Iako postoje nedoumice oko tačne prirode lipofuscina, nema sumnje da on nastaje oksidativnim mehanizmima, najverovatnije kao produkt oksidovanih lipida i proteina. Osvrćući se ponovo na pitanje zašto priroda dozvoljava da se događaju oksidativna oštećenja, moglo bi se reći da je to najverovatnije zahvaljujući činjenici da:

- \* bi bilo neophodno utrošiti suviše energije na izgradnju dovoljno odbrambenih sistema koji bi sprečili *sva* oksidativna oštećenja, te stoga,

- \* priroda verovatno koristi male količine reaktivnih kiseoničnih čestica za signalne reakcije u procesu razvoja ili diferencijacije, a na kraju i evolucije.

### 2.5.1. Oksidativni stres i NO

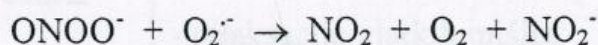
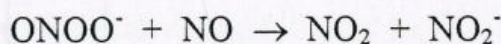
Azot monoksid nastaje iz aminokiseline L-arginin delovanjem enzima azot(II)-oksid sintaze (NOS) (Wiesinger, 2001):



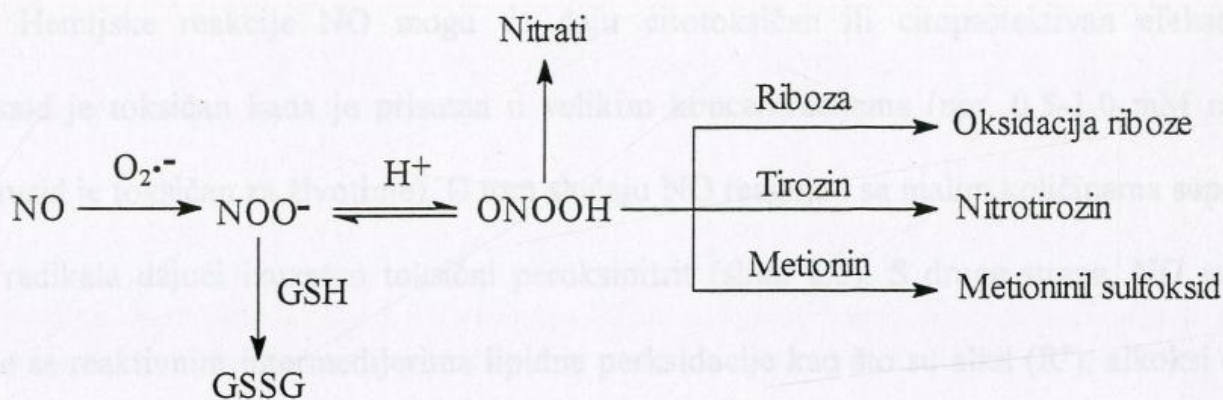
Reakcija između superoksid anjon radikala i azot monoksida je izuzetno brza, a konstanta brzine je  $k=7 \cdot 10^9 \text{ (mol/dm}^3\text{)}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Huic i Padmaja, 1993). Smatra se da je građenje  $\text{ONOO}^-$  primarni put metabolizma NO. U normalnim, nestresnim uslovima koncentracija  $\text{O}_2^-$  je znatno manja od koncentracije NO. Nastajanje  $\text{ONOO}^-$  tako uglavnom zavisi od koncentracije  $\text{O}_2^-$ . Na stvaranje  $\text{ONOO}^-$ , takođe utiče reakcija NO sa oksihemoglobinom ( $\text{HbO}_2$ ) kao i dismutacija  $\text{O}_2^-$  delovanjem superoksid dismutaze (SOD).

Smatra se da je za oksidativni stres izazvan azot monoksidom uglavnom odgovorna peroksinitrilna kiselina ( $\text{ONOOH}$ ). Poluživot  $\text{ONOOH}$  od 1,9s omogućuje joj difuziju od nekoliko ćelijskih dijametara. Peroksinitrilna kiselina može lako da difunduje kroz ćelijske membrane, a  $\text{ONOO}^-$  kroz anjonske kanale u ekstracelularnu sredinu. Time je posrednim putem omogućena i migracija hidroksil radikala ( $\text{OH}^\cdot$ ) koji nastaje razlaganjem  $\text{ONOOH}$ . Ovim mehanizmom je  $\text{ONOOH}$  uključena u niz peroksidativnih reakcija kao na pr. lipidnu peroksidaciju, oksidativnu modifikaciju aminokiselina, oksidaciju riboze i dr. (slika 2.3).

Toksičnost peroksinitrita smanjuju povećane koncentracije NO i  $\text{O}_2^-$  usled hemijskih reakcija sa  $\text{ONOO}^-$ :

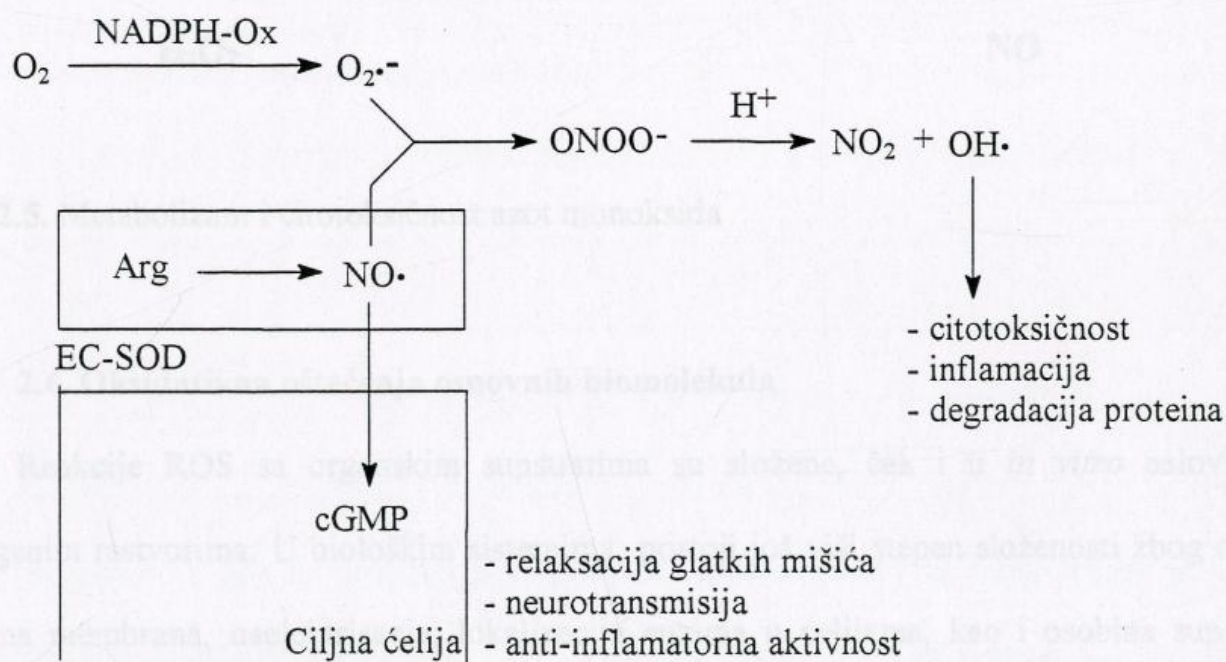


Maksimalna toksičnost se javlja kada su koncentracije NO i  $\text{O}_2^-$  ekvivalentne. Verovatno je mitohondrija najvažniji izvor  $\text{ONOO}^-$  unutar ćelije zbog nastanka  $\text{O}_2^-$  u procesu respiracije. Najvažniju ulogu u kontroli formiranja  $\text{ONOO}^-$  u mitohondriji igra Mn-SOD.



**Slika 2.3.** Metabolički putevi peroksinitrilne kiseline

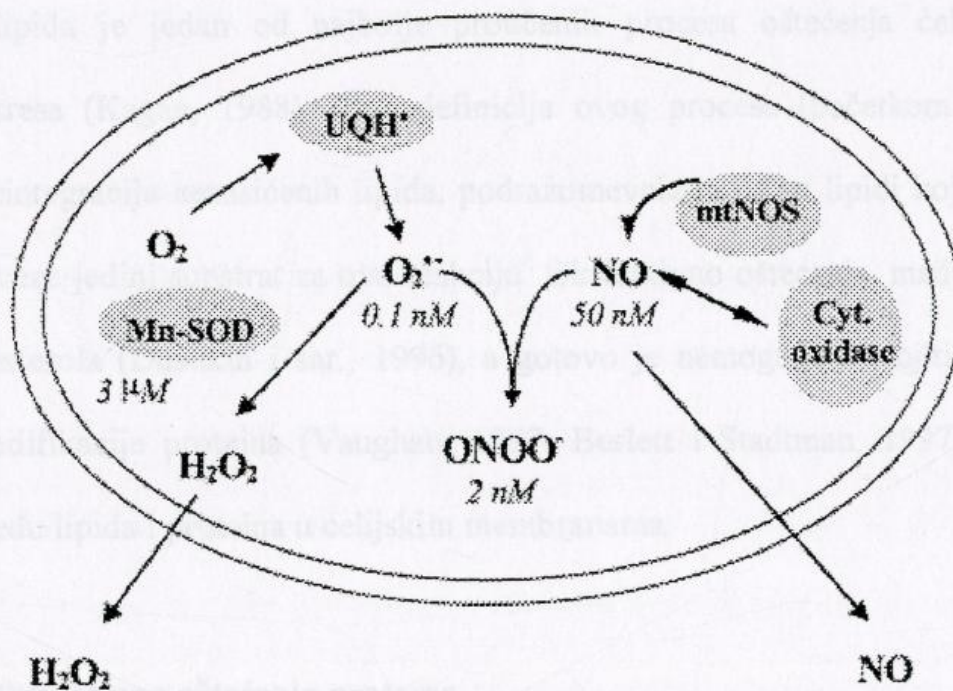
Izuzetnu važnost ima ekstracelularna SOD (EC-SOD) u regulaciji intracelularnog signalnog procesa. Superoksid anjon radikal,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , nastao delovanjem NADPH-oksidge (NADPH-Ox), u reakciji sa NO daje toksični  $\text{ONOO}^-$ . Ekstracelularna SOD dovodi do sniženja koncentracije  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , pa samim tim i  $\text{ONOO}^-$  u vanćelijskom prostoru dok se koncentracija NO povećava. Tako EC-SOD posredno reguliše koncentraciju NO u vanćelijskoj sredini (Fattman i sar., 2000) (slika 2.4).



**Slika 2.4.** Uloga EC-SOD u regulaciji aktivnosti NO



Hemijske reakcije NO mogu da daju citotoksičan ili citoprotektivan efekat. Azot monoksid je toksičan kada je prisutan u velikim koncentracijama (npr. 0,5-1,0 mM natrijum nitroprusid je toksičan za životinje). U tom slučaju NO reaguje i sa malim količinama superoksid anjon radikala dajući izuzetno toksični peroksinitrit (slika 2.5). S druge strane, NO može da reaguje sa reaktivnim intermedijerima lipidne perksidacije kao što su alkil ( $R^{\bullet}$ ), alkoksi ( $RO^{\bullet}$ ) i peroksi ( $ROO^{\bullet}$ ) radikali i da tako zaustavi propagaciju ove lančane reakcije.



Slika 2.5. Metabolizam i citotoksičnost azot monoksida

## 2.6. Oksidativna oštećenja osnovnih biomolekula

Reakcije ROS sa organskim supstratima su složene, čak i u *in vitro* uslovima sa homogenim rastvorima. U biološkim sistemima, postoji još viši stepen složenosti zbog osobina površina membrana, naelektrisanja, lokalizacije enzima u ćelijama, kao i osobina supstrata i katalizatora.

Priroda oksidativnog oštećenja koje dovodi do smrti ćelije nije uvek očigledna. Mehanizmi putem kojih kiseonični radikali oštećuju membranske lipide su dobro proučeni, a

oksidativno oštećenje koje se javlja kao posledica, je često isključivo povezano sa reakcijama peroksidacije membranskih lipida. Međutim, ono što se nekada previdi u istraživanjima, je činjenica da ROS reaguju i sa proteinima i nukleinskim kiselinama.

### **2.6.1. Oksidativno oštećenje lipida – lipidna peroksidacija**

Lipidna peroksidacija predstavlja oksidativno oštećenje različitih lipidnih molekula i kompleksnih biomolekula koje u sebi sadrže lipide (Halliwell i Gutteridge, 1989). Lipidi ćelijske membrane (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol) predstavljaju najčešće mete oksidativnog napada. Peroksidacija lipida je jedan od najbolje proučenih procesa oštećenja ćelije u uslovima oksidativnog stresa (Kagan, 1988). Prva definicija ovog procesa (početkom 19. veka), kao oksidativna dezintegracija nezasićenih lipida, podrazumevala je da su lipidi koji sadrže više od dve dvostruke veze jedini supstrat za ovu reakciju. Oksidativno oštećenje, međutim, obuhvata i oksidaciju holesterola (Dushkin i sar., 1996), a gotovo je nemoguće odvojiti ovaj proces od oksidativne modifikacije proteina (Vaughan, 1997; Berlett i Stadtman, 1997), s obzirom na interakcije između lipida i proteina u ćelijskim membranama.

### **2.6.2. Oksidativno oštećenje proteina**

S obzirom da su proteini glavni ćelijski strukturni i funkcionalni konstituenti, i oni su, takođe, mesto mnogih oksidativnih oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima (Pacifci i Davies, 1991). Već duže vreme je poznato da je *in vitro* oksidacija proteina obično praćena strukturnim modifikacijama, koje za posledicu imaju određene fizikohemijske promene. Na primer, fragmentacija, agregacija, i povećana podložnost proteolizi, samo su neke od tipičnih i važnih promena uočenih na proteinima kada se oksiduju. Oksidativna modifikacija proteina je dokazana u starenju (Pacifci i Davies, 1991), kao i kod mnogih bolesti i stanja, kao što su plućni emfizem, katarakta (Garner i Spector, 1980), reumatoidni artritis (Chapman i sar., 1989),

hronični alkoholizam, kancerogeneza, različita neurološka obolenja, *diabetes mellitus*, obolenja jetre i bubrega (Niederau i sar., 1999) i dr.

Iako stepen i tip efekta na proteinima u velikoj meri zavisi od radikala koji se u reakcijama oslobađaju i vremena izlaganja, moguće je izvršiti sledeću podelu (Stadtman, 1990):

\* Modifikacija primarne strukture proteina, kao posledica:

- modifikacije pojedinih aminokiselina
- gubitka pojedinih aminokiselina
- agregacije proteina
- fragmentacije proteina

\* Modifikacija sekundarne i tercijarne strukture proteina, koja dovodi do:

- promena rastvorljivosti (jača hidrofobnost ili hidrofilnost)
- promena naelektrisanja (ka pozitivnijem ili ka negativnijem)

Oksidativna modifikacija aminokiselina često dovodi do nastanka nekih drugih oblika aminokiselina, što utiče na funkcionalnu aktivnost samog proteina. Međutim, treba napomenuti da nije svaka oksidacija aminokiselina "pogubna" za njenu funkciju. U ćeliji se i prirodno dešavaju oksidacije koje dovode do stvaranja derivata aminokiselina, koji mogu ući u dalje metaboličke puteve. Na primer, od leucina se mogu dobiti različiti tipovi hidroksileucina, triptofan oksidacijom daje N-formil kinurenin, histidin oksidacijom daje aspartat, dok tirozin procesom oksidacije ulazi u put sinteze keteholamina (DOPA) (Davies, 1988).

### **2.6.3. Oksidativno oštećenje DNK**

Kao što je već napomenuto, promene uzrokovane dejstvom slobodnih radikala nisu ograničene samo na membranske lipide (Davies, 1988). Zbog svoje izuzetne reaktivnosti, slobodni radikali su sposobni da modifikuju većinu biomolekula, uključujući DNK.

Molekul DNK predstavlja hemijsku osnovu nasleđivanja kod svih prokariotskih i eukariotskih ćelija. Promene strukture genetskog materijala dovode do genetskih grešaka koje se

nazivaju mutacije. Pored brojnih faktora koji mogu pokazati mutagena svojstva, najveći značaj svakako pripada reaktivnim kiseoničnim česticama. One mogu biti odgovorne za nastanak malignih alteracija ukoliko zahvate specifične protoonkogene (Đorđević i sar., 2000).

Najčešće vrste oštećenja strukture DNK su: prekid lanca DNK, interakcija baza unutar jedne ili između dve DNK spirale, izmena, gubitak, ili modifikacija baza, stvaranje pirimidin dimera, interakcija sa proteinima, lipidnim peroksidima (malonildialdehid), produktima glukooksidacije, oksidativna modifikacija deoksiriboze, i dr. Oštećenjima DNK izazvanim "Fentonovim oksidansima" mogu da podlegnu i baze i šećerna komponenta. Razgradnja baza može da da mnogobrojne proizvode, uključujući 8-hidroksiguanin, hidroksimetilureu, ureu, timinglikol, timin i adenin otvorenog prstena, zasićene proizvode, i čitav niz drugih.

S obzirom na ovako veliki broj promena koje se pod dejstvom slobodnih radikala mogu dešavati na DNK, s pravom bi se moglo postaviti pitanje: Kako genom uopšte preživljava kad je izložen stalnom ataku koji je poguban za strukturu DNK? U ćeliji postoji niz mehanizama (enzimskih i neenzimskih sistema) i redoks reakcija kojima se sprečava, neutrališe ili minimizira ovaj štetan efekat.

## 2.7. Mehanizmi antioksidativne zaštite

U toku evolucije, kao adaptivni odgovor na toksično delovanje kiseonika, kod aerobnih organizama je došlo do stvaranja kompleksnih mehanizama zaštite od oksidativnih oštećenja. Osnovna uloga ovih mehanizama je da smanje količinu i nekontrolisano stvaranje slobodnih radikala i njihovih prekursora u ćeliji.

Mehanizmi antioksidativne zaštite podrazumevaju dva nivoa:

- \* primarna i
- \* sekundarna antioksidativna zaštita.

### *Primarna antioksidativna zaštita uključuje:*

\* enzimske sisteme: superoksid dismutaza, katalaza, ksantin oksidaza, peroksidaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, i dr.

\* neenzimske sisteme:

- liposolubilna jedinjenja: vitamin E, vitamin A,  $\beta$ -karoteni, koenzim Q, i dr.

- hidrosolubilna jedinjenja: vitamin C, glutation, mokraćna kiselina, transferin, ceruloplazmin, i dr.

Posebno mesto u ovim odbrambenim sistemima, i veoma važnu antioksidantnu aktivnost pokazuju flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla (Popović i sar., 2002). Ove grupe jedinjenja su, zbog svojih osobina, poslednjih godina privukle veliku pažnju naučnika. Najnovija obimna istraživanja iz oblasti hemije i biohemije upravo za cilj imaju traganje za odgovorom da li, i kako ove, veoma rasprostranjene molekule u biljnom svetu, mogu pomoći u zaštiti od oksidativnog stresa, i bolesti koje se javljaju kao posledica tog stresa.

Takođe, farmakološki aktivne supstance, kao što su: nesteroidni antiinflamatorni lekovi (Halliwell, 1994), blokatori kalcijuma (Janero i sar., 1988), alopurinol (Miwa-Nishimura i sar., 1990), N-acetilcistein (Aruoma, 1996), ostvaruju neenzimsku antioksidativnu zaštitu putem različitih mehanizama.

Osobine i mehanizam dejstva jedinjenja kojima se pripisuje uloga u primarnoj antioksidativnoj zaštiti detaljno su opisani (Freeman, 1984; Floyd, 1993; Đorđević i sar., 2000; Čebović, 2003, magistarski rad).

*Sekundarna antioksidativna zaštita* podrazumeva enzime, koji učestvuju u ispravljanju nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina. To su prvenstveno proteolitički enzimi, fosfolipaza A2, klasična i fosfolipid-zavisna glutation peroksidaza, glikozilaze, endo- i egzokleaze, DNA ligaze, DNA polimeraze, itd. Ovi enzimi "popravljaju" oštećene DNA molekule, odstranjuju oksidovane masne kiseline membranskih lipida i kroz procese degradacije i ponovne sinteze obnavljaju oksidovane aminokiseline, odnosno proteine.

## 2.8. Uloga oksidativnog stresa u malignoj transformaciji ćelije

Svaki poremećaj ravnoteže između stvaranja reaktivnih metabolita kiseonika i njihovog uklanjanja mehanizmima antioksidativnog, rezultuje nastankom oksidativnog stresa. U oksidativnom stresu povećano je stvaranje i nagomilavanje reaktivnih metabolita, što za posledicu ima oksidativne procese destrukcije ćelijskih komponenti i genetskog materijala.

Utvrdjivanje tačnog učinka slobodnih radikala u patogenezi različitih bolesti je izuzetno teško, zbog njihovog kratkog poluživota i nedostatka dovoljno osjetljivih metoda za njihovu direktnu detekciju u biološkim sistemima. Zato je kod mnogih bolesti još uvek aktuelno pitanje, da li je prisustvo slobodnih radikala uzrok, ili posledica patološkog stanja.

Mnoga istraživanja su, ipak, ukazala na povezanost oksidativnog stresa i mnogobrojnih patoloških stanja organizma. Do sada je poznato da povećana produkcija kiseoničnih radikala i neadekvatna antioksidativna odbrana, predstavljaju značajne uzroke starenja, i razvoja bolesti, kao što su ateroskleroza, osteoporoza, neurodegenerativne (Alzheimer-ova i Parkinson-ova bolest) maligne bolesti (Seis, 2002).

Ukazano je već na činjenicu da i molekularni kiseonik može da pokaže toksično dejstvo ukoliko je organizam izložen njegovoj povećanoj koncentraciji. Izlaganje ljudi dejstvu povišenog pritiska vazduha ( $p > 1 \text{ atm}$ ) ili dejstvu čistog kiseonika ( $p = 1 \text{ atm}$ ) dovode do oštećenja centralnog nervnog sistema praćenih konvulzijama koje su u korelaciji sa sniženjem koncentracije neurotransmitera,  $\gamma$ -aminobuterne kiseline (GABA), kao i oštećenja pluća i ishemije (Mayer i sar., 1992). Povišene koncentracije kiseonika prouzrokuju poremećaj u funkciji endokrinih žlezda (Fotte, 1976). Krvarenje, poznato kao retroletalna fibroplazija, je postalo početkom četrdesetih godina 20. veka veoma rasprostranjeno obolenje kod nedonoščadi, da bi se 1957. godine uzrok ovog obolenja doveo u vezu sa velikom koncentracijom kiseonika u inkubatorima za prevremeno rođene bebe (Halliwell, 1994). Međutim, važno je naglasiti da je toksično dejstvo

samog molekuskog kiseonika na aerobe zanemarljivo, i da su ROS, u stvari, ti koji su najodgovorniji za štetno delovanje kiseonika.

ROS mogu da nastanu u svim ćelijama (tkivima i organima), što može da ima ozbiljne reperkusije u čitavom organizmu. Organizam koristi antioksidantne rezerve u borbi protiv slobodnih radikala, tako da praćenje promena antioksidantnog statusa može da bude dragoceno za ranu detekciju bolesti.

### *Oksidativni stres i maligne bolesti*

Kancerogeneza je složeni, višestepeni proces koji obično uključuje kaskadu događaja u kojima poremećaj funkcije jednog gena aktivira lančane promene koji konačno vode ka nastanku malignog fenotipa ćelije. U razvoju tumora najčešće se, didaktički, razdvajaju tri faze: inicijacija, promocija i progresija. Pojmovi inicijacija i promocija u vezi su sa dejstvom kancerogenih agenasa (Kovačević, 2006).

*Inicijacija* predstavlja inicijalni događaj u kancerogenezi koji predisponira ćeliju na malignu alteraciju. Inicijaciju izazivaju hemijski, fizički ili biološki agensi koji direktno i ireverzibilno menjaju molekularnu strukturu DNK (Kovačević, 2006). *Promociju* izazivaju agensi koji menjaju ekspresiju genetskih informacija ćelije. Faza promocije razvoja tumora pokazuje izrazitu organspecifičnost, a u zavisnosti od prirode tumorskog promotora, razlikuju se i mehanizmi delovanja. Tumorski promotori su agensi (medijatori) koji ne deluju direktno na genom ćelije, već ostvaruju epigenetske efekte (utiču na enzime, receptore, transkripcione faktore i druge značajne regulatorne proteine). Uz to, za razliku od inicijacije koja je ireverzibilna promena, promocija može imati reverzibilan karakter. U evoluciji neoplazme, inicijacija i promocija karakterišu ranu fazu njenog razvoja.

Mnoga organska i neorganska jedinjenja mogu delovati kao promotori i/ili inicijatori kancerogeneze (Đorđević i sar., 2000): policiklični aromatični ugljovodonici (benzo(a)piren, dimetil benzantracen), aromatični amini (2-acetilamino-fluoren, N-metil-4-aminobenzen), nitrozoamini (dimetilnitrozoamin), različiti lekovi – alkilirajući agensi (ciklofosamid,

dietilstilbestrol), komponente hrane (daktinomicin, aflatoksin B1), arsen, azbest, berilijum, kadmijum, hrom, itd. Na osnovu mehanizma delovanja, svi agensi – tumorski promotori, mogu biti svrstani u genotoksične i negenotoksične. Genotoksični efekti nastaju direktnim delovanjem neke supstance ili njenog metabolita na genom, tj. DNK ćelije. Oni izazivaju mutacije DNK. Iz toga proizilazi široko zastupljen stav da je najveći broj mutagena kancerogen. Klasa negenotoksičnih kancerogena podrazumeva agense koji ne reaguju sa DNK, već su stimulatori proliferacije, kao i grupu supstanci poznatu kao citotoksini. No, ova podela ipak nije stroga, budući da mnoge supstance mogu da ispolje oba efekta. U ovu grupu bi se svakako mogle svrstati ROS, s obzirom da one pored genotoksične aktivnosti, dovode i do čitavog niza epigenetskih promena (Hussain i sar., 2003).

Brojni podaci (Abelev i Kopnin, 2000; Sun, 1990) sugerišu da posebno mesto u kancerogenezi pripada slobodnim radikalima za koje se smatra da deluju kao promotivni agensi.

\* Superoksid anjon ali i mnogi peroksidi su promotori tumorskog rasta, dok neki antioksidanti deluju kao antipromoteri i anti-karcinogeni.

\* Slobodni radikali se dovode u vezu sa oštećenjem DNK, kao i sa inhibicijom prirodnih bioloških sistema popravke.

\* Slobodni radikali i ROS mogu da menjaju ekspresiju gena mobilišući depoe kalcijuma, koji aktiviraju čitav niz ćelijskih kinaza, fosfataza i transkripcionih faktora.

\* Lipidna peroksidacija prouzrokovana slobodnim radikalima i ROS se takođe smatra jednim od uzrokujućih faktora razvoja karcinoma.

U relaciji oksidativni stres – kancerogeneza, prisutna je dilema: da li poremećaj u prooksidativnom i antioksidativnom potencijalu ćelije predstavlja jedan od uzroka kancerogeneze ili su ove promene posledice kancerogeneze? Mnoga saznanja idu u prilog pretpostavci da je oksidativni stres jedan od uzroka kancerogeneze.

Već je rečeno da ROS oštećuju DNK i modifikuju proteine. Prvi jasan dokaz efekta na DNK je fragmentacija hromozoma pod dejstvom vodonik peroksida u prisustvu aktivatora



peroksidacije  $\text{Fe}^{3+}$  (Oberley i Oberley, 1994). I različiti sekundarni produkti lipidne peroksidacije, kao što su lipidni peroksidi, aldehidi (4-hidroksinonenal) i malonildialdehid (MDA), predstavljaju mutagene faktore. S druge strane, MDA nastaje i pri procesu degradacije 2-deoksiriboze indukovane gvožđem (Cheeseman i Slater, 1993). Interakcije do kojih dolazi između MDA, na jednoj, i proteina, enzima, RNK, DNK i fosfolipida, na drugoj strani, mogu dovesti do kovalentne modifikacije ovih supstrata. Malonildialdehid brzo reaguje sa  $\epsilon$ -amino grupom aminokiselina (lizin, histidin, tirozin i arginin), kao i sa amino grupama adenina i citozina, dovodeći do interakcija protein-protein ili protein-nukleinska kiselina (Mukai i Goldstein, 1976). Inaktivacija antioksidantnih sistema zaštite, kao i enzima koji vrše reparaciju DNK i proteina, ostvarena oksidacijom njihovih SH- grupa, takođe, predstavlja molekulska bazu kancerogeneze (Henle *et al.*, 1999). Osim pomenutih, visoko reaktivni molekuli za DNK *in vitro* su hidroksil radikal (OH $\cdot$ ) i peroksinitrit (ONOO $\cdot$ ). Efekat hidroksil radikala *in vivo* je teško utvrditi zbog njegovog veoma kratkog poluživota, ali je za peroksinitrit, međutim, dobro poznato da može da difunduje u ćeliji i vrši oštećenja, naročito tokom hroničnih inflamacija. Manje reaktivan molekul je NO koji takođe difunduje i izaziva somatske mutacije protoonkogeni i gena supresora (Hussain i sar., 2003). Iako je teško utvrditi specifičnu ulogu NO u kancerogenezi, on kao agens koji modifikuje proteine važne za funkciju ćelije, može delovati na ćelijski ciklus, apoptozu i proces reparacije DNK, a time indukovati i malignu transformaciju (Oberley, 2002). Pokazano je da NO posreduje u pojavi angiogeneze (Sharma i sar., 1995). Kada se govori o povezanosti ROS i maligniteta, valja pomenuti i osobinu ROS da aktiviraju transkripciju nekih protoonkogeni uključujući Fos, Jun i c-Myc (Lyu i sar., 2002) koji stimulišu rast. Od posebnog značaja je mutacija p53 gena koju može izazvati NO i koja stoji duboko u vezi sa kancerogenezom. Na kraju valja reći i da postoje brojni inflamacijski procesi, izazvani ne samo virusima i bakterijama, već i hroničnim mehaničkim i hemijskim nadražajima tokom kojih se produkuju slobodni radikali i koji predstavljaju rizik za pojavu maligniteta (Hussain i sar., 2003). Ovo bi se moglo objasniti, makar delimično, aktivacijom enzima kao što je NO sintaza

(Kovačević, 2006). Enzim NO sintaza (inducibilna, iNOS) može proizvoditi mikromolarne količine NO, ključnog molekula u inflamatornoj kancerogenezi. Sem toga, pojačana aktivnost iNOS i pojačana ekspresija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta, VEGF (Mayers i sar., 1985) imaju za posledicu pojavu neovaskularizacije što ukazuje da ovaj enzim igra značajnu ulogu i u progresiji neoplazme.

### *Antioksidansi i maligne bolesti*

Povećan unos antioksidanasa, bilo putem hrane, ili kao suplemenata ishrani, povezan je sa smanjenom učestalošću karcinoma (Block i sar., 1992). Epidemiološke studije su pokazale da su niski nivoi antioksidanasa povezani sa povećanom učestalošću određenih karcinoma.

Linxian u Kini je poznat po najvećem procentu obolelih od karcinoma jednjaka u svetu. Nedavno sprovedeno istraživanje je pokazalo da je dodatak antioksidanasa u ishrani smanjio smrtnost od karcinoma za približno 13% u periodu od 5 godina (Blot i sar., 1993).

Ono što još uvek nije sa sigurnošću poznato je, da li je snižen ukupni antioksidantni status primarni i/ili sekundarni efekat. Kombinacija ova dva efekta najverovatnije odražava sliku situacije *in vivo*.

Antioksidantna jedinjenja deluju kao integrisani sistem i neki antioksidanti male molekulske mase (na pr. flavonoidi i fenolna jedinjenja iz biljaka) bi mogli biti važni za regeneraciju drugih antioksidanata, a time moguće i u prevenciji nastanka malignih oboljenja.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitivanje *in vitro* i *in vivo* uticaja ekstrakata imele (*Viscum album* L.) sa različitih domaćina na stvaranje reaktivnih kiseoničnih čestica i aktivnost antioksidantnih enzima u normalnim i tumorskim ćelijama.

Da bi se realizovao cilj:

1. određivan je sadržaj različitih bioaktivnih jedinjenja: hlorofila *a* i *b*, karotenoida, vitamina C, ukupnih fenola, tanina, ukupnih flavonoida, antocijanidina i galne kiseline u uzorcima listova *V. album* sa sedam različitih domaćina.

2. u *in vitro* uslovima je ispitivan uticaj ekstrakata *V. album* na

- a) proces *in vitro* lipidne peroksidacije (LPx) indukovane sa  $\text{CCl}_4$  kao poznatim veoma snažnim induktorom oksidativnog stresa, korišćenjem komercijalnog preparata lipozoma kao model sistema ćelijske membrane
- b) produkciju hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) radikala..
- c) stvaranje DPPH $^\cdot$  radikala.
- d) ukupan antioksidantni potencijal primenom FRAP metode.
- e) stvaranje azot monoksida (NO).

3. u *in vivo* uslovima ispitivano je dejstvo ekstrakta *V. album* na

- a) funkciju jetre, enzimske parametre oksidativnog stresa i serumske parametre oksidativnog oštećenja jetre izazvanog  $\text{CCl}_4$ -om.
- b) rast Ehrlich-ovih ascitnih tumora implantiranih NMRI miševima i biohemijske parametre oksidativnog stresa (antioksidantni enzimi: XOD, CAT, Px, GSHPx, GR, sadržaj GSH, intenzitet LPx) u ćelijama tumora.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. Biljni materijal

Listovi imele, sa *V. album* koja raste na različitim domaćinima (bagrem (*Robinia pseudoacacia*), kruška (*Pyrus communis*), šljiva (*Prunus domestica*), topola (*Populus nigra*), glog (*Crataegus oxycanta*), šipak (*Rosa canina*) i kleka (*Juniperus communis*)), sakupljeni su u proleće na Fruškoj Gori (Vojvodina, Srbija), odnosno na prostoru Hercegovine – Romanija, Perućac (Republika Srpska, Bosna i Hercegovina).

### 4.2. Priprema biljnih ekstrakata

Listovi imele, sa pomenutih domaćina, osušeni na vazduhu (5g), usitnjeni u mikseru, korišćeni su za pripremu vodenih ekstrakata *V. album* koji su se koristili u daljim eksperimentima. Aktivne komponente su ekstrahovane sa metanolom (MeOH), postupkom maceracije tokom tri dana. Rastvarač je zatim uparen pomoću vakuum uparivača. Sirovi MeOH ekstrakti su zatim procedeni preko guste filter hartije i razblaženi sa vodom kako bi se dobili čisti 5% vodeni ekstrakti *V. album* listova sa različitih domaćina. Ekstrakti su čuvani u frižideru (4-8°C). Pripremljeni ekstrakti su korišćeni u *in vitro* ispitivanjima, a eksperimentalnim životinjama u *in vivo* eksperimentima su davani intraperitonealno (i.p).

### 4.3. Fitohemijsko ispitivanje ("screening" test) *Viscum album* L.

Za "screening" test, posebno su pripremljeni infuzi listova imele sa pojedinih domaćina. Infuz je pripremljen tako što je 6 g osušenog i usitnjenog biljnog materijala preliveno sa 60 mL ključale destilovane vode. Nakon 15 minuta, infuz je proceden i korišćen u daljem radu.

Prisustvo pojedinih klasa sekundarnih biomolekula dokazano je postupcima prikazanim u tabeli 4.1.

**Tabela 4.1.** Postupak za dokazivanje pojedinih klasa sekundarnih biomolekula

Klasa sekundarnih biomolekula	Postupak dokazivanja pojedinih klasa	Promena koja upućuje na pozitivnu reakciju
Antocijani	1 mL infuza + HCl	crvena ili crvenonarandžasta boja rastvora
Leukoantocijani	1 mL infuza + 1 mL EtOH zakišljenog sa HCl, zagrevanje	crvena ili crvenonarandžasta boja rastvora
Flavonoidi	1 mL infuza + 4 mL 50% EtOH + nekoliko kapi cHCl + Mg opiljci	crvenoljubičasta ili crvenonarandžasta boja rastvora
Tanini	2 mL infuza + 1-2 kapi 1% FeCl <sub>3</sub>	crvenkasta ili zelena boja rastvora
Alkaloidi	1 mL infuza zakišljenog sa 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Mayer-ov reagens*	pojava taloga
Slobodni hinonski derivati	2 g usitnjenog biljnog materijala + 5 mL CHCl <sub>3</sub> (maceracija) + KOH(NaOH)	crvena boja filtrata
Vezani hinonski derivati	1 mL infuza + 1 mL 5% HCl, zagreva se 3 min. + CHCl <sub>3</sub> , ekstrakcija CHCl <sub>3</sub> ekstrakt + KOH(NaOH)	crvena boja ekstrakta
Saponini	snažno mućkanje	pojava pene
Supstance sa steroidnom strukturom	1 mL alkoholnog ekstrakta infuza + nekoliko kapi CH <sub>3</sub> COOH + 3 mL rastvora (CH <sub>3</sub> COOH:ccH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> =50:1)	ljubičasta boja rastvora koja prelazi u zelenu
Cijanogeni heterozidi	infuz se zagreva, a isparenja dovode u vezu sa žutom pikronatrijumovom hartijom	crvena boja pikronatrijumove hartije

\* - Ova reakcija nije dovoljno specifična, jer je daju i holin, amini, kvaternerne amonijumove soli, i dr. Ako se test ponovi sa Dragendorfovom reagensom, pojava žutog taloga dokaz je prisustva alkaloida.

Određivanje sadržaja pojedinih klasa sekundarnih biomolekula sa potencijalnim anti/prooksidantnim karakteristikama, rađeno je po postupcima preuzetim iz Popović i Malenčić (2006).

### 4.3.1. Određivanje sadržaja karotenoida i hlorofila

Za određivanje sadržaja karotenoida i hlorofila u uzorcima listova *V. album* sa različitih domaćina korišćena je spektrofotometrijska metoda po Wettsteinu (1957).

Listovi zelene biljke sitno se iseckaju makazama (izbegavati glavni lisni nerv) i odmeri se 0,4 g. Biljnom materijalu se doda na vrh špatule  $\text{CaSO}_4$  čime se neutrališu kiseline koje se izlučuju iz ćelija u toku homogenizacije i sprečava izdvajanje Mg iz hlorofila. Homogenizacija se vrši sa 10 mL 80% acetona (oko 3 min). Zeleni rastvor se filtrira preko vate (ili guste filter hartije) i levka direktno u odmerni sud. Preostalo biljno tkivo u avanu se po potrebi još jedan put homogenizuje, a avan i tučak se isperu acetonom. Odmerni sud se zatim dopuni 80% acetonom do crte.

Apsorbancija acetonskog rastvora hlorofila i karotenoida se očitava na spektrofotometru na talasnim dužinama od 440, 644 i 662 nm naspram 80% acetona (slepa proba). Nakon očitavanja na spektrofotometru izračunava se sadržaj hlorofila i karotenoida u biljnom tkivu i izražava jedinicom mg/g suve materije iz sledećih jednačina (Popović i Malenčić, 2006):

$$\text{Chla} = (9,784 \times A_{662} - 0,99 \times A_{644}) \times V / (1000 \times m)$$

$$\text{Chlb} = (21,42 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662}) \times V / (1000 \times m)$$

$$\text{Car} = (4,695 \times A_{440} - 0,268 \times (Aa + Ab))$$

gde je:

Chla – koncentracija hlorofila a (mg hlorofila a/g s.m.)

Chlb – koncentracija hlorofila b (mg hlorofila b/g s.m.)

A – očitane apsorbancije ekstrakata hlorofila na spektrofotometru na određenim talasnim dužinama prikazanim u indeksu

V – ukupna zapremina ekstrakta u 80% acetonu (mL)

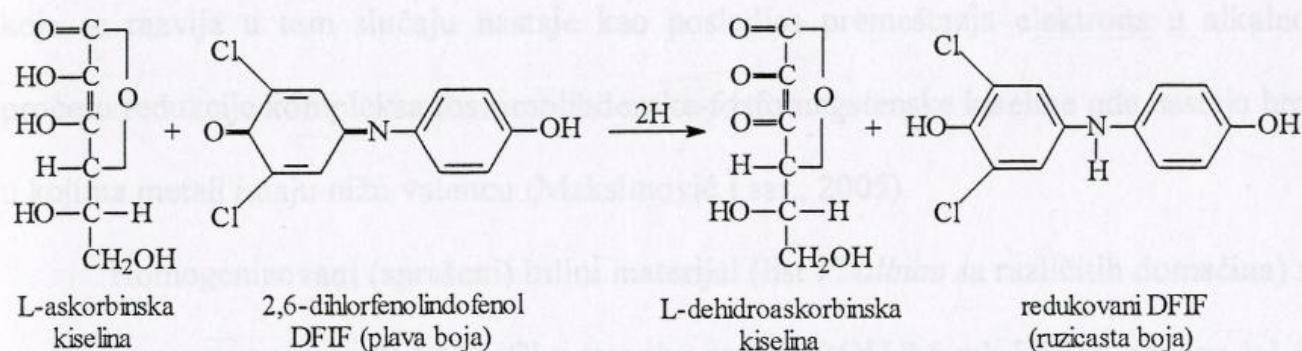
m – odmerena masa biljnog materijala (g)

$$Aa = 9,784 \times A_{662} - 0,99 \times A_{644}$$

$$Ab = 21,42 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662}$$

### 4.3.2. Određivanje sadržaja L-askorbinske kiseline (vitamina C)

Određivanje sadržaja vitamina C zasniva se na njegovoj velikoj redukcionoj moći. Najčešće se kao reagens koristi 2,6-dihlorfenol-indofenol (DFIF), koji je, kada se nalazi u oksidovanom obliku, u kiseljoj sredini ružičasto obojen dok je u baznoj sredini plavo obojen. Pri titraciji rastvora ili ekstrakta koji sadrže L-askorbinsku kiselinu rastvorom DFIF-a, dolazi do oksidacije askorbata i redukcije DFIF-a (slika 4.1).



**Slika 4.1.** Oksidacija askorbata i redukcija DFIF-a uz promenu boje.

Za određivanje se odmeri 0,2 g biljnog materijala (listova *V. album* sa različitim domaćina) i homogenizuje u porcelanskom avanu uz dodatak kvarcnog peska. Homogenatu se doda 15 mL 0,2% CH<sub>3</sub>COOH. Nastalu suspenziju dobro izmešati i filtrirati u odmerni sud od 100 mL. Odmerni sud se dopuni istim rastvorom kiseline. Alikvoti od 20 mL ekstrakta se zatim zakisele sa 2-3 kapi glacijalne sirćetne kiseline i titruju sa DFIF-om do pojave postojane ružičaste boje.

Sadržaj vitamina C (mg%) izračunava se pomoću formule:

$$\text{mg\%vit.C} = \frac{A \cdot T \cdot V}{g \cdot B} \cdot 100$$

gde je:

A – broj mL rastvora DFIF-a utrošenih za titraciju

T – titar rastvora (broj g supstance u 1 mL rastvora; 1)

V – ukupno razblaženje (100 mL)

B – odmerna proba (20 mL)

g – odvaga uzorka (0,2 g)

100 – %

#### 4.3.3. Određivanje ukupnih fenola (po Folin-Ciocalteu)

Folin-Ciocalteu fenolni reagens na kome se zasniva ova metoda sam ne sadrži fenole. Zapravo, ovaj reagens stupa u reakciju sa fenolnim jedinjenjima i ne-fenolnim redukujućim supstancama pri čemu nastaju hromogeni koji se mogu detektovati spektrofotometrijski. Boja koja se razvija u tom slučaju nastaje kao posledica premeštanja elektrona u alkalnoj pH u procesu redukcije kompleksa fosfomolibdenske-fosfotungstenske kiseline gde nastaju hromogeni u kojima metali imaju nižu valencu (Maksimović i sar., 2005).

Homogenizovani (sprašeni) biljni materijal (list *V. album* sa različitih domaćina) nalije se sredstvom za ekstrakciju (0,1 M HCl u etanolu; na 1 L EtOH 8,6 mL HCl) u odnosu 1:1 (ako je u pitanju svež, sočan materijal). Ako je u pitanju suvi, sprašeni materijal, 200 mg se odmeri u čašu od 25 mL, i doda se 10 mL ekstrakcionog sredstva (1:50, m/V). Ova smeša se stavi 45 minuta na magnetnu mešalicu, a zatim profiltrira kroz normalni laboratorijski filter papir. U literaturi se preporučuje upotreba rastvarača vodeni acetonski (70%) i metanolni (50%) rastvor. Ekstrakcija se vrši na tamnom i hladnom mestu, po mogućnosti što kraće (ultrazvučno vodeno kupatilo 20 min na sobnoj temperaturi).

*Slepa proba* – radna proba, izuzev što u slepu ne ide 0,1 mL uzorka (umesto toga: 0,1 mL vode)

*Radna proba* – 8,4 mL demineralizovane vode

0,1 mL uzorka

0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno ga rastvoriti sa vodom 1:2, čuvati u frižideru u tamnoj boci)

Promućkati i ostaviti da stoji 3-6 min.



centrifugirati 10 min 1,0 mL 20% zasićenog rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 g rastvoriti u 150 mL vode i dopuniti do 200 mL). Snažno promućkati.

Nakon 30-60 min meri se apsorbanca na 720 nm (preuzeto iz Popović i Malenčić, 2006). Izračunavanje sledi iz kalibracione krive standarda (+)-katehina (ili taninske kiseline, Merck) koja se pravi na osnovu različitih koncentracija katehina (između 30 i 500 mg katehina/L). Rezultati se očitavaju u mg katehina/L (mg kateh/L = apsorbanca uzorka x 873,74), a zatim preračunavaju na *mg/100g suve mase*:

$$\text{mg kateh/L} : 1000 = \text{mg kateh/mL}$$

$$\text{mg kateh/mL} \times 50 = \text{mg kateh/g s.m.} \times 100 = \text{mg kateh/100g s.m.}$$

**Tabela 4.2.** Kalibraciona kriva određivanja ukupnih fenola

Rastvor (+)-katehina (0,1mg/mL) (mL)	Destilovana voda (mL)	Folin-ov reagens (mL)	Rastvor Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	Apsorbanca na 725nm	(+)-katehin (µg)
0,00	0,50	0,25	0	0,000	0
0,02	0,48	0,25	10	0,112	2
0,04	0,46	0,25	20	0,218	4
0,06	0,44	0,25	30	0,327	6
0,08	0,42	0,25	40	0,432	8
0,10	0,40	0,25	50	0,538	10

#### 4.3.4. Određivanje ukupnih tanina

Nerastvorni polivinil polipirrolidon (polivinil polipirrolidone, PVPP; Sigma, P 6755) vezuje tanine (Hagerman i sar., 2000). Odmeriti 100 mg (0,1 g) PVPP u 100x12 mm epruvetu. Dodati 1,0 mL destilovane vode i 1,0 mL biljnog ekstrakta (100 mg PVPP je dovoljno da veže 2 mg ukupnih fenola; ako je njihov sadržaj u biljnom materijalu veći od 10 % s.m., razblažiti ekstrakt). Snažno promućkati. Epruvete staviti na 4°C 15 min, opet promućkati, zatim

centrifugirati 10 min na 3000 o/min. Odliti supernatant. U njemu su sadržani samo prosti, ne taninski fenoli. Tanini su vezani za PVPP (precipitirani).

Odrediti sadržaj ukupnih fenola (po prethodnoj metodi) u supernatantu. Potrebno je udvostručiti zapreminu uzorka tj. da bude 0,2-0,3 mL jer je ekstrakt već dvostruko razblažen u postupku plus deo tanina se gubi iako su vezani za PVPP. Kao rezultat se dobija sadržaj netaninskih fenola, a sadržaj tanina u uzorku se dobije iz razlike sadržaja ukupnih fenola (određeno po prethodnoj metodi) i sadržaja netanina (određeno po ovom postupku), jer svi tanini jesu fenoli ali svi fenoli nisu tanini. Izračunavanje se vrši po prethodnom postupku.

#### 4.3.5. Određivanje ukupnih flavonoida

1 g samlevene droge homogenizovati sa 20 mL rastvora za ekstrakciju (u 140 mL MeOH se doda 50 mL destilovane vode i 10 mL  $\text{ccCH}_3\text{COOH}$ ) i uz mešanje ostaviti da stoji 60 min. Nakon toga preko vate procediti rastvor u odmerni sud od 100 mL, pa vatu isprati tri puta sa po 20 mL rastvora za ekstrakciju i dopuniti istim rastvorom do crte. 2,5 mL ovog rastvora preneti u odmerni sud od 50 mL i dopuniti destilovanom vodom do crte.

Flavonoidi daju sa metalnim jonima odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito je značajan Al-kompleks jer se on vezuje za ukupne flavonoide pa se sumarni apsorpcioni maksimum lako određuje (Rechner, 2000).

*Slepa proba* – radna proba, osim što u slepu ne ide rastvor  $\text{AlCl}_3$  (umesto toga destilovana voda, ukupno 3,5 mL)

*Radna proba* – 5,0 mL ekstrakta

1,0 mL destilovane vode

2,5 mL rastvora  $\text{AlCl}_3$  (rastvoriti 133 mg  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i 400 mg  $\text{CH}_3\text{COONa}$  u 100 mL destilovane vode)

Spektrofotometrijsko očitavanje se vrši na talasnoj dužini 430 nm u staklenim kivetama.

Za svaki uzorak određuje se apsorbancu iz razlike apsorbance Ar.p. – As.p. Zatim se crta kalibraciona kriva koja predstavlja funkciju zavisnosti apsorbance od koncentracije rutina. Iz kalibracione krive se očitava koncentracija flavonoida u biljnom materijalu i izračunava po obrascu (Popović i Malenčić, 2006):

$$0,0025 \text{ g s.m.} : \Delta E(\text{g}) = 100 \text{ g s.m.} : x \text{ g U.F. } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m.}$$

Odnosno, 5,0 mL uzorka sadrži 0,0025 g biljnog materijala, a ako je Ar.p.<sub>430</sub> iznosila 0,02, to odgovara na kalibracionoj krivoj količini od 10 µg rutina = 0,01 mg = 0,00001 g. Dakle,

$$0,0025 : 0,00001 = 100 : x,$$

$$x = 0,4 \text{ g tj. } 400 \text{ mg rutina } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m.}$$

**Tabela 4.3.** Kalibraciona kriva određivanja ukupnih flavonoida

Rastvor rutina (mL)	Destilovana voda (mL)	Rastvor AlCl <sub>3</sub> (mL)	Apsorbancu na 430nm	Rutin (µg)
0	12	5	0	0
1	11	5	0,025	10
2	10	5	0,040	20
3	9	5	0,065	30
4	8	5	0,090	40
5	7	5	0,110	50
6	6	5	0,125	60
7	5	5	0,150	70

#### 4.3.6. Određivanje proantocijanidina (kondenzovanih tanina)

Proantocijanidini ili flavolani su kondenzovani proizvodi katehina (ili epikatehina) i flavan-3,4-diola. Postoje dve vrste ovih dimernih jedinjenja: procijanidin B u kome su monomeri povezani jednom vezom, i proantocijanidin A<sub>2</sub> u kome su monomerne jedinice povezane sa dve valence. Ova jedinjenja pokazuju antioksidantne efekte (Porter i sar., 1986).

U epruvetu se pipetira 0,5 mL ekstrakta (po potrebi razblaženog sa 70% acetonom, ako očitavanja apsorbance u uzorku prelaze 0,6) i dodati 3,0 mL butanol-HCl reagensu (95:5 v/v) i 0,1

mL feri reagensa (2% feri amonijum sulfat u 2 M HCl). Snažno promućkati, i staviti na ključalo vodeno kupatilo 60 min. Nakon hlađenja očitava se apsorbanca na 550 nm.

Proantocijanidini se izražavaju u % suve mase, kao leukocijanidin ekvivalenti, po sledećoj formuli:

$$(A_{550} \times 78,26 \times \text{razblaženje}) / (\%s.m.),$$

pri čemu se podrazumeva da je  $E^{1\%, 1\text{cm}, 550\text{nm}}$  za leukocijanidin = 460. Faktor razblaženja je 1 ako 70% aceton nije dodat u uzorak. Tamo gde jeste, faktor razblaženja iznosi: 0,5 mL/ (zapremina uzetog ekstrakta).

#### 4.3.7. Određivanje slobodne galne kiseline

Otpipetira se 200  $\mu\text{L}$  biljnog ekstrakta (za određivanje ukupnih fenola) u epruvetu 160x12 mm (4 epruvete po uzorku). Zatim se ukloni organski rastvarač iz uzorka pomoću vakuum sušnice. Doda se 200  $\mu\text{L}$  0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  u epruvete sa osušenim biljnim ekstraktom. U tri epruvete se doda 300  $\mu\text{L}$  rastvora rodanina (Sigma R 4375; 0,667% m/v u metanolu), a u četvrtu 300  $\mu\text{L}$  MeOH (kontrola). Nakon 5 min doda se 200  $\mu\text{L}$  rastvora 0,5 M KOH u sve epruvete. Sačeka se 2,5 min i doda 4,3 mL destilovane vode. Nakon 15 min meri se apsorbanca na 520 nm.

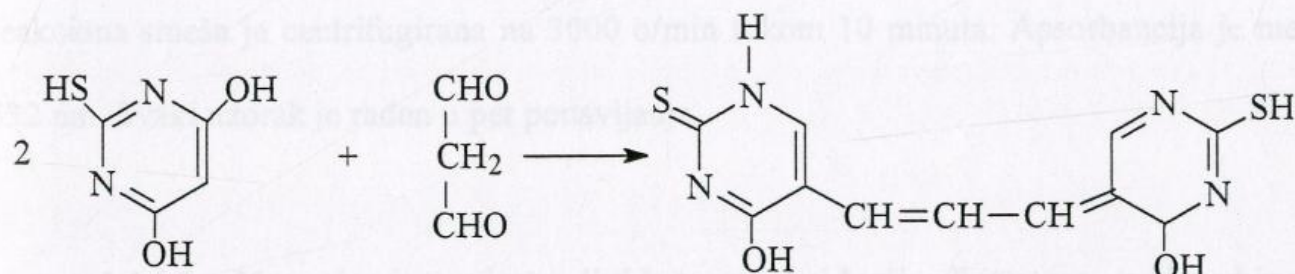
Izračunavanje sledi iz kalibracione krive standarda galne kiseline koja se pravi na osnovu različitih koncentracija galne kiseline (Inoue i Hagerman, 1988).

#### 4.4. *In vitro* ispitivanje antioksidantnih svojstava *Viscum album* L. sa različitim domaćina

##### 4.4.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije

Intenzitet peroksidacije lipida određen je iz količine malonildialdehida (MDA), nastalog u procesu peroksidacije membranskih lipida, modifikovanom metodom po Buege-Aust-u (1978). Takozvani TBA test (TBA-tiobarbiturna kiselina) je jedna od najčešće primenjivanih metoda za

određivanje intenziteta peroksidacije nezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu ćelijskih membrana. Metoda se zasniva na formiranju obojenog kompleksa TBA sa MDA, koji nastaje u reakciji malonildialdehida kao produkta peroksidacije lipida, i tiobarbiturne kiseline (slika 4.2). Kompleks pokazuje maksimum apsorpcije na 532 nm.



Tiobarbiturna kiselina  
(TBA)

Malonildialdehid  
(MDA)

Obojeni kompleks  
(sa max. apsorpcije 532 nm)

**Slika 4.2.** TBA – test, reakcija formiranja obojenog kompleksa TBA sa MDA

Kao model sistem biološke membrane korišćen je komercijalni preparat prolipozoma "PRO-LIPO S" (Lucas Meyer GmbH & Co., Hamburg, Nemačka) sa 30% fosfatidilholina soje, pH=5-7. Preparat lipozoma je dobijen tako što su "PRO-LIPO S" prolipozomi razblaženi sa demineralizovanom vodom (1:10). Rastvaranje se odvijalo u ultrazvučnom kupatilu, 20-30 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijeni lipozomi su bili dijametra 225-250 nm sa udelom fosfolipida od 3% i korišćeni su za *in vitro* određivanje intenziteta peroksidacije lipida.

\* Kontrola: suspenzija lipozoma

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=7,50 \cdot 10^{-2}$  mol/L

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

fosfatni pufer, pH 7,4

50%-ni rastvor etanola (EtOH)

\* Proba: suspenzija lipozoma

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=7,50 \cdot 10^{-2}$  mol/L

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

fosfatni pufer, pH 7,4

odgovarajući biljni ekstrakt

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

#### 4.4.1.1. Merenje intenziteta lipidne peroksidacije lipozoma u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida

\* Kontrola: suspenzija lipozoma

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=7,50 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$

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

fosfatni pufer, pH 7,4

50%-ni rastvor etanola (EtOH)

rastvor  $\text{CCl}_4$  u 50% etanolu

\* Proba: suspenzija lipozoma

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=7,50 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$

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

fosfatni pufer, pH 7,4

odgovarajući biljni ekstrakt:

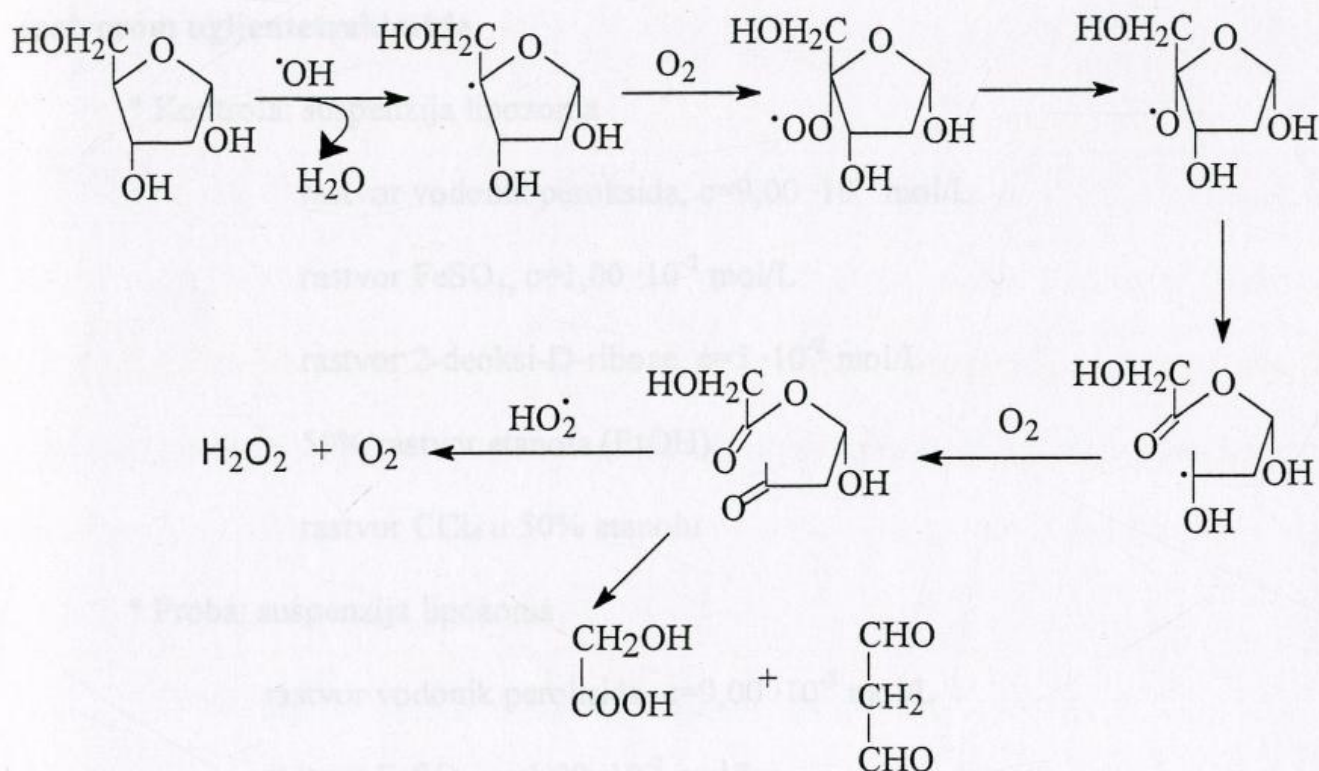
rastvor  $\text{CCl}_4$  u 50% etanolu

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

#### 4.4.2. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala ( $\text{OH}^\bullet$ )

Intenzitet produkcije hidroksil radikala ( $\text{OH}^\bullet$ ) je određen praćenjem hemijske reakcije degradacije deoksiriboze (slika 4.3). Reakciju počinju  $\text{OH}^\bullet$  radikali, dobijeni u Fentonovoj

reakciji\*, oduzimanjem atoma vodonika sa deoksiriboze, pri čemu nastaju proizvodi koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA-test). Nastali proizvodi, među kojima je najvažniji malonildialdehid, određuju se spektrofotometrijskom metodom po Buege-Aust-u.



Slika 4.3. Degradacija 2-deoksi-D-riboze do MDA

\* Kontrola: suspenzija lipozoma

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

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=1,00 \cdot 10^{-2}$  mol/L

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

50% rastvor etanola (EtOH)

\* Proba: suspenzija lipozoma

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

\* U reakciji  $\text{Fe}^{2+}$  jona sa vodonik peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nastaje hidroksil radikal, koji je glavni pokretač razgradnje 2-deoksiriboze do krajnjih produkata, od kojih je za samu metodu najvažniji MDA.

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=1,00 \cdot 10^{-2}$  mol/L

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

odgovarajući biljni ekstrakt:

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

#### 4.4.2.1. Merenje intenziteta produkcije hidroksil radikala ( $\text{OH}^\bullet$ ) u kombinaciji sa rastvorom ugljentetrahlorida

\* Kontrola: suspenzija lipozoma

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

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=1,00 \cdot 10^{-2}$  mol/L

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

50% rastvor etanola (EtOH)

rastvor  $\text{CCl}_4$  u 50% etanolu

\* Proba: suspenzija lipozoma

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

rastvor  $\text{FeSO}_4$ ,  $c=1,00 \cdot 10^{-2}$  mol/L

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

odgovarajući biljni ekstrakt

rastvor  $\text{CCl}_4$  u 50% etanolu

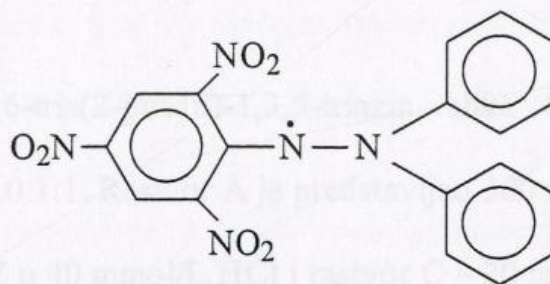
Dalji postupak je isti kao i kod određivanja intenziteta lipidne peroksidacije.

#### 4.4.3. Određivanje stepena inhibicije DPPH radikala

Određivanje stepena inhibicije DPPH radikala – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (slika 4.4) je jedna od veoma pogodnih metoda za određivanje antioksidantnog potencijala biljnih preparata u *in vitro* sistemima. Metoda se zasniva na promeni ljubičaste boje DPPH



radikala u žutu kada je on inhibiran, odnosno "uhvaćen" od strane antioksidanata iz ispitivanog ekstrakta.



**Slika 4.4.** DPPH radikal

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

\* Slepa proba: 4 mL metanola

\* Korekcija: 10  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg ispitivanog ekstrakta *V. album*

\* Kontrola: 1 mL 90  $\mu\text{mol/L}$  rastvora DPPH radikala

3 mL metanola

\* Proba: 1 mL 90  $\mu\text{mol/L}$  rastvora DPPH radikala

3 mL metanola

50, 20, 10  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg ispitivanog ekstrakta *V. album*

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

#### 4.4.4. Određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP metodom

U cilju dobijanja potpunije informacije o antioksidantnim svojstvima ispitivanih ekstrakata *V. album* sa sedam različitih domaćina, u ovoj disertaciji je testirana i ukupna

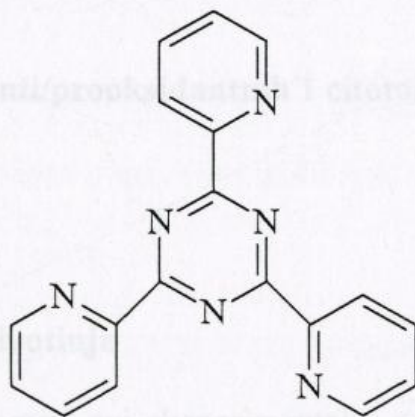
antioksidantna aktivnost metodom FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*), (Benzie i Strain, 1999). Ovo je spektrofotometrijska metoda zasnovana na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ , pod uticajem biljnog ekstrakta.

FRAP reagens (2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazin, slika 4.5) je dobijen mešanjem tri rastvora, A, B i C u odnosu 10:1:1. Rastvor A je predstavljao 300 mmol/L acetatni pufer pH=3,6; rastvor B – 10 mmol/L TPTZ u 40 mmol/L HCl i rastvor C – 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3$ . U FRAP reagens je dodato 100  $\mu\text{l}$  uzorka. Svi antioksidanti prisutni u ekstraktu koji imaju dovoljno nizak redoks potencijal redukuju jone  $\text{Fe}^{3+}$ . Fero-joni ( $\text{Fe}^{2+}$ ), nastali na ovaj način, grade sa prisutnim ligandom plavo obojeni kompleks,  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (gvožđe-tripiridiltriazin).

Razvijanje plave boje, prati se 4 min na 593 nm u odnosu na destilovanu vodu. Rezultat se izražava kao koncentracija  $\text{Fe}^{2+}$  jona, u  $\mu\text{mol/L}$ , nastalih u reakcionom sistemu pri opisanim uslovima ili u FRAP jedinicama (1 FRAP jedinica odgovara 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_2$ ).

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

Svaki uzorak je rađen u pet ponavljanja.



Slika 4.5. TPTZ – 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazin

#### 4.4.5. Određivanje stepena inhibicije stvaranja azot monoksida, NO

Inhibicija azot monoksida je određena spektrofotometrijskim merenjem stvaranja nitritnih jona (Harald i sar., 1996). Azot monoksid, nastao iz natrijum nitroprusida (SNP) u

vodenom rastvoru pri fiziološkim pH, reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone koji se određuju pomoću Griess-ove reakcije.

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

Radna proba je pripremljena mešanjem SNP-a (natrijum nitroprusid), rastvora uzorka (odgovarajućeg ispitivanog ekstrakta *V. album* u fosfatnom puferu) i fosfatnog pufera pH=7.

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

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

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

#### **4.5. In vivo ispitivanja anti/prooksidantnih i citotoksičnih efekata *Viscum album* L. sa različitih domaćina**

##### **4.5.1. Eksperimentalne životinje**

Postupak rada sa životinjama i svi eksperimentalni protokoli su sprovedeni u skladu sa Pravilnikom o radu i korišćenju laboratorijskih životinja koji uređuje Etička komisija pri Univerzitetu u Novom Sadu. Tokom izrade ove disertacije korišćene su dve vrste eksperimentalnih životinja: mužjaci i ženke miševa soja *Hannover National Medical Institute* (Hann:NMRI) i mužjaci i ženke pacova soja *Sprague Dawley*. Sve životinje su dobijene iz laboratorije Samostalnog odseka za biohemiju Instituta za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Novi Sad (Novi Sad, Vojvodina, Srbija). Sve eksperimentalne životinje su čuvane u

odgovarajućim kavezima, u strogo kontrolisanim uslovima temperature (25°C) i vlažnosti vazduha (30-50%), pri režimu svetlo-12h/tama-12h. Takođe, eksperimentalne životinje su imale slobodan pristup odgovarajućoj standardnoj hrani za miševе (LM<sub>2</sub> sa 19% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Vojvodina, Srbija), odnosno pacove (PA sa 20% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Vojvodina, Srbija) i vodi. *In vivo* eksperimenti iz ove disertacije rađeni su sa NMRI miševima oba pola, starosti 6-8 nedelja, telesne mase 25 g±10%, i pacovima *Sprague Dawley* oba pola, starosti 7-8 nedelja, telesne mase 200-250 g.

Eksperimenti su urađeni sa pripremljenim vodenim ekstraktima *V. album* sa različitih domaćina (poglavlje 3.2.). Sve životinje su jednokratno primale intraperitonealno (i.p.) odgovarajuće ekstrakte, odnosno fiziološki rastvor (kontrolna grupa).

#### *Postupak in vivo ispitivanja*

1. *In vivo* ispitivanja na *Sprague Dawley* pacovima su planirana i rađena prema programu prikazanom u sledećem pregledu.

Grupa CTRL – kontrolna grupa; životinje koje su primale fiziološki rastvor, 1 mL/kg telesne mase (i.p) tokom 7 dana, (n=6)

Grupa CTRL+CCl<sub>4</sub> – negativna kontrolna grupa; životinje koje su primale fiziološki rastvor, 1 mL/kg telesne mase (i.p) tokom 7 dana i rastvor ugljentetrahlorida (CCl<sub>4</sub>), 2 mL/kg telesne mase, sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja, (n=6)

Grupa A – životinje tretirane sa ispitivanim vodenim *V. album* ekstraktom, 1 mL/kg telesne mase (i.p.) tokom 7 dana, (n=6)

Grupa B – životinje tretirane sa ispitivanim vodenim *V. album* ekstraktom, 2 mL/kg telesne mase (i.p.) tokom 7 dana, (n=6)

Grupa C – životinje tretirane sa ispitivanim vodenim *V. album* ekstraktom, 3 mL/kg telesne mase (i.p.) tokom 7 dana, (n=6)

Grupa ACCl<sub>4</sub> – životinje tretirane sa ispitivanim vodenim *V. album* ekstraktom, 1 mL/kg telesne mase (i.p.) tokom 7 dana, i 2 mL/kg telesne mase CCl<sub>4</sub> sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja, (n=6)

Grupa BCCL<sub>4</sub> – životinje tretirane sa ispitivanim vodenim *V. album* ekstraktom, 2 mL/kg telesne mase (i.p.) tokom 7 dana, i 2 mL/kg telesne mase CCl<sub>4</sub> sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja, (n=6)

Grupa CCCL<sub>4</sub> – životinje tretirane sa ispitivanim vodenim *V. album* ekstraktom, 3 mL/kg telesne mase (i.p.) tokom 7 dana, i 2 mL/kg telesne mase CCl<sub>4</sub> sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja, (n=6)

Na kraju eksperimenta (dan 8), životinje su izmerene, anestezirane sa izofluoranom i dekapitovane. Uzorci krvi za biohemijske analize su dobijeni iz *venae cava inferior*. Masa jetre je izmerena nakon uklanjanja žučne kese. Uzorci mase 1 g su homogenizovani u TRIS-HCl/saharoznom medijumu (50 mM, 0,25 M, pH 7,40), 1:3, 4°C, pomoću Potter-Elvehjem-ovog seta za homogenizaciju. Zatim je dobijeni homogenat centrifugovan na 3000 o/min tokom 10 min, a koncentracija proteina je određena biuretskom metodom primenom bovinog serum albumina kao standarda (Wood, 1989). Eksperiment je ponovljen za svaki ispitivani ekstrakt.

2. Miševi soja NMRI podeljeni su u grupe od po 6 jedinki u svakoj i tretirane po sledećem programu:

Grupa EAC – životinje sa implantiranim ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAC), tretirane sa po 2 mL/kg fiziološkog rastvora, i.p., (n=6)

Grupa PRETRETMAN – životinje pretretirane sa po 2 mL/kg ispitivanog vodenog ekstrakta lista *V. album*/dan, i.p., tokom 7 dana, (n=6)

Grupa TRETMAN – životinje tretirane sa po 2 mL/kg ispitivanog vodenog ekstrakta lista *V. album*/dan, i.p., 7 dana, od dana implantacije EAC, (n=6)

Grupa POSTTRETMAN – miševi post-tretirani sa po 2 mL/kg ispitivanog vodenog ekstrakta lista *V. album*/dan, i.p., tokom 7 dana, 7 dana nakon imlantacije EAC, (n=6)

Po završetku 14-og dana od dana implantacije EAC, sve životinje su žrtvovane, sakupljen je ascites EAC za dalje biohemijske analize. Eksperiment je ponovljen za svaki od sedam ispitivanih ekstrakata (poglavlje 4.2). Da bi se proverila hipoteza da se uticaj ekstrakata na rast i razvoj tumora zasniva na promeni antioksidantnog statusa u ćelijama EAC, isti postupak je ponovljen i sa jednim antioksidansom, N-acetil-L-cisteinom (Sigma, 5mM). Takođe,

eksperiment je rađen sa mužjacima i ženka, odvojeno, polazeći od pretpostavke da rast Ehrlich-ovog tumora može biti propagiran hormonskim statusom ženki.

NAPOMENA: Za eksperimente je uzeta standardna doza 2 mL/kg telesne mase, što je bilo u skladu sa opštim postupkom opisanim u literaturi. Ipak, prethodnim pilot eksperimentom je proverena zavisnost uticaja ekstrakata imele na ćelije EAC od primenjene doze, a osim doze 2 mL/kg, provereno je i pet slabijih doza (1,5 mL/kg, 1 mL/kg, 0,5 mL/kg, 0,2 mL/kg, 0,1 mL/kg). U ovom segmentu, određivan je samo procenat oštećenih ćelija.

#### 4.5.2. Eksperimentalne metode u *in vivo* ispitivanjima

*In vivo* ispitivanje antioksidantnih svojstava *V. album* sa različitih domaćina, podrazumevalo je praćenje biohemijskih parametara (iz homogenata jetre i hemolizata krvi) oksidativnog stresa, kao i ispitivanje potencijalnog hepatoprotektivnog efekta ekstrakata imele nakon intoksikacije sa ugljentetrahloridom (CCl<sub>4</sub>).

Biohemijski testovi su uključivali određivanje aktivnosti nekoliko antioksidantnih enzima: ksantin oksidaze, XOD (Bergmayer, 1970), katalaze, CAT (Beers i Sizer, 1950), peroksidaze, Px (Simon i sar., 1974), glutation peroksidaze, GSHPx (Chin i sar., 1976), glutation reduktaze, GR (Goldberg i Spooner, 1983), kao i sadržaja redukovanog glutationa, GSH (Beuthler i sar., 1983), i intenziteta lipidne peroksidacije, LPx (Buege i Aust, 1978). U cilju dobijanja podataka o potencijalnom hepatoprotektivnom dejstvu ispitivanih ekstrakata određivani su sledeći parametri: AST, ALT, bilirubin, sadržaj hidroksiprolina i DNA iz hepatocita.

##### *Ksantin oksidaza (XOD)*

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

Na uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50 µL, dodato je 3 mL fosfatnog pufera, pH 7,5 (optimalna pH za XOD), u kome se nalazio rastvor EDTA i ksantin u

koncentraciji od 1 mol/L. Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Merena je apsorbancija reakcionog produkta na 293 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ( $\epsilon=1,2 \cdot 10^4$  L/mol·cm).

#### *Katalaza (CAT)*

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

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

#### *Peroksidaza (Px)*

Sadržaj peroksidaze (Px) je određen primenom vodonik peroksida kao supstrata.

Na uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50  $\mu$ L, dodato je 3 mL fosfatnog pufera (0,1 mol/L, pH 7), 50  $\mu$ L rastvora gvajakola (o-metoksifenol),  $c=2 \cdot 10^{-2}$  mol/L, i 40  $\mu$ L rastvora vodonik peroksida (0,14 mL 30%-nog  $H_2O_2$  u 100 mL  $H_2O$ ). Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 minuta. Merena je apsorbancija reakcionog produkta na 436 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ( $\epsilon=2,3 \cdot 10^4$  L/mol·cm).

#### *Glutation peroksidaza (GSHPx)*

Sadržaj glutacion peroksidaze (GSHPx) je određen pomoću kumol hidroperoksida ( $\alpha$ -dimetil-benzilhidroperoksid) kao supstrata.

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50  $\mu$ L, pomešan je sa 0,75 mL TRIS/HCl pufera (pH 7,6),  $c=5 \cdot 10^{-2}$  mol/L (pufer I) i termostatiran 10 minuta na 37 °C. U reakcionu smešu je zatim dodat 0,1 mL rastvora GSH,  $c=2,1 \cdot 10^{-3}$  mol/L i 0,1 mL rastvora kumolhidroperoksida u metanolu, (1:200) i ponovo termostatirano 5 minuta na 37 °C. Potom je dodato 1 ml 20%-nog rastvora TCA, da bi se reakcija stopirala. Reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u

toku 10 minuta. Zatim je u 2 mL TRIS/HCl pufera, pH 8,9 (pufer II),  $c=0,4$  mol/L, dodat 1 mL supernatanta i 0,1 mL rastvora DTNB (0,02 g u 5 mL pufera II). Merena je apsorbanacija na 412 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ( $\epsilon=1,36 \cdot 10^4$  L/mol·cm).

#### *Glutation reduktaza (GR)*

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

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

#### *Redukovani glutation (GSH)*

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

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

*Određivanje GSH u homogenatu:* Uzorak homogenata jetre, zapremine 1 mL, centrifugiran je sa 2 mL rastvora 4%-ne sulfosalicilne kiseline, 10 minuta na 3000 o/min. Određena zapremina supernatanta je pomešana sa rastvorom Ellman-ovog reagensa u odnosu

---

\* Ellman-ov reagens predstavlja smešu 0,2 mol/L rastvora DTNB i  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L rastvora  $KP_i$ , pH 8



1:40. Merena je apsorbancija na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta, a preračunat na mg proteina preko ukupnih proteina.

#### *Određivanje koncentracije ukupnih proteina*

Ukupni proteini određeni su biuretskom metodom.

Na uzorak homogenata jetre 20-50  $\mu\text{L}$ , dodato je 3 mL rastvora biuretskog reagensa ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,15%, K,Na-tartarat - 0,6%, rastvor KI - 0,1% u 0,85 mol/L NaOH i deoksiholat - 1,5%), i nakon 30 minuta merena je apsorbancija nastalog jedinjenja na 540 nm. Sadržaj proteina određen je na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem različite koncentracije BSA (5-50 mg/L).

#### *Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx)*

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

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) 20-50  $\mu\text{L}$ , je zagrevan 15 minuta na ključalom vodenom kupatilu sa 3 mL rastvora Činidle (tiobarbiturna kiselina 0,375% u 15% TCA (3,75 g TBA + 15 g  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  + 20,72 mL 37% HCl + jedna-dve kapi  $\alpha$ -tokoferola na 1L rastvora)). Rastvor je zatim centrifugiran 10 minuta na 3000 o/min i merena je apsorbancija nastalog proizvoda reakcije na 535 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ( $\epsilon=1,56 \cdot 10^5$  L/mol-cm).

#### *Serumski parametri funkcije jetre – AST, ALT, bilirubin*

Sadržaj serumske aspartat transaminaze (AST) i alanin transaminaze (ALT) je određen fotometrijski, merenjem količine nastalog hidrazona na 546 nm po Reitmann-u i Wotton-u. Detaljan opis eksperimenta se može naći u Spasić i sar. (2000).

Sadržaj bilirubina je određen fotometrijski, primenom reakcije sa dijazo reagensom. Detaljan opis eksperimenta se može naći u Kovačević (1994).

#### *Određivanje hidroksiprolina*

Koncentracija hidroksiprolina u jetri je određena prema Woessner-ovoj metodi (Woessner, 1961).

#### *Određivanje sadržaja DNA hepatocita*

Za biohemijsko određivanje sadržaja DNA hepatocita, uzorci jetre su obrađeni kao što je detaljno objašnjeno u literaturi (Schulte-Hermann i sar., 1988).

#### *In vivo ispitivanja citotoksičnosti ekstrakata *Viscum album L.* sa različitih domaćina za ćelije Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma*

##### *Određivanje broja tumorskih ćelija i ćelijske vijabilnosti*

Ascites Ehrlich-ovog tumora je prenesen u rastvor Krebs-Ringer-ovog fosfatnog pufera (0°C, pH 7,4). Dobijena suspenzija je zatim podvrgnuta nizu centrifugiranja pri 4500 rpm (MSE HIGH SPEED centrifuga na 4°C) i 12000 rpm (Eppendorf 3200 centrifuga, 2,5 min) da bi dobili gustu suspenziju ćelija (1:1). Nakon toga, određivana je težina ćelija, kao i broj ćelija izražen kao broj ćelija/mm<sup>3</sup> (brojanje vršeno u Neubauer-ovoj komori).

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

##### *Biohemijski testovi*

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

#### **4.6. Statistička analiza**

Rezultati, dobijeni merenjem šest uzoraka, izraženi su kao srednja vrednost ± standardna devijacija srednje vrednosti. Urađen je Studentov *t*-test radi identifikacije statističkih razlika. *p* vrednosti 0,05 ili niže (*p* < 0,05) smatrane su statistički značajnim. Za poređenje rezultata dobijenih za različite ekstrakte, različite doze ekstrakata, različite načine aplikacije ekstrakata, ili razlike po dva parametra (ekstrakt/doza, odnosno ekstrakt/način aplikacije), korišćene su dve

statističke metode: jednofaktorska i dvofaktorska analiza varijance (ANOVA). Značajne statističke razlike su identifikovane primenom dva post-hoc testa: Tuckey testa, i Bonferroni post-hoc testa.

U okviru različitih domaćina, uzoraka su primenjeni isti screening testovi. Detaljan opis postupka koji je s eksperimentalnom delu u tabeli 4.1.

U svim ispitivanjima uzorcima lista *V. album* se sadrži različita količina dokazano prisutno leikotocijane, flavonoida, tanina, alkaloida, saponina i glikozida se sekundarnih struktura, a nije dokazano prisutno amino-kiseline, slobodnih aminokiselina i vezanih amino-kiselina, kao i cijanogeniti heterozida.

Dobijeni rezultati pokazuju da se sastav pojedinih uzoraka listova imale sa različitih domaćina međusobno ne razlikuje. Međutim, potrebno je naglasiti da niko sa svi ispitivani uzorci listova *V. album* veoma sličnog ljubičastog sastava, to ne znači da su količine pojedinih sekundarnih biomolekula istovetne. Isto može biti da utiče na antioksidativna svojstva.

### 5.2. Kvantitativni sadržaj pojedinih klasa sekundarnih biomolekula u listu *Vaccinium album* L. sa različitim domaćinima

Da bi se stekao detaljniji uvid u postojanje eventualnih razlika u sastavu ispitivanih ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina, a koje bi se mogle odraziti na antioksidativna/prooksidativna svojstva u daljoj eksperimentalna, određeni su količine sledećih klasa jedinjenja: katehina (i flavonila a i b), L-askorbinske kiseline (vitamina C), ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonoida, proantocijanidina i glna kiselina. Sadržaj navedenih klasa sekundarnih biomolekula u listu *V. album* sa različitim domaćinima prikazan je u tabeli 5.1.

Najveća količina flavonila a je izmerena u listu imale sa bagerima, zatim slede listovi sa topole, kruška, kleke, šljive i šipka, a najmanja količina je određena u listu imale sa gloga. Srednje vrednosti sadržaja flavonila a se značajno razlikuju ( $F=40.022$ ,  $p<0.001$ ). Sadržaj flavonila b je u listu imale sa bagerima bio značajno veći u odnosu na ostale domaćine. Dajom

## 5. REZULTATI

### 5.1. Fitohemijski sastav *Viscum album* L. ssp. *album* sa različitih domaćina

Fitohemijska ispitivanja prisustva pojedinih klasa sekundarnih biomolekula u listovima *V. album* sa različitih domaćina, urađena su primenom tzv. *screening* testa. Detaljan opis postupka dat je u eksperimentalnom delu u tabeli 4.1.

U svim ispitivanim uzorcima lista *V. album* sa sedam različitih domaćina dokazano je prisustvo leukoantocijana, flavonoida, tanina, alkaloida, saponina i supstanci sa steroidnom strukturom, a nije dokazano prisustvo antocijana, slobodnih hinonskih i vezanih hinonskih derivata, kao i cijanogenih heterozida.

Dobijeni rezultati pokazuju da se sastav pojedinih uzoraka listova imele sa različitih domaćina međusobno ne razlikuje. Međutim, potrebno je naglasiti da iako su svi ispitivani uzorci listova *V. album* veoma sličnog fitohemijskog sastava, to ne znači da su i količine pojedinih sekundarnih biomolekula istovetne, što može bitno da utiče na antioksidantna svojstva.

### 5.2. Kvantitativni sadržaj pojedinih klasa sekundarnih biomolekula u listu *Viscum album* L. sa različitih domaćina

Da bi se stekao detaljniji uvid u postojanje eventualnih razlika u sastavu ispitivanih ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina, a koje bi se mogle odslikati na antioksidantna/prooksidantna svojstva u daljim eksperimentima, određene su količine sledećih klasa jedinjenja: karotenoida (i hlorofila *a* i *b*), L-askorbinske kiseline (vitamina C), ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonoida, proantocijanidina i galne kiseline. Sadržaj navedenih klasa sekundarnih biomolekula u listu *V. album* sa različitih domaćina prikazan je u tabeli 5.1.

Najveća količina hlorofila *a* je izmerena u listu imele sa bagrema, zatim slede imela sa topole, kruške, kleke, šljive i šipka, a najmanja količina je određena u listu imele sa gloga. Srednje vrednosti sadržaja hlorofila *a* se značajno razlikuju ( $F=40,022$ ;  $p<0,001$ ). Sadržaj hlorofila *a* je u listu imele sa bagrema bio značajno veći u odnosu na ostale domaćine. Daljom

analizom je utvrđeno da se uzorci lista imele sa šljive, šipka i gloga međusobno značajno ne razlikuju po sadržaju hlorofila  $\alpha$ , i da su izmerene količine značajno niže od ostalih. Značajne međusobne razlike nisu pokazali ni uzorci imele sa topole, kruške i kleke.

Količine hlorofila  $b$  su varirale u zavisnosti od domaćina i između srednjih vrednosti je postojala značajna razlika ( $F=12,852$ ;  $p<0,001$ ). Utvrđeno je da se količina hlorofila  $b$ , izmerena u listu imele sa bagrema, značajno razlikovala u odnosu na ostale uzorke sa drugih domaćina (osim kleke). Iako je sadržaj hlorofila  $b$  bio najveći u imeli sa gloga, ova vrednost se značajno razlikovala samo od vrednosti dobijenih za imelu sa kleke i kruške, dok se ostali uzorci međusobno nisu značajno razlikovali.

Najveća količina karotenoida nađena je u listu imele sa bagrema, a najmanja u listu imele sa šipka. Najmanja količina karotenoida, izmerena u imeli sa šipka, nije se statistički razlikovala od karotenoida imele sa gloga i topole. Količina karotenoida u imeli sa bagrema i kruške se značajno razlikovala od ostalih ispitivanih uzoraka ( $F=61,800$ ;  $p<0,001$ ). Važno je napomenuti i da su se ostali uzorci međusobno značajno razlikovali po sadržaju karotenoida, osim kleke i šljive, odnosno kruške.

Tabela 5.1. Sadržaj pojedinih klasa sekundarnih metabolita u listu *Viburnum lonicifolium* u zavisnosti od domaćina

List	Hlorofil $a^a$	Hlorofil $b^b$	Karotenoidi <sup>c</sup>	C vitamin <sup>d</sup>
bagrema	1,94±0,02	0,10±0,08	0,76±0,34	0,60±0,10
kruška	1,66±0,02	0,28±0,03	0,71±0,03	1,25±0,16
šljiva	1,47±0,01	0,34±0,01	0,51±0,02	1,20±0,10
topola	1,70±0,01	0,36±0,02	0,15±0,04	3,15±0,20
glog	1,34±0,11	0,43±0,06	0,29±0,05	0,85±0,12
šipka	1,45±0,07	0,31±0,06	0,14±0,08	1,75±0,16
kleka	1,61±0,08	0,23±0,07	0,59±0,05	0,40±0,12

<sup>a</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

<sup>b</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

<sup>c</sup> izraženo u mg hlorofila/100g suvog biljnog materijala

<sup>d</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

<sup>e</sup> izraženo u mg

<sup>f</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

<sup>g</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

<sup>h</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

<sup>i</sup> izraženo u mg karotena/100g suvog biljnog materijala

**Tabela 5.1.** Sadržaj pojedinih klasa sekundarnih biomolekula u listu *Viscum album* L. sa različitih domaćina

List <i>album</i> sa	Hlorofil <i>a</i> <sup>a</sup>	Hlorofil <i>b</i> <sup>b</sup>	Karotenoidi <sup>c</sup>	C vitamin <sup>d</sup>	Ukupni fenoli <sup>e</sup>	Tanini <sup>e</sup>	Flavonoidi <sup>f</sup>	Proantocijanidini <sup>g</sup>	Galna kiselina <sup>h</sup>
bagrem	1,90±0,02	0,10±0,08	0,76±0,14	0,60±0,10	1475,8±40,6	1230,3±18,2	384,0±65,0	302,2±25,4	3,77±0,73
kruška	1,66±0,02	0,28±0,03	0,71±0,03	1,25±0,16	1033,6±241,3	586,2±51,9	479,2±168,7	190,9±46,8	2,80±0,38
šljivica	1,47±0,01	0,34±0,01	0,51±0,02	1,20±0,19	2596,7±42,4	1925,7±33,0	864,0±134,1	289,6±23,8	5,60±1,08
topola	1,70±0,01	0,36±0,02	0,15±0,04	1,15±0,20	2813,4±83,3	2122,3±49,0	577,6±170,8	211,3±67,7	0
glog	1,34±0,11	0,43±0,08	0,29±0,05	0,85±0,12	652,7±34,6	368,7±101,6	163,2±53,0	120,5±55,7	0
šipak	1,45±0,07	0,31±0,06	0,14±0,05	1,75±0,16	1496,7±22,5	1015,3±208,3	958,5±76,8	319,3±42,1	2,74±0,43
kleka	1,61±0,08	0,23±0,07	0,59±0,05	0,40±0,12	2254,3±40,3	1796,4±91,9	352,0±87,6	203,5±51,7	0

svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost pet merenja±SD

<sup>a</sup> izraženo u mg hlorofila *a*/g suvog biljnog materijala

<sup>b</sup> izraženo u mg hlorofila *b*/g suvog biljnog materijala

<sup>c</sup> izraženo u mg karotenoida/g suvog biljnog materijala

<sup>d</sup> izraženo u mg%

<sup>e</sup> izraženo u mg katehina/100g suvog biljnog materijala

<sup>f</sup> izraženo u mg rutina/100g suvog biljnog materijala

<sup>g</sup> izraženo u mg leukoantocijanidina/100g suvog biljnog materijala

<sup>h</sup> izraženo u mg galne kiseline/100g suvog biljnog materijala

Kada je u pitanju količina vitamina C, izdvojile su se tri grupe. Prva grupa obuhvatala bi list imele sa šipka –  $1,75 \pm 0,16$  mg%, druga grupa listove imele sa kruške, šljive, topole i gloga, sa količinom od oko 1,20 mg% vitamina C, i treća grupa list imele sa bagrema i kleke, oko 0,5 mg%. Sadržaj vitamina C u imeli sa šipka se značajno razlikovao od ostalih dobijenih vrednosti ( $F=34,626$ ;  $p<0,001$ ). Takođe, količine vitamina C izmerene u listu imele sa bagrema i kleke, su bile značajno različite od ostalih uzoraka. Značajne razlike su uočene i između uzorka imele sa gloga i kruške, odnosno šljive. Iako su uočene mnoge značajne razlike u količini vitamina C u zavisnosti od domaćina, postavlja se pitanje koliko bi ove razlike mogle biti značajne za antioksidantna/prooksidantna svojstva, s obzirom na nestabilnost same L-askorbinske kiseline.

Najveći sadržaj ukupnih fenola (izražen preko katehinskih ekvivalenata) je zabeležen u listu *V. album* sa topole a nešto niže vrednosti su dobijene za list imele sa šljive i kleke. Na polovini tabele su se našle količine ukupnih fenola izmerene za list imele sa šipka i bagrema, dok je najmanja količina dobijena za list imele sa gloga. Dalje, potvrđeno je postojanje značajnih razlika ( $F=256,794$ ;  $p<0,001$ ) u količini ukupnih fenola između svih uzoraka lista imele sa različitih domaćina. Izuzeci od ovog pravila su bili list imele sa topole i šljive, odnosno šipka i bagrema, među kojima nije bilo značajnih razlika. Uočene razlike bi mogle imati uticaja na različit antioksidantni/prooksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata *V. album*.

Količine tanina određene u uzorcima lista *V. album* bile su značajno različite u zavisnosti od domaćina. Uočene su tri grupe uzoraka. U prvu grupu su uvršteni list imele sa topole, šljive i kleke, drugoj grupi pripadaju list imele sa bagrema i šipka, sa relativno bliskim vrednostima za tanine, a najniže količine ukupnih tanina su izmerene za list imele sa kruške i gloga. Značajne razlike nisu postojale između tri para uzoraka imele: glog/kruška, šipak/bagrem, šljiva/kleka. Ovi parovi su se, međutim, međusobno značajno razlikovali po sadržaju ukupnih tanina ( $F=188,726$ ;  $p<0,001$ ).

Količina ukupnih flavonoida u listovima *V. album* sa različitih domaćina se kretala u širokom rasponu od 163,2-958,6 mg rutina/100 g suvog biljnog materijala. Najveća

koncentracija ukupnih flavonoida je izmerena u listu imele sa šipka, a slede vrednosti dobijene za list imele sa šljive, topole i kruške. Najniža vrednost za ukupne flavonoide je dobijena za list imele sa gloga, a slede vrednosti nađene za list imele sa bagrema i kleke. Utvrđeno je da se list imele sa šipka i šljive međusobno značajno ne razlikuju po sadržaju flavonoida, ali da se značajno razlikuju od ostalih uzoraka ( $F=23,619$ ;  $p<0,001$ ). Ostali ekstrakti se međusobno značajno ne razlikuju po sadržaju flavonoida (izuzetak bi činio list imele sa topole u odnosu na list imele sa kruške odnosno gloga).

Količina proantocijanidina u listovima *V. album* sa različitih domaćina se kretala oko 230 mg leukoantocijanidina/100 g suvog biljnog materijala, sa razlikama između domaćina (tabela 5.1). Najveća količina je određena za list imele sa šipka, a najmanja za list imele sa gloga. Značajne razlike potvrđene su za sadržaj proantocijanidina u listu imele sa šipka u odnosu na list imele sa gloga, kruške, kleke i topole ( $F=9,376$ ;  $p<0,001$ ), a značajne razlike su zabeležene i između lista imele sa gloga i lista imele sa bagrema, odnosno šljive. Ostali uzorci se međusobno značajno ne razlikuju.

Slobodna galna kiselina nije identifikovana u listu imele sa topole, gloga i kleke. Pozitivan rezultat su dali list imele sa bagrema, šljive, kruške i šipka. Najveća količina slobodne galne kiseline je nađena u listu imele sa šljive i ona se jedino značajno razlikovala ( $F=67,304$ ;  $p<0,001$ ) od ostalih uzoraka u kojima je ova molekula identifikovana.

### **5.3. *In vitro* antioksidantna svojstva vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina**

*In vitro* antioksidantna svojstva lista *V. album* sa različitih domaćina ispitivana su prema protokolu opisanom u eksperimentalnom delu teze. Ispitivanja su izvedena sa sa osnovnim rastvorima (A) i četiri razblaženija rastvora dobijena dodatkom 0,5 mL (B), 1 mL (C), 1,5 mL (D) i 2 mL (E) vode na 1 mL osnovnog rastvora. Sva merenja su ponovljena pet puta. Vrednosti



dobijene sa razblaženim rastvorima ili nisu pokazivale doznu zavisnost ili se nisu razlikovale od osnovnih, tako da su u tabelama prikazani samo rezultati dobijeni sa osnovnim rastvorima.

### 5.3.1. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma

Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2, iz koje se vidi da su svi vodeni ekstrakti lista *V. album*, statistički značajno smanjili intenzitet *in vitro* lipidne peroksidacije (LPx) lipozoma u odnosu na kontrolu. Najjači inhibitori efekat pokazali su ekstrakti imele sa topole i šljive (bez značajne međusobne razlike), i on se značajno razlikovao od preostalih ekstrakata (domaćini: kruška, bagrem, šipak i kleka) među kojima značajne razlike nisu uočene, a najslabiji efekat je pokazao ekstrakt imele sa gloga.

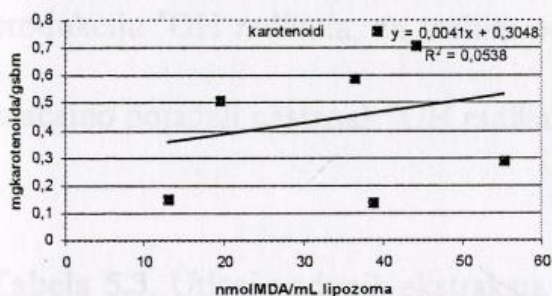
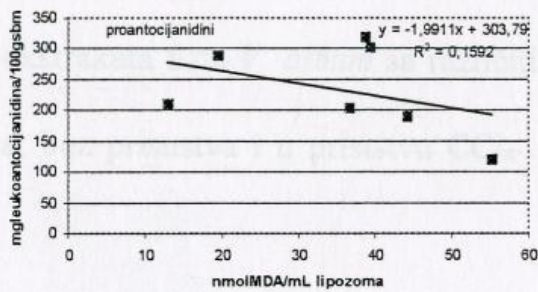
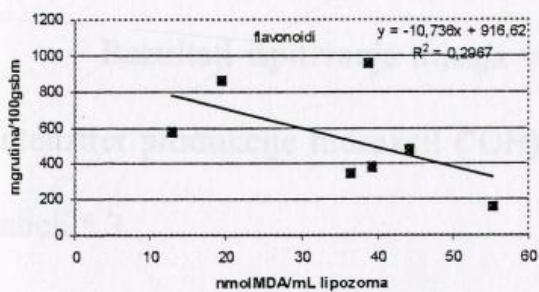
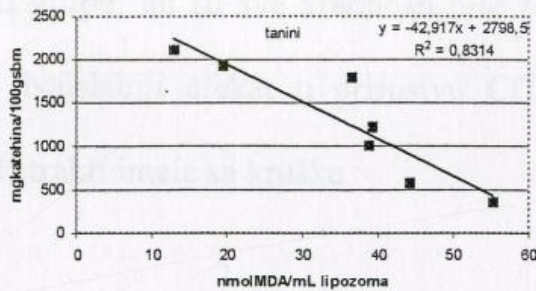
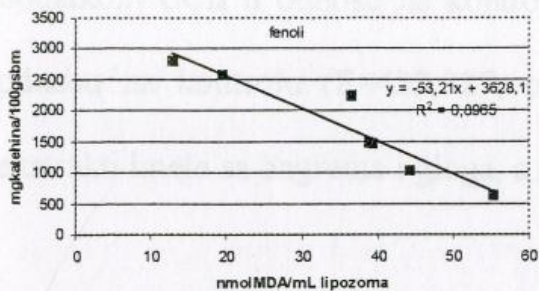
**Tabela 5.2.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na intenzitet lipidne peroksidacije lipozoma, bez prisustva i u prisustvu CCl<sub>4</sub>.

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
88,4±3,5	39,2±5,3	44,0±4,2	19,4±2,0	12,9±3,2	55,2±3,6	38,6±2,4	36,4±2,4
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
213,9±11,0	126,5±6,2	28,7±1,1	56,5±3,0	87,5±1,1	121,6±2,9	56,1±4,5	99,2±6,7

Intenzitet lipidne peroksidacije je izražen u nmol MDA/mL lipozoma. Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost±SD.

CTRL – kontrola;

Navedene razlike u sposobnosti ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina da inhibiraju proces *in vitro* lipidne peroksidacije su zatim dovedene u vezu sa sadržajem nekih od sekundarnih biomolekula određenih u poglavlju 5.2 – fenolinim jedinjenjima, taninima, flavonoidima, proantocijanidinima i karotenoidima. Rezultati su prikazani na slici 5.1.



Slika 5.1. Promena intenziteta *in vitro* lipidne peroksidacije u funkciji koncentracije nekih sekundarnih biomolekula iz *Viscum album* L. sa različitim domaćina.

Dobijeni rezultati pokazuju da je intenzitet LPx u značajnoj negativnoj korelaciji sa količinom fenolnih jedinjenja ( $r = -0,947$ ) i tanina ( $r = -0,912$ ) i nešto slabijoj, takođe negativnoj korelaciji sa količinom flavonoida ( $r = -0,545$ ) i proantocijanidina ( $r = -0,3990$ ). Sadržaj karotenoida u uzorcima lista *V. album* sa različitim domaćina nije uticao na *in vitro* peroksidaciju lipozoma ( $r = 0,2319$ ) na način koji je bio uočen za ostale biomolekule, odnosno nije uočena linearna veza između ova dva parametra.

Dodatak ugljentetrahlorida ( $CCl_4$ ), kao što je očekivano, značajno je povećao količinu MDA, produkta nastalog oksidativnim oštećenjem lipozoma (tabela 5.2.). Svi vodeni ekstrakti lista *V. album*, statistički značajno su smanjili intenzitet *in vitro* lipidne peroksidacije izazvane

dodatkom CCl<sub>4</sub> u odnosu na kontrolnu, CCl<sub>4</sub> grupu, ali su sve vrednosti bile značajno niže u odnosu na kontrolu (F=433,027; p<0,001). Najslabiji efekat u prisustvu CCl<sub>4</sub> su pokazali ekstrakti imele sa bagrema i gloga, a najjači ekstrakti imele sa kruške.

### 5.3.2. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na intenzitet produkcije hidroksil (<sup>•</sup>OH) radikala

Rezultati ispitivanja uticaja vodenog ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina na intenzitet produkcije hidroksil (<sup>•</sup>OH) radikala, bez prisustva i u prisustvu CCl<sub>4</sub> prikazani su u tabeli 5.3.

Vodeni ekstrakti *V. album* sa bagrema, kruške i šljive nisu statistički značajno uticali na produkciju <sup>•</sup>OH radikala, za razliku od ekstrakata imele sa topole, gloga, šipka i kleke, koji su značajno pojačali nastanak <sup>•</sup>OH radikala (F=64,488; p<0,001).

**Tabela 5.3.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na intenzitet produkcije hidroksil (<sup>•</sup>OH) radikala.

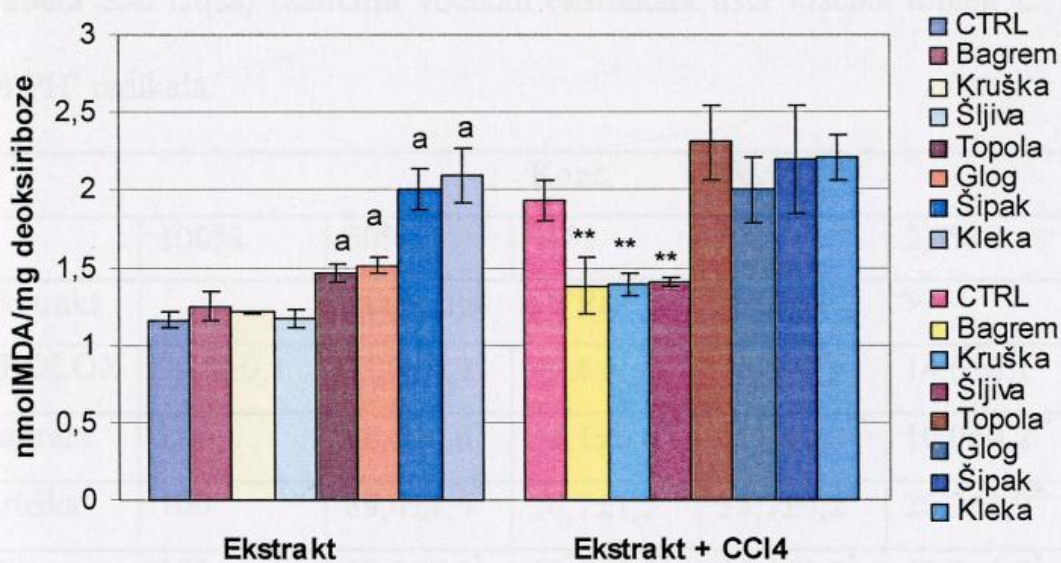
CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
1,16±0,05	1,25±0,09	1,21±0,01	1,17±0,06	1,46±0,06*	1,51±0,05*	2,00±0,13*	2,09±0,18*
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
1,93±0,13	1,38±0,18**	1,39±0,08**	1,40±0,03**	2,31±0,24	2,00±0,21	2,20±0,35	2,21±0,14

Intenzitet produkcije <sup>•</sup>OH radikala je izražen u nmolMDA/mg deoksiriboze. Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost±SD

CTRL – kontrola; \* - statistički značajno povećanje intenziteta produkcije <sup>•</sup>OH radikala u odnosu na CTRL; \*\* - statistički značajno smanjenje intenziteta produkcije <sup>•</sup>OH radikala u odnosu na CTRL+CCl<sub>4</sub>;

Dodatak ugljentetrahlorida (CCl<sub>4</sub>) doveo je do očekivanog, pojačanog nastanka <sup>•</sup>OH radikala u odnosu na kontrolnu vrednost, 1,93±0,13 nmol MDA/mg deoksiriboze, što je iznosilo

oko 66% (tabela 5.3.). Ekstrakti lista imele sa bagrema, kruške i šljive su pokazali značajno smanjenje produkcije  $\bullet$ OH radikala u poređenju sa kontrolnom grupom (sa  $\text{CCl}_4$ ), ( $F=17,083$ ;  $p<0,001$ ). Ostali ekstrakti imele sa topole, gloga, šipka i kleke nisu se značajno razlikovali od  $\text{CCl}_4$ -kontrole u ispitivanom *in vitro* sistemu, kao ni među sobom. Na slici 5.2 je dat grafički prikaz produkcije  $\bullet$ OH radikala u zavisnosti od primenjenog osnovnog ekstrakta imele.



**Slika 5.2.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina i kombinacije ovih ekstrakata i  $\text{CCl}_4$  na intenzitet produkcije hidroksil ( $\bullet$ OH) radikala.

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost $\pm$ SD; CTRL – kontrola; \* - statistički značajno povećanje produkcije  $\bullet$ OH radikala u odnosu na kontrolu CTRL; \*\* - statistički značajno smanjenje produkcije  $\bullet$ OH radikala u odnosu na kontrolu CTRL +  $\text{CCl}_4$ ;

### 5.3.3. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na intenzitet inhibicije DPPH $\bullet$ radikala

*In vitro* antioksidantni kapacitet ispitivanih ekstrakata *V. album* prikazan je preko sposobnosti ekstrakta da "hvata" stabilni slobodni radikal – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH). Rezultati su prikazani kao procenat "uhvaćenih", odnosno redukovanih DPPH radikala.

Određene su i IC<sub>50</sub> vrednosti za svaki ekstrakt (koncentracija ekstrakta pri kojoj dolazi do redukcije 50% DPPH radikala).

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina na intenzitet inhibicije DPPH radikala prikazani su u tabeli 5.4, kao i vrednosti dobijene primenom standardnog rastvora trolox-a.

**Tabela 5.4.** Uticaj različitih vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. na intenzitet inhibicije DPPH\* radikala.

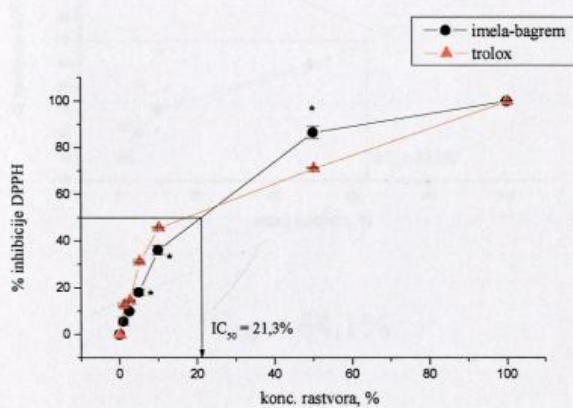
Ekstrakt	Konc. ekstr.					
	100%	50%	10%	5%	2,5%	1%
	Inhibicija DPPH radikala %					
TROLOX	99,8±0,1	71,3±1,2	45,8±1,5	31,5±0,4	14,6±0,1	12,5±0,5
Bagrem	100	86,5±0,6*	36,1±0,6**	18,1±0,9**	10,0±0,2**	5,6±1,2**
Kruška	100	89,4±1,6*	70,7±1,5*	35,7±0,2*	20,2±1,9*	10,7±0,7**
Šljiva	100	99,0±0,9*	93,3±0,8*	46,4±0,8*	22,9±1,0*	10,3±0,6**
Topola	100	83,2±0,7*	67,4±0,5*	33,3±0,2*	16,3±1,1*	8,6±0,8**
Glog	96,3±0,6**	83,7±0,9*	51,2±0,9*	25,5±0,4**	10,2±2,8**	6,1±1,3**
Šipak	99,5±0,3	93,4±0,4*	73,3±0,4*	37,7±1,3*	20,9±1,4*	6,7±0,1**
Kleka	76,2±1,7**	39,7±1,1**	20,9±1,1**	10,1±0,8**	0**	0**

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost±SD; \* - statistički značajno povećanje inhibicije DPPH radikala u odnosu na ekvivalentnu koncentraciju TROLOX-a; \*\* - statistički značajno smanjenje inhibicije DPPH radikala u odnosu na ekvivalentnu koncentraciju TROLOX-a

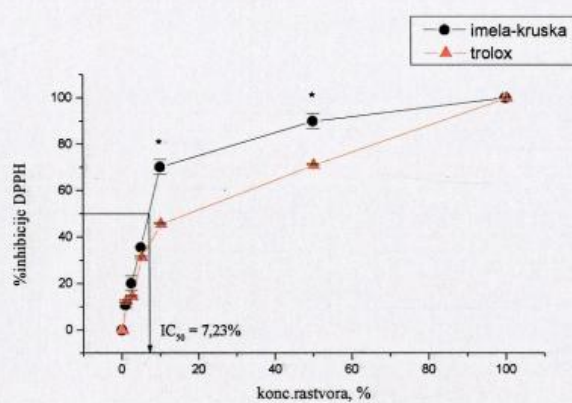
Iz tabele 5.4 se može uočiti da su osnovni rastvori ekstrakata *V. album* sa bagrema, kruške, šljive i topole u potpunosti inhibirali DPPH radikal, a da je sposobnost osnovnog rastvora ekstrakta imele sa šipka da inhibira DPPH radikal bila istovetna sa aktivnošću standardnog rastvora TROLOX-a. Nešto slabiju aktivnost je pokazao ekstrakt imele sa gloga, a najslabiju ekstrakt imele sa kleke, čija je anti-DPPH aktivnost bila značajno niža u odnosu na

korišćeni standard. Razblaženja osnovnih rastvora ekstrakata imele sa različitih domaćina pokazala su značajna odstupanja od aktivnosti TROLOX-a.

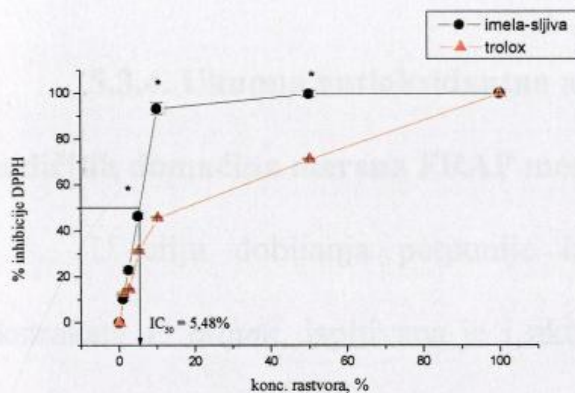
Kako bi uporedili sposobnost različitih ekstrakata da inhibiraju DPPH radikal, grafički su određene  $IC_{50}$  vrednosti za svaki ekstrakt, a rezultati su prikazani na slici 5.3. Najveći antioksidantni kapacitet, izračunat na osnovu inhibicije DPPH radikala, uočen je kod vodenog ekstrakta lista *V. album* sa šljive, sa  $IC_{50}$  vrednosti 5,5%. To znači da je rastvor koncentracije 5,5%, inhibirao 50% ukupne količine DPPH radikala. Ponašanje ovog ekstrakta značajno se razlikovalo od ponašanja standardnog rastvora TROLOX-a. Veoma dobar antioksidantni kapacitet su pokazali i vodeni ekstrakti lista *V. album* sa šipka ( $IC_{50}$  - 6,9%), kruške ( $IC_{50}$  - 7,2%), topole ( $IC_{50}$  - 7,6%) i gloga ( $IC_{50}$  - 9,7%). Nešto slabiji antioksidantni kapacitet u odnosu na pomenute ekstrakte pokazao je vodeni ekstrakt lista imele sa bagrema, sa  $IC_{50}$  vrednošću 21,3%, iako je ova vrednost bila veoma bliska standardnom rastvoru TROLOX-a. Koristeći inhibiciju DPPH radikala kao parametar antioksidantne moći ekstrakata, najmanji kapacitet, a time i najslabiji antioksidantni potencijal, pripisan je vodenom ekstraktu lista imele sa kleke, čija je  $IC_{50}$  vrednost iznosila 64,1%, što je bila statistički značajna razlika u odnosu na standardni rastvor TROLOX-a koji je korišten kao kontrola.



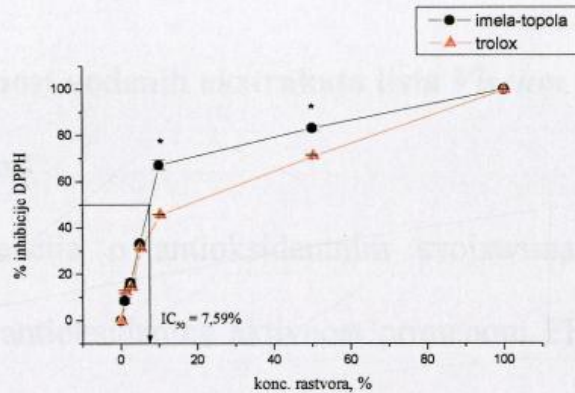
$IC_{50} = 21,3\%$



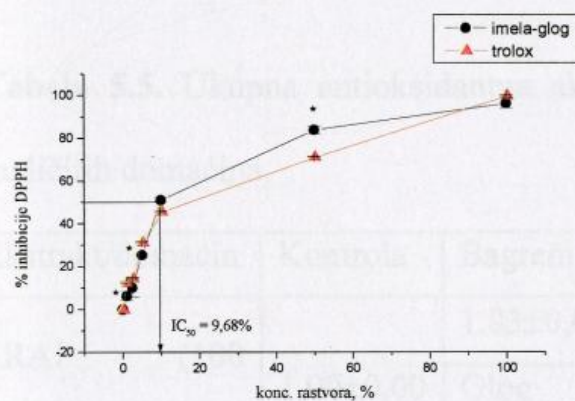
$IC_{50} = 7,2\%$



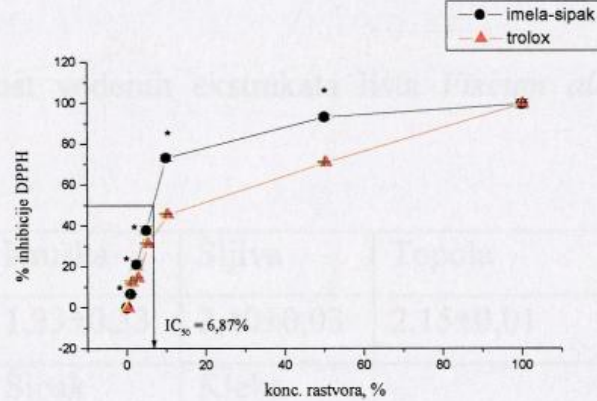
$IC_{50} = 5,5\%$



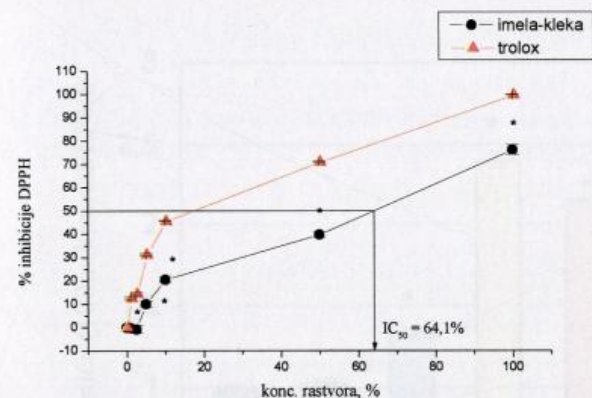
$IC_{50} = 7,6\%$



$IC_{50} = 9,7\%$



$IC_{50} = 6,9\%$



$IC_{50} = 64,1\%$

**Slika 5.3.** Uticaj različitih vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. na intenzitet inhibicije DPPH• radikala i određene  $IC_{50}$  vrednosti.

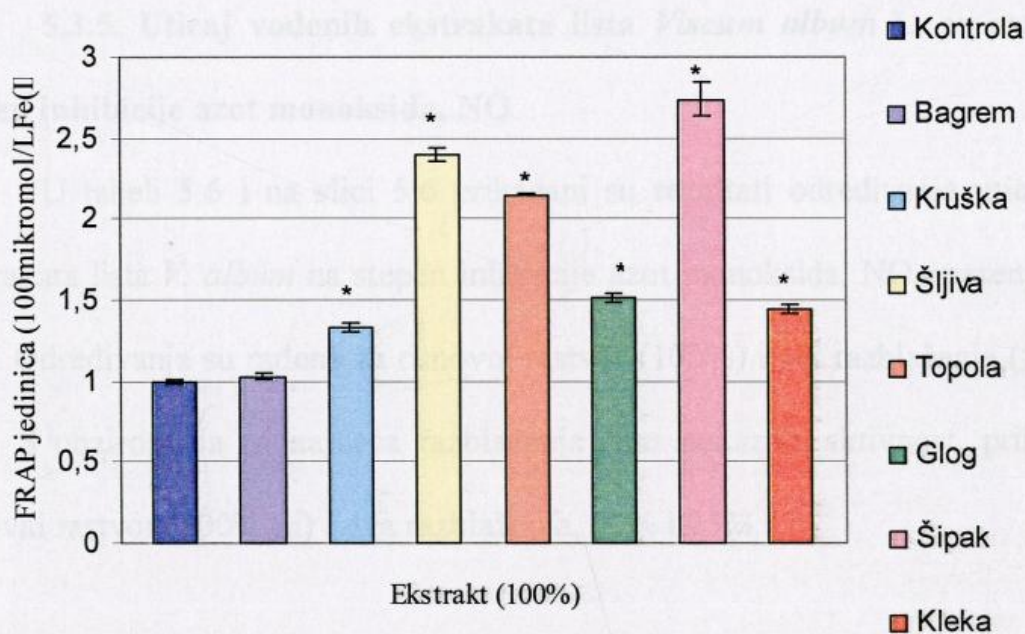
Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost $\pm$ SD; \* - statistički značajna razlika u odnosu na ekvivalentnu koncentraciju TROLOX-a; ● – ekstrakt lista *V. album* sa odgovarajućeg domaćina; ▲ – TROLOX standardni rastvor

### 5.3.4. Ukupna antioksidantna aktivnost vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina merena FRAP metodom

U cilju dobijanja potpunije informacije o antioksidantnim svojstvima ispitivanih ekstrakata *V. album*, ispitivana je i ukupna antioksidantna aktivnost primenom FRAP metode (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay). Rezultati su prikazani u jedinicama FRAP, što odgovara  $100 \mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ .

**Tabela 5.5.** Ukupna antioksidantna aktivnost vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina.

Ekstrakt/domaćin	Kontrola	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola
FRAP (100 $\mu\text{mol/L Fe(II)}$ )	1,00±0,00	1,03±0,01	1,33±0,33	2,40±0,03	2,15±0,01
		Glog	Šipak	Kleka	
		1,52±0,02	2,74±0,11	1,45±0,03	



**Slika 5.4.** Ukupna antioksidantna aktivnost vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina.

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost±SD; \* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (1FRAP jedinica)



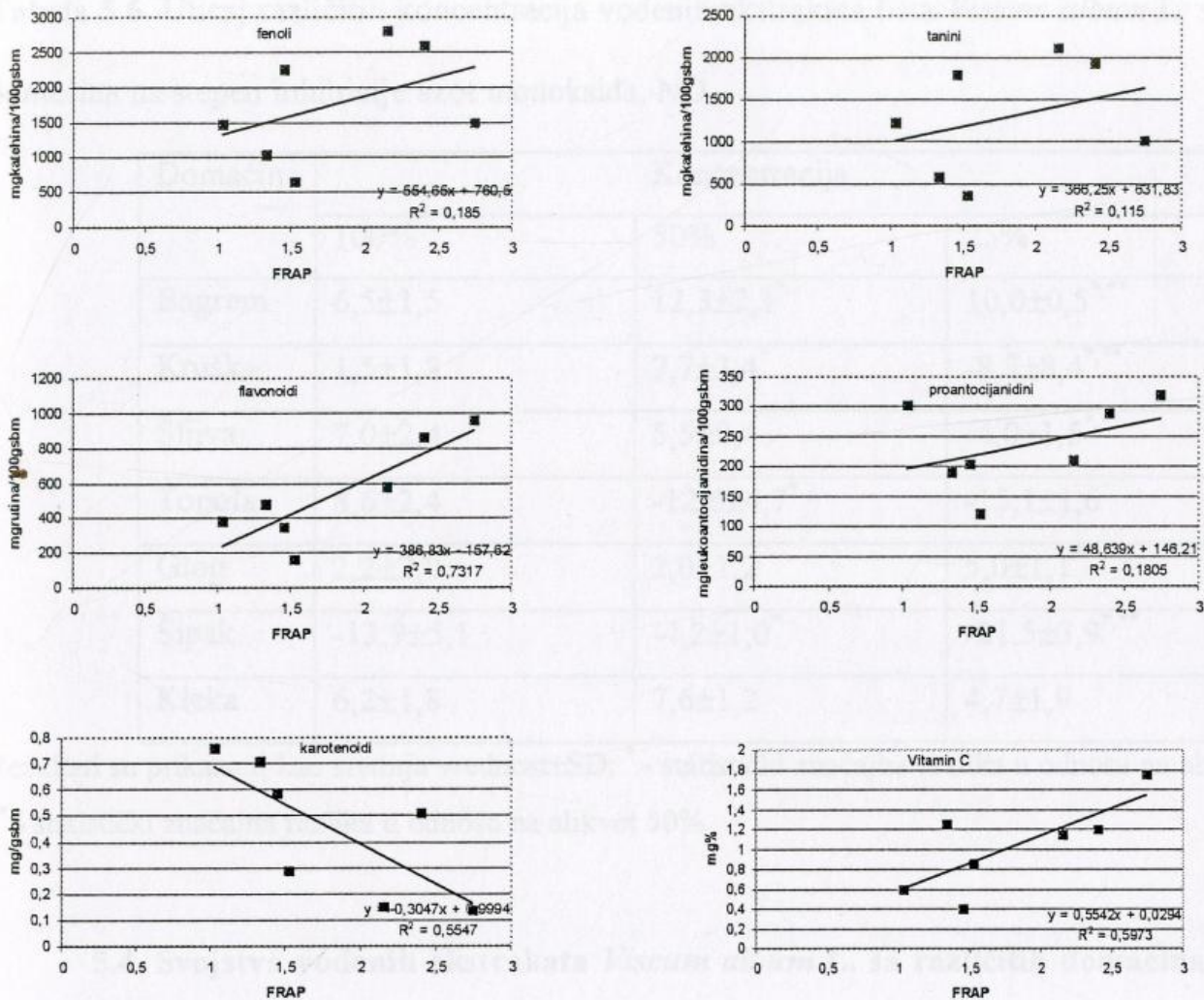
Do povećanja FRAP vrednosti došlo je kod vodenih ekstrakata lista *V. album* sa kruške (33%), šljive (139%), topole (115%), šipka (170%) i kleke (44%). Vodeni ekstrakt lista *V. album* sa bagrema (2,8%) nije statistički značajno uticao na antioksidantnu aktivnost merenu u FRAP jedinicama. Sve uočene razlike u ukupnom antioksidantnom kapacitetu ekstrakata su bile statistički značajne, a takođe, značajne su bile i razlike između ekstrakata ( $F=933,392$ ;  $p<0,001$ ).

S obzirom da su uočene razlike u ponašanju ekstrakata imele sa različitih domaćina, provereno je da li postoji korelacija između FRAP antioksidantnog potencijala i sadržaja pojedinih biomolekula u ovim uzorcima (slika 5.5.). Slaba pozitivna linearna korelacija dobijena je sa sadržajem fenola ( $r = 0,430$ ), tanina ( $r = 0,339$ ) i proantocijanidina ( $r = 0,424$ ), a vrlo jaka pozitivna linearna korelacija sa sadržajem flavonoida ( $r = 0,856$ ) i vitamina C ( $r = 0,770$ ). Između sadržaja karotenoida i FRAP antioksidantnog kapaciteta postojala je jaka negativna linearna korelacija ( $r = -0,745$ ).

Slika 5.5. Promena u vrednosti FRAP antioksidantnog potencijala u funkciji koncentracije nekih

### 5.3.5. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na stepen inhibicije azot monoksida, NO

U tabeli 5.6 i na slici 5.6 prikazani su rezultati određivanja uticaja različitih vodenih ekstrakata lista *V. album* na stepen inhibicije azot monoksida, NO, merenjem stvaranja nitritnih jona. Određivanja su rađena za osnovni rastvor (100%) i pet razblaženja (50%, 25%, 10%, 5% i 1%). S obzirom da tri najveća razblaženja nisu pokazala aktivnost, prikazani su rezultati za osnovni rastvor (100%-ni) i dva razblaženja, 50% i 25%.



**Slika 5.5.** Promena *in vitro* FRAP antioksidantnog potencijala u funkciji koncentracije nekih sekundarnih biomolekula iz *Viscum album* L. sa različitih domaćina.

Ekstrakti lista *V. album* sa različitih domaćina, različito su uticali na inhibiciju azot monoksida, NO. Ekstrakt imele sa bagrema je značajno inhibirao nastanak NO, a ekstrakti imele sa topole i šipka su značajno povećali produkciju NO. Ostali ekstrakti su u nekim koncentracijama pokazali inhibitorni, a nekim su pojačali nastanak NO.

**Tabela 5.6.** Uticaj različitih koncentracija vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina na stepen inhibicije azot monoksida, NO.

Domaćin	Koncentracija		
	100%	50%	25%
Bagrem	6,5±1,5	12,3±2,1*	10,0±0,5 <sup>*,**</sup>
Kruška	1,5±1,8	7,7±3,4*	-8,7±8,4 <sup>*,**</sup>
Šljiva	7,0±2,4	5,5±0,4	-4,0±1,5 <sup>*,**</sup>
Topola	8,6±2,4	-12,6±4,7*	-15,1±1,6*
Glog	2,2±2,0	2,0±1,2	5,0±1,1 <sup>**</sup>
Šipak	-13,9±5,1	-4,2±1,0*	-21,5±3,9 <sup>*,**</sup>
Kleka	6,2±1,8	7,6±1,2	4,7±1,9

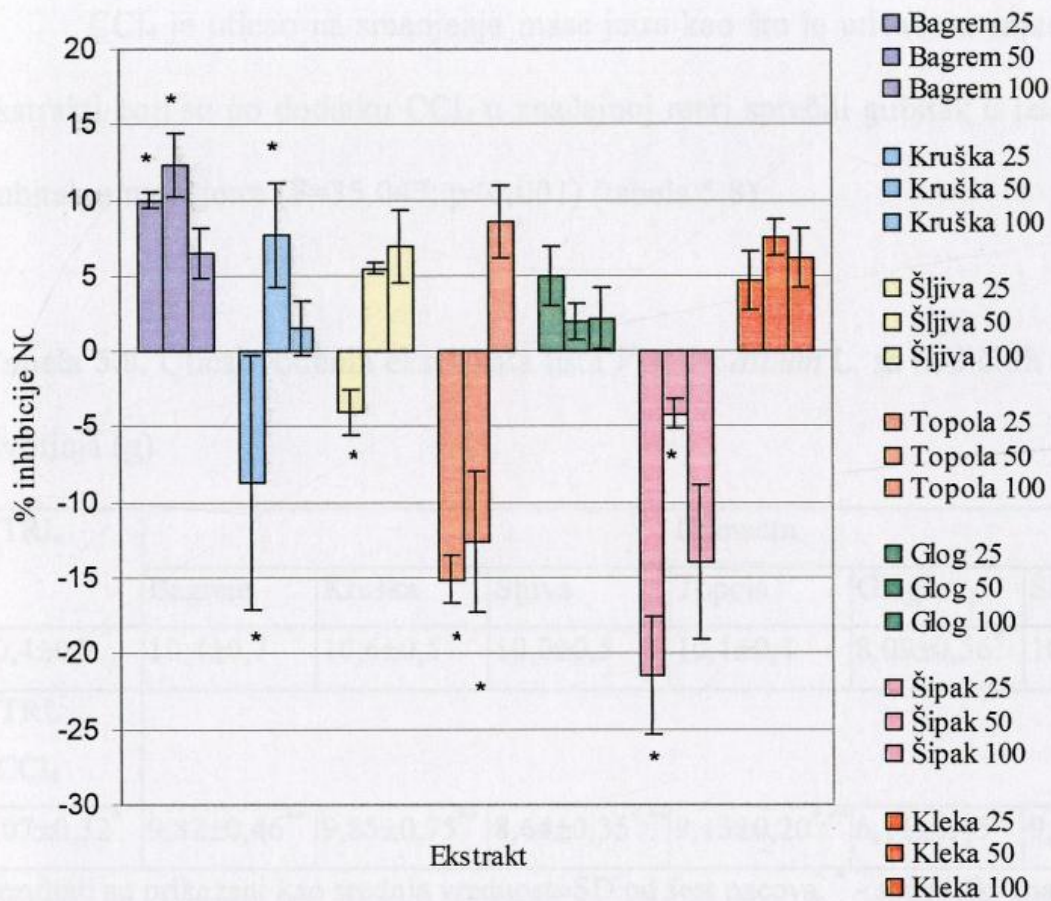
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD; \* - statistički značajna razlika u odnosu na alikvot 100%;

\*\* - statistički značajna razlika u odnosu na alikvot 50%

#### 5.4. Svojstva vodenih ekstrakata *Viscum album* L. sa različitim domaćina u sistemu *in vivo* oštećenja jetre izazvanih CCl<sub>4</sub>-om

Hepatotoksičnost ugljentetrahlorida (CCl<sub>4</sub>) se često koristi kao model za proučavanje oštećenja jetre, izazvanih slobodno radikalskim reakcijama (Cheesman, 1982; Smuckler, 1976). I u ovoj disertaciji, CCl<sub>4</sub> je korišćen za proveru potencijalnih protektivnih svojstava vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitim domaćina, pre i posle administracije CCl<sub>4</sub>.

Tretman sa CCl<sub>4</sub> značajno je smanjio masu životinja u odnosu na netretiranu, za oko 24% (tabela 5.7). Međutim, tretman sa ekstraktima imele je značajno uticao na ovu vrednost, a neki ekstrakti su čak poništili negativan efekat CCl<sub>4</sub>, održavajući telesnu masu u okviru kontrolnih vrednosti. Dobijene srednje vrednosti telesne mase u ovim grupama značajno su se razlikovale (F=34,117; p<0,001) u zavisnosti od primenjenog ekstrakta.



**Slika 5.6.** Uticaj različitih koncentracija vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina na stepen inhibicije azot monoksida, NO.

Rezultati su prikazani u obliku srednja vrednost $\pm$ SD; \* - statistički značajna razlika u odnosu na alikvot 100%

**Tabela 5.7.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina na telesnu masu životinja (g)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
249,2 $\pm$ 8,5	247,0 $\pm$ 4,9	248,5 $\pm$ 3,8	247,5 $\pm$ 4,2	247,5 $\pm$ 4,2	207,2 $\pm$ 5,9*	248,9 $\pm$ 5,6	236,1 $\pm$ 4,7
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
189,7 $\pm$ 9,9*	237,8 $\pm$ 6,7**	244,4 $\pm$ 7,1**	209,2 $\pm$ 6,8***	231,7 $\pm$ 8,1***	189,7 $\pm$ 8,1*	237,4 $\pm$ 6,8***	193,6 $\pm$ 5,3*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

CCl<sub>4</sub> je uticao na smanjenje mase jetre kao što je uticao na smanjenje mase životinja, a ekstrakti koji su po dodatku CCl<sub>4</sub> u značajnoj meri sprečili gubitak u telesnoj masi, sprečili su i gubitak u masi jetre (F=35,047; p<0,001) (tabela 5.8).

**Tabela 5.8.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na masu jetre životinja (g)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
10,4±0,9	10,4±0,7	10,6±0,5	10,0±0,5	10,1±0,4	8,09±0,56*	10,1±0,5	9,40±0,35*
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
6,07±0,32*	9,82±0,46**	9,85±0,75**	8,64±0,35***	9,13±0,20***	6,11±0,45*	9,60±0,56**	6,33±0,37*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

U tabeli 5.9 prikazani su rezultati isitivanja uticaja ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina na količinu hepaticne DNA pre i nakon intoksikacije sa CCl<sub>4</sub>. Intoksikacija sa CCl<sub>4</sub> dovela je do značajnog smanjenja količine hepaticne DNA, a efekat je u određenoj, značajnoj (F=10,826; p<0,001) meri zavisio od imelinog domaćina (vrste ekstrakta). Od domaćina je značajno zavisila i sposobnost ekstrakata imele da zaustave pad količine hepaticne DNA uzrokovan tretmanom sa CCl<sub>4</sub> (F=33,243; p<0,001).

Jedan od parametara oštećenja jetre, hidroksiprolin, je određen u hidrolizatu tkiva jetre u svim ispitivanim grupama životinja, a rezultati su predstavljeni u tabeli 5.10. Kao i do sada, ekstrakti imele sa gloga i kleke su se značajno razlikovali od kontrole i ostalih ekstrakata (F=11,479; p<0,001), i povećali sadržaj hidroksiprolina u hidrolizatu jetre (bez međusobnih razlika). Grupe tretirane sa ostalim ekstraktima se ni po sadržaju hidroksiprolina nisu razlikovale od netretirane kontrolne grupe. Sadržaj hepaticnog hidroksiprolina se značajno povećao po tretmanu sa CCl<sub>4</sub>, i bio je 3,2 puta veći kod CCl<sub>4</sub>-tretiranih životinja nego kod kontrolne grupe. Ekstrakti imele sa šljive, gloga i kleke nisu uspeli da ponište ovaj negativan efekat, odnosno,

dobijene srednje vrednosti se nisu razlikovale od CCl<sub>4</sub> kontrole, kao ni među sobom. Ostali ekstrakti su pokazali pozitivan efekat, značajno snizili vrednosti CCl<sub>4</sub>-kontrole ka vrednostima netretirane grupe (F=26,211; p<0,001), a nisu uočene značajne međusobne razlike.

**Tabela 5.9.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina na sadržaj hepatične DNA (mg DNA/100 g t.m.)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
6,23±0,23	6,34±0,18	6,22±0,08	6,20±0,09	6,24±0,10	5,12±0,13*	5,98±0,19	6,31±0,13
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
4,63±0,19*	5,56±0,21***	5,89±0,13***	6,00±0,17**	6,08±0,12**	4,06±0,12*	6,17±0,12**	4,89±0,13***

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

**Tabela 5.10.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitim domaćina na sadržaj hidroksiprolina u hidrolizatu jetre (µg/100 mg hemolizata jetre)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
28,2±6,5	27,4±4,9	28,5±5,2	28,1±7,2	28,8±6,0	38,1±5,8*	28,2±4,6	32,5±5,4
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
91,4±10,5*	39,4±8,3***	32,4±6,0**	86,3±4,9*	34,0±5,7**	84,6±9,8*	37,8±6,0***	93,8±7,1*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

Aktivnost AST se značajno menjala (F=6,924; p<0,01) u zavisnosti od primenjenog ekstrakta (imelinog domaćina). Svi ekstrakti *V. album* su pojačali aktivnost AST, ali je ovo povećanje bilo statistički značajno samo za ekstrakt imele sa gloga, čime se ovaj ekstrakt još jednom izdvojio od ostalih po svojim karakteristikama. Ostali ekstrakti se nisu značajno razlikovali od kontrole, kao ni među sobom. Očekivano, administracija CCl<sub>4</sub> je višestruko

povećala aktivnost serumske AST (više od 8 puta). Značajne razlike postoje kada je u pitanju odabir ekstrakata ( $F=23,216$ ;  $p<0,001$ ), te aktivnost AST značajno zavisi od domaćina sa koga je imela sakupljena. Aktivnost AST je bila značajno niža kod životinja koje su pre administracije  $CCl_4$  primale i neki od sledećih ekstrakata imele – sa šipka, topole, kruške, šljive ili bagrema. Ovi ekstrakti se nisu značajno razlikovali među sobom.

**Tabela 5.11.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na aktivnost AST (U/L)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
72,0±16,1	74,4±11,6	72,0±13,9	124,4±27,1*	83,2±36,4	123,8±30,8*	73,8±19,5	95,4±23,9
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
592,6±180,5*	236,5±83,8**	164,4±39,8**	172,3±56,2**	253,9±39,0**	477,4±47,9*	146,4±25,1**	347,6±61,1*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

Svi ekstrakti imele su malo povećali aktivnost ALT, ali je ovo povećanje bilo značajno jedino kod tretmana sa ekstraktom imele sa gloga ( $F=16,162$ ;  $p<0,001$ ). Razlike u efektu ostalih ekstrakata su bile veoma male, a dobijene vrednosti veoma bliske vrednosti u kontrolnoj grupi za aktivnost ALT. Efekat ekstrakata imele na aktivnost ALT bio u korelaciji sa efektima ekstrakata na aktivnost AST. Administracija  $CCl_4$  je u velikoj meri povećala aktivnost ALT, a izmerena srednja vrednost aktivnosti je bila čak 15 puta veća od kontrolne. Međutim, razlike između samih ekstrakata su bile značajne ( $F=19,985$ ;  $p<0,001$ ). Već je rečeno da je ekstrakt imele sa gloga sam pojačao aktivnost ALT, pa je kao posledica ovakvog svojstva bila i veoma visoka aktivnost ALT nakon administracije  $CCl_4$ , koja se nije značajno razlikovala od efekta čistog  $CCl_4$  ( $CCl_4$ -kontrola), ili od efekta ekstrakta imele sa kleke. Ostali ekstrakti su značajno snizili aktivnost ALT u odnosu na kontrolnu grupu i pomenuta dva ekstrakta, i nisu se značajno razlikovali među sobom.

**Tabela 5.12.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na aktivnost ALT (U/L)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
21,4±3,8	19,5±2,8	21,1±5,2	25,0±7,2	25,5±4,5	125,5±38,6*	25,2±8,5	25,5±8,1
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
328,4±80,1*	205,1±38,4***	175,0±24,3***	167,4±23,2***	148,2±34,1***	354,8±64,5*	94,1±28,6***	286,4±49,6*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

U tabelama 5.13 i 5.14, prikazani su rezultati određivanja još dva serumska parametra CCl<sub>4</sub>-indukovanog oksidativnog oštećenja jetre, ukupnih proteina i bilirubina, kao i uticaj ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina na ove parametre.

Promene koncentracije ukupnih proteina u serumu zavisile su od domaćina sa kog je imela sakupljena (F=6,734; p<0,01). Tako su ekstrakti imele sa šipka, topole i bagrema povećali količinu ukupnih proteina u odnosu na kontrolu, ali ove promene nisu bile značajne. Ekstrakti imele sa kruške, šljive, kleke i gloga su snizili količinu ukupnih proteina, ali je statistički značajno manja srednja vrednost dobijena samo kod ekstrakta imele sa gloga. Dodatak CCl<sub>4</sub> je smanjio sadržaj ukupnih proteina, a stepen smanjenja je iznosio oko 35% za dobijene srednje vrednosti. Kod životinja pretretiranih sa ekstraktima imele postoje značajne razlike (F=3,726; p<0,05) u sadržaju ukupnih proteina u zavisnosti od vrste primenjenog ekstrakta.

Srednja vrednost za bilirubin je značajno bila promenjena jedino u slučaju tretmana sa ekstraktom imele sa gloga (F=14,701; p<0,001). Ostali ekstrakti nisu pokazali značajnu razliku među sobom, niti u odnosu na srednju vrednost kontrolne grupe. Imajući u vidu činjenicu da je CCl<sub>4</sub> visoko hepatotoksičan, očekivano je da se administracija ovog agensa odrazi na vrednosti bilirubina u serumu eksperimentalnih životinja, i izmerene vrednosti su bile značajno povišene, oko 16 puta. Razlike u efektu različitih ekstrakata su bile značajne (F=9,753; p<0,001).



**Tabela 5.13.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na količinu ukupnih proteina (g/dL)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
7,2±0,7	7,2±0,5	7,2±0,7	7,0±0,4	7,1±0,4	5,1±0,5*	7,5±0,7	6,7±0,3
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
4,7±1,1*	6,1±0,7***	6,3±0,4***	5,3±0,8*	4,9±0,4*	3,9±0,3*	4,2±0,4*	5,0±0,5*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

**Tabela 5.15.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na količinu bilirubina u serumu (mg/dL)

CTRL	Domaćin						
	Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka
0,13±0,06	0,13±0,07	0,14±0,08	0,13±0,04	0,13±0,06	1,1±0,2*	0,14±0,04	0,18±0,06
CTRL +CCl <sub>4</sub>							
2,1±0,6*	1,6±0,9*	1,9±0,6*	1,1±0,06***	1,3±0,6*	3,2±0,6*	1,6±0,5*	2,2±0,4*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova. \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

#### 5.4.1. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa izazvanog CCl<sub>4</sub>-om

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa sedam domaćina na različite parametre oksidativnog stresa izazvanog ugljen-tetrahloridom prikazani su u tabeli 5.16.

**Tabela 5.16.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na aktivnost antioksidantnih enzima

	CTRL	Domaćin									
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka			
XOD (nmol/mg proteina/min)	ekstrakt	1,93±0,16	1,84±0,18	2,74±0,20*	1,89±0,23	1,79±0,15	1,87±0,13	1,88±0,06			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	1,89±0,18	1,88±0,21	2,04±0,34	1,91±0,31	1,91±0,20	1,90±0,30	1,88±0,07			
CAT (nmol/mg proteina/min)	ekstrakt	9,56±2,05	9,33±1,10	8,26±1,24	8,23±1,07	6,24±1,04*	8,28±1,00	7,16±1,22			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	3,32±1,71*	3,93±1,25*	6,91±1,14***	6,48±1,08***	5,42±1,11***	6,42±0,91***	6,41±0,74***			
Px (nmol/mg proteina/min)	ekstrakt	10,8±1,7	10,3±1,8	9,63±2,11	8,95±1,06	8,95±1,52	9,95±0,97	9,12±1,23			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	4,92±0,94*	5,53±1,82*	6,53±1,02***	6,72±1,10***	4,78±0,70*	5,74±1,26*	4,78±1,10*			
GSHP (nmol/mg proteina/min)	ekstrakt	8,50±1,16	8,14±1,43	9,03±1,52	9,03±0,96	9,54±1,25	8,01±0,63	13,1±2,0*			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	21,3±6,1*	20,9±5,2*	19,2±3,3*	18,4±4,6*	15,2±3,2*	16,1±2,8*	19,4±2,4*			
GR (nmol/mg proteina min <sup>-1</sup> )	ekstrakt	6,10±1,06	6,08±1,01	6,08±1,01	6,10±0,60	5,07±0,90	7,14±0,76	5,67±0,99			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	1,23±0,50*	1,94±0,60*	3,27±0,54***	2,20±0,54***	5,20±0,75**	3,19±0,96***	2,30±0,71***			
GSH (nmol/mg proteina)	ekstrakt	4,97±1,25	4,97±0,45	4,95±0,50	4,95±0,88	4,95±0,91	5,85±0,76	4,73±0,66			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	0,73±0,37*	1,22±0,65*	3,26±1,22**	2,15±0,76***	4,12±0,79**	3,01±1,06***	1,23±0,68*			
LPx (nmolMDA/mg proteina)	ekstrakt	2,98±0,74	3,02±0,57	2,83±0,33	2,93±0,12	3,93±0,93	1,83±0,41	3,01±0,38			
	ekstrakt+CCl <sub>4</sub>	9,68±1,30*	9,42±0,96*	8,01±0,85***	8,19±2,09*	8,26±0,96*	7,18±2,23*	8,26±0,63*			

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest pacova; \* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL kontrolnu grupu; \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na CTRL-CCl<sub>4</sub> grupu

Od svih ekstrakata imele jedino je ekstrakt imele sa šljive značajno povećao aktivnost ksantin-oksidge (XOD) i u odnosu na kontrolu, i u poređenju sa ostalim ekstraktima ( $F=14,908$ ;  $p<0,001$ ). Aktivnost XOD se nije značajno menjala tretmanom sa  $CCl_4$ , pa se srednje vrednosti aktivnosti XOD kod eksperimentalnih životinja pretretiranih sa ekstraktima imele nisu značajno razlikovale ni od kontrole ni od  $CCl_4$ -kontrolne. Uz to, iako su prethodno analizirani parametri bili značajno menjani tretmanom sa ekstraktom imele sa gloga, aktivnost XOD je ostala nepromenjena, čak i u kombinaciji sa  $CCl_4$ .

Tretman eksperimentalnih životinja sa ekstraktima imele pokazao je značajne razlike u efektima različitih ekstrakata na aktivnost katalaze (CAT) ( $F=16,889$ ;  $p<0,001$ ). Tako, ekstrakti imele sa gloga i kleke su značajno snizili aktivnost CAT u odnosu na kontrolnu grupu, a značajno su se razlikovali i od ostalih ekstrakata, među kojima nije bilo razlike. Ugljentetrahlid je značajno smanjio aktivnost CAT (za oko 65%) u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu životinja. Intenzitet sniženja aktivnosti CAT je zavisio od vrste ekstrakta kojim su životinje tretirane pre administracije  $CCl_4$  ( $F=8,521$ ;  $p<0,001$ ). Ekstrakti imele sa gloga, kruške i kleke nisu uspjeli da spreče pad aktivnosti CAT uzrokovan  $CCl_4$ -om. Ostali ekstrakti imele (sa bagrema, šljive, šipka i topole) značajno su pojačali aktivnost CAT u odnosu na  $CCl_4$  kontrolu i pomenute ekstrakte.

Ekstrakti kojima su životinje tretirane različito su uticali na aktivnost peroksidaze (Px) i među njima je bilo značajne razlike ( $F=8,748$ ;  $p<0,001$ ). Ekstrakt imele sa bagrema je pojačao aktivnost Px, izmerena srednja vrednost nije bila značajno viša od kontrolne, ali je bila značajno viša od aktivnosti Px nakon tretmana sa ekstraktima imele sa gloga, kleke i topole. Kao što je i očekivano, tretman sa  $CCl_4$  je značajno uticao na aktivnost Px, tj. snizio je aktivnost ovog enzima, oko 50%. Aktivnost Px nakon intoksikacije sa  $CCl_4$  značajno je zavisila od vrste ekstrakta kojim su životinje tretirane ( $F=9,192$ ;  $p<0,001$ ). Ekstrakti imele sa bagrema, topole i šljive su značajno povećali aktivnost Px, odnosno sprečili pad aktivnosti, očekivanu po dodatku  $CCl_4$ .

Aktivnost glutation-peroksidaze (GSHPx) nakon tretmana sa ekstraktima imele sa različitih domaćina značajno se razlikuje u zavisnosti od primenjenog ekstrakta ( $F=3,572$ ;  $p<0,05$ ). Značajna razlika u aktivnosti GSHPx je uočena samo između ekstrakata imele sa šipka (najniža aktivnost GSHPx) i ekstrakta imele sa kleke (najviša aktivnost GSHPx). Tretman eksperimentalnih životinja sa ugljentetrahloridom je značajno, oko 2,5 puta pojačao aktivnost GSHPx. Pretretman životinja sa različitim dozama ekstrakata imele nije značajno menjao aktivnost GSHPx nakon dodatka  $CCl_4$  ( $F=1,004$ ;  $p>0,05$ ).

Aktivnost glutation reduktaze (GR) je značajno zavisila od vrste apliciranog ekstrakta. Ova statistička značajnost ( $F=18,706$ ;  $p<0,01$ ) se prvenstveno odnosila na ekstrakt imele sa gloga, koji je značajno snizio aktivnost GR u odnosu na aktivnost GR u kontrolnoj grupi (za oko 30%), a izmerena srednja vrednost je bila značajno niža i u odnosu na tretman sa ostalim ekstraktima. Suprotno, ekstrakt imele sa šipka je značajno pojačao aktivnost GR i u odnosu na kontrolu (oko 18%), i u odnosu na ostale ekstrakte. Intoksikacija sa ugljentetrahloridom uticala je na GR, značajno snižavajući aktivnost ovog enzima, gotovo 5 puta u odnosu na netretiranu, kontrolnu grupu životinja (oko 20% kontrolne vrednosti). Ovako veliki pad aktivnosti GR nisu uspeli da spreče ekstrakti imele sa različitih domaćina.

Kada je u pitanju količina glutationa (GSH), jednog od najvažnijih endogenih antioksidanata, promena njegove ukupne količine je zavisila od vrste ekstrakta imele ( $F=4,170$ ;  $p<0,05$ ). Pomenuta značajnost se odnosila na razliku između efekata ekstrakata imele sa gloga i kleke (najmanja količina GSH) i efekta ekstrakta imele sa šipka (najveća izmerena količina GSH). Kao jak induktor oksidativnog stresa,  $CCl_4$  je oksidovao ili razgradio značajno veliki deo GSH *pool*-a hepatocita, odnosno, administracijom  $CCl_4$  je izgubljeno oko 85% redukovano glutationa. Drugim rečima, izmerena količina GSH je iznosila 0,73 nmol/mg proteina, što je bilo svega 15% od ukupnog sadržaja hepaticnog GSH. Može se reći da je ovakav rezultat bio očekivan, a biće interesantno proanalizirati kako je pretretman sa ispitivanim ekstraktima imele sa različitih domaćina uticao na sadržaj ovog endogenog antioksidansa. Količina GSH je u svim

grupama bila viša u odnosu na CCl<sub>4</sub>-kontrolu, ali je povišenje bilo značajno kada je CCl<sub>4</sub> kombinovan sa pretretmanom sa ekstraktima imele sa šipka, šljive, topole i bagrema (F=6,850; p<0,01). Značajno su se razlikovali i efekti ekstrakata šipka i kleke.

Intenzitet *in vivo* lipidne peroksidacije (LPx) membranskih lipida hepatocita u mnogome je zavisio od vrste primenjenog ekstrakta. Najniža srednja vrednost intenziteta LPx dobijena je nakon tretmana sa ekstraktom imele sa šipka i ova se značajno razlikovala od srednje vrednosti intenziteta LPx u kontrolnoj grupi i od srednjih vrednosti intenziteta LPx dobijenih za ostale ekstrakte (F=26,440; p<0,001). Suprotno, intenzitet LPx u hepatocitima je bio najveći nakon tretmana sa ekstraktom imele sa gloga i značajno se razlikovao od intenziteta LPx u kontrolnoj grupi i grupama tretiranim sa ostalim ekstraktima. Dobijeni *in vivo* rezultati pokazuju analogiju sa prethodno analiziranim *in vitro* rezultatima. Dodatak CCl<sub>4</sub> pojačao je oksidativno oštećenje membrane hepatocita 3,3 puta. Antioksidantni potencijal ekstrakata je zavisio i od vrste ekstrakata (F=5,978; p<0,01). Tako su ekstrakti imele sa šipka i bagrema uspeali da spreče značajno oštećenje membrane hepatocita nakon dodatka CCl<sub>4</sub>, i time pokazali moguć značajan antioksidantni potencijal. Ostali ekstrakti, iako su dobijene srednje vrednosti intenziteta LPx bile niže od CCl<sub>4</sub>-kontrole, nisu pokazali značajniji protektivni efekat, i nisu se razlikovali među sobom.

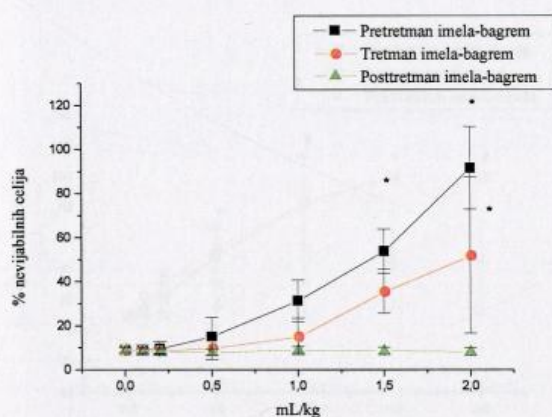
#### **5.5. *In vivo* citotoksičnost različitih vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. za ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)**

U ovom poglavlju opisan je uticaj vodenih ekstrakata lista imele sa sedam različitih domaćina na tumorske ćelije Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma. Rezultati su dati u poglavlju 5.5.1, u kome su prikazane promene nekih ćelijskih parametara, kao i u poglavlju 5.5.2, u kome su prikazane promene antioksidantnog statusa EAC ćelija nakon tretmana sa ispitivanim ekstraktima.

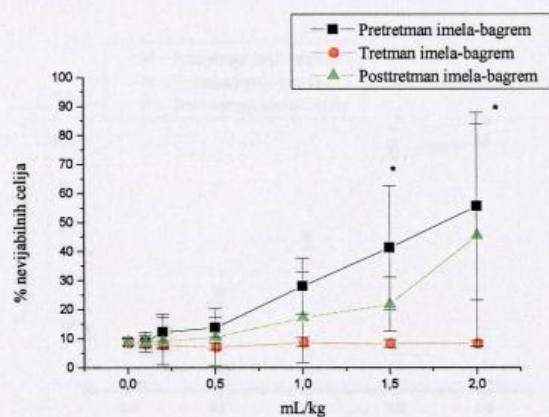
### 5.5.1. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na vijabilnost ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)

Da bi proverili opravdanost primene standardne doze ekstrakta 2 mL/kg t.m. za tretman životinja sa implantiranim tumorom, urađen je pilot eksperiment u kome je praćen procenat nevijabilnih ćelija EAC u zavisnosti od primenjene doze ekstrakta. Osim doze 2 mL/kg t.m., ispitano je i pet manjih – 1,5, 1, 0,5, 0,2 i 0,1 mL/kg, a rezultati su prikazani grafički (slika 5.7). Rezultati su prikazani odvojeno, za mužjake i ženke. Bez detaljne statističke analize, a na osnovu dobijenih rezultata, nameće se zaključak da je najveća doza – 2 mL/kg t.m. pokazala i najjači efekat. Stoga je za dalja ispitivanja citotoksičnosti vodenog ekstrakta imele sa različitih domaćina za ćelije Ehrlich-ovog tumora odabrana najveća doza, 2 ml/kg t.m., što je bilo u skladu sa literaturnim podacima (*Eksperimentalni deo*) i rezultatima preliminarnih *in vivo* eksperimenata (poglavlje 5.4).

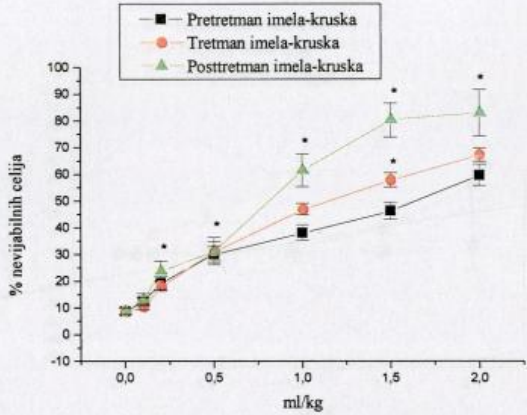
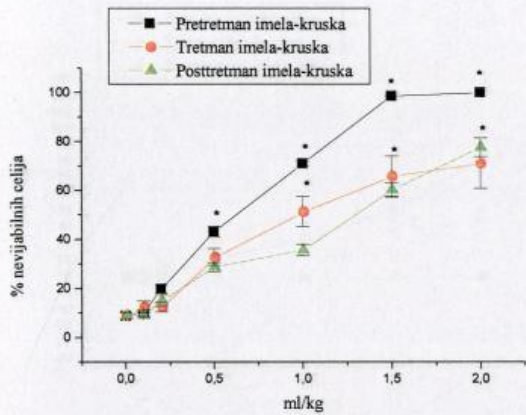
Mušjaci



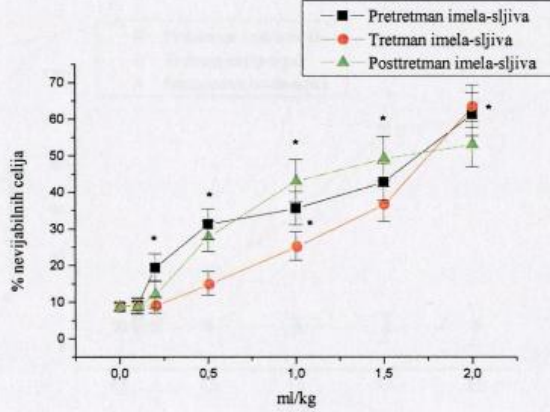
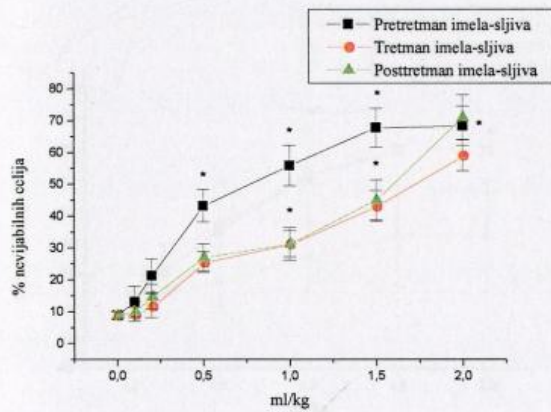
Ženke



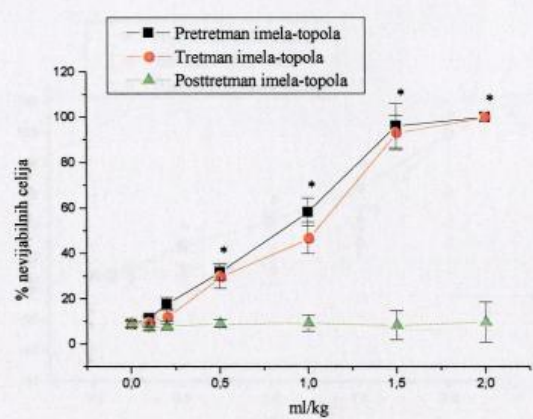
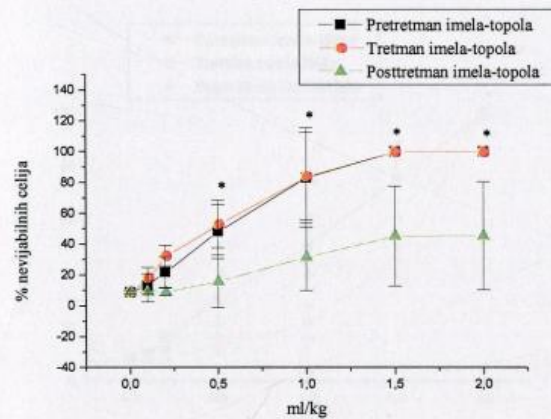
bagrem



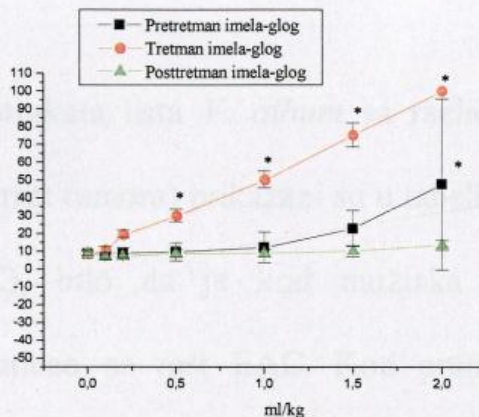
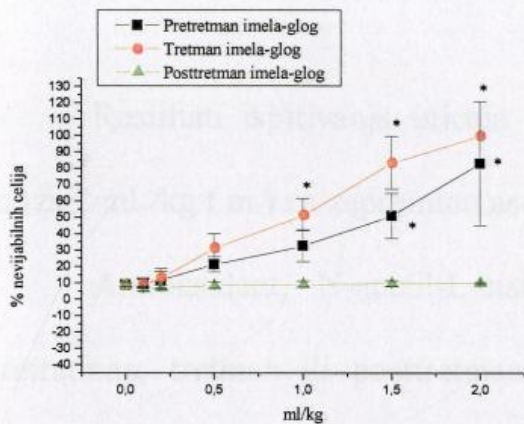
kruška



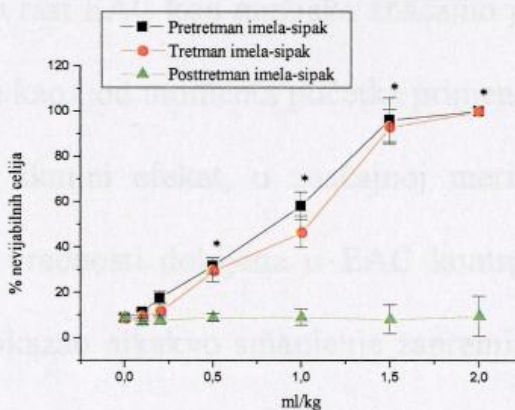
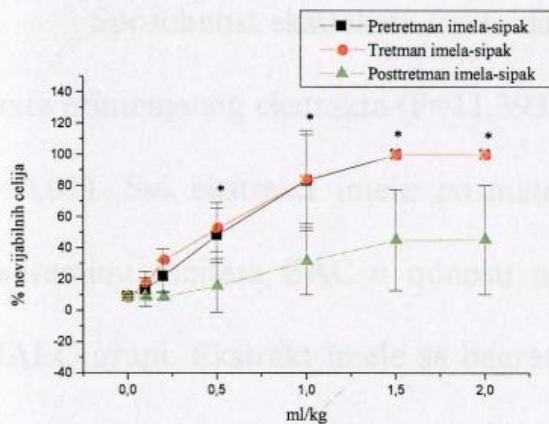
sljiva



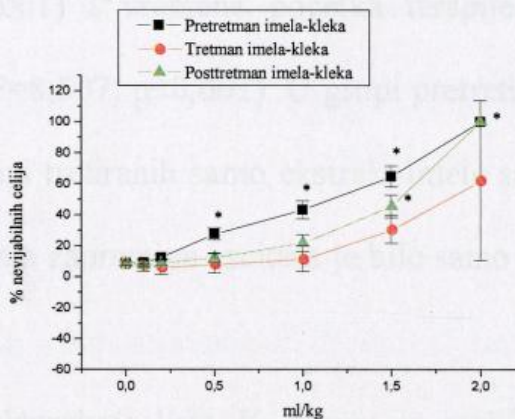
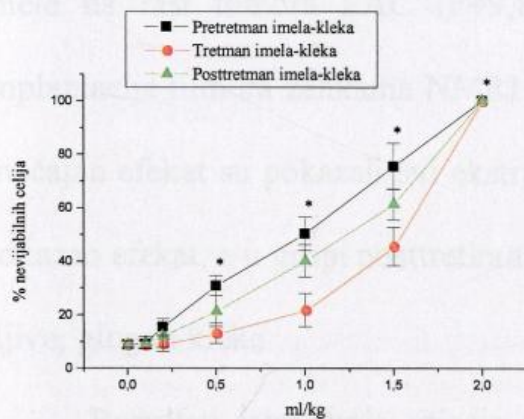
topola



### glog



### šipak



### kleka

**Slika 5.7.** Procenat nevjabilnih EAC ćelija nakon izlaganja dejstvu različitim doza vodenih ekstrakata lista *V. album* (levo-mužjaci; desno-ženke)

- – životinje pretretirane sa odgovarajućim vodenim ekstraktom *V. album*
- – životinje tretirane sa odgovarajućim vodenim ekstraktom *V. album*
- ▲ – životinje posttretirane sa odgovarajućim vodenim ekstraktom *V. album*



Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na zapreminu ascitesa EAC (rast tumora) prikazani su u tabeli 5.17.

Antioksidant, N-acetil-L-cistein (NALC), bilo da je kod mužjaka apliciran kao pretretman, tretman ili posttretman, slabo je uticao na rast EAC. Kod pretretiranih ženki izmerena je manja zapremina ascitesa EAC, ali je kod posttretiranih životinja izmerena veća zapremina ascitesa EAC.

Sposobnost ekstrakata imele da inhibiraju rast EAC kod mužjaka značajno je zavisila od vrste primenjenog ekstrakta ( $F=11,393$ ;  $p<0,001$ ) kao i od momenta početka primene ( $F=10,014$ ;  $p<0,01$ ). Svi ekstrakti imele posmatrano kroz ukupni efekat, u značajnoj meri su smanjili zapreminu ascitesa EAC u odnosu na srednje vrednosti dobijene u EAC kontrolnoj grupi i NALC grupi. Ekstrakt imele sa bagrema nije pokazao nikakvo smanjenje zapremine ascitesa u grupi posttretiranih životinja.

I kod ženki NMRI miševa, postojale su značajne razlike u efektu različitih ekstrakata imele na rast tumora EAC ( $F=9,867$ ;  $p<0,001$ ) i vremena početka terapije od momenta implantacije tumora ženkama NMRI miševa ( $F=8,507$ ;  $p<0,001$ ). U grupi pretretiranih životinja značajan efekat su pokazali svi ekstrakti, u grupi tretiranih samo ekstrakt imele sa bagrema nije pokazao efekat, a u grupi posttretiranih smanjenja zapremine ascitesa je bilo samo kod ekstrakata šljive, gloga i kleke.

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na broj ćelija EAC prikazani su u tabeli 5.18.

Kao što je uočeno i kod zapremine ascitesa EAC, antioksidant NALC je slabo uticao na broj ćelija EAC, i nije smanjio njihov broj u odnosu na EAC kontrolu, bilo da su N-acetil-L-cisteinom tretirane grupe mužjaka ili ženki.

Analiza podataka je pokazala da kod mužjaka postoje značajne razlike između samih ekstrakata ( $F=3,586$ ;  $p<0,05$ ) i između pretretiranih, tretiranih i posttretiranih životinja ( $F=7,190$ ;

$p < 0,01$ ). Kod pretretiranih i tretiranih mužjaka izmeren je značajno manji broj ćelija EAC u odnosu na postretirane životinje kod svih primenjenih ekstrakata, izuzev kod ekstrakta bagrema, koji nije pokazao smanjenje broja ćelija ni kod tretiranih ni kod posttretiranih životinja. Efekti svih ekstrakata, izuzev ekstrakta imele sa bagrema, primenjenih posle implantacije tumora bili su značajno različiti u odnosu na kontrolu i NALC grupu, ali smanjenje broja ćelija EAC nije bilo tako izrazito kao kod pretretiranih i posttretiranih životinja.

Poređenjem ukupnog efekta ekstrakata imele na broj ćelija EAC kod ženki, potvrđeno je postojanje značajnih razlika i u odnosu na vrstu ekstrakta ( $F=4,438$ ;  $p < 0,01$ ), i u odnosu na vreme primene ( $F=6,293$ ;  $p < 0,05$ ). Efekti svih ekstrakata u pretretiranoj grupi su bili značajni, a u tretiranoj grupi samo ekstrakt bagrema nije pokazao značajan efekat. U posttretiranoj grupi značajan efekat je pokazao samo ekstrakt imele sa kleke, kod svih ostalih ekstrakata nije bilo značajnog smanjenja broja ćelija.

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na vijabilnost ćelija EAC prikazani su u tabeli 5.19.

Tretman životinja oba pola sa antioksidantnom N-acetil-L-cisteinom nije menjao vijabilnost ćelija EAC, koja je u ovim grupama bila veoma visoka za sva tri načina aplikacije ovog molekula.

Analizom dobijenih srednjih vrednosti procenta nevijabilnih ćelija, potvrđeno je postojanje značajnih razlika u dejstvu različitih ekstrakata imele i NALC ( $F=8,914$ ;  $p < 0,001$ ). Naime, primena antioksidanta NALC nije uticala na promenu srednjih vrednosti iz EAC kontrolne grupe mužjaka, ali je procenat nevijabilnih ćelija određen nakon primene ekstrakata imele bio značajno viši u odnosu na EAC i NALC grupu. Iako se za ekstrakt imele sa bagrema na prvi pogled ne može reći da se po pokazanom efektu značajno razlikuje od NALC i EAC grupa, detaljnijom analizom je ova značajnost ipak potvrđena.

Efekat ekstrakata imele na vijabilnost ćelija EAC kod mužjaka zavisio je značajno i od vremena početka njihove aplikacije, odnosno da li su korišćeni kao pretretman, tretman ili

posttretman ( $F=5,850$ ;  $p<0,05$ ). Mužjaci pretretirani sa ekstraktima imele imali su značajno veći broj oštećenih tumorskih ćelija u odnosu na posttretirane.

Kao što je već napomenuto, kod mužjaka pretretiranih sa ekstraktima imele izmerena je značajno manja vijabilnost ćelija EAC u odnosu na EAC i NALC grupe ( $F=17,739$ ;  $p<0,001$ ), ali je značajne razlike između pojedinih ekstrakata nisu uočene. I u grupama mužjaka tretiranih sa ekstraktima imele, broj nevijabilnih ćelija tumora je bio značajno veći u odnosu na kontrolnu EAC i grupu tretiranu sa NALC ( $F=92,074$ ;  $p<0,001$ ). Međutim, kod ovakvog načina terapije do izražaja dolaze i značajne razlike u efektu pojedinih ekstrakata (razlikovali su se svi ekstrakti među sobom, osim onih kod kojih nije došlo do formiranja tumorske mase – ekstrakti imele sa topole, gloga, šipka i kleke). Posttretman mužjaka sa ekstraktima imele značajno je povećao procenat nevijabilnih ćelija EAC kada su primenjivani ekstrakti imele sa kleke, kruške i šljive ( $F=8,223$ ;  $p<0,001$ ), dok kod ostalih ekstrakata, kao i NALC ovaj parametar nije značajno promenjen.

Ukupni efekat ekstrakata imele na vijabilnost ćelija EAC kod ženki može se smatrati značajnim ( $F=2,656$ ;  $p<0,05$ ) u niskom stepenu, značajan je ukupni efekat ekstrakata imele sa kleke u odnosu na netretiranu grupu ženki i grupe u kojima je apliciran NALC.

Pretretman ženki sa ekstraktima imele značajno je smanjio vijabilnost ćelija EAC u odnosu na EAC kontrolu i NALC grupu ( $F=10,417$ ;  $p<0,001$ ), dok između ekstrakata nisu uočene značajne razlike. Kod ženki tretiranih sa NALC i ekstraktom imele sa bagrema nije smanjena vijabilnost ćelija EAC, ali je značajno smanjenje vijabilnosti uočeno kod ostalih ekstrakata ( $F=31,841$ ;  $p<0,001$ ). U grupama tretiranim sa ekstraktima imele sa šljive, kruške i kleke, iako smanjena u odnosu na kontrolu, vijabilnost ćelija EAC je bila značajno veća u odnosu na grupe tretirane ekstraktima imele sa topole, gloga i šipka, gde se tumor nije ni formirao. Značajno smanjena vijabilnost ćelija EAC kod ženki izmerena je u grupama posttretiranim sa ekstraktima imele sa kleke (0%), kruške, šljive i bagrema ( $F=51,693$ ;  $p<0,001$ ),

dok se ostali ekstrakti, kao i NALC nisu pokazali značajno efikasnim kada su aplicirani životinjama sa već razvijenim tumorom.

Do sada uočena značajna razlika u aktivnosti vodenih ekstrakata *V. album* sa različitim domaćina nagoveštava mogućnost da biološka aktivnost ekstrakata u mnogome zavisi od domaćina na kome je biljka rasla. Takođe, iz svega navedenog, nameće se zaključak da je u slučaju terapije sa vodenim ekstraktima *V. album*, od presudne važnosti kada se i na koji način ekstrakt aplicira eksperimentalnim životinjama.

Tabela 5.01. Učinkaj vodenih ekstrakata iz *Vaccinium album* L. na različitim domaćinima (2 ml/2g, 1m, 1) Na različitim EAC (rast različitih)

EAC	Aplicacija			Domaćin		
	Preparat	Kontrola	Šljiva	Trapača	Gljog	Sipak
Moljari	Preparat	0 (0/6)	0,130,2 (1/6)	0 (0/6)	0,130,2 (1/6)	0 (0/6)
	Trapača	1,5 (1/6)	0,330,2 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
	Posttreatman	6,231,2 (0/6)	3,030,5 (0/6)	1,531,5 (0/6)	2,531,2 (0/6)	1,530,5 (0/6)
Zrnko	Preparat	1,7 (2/6)	0,130,2 (1/6)	0,130,2 (0/6)	0 (0/6)	0,331,0 (0/6)
	Trapača	1,131,1 (0/6)	0,930,5 (0/6)	1,330,3 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
	Posttreatman	3,231,2 (0/6)	4,030,1 (0/6)	3,230,5 (0/6)	4,632,3 (0/6)	3,431,5 (0/6)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ±SD od šest životinja. \*statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu EAC. p < 0,05. Razlika od 0,05 se smatra značajnom.

**Tabela 5.17.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na zapreminu ascitesa EAC/rast tumora (mL).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC	
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka					
Mužjaci	Pretrtman	0,1±0,1*	0*(0/6)	0,1±0,2*	0*(0/6)	0,1±0,2*	0*(0/6)	0,1±0,2*	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	4,0±0,4*
		(1/6)		(1/6)		(1/6)		(1/6)					(6/6)
		Tretman	1,6±1,4*	0,5±0,2*	0,9±0,2*	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)
(5/6)	(6/6)		(6/6)									(6/6)	
Ženke	Posttretman	6,2±1,2	0,9±1,2*	3,0±0,5*	1,5±1,5*	2,5±1,2*	1,5±1,5*	1,5±1,5*	(3/6)	1,5±1,5*	(3/6)	0*(0/6)	6,2±1,3
		(6/6)	(2/6)	(6/6)		(5/6)							(6/6)
7,2±0,4	Pretrtman	2,2±3,2*	0,2±0,2*	0,3±0,4*	0*(0/6)	0,7±1,0*	0*(0/6)	0,7±1,0*	(2/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	3,8±0,5*
		(2/6)	(3/6)	(2/6)									(6/6)
		Tretman	5,9±3,1	0,9±0,8*	1,3±0,3*	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0*(0/6)	0,6±0,8*
(6/6)	(5/6)		(6/6)								(2/6)	(6/6)	
	Posttretman	3,8±3,2	4,0±0,1	3,2±0,5*	4,6±2,3	1,8±0,9*	4,4±1,5	1,8±0,9*	(6/6)	4,4±1,5	0*(0/6)	0*(0/6)	9,7±1,9
		(5/6)	(6/6)	(6/6)		(6/6)		(6/6)		(6/6)			(6/6)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD od šest miševa; \* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu EAC grupu; broj u zagradi označava broj životinja od 6 u grupi kod kojih se razvio tumor

**Tabela 5.18.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na broj ćelija EAC

(broj ćelija/mm<sup>3</sup>), izraženo u hiljadama.

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC			
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka							
105,0±1,3	Mušjaci														
	Pretretman	5,0±11,0*	0*	0,9±2,0*	0*	3,5±7,8*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	65,0±5,0*	
	Tretman	71,2±34,5	63,8±1,5*	17,9±2,0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	98,0±2,0	
Ženke	Posttretman	250,0±30,0	12,8±18,0*	74,1±3,0*	30,8±31,4*	66,2±38,9*	30,8±31,4*	30,8±31,4*	0*	0*	0*	0*	0*	120,0±5,0	
	Pretretman	35,0±50,0*	40,5±40,5*	18,3±26,1*	0*	26,0±36,9*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	110,0±2,0	
	Tretman	123,5±9,5	64,3±31,0*	50,3±9,3*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	130,0±4,0	
120,5±9,5	Posttretman	89,5±43,0	86,3±6,5	74,5±8,5	120,0±16,4	90,8±15,5	120,0±16,4	120,0±16,4	0*	0*	0*	0*	0*	130,0±6,5	

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

**Tabela 5.19.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na vijabilnost ćelija EAC (% nevijabilnih ćelija).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC	
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka					
Mužjaci	Pretretman	91,6±18,7*	100*	84,7±34,2*	100*	84,2±35,2*	100*	100*					8,38±1,83
	Tretman	51,6±22,0*	71,1±11,7*	59,1±8,81*	100*	100*	100*	100*					7,98±1,54
	Posttretman	8,20±1,08	77,5±32,0*	71,2±14,6*	54,8±45,2	21,6±35,1	54,8±45,2	100*					7,15±1,51
Ženke	Pretretman	82,8±24,8*	59,9±40,2*	69,9±42,6*	100*	72,6±38,7*	100*	100*					9,87±1,27
	Tretman	8,29±1,32	67,3±15,3*	63,5±9,6*	100*	100*	100*	68,8±44,1*					8,39±1,19
	Posttretman	45,5±28,2*	83,0±8,9*	53,0±11,1*	9,54±2,05	13,4±9,4	9,54±2,05	100*					7,99±1,68

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

### 5.5.2. Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina na antioksidantni status ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC)

U ovom poglavlju su prikazani rezultati ispitivanja uticaja različitih ekstrakata lista *V. album* na antioksidantni status malignih ćelija EAC. Promene antioksidantnog statusa malignih ćelija praćene su merenjem aktivnosti antioksidantnih enzima ksantin oksidaze (XOD), katalaze (CAT), peroksidaze (Px), glutation peroksidaze (GSHPx), glutation reduktaze (GR), kao i merenjem promena količine redukovanog glutationa (GSH) i intenziteta lipidne peroksidacije (LPx) u ovim ćelijama. Da bi se stekao uvid u eventualno postojanje oksidativnog stresa u ćelijama EAC posle primene ispitivanih ekstrakata, dobijeni rezultati poređeni su sa rezultatima dobijenim merenjem ovih parametara u ćelijama EAC, i u ćelijama EAC nakon primene jednog antioksidanta, N-acetil-L-cisteina (NALC).

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na aktivnost XOD u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.20.

Pre tretman mužjaka sa ekstraktima imele značajno je pojačao aktivnost XOD u ćelijama EAC ( $F=20,278$ ;  $p<0,001$ ) u odnosu na kontrolu i grupu pretretiranu sa NALC, između kojih nije bilo značajnih razlika. Razlika u efektu pojedinih ekstrakata nije bilo, s tim da se kod mužjaka pretretiranih sa ekstraktima imele sa kruške, topole, šipka i kleke tumor nije razvio (nisu pronađene ćelije EAC). Aktivnost XOD u ćelijama EAC u grupama mužjaka kojima je NALC i ekstrakt imele sa bagrema davani od momenta implantacije tumora, nije se razlikovala od aktivnosti u ćelijama EAC kontrolne grupe. Ostali ekstrakti su, primenjeni kao tretman, značajno pojačali aktivnost XOD u ćelijama EAC ( $F=100550,4$ ;  $p<0,001$ ). Posttretman mužjaka sa ekstraktima imele pokazao se signifikantno efikasnim jedino u slučaju primene ekstrakata imele sa kleke (bez ćelija EAC) i kruške, a veliko pojačanje aktivnosti XOD uočeno je i u ćelijama EAC u grupama posttretiranim sa ekstraktima imele sa šipka i topole ( $F=9,151$ ;  $<0,001$ ). Primena ostalih ekstrakata ili NALC nije značajno promenila aktivnost XOD u malignim ćelijama.



**Tabela 5.20.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost XOD u ćelijama EAC ( $\mu\text{mol/mL}$  ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC			
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka							
0,123±0,023	Mušjaci														
	Pretretman	3,17±0,0*	*	5,15±0,0*	*	3,15±0,0*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,134±0,034
	Tretman	1,06±0,24*	3,09±0,57*	3,14±0,91*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,142±0,046
Ženke	Posttretman	0,093±0,020	2,76±0,13*	1,25±0,51*	0,241±0,151*	0,224±0,141	0,247±0,061	*	*	*	*	*	*	*	0,093±0,020
	Pretretman	1,95±0,10*	4,23±0,91*	3,82±1,04*	*	3,92±1,55*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,19±1,10*
	Tretman	0,184±0,057	3,75±0,92*	2,87±0,94*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,919±0,284
0,153±0,036	Posttretman	0,148±0,029	3,82±1,39*	1,82±0,91*	1,22±0,29*	1,85±1,24	1,26±0,63	*	*	*	*	*	*	*	0,279±0,161

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

**Tabela 5.21.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost CAT u ćelijama EAC ( $\mu\text{mol/mL}$  ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin									
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka	NALC		
Mužjaci	Pre tretman	0,393±0,0*	-	0,093±0,0*	*	0,293±0,0*	*	*	0,375±0,092		
	Tretman	0,426±0,091	0,319±0,125	0,328±0,136	*	*	*	0,405±0,106			
	Post tretman	0,598±0,093	0,421±0,084*	0,412±0,085	0,213±0,067	0,442±0,120	0,219±0,098*	0,476±0,064			
Ženke	Pre tretman	0,508±0,02*	0,128±0,022*	0,103±0,049*	*	0,103±0,06*	*	*	0,504±0,085		
	Tretman	0,551±0,110	0,298±0,111*	0,392±0,137	*	*	*	0,576±0,15			
	Post tretman	0,695±0,08	0,388±0,208	0,493±0,106	0,392±0,112	0,493±0,103	0,419±0,127	0,548±0,067			

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

**Tabela 5.22.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost Px u ćelijama EAC ( $\mu\text{mol/mL}$  ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC		
		Bagrem	Kruška	Šjiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka						
Mužjaci														
	0,279±0,088	2,34±0,0*	-	2,45±0,0*	-	1,45±0,0*	*	-	*	-	*	-	0,286±0,091	
		0,432±0,079*	1,16±0,29*	1,11±0,49*	-	-	*	-	*	-	*	-	0,235±0,035	
Ženke														
		0,187±0,051	0,962±0,138*	0,935±0,095*	1,04±0,06*	0,235±0,044	1,04±0,08*	-	*	-	*	-	0,207±0,064	
0,328±0,083														
		0,579±0,092*	2,16±0,55*	1,57±0,14*	-	1,37±0,03*	*	-	*	-	*	-	0,261±0,059	
		0,353±0,072	1,86±0,42*	0,953±0,066*	-	-	*	-	*	-	*	-	0,291±0,085	
		0,327±0,063	0,996±0,272	0,826±0,056	0,327±0,10	0,826±0,057	0,331±0,087	-	*	-	*	-	0,200±0,101	

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

**Tabela 5.23.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost

GSHPx u ćelijama EAC ( $\mu\text{mol/mL}$  ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC	
		Bagrem	Kruška	Šljivja	Topola	Glog	Šipak	Kleka					
Mužjaci	Pre tretman	2,63±0,0*	-	5,63±0,0*	-	2,63±0,0*	-	-	-	-	-	-	0,754±0,118
	Tretman	0,993±0,091	4,89±0,74*	4,95±0,70*	-	-	-	-	-	-	-	-	0,808±0,141
	Post tretman	0,228±0,074	4,24±0,13*	2,26±0,49*	1,73±0,20	0,926±0,106	1,73±0,20	-	-	-	-	-	0,698±0,171
Ženke	Pre tretman	3,53±0,28*	6,53±0,28*	5,53±0,01*	-	5,53±0,15*	-	-	-	-	-	-	0,732±0,035
	Tretman	0,951±0,091	5,90±0,33*	3,90±1,13*	-	-	-	-	-	-	-	0,974±0,036*	0,544±0,033
	Post tretman	0,694±0,073	3,94±0,53*	1,93±0,64*	0,93±0,24	1,93±0,51*	0,923±0,094	-	-	-	-	-	0,588±0,054

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

**Tabela 5.24.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na aktivnost GR u ćelijama EAC ( $\mu\text{mol/mL}$  ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC		
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka						
1,38±0,47	Mušjaci													
	Pretretman	2,56±0,0*	*	8,56±0,0*	*	3,56±0,0*	*	-	*	-	*	-	1,47±0,59	
	Tretman	1,22±0,62	5,34±0,64*	5,22±0,46*	*	-	*	-	*	-	*	-	1,46±0,25	
Ženke	Posttretman	1,51±0,44	5,56±0,42*	3,51±0,53*	1,51±0,41*	2,51±0,39*	1,62±0,10	*	-	*	-	*	1,12±0,19	
	Pretretman	3,73±0,63*	7,73±0,77*	7,73±0,49*	*	7,73±0,30*	*	-	*	-	*	-	2,12±0,86	
	Tretman	2,86±0,81	6,33±0,89*	4,86±0,66*	*	-	*	-	*	-	*	2,83±0,70	1,81±0,48	
2,24±0,83	Posttretman	2,14±0,44	5,78±0,41*	4,13±0,87*	2,13±0,62	4,13±0,37*	2,33±0,50	*	-	*	-	*	1,57±0,48	

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

**Tabela 5.25.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na sadržaj GSH u

ćelijama EAC (nmol GSH/mL ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC		
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka						
Mužjaci														
	Pretretman	0,567±0,0*	-	0,101±0,0*	-	0,901±0,0*	-	*	-	*	-	*	1,53±0,06	
	Tretman	1,51±0,06	0,424±0,050*	0,527±0,047*	-	-	-	*	-	*	-	*	1,53±0,09	
1,50±0,06	Posttretman	1,46±0,09	0,819±0,049*	1,12±0,14*	1,53±0,08	1,52±0,08	1,53±0,08					*	1,55±0,05	
Ženke														
	Pretretman	0,759±0,096*	0,465±0,052*	0,532±0,014*	-	0,524±0,030*	-	*	-	*	-	*	1,64±0,09	
	Tretman	0,982±0,044	0,512±0,100*	0,639±0,043*	-	-	-	*	-	*	-	*	1,64±0,06	
1,63±0,04	Posttretman	1,45±0,27	0,732±0,066*	0,935±0,101*	1,65±0,15	1,57±0,06	1,65±0,36					*	1,64±0,08	

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

**Tabela 5.26.** Uticaj vodenih ekstrakata lista *Viscum album* L. sa različitih domaćina (2 mL/kg t.m.) i N-acetil-L-cisteina (NALC) na intenzitet LPx u ćelijama EAC ( $\mu\text{mol/mL}$  ćelija EAC).

EAC	Aplikacija ekstrakta	Domaćin										NALC			
		Bagrem	Kruška	Šljiva	Topola	Glog	Šipak	Kleka							
0,029±0,004	Mušjaci														
	Pretrtman	1,06±0,0*	*	1,06±0,0*	*	0,606±0,0*	*	*	*	*	*	*	*	0,027±0,008	
	Tretman	0,822±0,104*	1,26±0,12*	0,852±0,104*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,028±0,004	
Ženke	Posttretman	0,135±0,022*	1,09±0,15*	0,133±0,011*	0,035±0,020	0,037±0,010	0,033±0,009	*	*	*	*	*	*	0,024±0,005	
	Pretrtman	0,174±0,019*	1,07±0,19*	0,982±0,048*	*	0,998±0,052*	*	*	*	*	*	*	*	0,033±0,008	
	Tretman	0,045±0,008	0,945±0,174*	0,636±0,127*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,026±0,013	
0,031±0,005	Posttretman	0,039±0,009	0,863±0,201	0,268±0,048	0,065±0,014	0,061±0,009	0,059±0,018	*	*	*	*	*	*	0,029±0,009	

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

Pre tretman ženki ekstraktima imele značajno je uticao na aktivnost XOD u malignim ćelijama ( $F=7,781$ ;  $p<0,001$ ), a promene aktivnosti su zavisile od vrste primenjenog ekstrakta. Svi ekstrakti su značajno pojačali aktivnost XOD u ćelijama EAC u odnosu na netretiranu i grupu ženki pretretiranu sa antioksidantom NALC. Kod ženki pretretiranih sa ekstraktima imele sa topole, šipka i kleke nije došlo do formiranja tumora. Značajno pojačana aktivnost XOD u ćelijama EAC uočena je kod ženki tretiranih sa ekstraktima imele sa topole, gloga, šipka i kleke ( $F=29,169$ ;  $p<0,001$ ). Posttretman ženki sa ekstraktima imele sa bagrema je snizio aktivnost XOD u ćelijama EAC, dok je značajno povišenje aktivnosti XOD u ćelijama EAC izmereno je kod ženki posttretiranih sa ekstraktima imele sa kleke, kruške, gloga i šljive ( $F=10109,07$ ;  $p<0,001$ ).

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na aktivnost CAT u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.21.

Efekat ekstrakata kod mužjaka kada su aplicirani pre implantacije EAC značajno je zavisio od vrste ekstrakta ( $F=23,268$ ;  $p<0,001$ ). Pretretman sa NALC nije menjao aktivnost CAT u ćelijama EAC, dok je sa smanjenjem incidence tumora i aktivnost CAT u malignim ćelijama značajno opadala. Značajne razlike su postojale između ekstrakata i kada je terapija otpočela u momentu implantacije tumora ( $F=27,542$ ;  $p<0,001$ ). Naime, aktivnost CAT je bila nemerljiva kod mužjaka tretiranih sa ekstraktima imele sa topole, gloga, šipka i kleke, dok se u ostalim grupama, u kojima se kod životinja razvio tumor, aktivnost CAT u ćelijama EAC nije značajno menjala. Značajan pad aktivnosti CAT u ćelijama EAC bio je posledica aplikacije ekstrakata imele sa kleke, topole, šipka i kruške ( $F=16,611$ ;  $p<0,001$ ), a u ovim grupama je uočen i pad incidence tumora. Ostali ekstrakti, i NALC, nisu pokazali značajniju različitost u odnosu na EAC kontrolnu grupu.

Aktivnost CAT u ćelijama EAC je bila značajno snižena u svim grupama ženki pretretiranim sa ekstraktima imele ( $F=24,951$ ;  $p<0,001$ ), dok NALC nije menjao aktivnost ovog enzima u odnosu na kontrolu. Aktivnost CAT u malignim ćelijama je bila nemerljiva kod ženki



tretiranih sa ekstraktima imele sa topole, gloga i šipka, a značajno snižena u ćelijama EAC nakon tretmana sa ekstraktima imele sa kruške i kleke ( $F=17,462$ ;  $p<0,001$ ). Ekstrakti imele sa šljive i bagrema, kao i NALC, nisu značajno menjali aktivnost CAT u malignim ćelijama. Posttretman ženki sa ekstraktom imele sa kleke doveo je do potpunog "nestanka" implantiranog tumora i u ovoj grupi aktivnost CAT nije merena. Suprotno, aktivnost CAT u ostalim grupama nije značajno menjana, a kod ženki posttretiranih sa ekstraktom imele sa bagrema, aktivnost CAT u ćelijama EAC je bila značajno viša u odnosu na posttretman sa ekstraktima imele sa kruške, topole i šipka ( $F=14,637$ ;  $p<0,001$ ).

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na aktivnost Px u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.22.

Kod mužjaka pretretiranih sa ekstraktima imele sa kruške, topole, šipka i kleke nije došlo do formiranja tumorske mase, i aktivnost Px u malignim ćelijama nije merena. Pretretman mužjaka sa ostalim ekstraktima značajno je pojačao aktivnost Px ( $F=19,423$ ;  $p<0,001$ ), dok u grupi pretretiranoj sa NALC nije bilo nikakvih značajnijih promena aktivnosti Px u ćelijama EAC. Aktivnost Px u malignim ćelijama nije merena u grupama mužjaka tretiranih sa ekstraktima imele sa topole, gloga, šipka i kleke, zbog potpune inhibicije razvoja implantiranog tumora. Nakon tretmana mužjaka sa ekstraktom imele sa bagrema, aktivnost Px je ostala nepromenjena u odnosu na EAC kontrolu, a sličan efekat je pokazao i NALC. Kod mužjaka tretiranih sa ekstraktima imele sa kruške i šljive, aktivnost Px u ćelijama EAC je bila značajno pojačana ( $F=356808,6$ ;  $p<0,001$ ). Posttretman mužjaka sa ekstraktima imele sa gloga i bagrema, kao i NALC, snizili su aktivnost Px u ćelijama EAC, bez statističkog značaja. Ostali ekstrakti su pojačali aktivnost ovog enzima u malignim ćelijama, a značajno pojačanje je uočeno kod ekstrakata imele sa kruške i kleke ( $F=9,142$ ;  $p<0,001$ ).

Aktivnost Px u ćelijama EAC je bila značajno pojačana ( $F=7,669$ ;  $p<0,001$ ) kod ženki pretretiranih sa ekstraktima imele sa šljive, gloga, bagrema i kruške, s tim da je porast aktivnosti Px bio praćen smanjenjem incidence EAC kod ženki. Pretretman sa antioksidansom NALC je

beznačajno snizio aktivnost Px u EAC ćelijama. Aktivnost Px nije merena kod ženki tretiranih sa ekstraktima imele sa topole, gloga i šipka jer nije došlo do formiranja tumorske mase, dok je jedino kod ženki tretiranih sa ekstraktom imele sa kleke, aktivnost Px u malignim ćelijama bila značajno pojačana ( $F=28,818$ ;  $p<0,001$ ) u odnosu na EAC grupu i ostale ekstrakte, među kojima nije bilo značajne razlike. Značajno pojačana aktivnost Px u ćelijama EAC izmerena je kod ženki posttretiranih sa ekstraktima imele sa kruške, šljive i gloga ( $F=414898,3$ ;  $p<0,001$ ), dok ostali ekstrakti i NALC nisu pokazali značajne međusobne razlike.

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na aktivnost GSHPx u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.23.

Kod mužjaka pretretiranih sa ekstraktima imele sa kruške, topole, šipka i kleke, nije došlo do razvoja tumora, a kod mužjaka pretretiranih sa ekstraktima imele sa šljive, bagrema i gloga, aktivnost GSHPx u ćelijama EAC je bila značajno pojačana u odnosu na kontrolnu EAC grupu i NALC grupu ( $F=19,924$ ;  $p<0,001$ ). Pojačanje aktivnosti GSHPx u pretretiranim malignim ćelijama bilo je praćeno značajnim smanjenjem incidence tumora (1/6 kod pomenutih) ekstrakata. Tretman mužjaka sa ekstraktima imele sa topole, gloga, šipka i kleke u potpunosti je sprečio nastanak tumora, a aktivnost GSHPx u malignim ćelijama nakon tretmana sa ekstraktima imele sa šljive i kruške je bila značajno pojačana ( $F=105961,6$ ;  $p<0,001$ ) u odnosu na kontrolu, grupu tretiranu sa NALC antioksidantom, kao i ekstraktom imele sa bagrema (koji se nije pokazao efikasnim). Kod mužjaka posttretiranih sa ekstraktom imele sa kleke nije došlo do razvoja tumora, a aktivnost GSHPx u ćelijama EAC je bila značajno pojačana nakon posttretmana sa ekstraktima imele sa kruške, topole i šipka ( $F=9,365$ ;  $p<0,001$ ), što je bilo praćeno i smanjenjem incidence tumora. Ekstrakti imele sa šljive, gloga i bagrema, primenjeni na ovaj način, nisu značajnije menjali aktivnost GSHPx u ćelijama EAC u poređenju sa kontrolom ili mužjacima posttretiranim antioksidantom NALC.

Međutim, pojedinačna analiza rezultata dobijenih kod pretretiranih, tretiranih i posttretiranih ženki, istakla je postojanje nekih značajnih razlika. Pretretman ženki sa svim

ekstraktima imele značajno je pojačao aktivnost GSHPx u ćelijama EAC ( $F=8,232$ ;  $p<0,001$ ), što je bilo praćeno smanjenjem incidence tumora. Kod antioksidansa NALC, ovakav trend nije uočen. Kod ženki tretiranih sa ekstraktima imele sa topole, gloga i šipka aktivnost GSHPx u ćelijama EAC nije merena jer nije došlo do razvoja tumorske mase, dok je ista bila značajno pojačana nakon tretmana sa ekstraktom imele sa kleke ( $F=29,122$ ;  $p<0,001$ ), uz incidencu oko 33%. Aktivnost GSHPx u ćelijama EAC nije značajno menjana tretmanom sa ostalim ekstraktima, ili N-acetil-L-cisteinom. I u slučaju ženki posttretiranih sa ekstraktom imele sa kleke nije formiran tumor, dok je kod ekstrakata imele sa kruške, gloga i šljive izmerena aktivnost GSHPx u ćelijama EAC bila značajno viša u odnosu na EAC kontrolu, NALC grupu i ostale ekstrakte ( $F=51918,84$ ;  $p<0,001$ ), sa značajnim međusobnim razlikama.

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na aktivnost GR u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.24.

U svim grupama mužjaka pretretiranih ekstraktima imele, a kod kojih se formirao tumor (imela sa šljive, gloga i bagrema), aktivnost GR u ćelijama EAC je bila značajno pojačana u odnosu na kontrolu i NALC grupu, uz smanjenje incidence tumora na 1/6 ( $F=20,182$ ;  $p<0,001$ ). Kao i u slučaju prethodno analiziranih parametara, kod mužjaka tretiranih sa ekstraktima imele (osim imele sa bagrema), uočena je signifikantno pojačana aktivnost GR u ćelijama EAC ( $F=91436,33$ ;  $p<0,001$ ), ili nije došlo do razvoja tumora (ekstrakti imele sa topole, gloga, šipka i kleke). Dalje, trend značajnog porasta aktivnosti GR u malignim ćelijama uočen je i kod mužjaka posttretiranih sa ekstraktima imele sa kruške, šipka i topole ( $F=9,192$ ;  $p<0,001$ ), za razliku od ostalih ekstrakata i NALC, čiji se efekti nisu razlikovali od kontrolne EAC grupe, kao ni među sobom.

Aktivnost GR je bila značajno pojačana u ćelijama EAC grupa ženki pretretiranih ekstraktima imele ( $F=8,276$ ;  $p<0,001$ ), dok pretretman sa antioksidantom NALC nije menjao ovaj parametar u odnosu na kontrolu. Tretmanom ženki sa ekstraktom imele sa kleke, aktivnost GR u malignim ćelijama je bila značajno pojačana ( $F=29,138$ ;  $p<0,001$ ), u grupama tretiranim

ekstraktima imele sa topole, gloga i šipka nije došlo do obrazovanja merljive količine (broja) tumorskih ćelija, dok u grupama tretiranim ekstraktima imele sa kruške, šljive i bagrema aktivnost GR jeste bila povećana, ali bez statističkog značaja u odnosu na kontrolnu i NALC grupu. Ženke posttretirane ekstraktima imele sa šipka, bagrema i topole, kao i antioksidantom NALC nisu imale pojačanu aktivnost GR u ćelijama EAC, dok je značajno pojačanje aktivnosti GR zabeleženo kod posttretmana ženki ekstraktima imele sa kruške, šljive i gloga ( $F=16745,73$ ;  $p<0,001$ ).

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na sadržaj GSH u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.25.

Količina GSH u ćelijama EAC mužjaka pretretiranih sa ekstraktima imele nije mnogo varirala u zavisnosti od vrste ekstrakta, a sve dobijene vrednosti su bile značajno niže u odnosu na EAC i NALC grupu ( $F=115,375$ ;  $p<0,001$ ). Kod mužjaka tretiranih ekstraktima imele, a kod kojih se razvio tumor (imela sa šljive i kruške), izmereni sadržaj GSH u malignim ćelijama je bio značajno niži u odnosu na kontrolu i NALC grupu ( $F=1066,809$ ;  $p<0,001$ ), uz značajne međusobne razlike (jači efekat imele sa kruške). Ekstrakt imele sa bagrema nije menjao sadržaj GSH u ćelijama EAC. Kada je terapija mužjaka ekstraktima imele počela nakon implantacije tumora, značajno smanjenje sadržaja GSH u ćelijama EAC je uočeno u grupama koje su primale ekstrakte imele sa kleke, kruške, topole i šipka ( $F=11,083$ ;  $p<0,001$ ), dok su znatno slabiji efekat pokazali ekstrakti imele sa bagrema i gloga.

Kod ženki NMRI miševa sa implantiranim EAC, ne može se govoriti o postojanju značajnih razlika u ukupnom efektu ekstrakata imele na sadržaj GSH u malignim ćelijama ( $F=2,238$ ;  $p>0,05$ ), a efekat nije zavisio ni od vremena početka terapije ( $F=3,463$ ;  $p>0,05$ ). Zato su posebno analizirani pojedinačni efekti ekstrakata u grupama pretretiranih, tretiranih i posttretiranih životinja.

Pretretman ženki ekstraktima imele značajno je smanjio količinu GSH u ćelijama EAC ( $F=64,221$ ;  $p<0,001$ ), ali nisu uočene značajne razlike u efektu pojedinih ekstrakata. Kod

tretiranih ženki sadržaj GSH u ćelijama EAC je bio značajno manji u odnosu na kontrolnu grupu i NALC grupu ( $F=37,921$ ;  $p<0,001$ ). Značajne razlike su uočene i između pojedinih ekstrakata, a smanjenje sadržaja GSH u malignim ćelijama je bilo praćeno i smanjenjem broja ćelija i njihove vijabilnosti (poglavlje 5.5.1). Samo su ekstrakti imele sa kleke, kruške i šljive u značajnoj meri snizili nivo redukovano glutaciona u odnosu na EAC kontrolnu grupu ( $F=58,833$ ;  $p<0,001$ ) kada su primenjeni kao posttretman. Ostali ekstrakti nisu menjali sadržaj ovog endogenog antioksidansa u malignim ćelijama.

Rezultati ispitivanja uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina (doza 2 mL/kg t.m.) na intenzitet LPx u ćelijama EAC prikazani su u tabeli 5.26.

Svi ekstrakti imele primenjeni kod mužjaka kao pretretman značajno su pojačali intenzitet oksidativnog oštećenja membrane ćelija EAC ( $F=19,098$ ;  $p<0,001$ ) u odnosu na EAC kontrolnu grupu. Antioksidant NALC, očekivano, nije uticao na ovaj parametar, a dobijene vrednosti LPx su ostale u granicama kontrolne grupe. Mužjaci tretirani ekstraktima imele sa topole, gloga, šipka i kleke nisu imali razvijen tumor, dok je kod mužjaka tretiranih sa ekstraktima imele sa kruške, šljive i bagrema, stepen oksidativnog oštećenja membranskih lipida malignih ćelija bio značajno viši u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu, ili pak grupu tretiranu antioksidantom NALC ( $F=3608836$ ;  $p<0,001$ ). Ekstrakti imele su kod posttretiranih mužjaka pojačali intenzitet LPx u ćelijama EAC, ali je statistički značajno pojačanje zabeleženo samo za ekstrakte imele sa kleke i kruške, odnosno topole i šipka ( $F=9,061$ ;  $p<0,001$ ), što je bilo praćeno i smanjenjem incidence tumora i ostalih analiziranih ćelijskih parametara (poglavlje 5.5.1).

Svi ekstrakti imele primenjeni kao pretretman značajno su pojačali intenzitet LPx u ćelijama EAC u odnosu na kontrolu ( $F=7,616$ ;  $p<0,001$ ), dok NALC to nije učinio. Statistički značajne razlike između pojedinih ekstrakata nisu uočene. Smanjenje incidence tumora i ostalih ćelijskih parametara (poglavlje 5.5.1) bilo je praćeno značajnim porastom intenziteta LPx u ćelijama EAC ženki tretiranih sa ekstraktima imele, osim imele sa bagrema, ( $F=28,737$ ;  $p<0,001$ ), a značajnih razlika između ekstrakata nije bilo. Posttretman ženki ekstraktima imele

dao je u izvesnoj meri najslabije rezultate; tako je značajno povišen intenzitet LPx zabeležen samo kod ekstrakata imele sa kleke, kruške i šljive, dok su se vrednosti ovog parametra kod posttretmana sa ostalim ekstraktima kretali u opsegu vrednosti u kontrolnoj grupi, bez značajnih međusobnih razlika.

Preliminarna ispitivanja obuhvatila su biohemijski screening u cilju dobijanja osnovnih podataka o biohemijskom sastavu odabranih vodenih ekstrakata lista *F. album* sa sedam domaćina (bagrna kruška, šljiva, topola, glog, šipka i kleka). Pri odabiru biljaka, vodilo se računa da se izostave imela sa onih domaćina, o čijim je biohemijskim i farmakološkim efektima dostupno više literaturnih podataka (jurtka sa bora, omotica, brava, breza, jabuka). Biohemijski screening je potvrdio da su svi izdanci lista *F. album* sa različitim domaćinima sadržali dostačnu grupu sekundarnih biotransformata: flavonoida, tanina, fenolnih jedinjenja, leukoantocjanidina, alkaloida, saponina, za koje se pretpostavlja da bi mogle biti odgovorne za protivoksidantnu aktivnost i učestvovali u in vitro i in vivo oksidativnom stresu. Da bi se stekao detaljniji uvid u postojanje eventualnih razlika u sastavu ispitivanih ekstrakata *F. album* sa različitim domaćinima, a koje bi se mogle odraziti na antioksidantna/prooksidantna svojstva u daljim eksperimentima, određeno su količine sledećih klasa jedinjenja: karotenoida (β-karoten i lutein), l-askorbinske kiseline (vitamin C), ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonoida, proantocjanidina, glikoizelidina (poglavlje 5.2, tabela 5.13). U ispitivanim uzorcima lista imale su bile značajnih razlika u sadržaju β-karotena i l-askorbinske kiseline, dok se razlikovao po sadržaju karotenoida. Najveća količina je izmurena u listu imela sa bagrenom kruškom, zatim u listu imela sa klekom.

## 6. DISKUSIJA

Tokom višegodišnjeg istraživanja fenomena oksidativnog stresa, antioksidantne zaštite, i veze između oksidativnog stresa i citotoksičnosti različitih agenasa (pojedinačnih jedinjenja, biljnih preparata, namirnica), po svojoj posebnosti i specifičnim svojstvima izdvojila se imela (*Viscum album* L.), a njena antioksidantna/prooksidantna svojstva u smislu biohemijskih, biomedicinskih i fitoterapeutskih efekata, prikazana su i u ovoj disertaciji. Pored velikog broja dobijenih i prikazanih rezultata (poglavlje 5) koji će u ovom poglavlju biti diskutovani, otvoreno je i mnogo novih pitanja i pravaca za dalja istraživanja kako u oblasti biomedicine, biohemije, fitoterapije, farmakologije, tako i oblasti farmakognozije.

Preliminarna ispitivanja obuhvatila su fitohemijski *screening*, u cilju dobijanja osnovnih podataka o fitohemijskom sastavu odabranih vodenih ekstrakata lista *V. album* sa sedam domaćina (bagrem, kruška, šljiva, topola, glog, šipka i kleka). Pri odabiru biljaka, vodilo se računa da se izostave imele sa onih domaćina, o čijim je biohemijskim i farmakološkim efektima dostupno više literaturnih podataka (imela sa bora, omorike, hrasta, brešta, jabuke). Fitohemijski *screening* je potvrdio da su svi uzorci lista *V. album* sa različitih domaćina sadržali sledeće grupe sekundarnih biomolekula: flavonoide, tanine, fenolna jedinjenja, leukoantocijanidine, alkaloidne, saponine, za koje se pretpostavlja da bi mogle biti odgovorne za pro/antioksidantnu aktivnost i učešće *in vitro* i *in vivo* oksidativnom stresu. Da bi se stekao detaljniji uvid u postojanje eventualnih razlika u sastavu ispitivanih ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina, a koje bi se mogle odslikati na antioksidantna/prooksidantna svojstva u daljim eksperimentima, određene su količine sledećih klasa jedinjenja: karotenoida (i hlorofila *a* i *b*), L-askorbinske kiseline (vitamina C), ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonoida, proantocijanidina, galne kiseline (poglavlje 5.2, tabela 5.1). U ispitivanim uzorcima lista imele nije bilo značajnih razlika u sadržaju hlorofila *a* i *b*. S druge strane, uzorci su se razlikovali po sadržaju karotenoida, najveća količina je izmerena u listu imele sa bagrema i kruške, zatim u listu imele sa kleke i

šljive, dok su značajno manje količine karotenoida nađene u istu imele sa gloga, topole i šipka. Iako su uočene mnoge značajne razlike u količini vitamina C u zavisnosti od domaćina, postavlja se pitanje koliko bi ove razlike mogle biti značajne za antioksidantna/prooksidantna svojstva, s obzirom na nestabilnost same L-askorbinske kiseline. Takođe, potvrđeno je i postojanje značajnih razlika u sadržaju ukupnih fenola svih uzoraka lista imele, a uočene razlike bi mogle imati uticaja na različit antioksidantni/prooksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata *V. album*. Interesantno je da su uzorci lista imele u kojima je izmerena veća količina ukupnih fenola (topola, šljiva, kleka domaćini), imali i veći sadržaj tanina, a ovakav trend je uočen i za ostale uzorke. Značajne razlike su postojale između tri para uzoraka imele: glog/kruška, šipak/bagrem, šljiva/kleka. Nađeni sadržaj flavonoida je bio različit, u imeli sa šipka i šljive je bio najveći i značajno različit u odnosu na ostale ekstrakte, a najniža vrednost je dobijena za list imele sa gloga. Slični rezultati su dobijeni i za klasu proantocijanidina, dok galna kiselina uopšte nije identifikovana u listu imele sa topole, gloga i kleke. Iz svega navedenog se može zaključiti da postoje značajne razlike u fitohemijskom sastavu imele, što se u daljim ispitivanjima odrazilo na pro/antioksidantnu aktivnost ekstrakata, a posredno i na citotoksičnu aktivnost. Takođe, ovakav zaključak je bio u skladu sa brojnim literaturnim podacima (Haas i sar., 2003; Ochocka i Piotrowski, 2002; Wollenweber i sar., 2000).

*In vitro* ispitivanja u ovoj disertaciji zasnivala su se na potencijalnoj anti/prooksidantnoj aktivnosti ekstrakata imele i vezi između ove aktivnosti i sadržaja pojedinih klasa sekundarnih biomolekula, za koje se smatra da mogu posedovati ovakvu aktivnost. Pro/antioksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata je sagledavan u kontekstu njihovih efekata na dobro poznate parametre poput:

1. lipidne peroksidacije,
2. produkcije ROS (hidroksil radikala - OH<sup>\*</sup>),
3. sposobnosti inhibicije DPPH radikala,
4. ukupnog FRAP anti/prooksidantnog kapaciteta,



5. produkcije NO (nitrozativni stres),

a dobijeni rezultati su detaljno prikazani i analizirani u poglavlju 5.3. Za proveru i potvrdu anti/prooksidantne aktivnosti ekstrakata imele korišćen je ugljentetrahlorid (CCl<sub>4</sub>), za koji je dobro poznato da poseduje prooksidantna svojstva (Cheesman, 1982), s obzirom da je njegov dodatak u eksperimentalne sisteme uticao na veliko povećanje intenziteta lipidne peroksidacije i produkcije hidroksil radikala.

Iz tabele 5.2 se može uočiti da su svi vodeni ekstrakti lista *V. album*, i sva ispitivana razblaženja, statistički značajno smanjili intenzitet *in vitro* lipidne peroksidacije (LPx) lipozoma u odnosu na kontrolu, da je najjači inhibitori efekat pokazao ekstrakt imele sa topole, a zatim ekstrakt imele sa šljive, dok je najslabiji efekat imao ekstrakt imele sa gloga. Ovakva svojstva ekstrakata imele su potvrđena i u sistemima u kojima je dodavan CCl<sub>4</sub>. Takođe je pokazano da postoji linearna zavisnost sniženja intenziteta *in vitro* LPx u odnosu na porast količine prisutnih fenola i tanina, dok je slabija zavisnost uočena u odnosu na količinu flavonoida i proantocijanidina, dok sadržaj karotenoida nije pratio promene intenziteta LPx (poglavlje 5.3.1, slika 5.1). Imajući u vidu fitohemijski sastav listova imele, posebno visoki sadržaj flavonoida i fenolnih jedinjenja, snažnih antioksidanata (Areias i sar., 2001), može se pretpostaviti da bi neke biološke aktivnosti ekstrakta listova imele mogle biti pripisane postojanju antioksidantne aktivnosti. Dalje, pokazano je da su pomenute grupe jedinjenja sposobne da inhibiraju proces lipidne peroksidacije (Cos i sar., 2001). Pored ovoga, smatra se da flavonoidi i fenoli poseduju i veliki broj drugih farmakoloških svojstava, kao što su hepatoprotektivna, antimutagena, antiinflamatorna, antialergijska, kardioprotektivna, itd. (Cook i Samman, 1996; Middleton, 1996), za koje se smatra da se zasnivaju na antioksidantnom efektu. S druge strane, postoji nekoliko *in vitro* studija koje pokazuju da flavonoidi, u određenim koncentracijama i oblicima, mogu da se ponašaju kao prooksidanti, i tako dovedu do oštećenja ne-lipidnih molekula, na primer, DNA, proteina i ugljenih hidrata (Aruoma, 1996; Decker, 1997).

Ispitivanja sposobnosti ekstrakata imele da inhibiraju produkciju  $\text{OH}^\bullet$  radikala, podelila su ekstrakte u dve grupe – ekstrakti koji nisu uticali na nastanak  $\text{OH}^\bullet$  radikala (imela sa bagrema, kruške i šljive) i ekstrakti koji su pojačali ovaj proces (imela sa topole, gloga, šipka i kleke), uz značajne međusobne razlike (poglavljje 5.3.2, tabela 5.3). Shodno ovome, ni  $\text{CCl}_4$ -indukovana produkcija  $\text{OH}^\bullet$  radikala nije u značajnijoj meri inhibirana ispitivanim ekstraktima imele, što ne upućuje na postojanje značajnijeg *scavange* efekta ekstrakata. (Ne)efikasnost ispitivanih ekstrakata da inhibiraju produkciju  $\text{OH}^\bullet$  radikala može se tumačiti na dva načina:

1) Komponente ekstrakata deluju na taj način što inhibiraju produkciju  $\text{OH}^\bullet$  radikala u sistemu  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ , inhibirajući Fenton-ovu reakciju kompleksiranja  $\text{Fe}^{2+}$  jona. Poznato je da flavonoidi sa slobodnom OH grupom na petom C atomu mogu da deluju kao kompleksirajući agensi za dvovalentne i trovalentne metalne jone (Areias i sar., 2001).

2) Komponente ekstrakata deluju kao *scavenger*-i, odnosno "hvatači"  $\text{OH}^\bullet$  radikala, pri čemu sami prelaze u radikalski oblik koji se može rezonantno stabilizovati. Imajući u vidu da ekstrakti sadrže polifenole, flavonoide, tanine i fenole (jedinjenja bogata dvostrukim vezama), osnova njihovog ponašanja bi mogla biti dovedena u vezu sa predloženim mehanizmom.

DPPH radikal se veoma često koristi za evaluaciju efikasnosti različitih antioksidantnih jedinjenja ili biljnih ekstrakata da "hvataju" slobodne radikale (Gulcin i sar., 2006; Ozcelik i sar., 2003). Iz tabele 5.4 (poglavljje 5.3.3) se može uočiti da su osnovni rastvori ekstrakata *V. album* sa bagrema, kruške, šljive i topole u potpunosti inhibirali DPPH radikal, a da je sposobnost osnovnog rastvora ekstrakta imele sa šipka da inhibira DPPH radikal bila istovetna sa aktivnošću standardnog rastvora TROLOX-a. Nešto slabiji rezultat je pokazao ekstrakt imele sa kleke, čija je anti-DPPH aktivnost bila značajno niža u odnosu na korišćeni standard. Razblaženja osnovnih rastvora ekstrakata imele sa različitih domaćina pokazala su i značajna odstupanja od aktivnosti TROLOX-a, a sa povećanjem razblaženja smanjivala se i sposobnost inhibicije DPPH. Kako bi uporedili sposobnost različitih ekstrakata da inhibiraju DPPH radikal, grafički su određene  $\text{IC}_{50}$  vrednosti za svaki ekstrakt, a rezultati su prikazani na slici 5.3 (poglavljje 5.3.3). Najveći

antioksidantni kapacitet, izračunat na osnovu inhibicije DPPH radikala, uočen je kod vodenog ekstrakta lista *V. album* sa šljive, sa  $IC_{50}$  vrednosti 5,5%. Veoma dobar antioksidantni kapacitet su pokazali i vodeni ekstrakti lista *V. album* sa šipka ( $IC_{50} = 6,9\%$ ), kruške ( $IC_{50} = 7,2\%$ ), topole ( $IC_{50} = 7,6\%$ ) i gloga ( $IC_{50} = 9,7\%$ ). Nešto slabiji antioksidantni kapacitet u odnosu na pomenute ekstrakte pokazao je vodeni ekstrakt lista imele sa bagrema ( $IC_{50} = 21,3\%$ ), iako je ovaj rezultat bio veoma blizak standardnom rastvoru TROLOX-a. Koristeći inhibiciju DPPH radikala kao parametar antioksidantne moći ekstrakata, najmanji kapacitet, a time i najslabiji antioksidantni potencijal, pripisan je vodenom ekstraktu lista imele sa kleke, čija je  $IC_{50}$  vrednost iznosila 64,1%.

Ukupni antioksidantni kapacitet vodenih ekstrakata imele je određen merenjem FRAP vrednosti. Najveće povećanje ukupnog antioksidantnog kapaciteta (FRAP), prema rezultatima iz tabele 5.5 (poglavljje 5.3.4), izmereno je kod vodenog ekstrakta lista *V. album* sa šipka, a zatim i kod odgovarajućeg ekstrakta sa šljive kao domaćina. Vodeni ekstrakt lista *V. album* sa bagrema (2,8%) nije statistički značajno uticao na antioksidantnu aktivnost merenu u FRAP jedinicama. Sve uočene razlike u ukupnom antioksidantnom kapacitetu ekstrakata su bile statistički značajne. S obzirom da su uočene razlike u ponašanju ekstrakata imele sa različitih domaćina, napravljena je paralela između FRAP antioksidantnog potencijala i sadržaja pojedinih biomolekula u ovim uzorcima (poglavljje 5.3.4, slika 5.4). Generalno, porast sadržaja ukupnih fenola, tanina, flavonoida, proantocijanidina i vitamina C, doveden je u vezu sa porastom FRAP antioksidantnog kapaciteta, ali je kod fenola, tanina i proantocijanidina ova zavisnost u maloj meri bila linearna. S druge strane, za ispitivane ekstrakte imele sa različitih domaćina se može zaključiti da je FRAP antioksidantni kapacitet bio u linearnom odnosu sa sadržajem flavonoida i vitamina C, dok su karotenoidi u ovom slučaju pokazali suprotan efekat, odnosno porast sadržaja karotenoida u listu *V. album* doveden je u vezu sa smanjenjem FRAP antioksidantnog kapaciteta. Vrednosti FRAP ukazuju na ukupnu redukcionu moć ekstrakata (Benzie i Strain., 1999). Kod nekih biljaka sadržaj vitamina C doprinosi preko 50% FRAP vrednosti (Guo i sar., 2003). Pored

vitamina C, značajan doprinos FRAP vrednosti daju flavonoidi, fenolne kiseline i polifenolna jedinjenja koja pripadaju grupi sekundarnih biomolekula. Ovi literaturni podaci, i rezultati dobijeni za ispitivane vodene ekstrakte, ukazuju na postojanje antioksidantnih jedinjenja u ekstraktima, ali i na verovatne kvantitativne razlike u zavisnosti od biljke domaćina. Kada se antioksidantni kapacitet uporedi sa količinom ukupnih fenola, može se zaključiti da bi antioksidantna priroda ekstrakata mogla da zavisi od prisutnih fenola. Kao što je već objavljeno u literaturi, antioksidantna aktivnost je pojačana posebno u prisustvu fenolnih jedinjenja (Behera i sar., 2005). Takođe, saopšteno je da je antioksidantna aktivnost fenolnih jedinjenja uglavnom posledica njihovog redoks potencijala, postojanja donora vodonika i hvatača singletnog kiseonika (Rice-Evans i sar., 1995). Postoji niz literaturnih podataka koji idu u prilog pomenutoj tezi, i naglašavaju korelaciju između antioksidantnog kapaciteta i fenolnih konstituenata različitih ekstrakata (Jayaprakasha i Rao, 2000; Gulluce i sar., 2006). Dalje, studija Haznagya-Radnai i saradnika (2006) je potvrdila postojanje veze između antioksidantne aktivnosti i sadržaja tanina, kao i između antioksidantnog potencijala i sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima šest *Stachys* vrsta. Autori potvrđuju da ova jedinjenja značajno doprinose antioksidantnim aktivnostima pomenutih ekstrakata. S druge strane, nije pronađena veza između antioksidantne aktivnosti i količine kafene kiseline i flavonoida, naglašavajući pretpostavku da su tanini kao glavna grupa jedinjenja odgovorni za antioksidantne efekte ispitivanih ekstrakata. Rezultati dobijeni ispitivanjem antioksidantnog potencijala ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina delimično su bili u skladu sa pomenutim rezultatima, ali su uočene i razlike, koje su se prvenstveno odnosile na značajniji uticaj flavonoida na ukupni antioksidantni kapacitet ispitivanih ekstrakata.

Danas postoje dokazi da dva slobodna radikala male molekulske mase, superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ , 32 Da) i azot monoksid (NO, 30 Da), kontinualno nastaju u mitohondrijama aerobnih ćelija u kojima se, takođe, proizvodi ATP za energetske potrebe ćelije. Izgleda da interakcija između ova dva slobodna radikala ima značajnu ulogu u regulaciji ćelijske respiracije

preko inhibitornog efekta NO na aktivnost citohrom oksidaze (Valdez i sar., 2000). Prekomerna produkcija ovih čestica dovodi mitohondrije u disfunkcionalno stanje, koje se smatra korakom ka apoptozi. Prepoznavanje endogenog azot monoksida (NO) od strane azot monoksid sintaze (NOS) otvorilo je novo poglavlje u biohemiji slobodnih radikala. NO je slobodni radikal u smislu postojanja nesparenog elektrona, ali je on relativno nereaktivan slobodni radikal, s obzirom da nije sposoban da inicira slobodno radikalsku reakciju; međutim, on trenutno reaguje sa  $O_2^{\cdot -}$  u reakcijama terminacije. Pokazano je da je NO uključen u brojne regulatorne funkcije kao što je vazodilatacija (Moncada i sar., 1991), neurotransmisija (Dawson, 1996) i imunomodulacija (Moncada i sar., 1991). Takođe, ovom slobodnom radikalu je pripisano učešće u programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi), (Brune, 2003) i u velikom broju patofizioloških stanja (artritis, ateroskleroza, maligne bolesti, dijabetes, neurodegenerativni poremećaji), (Wink i Mitchell, 1998). Dakle, NO, kao intracelularna signalna molekula, igra ulogu u nekoliko ćelijskih metaboličkih puteva (Moncada i sar., 1991). Međutim, porast produkcije NO i koncentracije NO u ćelijama može da fiziološki efekat preokrene u citotoksičnost. Bustamante i saradnici (1998) su potvrdili postojanje rane pojave ROS za vreme apoptoze, koja bi mogla izmeniti redoks ravnotežu i celularne efekte NO. Autori smatraju da bi regulacija ćelijske respiracije i produkcije energije od strane NO, i njegove sposobnosti da izmeni put ćelijske smrti od apoptoze do nekroze u patofiziološkim stanjima, mogla da se odigrava primarno putem mitohondrijske produkcije ATP. Modulacija programirane ćelijske smrti egzogenim dodavanjem NO uočena je kod različitih tipova ćelija (Bustamante i sar., 1998). Objavljeno je da egzogeni NO može da inhibira apoptozu S-nitrozovanjem (Rossig i sar., 1999). Podaci za efekat NO na apoptozu su u ovom momentu kontradiktorni i zahtevaju bolje poznavanje intracelularnih koncentracija NO. Neki rezultati pokazuju (Valdez i sar., 2000) da je pojačana produkcija NO u vezi sa smanjenom brzinom respiracije u mitohondrijama, praćenom sniženjem količine mitohondrijalnog GSH i oslobađanjem citohroma c tokom apoptoze timocita; odnosno, da je NO uključen u početne korake koji vode ka apoptozi. Takođe, poznato je da je citotoksični efekat

makrofaga na ćelije tumora barem delimično povezan sa njihovom sposobnošću da generišu NO (MacMicking i sar., 1997). Naime, istraživanja su pokazala da ovakva produkcija NO rezultira oslobađanjem velike količine gvožđa, što dalje vodi inhibiciji rasta tumorskih ćelija (Watts i Richardson, 2004). Sposobnost inhibicije nastajanja NO je veoma važna karakteristika antioksidantnog sistema biljke. Interakcijom  $O_2^{\cdot-}$  i NO nastaje peroksinitrit anjon ( $ONOO^{\cdot-}$ ) koji je jak oksidans, izvor hidroksil radikala i nitrujući agens. U literaturi se navode različite grupe neenzimskih antioksidanata koji inhibiraju nastajanje NO u *in vivo* uslovima: polinezasićene masne kiseline, poliacetileni, kumarini, flavonoidi, neki seskviterpeni, diterpeni, triterpeni itd. (Matsuda i sar., 2003). Imajući u vidu prethodno iznete podatke, smanjenje koncentracije NO ukazuje na povećanje sadržaja pomenutih antioksidanata.

*In vitro* ispitivanja sprovedena u ovoj disertaciji, bavila su se i ispitivanjem uticaja vodenih ekstrakata lista *V. album* na inhibiciju/produkciju NO, a rezultati su prikazani u poglavlju 5.3.5 (tabela 5.6). Ekstrakti imele sa topole i šipka značajno su pojačali nastanak NO, dok su ostali ekstrakti inhibirali ovaj proces u manjoj (imela sa kruške i gloga) ili značajnijoj meri (imela sa bagrema, šljive i kleke). Efekat pojačane *in vitro* produkcije NO bi se mogao dovesti u vezu sa značajnim smanjenjem *in vivo* incidence EAC tumora kod NMRI miševa za ekstrakte imele sa topole i šipka, dok je, suprotno ovome, smanjenje *in vitro* produkcije NO kod ekstrakta imele sa kleke, takođe praćeno potpunom *in vivo* inhibicijom razvoja tumora EAC. Na osnovu dobijenih rezultata teško je izvesti eksplicitan zaključak o učešću NO u inhibiciji razvoja EAC; eventualna veza između ova dva parametra bi se mogla tražiti u slučaju detaljnijeg poznavanja *in vivo* intracelularnih koncentracija NO, što bi mogao biti jedan od daljih pravaca istraživanja.

*In vivo* ispitivanja su bazirana na proveru uticaja ispitivanih ekstrakata lista *V. album* sa sedam različitih domaćina na anti/prooksidantnu aktivnost u normalnim ćelijama, kao i specifičnih efekata ekstrakata imele na ćelije EAC tumora i njihov antioksidantni status, u cilju

provere hipoteze da ispitivani ekstrakti specifično menjaju antioksidantni status malignih ćelija i pojačavaju citotoksičnost, doprinoseći smanjenju incidence tumora.

Danas se smatra da oksidativni stres ima važnu ulogu u nastanku različitih poremećaja (Karthikeyan i sar., 2003; Kadiiska i sar., 2000). Za nekoliko glavnih komponenti mnogih lekovitih biljaka, pa i vodenih ekstrakata *V. album*, kao što su polifenoli i flavonoidi, dokazano je da poseduju antioksidantna svojstva (Lin i sar., 2000; Bhatnagar, 1995; Lepran i Lefer, 1985). Dokumentovan je visok stepen *in vitro* i *in vivo* sposobnosti različitih oblika polifenola i flavonoida da "hvataju" kiseonične slobodne radikale (Ajay i sar., 2003; Buttemeyer i sar., 2003; Furukawa i sar., 2003). Ovi podaci bi mogli biti ključni za mogući hepatoprotektivni efekat različitih ekstrakata lekovitog bilja, i *V. album* ekstrakata, takođe. Na osnovu pomenutih antioksidantnih svojstava sekundarnih biomolekula (flavonoida i polifenola u polarnim ekstraktima, ali i nekih nepolarnih jedinjenja), deo disertacije je bio dizajniran tako da ispita uticaj različitih ekstrakata lista *V. album* na aktivnost antioksidantnih enzima (XOD, CAT, Px, GSHPx, GR), količinu endogenih antioksidanata (GSH), intenzitet peroksidacije membranskih lipida, kao i na oksidativni stres prouzrokovan dejstvom ugljentetrahlorida (CCl<sub>4</sub>), koji se često koristi kao model za proučavanje oštećenja jetre u kojima učestvuju slobodni radikali (Kadiiska i sar., 2000; Cheesman, 1982).

Rezultati koje prezentuju Singh i saradnici (2006) zasnivaju se na ispitivanju inducibilnosti enzima uključenih u karcinogen/lek (ksenobiotik) metabolizam i održavanje antioksidantnog statusa ćelije. Autori ukazuju na nepostojanje neželjenih efekata pri primeni određenih doza *Tinospora*, u smislu nepostojanja promena (smanjenja) telesne mase životinja, jetre, i dr. Slično ovome, parametri mereni u ovoj disertaciji - telesna masa životinja, masa jetre (tabele 5.7 i 5.8, poglavlje 5.4) nisu značajno menjani tretmanom sa različitim ispitivanim dozama ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina. Takođe, nepostojanje značajnih promena u količini mikrozomalnih proteina bilo je u skladu sa prethodnim zaključcima. Sadržaj hepatične DNA (poglavlje 5.4, tabela 5.9) je, takođe, u velikoj meri bio očuvan, iz čega se može

zaključiti da davanje ispitivanih ekstrakata nije narušilo celularnost tkiva. Ovome u prilog idu i nepromenjene vrednosti za hidrokisprolin (određivan u hidrolizatu tkiva jetre), koji je parametar oštećenja hepatičnog tkiva (poglavljje 5.4, tabela 5.10).

Kao rezultat inflamacije indukovane formaldehidom, nivo serumskih transaminaza AST i ALT je povećan (Choi i Hwang, 2004). Sličan efekat je, očekivano, pokazao i  $\text{CCl}_4$ , korišćen kao induktor oksidativnog stresa u ovoj disertaciji (poglavljje 5.4, tabele 5.11 i 5.12). Analiza aktivnosti serumskih AST i ALT predstavlja dobro i jednostavno oruđe za merenje (ne)toksičnog delovanja ispitivanih jedinjenja ili ekstrakata. U ovoj disertaciji, ekstrakti *V. album* nisu značajno menjali aktivnost serumskih AST i ALT, ali je značajno sniženje aktivnosti ova dva serumska parametra oštećenja jetre nakon primene ekstrakata uočeno u grupama koje su primile  $\text{CCl}_4$ . Razlika među ekstraktima nije bilo, a značajnije odstupanje je uočeno samo kod ekstrakta imele sa gloga, kod koga je uočeno pojačanje aktivnosti AST i ALT. Slični rezultati su dobijeni i merenjem količine serumskog bilirubina (poglavljje 5.4, tabela 5.15) Ovi rezultati bi mogli navesti na zaključak o mogućim hepatotoksičnim svojstvima ispitivanog ekstrakta imele sa gloga. Mogućnost da ekstrakti imele sa različitih domaćina poseduju različita biološka svojstva u skladu je sa postojećim literaturnim podacima (Duong Van Huyen i sar., 2003).

Do sada je objavljeno nekoliko konfliktnih rezultata kada su u pitanju aktivnosti antioksidantnih enzima u stanjima oksidativnog stresa indukovanog  $\text{CCl}_4$  u različitim organima laboratorijskih životinja (Kadiiska i sar., 2000). Za  $\text{CCl}_4$  je poznato da raskida sulfhidrilne grupe glutaciona i onih vezanih za proteine, što rezultuje pojačanom produkcijom ROS), kao što su  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cheesman, 1982). Pretpostavlja se da je jedan od osnovnih uzroka oštećenja jetre delovanjem  $\text{CCl}_4$  lipidna peroksidacija inicirana slobodnim radikalima, derivatima ugljentetrahlorida. Naime,  $\text{CCl}_4$ , koga aktivira sistem NADPH-Cyt P450 endoplazmatskog retikuluma hepatocita, se konvertuje u trihlormetil radikale (npr.  $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ ) koji iniciraju peroksidaciju lipida (Afanasev i sar., 1989). Rezultati koji su dobijeni u disertaciji potvrdili su da je davanje  $\text{CCl}_4$  narušilo mehanizam antioksidantne zaštite u jetri pacova, posebno snižavanjem



sadržaja jetrenog GSH i smanjenjem aktivnosti CAT i Px. Veoma je dobro poznato da je GSH najvažniji protektivni biomolekul kod hemijski-indukovane citotoksičnosti i oksidativnih oštećenja (Gasso i sar., 1996). GSHPx omogućava korišćenje GSH za zaštitu membranskih lipida od peroksidativnih oštećenja izazvanih slobodnim radikalima tako što vrši simultano prevođenje peroksi lipida u hidroksi jedinjenja uz oksidaciju GSH u GSSG. Dodatno, pored GSHPx, i CAT i Px učestvuju u ovom procesu, "hvatajući" perokside i  $O_2^{\cdot-}$ . Aktivnost CAT je bila značajno smanjena u  $CCl_4$  grupi, a manje u grupama koje su primale različite ekstrakte *V. album* (izuzetak čine ekstrakti imele sa gloga i kleke). Ovo bi moglo da ukaže na pojačanu produkciju  $H_2O_2$ , koga delimično detoksikuju i CAT i Px. Povećana aktivnost GSHPx za vreme tretmana pokazuje da ovaj sistem ima glavnu ulogu u uklanjanju  $H_2O_2$ . Rezultati dobijeni u ranijim istraživanjima (Ćebović, 2005) takođe su pokazali da neki *V. album* ekstrakti mogu zaštititi ćelije od oksidativnog oštećenja povećanjem aktivnosti GSHPx. Uloga GR je redukcija oksidovanog glutationa (GSSG) u svoj redukovani, biološki aktivan oblik GSH uz učešće NADPH kao kofaktora (Arnao i sar., 1990), a dobijeni rezultati i ovde potvrđuju prethodne pretpostavke. Dalje, postoji dovoljno dokaza da se lipidna peroksidacija može javiti i kod akutnih i kod hroničnih oštećenja jetre (Oliveira i sar., 2005; Aleynik i sar., 1998; Parola i sar., 1993). Studija Parole i saradnika (1993) je pokazala da lipidna peroksidacija stimuliše produkciju kolagena, te da dovodi do fibroze. U ovoj disertaciji su životinje tretirane sa  $CCl_4$  pokazale znake narušene ravnoteže između oksidativnog stresa i antioksidantnih sistema zaštite (povišeni nivoi malonildialdehida i smanjena količina hepaticnog GSH). Međutim, ispitivani ekstrakti *V. album*, sa izuzetkom onih sa gloga i kleke, uglavnom su očuvali ovu ravnotežu. Imajući u vidu da:

- 1) polifenoli i flavonoidi stimulišu transkripciju gena za CAT i SOD i snižavaju koncentraciju MDA (Ranaivo i sar., 2004; Toyokuni i sar., 2003) i

2) askorbinska kiselina trenutno "hvata" reaktivne kiseonične čestice, sprečava oksidativnu modifikaciju lipoproteina i snižava nivoe MDA (Sowell i sar., 2004; Ray i Husain, 2002), smanjenje koncentracije MDA se moglo očekivati i kod ekstrakata imele, kod kojih je izmerena značajna količina pomenutih sekundarnih biomolekula. Ovakvi rezultati ukazuju na to da se mehanizam mogućeg hepatoprotektivnog efekta određenih *V. album* ekstrakata može dovesti u vezu sa smanjenjem oksidativnog stresa.

### *Oksidativni stres malignih ćelija*

ROS se formiraju kao proizvodi redukcije molekuskog kiseonika tokom aerobnog celularnog metabolizma. Uloga ROS u kancerogenezi je bila i još uvek je predmet mnogih spekulacija i kontroverzi. ROS, koje podrazumevaju superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), organske peroksid radikale ( $ROO^{\cdot}$ ), i singlet molekulski kiseonik ( $^1O_2$ ), konstantno se generišu u ćelijama tokom aerobnog metabolizma i oslobađaju ekstracelularno u fagocitozi (Freeman, 1984). Smatra se da ove čestice predstavljaju glavne medijatore citotoksičnosti kiseonika (Frank, 1980). Iz ovoga je jasno da bilo koja aktivna kiseonična čestica može izazvati oštećenje pa čak i smrt ćelije, pod određenim uslovima. Međutim, hidroksil radikal se smatra daleko najreaktivnijim, a najveća oštećenja u biološkim sistemima se javljaju upravo kao posledica nastanka ove reaktivne čestice. Kao što je ranije istaknuto, otkriće intracelularnih sistema koji detoksikuju ROS ukazuje na postojanje oksidant-antioksidant ravnoteže u ćelijama.

Uopšteno govoreći, najmanje jedan antioksidantni enzim pokazuje različitu aktivnost u tumorskoj ćeliji u odnosu na normalnu (Oberley i Oberley, 1986). Međutim, nije jasno da li je izmenjena aktivnost antioksidantnih enzima ono što dovodi do maligne transformacije ili nastaje kao posledica. Takođe, nije kompletno razjašnjena ni uloga kiseoničnih radikala u malignoj transformaciji, iako je poznato da su kiseonični radikali mutageni (Moraes i sar., 1990) i da tako mogu da učestvuju procesu maligne transformacije ćelija (Borek, 1991). Poznato je da do

maligne transformacije mogu dovesti radijacija, hemikalije i virusi. Radijacija direktno dovodi do nastanka ROS u biološkim sistemima, a za ove se smatra da dovode do maligne transformacije direktnim ili indirektnim promenama na DNA (Kennedy i sar., 1984). Iako se smatra da su ROS uključene i u hemijsku karcinogenezu, različiti eksperimentalni modeli pokazuju veoma različite, pa i oprečne rezultate. Relativno skroman broj istraživanja iz ove oblasti je pokazao da postoji veza između maligne transformacije i ravnoteže antioksidant-oksident. Pojačana proliferacija ćelija različitih tipova tumora kože kod miševa uočena je nakon tretmana sa benzoil peroksidom, generatorom ROS (O'Connell i sar., 1986).

Aplikacija vodonik peroksida, ROS, dovodi do pojave epidermalne hiperplazije i promocije tumora kod eksperimentalnih životinja (Klein-Szanto i Slaga, 1982). Preventivno intraperitonealno davanje agenasa koji poseduju antioksidantnu aktivnost (selen, glutation i vitamin E) pojačava aktivnost intracelularnog antioksidantnog sistema ćelija epidermisa, i inhibira nastanak i razvoj tumora (Perchelett i sar., 1987). Takođe, uočena je povećana koncentracija ROS u ćelijama nakon tretmana hemijskim karcinogenom, 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetatom (Robertson i sar., 1990). Rezultati ispitivanja aktivnosti antioksidantnih enzima u "normalnim" ćelijama nakon tretmana sa hemijskim karcinogenom pokazala su sniženje aktivnosti CAT i pojačanje aktivnosti XOD (Reiners i sar., 1991). Slično, uočena je snižena aktivnost CAT i pojačana aktivnost XOD u ćelijama tumora kao posledica dejstva oksidansa.

Naši rezultati pokazuju sniženu aktivnost CAT nakon tretmana "normalnih" ćelija sa  $CCl_4$ , nepromenjen XOD. U netretiranim ćelijama EAC zabeležena je niska aktivnost XOD i visoka aktivnost CAT, oprečno slučajevima u kojima je dokazano postojanje oksidativnog stresa. Međutim, u ćelijama Ehrlich-ovog tumora nakon tretmana sa ekstraktima *V. album*, uočena je snižena aktivnost CAT i pojačana aktivnost XOD, kao i u slučajevima kada su ćelije izložene oksidativnom stresu, s tim da su značajne razlike uočene u zavisnosti od vrste ekstrakta (imelinog domaćina). Aktivnosti antioksidantnih enzima su određivane i u hormon zavisnim

renalnim tumorima zamoraca (McCormick i sar., 1991). Aktivnosti obe forme SOD, (CuZn i Mn) i CAT su bile značajno niže u primarnim tumorima nego kod netretiranih i mužjaka tretiranih estrogenom. Takođe, CAT, CuZnSOD i MnSOD su pokazale sniženu aktivnost kod hormon-nezavisnih tumora u odnosu na primarne. McCormick i saradnici sugerišu da nedostatak SOD i CAT može da posluži kao marker za hormonski indukovanu renalnu neoplaziju kod ovih vrsta. Roy i Lier (1989) su pokazali da produženi tretman sa estrogenom dovodi do porasta količine glutationa, aktivnosti glutation peroksidaze i produkata lipidne peroksidacije u bubrezima (u slučaju renalnog tumora). Ovi autori zaključuju da primenjeni tretman rezultuje u "povećanom nivou oksidativnog stresa". Dodatni dokazi postojanja oksidativnog stresa priloženi su u radovima koji se bave praćenjem oksidativnog oštećenja proteina, takođe kod hormon zavisnih tumora (Winter i Liehr, 1991).

Suprotno prethodnim tvrdnjama, iako kiseonični radikali i hormoni (kod hormon zavisnih tumora) mogu da dovedu do pojačanog rasta tumora uticajem na ćelijsku proliferaciju, pokazalo se da ovi agensi mogu i da utiču na apoptozu (Oberley i sar., 1991). Ćelijska smrt kao pokazatelj rasta i regresije tumora, ispitivana je na transplatabilnoj ćelijskoj liniji tumora sa oznakom H301. U ovoj studiji, nakon transplantacije je uočena regresija tumora 80-90% za četiri dana. Ćelije u mitozu, nekrotične ćelije i ćelije u apoptozu su identifikovane na histološkim preparatima obojenim hematoksilinom i eozinom. Uporedo sa regresijom tumora, mitotička aktivnost je smanjena za oko 90%, a broj apoptotičnih ćelija se udvostručio. Broj nekrotičnih ćelija se nije menjao. Kod pacijenata sa kancerom uočen je snižen nivo ukupnog antioksidantnog statusa (TAS) (Salgo i sar., 1997). Međutim, još uvek nije sa sigurnošću poznato da li je ovo primarni ili sekundarni efekat. Određivanje ukupnog antioksidantnog statusa može da bude značajano *screening* sredstvo za identifikaciju pacijenata sa rizikom od nastanka kancera, ali i za praćenje terapijskih efekata. Sve navedene i diskutovane informacije idu u prilog činjenici da dosadašnje razumevanje uticaja oksidativnog stresa i antioksidantnih sistema zaštite u patogenezi maligne transformacije ćelije nije veliko.

Da bi se bolje shvatila kompleksnost problema kojim se bavi ova disertacija, valja napomenuti da se sve do kraja sedamdesetih godina verovalo da postoje kritične kvalitativne biohemijske razlike između normalnih i malignih ćelija. Međutim, sve veći broj istraživačkih radova, ostavljao je malo nade da će se ikad otkriti specifična abnormalnost biohemije i molekularne biologije tumora odnosno maligne transformacije ćelije. Drugim rečima, nema jedne jedinstvene enzimske, imunske ili genetske promene koja bi bila zajednička za sve maligne transformacije. Ti radovi su sve ubedljivije sugerisali da se, naprotiv, može izvesti jedan sasvim suprotan zaključak koji govori o ekstremnoj fenotipskoj heterogenosti maligno transformisanih ćelija počev od onih dobro diferenciranih i sa minimalnim devijacijama u odnosu na normalne pa do potpuno nediferenciranih (Dexter i Calabresi, 1982). Ova fenotipska heterogenost se pojavljuje već u najranijim stadijumima maligne transformacije, a ne samo kao rezultat njene progresije. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji potvrdili su postojanje biohemijskih razlika između malignih ćelija Ehrlich-ovog tumora i ćelija zdravih tkiva; prvenstveno u odgovoru na tretman sa ispitivanim ekstraktima imele, odnosno u odgovoru na postojanje oksidativnog stresa i/ili antioksidantne aktivnosti. Ova tvrdnja se prvenstveno odnosi na aktivnost nekih ispitivanih antioksidantnih enzima (XOD, CAT, GSHPx i GR); nakon davanja ekstrakata imele "zdravim" eksperimentalnim životinjama nije došlo do značajnih promena aktivnosti enzima (tabele 5.16), dok su promene aktivnosti ovih enzima u tumorskim ćelijama nakon tretmana ekstraktima bile značajne, i ukazivale na prisustvo oksidativnog stresa (tabele 5.20, 5.21, 5.23 i 5.24). Takođe, "normalne" i tumorske ćelije pokazale su različit odgovor na davanje ekstrakata imele i kada je praćen nivo GSH i intenzitet LPx; ćelije EAC su imale značajno izmenjene vrednosti ovih parametara nakon tretmana sa ekstraktima, što je opet ukazivalo na prisustvo oksidativnog stresa u ćelijama.

Prethodna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da *V. album* ekstrakti poseduju određena antitumorska svojstva, međutim, mehanizmi na kojima se zasnivaju ova svojstva su uglavnom nepoznata, i nalaze se još uvek u sferi naučnih spekulacija. Jedna od glavnih

karakteristika metabolizma malignih ćelija je konstantna izloženost epizodama hipoksije ili ishemije, praćene reoksigenacijom. Permanentna anoksija/ishemija dovodi do smrti ćelije i nekroze tumorskog tkiva. Međutim, tumorske ćelije koje su konstantno bile izložene oksidativnom stresu postale su veoma otporne, što znači da su razvile snažne mehanizme antioksidativne zaštite (Piette, 1999). Procesi koji dovode do oštećenja ćelijskih membrana tokom anoksije, a posebno posle reoksigenacije, su verovatno odsutni ili inhibirani u malignim ćelijama. Na primer, aktivnost XOD, enzima za koji se veruje da je odgovoran za nastanak  $O_2^{\bullet-}$ , je značajno smanjena, a maligne ćelije su, takođe, sposobne da se adaptiraju na povišenu koncentraciju  $Ca^{2+}$  (Ripple i sar., 1997). Pored toga, postoji nekoliko podataka koji pokazuju da su intenzitet lipidne peroksidacije i koncentracija degradacionog proizvoda (MDA) veoma niske kod proliferišućih tumorskih ćelija (Rice-Evans i Burdon, 1994), što ističe značajnu razliku između maligne i normalne ćelije. Maligne ćelije proizvode male količine  $O_2^{\bullet-}$  i  $H_2O_2$  i imaju niske aktivnosti enzima SOD i CAT. Rezultati dobijeni u disertaciji su potvrdili nisku aktivnosti XOD, CAT i veoma mali intenzitet lipidne peroksidacije u ćelijama EAC. Veoma visoka aktivnosti XOD i veliki intenzitet LPx, te snižena aktivnost CAT (praćena mogućnošću akumulacije  $O_2^{\bullet-}$  i  $H_2O_2$ ) kod životinja koje su tretirane sa ekstraktima imele (a koji su pokazali citotoksična svojstva), sve to praćeno smanjenom incidencom EAC, ukazuje na mogućnost da su maligne ćelije bile izložene snažnom oksidativnom stresu tokom tretmana sa imelinim ekstraktima.

GSH je univerzalni celularni protektant od oksidativnog stresa. Značaj glutaciona i enzima koji se sa njim dovode u vezu (glutacion reduktaza, glutacion peroksidaza) u antioksidativnoj zaštiti malignih ćelija leži u činjenici da brzina proliferacije, osetljivost prema citostaticima i mehanizmi koji mogu biti okidači programirane ćelijske smrti su direktno zavisni od intracelularnih nivoa glutaciona. U ovoj disertaciji, uočeno je snažno smanjenje količine GSH (tabela 5.25) u ćelijama EAC i porast aktivnosti GSHPx i GR (tabele 5.23 i 5.24) nakon tretmana sa *V. album* ekstraktima (koji su pokazali određeni stepen efikasnosti), što je bila karakteristika

ćelija izloženih oksidativnom stresu (tabela 5.16). Poredeći rezultate biohemijskih testova (aktivnost antioksidantnih enzima, količina GSH i intenzitet LPx) sa brojem ćelija EAC i ćelijskom vijabilnošću, mogu se uočiti izvesne korelacije. Netretirane ćelije EAC pokazale su visoku vijabilnost (nizak stepen oštećenja ćelija, 8,7-8,9%) i rastući broj ćelija od dana implantacije (od 20000 1-og dana do 120000 ćelija/mm<sup>3</sup> 14-og dana). Tretman sa *V. album* ekstraktima značajno je promenio antioksidantni status ćelija EAC (pojačana aktivnost XOD, Px, GSHPx i GR, snižena aktivnost CAT, smanjena količina GSH, pojačan intenzitet LPx), a imao je i uticaja na broj ćelija EAC i njihovu vijabilnost. Pojačan oksidativni stres ćelija EAC praćen je smanjenim brojem ćelija i ćelijskom vijabilnošću. U određenom broju slučajeva, pogotovo kada su životinje pretretirane sa ekstraktima *V. album* sa topole, gloga, šipka i kleke, zabeleženo je čak i potpuno odsustvo ćelija EAC. Posttretman je, takođe, doveo do redukcije broja i vijabilnosti ćelija, ali u manjoj meri, što je bilo u skladu sa nižim stepenom oksidativnog stresa kod ovih ćelija. Generalno, dobijeni rezultati upućuju na mogućnost da je citotoksična aktivnost određenih ekstrakata *V. album* u vezi sa indukcijom oksidativnog stresa. Od velikog značaja je, takođe, i ispitivanje reakcije malignih ćelija na takozvani terapijski oksidativni stres koji izazivaju antitumorski lekovi i aktivirane ćelije imunog sistema koje proizvode vodonik peroksid kao značajan citotoksični intermedijer (Korytowski i sar., 1995). Ovaj koncept je u potpunosti u skladu sa osnovnom idejom i ove disertacije. Ispitivane ekstrakte lista *V. album* smo u *in vivo* eksperimentima intraperitonealno davali miševima sa implantiranim EAC u različitim stadijumima razvoja tumora, nakon čega je, između ostalog merena koncentracija redukovanog glutationa. Efekti primenjenih ekstrakata su pokazali smanjenje GSH, verovatno praćenu porastom koncentracije oksidovanog oblika GSSG, ili njegovim izlaskom iz ćelija. Testiranje vijabilnosti ćelija EAC nakon tretmana sa ekstraktima pokazalo je da je pre davanja ekstrakata procenat nevijabilnih ćelija, određen korišćenjem boje *Trypan blue*, bio samo oko 8%, dok se nakon tretmana kretao od 60-100%, u zavisnosti od primenjenog ekstrakta i stadijuma razvoja tumora. Dalje, rezultati ove studije pokazuju da tretman ćelija EAC sa N-acetil-L-cisteinom

dovodi do smanjene degradacije i deplecije GSH u odnosu na ćelije koje nisu tretirane sa ovom aminokiselinom, što ide u prilog tezi o važnoj ulozi oksidativnog stresa u citotoksičnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata. U vezi sa prethodnom pretpostavkom su i rezultati do kojih su došli Lee i saradnici (1998), koji su pokazali da tiolni antioksidans N-acetil-L-cistein suprimira citotoksičnost i produkciju prooksidanasa kod ćelija humanog karcinoma dojke (MCF-7/ADR) sa multiplom rezistencijom na citostatike.

U fiziološkim uslovima koncentracija GSH u ćelijama je konstantna. U metabolizmu glutationa važnu ulogu igra i sistem NADPH/NADP<sup>+</sup>, koji inaktivira GR koja zatim biva reaktivirana povećanjem koncentracije GSSG (Tew, 1994). Ovaj podatak sugerše da je GR parcijalno neaktivna (inaktivirana) ili slabo aktivna u fiziološkim uslovima. U stanjima oksidativnog stresa povećanje koncentracije GSSG aktivira GR. U sistemima ispitivanim u disertaciji, aktivnost GR je bila niska kako u uzorcima krvi zdravih životinja, tako i u netretiranim ćelijama EAC. Kod životinja sa implantiranim EAC, aktivnost GR je bila izrazito povećana u krvi (Ćebović i Popović, 2007), verovatno kao posledica oksidativnog stresa. Iako ekstrakti imele generalno nisu menjali aktivnost GR kod zdravih životinja, porast aktivnosti tumorske GR je u manjoj ili većoj meri zabeležen tretmanom sa ekstraktima imele, u zavisnosti od domaćina. Intracelularne nivoe GSH reguliše i glutation peroksidaza (GSHPx). Izmereni nivoi aktivnosti GSHPx u normalnim i ćelijama EAC ukazuju na njihov značajan potencijal u antioksidativnoj zaštiti tumorskih ćelija koja je od izuzetnog značaja u uslovima egzogenog oksidativnog stresa koji oštećuje plazmalnu membranu i ostale ćelijske organele. Ovde do izražaja dolazi stepen povezanosti i sinergističkog delovanja komponenti antioksidantnog sistema – GSH, GSHPx i GR, i potrebe da njihova aktivnost u ćelijama izloženim oksidativnom stresu bude optimalna. Pojačanje aktivnosti GSHPx izmereno u ćelijama EAC nakon tretmana sa *V. album* ekstraktima sigurno ukazuje na postojanje promena u antioksidantnom statusu ovih ćelija.



Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji nalaze potvrdu i u nekim literaturnim podacima. Navarro i saradnici (1999) su ispitivali povezanost rasta tumora *in vivo* sa promenama aktivnosti CAT, te sistema GSH-GSHPx-GR u krvi eksp. životinja i tumorskim ćelijama. Uočen je značajan porast aktivnosti GSHPx i GR, pad nivoa GSH, te pojačanje aktivnosti CAT u krvi eksp. životinja nakon implantacije tumora, što se dobro slagalo sa našim rezultatima (Ćebović i Popović, 2007). Autori su ove promene doveli u vezu sa postojanjem oksidativnog stresa kod životinja sa implantiranim tumorom. S druge strane, prateći iste antioksidantne sisteme u tumorskim ćelijama, Navarro i saradnici nisu uočili značajne promene od momenta implantacije tumora, što je bilo u skladu sa rezultatima prikazanim u disertaciji (tabele 5.21, 5.23, 5.24 i 5.25). Korak dalje u istraživanjima su otišli Fawzia i saradnici (2004). Oni su, takođe, pratili promene aktivnosti CAT i sistema GSH-GSHPx-GR, ali nakon tretmana miševa sa implantiranim Ehrlich-ovim tumorom sa jodoacetatom i dimetilsulfoksidom. Važan zaključak ove studije je bio da su vrednosti za merene parametre u krvi svedene na kontrolne (životinje bez implantiranog tumora) nakon tretmana sa pomenutim antitumorskim agensima, da su vrednosti u tumorskim ćelijama ukazivale na poremećen antioksidantni status, te da je uočena i inhibicija rasta ovog solidnog tumora. Naši rezultati dobijeni kod miševa tretiranih sa ispitivanim ekstraktima imele u velikoj meri prati ovakav trend, sa malim odstupanjima kod posttretiranih životinja (verovatno zbog višeg stepena razvoja implantiranog tumora i postojanja oksidativnog stresa pre početka terapije sa ekstraktima). Razlike u rezultatima koje bi bile posledica primene ekstrakata imele sa različitih domaćina nisu zabeležene.

Mnoga saznanja idu u prilog pretpostavci da je oksidativni stres jedan od mehanizama prisutnih tokom maligne transformacije ćelije. Međutim, veoma je važno razmotriti i promene koje se dešavaju u toku razvoja kancera, kao i promene koje nastaju tokom terapije. Poznato je da su u prvoj fazi kancerogeneze (u fazi inicijacije) prisutne promene aktivnosti antioksidantnih enzima. Pokazano je da nakon aplikacije dimetilhidrazina, odgovornog za razvoj adenokarcinoma kolona miševa, aktivnost nekih antioksidantnih enzima (npr. SOD) raste mnogo

pre bilo kojih vidljivih histoloških promena (Loven i sar., 1980). Takođe, ispitivanjem ukupnog antioksidantnog potencijala i koncentracije malonildialdehida (MDA) u malignim ćelijama adenokarcinoma kolona, nađeno je povećanje ukupnog antioksidantnog kapaciteta i smanjenje koncentracije MDA u odnosu na ćelije zdravih tkiva životinja sa adenokarcinomom. U disertaciji, ispitivanjem aktivnosti antioksidantnih enzima ćelija Ehrlich-ovog tumora i zdravih tkiva, uočeno je, takođe, povećanje antioksidantnog kapaciteta u ćelijama tumora u odnosu na zdrava tkiva kod kojih je zabeležena pojava oksidativnog stresa, koja se ogledala ne samo u promenama aktivnosti antioksidantnih enzima, već i u padu koncentracije redukovano glutationa i porastu oksidativnog oštećenja membranskih lipida (koncentracija MDA). Dobijeni rezultati, kao i ostali podaci iz dostupne literature idu u prilog činjenici da promene u antioksidantnom statusu ćelije, vrlo verovatno, predstavljaju neke od faktora rane pripreme ćelija za malignu transformaciju. Najverovatnije su ovi faktori udruženi sa nishodnom "down" regulacijom lipidne peroksidacije.

Fenomen progresije tumora koji se odvija *in vivo* uslovljen je selekcijom tumorskih ćelija sa novim, specifičnim karakteristikama (Deichman, 2000). Ustanovljeno je da prirodna selekcija "otpornih" klonova tumorskih ćelija, imeđu ostalog, podrazumeva rezistenciju na  $H_2O_2$ , uslovljenu jakom antioksidativnom aktivnošću (najvećim delom aktivnošću CAT). Rezistencija na citotoksične nokse je u vezi sa ukupnom enzimskom antioksidantnom aktivnošću. Ove ćelije pokazuju manji nivo produkata lipidne peroksidacije, a ove stavove su potvrdili i rezultati prikazani u disertaciji (tabele 5.21 i 5.26). Bez obzira na činjenicu što je narušen antioksidantni status ćelije jedan od mogućih preduslova za kancerogenezu, produkcija ROS u malignom tkivu je značajno manja u odnosu na zdravo tkivo (Cheeseman i sar., 1986). Tačan mehanizam kojim maligne ćelije limitiraju produkciju kiseoničnih radikala nije precizno utvrđen. Pretpostavlja se da manja osetljivost malignih ćelija na proces peroksidacije lipida nastaje zbog manjeg sadržaja nezasićenih masnih kiselina (primarnog supstrata za proces peroksidacije). Prisutna je i opšta hipoteza da je povećanje mitotske aktivnosti ćelije udruženo sa opadanjem nivoa lipidne

peroksidacije (Slater, 1984). Rezultati dobijeni tokom izrade disertacije, koji ukazuju na smanjenu koncentraciju MDA u ćelijama EAC, u skladu su sa navedenim podacima iz literature. Osim smanjene koncentracije MDA, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, u tumorskim ćelijama je izmerena i smanjena koncentracija 4-hidroksi-nonenala (Barrera i sar., 2005, 1999), produkta koji nastaje u toku lipidne peroksidacije, za koji je takođe nađeno da inhibira proliferaciju HL-60 ćelija u *in vitro* uslovima. Dakle, nije isključeno da u pripremi ćelije za proces maligne transformacije limitirana produkcija radikala smanjuje apoptozu, a favorizuje ćelijsku proliferaciju. Ova pretpostavka bazirana je na činjenici da slobodni radikali učestvuju u normalnoj ćelijskoj destrukciji, kao i da se programirana ćelijska smrt (apoptoza) može inhibirati endogenim i egzogenim antioksidantima (Sandoval i sar., 1997). Pomenuta fenotipska karakteristika malignih ćelija (mala peroksidabilnost, smanjena apoptoza) predstavljaju kritični faktor za progresiju tumora. U prilog ovim literaturnim podacima svakako idu i rezultati disertacije dobijeni ispitivanjem uticaja antioksidanta N-acetil-L-cisteina na ćelije EAC, odnosno uočen porast broja tumorskih ćelija nakon tretmana ovim antioksidansom, kao i povećan antioksidantni status ćelija izražen kroz aktivnosti antioksidantnih enzima. S druge strane, smanjenje antioksidantnog statusa ćelija EAC, povećanje lipidne peroksidacije u ćelijama EAC praćeno smanjenjem broja ćelija EAC nakon tretmana sa ekstraktima imele, mogli bi da, na osnovu literaturnih pretpostavki, budu posledica specifičnog indukovanog oksidativnog stresa u ćelijama EAC.

Oštećenje malignih ćelija indukovano slobodnim radikalima tokom oksidativnog stresa, uključeno je u inicijaciju apoptoze. Aktivacija apoptotičkog programa u maligno transformisanim ćelijama je jedna od antitumorskih strategija koja se nalazi u centru istraživanja na nivou hemioterapije, radioterapije i genske terapije (Thompson, 1995). Međutim, problem primene antineoplastičnih lekova, kao što su antraciklinski antibiotici i alkilirajuća sredstva, je njihova sekundarna toksičnost, naročito izražena kao kardio, entero, hepato i nefrotoksičnost. Smatra se da je izazvana nastankom superoksid anjon radikala tokom metabolizma ovih lekova i

njegovom transformacijom do vodonik peroksida. S druge strane bi se moglo smatrati da su ispitivani ekstrakti *V. album* bili u prednosti jer, u *in vivo* ispitivanjima nisu pokazali hepatotoksični niti prooksidantni efekat u zdravim tkivima.

Istraživački tim Slyshenkov-a i saradnika (1996), koji je za svoje eksperimente *in vitro* takođe koristio ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC), prikazao je rezultate sadržaja proteina u ćelijskoj suspenziji, kao i koncentraciju redukovanog GSH adekvatne rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, s tim što je za indukciju oksidativnog stresa korišćen tercbutil hidroperoksid, a u disertaciji su rezultati bili posledica davanja ispitivanih ekstrakata imele. Ovi autori, takođe, pokazuju da primena antioksidanata snižava lipidnu peroksidaciju u ćelijama EAC (Slyshenkov i sar., 1995), što je bilo u korelaciji sa ovde prikazanim rezultatima.

Postoji malo dostupne literature koja ispituje moguću povezanost antitumorskog delovanja ekstrakata *V. album* sa delovanjem na oksidativni stres i produkciju ROS. Kim je, sa svojim saradnicima (2004), pokazao da tretman aglutininom *V. album* ssp. *coloratum* dovodi do značajnog povećanja količine ROS u Hep3B tumorskoj ćelijskoj liniji, do gubitka potencijala membrane mitohondrija, kao i da tretman sa antioksidantom, N-acetil-L-cisteinom, inhibirajući produkciju ROS sprečava apoptozu ovih ćelija. Ranija istraživanja ovih autora (Kim i sar., 2003) su dovela u vezu delovanje imelinog lektina-II sa prekomernim nastankom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod U937 leukemijskih ćelija. S druge strane, Timoshenko i njegovi saradnici (2001) ukazuju da bi se primenom imelinih lektina tokom imunoterapije C3H/HeJ adenokarcinoma sa interleukinom-2 mogli izbeći neželjeni efekti prouzrokovani prekomernim nastankom azot monoksida. Neki ispitivani neoplastični agensi, među kojima su cisplatina, hidroksiurea, doksorubicin i relaksin, pokazali su se kao promoteri produkcije azot monoksida, NO (Bani i sar., 1995; Pacelli i sar., 1996; Son i Kim, 1995). NO može imati uticaja na nekoliko aspekata biologije tumora uključujući modulaciju ćelijskog rasta, apoptoze, diferencijacije, angiogeneze i metastatske sposobnosti (Stuehr i Nathan, 1989). Takođe, NO, pojačava celularni oksidativni stres (Noronha-Dutra i sar., 1993). Neka istraživanja su pokazala da neoplastični agensi koji povećavaju

produkciju NO smanjuju rast solidnog Ehrlich-ovog tumora (Kalivendi i sar., 2001; Weinstein i sar., 2000). Takođe, NO može da utiče na ćelijsku proliferaciju preko ne-apoptotskih mehanizama kao što je inaktivacija enzima koji su odgovorni za mitohondrijalnu respiraciju (Stuehr i Nathan, 1989), ili inhibicija ribonukleotid reduktaze (Kwon i sar., 1991). Naša *in vitro* ispitivanja uticaja ekstrakata lista *V. album* sa različitih domaćina na produkciju NO su pokazala da ispitivani ekstrakti ne utiču značajno na povećanje koncentracije nitrita u ispitivanom sistemu. Malo odstupanje od ovakvog zaključka je pokazao ekstrakt imele sa šipka koji je u svim ispitivanim koncentracijama pojačao nastajanje NO. Interesantno je napomenuti da je upravo ovaj ekstrakt pokazao najjači citotoksični efekat na ćelije EAC, inhibirajući razvoj tumora 100% u svim ispitivanim slučajevima, što bi se moglo dovesti u vezu sa prethodno diskutovanim literaturnim podacima.

Najnovija istraživanja pokazuju anti-tumorski efekat ekstrakta *Iscador*, lista *V. album* sa hrasta, a Duong Van Huyen i saradnici (2007) smatraju da je antitumorska aktivnost posledica pojačane aktivnosti IL-2, praćena pojačanim oksidativnim stresom malignih ćelija melanoma B16.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji nedvosmisleno pokazuju značajan porast stepena oštećenja ćelija tumora EAC, odnosno značajno smanjenje vijabilnosti ćelija EAC nakon terapije vodenim ekstraktima lista *V. album* (poglavlje 5.5.1, tabela 5.19). Uz određene razlike između ekstrakata, ovaj fenomen je praćen i smanjenjem zapremine ascitesa, broja tumorskih ćelija, i naravno smanjenjem incidence tumora (poglavlje 5.5.1, tabele 5.17 i 5.18). Osnova diskutovanih istraživanja je bio enzimski profil u malignim ćelijama nakon terapije ekstraktima imele, i postavljanje eventualne veze između oksidativnog stresa i pojave supresije razvoja tumora. Međutim, interesantno je istražiti da li je oštećenje ćelija EAC bilo posledica apoptotske ili nekrotske aktivnosti, što može biti jedan od prioriternih pravaca daljih ispitivanja u ovoj oblasti.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji (poglavlje 5.5.2) ukazuju na postojanje slabijeg ili jačeg oksidativnog stresa u

malignim ćelijama nakon administracije vodenih ekstrakata lista *V. album*. Danas je poznato da mitohondrije igraju centralnu ulogu u programiranoj ćelijskoj smrti, a u njima se odigrava i najveća produkcija ROS (Green i Reed, 1998). Slobodni radikali dovode do oslobađanja citohroma c i otvaranja pora tranzitorne permeabilnosti mitohondrijalnih membrana, što predstavlja važan događaj u apoptotičnoj kaskadi (Green i Reed, 1998).

Mada postoje podaci koji ukazuju na ulogu oksidativnog stresa u pokretanju apoptoze, njihova uloga jos uvek nije pouzdano utvrđena. Neki ranije publikovani rezultati (Duong van Huyen i sar., 2007; Barrera i sar., 2005; Kim i sar., 2004), kao i ovde prezentovani rezultati, idu u prilog tvrdnji da produkcija slobodnih radikala i snižavanje antioksidantnog kapaciteta ćelije uzrokuje apoptozu/nekrozu. S druge strane, postoje i podaci koji ukazuju da se, apoptoza javlja i kod veoma niskog  $pO_2$ , gde je stvaranje ROS malo verovatno (Brunelle i Chandel, 2002).

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih i diskutovanih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Postoje značajne razlike u fitohemijskom sastavu imele, što se u daljim ispitivanjima odrazilo na efekte pro/antioksidantnu aktivnost ekstrakata, a posredno i na citotoksičnu aktivnost.

2. *In vitro* ispitivanja antioksidantnih svojstava ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina potvrdila su postojanje značajnih razlika.

3. *In vivo* testovi pokazali su hepatoprotektivna svojstva ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina (izuzev imele sa gloga).

4. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji potvrdili su postojanje biohemijskih razlika između malignih ćelija Ehrlich-ovog tumora i ćelija zdravih tkiva; prvenstveno u odgovoru na tretman sa ispitivanim ekstraktima imele, odnosno u odgovoru na postojanje oksidativnog stresa i/ili antioksidantne aktivnosti.

5. Uočena značajna razlika u aktivnosti vodenih ekstrakata *V. album* sa različitih domaćina nagoveštava mogućnost da biološka aktivnost ekstrakata u mnogome zavisi od domaćina na kome je biljka rasla.

6. Ekstrakti *V. album* sa različitih domaćina su pokazali različito citocidno delovanje na ćelije EAC.

7. Pokazana je povezanost između delovanja sastojaka ekstrakata *V. album* na produkciju ROS i aktivnost enzima antioksidantne zaštite i njihovog citocidnog delovanja na ćelije tumora.

8. Iz dobijenih i diskutovanih rezultata, nameće se zaključak da je u slučaju primene vodenih ekstrakata *V. album*, od presudne važnosti kada se i na koji način ekstrakt aplicira eksperimentalnim životinjama.

9. Određivanje ukupnog antioksidantnog statusa može da bude značajano *screening* sredstvo za identifikaciju pacijenata sa rizikom od nastanka kancera, ali i za praćenje terapijskih efekata.

Afanasiev IB, Derzhichko AL, Brodskii AV, Puzepovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(11): 1763-9.

Ajay M, Gilani AU, Mustafa M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat aorta. *Life Sci* 2003; 74: 607-12.

Alevalik SI, Leo MA, Aleynik MK, Lieber CS. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1998; 22(1): 132-6.

Arceus FM, Rego AC, Oliveira CR, Seabra RM. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate-Fe(2+)-induced oxidative stress in cultured rat liver cells. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 111-4.

Arnse MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Casnovas F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1041: 43-7.

Arsona OI. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *J Amer Oil Chem Soc* 1996; 73: 1617.

Balich RP, Voroencosa AL. Ljekovite biljke i rak. Beograd: Nauka, 1994. 143-51.

Bani D, Masini S, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB. Retenol activates the NADPH-dependent oxidase pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 5272-5.

Barnay CW, Ravitsworth FG, Geils BW. Hops of *Vitis vinifera*. *Eur J For Path* 1998; 28: 160-208.

Barrera G, Hernandez A, Pineda JF, Lafont S, Druet G, Monfak DA. 4-hydroxy-retenol and cell cycle. *BioFactors* 2005; 24(1-4): 151-7.

Barrera G, Pineda JF, Macias G, Maggioni M, Diazzi MI, Casals RA. Enzymes metabolizing aldehydes in HL-60 human leukemia cells. *Adv Exp Med Biol* 1999; 463: 517-22.

Becker H, Exner J. Vergleichende Untersuchungen von Musteln verschiedener Wirte anhand der Flavonoide und Phenolcarbonsäuren. *J Pflanzenphysiol* 1980; 97: 417-38.

Beer RF, Sizer JW. Spectrophotometric method for measuring of break down of hydrogen peroxide by catalase. *J of Biolog Chem* 1950; 195: 13-40.

Beberz BC, Verma N, Sonare A, Makhija D. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a fungus *Dorvillea gaurandae*. *Phytother Res* 2003; 19: 38-40.



## 8. LITERATURA

Abelev GI, Kopnin BP. Biochemistry of cancer: an introduction to this issue. *Biochemistry* 2000; **65**(1): 3-4.

Afanasev IB, Doroschko AI, Brodskii AV, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**(11): 1763-9.

Ajay M, Gilani AU, Mustafa M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003; **74**: 603-12.

Aleynik SI, Leo MA, Aleynik MK, Lieber CS. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1998; **22**(1): 192-6.

Areias FM, Rego AC, Oliveira CR, Seabra RM. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe(2+)-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem Pharmacol* 2001; **62**: 111-8.

Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Canovas F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1041**: 43-7.

Aruoma OI. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *J Amer Oil Chem Soc* 1996; **73**: 1617.

Balickij KP, Voroncova AL. Lekovite biljke i rak. Beograd: Nauka, 1994: 143-51.

Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB. Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 5272-5.

Barney CW, Hawksworth FG, Geils BW. Hosts of *Viscum album*. *Eur J For Path* 1998; **28**: 187-208.

Barrera G, Hernandez A, Poulin JF, Laforest S, Drolet G, Morilak DA. 4-hydroxy-nonenal and cell cycle. *Biofactors* 2005; **24**(1-4): 151-7.

Barrera G, Pizzimenti S, Muzio G, Maggiora M, Dianzani MU, Canuto RA. Enzymes metabolizing aldehydes in HL-60 human leukemic cells. *Adv Exp Med Biol* 1999; **463**: 517-22.

Becker H, Exner J. Vergleichende Untersuchungen von Misteln verschiedener Wirtsbaume an Hand der Flavonoide und Phenolcarbonsauren. *Z Pflanzenphysiol* 1980; **97**: 417-28.

Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric method for measuring of break down of hydrogen peroxide by catalase. *J of Biolog Chem* 1950; **195**: 133-40.

Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytother Res* 2005; **19**: 58-64.

- Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; **299**: 15-27.
- Bergmayer UH. *Methoden Der Enzymatischen Analyse*. Weinheim: Verlag Chemie, 1970: 483-4.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; **272**: 20313-6.
- Beuthler E, Duron O, Kelly B. Improved methods for the determination of blood glutathione. *J of Lab and Clin Med* 1983; **61**: 882-9.
- Bhatnagar A. Attenuation of reperfusion injury by the antioxidant n-propyl gallate. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **26**: 343-7.
- Bianchi G. Plant Waxes. In: Hamilton RJ. ed. *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Dundee: The Oily Press, 1995:175-222.
- Block G. *et al*. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992; **18**: 1-29.
- Blot *et al*. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin and mineral combinations, cancer incidence and disease specific mortality in the general population. *Natl Cancer Instit* 1993; **85**: 1483-92.
- Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Karasman M, Schneider B. Efficacy and safety of long-term complementary treatment with standardized European mistletoe extract (*Viscum album* L.) in addition to the conventional adjuvant oncologic therapy in patients with primary non-metastasized mammary carcinoma. Results of a multi-center, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* 2004; **54**(8): 456-66.
- Borek L. Free radical processes in multistage carcinogenesis. *Free Radical Res Commun* 1991; **12-13**: 745-50.
- Brune B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death and Differentiation* 2003; **10**: 864-9.
- Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: An update. *Apoptosis* 2002; **7**: 475-82.
- Buege AL, Aust DS. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleisher S, Parker L. eds. *Methods In Enzymology*. New York: Academic Press, 1978: 306-10.
- Bungert M, Thiel R, Goedings P, Becker H. (E,E)-alpha-farnesene the main substance of the volatiles of the flowers from European mistletoe (*Viscum album* L.). *Z Naturforsch [C]* 2002; **57**(1-2): 205-7.
- Bussing A. *Mistletoe: The genus Viscum*. Harwood Academic Publishers, 2000.

Bussing A, Suzart K, Bergmann J, Pfueller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett* 1996; **99**: 59-72.

Bussing A, Schaller G, Pfueller U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Res* 1998; **18**: 4291-6.

Bussing A, Stein GM, Wagner M, Wagner B, Schaller G, Pfueller U, Schietzel M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. *Eur J Biochem* 1999; **262**: 79-87.

Bustamante J, Carreras C, Riobo N, Tovar-Baralia A, Montero G, Poderoso JJ, Boveris A. Nitric oxide and hydrogen peroxide production during apoptosis of human neutrophils. In: Moutonier L, Olivier R, Pasquier C. eds. *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases*. New York: Marcel Dekker, 1998; **3**: 205-11.

Buttemeyer R, Philipp AW, Schlenzka L, Beissenhirtz M, Lisdat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury *in vivo*. *Transplant Proc* 2003; **35**: 3116-20.

Calder M, Bernhardt P. eds. *The biology of mistletoes*. Sydney: Academic Press, 1983.

Capernaros Z. The Golden Bough: The Case for Mistletoe, *European Journal of Herbal Medicine* 1994; **1**.

Cazacu M, Oniu T, Lungoci C, Mihailov A, Cipak A, Klinger R, Weiss T, Zarkovic N. The influence of isorel on the advanced colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2003; **18**(1): 27-34.

Chapman ML, Rubin BR, Gracy RW. Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989; **16**(1): 15-18.

Cheesman KH. In: Mc Brien DCH, Slater TF. eds. *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*. London: Academic Press, 1982: 197.

Cheesman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bull* 1993; **49**(3): 481.

Cheesman KH, Collins M, Proudfoot K, Slater TF, Burton GW, Webb AC, Ingold KU. Studies on lipid peroxidation in normal and tumour tissues. The Novikoff rat liver tumour. *Biochem J* 1986; **235**(2): 507-14.

Chernyshov VP, Heusser P, Omelchenko LI, Chernyshova LI, Vodyanik MA, Vykhovanets EV, Galazyuk LV, Pochinok TV, Gaiday NV, Gumenyuk ME, Zelinsky GM, Schaefermeyer H, Schaefermeyer G. Immunomodulatory and clinical effects of *Viscum album* (Iscador M and Iscador P) in children with recurrent respiratory infections as a result of the Chernobyl nuclear accident. *Am J Ther*; **7**(3): 195-203.

Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem and Biophys Acta* 1976; **445**: 558-660.

- Choi EM, Hwang JK. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 2004; **75**: 557-65.
- Chou CJ, Ko HC, Lin LC. Flavonoid glycosides from *Viscum alniformosanae*. *J Nat Prod* 1999; **62**: 1421-2.
- Cook NC, Samman S. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *Nutritional Biochemistry* 1996; **7**: 66-76.
- Cos P, Calomme M, Sindambiwe JB, De Bruyne T, Cimanga K, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med* 2001; **67**: 515-9.
- Coulon A, Mosbah A, Lopez A, Sautereau AM, Schaller G, Urech K, Rouge P, Darbon H. Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures. *Biochem J* 2003; **374**(Pt 1): 71-8.
- Cronquist A. *Integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981.
- Ćebović T. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja antioksidantnih svojstava *Viscum album* L. i *Allium cepa* L. Magistarska teza, Prirodno-matematički fakultet: Univerzitet u Novom Sadu, 2003.
- Ćebović T. *Oksidativni stres i antioksidantna svojstva imele (Viscum album L.)*, Beograd: Zadužbina Andrejević, 2005.
- Ćebović T, Popović M. Effect of European mistletoe (*Viscum album* L.) grown on plums on antioxidant status of Ehrlich tumour cells *in vivo*. *FEB* 2007; **16**(4): 435-42.
- Ćebović T, Kaurinović B, Popović M, Mimica-Dukić N. Uticaj ekstrakata imele (*Viscum album*) na lipidnu peroksidaciju lipozoma, VII manifestacija "Dani lekovitog bilja 2001", Beograd, 2001: 86-7.
- Davies KJA. Proteolytic systems as secondary antioxidant defenses. In: Chow CH. ed. *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*. Boca Raton: CRC Press, 1988: 2: 25.
- Dawson VL. Pathologic roles of nitric oxide in the central nervous system. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. eds. *Free Radical in Brain Physiology and Disorders*. San Diego: CA: Academic Press Inc., 1996: 83-100.
- Debreczeni JE, Girmann B, Zeeck A, Kratzner R, Sheldrick GM. Structure of viscotoxin A3: disulfide location from weak SAD data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; **59**(Pt 12): 2125-32.
- Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 1997; **55**: 396.
- Decker G. Patients are talking about ... Iscador (mistletoe). *Clin J Oncol Nurs* 2001; **5**(4): 183-4.
- Deichman GI. Natural selection and early changes of phenotype of tumour cells *in vivo*: acquisition of new defence mechanisms. *Biochemistry (Mosc.)* 2000; **65**(1): 78-94.

- Deliorman D, Calis I, Ergun F. A new acyclic monoterpene glucoside from *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia* 2001; **72**: 101-5.
- Dexter DL, Calabresi P. Intraneoplastic diversity. *Biochim Biophys Acta* 1982; **695**: 97-112.
- Diechman GI. *Biochemistry* 2000; **65**: 92-111.
- Duong Van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Comparative study of the sensitivity of lymphoblastoid and transformed monocytic cell lines to the cytotoxic effects of *Viscum album* extracts of different origin. *Chemotherapy* 2003; **49**(6): 298-302.
- Duong Van Huyen JP, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD, Bruneval P, Nicoletti A, Kaveri SV. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Letters* 2007; **xx** (u štampi): 1-6.
- Dushkin MI, Safina AF, Vereschagin EI, Schwartz YS. Carboxymethylated beta-1,3-glucan inhibits the binding and degradation of acetylated low density lipoproteins in macrophages *in vitro* and modulates their plasma clearance *in vivo*. *Cell Biochem Funct* 1996; **14**: 209-17.
- Dorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. *Biohemija slobodnih radikala*. Niš: Medicinski fakultet u Nišu, 2000: 49.
- Edlund U, Hensel A, Frose D, Pfuller U, Scheffler A. Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I. *Arzneimittelforschung* 2000; **50**(7): 645-51.
- Endo Y, Tsurugi K, Franz H. The site of action of the A-chain of the mistletoe lectin I on eucaryotic ribosomes-the RNA *N*- glycosidase activity of the protein. *FEBS* 1988; **Lett. 231**: 378-80.
- Fattman CL, Enghild JJ, Crapo JD, Schaefer LM, Valnickova Z, Oury PD. Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 542-8.
- Fawzia AF, Amr YE, Essam AM, Emad KI. Antitumor activities of iodoacetate and dimethylsulphoxide against solid Ehrlich carcinoma growth in mice. *Biological Research* 2004; **2**: 234-9.
- Floyd RA. Basic free radical biochemistry. In: Yu BP. ed. *Free Radicals in Aging*. Boca Raton: CRC Press, 1993: 45-7.
- Fotte CS. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In: Pryor WA. ed. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press, 1976: 2: 85.
- Frank L. Oxygen toxicity in eukaryotes. In: Oberley LW. ed. *Superoxide dismutase*, Boca Raton: CRC Press, 1980: Vol. 3.
- Franz H. Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel. *Pharmazie* 1985; **40**: 97-104.

- Freeman BD. Biological sites and mechanisms of free radical production. In: Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TF. eds. *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*. New York: Raven Press, 1984: 43.
- Fukunaga T, Kajikawa I, Nishiya K, Watanabe Y, Takeya K, Itokawa H. Studies on the European Mistletoe, *Viscum album*. *Chem Pharm Bull* 1987; **35**: 3292-7.
- Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 1769-78.
- Gabius HJ, Wazel H, Joshi SS, Kruip J, Kojima S, Gerke V, Kratzin H, Gabius S. The immunomodulatory  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact in intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res* 1992; **12**: 669-76.
- Garner MH, Spector A. Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 1274.
- Gasso M, Rubio M, Varela G, Cabre M, Caballeria J, Alonso E, Deulofem R, Camps J, Gimenez A, Piores M, Pares A, Mato JM, Rodes J. Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1996; **25**: 200-5.
- Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In: Bergmayer HU. ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Volume III. 3rd ed. Basel: Weinheim, 1983: 258-65.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309-12.
- Grossarth-Maticsek R, Kiene H, Baumgartner SM, Ziegler R. Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study. *Altern Ther Health Med* 2001; **7**(3): 57-66, 68-72, 74-6.
- Gulcin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine* 2006; **13**: 343-51.
- Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, Sokmen A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 2006; **13**: 515-21.
- Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 2003; **23**: 1719-26.
- Haas K, Bauer M, Wollenweber E. Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes. *Z Naturforsch [C]* 2003; **58**(7-8): 464-70.
- Hagerman A, Harvey-Mueller I, Makkar HPS. *Quantification of tannins on three foliage – a laboratory manual*. FAO/IAEA, Vienna, 2000: 4-7.

- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defence system *in vivo* in rabbits and patients. *Cancer Res* 1989; **49**: 4803-8.
- Halliwell B. Free radical and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; **52**: 8, 253.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Science Publications, 1989: 75.
- Harald SHW, Kelm M. Determination of Nitrite and Nitrate by the Griess Reaction. In: Feelisch M, Stamler JS. eds. *Methods in Nitric Oxide Research*, 1996: 491-7.
- Harborne JB. Plant Phenolics. In: Dey PM, Harborne JB. eds. *Methods in Plant Biochemistry*. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1989; **1**: 3.
- Harmsma M, Gromme M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FC. Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* 2004; **25**(6): 1521-9.
- Haznagy-Radnai E, Czigle Sz, Zupko I, Falkay G, Mathe I. Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia* 2006; (u štampi).
- Henle ES, Han Z, Tang N, Rai P, Luo Y, Linn S. Sequence-specific DNA cleavage by  $Fe^{2+}$ -mediated Fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* 1999; **274**: 962-71.
- Holtorf S, Ludwig-Mueller J, Apel K, Bohlmann H. High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Mol Biol* 1998; **36**: 673-80.
- Huic RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; **18**: 195-9.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003; **3**: 276-285.
- Inoue KH, Hagerman AE. Determination of gallotannins with rhodanine. *Anal Biochem* 1988; **169**: 363-9.
- Janero DR, Burghardt B, Lopez R. Protection of cardiac membrane phospholipid against oxidative injury by calcium antagonists. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**(21): 4197-203.
- Jayaprakascha GK, Rao LJ. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Z. Naturforsch (C)* 2000; **55**(11-12): 1018-1022.
- Jung MJ, Yoo YC, Lee KB, Kim JB, Song KS. Isolation of epi-oleanolic acid from Korean mistletoe and its apoptosis-inducing activity in tumor cells. *Arch Pharm Res* 2004; **27**(8): 840-4.
- Kadiiska M, Gladen BC, Baird DD, Dikalova AE, Sohal RS, Hatch GE, Jones DP, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of  $CCl_4$  poisoning? *Free Rad Biol Med* 2000; **28**: 838-45.
- Kagan VE. *Lipid Peroxidation in Biomembranes*. Boca Raton: CRC Press, 1988.

- Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47266-76.
- Karagoz A, Onay E, Arda N, Kuru A. Antiviral potency of mistletoe (*Viscum album* ssp. album) extracts against human parainfluenza virus type 2 in Vero cells. *Phytother Res* 2003; **17**(5): 560-2.
- Karthikeyan K., Saralabai BR, Gauthaman K, Sathish KS, Niranjali Devaraj S. Cardioprotective effect of the alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark in an *in vivo* model of myocardial ischemic reperfusion injury. *Life Sci* 2003; **73**: 2727-39.
- Kennedy AR, Troll W, Little JB. Role of free radicals in the initiation and promotion of radiation transformation *in vitro*. *Carcinogenesis* 1984; **5**: 1213.
- Kim MS, Lee J, Lee KM, Yang SH, Choi S, Chung SY, Kim TY, Jeong WH, Park R. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci* 2003; **73**(10): 1231-43.
- Kim WH, Park WB, Gao B, Jung MH. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004; **66**(6): 1383-96.
- Kintzios S, Barberaki M, Tourgelis P, Aivalakis G, Volioti A. Preliminary evaluation on somaclonal variation for the *in vitro* production of new toxic proteins from *Viscum album* L. *J Herbs, Spices & Medicinal Plants* 2002; **9**: 217-22.
- Klein-Szanto AJP, Slaga TJ. (1982), Effects of peroxides in rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. *J Invest Dermatol* 1982; **79**: 30.
- Klopp R, Schmidt W, Niemer W, Werner M, Beuth J. Changes in immunological characteristics of white blood cells after administration of standardized mistletoe extract. *In Vivo* 2001; **15**(6): 447-57.
- Konopa J, Woynarowski JM, Lewandowska-Gumieniak M. (1980), Isolation of viscotoxins, cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1980; **361**: 1525-33.
- Korytowski W, Bachowski G, Geiger P, Lin F, Zhao G, Girotti A. Selenoperoxidase-dependent glutathione cycle activity in peroxide-challenged leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1267**: 31-40.
- Kourmanova AG, Soudarkina OJ, Olsnes S, Kozlov JV. Cloning and characterization of the genes encoding toxic lectins in mistletoe (*Viscum album* L). *Eur J Biochem* 2004; **271**(12): 2350-60.
- Kovacs E. Effects of *Viscum album* extract therapy in patients with cancer: relation with interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor, and soluble gp130. *J Altern Complement Med* 2004; **10**(2): 241-6.



- Kovačević Z. *Praktična biohemija i molekularna biologija*. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, 1994.
- Kovačević Z. *Maligne neoplazme*. Novi Sad: Srpska akademija nauka i umetnosti, Ogranak u Novom Sadu, 2006.
- Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan C. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991; **174**: 761-7.
- Lavastre V, Cavalli H, Rathe C, Girard D. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 2001; **137**(2): 272-8.
- Lee YJ, Galaforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. (1998), Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in nitrogen-activated protein kinase deprivation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; **273**(9): 5294-9.
- Lepran I, Lefer AM. Protective actions of propyl-gallate: a lipoxygenase inhibitor, on the ischemic myocardium. *Circulation* 1985; **15**: 79-88.
- Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by the flavin-3,3'-digallate and propylgallate. *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 2736-43.
- Lorch E. Neue Untersuchungen über Flavonoide in *Viscum album* ssp. *abietis*, *album* und *austriacum*. *Z Naturforsch* 1993; **48c**: 105-7.
- Loven DP, Oberley LW, Rousseau FM, Stevens RH. Superoxide dismutase activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1980; **65**: 337-81.
- Luczkiewich M, Cisowski W, Kaiser P, Ochocka R, Piotrowski A. Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Pol Pharm* 2001; **58**(5): 373-9.
- Lyu SY, Choi SH, Park WB. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch Pharm Res* 2002; **25**(1): 93-101.
- Mabed M, El-Helw L, Shamaa S. Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; **90**(1): 65-9.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 323-50.
- Maier G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts *in vitro*. *Anticancer Drugs* 2002; **13**(4): 373-9.
- Maksimović Z, Malenčić Đ, Kovačević N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology* 2005; **96**: 873-7.

- Mansky PJ, Grem J, Wallerstedt DB, Monahan BP, Blackman MR. Mistletoe and gemcitabine in patients with advanced cancer: a model for the phase I study of botanicals and botanical-drug interactions in cancer therapy. *Integr Cancer Ther* 2003; **2**(4): 345-52.
- Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* 2002; **2**:315-319.
- Matsuda H, Marikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M. Structure requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003; **11**: 1915-2000.
- Matsuo M. Age-related alterations in antioxidant defense. In: Yu BP. ed. *Free Radicals in Aging*. Boca Raton: CRC Press, 1993: 144-6.
- Mayer DC, Strada JC, Hanson A, Artman M. Effect of hemorrhagic shock and retransfusion on catalase and superoxide dismutase activities in rabbits. *Circulatory Shock* 1992; **36**: 147.
- McCormick ML, Oberley TD, Elwell JH, Oberley LW, Sun Y, Li JJ. Superoxide dismutase and catalase levels during estrogen-induced renal tumorigenesis, in renal tumors and their autonomous variants an the Syrian hamster. *Carcinogenesis* 1991; **12**: 977.
- Middleton E. Biological Properties of Plant Flavonoids: An Overview. *International Journal of Pharmacognosy* 1996; **34**: 344-8.
- Miwa-Nishimura N, Kanaide H, Abe S, Nakamura M. Does allopurinol prevent myocardial injury as a result of hypoxia-re-oxygenation in rats? *Int J Exp Path* 1990; **71**: 723-39.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; **43**: 109-42.
- Moraes EC, Keyse SM, Tyrell RM. Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment in mamalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 263.
- Mukai HF, Goldstein BD. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science* 1976; **191**: 868-9.
- Myers MA, Mc Phail LC, Snyderman R. Redistribution of protein kinase C activity in human monocytes: correlation with activation of the respiratory burst. *J Immunol* 1985; **135**: 3411-16.
- Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Avino J, Perez P, Estrela JM. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth *in vivo*. *Free Rad Biol Med* 1999; **26**: 410-8.
- Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1994; **16**: 279-88.
- Niederau C, Erhardt A, Haussinger D, Stohmeyer G. Haemochromatosis and the liver. *J Hepatology* 1999; **30**: 6-11.
- Noronha-Dutra AA, Epperlein MM, Woolf N. Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic single oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett* 1993; **321**: 59-62.

- Oberley TD. Oxidative damage and cancer. *Am J Pathol* 2002; **160**: 403-408.
- Oberley LW, Oberley TD. Free radicals, cancer and aging. In: Johnson ED. ed. *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*. New York: Alan R. Liss, 1986: 325.
- Oberley TD, Oberley LW. Oxygen radicals and cancer. In: Yu BP. ed. *Free Radicals in Aging*. Boca Raton: CRC Press, 1994: 247-269.
- Oberley TD, Allen RG, Schultz JL, Lauchner LJ. Antioxidant enzymes and steroid-induced proliferation of kidney tubular cells. *Free Radical Biol Med* 1991; **10**: 79.
- Ochocka JR, Piotrowski A. Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.). *Can J Plant Pathol* 2002; **24**: 21-8.
- O'Connell JF, Klein-Szanto AJP, DiGiovanni DM, Fries JW, Slaga TJ. Enhanced malignant progression of mouse skin tumors by the free-radical generator benzoyl peroxide. *Cancer Res* 1986; **46**: 2863.
- Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilbert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; **25**: 1057-65.
- Oliveira CPMS, Faintuch J, Rascovski A, Furuya CK et al. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) – preliminary findings. *Obesity Surgery* 2005; **15**(4): 502-5.
- Orru S, Scaloni A, Giannattasio M, Urech K, Pucci P, Schaller G. Aminoacid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Biol Chem* 1997; **378**: 989-96.
- Ozcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J Food Sci* 2003; **68**: 487-90.
- Pacelli R, Taira J, Cook JA, Wink DA, Krishna MC. (1996), Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide. *Lancet*; **347**: 900-6.
- Pacifici RE, Davies KJA. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991; **37**: 166.
- Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P, Dianzani MU. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1(I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Com* 1993; **194**: 1044-50.
- Perchelett JP, Abney NL, Thomas RM, Guislain YL, Perchelett EM. Effects of combined treatments with selenium, glutathione and vitamin E on glutathione peroxidase activity, ornithine decarboxylase induction and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Cancer Res* 1987; **47**: 477-82.
- Peumans WJ, Verhaert P, Pfuller U, Van Damme EJ. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album* L.). *FEBS Lett* 1996; **396**: 261-5.

- Pevzner IB, Agapov II, Niwa H, Maluchenko NV, Moisenovich MM, Pfuller U, Tonevitsky AG. Differences in amino acid sequences of mistletoe lectin I and III B-subunits determining carbohydrate binding specificity. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1675**(1-3): 155-64.
- Piette J. Role of oxidative stress in transcription factor NF-kB activation by interleukin-I. *Clin Chem Lab Med* 1999; **37**: 83.
- Popović M, Malenčić Đ. *Aktivni principi ukrasnog bilja*, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, 2006: 124-71.
- Popović M, Jakovljević V, Mimica-Dukić N, Kaurinović B, Čebović T. Effects of different extracts of *Hypericum perforatum* L. on the CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Oxidation Communications* 2002; **25**(2): 273-8.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986; **25**: 223-30.
- Proksch P, Rodriguez E. Baja California-Ein Modell für chemooekologische Adaptationen von Wustpflanzen. *Biologie in unserer Zeit* 1985; **15**: 75-80.
- Ranaivo HR, Rakotoarison O, Tesse A, Schott C, Randriantsoa A, Lobstein A, Andriantsitohaina R. *Cedrelopsis grevei* induced hypotension and improved endothelial vasodilatation through an increase of Cu/Zn SOD protein expression. *Am J Physiol Heart Cric Physiol* 2004; **286**: H775-81.
- Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002; **40**: 1213-32.
- Rechner A. Influence of processing techniques on polyphenols and antioxidative capacity of apple and berry juices. Disertacija. University of Giessen, 2000.
- Reiners JJJr, Thai G, Rupp T, Cantu AR. Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Quantitation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase. *Carcinogenesis* 1991; **12**: 2337.
- Rice-Evans CA, Burdon RH. eds. *Free Radical Damage and its Control*. Elsevier Science B.V., 1994.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Barmley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995; **22**: 375-83.
- Ripple MO, Henry WF, Rago RP, Wildin G. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma C. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 40-8.
- Robertson FM, Bearis AJ, Oberyszyn TM, O'Connell SM, Dokidos A, Laskin DL, Laskin JD, Reiners JJJr. Production of hydrogen peroxide by murine epidermal keratinocytes following treatment with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1990; **58**: 6062.

- Romagnoli S, Fogolari F, Catalano M, Zetta L, Schaller G, Urech K, Giannattasio M, Ragona L, Molinari H. NMR solution structure of viscotoxin C1 from *Viscum album* species *Coloratum ohwi*: toward a structure-function analysis of viscotoxins. *Biochemistry* 2003; **42**(43): 12503-10.
- Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschop K, Haendler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo*. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6823-6.
- Roy D, Liehr JG. Changes in activities of free radical detoxifying enzymes in kidneys of male Syrian hamsters with estradiol. *Cancer Res* 1989; **49**: 1475.
- Rutkowski L. *Klucz do oznaczania roslin naczyniowych Polski nizowej*, Warszawa: Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, 1998.
- Salgo MD. *et al*. Plasma TAS in various diseases. Abstract from MEDLAB, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Basel: 1997; poster A11.
- Sandoval M, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW264,7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 1997; **22**(3): 489-95.
- Schaller G, Urech K, Grazi G, Giannattasio M. Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. *Planta Med* 1998; **64**: 677-8.
- Schrader-Fisher G, Apel K. cDNA-derived identification of novel thionin precursors in *Viscum album* that contain highly divergent thionin domains but conserved signal and acidic polypeptide domains. *Plant Mol Biol* 1993; **23**: 1233-42.
- Schulte-Hermann R, Ochs H, Bursch W, Parzefall W. Quantitative structure-activity studies on effects of 16 different steroids on growth and monooxygenases of rat liver. *Cancer Res* 1988; **48**: 2462-8.
- Seis H. ed. *Antioxidants in disease mechanism and therapy, Advances in Pharmacology*. London: Publ. Academic Press, 2002: 38.
- Sharma K, Danoff TM, De Piero A, Ziyadeh FN. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **207**(1): 80-8.
- Sharrer T. HeLa herself. *The Scientist* 2006; **20**: 7-22.
- Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovics B. Study of metabolism enzymes during the development of phaseous vulgaris. *Biochem And Physiol Pflanz* 1974; **166**: 389-93.
- Singh RP, Banerjee S, Kumar PVS, Raveesha KA, Rao AR. *Tinospora cordifolia* induces enzymes of carcinogen/drug metabolism and antioxidant system, and inhibits lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine* 2006; **13**: 74-84.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; **222**(2): 1-15.
- Slyshenkov VS, Rakowska M, Moiseenok AG, Wojtczak L. Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 1995; **19**(6): 767-72.

Slyshenkov VS, Moiseenok AG, Wojtaczak L. Noxious effects of oxygen reactive species on energy-coupling processes in Ehrlich ascites tumor mitochondria and the protection by panthotenic acid. *Free Rad Biol Med* 1996; **20**(6): 793-800.

Smuckler EA. Structural and functional changes in acute liver injury. *Environmental Health Perspectives* 1976; **15**: 13-25.

Son K, Kim YM. *In vivo* cisplatin-exposed macrophages increase immunostimulant-induced nitric oxide synthesis for tumor cell killing. *Cancer Res* 1995; **55**: 5524-7.

Sowell J, Frei B, Stevens JF. Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: structural characterization and detection in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 17964-9.

Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. Uputstva za vežbe iz medicinske biohemije za studente farmaceutskog fakulteta. Beograd, 2000: 147-57.

Stadtman ER. Covalent modification reactions are making steps in protein turnover. *Biochemistry* 1990; **29**: 6323.

Stirpe F, Barbieri L, Batteli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* 1992; **10**: 405-12.

Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide in macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumour target cells. *J Exp Med* 1989; **169**: 1543-55.

Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1990; **8**(6): 583-99.

Szafer W, Kulczynski S, Pawlowski B. *Rosilny Polskie*, Krakow: Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, 1967.

Tew, K.D. (1994), Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res.*, **54**, 4313-4320.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**(5203): 1456-62.

Timoshenko AV, Lan Y, Gabius HJ, Lala PK. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination. Effects on tumor growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. *Eur J Cancer* 2001; **37**(15): 1910-20.

Tomas-Barberan FA, Msonthi JD, Hostettmann K. Antifungal epicuticular fully methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry* 1988; **27**: 753-5.

Tonevitsky AG, Agapov II, Pevzner IB, Malyuchenko NV, Moisenovich MM, Pfueller U, Kirpichnikov MP. Cloning and expression of catalytic subunit of MLIII, the ribosome-inactivating protein from *Viscum album*. *Biochemistry (Mosc)* 2004; **69**(6): 642-50.

Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, Fang NR, Ozeki M, Akatsuka S, Hiai H, Aruoma OI, Bahorun T. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extract on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Rad Res* 2003; **37**: 1215-24.

Tucakov J. *Lečenje biljem*, Beograd: Rad, 1997.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. eds. *Flora Europaea*, Cambridge: The University Press, 1964.

Urech K, Schaller G, Ziska P, Giannattasio M. Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture. *Phytother Res* 1995; **9**: 49-55.

Urech K, Scher JM, Hostanska K, Becker H. Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L. *J Pharm Pharmacol* 2005; **57**(1): 101-9.

Valdez LB, Arnaiz SL, Bustamante J, Alvarez S, E Costa L, Boveris A. Free radical chemistry in biological systems. *Biological Research* 2000; **33**(2): 127-36.

Vaughan M. Oxidative modification of macromolecules minireviews series. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18513-7.

Wacker R, Stoeva S, Betzel C, Voelter W. Complete structure determination of N-acetyl-D-galactosamine-binding mistletoe lectin-3 from *Viscum album* L. album. *J Pept Sci* 2004; [Epub ahead of print]

Watts RN, Richardson DR. Differential effects on cellular iron metabolism of the physiologically relevant diatomic effector molecules, NO and CO, that bind iron. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1692**(1): 1-15.

Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *Pharmacology* 2000; **294**: 396-401.

Wenzel-Seifert K, Lentzen H, Seifert R. In U-937 promonocytes, mistletoe lectin I increases basal  $[Ca^{2+}]_i$ , enhances histamine  $H_1$ - and complement C5a-receptor-mediated rises in  $[Ca^{2+}]_i$ , and induces cell death. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; **355**: 190-7.

Wester F, Nienhaus J. (1965), Kanzerostatische Orotein-Komponenten aus *Viscum album*. *Experientia* 1965; **21**(4): 197-9.

Wettstein D. Chlorophyll patale und der submikroskopische formwechsel der plastiden. *Exp Cell Research* 1957; **12**: 427-37.

Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; **64**: 365-91.

Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1998; **25**: 434-56.

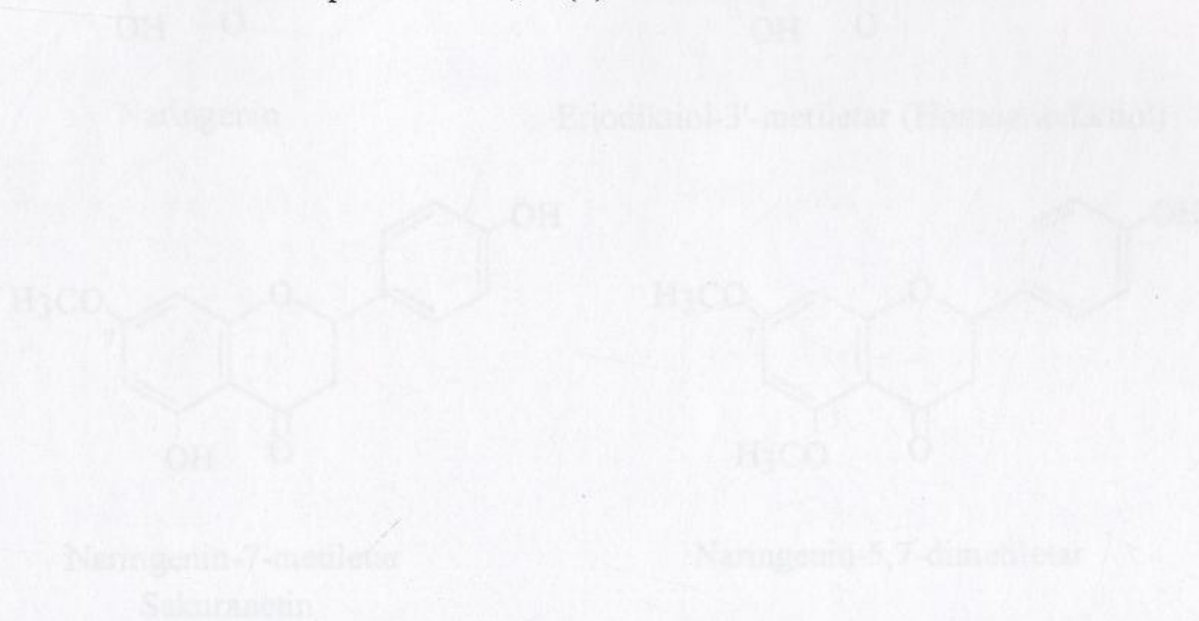
Winter ML, Liehr JG. Free radical-induced carbonyl content in protein of estrogen-treated hamsters assayed by sodium borohydride reduction. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14446.

Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; **93**: 440-7.

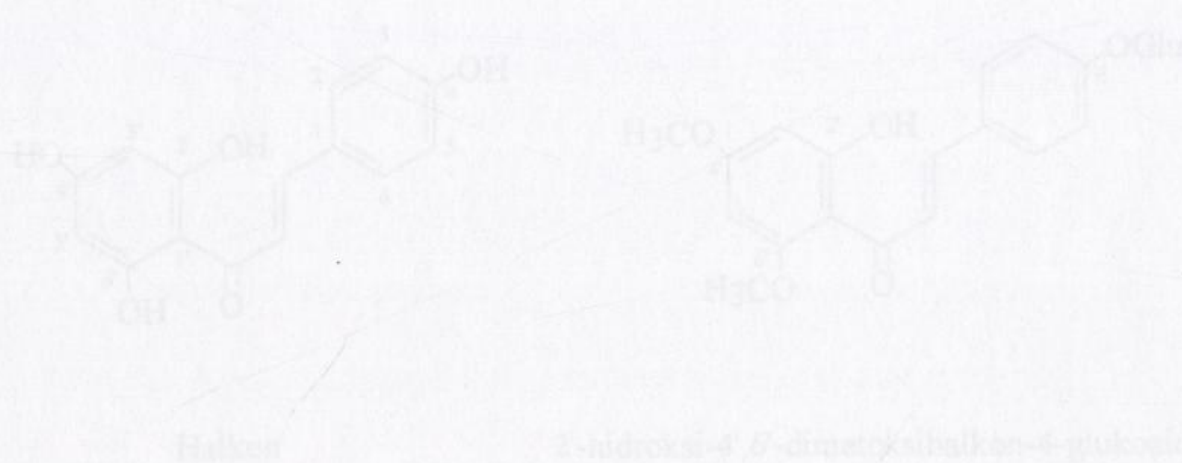
Wollenweber E, Wieland A, Haas K. Epicuticular waxes and flavonol aglycones of the European mistletoe, *Viscum album* L. *Z Naturforsch* 2000b; **55c**: 314-7.

Wood EJ. *Practical biochemistry for colleges*. Oxford: Pergamon Press, 1989.

Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, Sabolovic S, Konitzer M, Mang S. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; **16**(1): 55-62.



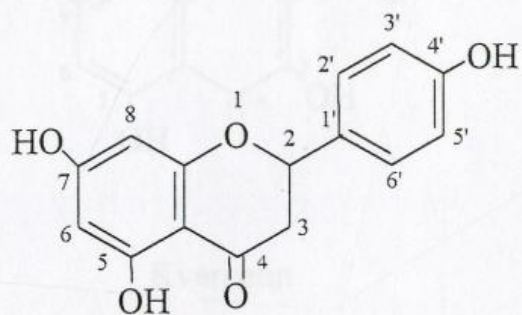
Slika 9.1. Naringenin i njegovi derivati detektovani u *Viscum album* L.



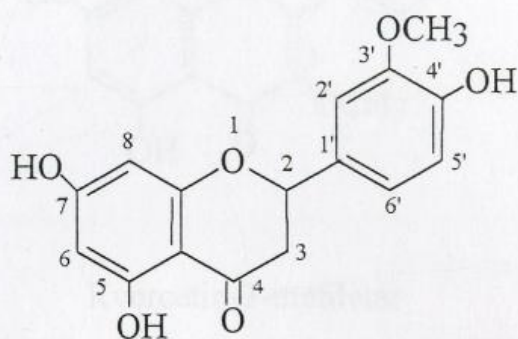
Slika 9.2. Halkan i njegov glikozid detektovani u *Viscum album* L.



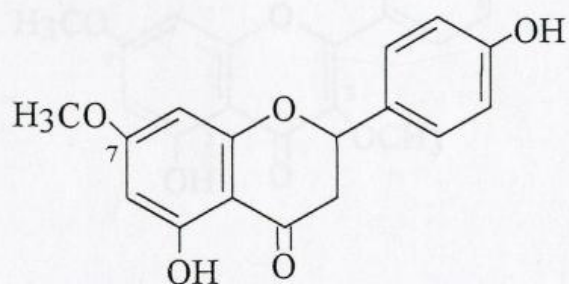
## 9. PRILOG



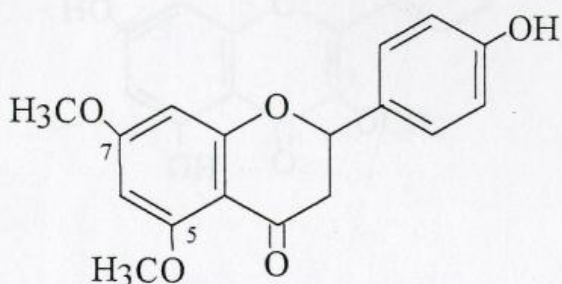
Naringenin



Eriodiktiol-3'-metiletar (Homoeriodiktiol)

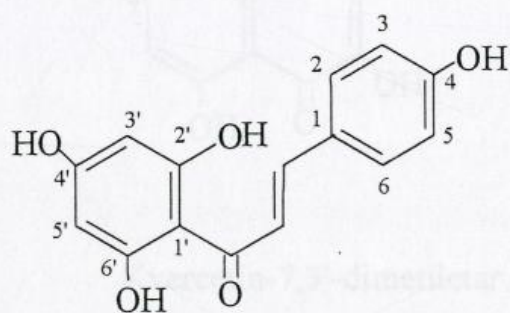


Naringenin-7-metiletar  
Sakuranetin

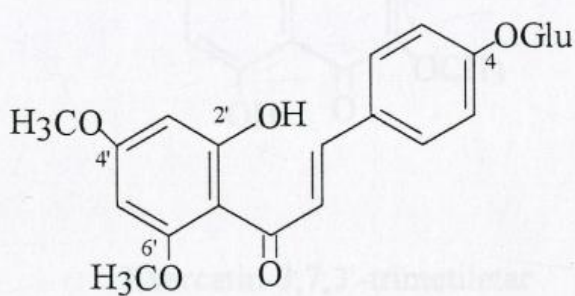


Naringenin-5,7-dimetiletar

Slika 9.1. Naringenin i njegovi derivati detektovani u *Viscum album* L.

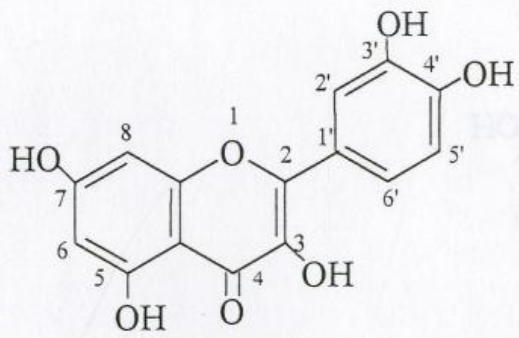


Halkon

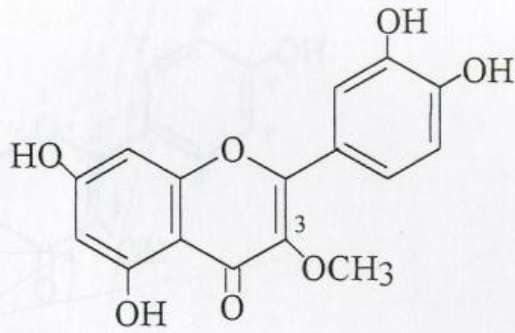


2'-hidroksi-4',6'-dimetoksihalkon-4-glukozid

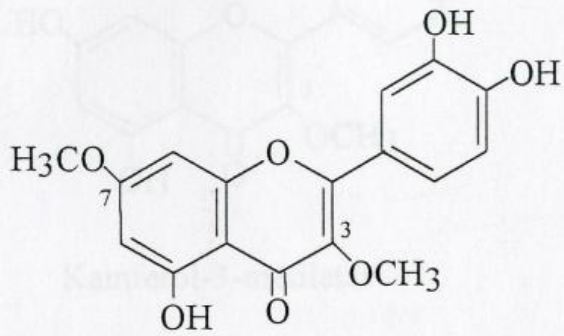
Slika 9.2. Halkon i njegov glukozid detektovan u *Viscum album* L.



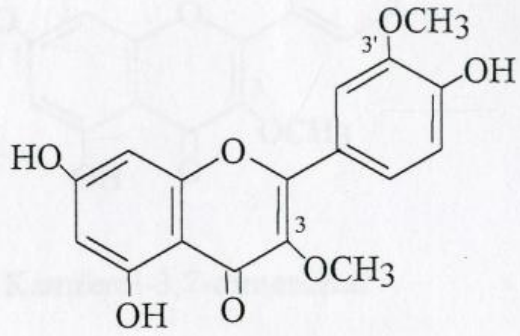
Kvercetin



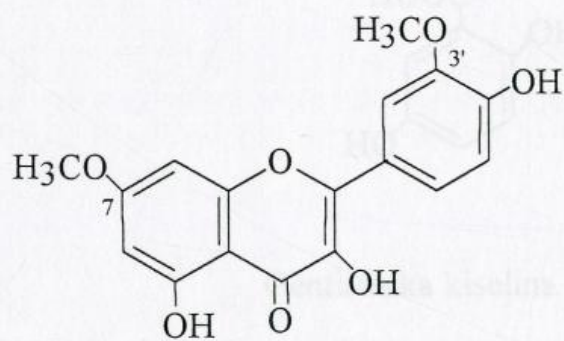
Kvercetin-3-metiletar



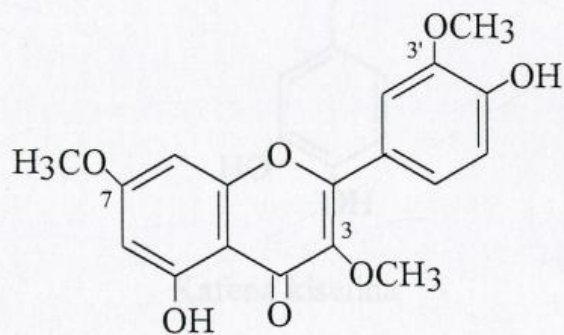
Kvercetin-3,7-dimetiletar



Kvercetin-3,3'-dimetiletar

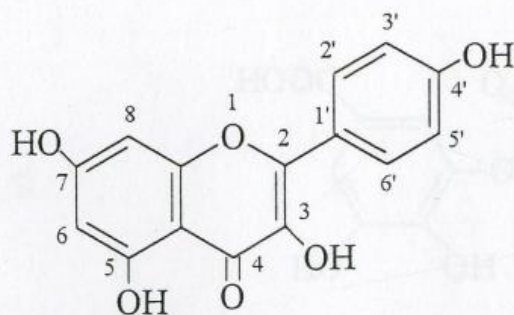


Kvercetin-7,3'-dimetiletar

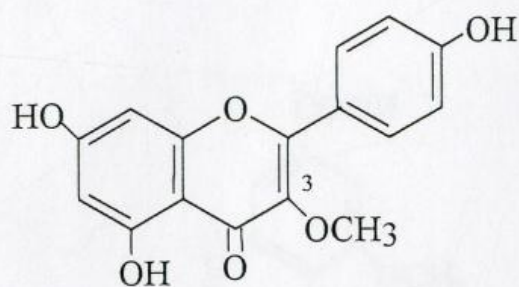


Kvercetin-3,7,3'-trimetiletar

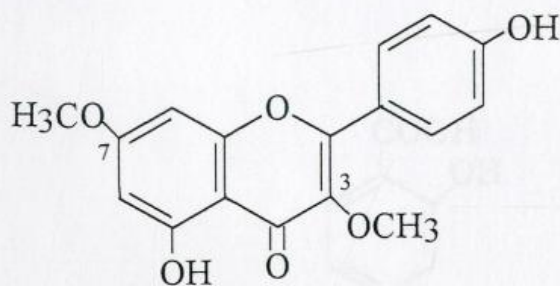
Slika 9.3. Kvercetin i njegovi derivati detektovani u *Viscum album* L.



Kamferol

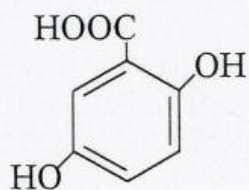


Kamferol-3-metiletar

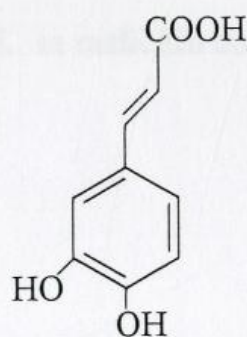


Kamferol-3,7-dimetiletar

Slika 9.4. Kamferol i njegovi derivati detektovani u *Viscum album* L.

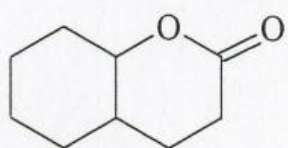


Gentisinska kiselina

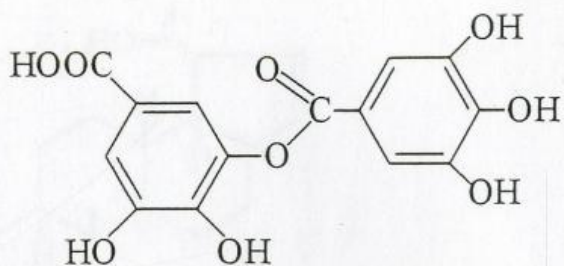


Kafena kiselina

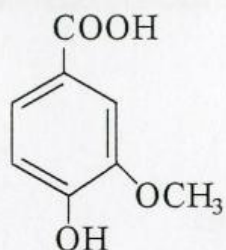
Slika 9.5. Fenilkarboksilne kiseline detektovane u *Viscum album* L.



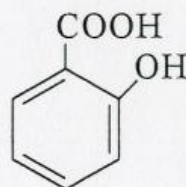
Lakton o-kumarinske kiseline



Digalna kiselina

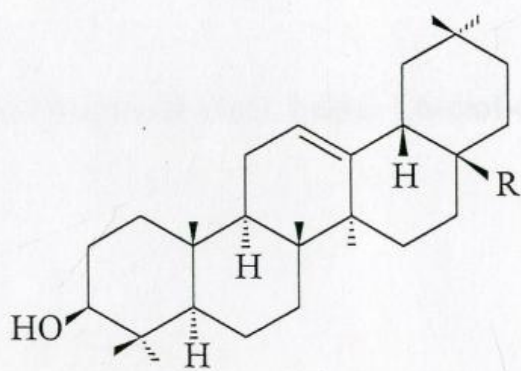


Vanilna kiselina  
(4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina)

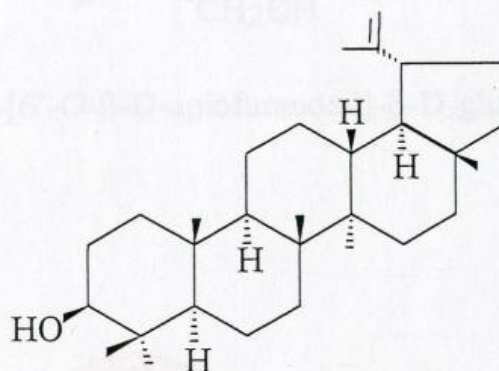


Salicilna kiselina  
(2-hidroksibenzojeva kiselina)

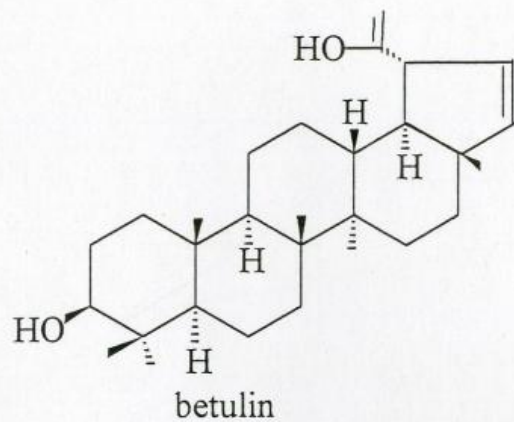
Slika 9.6. Fenolne kiseline detektovane u *Viscum album* L. sa različitih domaćina



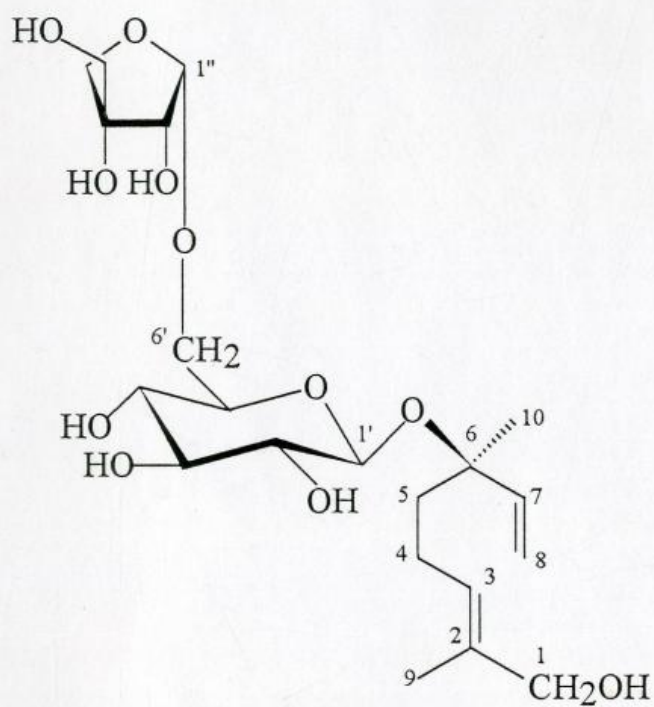
R=CH<sub>3</sub>, β-amirin  
R=COOH, Oleanolna kiselina



Lupeol



Slika 9.7. Neki triterpenoidi detektovani u *Viscum album* L.



Slika 9.8. 2,6-dimetilokta-2,7-dien-1,6-diol-6-O-[6'-O- $\beta$ -D-apiofuranozil]- $\beta$ -D-glukopiranozid



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а ТАТЈАНА Н. ЋЕБОВИЋ

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА ИМЕЛЕ (VICUM ALBUM L.) СА РАЗЛИЧИТИХ  
ДОЗАБИНА НА СТВАРАЊЕ СЛОБДНИХ РАДИКАЛА КИСЕОНИКА И АКТИВНОСТ  
АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМА

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.10.2013.

Татјана Себоић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА ИМЕЛЕ (VISCUM ALBUM L.) СА РАЗЛИЧИТИХ ДОЗАТИ НА НА СТВАРАЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА КИСЕОНИКА И АКТИВНОСТ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМА

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

у Београду, 24.10.2013.

д-р Тања Савица

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.