

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Stefana D. Cvetković

ANTIMIKROBNI I ANTIGENOTOKSIČNI EFEKAT  
EKSTRAKATA LINCURE (*Gentiana lutea* L.)  
GAJENE U PLANTAŽNIM I LABORATORIJSKIM  
USLOVIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Stefana D. Cvetković

ANTIMICROBIAL AND ANTIGENOTOXIC  
EFFECT OF EXTRACTS OF YELLOW GENTIAN  
(*Gentiana lutea* L.) GROWN IN FIELD AND IN  
LABORATORY CONDITIONS

Doctoral disertation

Belgrade, 2021

## MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

### **Mentor:**

**dr Biljana Nikolić**, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

### **Članovi komisije:**

**dr Branislav Nastasijević**, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „VINČA“,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Slađana Todorović**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Branka Vuković-Gačić**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

**dr Dragana Mitić-Ćulafić**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Najveći deo ove doktorske disertacije urađen je na Katedri za Mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta, dok su određeni delovi rađeni u Laboratoriji za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu – Instituta za nuklearne nauke „VINČA“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju; na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Univerziteta u Beogradu – Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju; na Departmanu za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu, Prirodno-matematičkog fakulteta; na Katedri za tehnološku mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu – Poljoprivrednog fakulteta. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su zahvaljujući nacionalnom projektu OI 172058 „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Ovom prilikom želim da se zahvalim....*

*Mentoru prof. dr Biljani Nikolić za svo preneto znanje tokom poslednjih šest godina. Hvala Vam na velikoj stručnosti, ukazanom poverenju, brojnim savetima i idejama i prilici da zajedno savladamo sve prepreke, kako bi ova doktorska disertacija „ugledala svetlost dana“. Hvala Vam na požrtvovanosti i podršci tokom saradnje.*

*Dr Branislavu Nastasijeviću, na velikoj pomoći prilikom hemijske analize i pripreme ekstrakata Gentiana lutea, tumačenju rezultata, korisnim savetima tokom pisanja i finalnog oblikovanja teze.*

*Dr Slađani Todorović, na pripremi in vitro gajene Gentiana lutea, pomoći oko analiziranja rezultata, stručnim i korisnim sugestijama i dragocenim savetima prilikom finalne obrade disertacije.*

*Prof. dr Branki Vuković-Gačić, na prenetom znanju tokom studiranja, korisnim savetima, diskusijama i kritičkoj oceni doktorske disertacije.*

*Dr Dragani Mitić-Ćulafić, na pomoći i savetima prilikom izvođenja mnogih eksperimenata, dragocenim sugestijama prilikom pisanja i finaliziranja ove disertacije. Hvala Vam na prijateljskom odnosu i saradnji tokom svih ovih godina.*

*Profesorima Katedre za Mikrobiologiju dr Slaviši Stanković, dr Jeleni Knežević-Vukčević i dr Tanji Berić na ukazanom poverenju, pruženom znanju, stručnim savetima, odličnoj saradnji i kolegijalnom odnosu.*

*Dini Tenji na pomoći oko RT-PCR analize, stručnim i prijateljskim savetima i druženju. Prof. dr Aniti Klaus i dr Jovani Vunduk na pomoći u izradi testova antioksidativnosti. Dr Tatjani Marković i Dr Dragoji Radanović sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ na ustupljenom biljnom materijalu.*

*Mojim dragim kolegama Stefani Đukanović, dr Bojani Vasiljević, dr Marini Jovanović, dr Tamari Janakiev, dr Olji Stanojević, Tamari Pavlović, Tei Ganić, Nini Tomić, Jeleni Đorđević, Jovani Jovanović Marić, dr Ivanu Nikolić, dr Ivici Dimkić, dr Stoimiru Kolarević na korisnim profesionalnim savetima, prijateljskoj atmosferi i druženju na Katedri i van nje.*

*Mojim roditeljima, bratu i mom Joci na neiscrpoj podršci, безусловnoj ljubavi i veri u mene.*

*Mojim roditeljima*

## Antimikrobni i antigenotoksični efekat ekstrakata lincure (*Gentiana lutea* L.) gajene u plantažnim i laboratorijskim uslovima

### SAŽETAK

Lincura (*Gentiana lutea*) je značajna medicinska biljka koja se zbog ugroženosti gaji plantažno, a u ovom radu je uspešno odgajena i u *in vitro* kulturi. Pripremljeni su metanolni i 50%-etanolni ekstrakti korena i lista/izdanka i ispitane su antimikrobne i antigenotoksične aktivnosti. UPLC-PDA MS/MS analiza je pokazala da je genciopikrozid najdominantniji u svim ekstraktima korena, kao i u ekstraktu izdanka *in vitro* gajene biljke, dok su u ekstraktima listova plantažnih biljaka najprisutniji homoorientin, izoviteksin i loganska kiselina. Veći prinos sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida je zabeležen za ekstrakte nadzemnih delova. MIK vrednosti su ukazale da su *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* najosetljivije na ekstrakte *in vitro* biljke (0,156-0,625 mg mL<sup>-1</sup>), a *L. monocytogenes* na konstituente (15,6-250 µg mL<sup>-1</sup>). Sprečavanje formiranja biofilma *L. monocytogenes* je najuspešnije kada su primenjeni ekstrakti plantažnih biljaka, homoorientin i izoviteksin (inhibicija 58-90%). Rezultati SOS/*umuC* testa ukazuju na antigenotoksični efekat ekstrakata prema PhIP mutagenu (inhibicija do 85%). Alkalni komet test na HepG2 ćelijama ukazuje na značajnu redukciju IQ- i PhIP-indukovanih DNK oštećenja ekstraktima, genciopikrozidom i mangiferinom (inhibicija do 78%). Isti test na MRC-5 i Hs 294T ćelijama pokazuje jak UV-protektivni efekat svih ekstrakata (inhibicija do 78%). Bolja antioksidativna aktivnost je zabeležena za ekstrakte nadzemnih delova *G. lutea* u svim testovima. Odabrani ekstrakti i konstituenti su povećali ekspresiju *Nrf2* gena i uspešno doprineli regeneraciji redukovane forme glutaciona u HepG2 ćelijama. Dobijeni rezultati preporučuju ekstrakte lincure za dalju analizu, u cilju dobijanja potencijalnih dijetetskih suplemenata i UV-protektivnih agenasa.

**Ključne reči:** *Gentiana lutea*, *in vitro* gajenje, antimikrobna aktivnost, mutageni iz hrane, UV zračenje, antigenotoksičnost, antioksidativna aktivnost, Nrf2 transkripcioni faktor, glutation;

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biologija mikroorganizama/Genotoksikologija

## Antimicrobial and antigenotoxic effect of extracts of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) grown in field and in laboratory conditions

### ABSTRACT

Yellow gentian (*Gentiana lutea*) is an important medicinal plant that is grown in field due to endangerment. In this work it was successfully grown in *in vitro* culture, too. Methanolic and 50% ethanolic root and leaf/shoot extracts were prepared and antimicrobial and antigenotoxic activities were examined. UPLC-PDA MS/MS analysis showed that gentiopicroside was the most dominant in the root and *in vitro* shoot extracts, while homoorientin, isovitexin and loganic acid were the most present in plantation leaf extracts. A higher yield of total polyphenols and flavonoids was recorded for the leaf/shoot extracts. MIC values pointed at *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* as the most sensitive to the treatment with *in vitro* extracts (0.156-0.625 mg mL<sup>-1</sup>), and at *L. monocytogenes* in the case of constituents (15.6-250 µg mL<sup>-1</sup>). *L. monocytogenes* biofilm formation was highly inhibited by plantation extracts, homoorientin and isovitexin (inhibition 58-90%). The results of the SOS/*umuC* assay indicated antigenotoxic effect of all gentian extracts against PhIP mutagen (inhibition up to 85%). The alkaline comet assay on HepG2 cells showed remarkable reduction of IQ- and PhIP-induced DNA damage by extracts, gentiopicroside and mangiferin (inhibition up to 78%). The same assay on MRC-5 and Hs 294T cells pointed out strong UV-protective effect of all the extracts (inhibition up to 78%). Higher antioxidative activity was recorded for leaf/shoot extracts in all applied assays. Selected extracts and constituents up-regulated the expression of *Nrf2* gene and successfully contributed to protection against glutathione depletion in HepG2 cells. Results obtained recommend gentian extracts for further analysis in order to obtain potential dietary supplements and UV-protective agents.

**Key words:** *Gentiana lutea*, *in vitro* cultivation, antimicrobial activity, food mutagens, UV radiation, antigenotoxicity, antioxidative activity, Nrf2 transcription factor, glutathione;

**Scientific field:** Biology

**Scientific sub-field:** Biology of microorganisms/Genotoxicology

## **Spisak skraćenica i oznaka korišćenih u radu:**

4NQO – 4-Nitrohinolin 1-oksidi  
(6-4)-PP – pirimidin-pirimidon (6-4) fotoprodukti  
ARE – antioksidativni elementi odgovora (eng. *antioxidant response elements*)  
ATCC – eng. *American Type Culture Collection*  
B[a]p – benzo[a]piren  
BAP – 6-benzilaminopurin  
BHA – butil hidroksianazol  
BHT – butil hidroksitoluen  
CPD – ciklobutan-pirimidin dimeri  
CUPRAC – eng. *cupric reducing antioxidant capacity*  
DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikal  
DMSO – dimetil sulfoksid  
EC<sub>50</sub> – efektivna koncentracija test supstance na kojoj je neutralisano 50% DPPH radikala, helirano 50% jona gvožđa, odnosno na kojoj je apsorbancija 0,5 u CUPRAC i FRAP testovima  
eDNK – ekstracelularna DNK  
ECACC – eng. *The European Collection of Authenticated Cell Cultures*  
EPS – ekstracelularne polimerne supstance  
ESI – elektrosprej jonizacija (eng. *electrospray ionization*)  
FRAP – eng. *ferric-reducing power assay*  
G – stopa rasta bakterija (eng. *growth ratio*)  
GLK 50% EtOH – 50% vodeno-etanolni ekstrakt korena plantažno gajene lincure  
GLL 50% EtOH – 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista plantažno gajene lincure  
GLK MeOH – metanolni ekstrakt korena plantažno gajene lincure  
GLL MeOH – metanolni ekstrakt lista plantažno gajene lincure  
GLvI MeOH – metanolni ekstrakt izdanka *in vitro* gajene lincure  
GLvK MeOH – metanolni ekstrakt korena *in vitro* gajene lincure  
GSH – redukovani glutation  
GSSG – oksidovani glutation  
GST – glutation-S-transferaza  
HAA – heterociklični aromatični amini  
HepG2 – ćelije hepatocelularnog karcinoma  
Hs 294T – ćelije melanoma  
IAA – indol-3-sirćetna kiselina  
IARC – Međunarodna agencija za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer*)  
ICI – Međunarodna komisija za osvetljenje (eng. *International Commission on Illumination*)  
IR – stopa indukcije (eng. *induction rate*)  
IQ – 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]hinolin  
LP – lipidna peroksidacija  
MBK – minimalna bakteriocidna koncentracija  
MDA – malondialdehid  
MeIQ – 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]hinolin  
MeIQx – 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]hinoksalin  
MIK – minimalna inhibitorna koncentracija  
MRC-5 – normalni fetalni fibroblasti pluća  
MRM – Multipli reakcioni monitoring (eng. *Multiple Reaction Monitoring*)

MTT – 3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid  
NAA – 2-(1-Naftil)sirćetna kiselina  
NAT – acetiltransferaza  
NER – nukleotidna eksciziona reparacija  
Nrf2 – eng. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*  
ONPG – O-nitrofenil- $\beta$ -galaktopiranozid  
ONP – orto-nitrofenol  
PhIP – 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin  
PIA – polisaharidni intercelularni adhezini  
PDA – eng. *Photodiode Array*  
QS – eng. *Quorum Sensing*  
RNS – reaktivne vrste azota (eng. *Reactive Nitrogen Species*)  
ROS – reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*)  
SCGE – elektroforeza pojediničanih ćelija (eng. *Single Cell Gel Electrophoresis*)  
SULT – sulfotransferaza  
TBA – tiobarbiturna kiselina  
TIC – hromatogrami ukupne jonske struje (eng. *total ion chromatograms*)  
UGT – UDP-glukuronil transferaza  
UPLC – ultra efikasna tečna hromatografija  
UV – ultraljubičasto zračenje  
WHO – Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)



## SADRŽAJ:

1. Uvod.....	1
1.1. Prisustvo mikroorganizama u hrani i problemi rezistencije na konvencionalne antimikrobne agense .....	1
1.1.1. Mehanizmi rezistencije bakterija.....	3
1.1.2. Formiranje biofilma i načini njegove prevencije u prehrambenoj industriji .....	4
1.2. Genotoksikologija – štetne posledice genotoksina i značaj testiranja genotoksičnosti/antigenotoksičnosti.....	6
1.2.1. Mutageni iz hrane .....	8
1.2.1.1. Heterociklični aromatični amini.....	8
1.2.2. UV zračenje kao izvor oštećenja na DNK molekulu .....	11
1.2.2.1. Mehanizmi UV-indukovanih oštećenja .....	12
1.3. Protektivna uloga antioksidanata.....	15
1.4. Biljke kao izvor biološki aktivnih komponenti .....	16
1.4.1. Biljke kao izvor antimikrobnih jedinjenja .....	17
1.4.2. Biljke kao izvor antigenotoksičnih jedinjenja .....	18
1.5. Opšte odlike roda <i>Gentiana</i> .....	19
1.5.1. <i>Gentiana lutea</i> – opšte karakteristike .....	20
1.5.2. Problem ugroženosti <i>G. lutea</i> i alternativna rešenja .....	22
2. Ciljevi istraživanja .....	23
3. Materijal i metode .....	25
3.1. Materijal .....	25
3.1.1. Biljni materijal .....	25
3.1.2. Čista jedinjenja .....	25
3.1.3. Rastvori za testove antioksidativnosti .....	25
3.1.3.1. DPPH test.....	25
3.1.3.2. TBA test .....	25
3.1.3.3. Heliranje jona gvožđa .....	26
3.1.3.4. FRAP test .....	26
3.1.3.5. CUPRAC test.....	27
3.1.4. Biološki materijal.....	28
3.1.4.1. Bakterijski sojevi.....	28
3.1.4.2. Čelijske linije .....	28
3.1.5. Hranljive podloge i rastvori za rad sa bakterijskim kulturama.....	28
3.1.6. Hranljive podloge i rastvori za rad sa humanim čelijskim linijama .....	31
3.1.7. Prajmeri za qRT-PCR.....	33

3.1.8. GSH/GSSG kit.....	33
3.1.9. Mutageni iz hrane i model mutageni .....	33
3.2. Metode.....	34
3.2.1. Gajenje biljaka i priprema ekstrakata .....	34
3.2.1.1. Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture.....	34
3.2.1.2. Priprema biljnih ekstrakata .....	34
3.2.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata .....	35
3.2.2.1. Kvalitativna i kvantitativna UPLC-PDA MS/MS analiza ekstrakata lincure .....	35
3.2.2.2. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida u ekstraktima <i>G. lutea</i> .....	36
3.2.3. Detekcija antioksidativne aktivnosti.....	36
3.2.3.1. Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (DPPH test).....	36
3.2.3.2. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije (TBA test) .....	37
3.2.3.3. Sposobnost heliranja jona gvožđa.....	37
3.2.3.4. Sposobnost redukcije jona gvožđa (eng. <i>Ferric-reducing power assay</i> , FRAP).....	38
3.2.3.5. Sposobnost redukcije jona bakra (eng. <i>Cupric reducing antioxidant capacity</i> , CUPRAC) .....	38
3.2.4. Ispitivanje bioloških aktivnosti na bakterijskim model sistemima.....	38
3.2.4.1. Održavanje i priprema bakterijskih kultura za rad.....	38
3.2.4.2. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija – MIK test.....	39
3.2.4.3. Ispitivanje uticaja ekstrakata i konstituenata <i>G. lutea</i> na formiranje biofilma .....	39
3.2.4.4. Ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata lincure i mutagena iz hrane primenom SOS/ <i>umuC</i> .....	40
3.2.4.5. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure primenom SOS/ <i>umuC</i> .....	41
3.2.5. Ispitivanje bioloških aktivnosti na kulturi sisarskih ćelija.....	42
3.2.5.1. Metode za održavanje i gajenje ćelijskih linija.....	42
3.2.5.1.1. Čuvanje ćelijskih linija-procedura zamrzavanja ćelija.....	42
3.2.5.1.2. Procedura oživljavanja zamrznutih ćelija i gajenje .....	42
3.2.5.1.3. Tripsinizacija ćelija .....	42
3.2.5.1.4. Procena broja i vijabilnosti ćelija primenom tripan plavog .....	42
3.2.5.2. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci primenom MTT metode.....	43
3.2.5.3. Ispitivanje genotoksičnosti primenom alkalnog komet testa .....	43
3.2.5.3.1. Priprema ćelija za ispitivanje genotoksičnosti test supstanci .....	43
3.2.5.3.2. Utvrđivanje genotoksičnih doza UVC i UVA zračenja primenom alkalnom komet testa.....	44
3.2.5.3.3. Alkalni komet test .....	44
3.2.5.4. Ispitivanje antigenotoksičnosti primenom alkalnog komet testa .....	45

3.2.5.4.1. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata i konstituenata lincure prema mutagenima iz hrane .....	45
3.2.5.4.2. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure prema UV zračenju .....	46
3.2.5.5. Praćenje ekspresije Nrf2 transkripcionog faktora kvantitativnom RT-PCR metodom (qRT-PCR).....	46
3.2.5.5.1. Izolacija RNK.....	46
3.2.5.5.2. qRT-PCR.....	47
3.2.5.6. Određivanje sadržaja i odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa.....	47
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	48
4. Rezultati .....	49
4.1. <i>In vitro</i> gajenje <i>G. lutea</i> .....	49
4.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata <i>G. lutea</i> .....	50
4.2.1. UPLC-PDA MS/MS analiza ekstrakata.....	50
4.2.2. Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida.....	54
4.3. Antibakterijska aktivnost ekstrakata <i>G. lutea</i> i njenih konstituenata .....	55
4.3.1. Određivanje minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija ekstrakata i konstituenata <i>G. lutea</i> .....	55
4.3.2. Efekat ekstrakata i konstituenata <i>G. lutea</i> na formiranje biofilma odabranih sojeva.....	57
4.4. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata <i>G. lutea</i> prema IQ i PhIP mutagenima.....	59
4.4.1. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata <i>G. lutea</i> u SOS/ <i>umuC</i> testu.....	60
4.4.1.1. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci na <i>S. typhimurium</i> TA1535 soju .....	60
4.4.1.2. Procena genotoksičnosti test supstanci u SOS/ <i>umuC</i> testu.....	61
4.4.1.3. Procena antigenotoksičnog efekta ekstrakata <i>G. lutea</i> prema PhIP mutagenu u SOS/ <i>umuC</i> testu .....	63
4.4.2. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata <i>G. lutea</i> primenom alkalnog komet testa... ..	65
4.4.2.1. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci na HepG2 ćelijama primenom MTT testa.....	65
4.4.2.2. Procena genotoksičnog potencijala test supstanci na HepG2 ćelijama primenom alkalnog komet testa.....	66
4.4.2.3. Procena antigenotoksičnog efekta ekstrakata i konstituenata <i>G. lutea</i> prema IQ i PhIP mutagenima primenom alkalnog komet testa .....	67
4.5. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata <i>G. lutea</i> prema UV zračenju.....	70
4.5.1. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom MTT testa .....	70
4.5.2. Procena genotoksičnog potencijala ekstrakata na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom alkalnog komet testa .....	71
4.5.3. Odabir neletalnih genotoksičnih doza UVC i UVA zračenja.....	73

4.5.4. Procena antigenotoksičnog efekta ekstrakata <i>G. lutea</i> prema UVC i UVA zračenju .....	74
4.6. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata <i>G. lutea</i> .....	80
4.6.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala .....	80
4.6.2. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije .....	81
4.6.3. Određivanje sposobnosti ekstrakata da heliraju jone gvožđa .....	82
4.6.4. Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP test) .....	84
4.6.5. Određivanje sposobnosti redukcije jona bakra (CUPRAC test).....	85
4.6.6. Uticaj ekstrakata i konstituenata <i>G. lutea</i> na ekspresiju <i>Nrf2</i> gena u HepG2 ćelijama .....	86
4.6.7. Uticaj ekstrakata i konstituenata <i>G. lutea</i> na sadržaj i odnos redukovanog i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG) u HepG2 ćelijama .....	87
5. Diskusija.....	90
6. Zaključci.....	104
7. Literatura .....	106
8. Prilozi .....	123

## 1. Uvod

Veza između čoveka i biljaka je stara koliko i samo postojanje ljudskog roda. Tokom vremena i sa razvojem društva, čovek je naučio da prepoznaje i kategorizuje biljni materijal pogodan za svakodnevnu upotrebu. Ova povezanost između biljaka i ljudi se značajno učvrstila sa početkom korišćenja biljaka i njihovih derivata u lekovite svrhe. Upotreba biljaka i njihovih isceliteljskih moći se može pratiti do najstarijih mitova, tradicija i zapisa, koji svedoče o potencijalu biljaka u ublažavanju bolova i lečenju različitih bolesti (Mamedov, 2012; Shakya, 2016). Najstariji pisani dokazi o korišćenju biljaka za pripremu lekovitih preparata pronađeni su na sumerskoj glinenoj ploči iz Nagpura, čija se starost procenjuje na oko 5000 godina. Sastojali su se od 12 recepata za pripremu lekova od 250 različitih biljnih vrsta i njihovih derivata, uključujući mak, buniku, mandragoru i dr. Najstariji podaci o lekovitim svojstvima korena lincure potiču iz kineske knjige „Pen T'Sao“ koju je napisao car Šen Nung oko 2500. godine pre nove ere (Petrovska, 2012). Fitomedicina je danas široko rasprostranjena u svetu. Godinama unazad, ljudi su se okrenuli upravo prirodnim lekovima za lečenje nekih učestalih blažih oblika bolesti, poput zubobolje, alergija, prehlade, i taj trend nepresteno raste, što dovodi polako do zamene sintetičkih lekova biljnim (Shakya, 2016). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO), oko 70% populacije se oslanja na korišćenje biljaka za svoju primarnu zdravstvenu zaštitu. Na današnjem globalnom tržištu, više od 50 bitnih lekova vodi poreklo od tropskih biljaka (Mamedov, 2012). Od oko 250000 vrsta viših biljaka, samo je 17% naučno istraženo zbog svojih medicinskih svojstava. Hemijska i biološka raznovrsnost biljaka predstavljaju potencijalni neograničeni obnovljivi izvor za razvoj novih farmakološki aktivnih jedinjenja.

Upravo zbog ogromnog potencijala biljaka da poboljšavaju zdravlje ljudi u različitim aspektima, ova doktorska disertacija se bavi ispitivanjem biološke aktivnosti ekstrakata biljne vrste *Gentiana lutea*, široko korišćene u tradicionalnoj medicini. Pre svega, ispitivani su antibakterijski i antigenotoksični efekti ekstrakata kao potencijalnih dijetetskih suplemenata hrani, u borbi protiv bakterijskih kontaminanata, kao i protiv mutagena iz hrane. Dodatno, ovaj rad daje odgovore na pitanja o UV-protektivnom potencijalu ekstrakata lincure i njihovoj mogućoj primeni u zaštiti naslednog materijala od štetnih posledica zračenja.

### 1.1. Prisustvo mikroorganizama u hrani i problemi rezistencije na konvencionalne antimikrobne agense

Većina namirnica je podložna kvarenju jer sadrže neophodne nutrijente za rast i razvoj mikroorganizama. Kako bi se izbegao proces kvarenja hrane i eliminisale bolesti koje se prenose putem hrane, neophodno je kontrolisati pojavu i umnožavanje mikroorganizama. U hrani se mogu naći mikroorganizmi koji su korisni, uzročnici kvarenje hrane ili patogeni. U grupu korisnih mikroorganizama spadaju probiotici, kao i oni koji učestvuju u produkciji novih hranljivih sastojaka fermentacijom. Drugu grupu čine mikroorganizmi koji kroz svoj rast i određene enzimske reakcije menjaju ukus, boju i teksturu hrane dovodeći do njenog kvarenja. Patogeni mikroorganizmi koji se nalaze u hrani mogu dovesti do intoksikacije ili do razvoja infekcije kod konzumenata. Intoksikacija je rezultat proliferacije mikroorganizama koji proizvode toksine u hrani i njenom konzumacijom dovode do razvoja bolesti. Do infekcije dolazi usled unosa patogenih mikroorganizama sa hranom, intoksikacijom, adhezijom i invazijom tkiva (Marriot i sar., 2006). Bolesti koje se razvijaju usled kontaminirane hrane predstavljaju globalni zdravstveni problem, a sama patogenezna bolesti zavisi od zdravstvenog stanja domaćina, vrste mikroorganizma, kao i veličine unetog inokuluma. Otprilike 66% bolesti koje se prenose hranom su uzrokovane bakterijskim patogenima. Najčešći uzročnici ovih bolesti

su bakterije roda *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, kao i vrste *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, koje se sve prenose hranom i vodom dovodeći do toksičnih simptoma i gastrointestinalnih infekcija (Marriot i sar., 2006; Takó i sar., 2020). U Tabeli 1. je dat pregled najčešćih patogena hrane koji dovode do nastanka bolesti kod čoveka.

Tabela 1. Najčešći patogeni hrane, toksini koje proizvode i bolesti koje uzrokuju (preuzeto i modificirano iz Takó i sar., 2020)

Patogena bakterija	Produkcija toksina	Tip bolesti	Glavni izvori infekcija
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolizin O	Listerioza	Mekani sir iz nepasterizovanog mleka
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulinum	Botulizam	Nepravilno obrađena konzervirana hrana
<i>Bacillus cereus</i>	Emetik toksin	Emetik sindrom	Pirinač, pasta, nudle
<i>Staphylococcus aureus</i>	Termostabilni enterotoksini	Gastrointestinalni simptomi	Meso, mlečni proizvodi, salate
<i>Salmonella</i> spp.	Enterotoksin	Tifoidna groznica, salmoneloza	Meso, riba, mleko, jaja, povrće, voda
<i>Vibrio cholerae</i>	Kolera toksin	Kolera, gastroenteritis	Sirovo meso, školjke, voda
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Šiga-toksin	Hemoragični kolitis	Mleveno meso, nedovoljno pasterizovano mleko
<i>Shigella</i> spp.	Enterotoksin	Šigeloza (bacilarna dizenterija)	Salate, mlečni proizvodi, kontaminirana voda

*L. monocytogenes* je naročito opasan oportunistički patogen, jer uspeva da raste na niskim temperaturama u frižideru. Predstavlja gram pozitivnu, mikroaerofilnu bakteriju koja ne formira spore i izaziva bolest listeriozu. Ranije se ovo oboljenje smatralo retkom pojavom kod ljudi, međutim, od osamdesetih godina povećala se učestalost listerioze, kao i zabrinutost za javno zdravlje. Jedan od velikih problema je i veća podložnost trudnica ovoj bolesti (Marriot i sar., 2006). Najčešći simptomi ove bolesti podrazumevaju blagi gastroenteritis i pojavu groznice, međutim može doći i do pojave meningitisa, meningoencefalitisa, pobačaja, mastitisa, spinalnog mijelitisa (Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007). Ovaj patogen se može naći u širokom spektru namirnica, od čokolade i hleba, do mleka i crvenog i pilećeg mesa. Najefikasniji način prenosa ovog patogena je putem konzumiranja kontaminirane hrane, ali se može preneti i direktnim kontaktom (Marriot i sar., 2006). Dalje, *S. aureus* je takođe čest patogen koji dovodi do razvoja bolesti putem hrane. U pitanju je gram pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija koja ne formira spore, proizvodi enterotoksine koji uzrokuju inflamaciju ćelija želuca i creva i dovodi do gastroenteritisa. Najčešći simptomi usled intoksikacije stafilokoknim toksinima su hipersalivacija, mučnina, povraćanje i grčevi u stomaku, sa ili bez dijareje (Kadariya i sar., 2014). Namirnice koje su najčešće podložne kontaminaciji ovim patogenom su mleko, meso, različite salate, pekarski proizvodi, itd. Pri idealnoj temperaturi za rast i sa visokim stepenom kontaminacije, stafilokoke se mogu dovoljno umnožiti da uzrokuju trovanje hranom bez primetne promene boje, ukusa i mirisa hrane. Eliminacija *S. aureus* iz namirnica je moguća prilikom kuvanja na oko 66 °C u toku 12 minuta, međutim za odstranjivanje toksina neophodno je da se zagrevanje hrane vrši na 131 °C u vremenskom periodu od 30 minuta. Česti uzročnici trovanja hranom su i bakterije roda

*Salmonella* i *Shigella*. Ove gram negativne bakterije usled proliferacije i produkcije enterotoksina u slučaju *Salmonella* spp. dovode do mučnine, povraćanja, dijareje, groznice i povišene temperature (Marriot i sar., 2006). Dodatno, neki od potagena hrane mogu preživeti nepovoljne uslove sredine u kojoj se nalaze, poput ekstremno niskih ili visokih temperatura, kiselosti, visokog saliniteta. Uz to, većina poseduje sposobnost formiranja biofilmova, što im olakšava rast i širenje kako na hrani, tako i na površinama koje su u kontaktu sa njom (Takó i sar., 2020).

S druge strane, mikrobiološko kvarenje hrane negativno utiče na fizičko-hemijska svojstva hrane, samim tim i na senzorne karakteristike (izgled površine hrane, njena boja, miris, ukus, konzistencija isl). Omekšavanje teksture hrane, produkcija sluzi, neprijatni mirisi i ukusi i promene boje namirnica su glavni znaci njenog kvarenja. Najčešći mikroorganizmi koji dovode do kvarenja namirnica životinjskog porekla (npr. mleko, jaja, meso) su bakterije familije Enterobacteriaceae, roda *Pseudomonas* i *Proteus*, dok su bakterije roda *Erwinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* glavni uzročnici kvarenja hrane biljnog porekla (Sperber, 2009; Rawat, 2015).

Jedan od problema sa kojim se suočavamo usled kontaminacije hrane patogenim mikroorganizmima, kao i uzročnicima kvarenja hrane, jeste činjenica da su mnoge bakterije postale tolerantne na dostupne konvencionalne metode prezervacije i konzervacije hrane. Takođe, pokazano je da mnogi veštački aditivi hrane dovode do brojnih neželjenih efekata. Najčešće korišćeni veštački antioksidanti butil hidroksianazol (BHA) i butil hidroksitoluen (BHT), neophodni za usporavanje kvarenja masti i ulja, su identifikovani kao okidači pogoršanja hronične urtikarije (Wilson i Bahna, 2005). Dodatno, ova dva antioksidanta, zajedno sa pojedinim fungicidima i zaslađivačima, indukuju oštećenja molekula DNK, sledstveno promovišući kancerogenezu u ćelijama gastrointestinalnih organa (Sasaki i sar., 2002). Još jedan od problema jeste zloupotreba i prekomerna upotreba antimikrobnih lekova protiv patogenih mikroorganizama, što je dovelo do razvoja veće otpornosti istih na kliničku antibiotsku terapiju i mogućnosti njihovog preživljavanja pri visokim koncentracijama lekova, što može uzrokovati ozbiljne hronične infekcije. Antibakterijska rezistencija se može širiti i kroz hranu direktnim ili indirektnim putem. Direktno širenje se dešava usled kontakta čoveka sa životinjom ili njenim telesnim tečnostima, dok indirektno podrazumeva konzumaciju kontaminiranih proizvoda životinjskog porekla. Danas su detektovane različite vrste rezistentnih bakterija u prehrambenim proizvodima i kod konzumenata, međutim neke osnovne mere u pripremi, konzumiranju i skladištenju namirnica bi mogle efikasno da smanje i kontrolišu širenje antibakterijske rezistencije putem hrane (Hashempour-Baltork i sar., 2019).

### 1.1.1. Mehanizmi rezistencije bakterija

Antimikrobna jedinjenja su uglavnom kategorisana prema mehanizmima delovanja koji uključuju: 1) ometanje sinteze ćelijskog zida ( $\beta$ -laktamski i glikopeptidni antibiotici; 2) inhibiciju sinteze proteina (makrolidi i tetraciklini); 3) ometanje sinteze nukleinskih kiselina (fluorohinoloni, rifampicin); 4) inhibiciju metaboličkih puteva (trimetoprim-sulfametoksazol) i remećenje strukture bakterijske membrane (polimiksini, daptomicin). Neke vrste bakterija poseduju urođenu rezistentnost na više od jedne klase antimikrobnih jedinjenja. U takvim slučajevima, svi sojevi te vrste bakterija su otporni na sve članove te klase antimikrobnih jedinjenja. Veću pretnju predstavljaju slučajevi stečene rezistencije, gde prvobitno osetljive populacije bakterija postaju otporne na određene antimikrobne lekove. Sticanje rezistencije se dešava usled mutacija na genomu bakterija, ili preuzimanjem gena koji nosi informaciju o rezistenciji od drugih bakterija u procesima konjugacije, transdukcije i transformacije (Tenover, 2006). Postoji nekoliko najčešćih mehanizama kojima se ostvaruje rezistencija bakterija na antimikrobne agense. Veoma često dolazi do menjanja ciljnog proteina za koji se vezuje antibakterijski agens; tj. do modifikacije ili eliminacije vezujućeg mesta, npr. promena u penicilin-vezujućem 2b proteinu kod pneumokoka rezultira rezistencijom na penicilin. Zatim,

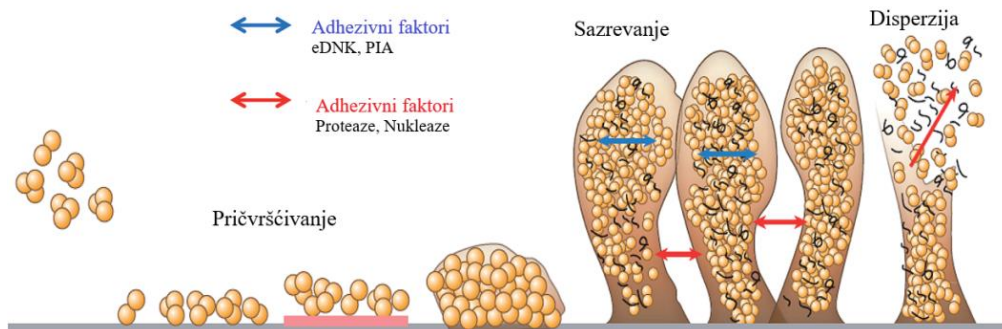
rezistencija se može razviti usled pozitivne regulacije produkcije enzima koji inaktiviraju antimikrobni lek (npr. eritromicin ribozomska metilaza kod stafilokoka). Negativna regulacija ili promena strukture proteinskog kanala spoljašnje membrane, neophodnog za ulazak leka u ćeliju, ili povećana ekspresija efluks pumpi koje izbacuju lek iz ćelije, takođe su mogući mehanizmi rezistencije (Byarugaba, 2010).

### 1.1.2. Formiranje biofilma i načini njegove prevencije u prehrambenoj industriji

Biofilmovi predstavljaju preovlađujući način rasta mikroorganizama u prirodi. Oni se definišu kao zajednice mikroorganizama pričvršćenih za određenu podlogu. Formiranje i razvoj biofilma zavisi od mnogih faktora, uključujući specifični bakterijski soj, svojstva površine na kojoj se formira, ekološke parametre, poput pH vrednosti, nivoa hranljivih sastojaka i temperature. Levenhuk je još 1684. godine, koristeći svoj primitivni mikroskop, primetio da se mikroorganizmi kače za površinu zuba i formiraju sesilne zajednice, što se može smatrati i prvim posmatranjem biofilmova. Tek je dvadesetih godina XX veka formulisan koncept biofilma, kada je Angst primetio da je broj bakterija na površini trupa brodova bio veći od broja okolnih planktonskih ćelija, sugerišući da je upravo bakterijski biofilm doveo do ozbiljne korozije trupa broda. Do 80-ih godina prošlog veka, primećeno je da bakterije formiraju biofilme na različitim površinama, uključujući sisteme za prečišćavanje otpadnih voda, opremu za prehrambenu industriju, različita medicinska sredstva, itd. Bilo koja vrsta mikroorganizama, uključujući i patogene hrane, kao i uzročnike kvarenja hrane, može da formira biofilm, igrajući tako bitnu ulogu u razvoju mnogih infekcija (Shi i Zhu, 2009).

Formiranje biofilma je postepen i dinamičan proces koji podrazumeva sledeće faze: inicijalno pričvršćivanje, formiranje mikrokolonija, sazrevanje biofilma i disperziju (Slika 1.). Inicijalno pričvršćivanje se sastoji od reverzibilnog i ireverzibilnog vezivanja bakterijskih ćelija za površinu. U slučaju reverzibilnog, bakterije se „ležerno“ zalepe za podlogu pomoću ekstracelularnih organela poput flagela i pila, i male količine ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS), čije su glavne komponente ekstracelularna DNK (eDNK), proteini, lipidi, polisaharidni intercelularni adhezini (PIA), teihojna kiselina. U ovoj fazi veza je slaba i moguće je vraćanje na planktonski način života. Prelaz u ireverzibilno vezivanje dovodi do jače interakcije između bakterija i površine zahvaljujući povećanoj sekreciji EPS-a. Nakon ireverzibilnog pričvršćivanja, hemijsko razbijanje deterdžentima ili sredstvima za dezinfekciju i/ili toplotno uklanjanje biofilma je neophodno. Formiranje mikrokolonija je rezultat istovremene akumulacije i rasta mikroorganizama i povezano je sa produkcijom EPS-a, što zatim dovodi do pojačanja veze između bakterija i supstrata i štiti kolonije od spoljašnjih stresora. Sazrevanje biofilma podrazumeva korak kada se on razvija u organizovanu strukturu koja može biti ravna ili u obliku pečurke, u zavisnosti od izvora hranljivih sastojaka na koje se oslanja (Srey i sar., 2013). Disperzija je poslednji korak u ciklusu formiranja biofilma, koji omogućava ćelijama da se vrate u svoje planktonsko stanje. Spoljašnja perturbacija, unutrašnji procesi u biofilmu, poput razgradnje endogenih enzima, kao i oslobađanje EPS-a i površinski-vezujućih proteina su svi mogući uzroci disperzije biofilma. Smatra se da je disperzija biofilma aktivan proces koji omogućava kolonizaciju drugih niša. Dodatno, gladovanje unutar biofilma je jedan od mogućih razloga njegove disperzije, što pruža mogućnost bakterijama da traže okruženje bogato hranljivim sastojcima (O'Toole i sar., 2000).





Slika 1. Model formiranja biofilma tokom 48h sa promenama u formiranju mikrokolonija, sazrevanju i disperziji (preuzeto iz Zhao i sar., 2017)

Kao što je već naglašeno, patogeni hrane su sposobni da se pričvrste i rastu na površini hrane i opremi za proizvodnju hrane, formirajući biofilm. Na primer, *L. monocytogenes* formira biofilm na podnim odvodima, rezervoarima za skladištenje, transportnim trakama i drugim materijalima koji dolaze u kontakt s hranom (Kim i Frank, 1995). Takođe, pokazano je da *L. monocytogenes* formira biofilm na površini goveđeg mesa, dok su bakterije roda *Salmonella* sposobne da formiraju zajednicu na površini pilećeg mesa (Shi i Zhu, 2009). Prisustvo patogenih bakterija na hrani ili površinama koje su u kontaktu sa hranom smanjuje bezbednost upotrebe takve hrane. Sam proces formiranja biofilma u prehrambenoj industriji je kompleksan i do njega najčešće dolazi usled postojanja ostataka organskih molekula hrane na površini opreme za njenu preradu. Takvi uslovi pogoduju biološkoj aktivnosti mikroorganizama tako da, ukoliko dospeju do odgovarajućih površina, veoma lako može doći do formiranja biofilma. Dodatno, mali broj mikrobijalnih ćelija može preživeti i nakon čišćenja i dezinfekcije i inicirati ponovni rast. Na kraju, sve ovo dovodi do formiranja zajednice mikroorganizama uz pomoć ekspresije odgovarajućih gena podstaknute međucelijskom komunikacijom (Shi i Zhu, 2009).

Pojava bakterijskih biofilmova na hrani ili opremi za obradu hrane, može voditi pojavi intoksikacije ili pojave bolesti kod konzumenata. Pokazano je da se toksini mogu sekretovati od strane biofilma formiranog u okviru pogona za preradu hrane. Odatle se mogu kontaminirati hranljive komponente, što posledično dovodi do individualnih ili višestrukih intoksikacija, narušavajući zdravlje ljudi (Galie i sar., 2018). Jednom kada se biofilm formira, osetljivost bakterija na različite hemijske preparate i promene u spoljašnjoj sredini je značajno smanjena, zbog čega je veoma teško ukloniti ga. Zbog toga velike doze antibiotika ne mogu uspešno da eliminišu infektivne biofilme, obzirom da su bakterije dobro zaštićene njegovim matriksom. Zbog veće rezistentnosti biofilmova na antimikrobne agense u poređenju sa planktonskim ćelijama, njihova eliminacija iz objekata za preradu hrane i sa same hrane predstavlja veliki izazov (Simões i sar., 2010; Zhao i sar., 2017).

Veliki problem u prehrambenoj industriji predstavlja *L. monocytogenes*. Biofilm ovog patogena je uglavnom sastavljen od teihojnih kiselina i može se formirati na različitim materijalima u industriji, uključujući polipropilen, čelik, gumu i staklene površine. Odatle se patogen širi dalje i uspešno se umožava na niskim temperaturama u frižideru (Silva i sar., 2008). Uobičajena hrana koja podleže kontaminaciji ovim patogenom je dimljena riba, naresci mesa, sveži sir. Pored sposobnosti proliferacije na niskim temperaturama, ova bakterija indukuje i formiranje biofilma kao odgovor na niske temperature, povećavajući tako sposobnost vezivanja za površine i rezistentnost na različite proizvode za dezinfekciju. Eradikaciju ovog patogena iz prehrambene industrije dodatno komplikuje i njegova otpornost na toplotne tretmane do 60 °C (Lee i sar., 2017). Smatra se da su geni uključeni u pokretljivost flagela (*fliQ*, *flaA*, *fliI*, *motA*), kao i regulatorni gen *phoR* (fosfat osetljiv operon) i geni uključeni u inkorporaciju D-alanina u lipoteihojnu kiselinu neophodni za formiranje biofilma (Alonso i

sar., 2014). Nakon unošenja u organizam i invazije ćelije domaćina, *L. monocytogenes* može da koristi listeriolizin O i/ili fosfolipaze PlcA i PlcB, kako bi prodrla u njen citosol. Listeriolizin O je holesterol zavisan citolizin koji se insertuje u membrane ćelije domaćina, formirajući pore i narušavajući citoplazmatični prostor. Zatim, bakterija koristi površinski protein koji indukuje sakupljanje aktina (ActA), aktivirajući tako mašineriju ćelije domaćina za pokretanje aktina, što joj omogućava intracelularno kretanje i širenje iz ćelije u ćeliju (Kanki i sar., 2018), dovodeći do gastroenteritisa ili listerioze kod trudnica i imunokompromitovanih osoba. Navedene činjenice ističu kliničku važnost praćenja i kontrole biofilma *L. monocytogenes* u prehrambenoj industriji.

*S. aureus* je oportunistički patogen koji takođe dovodi do problema u prehrambenoj industriji usled formiranja biofilma i produkcije enteroksina na temperaturama između 10 i 46 °C. Hrana sa niskom količinom vode, ali sa visokim sadržajem soli i šećera je pogodna za rast i razvoj ove bakterije. Enterotoksini koje proizvodi se vezuju za molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II u T ćelijama, što dovodi do akutnog toksičnog šoka sa povraćanjem i dijarejom (Schelin i sar., 2017). Dodatno, veliku zabrinutost predstavlja i meticilin rezistentan soj *S. aureus* (MRSA), s obzirom da je primarno poreklo kontaminacije ovim sojem vezano za hranu životinjskog porekla sa farmi, kao i da ovaj soj može formirati biofilm na različitim površinama životinjskih trupova (Vergara i sar., 2017). Formiranje i rast biofilma *S. aureus* može biti i pojačano različitim metodama obrade koje se susreću u prehrambenoj industriji, poput primene suboptimalnih temperatura, nedovoljne dezinfekcije, kombinacije soli i glukoze. Pokazano je i da je transkripcija gena odgovornih za formiranje biofilma i virulencije pozitivno regulisana u prisustvu subletalnih koncentracija različitih deterdženata koji se koriste u prehrambenoj industriji (Slany i sar., 2017). Ekspresija *icaA* gena, čiji je transkripcioni produkt *N*-acetilglukozominiltransferaza uključen u formiranje ekstracelularnog polisaharidnog matriksa, je neophodna za formiranje biofilma kod ovog patogena. Drugi geni uključeni u formiranje biofilma ovog patogena imaju ulogu u adheziji (*icaD*, *cna*, *fnbA* i *fnbB*), sekreciji toksini (*hla* i *hly*) i regulaciji transkripcije (*agr* i *sarA*) (Vergara i sar., 2017).

Postoje različiti načini koji se koriste za prevenciju i sprečavanje formiranja biofilma. Pre svega, najbolji način sprečavanja formiranja biofilma je inhibicija rasta bakterija, što se postiže sterilizacijom hrane i dodavanjem različitih aditiva hrani. Zatim, sprečavanjem inicijalne adhezije ćelija inhibira se i formiranje biofilma. S druge strane, najčešći načini za otklanjanje formiranog biofilma su različiti fizički tretmani, poput visokih temperatura, ultrazvuka, hemijskih reagenasa, kao i biološki tretmani koji uključuju upotrebu bakteriofaga (Zhao i sar., 2017).

Industrijska potražnja za novim tehnikama konzerviranja i očuvanja hrane je značajno porasla usled ogromnih gubitaka namirnica zbog kontaminacije mikroorganizmima. Štaviše, zabrinutost konzumenata zbog štetnih posledica veštačkih aditiva i suplemenata hrane raste, što dodatno podstiče istraživače na pronalaženje novih alternativnih prirodnih antimikrobnih jedinjenja koja bi imala potencijal u prezervaciji hranljivih namirnica.

## **1.2. Genotoksikologija – štetne posledice genotoksina i značaj testiranja genotoksičnosti/antigenotoksičnosti**

Genetička toksikologija – genotoksikologija je multidisciplinarna nauka koja se bavi proučavanjem interakcija između fizičkih, hemijskih i bioloških agenasa sa genetičkim materijalom, mehanizama odgovora na izazvana oštećenja i sveukupnim uticajem na organizam. Početak razvoja genotoksikologije se vezuje za tridesete godine XX veka, kada je Hermann Joseph Muller u svom istraživanju pokazao da X-zraci dovode do pojave mutacija na modelu *Drosophila melanogaster*, dok je nemačka naučnica Charlotte Auerbach 1942. ukazala na mutageni potencijal hemijskih agenasa poput pesticida, aditiva itd. Dodatni podsticaj razvoju genotoksikologije je obezbedio i Alexander

Hollender zadužen za osnivanje Društva za mutagenezu životne sredine 1961. godine u Americi (Dar i sar., 2016).

Genotoksičnost predstavlja sposobnost različitih agenasa da indukuju oštećenje na genetičkom materijalu. Međutim, oštećenja na genetičkom materijalu ne uključuju samo DNK molekul, već i ćelijske komponente povezane sa funkcionalnošću i ponašanjem hromozoma u ćeliji, kao što su proteini odgovorni za reparaciju, kondezaciju, dekondezaciju DNK molekula i druge strukture, poput deobnog vretena odgovornog za distribuciju hromozoma tokom ćelijske deobe (Simić i sar., 2002; Nagarathna i sar., 2013; López-Romero i sar., 2018). Agensi koji su sposobni da izazivaju genetičku toksičnost se nazivaju genotoksini i prema svom poreklu su podeljeni na fizičke, hemijske i biološke genotoksine. Prva kategorija uključuje temperaturu, jonizujuća i neka nejonizujuća zračenja – ultraljubičasto, a po mnogim autorima i uži opseg talasnih dužina mikrotalasnog zračenja (Liu i sar., 2013; Atli Şekeroğlu i sar., 2013; Megha i sar., 2015). Druga grupa se sastoji od širokog spektra jedinjenja sa mnogobrojnim efektima, i pre svega ubraja teške metale, pesticide, alkilirajuće agense, organske rastvarače, pojedine aditive hrane, odnosno različite ksenobiotike. U treću grupu genotoksina spadaju različiti paraziti, bakterije, virusi, biljke, gljive (naročito vrste koje sintetišu sekundarne metabolite poput fito- i miktoksina) (Ferguson, 2002; Ferguson i Philpott, 2008). Istovremeno, genotoksini se mogu klasifikovati i prema načinu delovanja na mutagene, kancerogene i teratogene, indukujući procese mutageneze, kancerogeneze i teratogeneze. Naravno, podela nije stroga i pojedini genotoksični agensi imaju višestruko dejstvo, tj. mogu istovremeno pripadati dvema, ili čak svim pomenutim klasama. U mutagenezi se razmatraju dva tipa genetičkih alteracija: mutacije koje se dešavaju na nivou gena (mikromutacije) i na nivou hromozoma (makromutacije). Mutacije se mogu desiti u somatskim ćelijama, što može dovesti do razvoja kancera kod individualnih jedinki, ali i do genetičkih poremećaja kao što su arterioskleroza, kardiovaskularne bolesti i druge hronične degenerativne bolesti. S druge strane, mutacije u polnim ćelijama dovode do oštećenja koja se prenose na potomstvo (Umbuzeiro i sar., 2016; López-Romero i sar., 2018). Kancerogeneza je proces koji podrazumeva promene poput ireverzibilne transformacije ćelija kroz faze inicijacije, promocije i progresije. Interesantno je napomenuti da je oko 90-95% karcinoma (kanceri nastali od različitih oblika epitelnih ćelija) povezano sa hemijskim genotoksinima, 5-10% sa fizičkim i oko 2-5% sa biološkim. Što se tiče procesa teratogeneze, on podrazumeva indukovanje oštećenja tokom razvoja organizma u bilo kom trenutku tokom perioda gestacije (Ferguson i Philpott, 2008).

S obzirom da su genotoksični agensi uključeni u procese inicijacije i promocije različitih bolesti kod ljudi, značaj otkrivanja i istraživanja novih fitojedinjenja koja su uspešna u neutralisanju mutagenih i kancerogenih efekata različitih agenasa je u usponu. Takva jedinjenja koja redukuju mutagenost fizičkih i hemijskih agenasa se označavaju kao antimutageni. Međutim, uzimajući u obzir činjenicu da su svi mutageni genotoksični, ali da sve genotoksične supstance nisu mutagene, jedinjenja koja redukuju nivo oštećenja na DNK molekulu izazvanog delovanjem genotoksina se nazivaju antigenotoksična jedinjenja (Bhattacharya, 2011). Poslednjih decenija, veliki broj istraživanja je sproveden kako bi se identifikovale komponente koje štite ljudski organizam od posledica DNK oštećenja. Širom sveta se ulažu neprekidni naponi kako bi se istražio bogat biodiverzitet jestivih, medicinskih i drugih netoksičnih biljaka i njihovih derivata, u potrazi za najefikasnijim fito-antimutagenima. Ova bioaktivna jedinjenja se mogu klasifikovati na osnovu hemijskih, biogenetskih i farmakoloških kriterijuma i organizovana su u pet grupa koje uključuju karotenoide, fenolna jedinjenja, alkalioide, jedinjenja koja sadrže azot i organo-sumporna jedinjenja.

Generalno gledano, antimutageni su podeljeni na dezmutagene i bioantimutagene. Prva grupa podrazumeva supstance koje promovišu eliminaciju genotoksina iz organizma kao i supstance koje inaktiviraju mutagen parcijalno ili potpuno, enzimskim ili hemijskim interakcijama, pre nego što mutagen „napadne“ DNK. S druge strane, bioantimutageni mogu potisnuti proces mutacije nakon

nastanka oštećenja. Oni deluju na reparacione i replikacione procese oštećenog DNK molekula, što rezultuje snižavanjem učestalosti mutacija. Zbog svoje široke primene u monitoringu životne sredine i oštećenja humanog genetičkog materijala, genetička toksikologija se takođe koristi u proceni i identifikaciji antigenotoksičnih efekata mnogih lekovitih i aromatičnih biljaka, voća i povrća, primenom mnogobrojnih *in vivo* i *in vitro* testova (De Flora i Ferguson, 2005; Ferguson i sar., 2005; Nikolić i sar., 2012).

### 1.2.1. Mutageni iz hrane

Smatra se da hrana i nutritivne navike, poput visokog unosa masti, nedovoljnog unosa vlaknaste hrane i konzumacije dobro kuvanog mesa, usled čega dolazi do formiranja mutagena, mogu povećati rizik od nastanka kancera debelog creva, pankreasa, dojki, prostate i endometrijuma (Gooderham i sar., 2001). Mutageni iz hrane mogu prouzrokovati različita oštećenja na DNK molekulu, najčešće nukleotidne alteracije i hromozomske aberacije. Većina mutagena započinje svoje dejstvo na nivou DNK, formirajući kancerogen-DNK adukte koji nastaju kovalentnim vezivanjem kancerogena ili dela kancerogena za nukleotide. Takođe, mutageni iz hrane mogu indirektno indukovati oštećenje na DNK molekulu iniciranjem produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Međutim, efekti mutagena na kancerogenezu mogu biti modifikovani i redukovani metaboličkom transformacijom i detoksifikacijom mutagena, kao i ćelijskim odgovorom na DNK oštećenje koji obuhvata reparaciju ili uvođenje ćelije u proces apoptoze (Goldman i Shields, 2003). Po ulasku u telu, mutageni uglavnom prolaze kroz metaboličku aktivaciju i detoksifikaciju endogenim enzimima čija je uloga da organizam oslobode od ksenobiotika. Ponekad se nakon obrade, hemijski modifikovani mutageni koji su reaktivniji (elektrofilniji) vezuju za DNK, a ne za molekule nosače kojim se izlučuju, što dovodi do oštećenja i zaustavljanja procesa replikacije. Međutim, zahvaljujući reparacionim mehanizmima mogu se popraviti nastali DNK adukti, čemu dodatno pomažu ćelijski procesi koji zaustavljaju ćelijski ciklus, obezbeđujući više vremena za popravku nastale lezije. Ukoliko se adukti ne uklone i lezije ne repariraju može se aktivirati mehanizam programirane ćelijske smrti (apoptoze), a ako i ovaj mehanizam "zakaže", može doći do pojave tačkastih mutacija, delecija, insercija i hromozomskih aberacija (Goldman i Shields, 2003; Sugimura i sar., 2004).

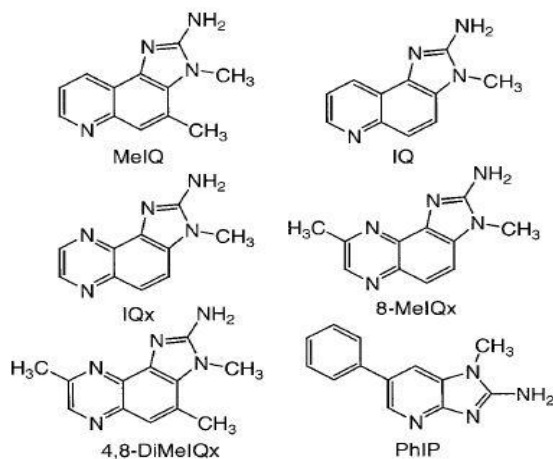
Otkriće da kuvana hrana može biti mutagena navela je istraživače da izoluju mutagene produkte koji se formiraju prilikom obrade hrane. Grupe naučnika u Japanu i Americi su pokazale da se kuvanjem hrane generišu mnoga jedinjenja koja su ispoljila mutagenost u *in vitro* bakterijskim testovima. Definisane su tri grupe mutagenih jedinjenja, uključujući policiklične aromatične ugljovodonike, nitrozamine i heterociklične aromatične amine (HAA) (Gooderham i sar., 2001). Policiklični aromatični ugljovodonici nastaju tokom direktne obrade hrane na žaru (npr. roštiljanjem), HAA prilikom različitih obrada mesa na visokim temperaturama, dok se nitrozamini mogu naći u suvomesnatim i ribljim prerađevinama (Goldman i Shields, 2003).

#### 1.2.1.1. Heterociklični aromatični amini

HAA predstavljaju moćne mutagene koji se formiraju prilikom termičke obrade hrane bogate proteinima i imaju bitnu ulogu u etiologiji različitih kancera kod čoveka, a aktivne koncentracije pojedinih među njima su čak reda veličine ng ( $10^{-9}$  g) (Sugimura, 2002). Međunarodna agencija za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) neke HAA kao što su 2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5-f]hinolin (MeIQ), 2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5-f]hinoksalin (MeIQx) i 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP) smatra mogućim karcinogenima, dok se 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]hinolin (IQ) smatra najverovatnijim karcinogenom štetnim za zdravlje ljudi (Kizil i sar., 2011). Mutagenost HAA je i potvrđena mnogim testovima na bakterijskim i sisarskim

ćelijama (Sugimora i sar., 2004), pri čemu je njihov mutageni potencijal oko 100 puta veći od potencijala aflatoksina B1, i čak 2000 puta veći od mutagenosti benzo[*a*]pirena (B[*a*]p) (Kizil i sar., 2011). HAA predstavljaju promutagene, odnosno zahtevaju metaboličku aktivaciju kako bi doveli do stvaranja reaktivnih intermedijera koji se vezuju za DNK, formirajući DNK-adekte i dovodeći do pojave prekida na molekulu DNK, koji mogu voditi nastanku mutacija (Turesky i Le Marchand, 2011).

HAA su pronađeni u crvenom mesu i ribi pripremanim na temperaturi preko 130 °C, po prvi put od strane japanskog naučnika Sugimora 1977. godine (Nagao i sar., 1977). Do danas je izolovano i identifikovano oko 25 heterocikličnih aromatičnih amina iz kivanog mesa i mesnih prerađevina. HAA se mogu klasifikovati u dve velike grupe koje podrazumevaju aminoimidazohinoline (IQ-tip) i aminokarboline (ne IQ-tip). IQ-tip amina se formira prilikom obrade hrane pri konvencionalnim temperaturama za kuvanje (oko 150 °C), kroz Milardovu reakciju koja hrani daje karakterističnu braonkastu boju i ukus i uključuje hemijske interakcije između amino kiselina, kreatinina i šećera. Ovi amino hinolini predstavljaju i najznačajniju klasu mutagena koja se formira u termički obrađenoj hrani, pri čemu poseduju imidazo grupu vezanu za hinolin, hinoksalin ili piridin (Slika 2.). Druga grupa amina nastaje prilikom obrade hrane na temperaturama preko 300 °C, pirolizom amino kiselina i proteina (Kizil i sar., 2011).

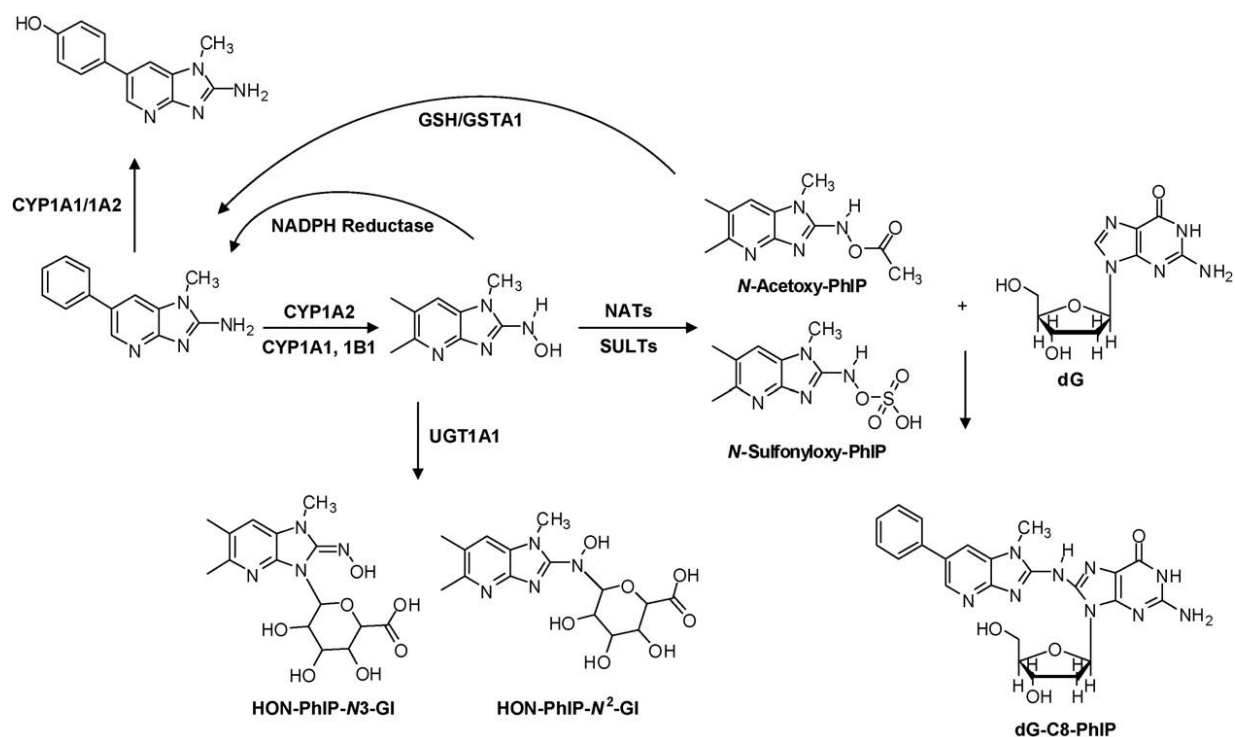


Slika 2. Najčešći mutageni koji nastaju termičkom obradom hrane bogate proteinima (preuzeto iz Gooderham i sar., 2001)

Nekoliko studija je pokazalo da su glavni prekursori HAA kreatin i/ili kreatinin, slobodne amino kiseline i redukujući šećeri. Poznato je da meso sadrži kreatin ili kreatinin koji mogu reagovati sa amino kiselinama i šećerima prilikom kuvanja. Stoga, može se reći da kreatin leži u osnovi mutagenosti mesa. Prilikom termičke obrade mesa ili ribe kreatin se konvertuje u kreatinin, koji zatim formira imidazo grupu heterocikličnih amina. Sa povećanjem temperature obrade hrane dolazi i do brže degradacije kreatina i formiranja kreatinina (Chiu i sar., 1998). Kada je u pitanju IQ mutagen, pretpostavlja se da su kreatinin, amino kiseline i heksaze, prisutne u sirovom mesu, njegovi prekursori. Smatra se da kreatinin formira 2-amino-3-metilimidazo deo IQ-tipa amina, ciklizacijom šećera i eliminacijom vode, što se dešava spontano kada se temperatura kuvanja povisi iznad 100 °C. Ovaj deo molekula je uobičajen za sva IQ- jedinjenja i smatra se odgovornim za ispoljavanje mutagenosti. Bez ovog dela, naročito njegove 2-amino grupe, mutagenost je zanemarljiva. Pretpostavlja se da ostali delovi IQ mutagena potiču od produkata Strekerove degradacije amino kiselina, poput piridina ili pirazina, nastalih u Milardovoj reakciji (Kizil i sar., 2011). U slučaju PhIP mutagena, najverovatniji prekursori njegovog formiranja jesu fenilalanin i kreatinin, što je pokazano prilikom suvog zagrevanja <sup>13</sup>C-fenilalanina i kreatinina. Takođe, smatra se da i glukoza, u zavisnosti od koncentracije, može

značajno uticati na prinos PhIP jedinjenja u tečnim model sistema. Dodatno, PhIP može nastati i prilikom zagrevanja kreatina sa leucinom, izoleucinom i tirozinom (Murkovic, 2004). Smatra se da je prvi korak u formiranju PhIP-a degradacija fenilalanina, zatim sledi aldolna reakcija između produkata degradacije fenilacetaldehida i kreatinina. U sledećem koraku se formiraju intermedijerni produkti aldolne kondenzacije i na kraju dolazi do formiranja Šifove baze između kreatininskog dela kondenzovanog produkta i amino grupe (Zöchling i Murkovic, 2002). Formiranje HAA zavisi u većoj meri od temperature, dužine i metode kuvanja/obrade mesa, nego od samih prekursora prisutnih u hrani. Pokazano je da se roštiljanjem hrane formira veći procenat HAA u odnosu na obradu mesa u rerni i mikrotalasnoj pećnici (Kizil i sar., 2011).

Metabolička aktivacija HAA se odvija najvećim delom u jetri pomoću CYP1A2-zavisne *N*-oksidacije egzociklične amino grupe, što dovodi do formiranja *N*-hidroksi HAA vrsta. Ovaj tip oksidacije HAA može biti katalizovan i enzimima CYP1A1 i CYP1B1 u ekstrahepatičnim tkivima. Naknadno acetilovanje ili sulfonovanje *N*-hidroksi HAA vrsta, pomoću acetiltransferaza (NAT) ili sulfotransferaza (SULT), dovodi do stvaranja jako nestabilnih estara koji mogu da formiraju adukte sa DNK molekulom. Što se tiče detoksifikacije, *N*-hidroksi HAA vrste podležu istoj pomoću UDP-glukuronil transferaze (UGT), čime se formiraju stabilni glukuronidni konjugati, pri čemu je UGT1A1 katalitički najaktivnija izoforma ovog enzima. Takođe, *N*-hidroksi HAA vrste prolaze kroz detoksifikaciju redukcijom nazad do matičnih amina, pomoću NADPH reduktaza. U slučaju PhIP mutagena, reaktivni *N*-acetoksi ester *N*-hidroksi PhIP vrste podleže detoksifikaciji redukcijom reaktivnog intermedijera nazad do matičnog amina, pomoću glutation-S-transferaze (GST) kroz redukciju, najverovatnije kroz formiranje nestabilnog glutation konjugata (Slika 3.). Glutacion-S-transferaza GSTA1 je najaktivniji enzim u ovoj reakciji (King i sar., 2000; Turesky, 2007).

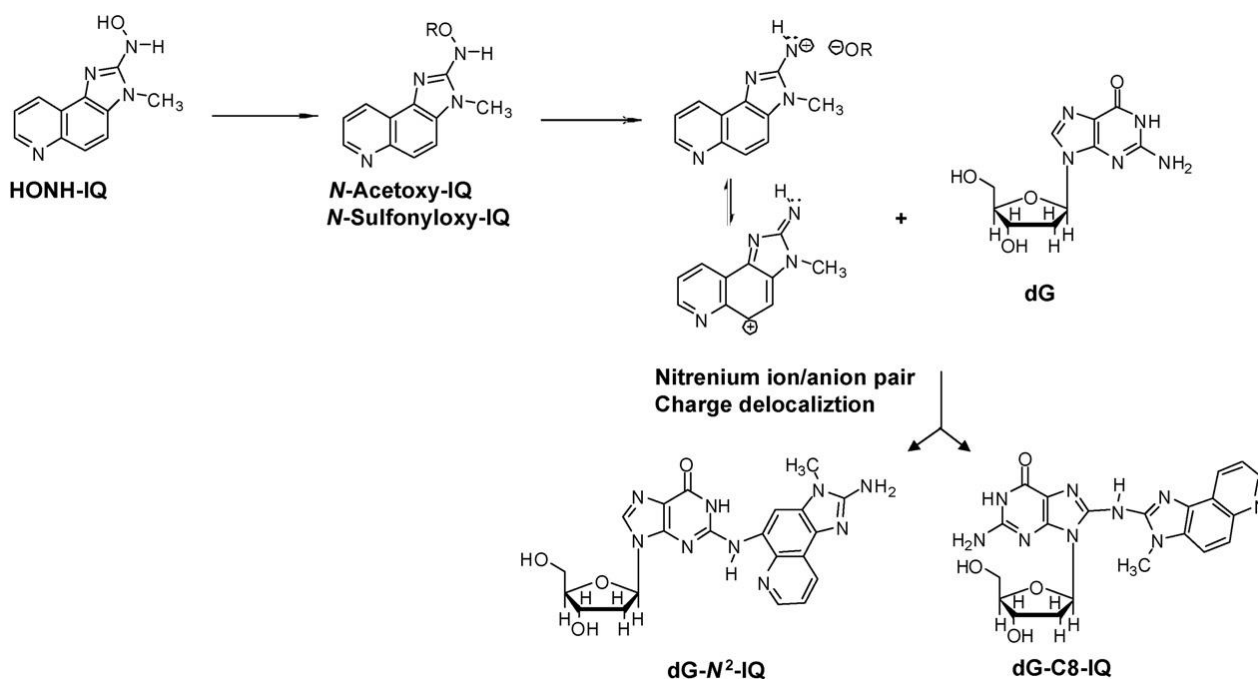


Slika 3. Glavni putevi metabolizma PhIP mutagena (preuzeto iz Turesky, 2007)

Bioaktivacija se dešava pomoću CYP1A1 enzima u jetri ili CYP1A2 i CYP1B1 u ekstrahepatičnom tkivu. Esterifikacija reaktivne vrste PhIP (HONH-PhIP) se dešava pomoću NAT ili SULT, čime nastaju reaktivni intermedijeri koji mogu da formiraju adukte sa dG u DNK, stvarajući tako dG-C8-PhIP. Detoksifikacija se dešava 4'-hidroksilacijom PhIP-a, odnosno glukuronidacijom HNOH-PhIP pomoću UGT1A1, ili redukcijom reaktivnih *N*-acetoksi-PhIP vrsta do matičnog amina, pomoću GSTA1.

Formiranje HAA-DNK adukata se dešava u reakciji između esterifikovanih *N*-hidroksi HAA i C-8 atoma dezoksiguanozina (dG), što dovodi do stvaranja dG-C8-HAA adukata, najverovatnije posredstvom reaktivnog nitrenijum jona kao intermedijatora reakcije. U slučaju mutagena IQ i 8-MeIQx, adukti se mogu formirati i na N<sup>2</sup> poziciji dezoksiguanozina, ukazujući na delokalizaciju naelektrisanja nitrenijum jona (Slika 4.) (Turesky i Vouros, 2004).

Mutagenost i karcinogenost HAA se može potisnuti primenom različitih dijetetskih faktora. Mnoge studije su pokazale da dodavanje prirodnih i veštačkih antioksidanata hrani redukuju mutagenost ili inhibiraju stvaranje HAA. Naročito se ističu blagotvorni efekti začina koji su bogat izbor antioksidativnih jedinjenja. Pokazano je na primer da ruzmarin, devičansko maslinovo ulje, ekstrakt semena grožđa, crni biber i mnogi drugi uspešno inhibiraju formiranje mutagena u hrani. Katehini iz zelenog čaja su uspešno inhibirali PhIP-indukovanu karcinogenezu mlečnih žlezdi kod pacova. Mariniranje je još jedan način kojim se redukuje štetna priroda ovih jedinjenja, obzirom da je pokazano da je mariniranje piletine pre grilovanja doprinelo značajnom smanjenju produkcije HAA, što se objašnjava prisustvom antioksidantnih jedinjenja u produktima primenjenim za mariniranje (Sugimora i sar., 2004; Kizil i sar., 2011).



Slika 4. Mehanizam formiranja dG-C8 i dG-N<sup>2</sup> adukata IQ mutagena (preuzeto iz Turesky, 2007)

### 1.2.2. UV zračenje kao izvor oštećenja na DNK molekulu

Ultraljubičasto (UV) zračenje ispoljava nekoliko korisnih zdravstvenih efekata, poput formiranja vitamina D<sub>3</sub>; poznata je njegoa primena u kombinaciji sa konvencionalnim lekovima u lečenju oboljenja kože kao što su psorijaza i vitiligo. Međutim, UV zračenje može prouzrokovati akutne i hronične štetne efekte na koži, što sledstveno može rezultovati u razvoju različitih maligniteta kože. Rak kože je trenutno jedan od najčešćih tipova kancera kod ljudi. Incidenca raka kože koji uključuje melanom, bazocelularni i skvamocelularni karcinom se i dalje povećava, što se povezuje i sa postepenom degradacijom ozonskog omotača i povećanjem UV indeksa (Melnikova i Ananthaswamy, 2005). Sunčeva svetlost se sastoji od kontinuiranog spektra elektromagnetnog zračenja koje obuhvata

tri glavna dela (UV, infracrvena i vidljiva svetlost) različitih talasnih dužina. Prema Međunarodnoj komisiji za osvetljenje (eng. *International Commission on Illumination*, ICI) UV zračenje je u zavisnosti od talasne dužine podeljeno na tri kategorije: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) i UVC (100-280 nm). Ozonski omotač efikasno apsorbira UV zračenje do 310 nm i samim tim sprečava UVC i 95% UVB zračenja da dopru do zemljine površine. Međutim, UVA uopšte nije apsorbirano, a i usled sve značajnijeg oštećenja ozonskog omotača, povećana količina UVB zračenja dospeva do površine zemlje (Svobodová i sar., 2006).

UVA obuhvata više od 95% sunčevog zračenja koje stiže do nas. U poređenju sa UVB, ovo dugotalasno zračenje prodire duboko u epidermis i dermis kože, stimulišući produkciju melanina, koja dovodi do tamnjenja kože. Intenzivno izlaganje UVA zračenju može dovesti do oštećenja kože i preranog fotostarenja. UVA takođe uzrokuje nekrozu endotelijalnih ćelija, oštećujući tako krvne sudove kože. UVA-indukovani odgovor u ćelijama se uglavnom dešava indirektno, kroz oksidativne procese inicirane endogenom fotosenzibilizacijom. Nakon izlaganja UVA zračenju dolazi do produkcije ROS-a koji mogu oštetiti proteine, lipide, saharide. Dodatno, UVA dovodi do strukturnih oštećenja DNK molekula i narušava imunski sistem što posledično može inicirati nastanak raka kože. Oko 67% melanoma je upravo povezano sa intenzivnim izlaganjem UVA zračenju (Svobodová i sar., 2006; de Grujil i Leun, 2000).

UVB zračenje je znatno genotoksičnije i oko 1000 puta jače u izazivanju opekotina kože u odnosu na UVA zračenje. S druge strane, njegova moć prodiranja je manja, tako da dospeva do epidermalnog bazalnog dela kože. Uglavnom dovodi do direktnih oštećenja na DNK molekulu (formiranjem ciklobutan-pirimidin dimera (CPD) i pirimidin-pirimidon (6-4) fotoprodukata [(6-4)-PP]) i proteina (interakcijom sa aromatičnim amino kiselinama). UVB zračenje može indukovati i indirektna oštećenja makromolekula, dovodeći do produkcije ROS-a i smanjujući nivo antioksidanata kože. Raznovrsni direktni i indirektni efekti UVB zračenja mogu dovesti do fotostarenja i fotokarcinogeneze (de Grujil i Leun, 2000).

UVC zračenje poseduju najveću energiju i potencijal da dovede do bioloških oštećenja svih životnih formi, čak i prilikom kratkog perioda izlaganja. Veoma je mutageno i toksično i apsorbirano je od strane proteina i nukleinskih kiselina izazivajući direktna oštećenja poput UVB zračenja. Srećom, UVC biva potpuno apsorbirano u zemljinoj stratosferi, gde se energija UVC zračenja koristi kako bi se formirao ozon od molekularnog kiseonika (Hussein, 2005). Međutim, upravo činjenica da je njegov potencijal izazivanja bioloških oštećenja najveći, te da se ostvaruje kroz direktno delovanje na molekul DNK (formiranje CPD i (6-4)-PP) ali i produkciju ROS, čini ga dobrim eksperimentalnim modelom za proučavanje UV-protektivnog delovanja bio-aktivnih supstanci, što je iskorišćeno od strane brojnih autora (Zhang i sar., 1997; Pfeifer i sar., 2005).

### 1.2.2.1. Mehanizmi UV-indukovanih oštećenja

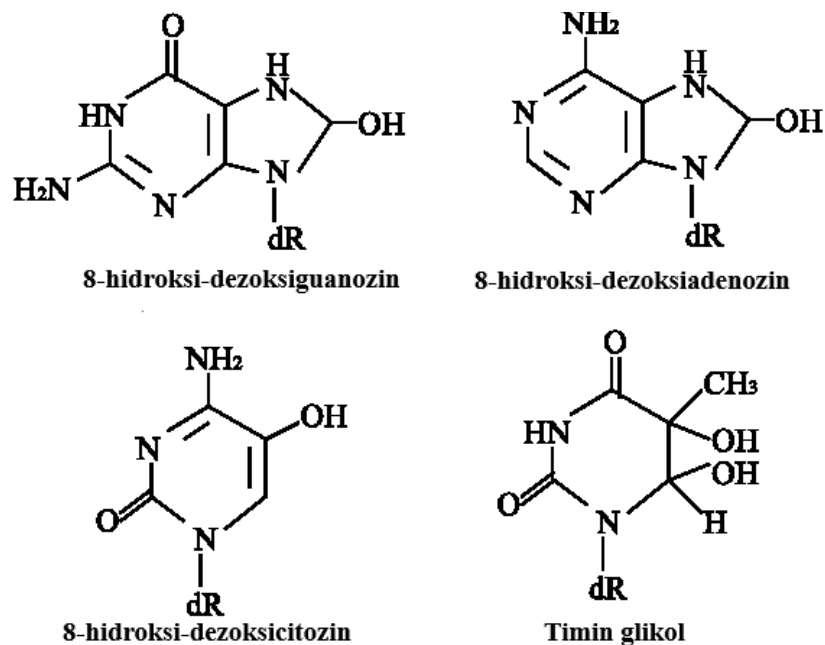
Da bi ispoljili svoje biološke efekte, UV fotoni se moraju preneti kroz slojeve kože i apsorbirati od strane ćelijskih molekula (hromofora), što pokreće seriju bioloških reakcija. UV zračenje indukuje oštećenja kroz dva mehanizma. Prvi podrazumeva direktnu apsorpciju UV fotona od strane nukleinskih kiselina, što može dovesti do foto-indukovanih reakcija. Ovaj tip oštećenja je tipičan za pirimidinske DNK baze. Drugi mehanizam je indirektna i podrazumeva fotosenzibilizacione procese u kojima endogeni i egzogeni senzibilizatori apsorbiraju UV svetlost (Pattison i Davies, 2006). Apsorpcijom energije fotona menja se distribucija elektrona u hromoforama/fotosenzibilizatorima i stvara se pobuđeno stanje elektrona.

Ćelijsko oštećenje preko pobuđenog fotosenzibilizatora se može desiti kroz dva glavna puta, označena kao tip I i tip II, što zavisi od hemijskih karakteristika fotosenzibilizatora. Tip I mehanizam podrazumeva prenos elektrona direktnom interakcijom između pobuđenog fotosenzibilizatora i drugih



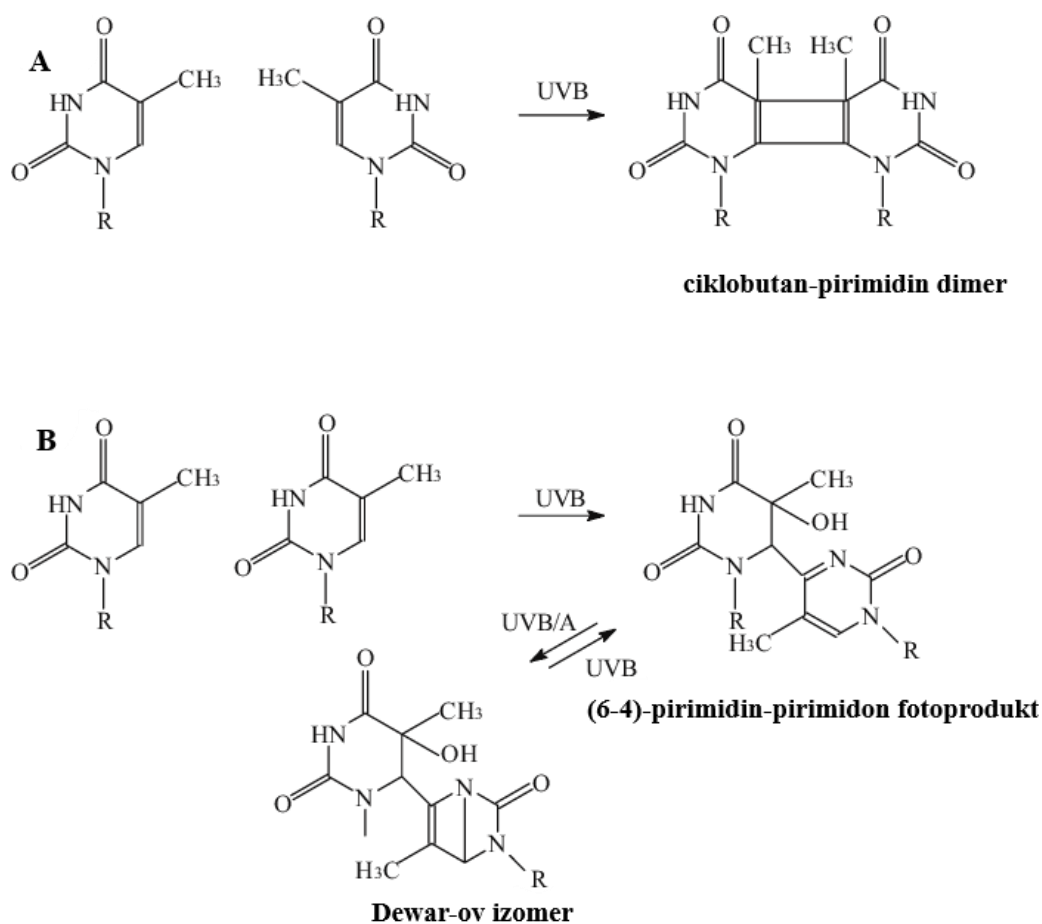
biomolekula, rezultujući u formiranju slobodnih radikala. Ovaj mehanizam ne zahteva prisustvo kiseonika za indukciju oštećenja molekula. Mehanizam tipa II uključuje transfer elektrona sa pobuđenog fotosenzibilizatora na molekularni kiseonik što dovodi do produkcije ROS-a. Uglavnom se generiše singletni kiseonik, pobuđena forma kiseonika koja je veoma jak oksidant sa dugim poluživotom. Ređe, može se formirati i superoksidni anjon, praćen dismutacijom u vodonik peroksid. Vodonik peroksid ne izaziva oštećenje sam po sebi, ali u prisustvu metalnih katjona dolazi do formiranja hidroksil radikala putem Fenton-ove reakcije. ROS interakcije sa biomolekulima izazivaju finalne biološke odgovore. Pored ROS, nakon izlaganja UV zračenju mogu se formirati i reaktivne vrste azota (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) kao što su azot oksid i azot dioksid (Svobodová i sar., 2006).

Treba imati na umu da su ROS prirodni i nerazdvojni deo metabolizma. U koži se konstantno formiraju u keratinocitama i fibroblastima i isto tako bivaju brzo uklonjeni neenzimskim (askorbinska kiselina, tokoferol, glutation) i enzimskim (katalaza, superoksid dismutaza, tiodoksinska reduktaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza) antioksidantima koji održavaju prooksidativnu/antioksidativnu ravnotežu. Međutim, prevelika produkcija ROS usled reakcije UV fotona i endogenih fotosenzibilizatora u koži može nadvladati mehanizme antioksidativne zaštite i posledično dovesti do disbalansa i oksidativnog stresa (Afaq i Mukhtar, 2002). UVA zračenje ispoljava jači uticaj na oksidativni stres u odnosu na UVB, usled produkcije ROS/RNS koji oštećuju DNK, proteine i lipide i dovode do trošenja NADH, što posledično uzrokuje gubitak energije iz ćelija. ROS/RNS izazivaju različite oksidativne DNK lezije koje igraju bitnu ulogu u inicijaciji karcinogeneze. Najčešće dovode do nastanka jednolančanih prekida, formiranja unakrsnih veza između DNK i proteina, kao i do alteracije DNK baza. Usled slabog jonizacionog potencijala, guanin je najosetljiviji na oksidaciju mehanizmima tipa I ili II. Zatim sledi adenin, praćen skoro podjednako osetljivošću citozina i timina (Slika 5.). Najprisutniji tip modifikovanog guanina je 8-okso-dezoksiguanin, karakteristična mutagena lezija koja dovodi do GC→TA transverzija, sparivanjem sa adeninom umesto sa citozinom tokom replikacije (Skarupova i sar., 2020).



Slika 5. Glavne DNK lezije izazvane oksidativnim oštećenjima (preuzeto iz Svobodová i sar., 2006)  
dR-dezoksiriboza

Nukleinske kiseline su najosetljivije na UVB zračenje, a samim tim i najodgovornije za pokretanje UV-indukovanih bioloških odgovora nakon insolacije. Međutim, aromatične amino kiseline proteina u stratum korneumu, koji predstavlja najperiferniji sloj kože, apsorbuju znatnu količinu UVB zračenja pre nego što ono dospe do nukleinskih kiselina vijabilnih ćelija (Hussein, 2005). Eksperimentalno je dokazano da UVB izaziva oštećenja na DNK molekulu najčešće formiranjem dimernih fotoprodukata (CPD, (6-4)-PP) između susednih pirimidina istog lanca (Slika 6.). Nakon izlaganja UVB, ali u maloj meri i UVA zračenju, (6-4)-PP se lako konvertuju u Dewar-ove izomere koji su umereno fotoaktivni, ali se mogu nakon izlaganja kratkotalasnom UV zračenju konvertovati nazad u (6-4)-PP. Pogrešna reparacija ovih lezija vodi nastanku mutacija u epidermalnim ćelijama, što posledično može uzrokovati malignu transformaciju ćelije. Pokazano je da među CPD, timin-citozin i citozin-citozin dimeri ispoljavaju najjači mutageni potencijal, obzirom da se TC→TT i CC→TT mutacije često mogu naći u p53 genu UV-indukovanih kancerskih ćelija (Ichihashi i sar., 2003). Dodatno, (6-4)-PP se efikasnije repariraju u odnosu na CPD, zbog čega se smatra da CPD doprinose u velikoj meri mutacijama kod sisara (Matsumura i Ananthaswamy, 2004). UV zračenje može da izazove i oštećenje RNK molekula, što dovodi do strukturnih promena u eksprimiranim genima i do produkcije nefunkcionalnih proteina. Dodatno, blokada transkripcije RNK molekula koja se dešava usled formiranja DNK fotoprodukata indukuje aktivaciju p53 proteina koji dovodi do apoptoze ozračenih keratinocita (Trautinger, 2001).



Slika 6. Formiranje pirimidinskih dimera između susednih pirimidina istog lanca (A), (6-4)-fotoprodukata i Dewar-ovih izomera (B) nakon apsorpcije UV fotona (preuzeto iz Svobodová i sar., 2006)

Jedan od pristupa u zaštiti ljudskog zdravlja od štetnih efekata UV zračenja je upotreba fotoprotektivnih agenasa. Poslednjih godina jedinjenja prirodnog porekla su zadobila značajnu pažnju i interesovanje kao potencijalne protektivne komponente. Vitamini C i E i  $\beta$ -karoten se inkorporiraju u mnoge proizvode za negu kože i preparate za sunčanje. Drugi pristup se zasniva na antioksidativnim svojstvima fenolnih/polifenolnih jedinjenja, s obzirom da se ova jedinjenja mogu koristiti u ishrani ljudi ili kao dodaci mnogim preparatima za topikalnu aplikaciju (Svobodová i sar., 2003).

### 1.3. Protektivna uloga antioksidanata

Slobodni radikali se definišu kao molekulske vrste sposobne da postoje nezavisno sa jednim ili više nesparenih elektrona. Mnogi radikali su nestabilni i jako reaktivni. U živim sistemima dominantna forma slobodnih radikala pripada grupi ROS. Najčešće ROS su superoksid anjon ( $O_2^{\bullet -}$ ), peroksid, hidroksil radikal ( $OH^{\bullet}$ ), hidroksil jon i singletni kiseonik ( $^1O_2$ ). U biološkim sistemima, ROS dodaju elektron (oksiduju) druge molekule u blizini, oslobađajući tako dodatno energiju i vraćajući se u stabilno stanje (Lobo i sar., 2010). Ukoliko ROS nisu uklonjeni delovanjem antioksidanata, reakcije oksidacije se lančano nastavljaju, što posledično dovodi do štetnih posledica. Značajan izvor endogenih ROS proizilazi od nusprodukata oksidativnog metabolizma u mitohondrijama, gde se adenzin trifosfat (ATP) generiše iz glukoze. Kao sporedna reakcija molekularni kiseonik se konvertuje u  $O_2^{\bullet -}$  koji se dalje prevodi u vodonik peroksid spontano ili dejstvom superoksid dismutaze. Vodonik peroksid je ključni agens u Fentonovoj reakciji, do koje dolazi lako u prisustvu metalnih katalizatora (gvožđe ili bakar) što dovodi do produkcije  $OH^{\bullet}$ , jednog od najnestabilnijih radikala. Do egzogene produkcije ROS-a uglavnom dolazi usled delovanja spoljašnjih faktora poput UV zračenja, različitih zagađivača, tj. ksenobiotika (Chen i sar., 2012). Usled narušavanja ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i antioksidativnih mehanizama zaštite dolazi do oksidativnog stresa koji je povezan sa širokim spektrom oštećenja lipida, proteina, DNK molekula (McCord, 2000).

Antioksidanti predstavljaju stabilne molekule koji mogu da doniraju elektron slobodnom radikalima i neutrališu ga, redukujući tako njegov kapacitet da dovede do oštećenja biomakromolekula. Antioksidanti ostvaruju svoje efekte kroz sprečavanje produkcije slobodnih radikala, direktnim uklanjanjem produkovanih slobodnih radikala, helacijom jona metala, regulacijom genske ekspresije, što posledično vodi modulaciji aktivnosti reparacionih mehanizama i enzima antioksidativne zaštite. Čelije se štite od oksidativnog stresa enzimskim i neenzimskim komponentama mehanizama antioksidativne zaštite. Među enzimskim antioksidantima ističu se superoksid dismutaza koja katalizuje razgradnju superoksid anjona na kiseonik i vodonik peroksid. Zatim, u skoro svim organizmima izloženim kiseoniku prisutan je enzim katalaza, koji katalizuje razgradnju vodonik peroksida na kiseonik i vodu. Značajnu ulogu enzimskih antioksidanata imaju i glutation peroksidaza, glutation reduktaza i glutation-S-transferaza koji su naročito prisutni u jetri i imaju i ulogu u detoksifikaciji ksenobiotika. S druge strane, u neenzimske antioksidante spadaju askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), melanin, mokraćna kiselina, glutation. Glutation se smatra centralnim antioksidantom odgovornim za prvu liniju odbranu od ROS-a. Glutation je tripeptid i sastoji se od glutaminske kiseline, cisteina i glicina, a antioksidativna svojstva poseduje zahvaljujući tiol grupi cisteina. Glutation zajedno sa glutation peroksidazom otklanja intracelularni vodonik peroksid, štiteći tako čelije od oksidativnih oštećenja. Prilikom ovog procesa redukovana forma glutationa (GSH) se konvertuje do oksidovane forme (GSSG). Zatim glutation reduktaza redukuje GSSG do GSH korišćenjem NADPH kao donora elektrona, čime se popunjava GSH „pool“.

U odnosu na svoje poreklo, različiti antioksidanti, poput katalaze, superoksid dismutaze, glutationa i mokraćne kiseline se mogu sintetisati *in vivo*, dok se drugi uglavnom unose hranom ili dijetetskim suplementima bogatim polifenolima. Pokazano je da postoji obrnuta proporcionalnost

između unosa hrane bogate antioksidantima i medicinskog bilja sa učestalošću pojave bolesti povezanih sa oksidativnim stresom kod ljudi (Mitić i sar., 2001).

#### 1.4. Biljke kao izvor biološki aktivnih komponenti

Vekovima unazad biljke su korišćene kao izvor bioaktivnih jedinjenja i upotrebljavane u lečenju različitih zdravstvenih problema kod ljudi. Pored Kine, iz koje datiraju najstariji pisani dokazi o upotrebi biljaka u medicinske svrhe, Indija je takođe poznata po svojim tradicionalnim medicinskim sistemima. Jedan od njih, koji se razvijao između 2500-500 godine pre nove ere je označen kao „Ajurveda“, čije ime znači „nauka života“, odnosno „nauka o dugovečnosti“ (Pandey i sar., 2013). Razvoj fitomedicine u Evropi je krenuo dosta kasnije, najpre u antičkoj Grčkoj, pri čemu se Hipokrat smata ocem fitoterapije, jer je njegovo delo „*Corpus Hippocraticum*“, objavljeno nakon njegove smrti, sadržalo informacije o blagotvornom dejstvu više od 400 biljaka (Antolak i Kregiel, 2017).

Polje primene farmakoloških lekova koje mi poznajemo danas se zasniva na istorijskom korišćenju biljaka. Značajni izvori o korišćenju biljaka kroz vekove potiču od mnogih drevnih i sredjevekovnih tekstova istraživača koji su imali kombinovano interesovanje za botaniku i medicinu. Stečeno etnofarmakološko znanje autohtonih naroda različitih regiona sveta se i danas koristi u potrazi za novim lekovima. Od davnina se zna da fitojedinjenja štite biljke od virusa, bakterija, gljiva, herbivora i drugih opasnosti, međutim danas se zna da su i neophodna za zaštitu ljudi od različitih bolesti. Metaboliti koje sintetišu biljke se mogu podeliti na primarne i sekundarne. Prva grupa jedinjenja je neophodna za rast i razvoj i obuhvata ugljene hidrate, proteine, lipide i nukleinske kiseline. S druge strane, sekundarni metaboliti se definišu kao jedinjenja koja pomažu biljci u preživljavanju i prevazilaženju promena sredine u kojoj se nalazi. Upravo su sekundarni metaboliti odgovorni za medicinska svojstva i lekovitost biljaka.

Grubo, sekundarni metaboliti se mogu podeliti na terpene, alkaloidne i fenolna jedinjenja (Croteau i sar., 2000; Antolak i Kregiel, 2017). Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena, važna grupa jedinjenja kod biljaka. Ova grupa jedinjenja sadrži oko 8000 strukturno različitih komponenti koje se uglavnom mogu naći u plodovima, cveću i listovima biljaka. Fenoli obuhvataju nekoliko kategorija uključujući fenolne kiseline i njihove derivate, flavonoide, tanine, stilbene, lignane, kumarine i druga jedinjenja, klasifikovana na osnovu broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata koji povezuju ove prstenove. Biosinteza mono- i polifenolnih jedinjenja podrazumeva ugljene hidrate kao prekursore i odvija se fenilpropanoidnim i flavonoidnim putevima, kao i putem šikimske kiseline. Neki od najznačajnijih fenola koji pripadaju grupi flavonoida jesu katehin, epikatehin, kvercetin, rutin i drugi, koji se mogu naći u širokom spektru voća, povrća, čajeva, začina. Pokazano je da se ovi flavonoidi karakterišu mnogobrojnim biološkim aktivnostima, pre svega značajan je njihov antioksidativni, antimikrobni, hepatoprotektivni, antigenotoksični potencijal (Ramos i sar., 2008; Bacanlı i sar., 2015; Antolak i Kregiel, 2017). Sledeća klasa jedinjenja koja se često može naći u biljkama jesu alkaloidi. To su ciklična jedinjenja koja sadrže azot, ispoljavaju alkalni pH i javljaju se kod oko 14-20% biljnih vrsta. Uglavnom se koriste u farmakologiji i terapiji različitih bolesti jer ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti: anti-inflamatornu, antivirusnu, antitumorsku, antibakterijsku, antimarijsku, anitmutagenu itd. (Moura i sar., 2007). Terpeni ili terpenoidi predstavljaju najraznovrsniju klasu sekundarnih metabolita koja broji oko 40000 različitih jedinjenja (neka među njima sadrže i fenolni prsten, pa se svrstavaju i u gornju grupu). Najpoznatija grupa jedinjenja koja pripadaju terpenima jesu karoteni i oksikarotenoidi, koji se mogu naći u različitom voću i povrću dajući im karakterističnu žutu, narandžastu ili crvenu boju. Pokazano je da terpeni, pre svega etarska ulja, ispoljavaju različite biološke funkcije poput antitumorske, antibakterijske, anti-inflamatorne, antigenotoksične (Antolak i Kregiel, 2017; Aprotosoae i sar., 2019).

### 1.4.1. Biljke kao izvor antimikrobnih jedinjenja

Iako otkriće antibiotika i njihovo uvođenje u kliničku praksu predstavlja jedno od najistaknutijih doprinosa u lečenju zaraznih bolesti, njihova nekontrolisana i neprimerena upotreba doprinosi širenju mehanizama rezistencije među bakterijama, o čemu je bilo reči u poglavlju 1.1.1. Iz tog razloga neophodno je preduzeti korake za smanjenje antibiotske rezistencije, a tome doprinosi i pronalazak novih antimikrobnih agenasa sa baktericidnim dejstvom i sa sposobnošću moduliranja bitnih faktora virulencije bakterija (Slobodniková i sar., 2016). Upravo biljke predstavljaju neiscrpan izvor novih potencijalnih antimikrobnih agenasa, pre svega njihovi sekundarni metaboliti.

Pokazano je da fenoli poreklom od biljaka mogu inhibirati rast mnogih mikroorganizama, uključujući i patogene hrane, kao i klinički važne bakterije, gljive i protozoe (Daglia, 2012). Postojanje razlika u strukturi i hemijskom sastavu među fenolnim jedinjenjima im omogućava da ostvaruju antimikrobne aktivnosti posredstvom različitih mehanizama, poput povećanja permeabilnosti i destabilizacije ćelijske membrane, ili inhibicije ćelijskih enzima. Štaviše, mehanizmi delovanja biljnih fenola se neretko razlikuju od mehanizama konvencionalno korišćenih antibiotika, što ih čini efektivnim u borbi protiv rezistentnih mikroorganizama (Górniak i sar., 2019). Ekstrakti različitog voća, poput grožđa i jabuka, kao i mnogih medicinskih i začinskih biljaka, se istražuju zbog svojih potencijalnih antimikrobnih aktivnosti. U jednoj od pilot studija na primer, ispitan je antibakterijski efekat ekstrakta grožđa prema 14 odabranih patogenih hrane i uzročnika kvarenja hrane (Özkan i sar., 2004), pri čemu je pokazan bakteriostatski efekat prema *E. coli* O157:H7 i *S. aureus*. Ekstrakti semena grožđa su takođe bili efikasni u suzbijanju rasta bakterija povezanih sa hranom kao što su *L. monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp. (Jayaprakasha i sar., 2003). Dalje, brojne studije su rađene u cilju korišćenja fenolnih jedinjenja kao prirodnih konzervanasa u hrani. Na primer, rad Sagdic i sar. (2011) se fokusira na *in situ* ispitivanje antimikrobnog efekta ekstrakta grožđa u goveđim burgerima. Uzorci pet različitih ekstrakata su dodati u goveđe burgere i uspešno su inhibirali rast patogenih bakterija poput *Salmonella* spp., *S. aureus*, kao i plesni i kvasaca. Eksperimenti Hayrapetyan i sar. (2012) su pokazali da ekstrakt nara bogat flavonoidima inhibira rast *L. monocytogenes* u mesnim paštetama na temperaturi od 4°C. Pored poznatih mehanizama delovanja fenolnih komponenti koji uključuju suzbijanje faktora virulencije, menjanje fluidnosti membrane, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina, bitno je naglasiti da ova jedinjenja imaju sposobnost sinergističkog delovanja sa antibioticima, povećavajući tako njihovu efektivnost, a ujedno i smanjujući terapijske doze antibiotskih lekova (Górniak i sar., 2019).

Prisustvo i broj hidroksilnih grupa kod fenolnih jedinjenja su odgovorni za njihova antioksidativna svojstva, a promena pozicija grupe može dosta uticati na njihovu antimikrobnu aktivnost i interakciju sa strukturom ćelijske membrane. Na primer, u slučaju karvakrola, smatra se da su prisustvo hidroksilne grupe i delokalizacija elektrona odgovorni za destabilizaciju membrane, što za posledicu ima smrt ćelija *B. cereus* (Ultee i sar., 2002). Određeni fenoli i ekstrakti bogati fenolima mogu ispoljiti antibiofilm i anti-QS (*quorum sensing*) aktivnosti. Obzirom da je QS mehanizam koji reguliše formiranje biofilma i produkciju toksina kod patogenih bakterija, bitno je pronaći supstance koje ispoljavaju anti-QS potencijal. U studiji koju su sprovedi Vatter i sar. (2007) ispitana je anti-QS aktivnost ekstrakata voća i začina bogatih fenolima, korišćenjem soja *Chromobacterium violaceum* CVO26/CV 31532 koji produkuje ljubičasti pigment violacein. Sinteza ovog pigmenta je pod regulacijom QS-a i odvija se posredstvom acil-homoserin lakton (AHL) autoinducera. Od ispitivanih biljaka, ekstrakti maline, grožđa i borovnice su ispoljili značajnu inhibiciju aktivnosti AHL autoinducera, posledično inhibirajući QS.

Tanini predstavljaju jednu od najvećih grupa biljnih polifenola i pokazano je da poseduju antibakterijsku aktivnost i prema gram pozitivnim i prema gram negativnim bakterijama. Na primer,

katehini su sposobni da prodiru u membranu i interaguju sa lipidnim dvoslojem, kao i da dovedu do fuzije slojeva membrane, što vodi „curenju“ ćelijskog sadržaja (Taylor i sar., 2005). Pokazano je i da epigalokatehin galat poseduje različite antibakterijske aktivnosti, uključujući ograničavanje bakterijskog rasta i invazivnih sposobnosti, kao i ispoljavanje sinergističkog dejstva sa određenim antibioticima. Dodatno, sub-inhibitorne koncentracije ovog katehina su uspešno preokrenule rezistenciju na tetraciklin (re-senzibilisale rezistentne sojeve) kod stafilokoka, inhibicijom tetraciklin efluks pumpe (Roccaro i sar., 2004). Metanolni ekstrakt nara, bogat elaginskom kiselinom, je uspešno inhibirao formiranje biofilma *S. aureus*, meticilin-rezistentnog *S. aureus* i *E. coli*, najverovatnije usled izazivanja oštećenja ćelijske membrane (Bakkiyaraj i sar., 2013).

Još jedna široko rasprostranjena grupa fenolnih jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću jesu flavonoidi, koji štite biljke od različitih biotičkih i abiotičkih stresora. Flavonoidi ispoljavaju svoje antibakterijske aktivnosti inhibicijom sinteze nukleinskih kiselina, oštećenjem ćelijske membrane i inhibicijom energetskog metabolizma (Slobodníková i sar., 2016). Pored toga, pokazano je da poseduju i antibiofilm aktivnosti. Poznato je da crveno vino pored taninske kiseline i *trans*-resveratrola sadrži i mnoge druge flavonoide, poput kvercetina, apigenina, luteolina, kao i njihove derivate. Ove komponente crvenog vina ispoljavaju visoku efikasnost u inhibiciji formiranja biofilma *S. aureus*, pri čemu se kvercetin izdvaja kao najaktivniji flavonoid (Cho i sar., 2015). Dalje, flavonoid morin je u *in vivo* i *in vitro* uslovima inhibirao formiranje biofilma i redukovao virulenciju jednog od vodećih patogenih hrane, *L. monocytogenes* (Sivaranjani i sar., 2016). Pokazano je i da rutin pospešuje antibakterijsku aktivnost drugih flavonoida, poput kvercetina i morina, ispoljavajući tako jaču inhibitornu aktivnost prema *B. cereus* i *S. Enteritidis* (Arima i sar., 2002).

#### 1.4.2. Biljke kao izvor antigenotoksičnih jedinjenja

Genotoksini, bilo da su fizičkog, hemijskog ili biološkog porekla, mogu biti uključeni u patogenezu mnogih hroničnih bolesti kod ljudi, uključujući neurodegenerativne, kardiovaskularne bolesti, artritis, kancer, hroničnu inflamaciju i druge. Poslednjih godina, istraživači su uspeli da pronađu jedinjenja koja deluju kao antigenotoksična, redukujući štetne posledice izazvane genotoksinima. Najveći deo ovih protektivnih komponenti se upravo može naći među biljkama, kako jestivim, tako i onim koje se koriste u tradicionalnoj medicini. Predloženo je da je upotreba supstanci koje ispoljavaju antimutageni i antikarcinogeni potencijal u svakodnevnom životu najbolji način prevencije kancera i genetičkih oboljenja (Ferguson, 1994). Veliki broj studija ukazuje na postojanje antigenotoksičnog potencijala voća, povrća, čajeva i njihovih pojedinačnih biološki aktivnih komponenti (Vuković-Gačić i sar., 2006a; Izquierdo-Vega i sar., 2017; López-Romero i sar., 2018).

Kada je u pitanju genoprotektivna aktivnost povrća, zabeleženo je da brokoli u različitim *in vivo* i *in vitro* studijama ispoljava antimutagenu aktivnost i uspešno redukuje učestalost hromozomskih aberacija, mikronukleusa, kao i jedno- i dvolanačanih prekida na DNK molekulu, izazvanih delovanjem B[a]p, aflatoksina B1, mitomicina C, ali i HAA, poput IQ, PhIP i MeIQx (López-Romero i sar., 2018). Pokazano je takođe i da je visok unos paradajza koji je bogat antioksidantom likopenom povezan sa smanjenem rizika od kancera prostate (Giovannucci, 1999). Dalje, antigenotoksična aktivnost nara i njegovih aktivnih komponenti je po prvi put ispitana u studiji Alekperov (2002), gde je pokazano da uspešno redukuje hromozomske aberacije izazvane delovanjem X-zraka, *N*-metil nitrozouree i ciklofosfamida. Dodatno, genoprotektivna uloga ekstrakta nara je potvrđena u istraživanju Sánchez-Lamar i sar. (2005), u kome je ekstrakt pokazao jak antioksidativni efekat i snizio stopu razmene sestrinskih hromatida uzrokovane vodonik peroksidom. Dalje, različite studije su pokazale da grejpfrut i njegove aktivne komponente naringin i naringenin predstavljaju potencijalne antigenotoksične agense. Rezultati ovih istraživanja sugerišu da grejpfrut može redukovati prekide na DNK molekulu, razmenu sestrinskih hromatida, hromozomske aberacije izazvane delovanjem IQ

mutagena, B[a]p, vodonik peroksida, X-zraka (Izquierdo-Vega i sar., 2017). Primećeno je da unos soka od grejpfruta kao i njegovih komponenti značajno suprimira aflatoksin B1-indukovanu genotoksičnost u ćelijama jetre pacova, inhibicijom enzima P450 (Miyata i sar., 2004). Najveći broj studija, kada je reč o genoprotektivnoj ulozi voća, se odnosi na ispitivanje antigenotoksičnog efekta manga i njegovih konstituenata. Pokazano je da ekstrakt manga redukuje B[a]p-indukovanu klastogenost u ćelijama koštane srži miševa, smanjujući incidencu mikronukleusa i povećavajući mitotički indeks (Prasad i sar., 2008). Dodatno, studije su pokazale da ekstrakt manga nije citotoksičan niti genotoksičan, već da poseduje antiapoptotsko i radioprotektivno dejstvo i da svoje genoprotektivno delovanje ispoljava zahvaljujući dobroj antioksidativnoj aktivnosti i sposobnosti inhibicije CYP enzima (Izquierdo-Vega i sar., 2017). Generalno gledano, biljke predstavljaju zaista impresivan izvor mnogih antioksidanata poput flavonoida, karotenoida, etarskih ulja i njihovih terpenskih komponenti, folne kiseline, askorbinske kiseline, tokoferola. Jaka antioksidativna aktivnost je zabeležena za bobičasto voće, citrusne, suve šljive, maslinovo ulje, spanać, krompir itd. (Veskoukis i sar., 2012), kao i za vitamine E i C (Nikolić i sar., 2004; 2006) i za etarsko ulje bosiljka (Berić i sar., 2008).

Zabeležena su i genoprotektivna svojstva raznovrsnih čajeva bogatih polifenolima. Na primer, čaj od kamilice je najčešće konzumiran čaj, koji je inače bogat mnogobrojnim biološki aktivnim konstituentima, ali njegova najviše izučavana fitojedinjenja u smislu antigenotoksičnosti jesu  $\alpha$ -bisabolol i apigenin. Istraživanje Gomes-Carneiro i sar. (2005) je pokazalo da  $\alpha$ -bisabolol ispoljava antimutageni potencijal *in vitro* na bakterijskom test modelu, i to prema velikom broju direktnih i indirektnih mutagena, uključujući 4NQO, B[a]p, aflatoksin B1 i dr. Takođe, antigenotoksičnost  $\alpha$ -bisabolola i apigenina protiv vodonik peroksid-indukovanih oštećenja je demonstrirana na modelu *Drosophila melanogaster*, istovremeno sugerišući da antioksidativnost ovih fenola može biti delimično odgovorna za uočenu aktivnost (Anter i sar., 2011). Velika pažnja istraživača je usmerena i na polifenole prisutne u zelenom i crnom čaju i semenima grožđa. Najzastupljeniji polifenoli u zelenom čaju su galokatehin, epigalokatehin i epigalokatehin-3-galat (EGKG). Studije su pokazale da EGKG uspešno inhibira UVB-indukovano oslobađanje hidrogen peroksida u keratinocitama, redukujući tako oštećenja nastala zračenjem. Na životinjskim modelima, oralna primena polifenola iz čaja dovela je do zaštite od UVB-indukovane inflamacije i karcinogeneze. Dugotrajno hranjenje miševa polifenolima, a zatim izlaganje UV zračenju je rezultovalo u blokadi edema, sprečavanju trošenja endogenih antioksidanata kože i inhibiciji ekspresije inflamacionog markera ciklooksigenaze-2 (COX-2). Semena grožđa su takođe veoma bogata polifenolima, među njima upravo je resveratrol odgovoran za mnogobrojne biološke funkcije ovih komponenti. Pokazano je da resveratrol utišava UVA-indukovani oksidativni stres, snižavajući ekspresiju Keap1 proteina, samim tim omogućavajući ekspresiju Nrf2 faktora odgovornog za regulaciju brojnih antioksidativnih enzima. Uz to, pokazano je da redukuje štetne posledice UVB zračenja *in vivo* na miševima, inhibirajući inflamaciju i sprečavajući lipidnu peroksidaciju (Dunaway i sar., 2018). Dodatno, primenom brojnih testova na prokariotskim i eukariotskim ćelijama pokazana je i antigenotoksičnost etarskih ulja žalfije i bosiljka, kao i njihovih različitih frakcija i čistih supstanci, u odnosu na UV zračenje (Knežević-Vukčević i sar, 2005; Vuković-Gaćić i sar., 2006a; 2006b; Stanojević i sar., 2008).

### 1.5. Opšte odlike roda *Gentiana*

Rod *Gentiana* (familija Gentianaceae) broji preko 400 vrsta, uglavnom rasprostranjenih u Jugoistočnoj Aziji, Evropi i Severnoj Americi. Pojedine vrste ovog roda se koriste u narodnoj medicini još od davnina. Na primer, tradicionalni kineski lekovi „*Longdan*“ i „*Qinjiao*“ dobijeni od biljaka roda *Gentiana* se koriste već 2000 godina kao hepatoprotektivni i anti-inflamatorni agensi. Rod je dobio ime po ilirskom kralju Genciju koji je smatrao da je koren lincure delotvoran u lečenju kuge još 167. godine pre nove ere (Mirzaee i sar., 2017). Zbog svojih izvanrednih medicinskih svojstava, biljke ovog roda su

tema mnogih fitohemijskih istraživanja u farmakologiji od 1960-ih. Fitohemijske analize različitih delova biljaka roda *Gentiana* su uglavnom fokusirane na koren i rizom, ali postoje i studije koje se bave ispitivanjem farmakoloških aktivnosti nadzemnih delova, pre svega listova i cvetova (Pan i sar., 2016). Više od 600 sekundarnih metabolita je izolovano iz biljaka ovog roda i pokazano je da su bogate iridoidima, ksantonima i flavonoidima. Neka od ovih jedinjenja poseduju izuzetne biološke aktivnosti poput antimikrobne, antioksidativne, hepatoprotektivne, anti-inflamatorne, radioprotektivne, kao i sposobnosti stimulacije DNK reparacije. Iridoidi predstavljaju veliku grupu ciklopenta[c]piran monoterpenoida koji ispoljavaju mnogobrojne farmakološke aktivnosti. Fitohemijske analize su pokazale da su biljke ovog roda bogate iridoidima i sekoiridoidima, poput loganske kiseline, genciopikrozida, sverozida, svertiamarina, amarogentina. Kao glavne komponente vrsta *Gentiana* roda, smatra se da su iridoidi povezani sa njihovim hepatoprotektivnim potencijalom (Jiang i sar., 2005). Dodatno, iridoidna jedinjenja podstiču lučenje želudačnog soka i olakšavaju proces varenja. Ksantoni, česti među biljkama ovog roda, su dibenzo- $\gamma$ -piron heterociklična jedinjenja koja se mogu naći u formi mono- ili polimetil etara ili u formi glikozida. Do sada je opisano oko 50 ksantona izolovanih iz *G. dinarica* Beck, *G. lutea* L., *G. kochiana* Acaulis, *G. tizuensis* Franchet i *G. utriculosa* L. Pokazano je da su nadzemni delovi biljaka roda *Gentiana* bogatiji ksantonima, među kojima se ističu izogentizin, gentizin, mangiferin itd. Što se tiče flavonoida, među biljkama ovog roda najzastupljeniji su flavoni kao što su homoorientin, izoviteksin i njihovi derivati, koji se ističu pre svega po antioksidativnim i anti-inflamatornim aktivnostima (Jiang i sar., 2020).

### 1.5.1. *Gentiana lutea* – opšte karakteristike

*Gentiana lutea*, u našem narodu je najpoznatija kao lincura, ali se u pojedinim krajevima lokalno označava i kao goreč, zelje od srca/trava od srca, vladisavka, licijan, raven itd. (Tucakov, 1996). Ovo je planinska biljka koja raste na nadmorskim visinama od 800-2500 metara i najčešće se može naći na travnatim pašnjacima subalpskih i alpskih planinskih predela Južne i Srednje Evrope (EMA, 2018). Danas je poznato da su tri podvrste distribuirane širom Evrope: subsp. *lutea* L. (prisutna u svim krajevima osim Balkanskog poluostrva i Istočnih Alpa); subsp. *symphiandra* (Murb.) Hayek. (spontano raste u predelu Istočnih Alpa i Balkanskog poluostrva); subsp. *vardjanii* Wraber. (prisutna u predelima Jugoistočnih Alpa). *G. lutea* je višegodišnja biljka, visine 1-2 metara, sa širokim elipsoidnim listovima dužine 10-30 cm i širine 4-12 cm i dobro razvijenim podzemnim organima, pri čemu glavni koren može biti dužine do 1 metra i težine do 7 kg. Cveta od jula do avgusta, a cvetovi su žute boje, dvopolni (Slika 7.). U Srbiji samoniklo raste *G. lutea* subsp. *symphiandra* (Murb.) Hayek. na planinskim predelima Stare planine, Zlatibora, Tare, Suvobora, Maljena, Kopaonika (Tucakov, 1996; Radanović i sar., 2014). Prema podacima Evropske agencije za lekove prikazanom u odgovarajućem izveštaju (EMA, 2018) osušeni koren *G. lutea* (*gentianae radix*) se koristi i kao zvanični lek u evropskoj farmakopeji za lečenje blagih gastrointestinalnih problema i poboljšanje apetita. Glavna farmakološki aktivna jedinjenja u korenu jesu iridoidi i sekoridoidi koji daju i specifičan gorak ukus lincuri. Najzastupljeniji među njima jeste genciopikrozid (udeo u ekstraktima iznosi 2-8%), zatim sverozid i svertiamarin, loganska kiselina i u maloj meri može se naći acilglukozid amarogentin (0,025-0,4%). Zanimljivo je da je vrednost gorčine genciopikrozida 12000, dok je amarogentina čak 58 miliona, čineći ga tako jedinjenjem sa najvećim poznatim indeksom gorčine. Što se tiče prisustva ksantona u korenu lincure zabeleženo je oko 1% ovih jedinjenja, a najzastupljeniji su gentizin, izogentizin, metilgentizin, 1-hidroksi-3,7-dimetoksiksanton i dr. i upravo je ova grupa jedinjenja odgovorna za žuto-braon boju korena. U veoma malim procentima u korenu se mogu naći i flavonoidi, kao što si izoviteksin-4-O-glukozid i izoorientin-4-O-glukozid. Količinski najzastupljenija jedinjenja u korenu lincure jesu ugljeni hidrati (oko 30-50% suve mase korena), među kojima su najčešći gentibioza, saharoza, gentianoza, glukoza, fruktoza, pektin. U korenu su takođe pronađeni i tragovi



alkaloida gentianina, fitosterola, triterpena i esencijalnog ulja (Prakash i sar., 2017). Treba napomenuti da količina ugljenih hidrata i gorkih jedinjenja varira tokom godišnjih doba. Sadržaj šećera opada u proleće, a svoj maksimum dostiže u julu, dok suprotno tome, gorke materije dostižu maksimum svog sadržaja u proleće. Efikasnost ekstrakcije hemijski aktivnih jedinjenja iz korena i lista žute lincure zavisi i od rastvarača koji se koriste za ekstrakciju. Komercijalna priprema ekstrakta korena lincure uglavnom podrazumeva ekstrakciju perkolacijom sa 40-70% etanola u vodi, čime se dobija ekstrakt karakterističnog gorkog ukusa i arome (EMA, 2018).



Slika 7. *Gentiana lutea* u prirodnom staništu na planini Tari (preuzeto iz Nastasijević, 2016; autor fotografije Tatjana Marković, Institut za proučavanje lekovitog bilja, „Dr Josif Pančić“, Beograd)

Iako se koren žute lincure koristi kao oficijalni lek u farmaceutskoj industriji, nadzemni delovi biljke takođe sadrže biološki aktivna jedinjenja koja mogu da imaju ulogu u fitoterapiji. U nadzemnim delovima *G. lutea* se mogu naći sekoiridoidi, pri čemu je najzastupljeniji genciopikrozid. Što se tiče ksantona, cvetovi, a pre svega listovi, se karakterišu značajnom količinom mangiferina (Menković i sar., 2000). Mangiferin pripada grupi C-glukoksantona, obzirom da je njegov šećer prikačen za jezgro ksantona preko C-C veze (Jensen i Schripsema, 2002). Takođe, od ksantona zabeleženo je i prisustvo izogentizina, izogentizin-3-O-primverozida, a od C-glukoflavona pronađeni su homoorientin i izoviteksin (Menković i sar. 2000; Šavikin i sar., 2009; Kušar i sar. 2010).

Koren lincure, odnosno *Gentianae radix*, kako se stručno naziva u fitofarmaciji, se koristi i u kombinaciji s mnogim drugim gorkim i/ili aromatičnim biljkama i biljnim preparatima, uglavnom za lečenje tegoba želuca i jetre, odnosno generalno za ublažavanje gastro-intestinalnih tegoba. Najčešće se kombinuje sa zovom, bokvicom, kurkumom, jasenom, vilinim sitom itd. Pored toga, koren lincure je jedan od aktivnih sastojaka biljnih medicinskih preparata koji se koriste za ublažavanje simptoma prehlade u mnogim evropskim zemljama. Do danas su dokazane mnogobrojne biološke aktivnosti ekstrakata *G. lutea* i njenih konstituenata na *in vitro* i *in vivo* modelima, kao što su antioksidativna, anti-inflamatorna, antimikrobna, hepatoprotektivna, antitumorska i druge, što ukazuje na širok spektar delovanja ove biljke i opravdava njeno dalje istraživanje i dugotrajnu upotrebu u tradicionalnoj medicini različitih naroda.

### 1.5.2. Problem ugroženosti *G. lutea* i alternativna rešenja

Pored upotrebe u tradicionalnoj medicini, kao i za pripremu zvaničnog leka mnogih farmakopeja, koren lincure je našao svoju primenu i u prehrambenoj industriji, pre svega u pripremi mnogih alkoholnih pića. Dodatno, u studiji koju su sprovedi Azman i sar. (2015) ekstrakt korena lincure je uspešno sprečio promenu boje goveđih burgera i oksidaciju lipida, ukazujući na potencijalnu ulogu ekstrakta *G. lutea* kao aditiva hrane. Tokom prethodnih decenija tržište biljne sirovine – korena lincure, zadovoljavano je prikupljanjem iz prirodnih resursa. Međutim, sakupljanje korena *G. lutea* iz njenih prirodnih staništa bez ikakve regulacije predstavlja glavnu pretnju za opstanak ove vrste. Zbog nekontrolisane eksploatacije lincure sa svojih staništa, krajem prošlog veka skoro sve zemlje Evrope su zabranile sakupljanje lincure iz prirode. S druge strane, potražnja za ovom biljkom ima tendenciju daljeg rasta. Godišnja potražnja za osušenim korenom lincure u Evropi je nedavno iznosila oko 1500 tona (Radanović i sar., 2014). U Srbiji je sakupljanje lincure zabranjeno od 1993., Uredbom o zaštiti prirodnih retkosti (*Sl. Glasnik RS 53/93 i 93/93*), što je doprinelo razvoju plantažnog gajenja *G. lutea* u planinskim predelima južnih i jugozapadnih delova zemlje. Metodom plantažnog gajenja se postiže zaštita prirodne populacije ove ugrožene biljne vrste, a istovremeno se obezbeđuje kontrolisana proizvodnja kvalitetnog biljnog materijala za potrebe domaćeg i svetskog tržišta (Marković i Radanović, 2011). Iako plantažno gajenje predstavlja odličnu alternativu sakupljanju samonikle biljke, ipak postoje određeni nedostaci. Kako bi se obezbedio farmakološki upotrebljiv materijal, potrebno je da kultivacija traje oko 4-6 godina, a njen uspeh zavisi od mnogih faktora, pre svega klimatskih uslova (Radanović i sar., 2016). Uzimajući u obzir važnost ove biljke, još jedan način kojim bi se obezbedila dodatna produkcija zdravog biljnog materijala jeste *in vitro* kultivacija u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Tehnika *in vitro* kultivacije, kao alternativna metoda dobijanja biljnog materijala, se karakteriše prednostima poput dostupnosti biljnog materijala tokom čitave godine, zatim povećanim stepenom razmnožavanja i potpunom nezavisnošću od klimatskih faktora, kao i odsustvom fitopatogenih virusa, bakterija i drugih parazita. Biljni materijal poreklom iz *in vitro* kulture može biti pogodan za rekultivaciju biljne vrste kao i za različita fitohemijska i istraživanja bioloških aktivnosti (Todorović i sar., 2008; Perić i sar., 2012; Skorić i sar., 2012; Belić i sar., 2020).

Među tehnikama *in vitro* gajenja, smatra se da mikropropagacija poseduje najveći komercijalni i ekonomski značaj za *ex situ* zaštitu retkih i ugroženih lekovitih biljaka. Uprkos mnogobrojnim opsežnim i uspešnim istraživanjima širom sveta, uspostavljanje *in vitro* kulture vrste roda *Gentiana* se pokazalo veoma teškim, pre svega zbog njihovog prirodno niskog kapaciteta regeneracije (Tasheva i Kosturkova, 2013). Prvi radovi o uspostavljanju *in vitro* kulture vrste roda *Gentiana* potiču iz 80-ih godina prošlog veka, kada su Wesolowska i sar. (1985) uspešno idukovali kalogenezu kod vrsta *G. punctata* i *G. panonica*, kao i organogenezu i rizogenezu kod vrsta *G. cruciata* i *G. purpurea*. Sledećih godina, istraživači su se bavili istraživanjem osnovnih faktora i zahteva biljaka za uspostavljanje *in vitro* kulture i mikropropagacije kod različitih vrsta roda *Gentiana*, pri čemu su korišćeni različiti eksplantati. Momčilović i sar. (1997) su koristili segmente stabljike i meristemskog tkiva kao eksplantate za inicijaciju kulture tkiva i indukciju formiranja izdanaka *de novo* kod vrsta *G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* i *G. acaulis*. S druge strane, eksplantati listova su korišćeni za indukciju izdanaka vrsta *G. macrophylla* i *G. kurroo* Royle (Cao i sar., 2005; Fiuk i Rybczyński, 2008). Iako su *in vitro* kulture mnogih vrsta roda *Gentiana* u prethodnim istraživanjima uspešno uspostavljane, uključujući i *G. lutea*, podaci o njihovim biološkim aktivnostima su oskudni i svakako je neophodno obogatiti ih.

## 2. Ciljevi istraživanja

Rezistencija bakterija na konvencionalne antibiotike, kao i problem kontaminacije hrane bakterijama koje izazivaju intoksikacije i infekcije kod ljudi predstavljaju veliki problem današnjice. S druge strane, izloženost organizma različitim genotoksičnim agensima može dovesti do oštećenja na molekulu DNK, što može voditi razvoju mnogih bolesti. Zbog toga je važno identifikovati potencijalne agense prirodnog porekla sa antimikrobnom aktivnošću i potencijalom u zaštiti DNK molekula. Imajući u vidu navedene činjenice, predmet ove doktorske disertacije je ispitivanje biološke aktivnosti biljke lincure (*Gentiana lutea* subsp. *symphiandra* (Murb.) Hayek). S obzirom da se ona već koristi u prehrambenoj industriji, prvi deo disertacije se bavi uvrđivanjem antibakterijskog potencijala prema čestim kontaminantima hrane, kao i detaljnijom analizom njene genoprotektivne aktivnosti prema mutagenima iz hrane. Dodatno, kako bi se proširila saznanja o antigenotoksičnim aktivnostima, ispitana je mogućnost ekstrakata lincure da ispolje UV-protektivni efekat. Uz to, zbog činjenice da je lincura ugrožena vrsta, ispitivana je i biološka aktivnost biljke koja je uspostavljena u *in vitro* kulturi.

Shodno navedenim činjenicama, glavni ciljevi istraživanja su bili sledeći:

- 1) Priprema i hemijska analiza 50% vodeno-etanolnih i metanolnih ekstrakata *G. lutea*;
- 2) Ispitivanje antimikrobnog potencijala ekstrakata i odabranih konstituenata lincure prema bakterijama kontaminantima hrane;
- 3) Analiza antigenotoksičnog efekta ekstrakata i odabranih konstituenata lincure prema mutagenima iz hrane;
- 4) Analiza antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure prema UV zračenju;
- 5) Ispitivanje uloge mehanizama antioksidativne zaštite u uočenoj antigenotoksičnosti.

Za ostvarivanje glavnih ciljeva definisani su brojni konkretni zadaci istraživanja:

- Priprema biljnih ekstrakata:
  - uspostavljanje *in vitro* kulture *G. lutea* u cilju dobijanja biljnog materijala nadzemnih i podzemnih delova;
  - ekstrakcija biljnog materijala dobijenog sa plantaža primenom 50% vodeno-etanolnog rastvora (v/v);
  - ekstrakcija biljnog materijala dobijenog sa plantaža i iz *in vitro* kulture primenom 100% metanola;
- Hemijska karakterizacija ekstrakata:
  - kvalitativna i kvantitativna analiza svih pripremljenih ekstrakata primenom UPLC-PDA MS/MS analize;
  - određivanje ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida u ekstraktima kolorimetrijskim metodama;
- Ispitivanje antimikrobnog efekta ekstrakata i konstituenata *G. lutea* prema odabranim bakterijskim sojevima:
  - utvrđivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija primenom mikrodilucione metode;
  - ispitivanje inhibicije formiranja biofilma odabranih sojeva primenom kristal violet metode za bojenje biomase biofilma;
- Analiza antigenotoksičnog potencijala ekstrakata i konstituenata *G. lutea* prema 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]hinolin (IQ) i 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP) mutagenima u bakterijskom i sisarskom *in vitro* test modelu:
  - utvrđivanje minimalnih inhibitornih koncentracija ekstrakata i mutagena na soju *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002 primenom mikrodilucione metode;

- ispitivanje genotoksičnog potencijala ekstrakata i mutagena na soju *S. typhimurium*, u odsustvu i prisustvu S9 frakcije, primenom SOS/*umuC* testa;
- ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata prema mutagenima na soju *S. typhimurium*, u prisustvu S9 frakcije, primenom SOS/*umuC* testa;
- ispitivanje citotoksičnog potencijala ekstrakata, odabranih konstituenata i mutagena na HepG2 ćelijama primenom MTT testa;
- ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata, odabranih konstituenata i mutagena na HepG2 ćelijama primenom alkalnog komet testa;
- analiza antigenotoksičnog potencijala ekstrakata i odabranih konstituenata prema mutagenima na HepG2 ćelijama primenom alkalnog komet testa;
- Analiza antigenotoksičnog potencijala ekstrakata *G. lutea* prema UVC i UVA zračenju na sisarskom *in vitro* test modelu:
  - ispitivanje citotoksičnog potencijala ekstrakata na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom MTT testa;
  - ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom alkalnog komet testa;
  - uspostavljanje neletalnih i genotoksičnih doza UVC i UVA zračenja na MRC-5 i Hs 294T ćelijama, preliminarnim određivanjem vijabilnosti uz pomoć tripan plavog i primenom alkalnog komete testa;
  - analiza antigenotoksičnog potencijala ekstrakata prema UVC i UVA zračenju na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom alkalnog komet testa;
- Ispitivanje uloge antioksidativne zaštite u uočenoj antigenotoksičnosti:
  - određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata i konstituenata primenom DPPH, TBA, FRAP, CUPRAC testova i testa heliranja jona gvožđa;
  - praćenje uticaja 50% vodeno-etanolnih ekstrakata i odabranih konstituenata na ekspresiju Nrf2 transkripcionog faktora na HepG2 ćelijama primenom qRT-PCR metode;
  - ispitivanje uticaja pojedinačnih tretmana 50% vodeno-etanolnim ekstraktima, odabranim konstituentima i mutagenima IQ i PhIP, kao i njihovim koretmanima, na sadržaj i odnos redukovano i oksidovanog glutationa u HepG2 ćelijama, primenom komercijalnog kita.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Biljni materijal

Biljni materijal korišćen u ovoj disertaciji je gajen plantažno, kao i u *in vitro* uslovima, a u oba slučaja za umnožavanje i gajenje biljke korišćena su semena *Gentiana lutea* subsp. *symphiandra* (Murb.) Hayek, koja su originalno prikupljena sa prirodnih staništa planine Suvobor, Zapadna Srbija (Menković i sar., 2000; Marković i sar., 2019). Plantažno gajenje vršeno je u komercijalnim rasadnicima Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd, Srbija, lociranim u Nacionalnom parku „Tara“, Srbija (760 m nadmorske visine, N 44° 08'10" E 20°11'07"), dok je uspostavljanje *in vitro* kulture vršeno na Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd, Srbija. Vaučer vrste (No15795) je deponovan u herbarijumu Instituta za Botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet. Ekstrakti korena i listova plantažno gajene lincure koji su korišćeni u ovom radu dobijeni su od sedmogodišnjih biljaka sakupljenih sa plantaža u julu 2017. godine, dok su *in vitro* ekstrakti dobijeni sa ožiljenih biljaka gajenih tokom 2016. godine.

##### 3.1.2. Čista jedinjenja

Prilikom hemijske analize ekstrakata lincure, kao i ispitivanja određenih bioloških aktivnosti korišćena su sledeća čista jedinjenja: genciopikrozid, sverozid, svertiamarin, izogentizin, mangiferin, izoviteksin, homoorientin (Phytolab GmbH, Nemačka) i loganska kiselina (Extrasynthese, Francuska). Za testove biološke aktivnosti su sva jedinjenja, izuzev genciopikrozida, rastvarana u DMSO-u (primarni stok 5 mg mL<sup>-1</sup>). Genciopikrozid je rastvaran u dH<sub>2</sub>O (primarni stok 5 mg mL<sup>-1</sup>).

##### 3.1.3. Rastvori za testove antioksidativnosti

###### 3.1.3.1 DPPH test

###### DPPH reagens

DPPH	7,8 g
Metanol	100 mL

###### Vitamic C (askorbinska kiselina)

Primarni stok 10 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoren u dH<sub>2</sub>O.

###### 3.1.3.2. TBA test

###### Rastvor lipozoma

L- $\alpha$ -fosfaditilholin	1 g
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	10mL

###### 0,01M Vitamin C (askorbinska kiselina)

Vitamin C	0,06 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

###### Butil-hidroksitoluen (BHT)

Primarni stok 200 mg mL<sup>-1</sup> rastvoren u DMSO-u.

<b>0,01M FeSO<sub>4</sub></b>	
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,21 g
dH <sub>2</sub> O	10 mL
<b>0,067M Pufer (pH 7,4) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,69 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL
<b>0,1M EDTA</b>	
EDTA	1,86 g
dH <sub>2</sub> O	50 mL
<b>TBA reagens</b>	
Tribarbiturna kiselina (TBA)	3 g
Trihlor sirćetna kiselina (TCA)	120 g
Perhlorna kiselina (HClO <sub>4</sub> )	10,4 mL
dH <sub>2</sub> O	800 mL
<b>3.1.3.3. Heliranje jona gvožđa</b>	
<b>2mM FeCl<sub>2</sub></b>	
FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,0397 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL
<b>5mM Ferozin</b>	
Ferozin	0,266 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL
<b>Limunska kiselina</b>	
Primarni stok 10 mg mL <sup>-1</sup> , rastvoren u dH <sub>2</sub> O.	
<b>EDTA</b>	
Primarni stok 10 mg mL <sup>-1</sup> , rastvoren u dH <sub>2</sub> O.	
<b>3.1.3.4. FRAP test</b>	
<b>1% Kalijum-fericijanid (C<sub>6</sub>N<sub>6</sub>FeK<sub>3</sub>)</b>	
Kalijum-fericijanid	1 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL
<b>10% Trihlor sirćetna kiselina (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)</b>	
C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	10 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL
<b>0,1% FeCl<sub>3</sub></b>	
FeCl <sub>3</sub>	0,176 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

**Fosfatni pufer (pH 6,6)****A komponenta**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2,76 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

**B komponenta**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	3,56 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

Komponente A (67,5 mL) i B (37,5 mL) su pomešane kako bi se dobio fosfatni pufer.

**Vitamin C (askorbinska kiselina)**

Primarni stok 10 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoren u dH<sub>2</sub>O.

**3.1.3.5. CUPRAC test****10mM CuCl<sub>2</sub>**

CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,085 g
dH <sub>2</sub> O	50 mL

**1M Amonijum-acetatni pufer (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) (pH 7)**

CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	3,85 g
dH <sub>2</sub> O	50 mL

**7,5mM Neokuproin**

Neokuproin prah	0,078 g
96% EtOH	50 mL

**Vitamin E (α-tokoferol)**

Primarni stok 2 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoren u DMSO-u.

### 3.1.4. Biološki materijal

#### 3.1.4.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu za ispitivanje antibakterijskog potencijala dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi	Poreklo	Kolekcija
<b>Gram pozitivne bakterije</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	ATCC	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ATCC	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	ATCC	
Meticilin senzitivni <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) ATCC 25923	ATCC	Katedra za mikrobiologiju, Univezitet u Beogradu, Biološki fakultet
Meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	ATCC	
<b>Gram negativne bakterije</b>		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	ATCC	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	ATCC	

Dodatno, u SOS/*umuC* testu je korišćen soj *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002 (*hisG46*  $\Delta$  (*bio chlD uvrB gal*) *rfa*/pSK1002; Mortelmans i Zeiger, 2000). Ovaj soj je auksotrof za histidin, nosi mutaciju u *rfa* genu, čime mu je narušena struktura liopolisaharidnog sloja ćelijske membrane, što dovodi do veće permeabilnosti. Soj je takođe mutant za *lacZ* gen (mutacija je na hromozomu), kao i mutant za *uvrB* gen, odnosno ima defektnu nukleotidnu ekscizionu reparaciju čime je indukcija SOS odgovora dodatno podstaknuta. Takođe, soj nosi i višestruke kopije plazmida pSK 1002 sa fuzijom *umuC::lacZ* gena i genom za rezistenciju na ampicilin. Fuzija *umuC::lacZ* na plazmidu stavlja reporter gen za  $\beta$ -galaktozidazu pod kontrolu SOS regulona, dok *lacZ* mutacija na hromozomu isključuje ekspresiju ovog gena, što onemogućava pojavu  $\beta$ -galaktozidaze u konstitutivnim uslovima.

#### 3.1.4.2. Ćelijske linije

U ovom radu korišćena su tri tipa humanih ćelijskih linija: normalni fetalni fibroblasti pluća (**MRC-5**, ECACC 84101801), ćelije melanoma (**Hs 294T**, ATCC HTB-140) i ćelije hepatocelularnog karcinoma (**HepG2**). MRC-5 i Hs 294T ćelijske linije su dobijene od dr Dragane Četojević-Simin sa Onkološkog Instituta Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija, dok su HepG2 dobijene od dr Bojane Žegure sa Nacionalnog Instituta za Biologiju, Ljubljana, Slovenija.

### 3.1.5. Hranljive podloge i rastvori za rad sa bakterijskim kulturama

#### LB-(Luria Bertani bujon)

Bakto tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL



**LA-(Luria Bertani agar)**

Bakto tripton	10 g
Ekstrak kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**MHB-(Mueller-Hinton bujon)**

MHB prah	21 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**MHA-(Mueller-Hinton agar)**

MHB prah	21 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**BHI-(Brain Heart infusion bujon)**

BHI prah	37 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**BHA-(Brain Heart infusion agar)**

BHI prah	37 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**1xTGA**

Tripton	10 g
NaCl	5 g
HEPES	11,9 g
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	980 mL

Svi medijumi su nakon pripreme sterilisani u autoklavu (20 minuta, na 121 °C). Posebna procedura, korišćena u pripremi 1xTGA, obuhvatala je sledeće: Nakon rastvaranja u bidestilovanoj vodi, pH vrednost medijuma je doterana na  $7\pm 0,2$  i medijum je sterilisan u autoklavu (20 minuta, na 121 °C). Dodatno, rastvoreno je 2g glukoze u 20 mL (1% glukoza) bidestilovane vode i rastvor je autoklaviran. Nakon autoklaviranja oba rastvora, dodata je 1% glukoza u 1xTGA. Pošto se medijum ohladio, dodato je 50 mg ampicilina.

**Streptomycin**

Primarni stok 20 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoren u dH<sub>2</sub>O

Radni stok - 1 mg mL<sup>-1</sup>

**Resazurin**

Primarni stok koncentracije 0,675 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoren u dH<sub>2</sub>O.

**Kristal violet (0,1%)**

Kristal violet prah	0,1 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

**B-pufer**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10,90 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2,75 g
KCl	0,352 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,125 g
SDS	0,5 g
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	500 mL

pH je doteran na 7±0,2 i rastvor je autoklaviran. Pre upotrebe, na dan eksperimenta, dodato je 1,35 mL β-merkaptioetanol, a pufer je čuvan na 4 °C.

**1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	17,8 g
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	100 mL

**1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12 g
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	100 mL

**0,1M Fosfatni pufer**

1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,8 mL
1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	21,2 mL
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	do 500 mL

pH je doteran na 7±0,2 i rastvor je sterilisan u autoklavu i čuvan na 4 °C.

**1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99 g
Bidestilovana H <sub>2</sub> O	1000 mL

**ONPG-(O-nitrofenil-β-galaktopiranozid)**

ONPG	180 mg
0,1M Fosfatni pufer	40 mL

Rastvor ONPG-a se pravi na dan eksperimenta i čuva do upotrebe na 4 °C.

**Bakterijska suspenzija *S. typhimurium* sa miksom za metaboličku aktivaciju (za 5 mL bakterijske suspenzije u 10% S9 miksa)**

Smeša MgCl <sub>2</sub> -KCl	100 μL
0,2M G-6-P	125 μL
0,2M NADP	500 μL
0,2M Fosfatni pufer	2,5 mL
S9	500 μL
1xTGA sa bakterijskom kulturom	1,5 mL

Pre dodavanja bakterijske suspenzije potrebno je S9 smešu filtrirati (filter 0,22  $\mu\text{m}$ ) i staviti na led.

### 0,2M Fosfatni pufer

0,2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	440 mL
0,2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	100 mL
Doterati pH na 7,4.	

### Mešavina $\text{MgCl}_2$ -KCl

KCl	61,5 g
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	40,7 g
dH <sub>2</sub> O	500 mL

### 3.1.6. Hranljive podloge i rastvori za rad sa humanim ćelijskim linijama

Za gajenje **MRC-5** i **Hs 294T** ćelijskih linija korišćen je **DMEM** medijum (eng. *Dulbecco's modified eagle's medium*) sa 2 mM L-glutaminom, dodatkom fetalnog goveđeg seruma (FBS, eng. *Fetal bovine serum*) i rastvora smeše antibiotika penicilina (100 U  $\text{mL}^{-1}$ ) i streptomocina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### DMEM radni medijum (zapremina 50 mL)

DMEM medijum	44,5 mL
FBS	5 mL
Penicilin/streptomicin	0,5 mL

Za gajenje **HepG2** ćelijske linije korišćen je **Williams' medijum E** sa dodatkom 2 mM L-glutamina, FBS-a i smeše rastvora antibiotika penicilina (100 U  $\text{mL}^{-1}$ ) i streptomocina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### Williams' E radni medijum (zapremina 50 mL)

Williams' medijum E	42 mL
FBS	7,5 mL
Penicilin/streptomicin	0,5 mL

#### Medijum za zamrzavanje (zapremina 1 mL)

DMEM/ Williams' medijum E	550 $\mu\text{L}$
DMSO (krioprotektant)	100 $\mu\text{L}$
FBS	350 $\mu\text{L}$

#### 1xPBS (eng. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

10xPBS	5 mL
dH <sub>2</sub> O	45 mL

#### Tripsin (0,1%)

Tripsin	1 g
EDTA	0,1 g
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Glukozomohidrat	1 g
$\text{NaHCO}_3$	0,84 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**MTT (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid)**

primarna koncentracija 5 mg mL<sup>-1</sup> rastvorena je u 1 x PBS-u. Rastvor je profiltriran (filter 0,22 µm) i čuvan na 4 °C.

**Tripan plavo (0.4 %)**

Tripan plavo prah	0,4 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

**Rastvor za lizu ćelija (pH 10)**

NaCl	146,6 g
EDTA	37,2 g
Tris	1,21 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

Nakon podešavanja pH rastvora, korišćenjem 10M NaOH, dodat je **1% Triton X-100**.

**Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)**

10 M NaOH	40,5 mL
0,2 M EDTA	6,75 mL
dH <sub>2</sub> O	1302,75 mL

**Rastvor za neutralizaciju (pH 7,5)**

Tris	48,44 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

pH vrednost rastvora za neutralizaciju je podešena dodavanjem HCl.

Rastvori za lizu, denaturaciju, elektroforezu i neutralizaciju se prave na dan eksperimenta i do upotrebe čuvaju na 4 °C.

**10M NaOH**

NaOH	200 g
dH <sub>2</sub> O	500 mL

**0,2M EDTA**

EDTA	37,2 g
dH <sub>2</sub> O	500 mL

**NMP (eng. *Normal melting point*) agaroza (0,5%)**

NMP	0,5 g
dH <sub>2</sub> O	99,5 mL

**NMP agaroza (1%)**

NMP	1 g
1 x PBS	99 mL

**LMP (eng. *Low melting point*) agaroza (1%)**

LMP	1,4 g
1xPBS	99 mL

**Akridin oranž (za vizualizaciju kometa)**Primarni stok 10 mg mL<sup>-1</sup> rastvoren u dH<sub>2</sub>OFinalni stok 2 µg mL<sup>-1</sup>**Pufer za liziranje ćelija**

50mM Tris (pH 7,5) 0,061 g

150mM NaCl 0,088 g

1 x PBS 10 mL

Neposredno pre liziranja odvojiti 990 µL smeše 50mM Tris + 150mM NaCl i dodati 10 µL 1% Triton X-100.

**3.1.7. Prajmeri za qRT-PCR**

Prajmeri (Invitrogen Life Technologies, SAD) korišćeni u kvantitativnoj RT-PCR za praćenje ekspresije transkripcionog faktora Nrf2 u HepG2 ćelijskoj liniji dati su u Tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni u qRT-PCR analizi

Ime gena	Simbol gena	Sekvenca prajmera (5'-3')
eng. <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	Nrf2	Forward: CCTCAACTATAGCGATGCTGAATCT Reverse: AGGAGTTGGGCATGAGTGAGTAG
Beta-aktin	β-aktin	Forward: ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA Reverse: TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA

**3.1.8. GSH/GSSG kit**

Komercijalni GSH/GSSG kit (Oxford Biomedical Research, SAD) korišćen je za utvrđivanje odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa u ćelijama.

**3.1.9. Mutageni iz hrane i model mutageni**

Prilikom ispitivanja genotoksičnosti/antigenotoksičnosti, u radu su korišćeni mutageni 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]hinolin (**IQ**) i 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (**PhIP**) (Toronto Research Chemicals, Kanada). U testovima su korišćeni i model mutageni 4-Nitrohinolin 1-oksid (**4NQO**) i benzo[*a*]piren (**B[*a*]p**), kako bi se uporednom analizom bolje procenila genotoksičnost analiziranih test supstanci.

**IQ/PhIP**Primarni stokovi 20 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoreni u DMSO-u.**4NQO/B[*a*]p**Primarni stokovi 5 mg mL<sup>-1</sup>, rastvoreni u DMSO-u.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Gajenje biljaka i priprema ekstrakata

#### 3.2.1.1. Uspostavljanje *in vitro* kulture

*In vitro* kultura *G. lutea* uspostavljena je prema ranije opisanom protokolu u radu Momčilović i sar. (1997). Eksperimenti su vođeni u kontrolisanim laboratorijskim uslovima dugog dana (16h/8h, dnevno/noćni režim) na temperaturi od  $25 \pm 2$  °C, pod belom fluorescentom svetlošću (fluorescentna lampa „Tesla“, Pančevo) gustine fluksa od  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Klijanje površinski sterilisanih semena je inicirano u petri kutijama na osnovnom MS medijumu (Murashige i Skoog, 1962) dopunjenom sa 0,2 mM giberelinskom kiselinom ( $\text{GA}_3$ ). Nakon isključavanja, klijanci su prebačeni u epruvete (20x100 mm) koje su sadržale  $\frac{1}{2}$  MS medijuma (napunjen do polovine volumena epruveta) bez dodatka hormona.

Umožavanje izdanaka praćeno je na MS podlozi u prisustvu 2 mg  $\text{L}^{-1}$ -6-benzilaminopurina (BAP) i 0,2 mg  $\text{L}^{-1}$  indol-3-sirćetne kiseline (IAA), dok je razviće korenova na izdancima starim 3 nedelje indukovano tokom naredne 2 nedelje na MS podlozi, a u prisustvu 2-(1-Naftil) sirćetne kiseline (NAA) u koncentraciji od 2 mg  $\text{L}^{-1}$ . Ukorenjene biljke, prenete na MS podlogu bez dodatka regulatora rasta, rasle su tokom narednih 7 nedelja, da bi na kraju eksperimenta ukorenjeni izdanci bili korišćeni za pravljenje odgovarajućih ekstrakata i utvrđivanje osnovnih parametara rasta u kulturi *in vitro*, kao što su: sveža i suva masa (SM) izdanaka i korenova, prosečan broj formiranih aksilarnih izdanaka po eksplantatu, procenat izdanaka sa obrazovanim korenom, kao i stopa rasta (prirast). Stopa rasta je određena prema sledećoj formuli:

$$\text{Stopa rasta} = \frac{(\text{FinalnaSM}(g) - \text{InicijalnaSM}(g))}{\text{InicijalnaSM}(g)}$$

#### 3.2.1.2. Priprema biljnih ekstrakata

Za pripremu ekstrakata korišćen je biljni materijal *G. lutea* dobijen sa plantaža i iz *in vitro* kulture. Od biljnog materijala dobijenog sa plantaža korišćeni su koren i list za pravljenje ekstrakata, a ekstrakcija je vršena primenom 100% metanolnog (MeOH) i 50% vodeno-etanolnog (50% EtOH, v/v) rastvarača u odnosu biljnog materijala i ekstraktanta 1:10 (w/v). Od biljaka gajenih u *in vitro* kulturi, za pravljenje ekstrakata korišćeni su koren i izdanak, pri čemu je materijal ekstrahovan primenom 100% MeOH u odnosu 1:20 (w/v). Biljni materijal je usitnjen i naliven odgovarajućim rastvaračem i ostavljen na orbitalnoj mućkalici 24h na 150 rpm, na sobnoj temperaturi. Sutradan, uzorci su centrifugirani na 5500 rpm, 10 minuta, dobijen supernatant je filtriran korišćenjem MN 617 filter papira (Macherey-Nagel GmbH, Nemačka) pomoću bihnerovog levka. Preostali talog je naliven odgovarajućim rastvaračem i čitav proces je ponovljen još 2 puta. Nakon 72 sata ekstrakcije, dobijeni ekstrakti su uparavani do suvog ostatka na vakum uparivaču (Buchi R-210), pod sniženim pritiskom i na temperaturi od 30 °C za metanolne, odnosno 45 °C za 50% vodeno-etanolne ekstrakte. Upareni ekstrakti su rastvoreni u DMSO-u (primarnih koncentracija 200 mg  $\text{mL}^{-1}$  za ekstrakte pripremljene od plantažno gajenih biljaka, odnosno 100 mg  $\text{mL}^{-1}$  za ekstrakte pripremljene od *in vitro* kulture) i čuvani su na -20°C. Pregled korišćenih ekstrakata i prinosi ekstrakcije su dati u Tabeli 4.

Tabela 4. Pregled korišćenih ekstrakata *G. lutea*

Oznaka ekstrakta	Poreklo biljnog materijala	Korišćeni rastvarač	Uslovi gajenja	Prinos ekstrakcije
GLK 50% EtOH	koren	50% vodeno-etanolni	Plantaža	42%
GLL 50% EtOH	list	50% vodeno-etanolni	Plantaža	49%
GLK MeOH	koren	100% metanol	Plantaža	55%
GLL MeOH	list	100% metanol	Plantaža	50%
GLvK MeOH	koren	100% metanol	<i>in vitro</i> kultura	17%
GLvI MeOH	izdanak	100% metanol	<i>in vitro</i> kultura	37%

### 3.2.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata

#### 3.2.2.1. Kvalitativna i kvantitativna UPLC-PDA MS/MS analiza ekstrakata lincure

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata lincure korišćena je ultra efikasna tečna hromatografija (UPLC, Waters ACQUITY) povezana sa PDA (eng. *Photodiode Array*) detektorom i Quattro micro API masenim spektrometrom (Waters) sa Z-sprej interfejsom, kao i sledeći standardi: genciopikrozid, sverozid, svertiamarin i loganska kiselina, mangiferin i izogentizin, hoomorientin i izoviteksin. Ekstrakti su razblaženi u metanolu do koncentracija od 5 ili 10 mg mL<sup>-1</sup>, za metanolne, odnosno etanolne ekstrakte, i filtrirani upotrebom 0,22 µm membranskog najlon filtera (Phenomenex). MassLynx softver (verzija 4.1) je korišćen za prikupljanje i obradu podataka dobijenih tečno masenom hromatografijom ekstrakata i konstituenata lincure. Nakon hromatografskog razdvajanja (UPLC), ekstrakti i standardi su jonizovani (maseni detektor) elektrosprej jonizacijom (eng. *Electrospray Ionization, ESI*) pozitivnog i negativnog polariteta, u režimu koji omogućava istovremeno praćenje procesa fragmentacije ispitivanih analita (konstituenata) (eng. *Multiple Reaction Monitoring, MRM*) sa vremenom zadržavanja od 0,1 sekunde. Dodatno, podaci su prikupljeni i pomoću PDA detektora u opsegu talasnih dužina od 190 do 500 nm. ESI<sup>-</sup> jonizacija (negativni polaritet) je korišćena za analizu loganske kiseline, svertiamarina, genciopikrozida i izoviteksina, dok je ESI<sup>+</sup> (pozitivni polaritet) jonizacija iskorišćena za kvantifikaciju sverozida, homoorientina, mangiferina i izogentizina. Ekstrakti i konstituenti su razdvajani na ACQUITY UPLCTM BEH C18 koloni (1,7 µm, 100 mm x 2,1 mm) u gradijentu, sa mobilnom fazom koja se sastojala od rastvarača A (smeša mravlje i sirćetne kiseline u vodi, u odnosu 0,9:0,1 %; v/v) i rastvarača B (smeša acetonitrila i 2-propanola u odnosu 50:50 %, v/v). Gradijent koji je korišćen za eluiranje počinjao je sa 99% mobilne faze A tokom 6 minuta, zatim sa 70-40% mobilne faze A sledeća 3 minuta i od 9-11 minuta bio je na 5% faze A. Injektirana zapremina je iznosila 5 µL, temperatura kolone 30 °C, a protok 0,25 mL min<sup>-1</sup>. Kalibracione krive za kvantitativno određivanje sastava ekstrakata *G. lutea* su konstruisane na osnovu zavisnosti između površina pikova (nakon integraljenja MRM hromatograma) i koncentracija svakog od standarda (konstituenta). Standardi su bili rastvoreni u obliku smeše, u metanolu, u opsegu koncentracija od 0,5-400 µg mL<sup>-1</sup>. Kvalitativna analiza ekstrakata je urađena upoređivanjem retencionih vremena (Rt), karakterističnih apsorpcionih spektara, pikova ekstrakata i standarda, kao i masenom spektrometrijom korišćenjem karakterističnih MRM tranzicija. Podešavanja instrumenata za jonizaciju u MRM režimu su prethodno opisana u istraživanju Marković i sar. (2019). Retencionna vremena odabranih konstituenata, kao i parametri korišćeni za MS/MS analizu u MRM režimu, su data u Tabeli 5. Koncentracija konstituenata određena u 1 mL je predstavljena kao procenat i izračunata na osnovu suve materije ekstrakata. Kvantifikacija je urađena u triplikatu i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardne devijacije.

Tabela 5. Parametri korišćeni u MS/MS analizi ekstrakata *G. lutea* u MRM režimu

Konstituent	Formula	Rt (min)	Detektovane vrste jona	MRM m/z tranzicija*	Napon na konusu (V)/ Koliziona energija (eV)	ESI režim
Loganska kiselina	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	3.22	(M-H) <sup>-</sup>	375>212.90	30/10	-
Svertiamarin	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	3.64	(M+HCOO) <sup>-</sup>	419>179	20/12	-
Mangiferin	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	3.91	(M+H) <sup>+</sup>	423>357	62/20	+
Genciopikrozid	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	4.03	(M+HCOO) <sup>-</sup>	401.11>179	20/12	-
Sverozid	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	4.17	(M+H) <sup>+</sup>	359>197	26/10	+
Homoorientin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	4.54	(M+H) <sup>+</sup>	449>329	40/25	+
Izoviteksin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5.15	(M-H) <sup>-</sup>	431.10>311	45/20	-
Izogentizin	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	9.84	(M+H) <sup>+</sup>	259>213	50/35	+

\*MRM: Multipli reakcioni monitoring sa karakterističnim prelazima (m/z) roditeljskih (eng. *parent*) jona i njihovih fragmenata, odnosno ćerki jona (eng. *daughter*).

### 3.2.2.2. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida u ekstraktima *G. lutea*

Ukupan sadržaj polifenola je određen primenom kolorimetrijske metode (Singleton i Rossi, 1965), pri čemu su ekstrakti razblaženi do koncentracije od 1 mg mL<sup>-1</sup> u metanolu. Zatim je po 100 µL svakog ekstrakta pomešano sa 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL 15% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dobijena smeša je dodatno razblažena destilovanom vodom do 10 mL i inkubirana 2h, na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije apsorbancija uzoraka je izmerena na 750 nm, naspram vode kao slepe probe. Sadržaj ukupnih polifenola je kvantifikovan korišćenjem kalibracione krive galne kiseline u opsegu 2-200 µg mL<sup>-1</sup>. Rezultati su predstavljeni kao mg ekvivalenta galne kiseline na 1 g suve mase biljnog ekstrakta (mg GEK g<sup>-1</sup>).

Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida kolorimetrijskom metodom (Ordoñez i sar., 2006), 0,5 mL svakog ekstrakta koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> je pomešano sa 0,5 mL metanolnog rastvora 2% AlCl<sub>3</sub>. Nakon jednočasovne inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbancija uzoraka je izmerena na 415 nm, naspram metanola kao slepe probe. Kvantifikacija ukupnih flavonoida je izvršena pomoću kalibracione krive kvercetina u opsegu 5-200 µg mL<sup>-1</sup>. Rezultati se predstavljaju kao mg ekvivalenta kvercetina na 1 g suve mase biljnog ekstrakta (mg QEK g<sup>-1</sup>).

### 3.2.3. Detekcija antioksidativne aktivnosti

#### 3.2.3.1. Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (DPPH test)

Sposobnost ekstrakata i konstituenata lincure da neutrališu slobodne radikale izmerena je primenom DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikal) testa. Test se zasniva na inhibiranju DPPH radikala, stabilnog radikala ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Prilikom reakcije sa antioksidantom, DPPH radikal se neutrališe, što je praćeno promenom boje iz ljubičaste u blede žutu. Metoda je urađena po protokolu koji su dali Brand-Williams i sar. (1995) sa malim modifikacijama. U pripremljene epruvete je sipano 790 µL metanola, 10 µL test supstance odgovarajuće koncentracije i 200 µL DPPH reagensa. Kontrola je sadržala 800 µL metanola i 200 µL DPPH reagensa. Nakon inkubacije od 30 minuta u mraku, izmerena je apsorbancija na 517 nm (UV-6300 PC spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel). Ekstrakti lincure su testirani u koncentracijama od 10, 50, 100, 200 i 400 µg mL<sup>-1</sup>. Dodatno, ispitana je i sposobnost konstituenta (genciopikrozida, sverozida, svertiamarina, izoviteksina, u koncentracionom opsegu dvostrukih razblaženja od 12,5-200 µg mL<sup>-1</sup> i



mangiferina i homoorientina, u opsegu od 0,625-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) da neutrališu DPPH radikal. Kao pozitivna kontrola korišćena je askorbinska kiselina u opsegu koncentracija 6,25-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Procenat inhibicije DPPH radikala je izračunat na osnovu sledeće formule:

$$I(\%) = 100 * \frac{A_k - A_u}{A_k}$$

pri čemu  $A_k$  predstavlja vrednost apsorbance kontrole, dok  $A_u$  predstavlja vrednost apsorbance uzorka. Dodatno, određena je i  $EC_{50}$  vrednost, odnosno efektivna koncentracija test supstance koja inhibira 50% inicijalne koncentracije DPPH radikala.

### 3.2.3.2. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije (TBA test)

Sposobnost ekstrakata da inhibiraju proces lipidne peroksidacije (LP) ispitana je TBA testom po prokolu koji su dali Mitić-Ćulafić i sar. (2009). Jedan od produkta LP je malondialdehid (MDA) koji je sposoban da gradi adukte sa molekulom DNK narušavajući tako njegovu strukturu. Upravo se MDA koristi kao marker LP u TBA testu, jer formira obojeni produkt reagujući sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). U testu su korišćeni komercijalni lipozomi (L- $\alpha$ -fosfaditilholin), kao model ćelijske membrane bogat nezasićenim masnim kiselina. Reakcija LP je indukovana inkubiranjem epruveta koje su sadržale 10  $\mu\text{L}$  ekstrakta odgovarajuće koncentracije (ekstrakti plantažno gajene lincure su testirani u opsegu koncentracija 24-384  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dok su *in vitro* ekstrakti testirani u opsegu od 12-192  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 60  $\mu\text{L}$  lipozoma, 20  $\mu\text{L}$  0,01M  $\text{FeSO}_4$ , 20  $\mu\text{L}$  0,01M vitamina C i 2,89 mL 0,067M pufera na 37 °C, 1h. Uporedo je urađena i serija epruveta koje su služile kao „korekcija“, pri čemu su sadržale sve komponente osim lipozoma, koji su zamenjeni sa 60  $\mu\text{L}$  pufera. Kontrolne epruvete su umesto ekstrakata, sadržale 10  $\mu\text{L}$  DMSO-a. Kao pozitivna kontrola korišćen je veštački antioksidans butil hidroksitoluen (BHT), koji je testiran u istom opsegu koncentracija kao i ekstrakti. Reakcija LP je zaustavljena dodavanjem 2 mL TBA reagensa i 0,2 mL 0,1M EDTA, nakon čega su epruvete inkubirane u vodenom kupatilu na 100 °C, 15 minuta. Rastvor je zatim ohlađen i proteini su otklonjeni centrifugiranjem na 4000 rpm, 10 minuta. Inhibicija LP je određena merenjem apsorbance obojenog produkta na 532 nm (UV-6300 PC spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel) i računanjem prema formuli:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{(A_u - A_{kr})}{A_k}\right) * 100$$

gde je  $A_u$  srednja vrednost apsorbanci uzoraka,  $A_{kr}$  srednja vrednost asporbanci korekcija i  $A_k$  srednja vrednost apsorbanci kontrole.

### 3.2.3.3. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Sposobnost ekstrakata da heliraju jone gvožđa ispitana je prema metodi Tseng i sar. (2008) sa određenim izmenama. Metoda se zasniva na sposobnosti helirajućih agenasa da vezuju dvovalentne jone prelaznih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ), koji mogu da iniciraju lipidnu peroksidaciju, i njihovom prevođenju u rastvornu formu. Ekstrakti su rastvoreni u 1 mL metanola finalnog koncentracionog opsega 62,5-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nakon čega im je dodato 3,7 mL metanola i ostavljeni su na inkubaciju u vodenom kupatilu na 60 °C, 15 minuta. Nakon inkubacije dodato je 100  $\mu\text{L}$  2 mM  $\text{FeCl}_2$  i 200  $\mu\text{L}$  5mM ferozina, čime je inicirana reakcija formiranja kompleksa, i epruvete su ostavljene na dodatnu inkubaciju 10 minuta na sobnoj temperaturi. Dodatno, rađen je i blank koji je sadržao sve osim ekstrakata, a kao pozitivne kontrole korišćene su limunska kiselina i EDTA, u istom opsegu koncentracija. Nakon inkubacije merena je apsorbance na 562 nm (UV/VIS spektrofotometar, ShimadzuUV-1800, Japan) pri čemu niža vrednost apsorbance ukazuje na veću sposobnost heliranja jona gvožđa. Sposobnost heliranja jona gvožđa je izračunata prema sledećoj formuli:

$$\text{Heliranje jona gvožđa (\%)} = 100 * \frac{A_b - A_u}{A_b}$$

gde  $A_b$  predstavlja srednju vrednost apsorbanci blanka, a  $A_u$  predstavlja srednju vrednost apsorbanci uzorka. Dodatno, izračunate su  $EC_{50}$  vrednosti (efektivna koncentracija test supstance na kojoj je helirano 50% jona gvožđa).

### 3.2.3.4. Sposobnost redukcije jona gvožđa (eng. *Ferric-reducing power assay, FRAP*)

Sposobnost ekstrakata da redukuju jone gvožđa ispitana je prema metodi Oyaizu (1986) sa manjim izmenama. Metoda se zasniva na transferu elektrona između antioksidanta i oksidanta ( $Fe^{3+}$ ) pri čemu dolazi do redukcije  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ . Ekstrakti su rastvoreni u 1 mL metanola finalnih koncentracija u opsegu 62,5-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Zatim je ekstraktima dodato 500  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera i 500  $\mu\text{L}$  1% kalijum-fericijanida. Epruvete su ostavljene na inkubaciju u vodenom kupatilu na 50 °C, 20 minuta. Nakon inkubacije, dodato je 500  $\mu\text{L}$  10% trihlor sirćetne kiseline, 2 mL  $dH_2O$ , 400  $\mu\text{L}$  0,1%  $FeCl_3$  i izmerena je apsorbanca (UV/VIS spektrofotometar, ShimadzuUV-1800, Japan) na 700 nm talasne dužine. Blank je sadržao sve osim ekstrakata, a kao pozitivna kontrola korišćena je askorbinska kiselina u istom opsegu koncentracija kao i ekstrakti. Usled pozitivne reakcije dolazi do promene boje rastvora, od žute do zelene i plave. Intezivnija boja, odnosno veća apsorbanca uzorka ukazuje na veću sposobnost redukcije  $Fe^{3+}$ . Rezultati su predstavljeni grafički kao odnos apsorbance i koncentracije test supstanci i izračunate su  $EC_{50}$  vrednosti, odnosno efektivne koncentracije pri kojima je apsorbanca 0,5 (odabrana kao referentna vrednost).

### 3.2.3.5. Sposobnost redukcije jona bakra (eng. *Cupric reducing antioxidant capacity, CUPRAC*)

Ispitivanje sposobnosti ekstrakata da redukuju jone bakra urađeno je po metodi Öztürk i sar. (2011), u mikrotitar pločama sa 96 bunarića. Metoda se zasniva na sposobnosti antioksidativnih jedinjenja da redukuju  $Cu^{2+}$ -neokuproin kompleks do žuto obojenog  $Cu^{1+}$ -neokuproin helacionog kompleksa. Prednost ove metode je mogućnost merenja antioksidativnog potencijala pri skoro fiziološkoj pH vrednosti, čime se bolje simulira delovanje antioksidanata u fiziološkim uslovima (Özyürek i sar., 2011). Po 40  $\mu\text{L}$  ekstrakata rastvorenih u DMSO-u (koncentracioni opseg 62,5-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) je dodato u bunariće mikrotitar ploče. Nakon toga, dodato je još 50  $\mu\text{L}$  10mM  $CuCl_2$ , 50  $\mu\text{L}$  7,5mM neokuproina i 60  $\mu\text{L}$  1M amonijum-acetatnog pufera. Blank ploča je sadržala sve osim 10mM  $CuCl_2$ . Dodatno, kao pozitivna kontrola korišćen je  $\alpha$ -tokoferol rastvoren u DMSO-u u istom opsegu koncentracija kao ekstrakti. Ploče su inkubirane na 30 °C, 60 minuta, a zatim je izmerena apsorbanca (A) na 450 nm talasne dužine (Microplate reader, BioTek, Ex1808, SAD). Ukupna apsorbanca dobijena je iz formule:

$$A_{ukupno} = A_{uzorak} - A_{blank}$$

Kao i u FRAP testu, i ovde je veća apsorbanca ukazivala na veću sposobnost redukcije  $Cu^{2+}$  jona. Rezultati su predstavljeni grafički kao odnos apsorbance i koncentracije test supstanci i izračunate su  $EC_{50}$  vrednosti, tj. efektivne koncentracije pri kojima je apsorbanca 0,5.

## 3.2.4. Ispitivanje bioloških aktivnosti na bakterijskim model sistemima

### 3.2.4.1. Održavanje i priprema bakterijskih kultura za rad

Bakterijski sojevi (ATCC kolekcija) su čuvani u LB medijumu sa 20% glicerola na -20 °C. Dodatno, *Salmonella tythimurium* TA1535 koja se koristi u SOS/*umuC* testu, čuvana je u 1xTGA medijumu sa dodatkom 10% DMSO-a na -80 °C. Čiste kulture bakterijskih ATCC sojeva su održavane

na petri šoljama sa kojih su presejavane u odgovarajućim vremenskim razmacima, kako bi se sprečilo isušivanje hranljive podloge i potencijalna kontaminacija. Za potrebe eksperimenata, po jedna kolonija sa petri šolja je ezom zasejavana u odgovarajući tečni hranljivi medijum i inkubirana 24h na 37 °C. *S. typhimurium* je oživljavana direktnim zasejavanjem zamrznutog uzorka u hranljivi medijum.

### 3.2.4.2. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija – MIK test

Pripremljene prekonoćne kulture bakterija su razblažene 20x u 30 mL odgovarajućeg medijuma (MHB, odnosno BHI za *L. monocytogenes* i 1xTGA za *S. typhimurium*) i inkubirane uz aeraciju na 180 rpm i 37 °C do dostizanja željene optičke gustine ( $OD_{600}$ ) koja, na osnovu prethodno određenih kalibracionih kriva (Kolarević i sar., 2016), odgovara koncentraciji ćelija  $\sim(1-2) \times 10^8$ . Pomoću spektrofotometra (UV-6300 PC spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel) na svakih sat vremena merena je  $OD_{600}$  bakterija i nakon dostizanja željene optičke gustine suspenzija bakterija je centrifugirana na 4000 rpm 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je otklonjen i talog resuspendovan u 0,01M  $MgSO_4$ , a zatim je dobijena suspenzija razblažena tako da je finalna koncentracija ćelija bila  $10^6 \text{ mL}^{-1}$ . MIK test se zasniva na pravljenju dvostrukih razblaženja test supstanci u pločama sa 96 bunarića. Pored kolona sa test supstancama, svaka ploča sadrži i kolone za kontrolu sterilnosti (blank), za kontrolu rasta bakterija, za kontrolu rastvarača (DMSO), kao i kolone za pozitivnu kontrolu (streptomycin, testiran u opsegu 0,78-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). U kolonama sa ekstraktima, pozitivnom kontrolom i kontrolom rastvarača, pravljen je gradijent koncentracija tako što je sipano 160  $\mu\text{L}$  medijuma i 40  $\mu\text{L}$  test supstance u bunariće A, dok je u ostalim bunarićima B-H sipano po 100  $\mu\text{L}$  medijuma. Uzimanjem 100  $\mu\text{L}$  sadržaja iz prvog bunarića i prebacivanjem drugi, zatim iz drugog u treći i tako do kraja, napravljena su dvostruka razblaženja (iz bunarića H reda se izbacuje po 100  $\mu\text{L}$ ). Nakon napravljenog gradijenta u svaki bunarić je dodato 80  $\mu\text{L}$  medijuma i 20  $\mu\text{L}$  bakterija ( $10^5 \text{ mL}^{-1}$  u bunarićima), čime je postignuta finalna zapremina od 200  $\mu\text{L}$ . Na kraju je u svaki bunarić dodato po 22  $\mu\text{L}$  indikatora rasta resazurina. Ploče su obmotane parafilmom i inkubirane 24h na 37 °C. Ekstrakti lincure su testirani u opsegu koncentracija 0,078-10  $\text{mg mL}^{-1}$ , dok su konstituenti (genciopikrozid, sverozid, svertiamarin, mangiferin, izoviteksin i homoorientin) testirani u opsegu 0,0078-1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Rezultati su analizirani praćenjem promene boje indikatora. Resazurin, koji je plave boje, se u prisustvu oksidoreduktaza živih ćelija redukuje do rezorufina roze boje, što predstavlja indicaciju rasta. Najmanja koncentracija na kojoj nije došlo do promene boje se tumači kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Kako bi se utvrdilo da li test supstanca ostvaruje samo bakteriostatsko ili i baktericidno dejstvo, ezom je iz svakog bunarića u kome nema vidljivog rasta zasejavan uzorak na čvrstu hranljivu podlogu, koja je zatim inkubirana 24h na 37 °C. Nakon inkubacije posmatrano je prisustvo ili odsustvo rasta i najmanja koncentracija na kojoj nema rasta proglašavana je za minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBK).

Kako bi se utvrdila granica toksičnosti ekstrakata lincure za model organizam u SOS/*umuC* testu (*S. typhimurium* TA1535/pSK1002), određene su MIK vrednosti. Pored ekstrakata, testiranih u opsegu koncentracija 0,039-5  $\text{mg mL}^{-1}$ , na ovom soju testirani su i mutageni IQ i PhIP (opseg koncentracija 0,39-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.2.4.3. Ispitivanje uticaja ekstrakata i konstituenata *G. lutea* na formiranje biofilma

Efekat ekstrakata lincure na sprečavanje procesa formiranja biofilma je praćen kvantifikacijom ukupne biomase biofilma, bojenjem kristal violetom po metodi Stepanović i sar. (2000), sa malim modifikacijama. Metoda se izvodi u mikrotitar pločama sa 96 bunarića, pri čemu su ekstrakti i konstituenti testirani u koncentracijama koje su odgovarale njihovim  $1/16$ MIK,  $1/8$ MIK,  $1/4$ MIK,

$1/2$ MIK i MIK vrednostima. Pored kolona sa ekstraktima, ploča je sadržala i kolone za kontrolu sterilnosti, kontrolu formiranja biofilma i kontrolu rastvarača (DMSO). Po 100  $\mu$ L bakterijske suspenzije ( $10^6$  ćelija  $\text{mL}^{-1}$ ) je dodato u bunariće mikrotitar ploče, a zatim je sipano po 100  $\mu$ L test supstanci odgovarajuće koncentracije doprinoseći ukupnom volumenu od 200  $\mu$ L. Odabrane koncentracije ekstrakata, kao i bakterijske suspenzije pripremane su u odgovarajućim medijumima (MHB za *S. aureus*, BHI za *L. monocytogenes*) sa dodatkom 0,5 % glukoze. Nakon postavljanja eksperimenta, ploče su inkubirane preko noći na 37 °C. Sledećeg dana, medijum iz bunarića je uklonjen, preostali sadržaj je ispran vodom dva puta, i ploča je ostavljena da se osuši. Nakon toga dodavano je po 200  $\mu$ L vodenog rastvora 0,1 % kristal violeta u svaki bunarić i ploča je ostavljena na inkubaciju 20 min na sobnoj temperaturi. Po isteku perioda inkubacije, ploča je ponovo isprana vodom i nakon sušenja dodavan je apsolutni etanol za rastvaranje kristal violeta koji se vezao za masu biofilma. Ukupna masa biofilma određivana je merenjem intenziteta boje kristal violeta na talasnoj dužini od 570 nm (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina). Procenat inhibicije formiranja biofilma, u odnosu na netretiranu kontrolu, je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{Inhibicija formiranja biofilma (\%)} = 1 - \frac{A_t}{A_k} * 100$$

gde  $A_t$  predstavlja srednju vrednost apsorbance tretmana, dok  $A_k$  predstavlja srednju vrednost apsorbance kontrole rastvarača (DMSO).

#### 3.2.4.4. Ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata lincure i mutagena iz hrane primenom SOS/*umuC*

SOS/*umuC* test se bazira na sposobnosti genotoksičnih agenasa da indukuju SOS odgovor kod bakterija, odnosno ekspresiju gena *umuC* (Oda, 2016). Test se izvodi na bakteriji *S. typhimurium* TA1535/pSK 1002 koja sadrži višestruke kopije plazmida pSK 1002 sa fuzijom *umuC::lacZ* gena. Gen *lacZ* kodira za  $\beta$ -galaktozidazu, pa se samim tim ekspresija *umuC* gena prati preko aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze. Test se izvodi u mikrotitar pločama sa 96 bunarića u koje se nakon izlaganja *S. typhimurium* test supstanci, dodaje supstrat za  $\beta$ -galaktozidazu (O-nitrofenil- $\beta$ -galatopiranozid, ONPG). Razgradnjom supstrata nastaje žuto obojeno jedinjenje orto-nitrofenol (ONP), čija se količina meri spektrofotometrijski na 405 nm. Genotoksični potencijal test supstanci je direktno proporcionalan aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze.

U ovom radu ispitivanje genotoksičnosti ekstrakata je vršeno uporedo i u prisustvu i u odsustvu S9 miksa, tj. mikrozomalne frakcije jetre pacova koja omogućava metaboličku aktivaciju test supstanci. Na ovaj način se moglo utvrditi da li su ekstrakti promutageni, tj. da li zahtevaju metaboličku aktivaciju da bi izazvali oštećenja na molekulu DNK. Pored ispitivanja genotoksičnosti ekstrakata, ispitivan je i genotoksični potencijal mutagena iz hrane IQ i PhIP u primenjenim eksperimentalnim uslovima, tj. ustanovljene su genotoksične doze ovih mutagena koje će se primenjivati u testu antigenotoksičnosti.

#### Radni protokol

Dan pre eksperimenta zasejana je kultura *S. typhimurium* (50  $\mu$ L bakterijske kulture je zasejano u 10 mL 1xTGA) i inkubirana je na 37 °C uz aeraciju ne duže od 16h. Na dan eksperimenta je prekonoćna kultura razblažena 10x u svežem 1xTGA medijumu (10 mL) i inkubirana 1,5 h na 37 °C uz aeraciju na 250 rpm. Nakon inkubacije, OD<sub>600</sub> je izmeren i doteran pomoću svežeg medijuma na 0,2. Na taj način dobijene su ćelije u ekspanzionalnoj fazi rasta. Eksperiment se izvodi korišćenjem 3 mikrotitar ploče (A, B, C).

Prvo je punjena A ploča tako što je u slepu probu dodato 90  $\mu\text{L}$  1xTGA medijuma i 10  $\mu\text{L}$  bidestilovane vode, u kontrolu rasta bakterija 90  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija i 10  $\mu\text{L}$  bidestilovane vode, u kontrolu rastvarača (DMSO) 90  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija i 10  $\mu\text{L}$  DMSO-a (10%), u pozitivnu kontrolu 90  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija i 10  $\mu\text{L}$  rastvora poznatog mutagena. Kao pozitivne kontrole korišćeni su 4-nitrohinolin 1-oksidi (4NQO, 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i benzo[*a*]piren (B[*a*]p, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Prilikom ispitivanja genotoksičnosti test supstanci (ekstrakti, IQ i PhIP) dodavano je u bunariće A ploče 90  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije i 10  $\mu\text{L}$  test supstance određene koncentracije. S obzirom da je test rađen i u prisustvu S9 frakcije, paralelno je pripremana još jedna ploča A, koja je punjena po istoj shemi, ali je 90  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija sadržavalo i S9 miks (10% S9 frakcija, šema pripreme je data u poglavlju 3.1.5. Nakon punjenja, ploča A je obmotana parafilmom i inkubirana 2h na 37 °C uz aeraciju na 150 rpm. Po isteku perioda inkubacije prebačeno je iz svih bunarića ploče A po 30  $\mu\text{L}$  uzoraka u ploču B, u koju je prethodno dodato 270  $\mu\text{L}$  1xTGA medijuma. Ploča B je zatim obmotana parafilmom i inkubirana 2h na 37 °C uz aeraciju na 150 rpm. Pred kraj inkubacionog perioda ploče B, u ploču C je dodato 120  $\mu\text{L}$  B-puferu i ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon toga, iz ploče B je prebačeno 30  $\mu\text{L}$  uzoraka u ploču C i naneto je još 30  $\mu\text{L}$  rastvora ONPG-a. Tako pripremljena ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 minuta. Reakcija razgradnje ONPG-a je prekinuta dodavanjem 120  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Spektrofotometrijski (Multiscan FC microplate reader, Thermo Scientific, Šangaj, Kina) su zatim očitane: (1) sa ploče B optička gustina bakterija na 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ), koja omogućava procenu vijabilnosti, tj. stope rasta, (2) sa ploče C apsorbancu na 405 nm ( $A_{405}$ ), koja omogućava procenu nivoa ekspresije  $\beta$ -galaktozidaze, tj. daje informaciju o stopi indukcije SOS odgovora. Na osnovu dobijenih vrednosti moguće je izračunati stopu rasta bakterija (eng. *growth ratio*, G) prema sledećoj formuli:

$$G = \frac{\text{OD}_{600}\text{uzorka}}{\text{OD}_{600}\text{kontrola}}$$

Ukoliko je  $G < 0,75$ , uzorak je smatran citotoksičnim.

Dodatno, izračunata je stopa indukcije (eng. *induction rate*, IR) SOS odgovora, odnosno posredno DNK oštećenja, prema sledećoj formuli:

$$IR = \left( \frac{A_{405}\text{uzorka}}{A_{405}\text{kontrola}} \right) / G$$

Ukoliko je  $IR \geq 2$ , uzorak je smatran genotoksičnim.

Prilikom ispitivanja genotoksičnosti ekstrakata/mutagena testirane su serije koncentracija, počev od MIK vrednosti naniže.

### 3.2.4.5. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure primenom SOS/*umuC*

Kako bi se ispitao antigenotoksični potencijal ekstrakata prema mutagenima iz hrane IQ i PhIP, korišćen je isti eksperimentalni protokol, uz primenu prethodno uspostavljenih negenotoksičnih koncentracija ekstrakata i genotoksičnih koncentracija IQ i PhIP. Eksperimenti su vršeni samo u prisustvu S9 frakcije, obzirom da korišćeni mutageni IQ i PhIP zahtevaju metaboličku aktivaciju. Kako bi se ispitao antigenotoksični efekat, bakterija je podvrgnuta ko-tretmanu ekstrakata i mutagena, što je zahtevalo mešanje bakterijske suspenzije (90  $\mu\text{L}$ ) i smese mutagena i ekstrakta (10  $\mu\text{L}$ ) u ploči A. Ostatak protokola je bio isti kao u gore navedenom poglavlju 3.2.13.

Nakon izračunavanja IR vrednosti, inhibicija indukovane genotoksičnosti izračunata je primenom formule:

$$I(\%) = \left( 1 - \frac{IR_{kt}}{IR_m} \right) * 100$$

gde  $IR_{kt}$  predstavlja srednju vrednost indukcione stope ko-tretmana, a  $IR_m$  srednju vrednost indukcione stope mutagena.

### 3.2.5. Ispitivanje bioloških aktivnosti na kulturi sisarskih ćelija

#### 3.2.5.1. Metode za održavanje i gajenje ćelijskih linija

##### 3.2.5.1.1. Čuvanje ćelijskih linija-procedura zamrzavanja ćelija

Ćelijske linije su čuvane u tečnom azotu, zamrznute na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  i na ovaj način moguće je održati vijabilnost ćelija skoro neograničeno. Dodatno, ćelijske kulture se mogu čuvati neko vreme (do 6 meseci) u zamrznutom stanju na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u Deep Freez-u. Ćelije su gajene u optimalnim uslovima na srednjem flasku ( $75\text{ cm}^2$ ) u inkubatoru (Binder, Holandija) uz 100% vlažnosti, na  $37^{\circ}\text{C}$ , sa 5% zasićenosti  $\text{CO}_2$ . Nakon dostizanja eksponencijalne faze rasta (do 80% konfluentnosti) ćelije su tripsinizovane i određen im je broj bojenjem tripan plavim (broj vijabilnih ćelija koji se zamrzava iznosio je  $5 \times 10^6/\text{mL}$ ). Zamrzavanje ćelija je vršeno postepno, kriotube su prvo ohlađene u frižideru na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zatim prebačene na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i na kraju na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ili u tečni azot.

##### 3.2.5.1.2. Procedura oživljavanja zamrznutih ćelija i gajenje

Kriotube sa zamrznutim ćelijama su otopljenje i sadržaj je prebačen u epruvete za centrifugiranje sa 3 mL odgovarajućeg medijuma i centrifugiran 10 minuta na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je otklonjen, čime se uklanja i DMSO, a ćelije su resuspendovane u 1 mL medijuma. Sav sadržaj iz epruvete je prebačen u mali flask ( $25\text{ cm}^2$ ) i ćelije su gajene do pojave monosloja. Po potrebi, ćelijama je menjan medijum i ispirane su primenom 1xPBS. Pošto su dostigle 80% konfluentnosti, što je utvrđeno posmatranjem na invertnom svetlosnom mikroskopu (Boeko, Nemačka), ćelije su pripremane za tripsinizaciju i presejavanje na srednji flask.

##### 3.2.5.1.3. Tripsinizacija ćelija

Procedura tripsinizacije ćelija podrazumevala je otklanjanje medijuma iz flaskova i ispiranje ćelija 1xPBS-om. Nakon toga, dodavana je određena količina rastvora 0,1% tripsina (1,5 mL za mali flask, 2,5 mL za srednji flask). Flaskovi su ostavljani 2-3 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nakon čega su snažno izlupani kako bi se ćelije odlepile. Reakcija tripsinizacije je zaustavljena dodavanjem duplo veće količine medijuma i sav sadržaj je prebačen u epruvete i centrifugiran 10 min na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen i talog je resuspendovan dodavanjem 1-2 mL medijuma. U zavisnosti od potreba određivan je broj ćelija bojenjem tripan plavim (u cilju postavljanja eksperimentata citotoksičnosti/genotoksičnosti ili zamrzavanja) ili je vršeno presejavanje u nove flaskove.

##### 3.2.5.1.4. Procena broja i vijabilnosti ćelija primenom tripan plavog

Za određivanje broja ćelija korišćen je hemocitometar (Bürker komora) i 0,4% rastvor tripan plavog, boje koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu, tako da žive ćelije ostaju nebojene, dok mrtve primaju boju i postaju plave. Korišćeni hemocitometar se sastoji iz dve komorice podeljene na 9 velikih kvadrata, a svaki od njih je podeljen na 16 malih kvadratića. Broj i vijabilnost ćelija su određivani mešanjem 10  $\mu\text{L}$  ćelijske suspenzije i 20  $\mu\text{L}$  tripan plavog. Broj ćelija je izračunat prema formuli:  $\text{Broj ćelija/mL} = \text{broj ćelija u 4 vidna polja} \times 4 \times 3 \times 10^4$ . Broj ćelija u 4 vidna polja pomnožen je sa 4 zbog broja kvadratića na hemocitometru (16). Pošto je suspenzija ćelija pomešana sa bojom u

odnosu 1:2, množi se sa 3, a usled toga što u polje sa 16 kvadratića staje  $0,1 \text{ mm}^3$ , tj.  $10^{-4}$ , množi se sa  $10^4$ .

### 3.2.5.2. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci primenom MTT metode

Ispitivanje citotoksičnog potencijala test supstanci urađeno je primenom MTT testa. MTT test je kolorimetrijska metoda za procenu metaboličke aktivnosti i samim tim i vijabilnosti ćelija. MTT (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid) je žuta tetrazolijum boja koja u metabolički aktivnim ćelijama biva redukovana do nerastvorljivih ljubičastih kristala formazana. Poznato je da u testovima procene vijabilnosti ćelija redukciju MTT boje vrše ćelijski koenzimi NAD(P)H i glikolitički enzimi endoplazmatičnog retikuluma (Stockert i sar., 2018). Korišćenjem odgovarajućeg rastvarača (DMSO) kristali formazana bivaju rastvoreni tako da je intezitet dobijene ljubičaste boje, spektrofotometrijski očitani, proporcionalan broju metabolički aktivnih vijabilnih ćelija.

### Radni protokol

Nakon tripsinizacije i određivanja broja ćelija, na mikrotitar ploče sa 96 bunarića, zasejano je  $2 \times 10^4$  ćelija po bunariću i ostavljeno je na inkubaciju 24h, na  $37^\circ\text{C}$ , u prisustvu 5%  $\text{CO}_2$  kako bi se formirao monosloj. Sutradan, medijum je izvučen iz bunarića, ćelije su isprane 1xPBS-om i dodat je svež medijum u kojem su rastvorene test supstance u odgovarajućim koncentracijama i ploče su ostavljene na 24-časovnu inkubaciju. Svaka ploča sadržala je bunariće sa test supstancama, sa kontrolom rastvarača (1% DMSO), sa kontrolom rasta ćelija i kontrolom sterilnosti. Nakon inkubacije dodat je rastvor MTT boje ( $20 \mu\text{L}$  rastvora MTT u  $200 \mu\text{L}$  medijuma) i dodatna inkubacija je trajala 3h. Posle inkubacionog perioda pažljivo je izvučen medijum i formirani kristali formazana su rastvoreni dodavanjem DMSO. Rezultati su očitani spektrofotometrijski (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina) na talasnoj dužini od  $570 \text{ nm}$  i izračunati su procenti preživljavanja (P) prema sledećoj formuli:

$$P(\%) = 100 * \left( \frac{OD_{570} \text{ test supstance}}{OD_{570} \text{ kontrole rastvarača}} \right)$$

Citotoksičnost ekstrakata *G. lutea* je ispitana na MRC-5, Hs 294T i HepG2 ćelijama u opsegu koncentracija  $0,0625$ - $2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Dodatno, na HepG2 ćelijama za potrebe ispitivanja antigenotoksičnog efekta prema mutagenima iz hrane ispitani su i citotoksični potencijal konstituenata (genciopikrozid i mangiferin) u opsegu koncentracija  $1,56$ - $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , kao i mutagena IQ i PhIP u koncentracionom opsegu  $6,25$ - $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.2.5.3. Ispitivanje genotoksičnosti primenom alkalnog komet testa

#### 3.2.5.3.1. Priprema ćelija za ispitivanje genotoksičnosti test supstanci

Ćelijske linije (MRC-5, Hs 294T, HepG2) su zasejane u ploče sa 12 bunarića tako da je finalna koncentracija ćelija po bunaru iznosila  $3 \times 10^5$  ćelija/mL. Ploče su ostavljene na inkubaciju preko noći kako bi se formirao monosloj. Sledećeg dana medijum je izvučen iz bunara, ćelije su isprane 1xPBS-om i dodat je medijum sa ili bez test supstanci. Svaka ploča je sadržala bunare sa test supstancama, kontrolom rasta ćelija, kontrolom rastvarača (1% DMSO) i pozitivnom kontrolom (4NQO,  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Prilikom odabira koncentracija test supstanci uzimani su u obzir rezultati MTT testa, tj. za ispitivanje genotoksičnog potencijala, ćelije su izložene najvišim necitotoksičnim koncentracijama test supstanci.

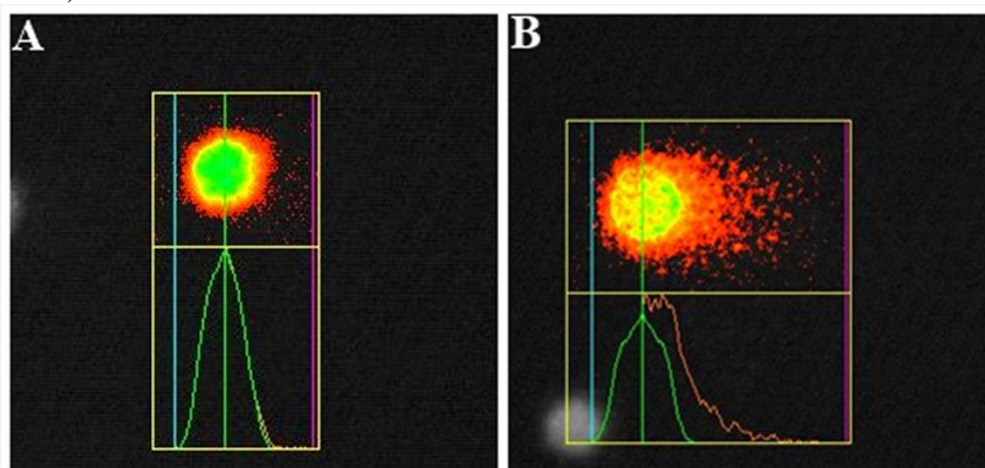
Tretman je vršen na 37 °C, u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>, tokom 24h. Nakon tretmana ćelije su korišćene za alkalni komet test.

### 3.2.5.3.2. Utvrđivanje genotoksičnih doza UVC i UVA zračenja primenom alkalnom komet testa

Kako bi se ispitao protektivni efekat ekstrakata prema UV zračenju bilo je potrebno prvo uspostaviti sub-letalne doze UV zračenja koje dovode do oštećenja na DNK molekulu. Za potrebe ovog eksperimenta korišćene su MRC-5 i Hs 294T ćelijske linije. Čelije su dan pre eksperimenta zasejane u ploče sa 12 bunariča ( $3 \times 10^5$  ćelija po bunaru) i ostavljene na inkubaciju kako bi formirale monosloj. Sutradan, medijum je otklonjen iz bunariča i dodato je 500  $\mu$ L 1xPBS-a kako bi se sprečilo isušivanje ćelija prilikom zračenja. Čelije su zatim ozračene vodeći računa da kontrola ostane neozračena. Za zračenje je korišćena UV lampa (Benda, NU-8 KL) sa svetlošću talasne dužine od 254 nm prilikom ispitivanja UVC zračenja, odnosno 366 nm za ispitivanje UVA zračenja. Primenjene su tri doze UVC zračenja (45, 54 i 63 J m<sup>-2</sup>) i tri doze UVA zračenja (1, 2, 3 J cm<sup>-2</sup>). Zračenje i priprema ćelija za komet test su odvijani u mraku. Nakon zračenja ćelije su tripsinizovane, centrifugirane i određena im je vijabilnost primenom tripan plavog (poglavlje 3.2.5.1.4.). Kako bi doza zračenja bila pogodna za dalje istraživanje, vijabilnost ćelija je trebala da iznosi preko 60% i ukoliko je ovaj uslov bio ispunjen pristupilo se rađenju komet testa.

### 3.2.5.3.3. Alkalni komet test

Za određivanje genotoksičnog potencijala test supstanci primenjena je alkalna verzija komet testa. Komet test (eng. *Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE) predstavlja metodu za detektovanje oštećenja DNK molekula na nivou pojedinačnih eukariotskih ćelija. Alkalnim komet testom je moguće detektovati jednolančane, dvolančane prekide i alkalno labilna mesta (Singh i sar., 1988). SCGE se zasniva na sposobnosti negativno naelektrisanih fragmenata DNK da putuju kroz agarozni gel od katode ka anodi, pri čemu oštećena jedra formiraju „komete“. Neoštećena DNK zadržava kompaktnu formu i ostaje u glavi komete, dok prekinuti lanci formiraju rep komete krećući se ka pozitivnoj elektrodi (Slika 8.)



Slika 8. A) Izgled neoštećenog nukleoida MRC-5 ćelijske linije; B) Izgled oštećenog nukleoida MRC-5 ćelijske linije nakon tretmana mutagenom 4NQO



## Radni protokol

### *Priprema ćelija*

Nakon odgovarajućeg tretmana ćelija, izvučen je medijum, ćelije su isprane 1xPBS-om i tripsinizovane dodavanjem 600  $\mu\text{L}$  0,1% tripsina. Reakcija tripsinizacije je prekinuta dodavanjem 600  $\mu\text{L}$  medijuma i sav sadržaj je prebačen u ependorfice i centrifugiran na 1000 rpm, 10 minuta, nakon čega je supernatant uklonjen i talog je resuspendovan medijumom.

### *Priprema mikroskopskih pločica i fiksacija ćelija*

Dan pre eksperimenta mikroskopske pločice su dobro oprane vodom i deterdžentom i ostavljene su da se osuše. Zatim su potapane u 0,5% NMP, obrisane s jedne strane i obeležene na strani na kojoj je nanet prvi sloj agaroze i ostavljene da se osuše preko noći. Na dan eksperimenta na pločice je naneto po 80  $\mu\text{L}$  1% NMP u duplikatu i prekriveno je pokrovnim stakalcem kako bi se formirao gel. Pločice su ostavljene u frižideru 5-10 minuta kako bi se gel stegao, a zatim su pokrovna stakalca pažljivo skinuta. Nakon toga, 30  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene ćelijske suspenzije je pomešano sa 1% LMP, naneto u duplikatu na pločice i prekriveno pokrovnim stakalcima. Nakon 5-10 minuta u frižideru, sa pločica su skinuta pokrovna stakalca i ćelije su bile spremne za liziranje.

### *Proces liziranja ćelija*

Liziranje ćelija je obavljeno stavljanjem pločica u pufer za lizu ćelija (pH 10), što dovodi do uklanjanja membrana, narušavanja citoplazme i nukleoplazme, ostavljajući nukleoid i oslobađajući DNK. Liza se odvijala u mraku na 4 °C, 1h, nakon čega su pločice izvađene, osušene i stavljene u kadice za elektroforezu.

### *Denaturacija i elektroforeza*

Oba procesa su obavljena korišćenjem pufera za elektroforezu (pH 13), pri čemu je denaturacija trajala 20 minuta, u mraku na 4 °C, što je omogućilo raskidanje vodoničnih veza u DNK molekulu. Nakon toga vršena je elektroforeza u mraku, na 4 °C pri voltaži od 25V i struji od 300mA, u trajanju od 20 minuta.

### *Neutralizacija i čuvanje pločica*

Neutralizacija se odvijala 15 minuta na 4 °C u mraku, stavljanjem pločica u pufer za neutralizaciju (pH 7,5). Pločice su čuvane preko noći u vlažnoj posudi na 4 °C i analizirane sledećeg dana.

### *Vizuelizacija i kvantifikacija kometa*

Gelovi su obojeni fluorescentim interkalirajućim agensom akridin oranžom. Po 20  $\mu\text{L}$  akridin oranža koncentracije 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  je naneto na gelove i prekriveno pokrovnim stakalcem. Po 100 nasumično odabranih nukleusa (50 po gelu) je analizirano pomoću fluorescentnog mikroskopa (ekscitacioni filter 510 – 560 nm, emisioni filter 590 nm, uveličanje 400x, Leica, DMLS, Austrija) i softvera *Comet IV Computer Software* (Perceptive Instruments, UK). U ovom istraživanju nivo oštećenja DNK molekula je praćen preko parametra intezitet repa komete (eng. *Tail intensity*, TI) koji predstavlja procenat DNK prisutne u repu komete.

## 3.2.5.4. Ispitivanje antigenotoksičnosti primenom alkalnog komet testa

3.2.5.4.1. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata i konstituenata lincure prema mutagenima iz hrane

Za ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure i njenih konsituenta (genciopikrozid, mangiferin) prema mutagenima IQ i PhIP korišćene su metabolički aktivne HepG2 ćelije koje omogućavaju metaboličku konverziju datih mutagena i samim tim ispoljavanje njihovih efekata. Kako bi se analizirao antigenotoksični efekat, ćelije su bile izložene ko-tretmanu (24h, 37 °C) različitim

prethodno utvrđenim negenotoksičnim koncentracijama ekstrakata i konstituenata i genotoksičnim koncentracijama mutagena IQ ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i PhIP ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Nakon izvođenja alkalnog komet testa (vidi poglavlje 3.2.5.3.3.) i očitavanja TI vrednosti, inhibicija IQ/PhIP indukovane genotoksičnosti je izračunata prema sledećoj formuli:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{TI_{kt}}{TI_m}\right) * 100$$

gde  $TI_{kt}$  predstavlja srednju vrednost inteziteta repa ko-tretmana, dok  $TI_m$  predstavlja srednju vrednost inteziteta repa IQ/PhIP tretmana.

#### 3.2.5.4.2. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure prema UV zračenju

Antigenotoksični efekat ekstrakt lincure prema UVC i UVA zračenju ispitan je na MRC-5 i Hs 294T ćelijskim linijama. Nakon zasejavanja ćelija u ploče sa 12 bunara ( $3 \times 10^5$  ćelija po bunaru), inkubacije i formiranja monosloja, ćelije su izložene negenotoksičnim koncentracijama test supstanci tokom 24h (pretretman antimutagenom). Na dan eksperimenta, ćelije su ozračene odabranim dozama UVC zračenja ( $63 \text{ J m}^{-2}$ ) i UVA zračenja ( $3 \text{ J cm}^{-2}$ ) koje dovode do dovoljnog oštećenja DNK molekula, ali ne utiču u velikoj meri na vijabilnost ćelija. Inhibicija UV-indukovane genotoksičnosti je izračunata prema sledećoj formuli:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{TI_t}{TI_{uv}}\right) * 100$$

gde  $TI_t$  predstavlja srednju vrednost intenziteta repa u pre-tretmanu ekstraktima, a  $TI_{uv}$  srednju vrednost inteziteta repa nakon zračenja.

#### 3.2.5.5. Praćenje ekspresije Nrf2 transkripcionog faktora kvantitativnom RT-PCR metodom (qRT-PCR)

##### 3.2.5.5.1. Izolacija RNK

Detekcija ekspresije Nrf2 transkripcionog faktora praćena je na HepG2 ćelijama primenom qRT-PCR metode po protokolu opisanom od strane Kaisarevic i sar. (2015) sa malim izmenama. Ćelije su zasejavane u ploče sa 12 bunarića u koncentraciji  $1 \times 10^6$  ćelija po bunaru i inkubirane na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , u prisustvu 5%  $\text{CO}_2$ , tokom 24h, kako bi formirale monosloj. Nakon toga, ćelije su izložene odabranim koncentracijama ekstrakata (50% EtOH) i konstituenata (genciopikrozid, mangiferin) koje su se pokazale najefikasnijim u ispitivanjima antigenotoksičnosti prema IQ i PhIP. Nakon 24-časovnog tretmana, medijum je otklonjen i pristupilo se izolaciji RNK. Dodato je 500  $\mu\text{L}$  trizola i ploče su šejkirane 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je sadržaj iz bunarića prenet u kriotube i izmešan na vorteksu 20 sekundi. Nakon toga dodato je 100  $\mu\text{L}$  hloroforma, kriotube su promućkane i inkubirane 2-3 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane na 12000 rpm, 15 minuta. Gornja faza koja se izdvojila nakon centrifugiranja i u kojoj se nalazila RNK je prebaćena u nove kriotube, potom je dodato 250  $\mu\text{L}$  izopropanola i smeša je kratko vorteksovana, inkubirana na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 12000 rpm, 10 minuta. Supernatant je uklonjen i u talog, u kome je ostala RNK, dodato je 500  $\mu\text{L}$  75% etanola. Potom su kriotube vorteksovane i centrifugirane na 7500 rpm, 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta i sušenja kriotuba dodato je 50  $\mu\text{L}$  DEPTC vode i smeša je inkubirana na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 minuta. Merenjem apsorbanci na 260 nm, kao i odnosa apsorbanci 260/280 i 260/230 (BioSecnano, Schimadzu Corporation, Kjoto, Japan) dobijaju se podaci o koncentraciji i čistoći RNK. Obzirom da su se vrednosti apsorbanci kretale oko 2 i 2,2 čime su ispunjeni kriterijumi o koncentraciji i čistoći RNK molekula, nastavljeno je sa daljom analizom.

### 3.2.5.5.2. qRT-PCR

Reverzna transkripcija RNK u cDNK urađena je pomoću High Capacity, cDNK Reverse Transcription Kit-a sa RNaza inhibitorom. Prevođenje RNK (2 µg) u cDNK je sprovedeno inkubiranjem reakcione smeše u Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) u sledećim uslovima: 10 minuta na 25 °C, 120 minuta na 37 °C, 5 minuta na 85 °C. Nivo ekspresije *Nrf2* gena je kvantifikovan qRT-PCR metodom na Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Nemačka), pri čemu je svaka PCR smeša (finalna zapremina 12,5 µL) sadržala cDNK (15 ng), 500 nM specifičnih prajmera (Tabela 2.) i master miks (Power SYBR Green PCR Master Mix). Uslovi ciklusa PCR reakcije su bili sledeći: 2 minuta na 50 °C, 10 minuta na 95 °C, 40 ciklusa na 95 °C 15 sekundi i 1 minut na 60 °C. Gen za β-aktin (eng. *housekeeping gene*) je korišćen kao endogena kontrola u odnosu na koju su normalizovani dobijeni rezultati. Relativna ekspresija *Nrf2* gena je izračunata na osnovu vrednosti praga ciklusa (eng. *cycle threshold*, Ct) prema načinu koji su opisali Voelker i sar. (2007).

### 3.2.5.6. Određivanje sadržaja i odnosa redukovanog i oksidovanog glutationa

Za ispitivanje uticaja test supstanci na sadržaj redukovanog (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa korišćen je komercijalni kit (Oxford Biomedical Research, SAD) prema upustvima proizvođača. Čelije su zasejavane u ploče sa 12 bunarića u koncentraciji od  $3 \times 10^6$  ćelija po bunaru i inkubirane na 37 °C, u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>, tokom 24h. Nakon formiranja monosloja, ćelije su izložene individualnim tretmanima ekstrakata (50% EtOH), konstituenata (genciopikrozid, mangiferin) i mutagena (IQ, PhIP), kao i ko-tretmanima ekstrakata/konstituenata sa mutagenima. Odabrane su koncentracije ekstrakata i konstituenata koje su se pokazale najefikasnijim u ispitivanjima antigenotoksičnog efekta. Nakon tretmana od 24h, ćelije su tripsinizovane i centrifugirane na 1600 rpm, 10 minuta. Potom je supernatant odliven, talog je resuspendovan sa 1 mL ledeno hladnog 1xPBS-a i ćelije su centrifugirane na 6200 rpm, 10 minuta. Supernatant je pažljivo otklonjen i dodato je 90 µL lizirajućeg pufera, a ependorfice su ostavljene 20 minuta na ledu dok se rastvor razbistrio. Potom su centrifugirane na 6200 rpm, 15 minuta na 4 °C. Supernatant je pažljivo prebačen u nove ependorfice. Priprema za GSSG uzorke podrazumevala je dodavanje 30 µL Scavenger-a (Thiol scavenger koji održava GSSG u oksidovanoj formi) u 100 µL pripremljenog lizata. Tako pripremljenoj smeši je dodato 270 µL 5% MPA (eng. *Metaphosphoric acid solution*) za uklanjanje proteina iz uzoraka, i smeša je centrifugirana na 1000 x g, 10 minuta na 4 °C. Potom je 25 µL supernatanta dodato u 1,5 mL pufera i uzorci su ostavljeni na ledu. GSH uzorci su pripremljeni dodavanjem 50 µL lizata u 350 µL 5% MPA, centrifugiranjem i ubacivanjem 12,5 µL u 750 µL pufera i ostavljeni su na ledu. Eskperiment je rađen u mikrotitar ploči sa 96 bunarića, pri čemu je ploča sadržala kolone sa uzorcima, standardom (10µM rastvor GSSG standarda) i blankom (pufer). Kalibraciona kriva standarda je konstruisana na osnovu upustva proizvođača. U odgovarajuće bunariće dodato je 50 µL uzorka, standarda i pufera, zatim je u sve bunariće dodato 50 µL DTNB (eng. *5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid*) rastvora, 50 µL rastvora rekombinantne glutation reduktaze i 50 µL rastvora NADPH (eng. *β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Merenje apsorbanci je vršeno u vremenu, na 405 nm (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina), svakog minuta u trajanju od 10 minuta, uzimajući u obzir i nultno vreme. Odnos GSH/GSSG je izračunat u skladu sa upustvima datim u komercijalnom kitu prema formuli:

$$GSH/GSSG = \frac{GSH - 2 * GSSG}{GSSG}$$

### **3.2.6. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada rezultata komet testa podrazumevala je primenu softverskog programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., SAD). Za ispitivanje normalnosti raspodele podataka korišćen je Kolmogorov-Smirnov test. Obzirom da podaci dobijeni u komet testu ne pokazuju normalnu raspodelu, za analizu rezultata je primenjen neparametrijski Mann-Whithney *U* test, pri čemu su pragovi značajnosti definisani na sledeći način:  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ . Za statističku analizu rezultata svih ostalih testova korišćen je softverski program GraphPad Prism 6.01 (Software, Inc., SAD), pri čemu su podaci podvrgnuti jednosmernoj analizi varijanse (one-way ANOVA), primenom Dunnet-ovog i Tukey-ovog testa. Prag statističke značajnosti je definisan na  $p < 0,05$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. *In vitro* gajenje *G. lutea*

Deo ove doktorske disertacije bavi se ispitivanjem bioloških aktivnosti i hemijskom analizom ekstrakata *G. lutea* gajene u *in vitro* uslovima (Cvetković i sar., 2020a). U te svrhe, bilo je neophodno uspostaviti *in vitro* kulturu i proceniti faktore rasta i morfogeneze na ovaj način gajene lincure. Klijavost semena lincure je nakon dve nedelje klijanja na MS medijumu obogaćenom sa 0,2 mM GA<sub>3</sub> iznosila 85%, tako da su eksplantati uspešno razvili rozete (Slika 9A, 9B). Dve nedelje nakon postavke eksperimenta primećeno je formiranje aksilarnih izdanaka na MS medijumu u prisustvu 2 mg L<sup>-1</sup> BAP i 0,2 mg L<sup>-1</sup> IAA. Nakon dodatne tri nedelje, na izrezanim izdancima je došlo do razvoja aksilarnih pupoljaka, čija je brojnost iznosila 6,85 ± 0,75 po eksplantatu (Slika 9C, Tabela 6.). Ukorenjenost izdanaka nakon tretmana sa 2 mg L<sup>-1</sup> NAA je iznosila 82,3 ± 3,9 % (Slika 9D, Tabela 6.). Dodatno, dobijeni su podaci i o svežoj i suvoj masi, kao i o stopi rasta korena i izdanka (Tabela 6.).

Tabela 6. *In vitro* rast i morfogeneza *G. lutea*

Masa (g)	Sveža masa	Suva masa	Stopa rasta
Koren	0,724 ± 0,062	0,127 ± 0,010	13,485 ± 1,241
Izdanak	0,623 ± 0,047	0,098 ± 0,008	4,391 ± 0,306
			Srednja vrednost ± SD
Prosečan broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu			6,85 ± 0,75
Izdanci sa razvijenim korenom (%)			82,3 ± 3,9

Vrednosti sveže i suve mase su izmerene nakon 9 nedelja rasta u *in vitro* kulturi, a na osnovu njih je izračunata i stopa rasta. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardne greške. Eksperiment je ponovljen 3 puta, sa po 10 eksplantata (n=30).



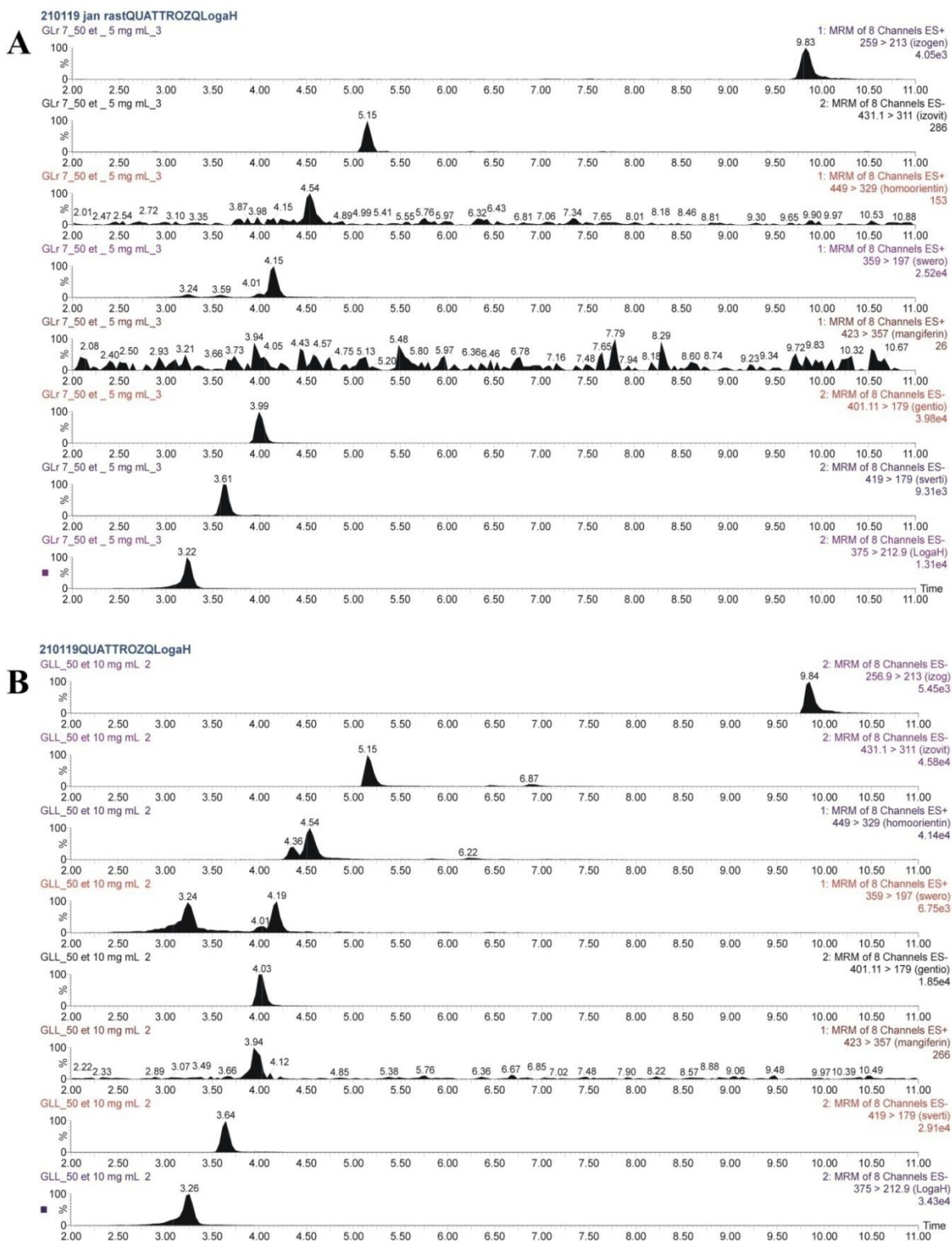
Slika 9. *In vitro* kultura *G. lutea*: A) primarni eksplantat; B) izgled rozeta tokom gajenja u subkulturi; C) aksilarni izdanci formirani nakon tri nedelje na MS podlozi obogaćenoj sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP i  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  IAA; D) ukorenjene biljke stare 9 nedelja. Skala je podešena na 5 mm (autor fotografije dr Milica Bogdanović).

#### 4.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata *G. lutea*

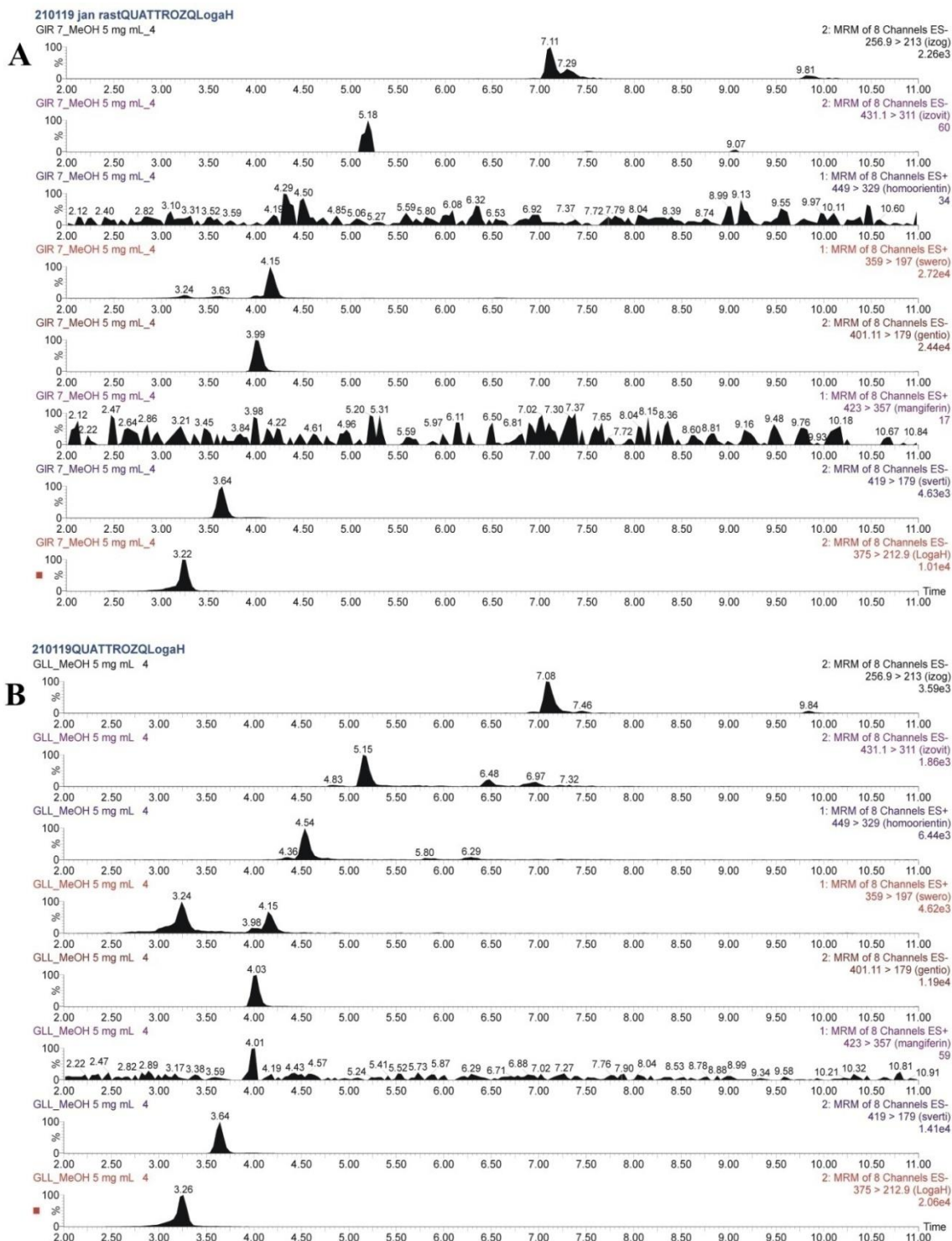
Ekstrakti *G. lutea* su hemijski okarakterisani i analizirani primenom UPLC hromatografije, kao i određivanjem sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida primenom kolorimetrijskih metoda (Cvetković i sar., 2020a; 2020b).

##### 4.2.1. UPLC-PDA MS/MS analiza ekstrakata

Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata lincure je urađena pomoću UPLC hromatografije sa PDA detektorom i primenom masene spektrometrije prema uslovima opisanim u poglavlju 3.2.3. Ekstrakti lincure su podvrgnuti istim uslovima kao i smeša osam standarda, i to sekoiridoida (genciopikrozid, sverozid, svertiamarin), iridoida (loganska kiselina), ksantona (mangiferin i izogentizin) i C-glukoflavona (homoorinetin i izoviteksin). Karakteristični hromatogrami ukupne jonske struje (eng. *total ion chromatograms*, TIC) ekstrakata i smeše standarda, kao i apsorpcioni spektri standarda, su dati u Prilogu. MRM hromatogrami svih ekstrakata su predstavljeni na slikama 10, 11 i 12.

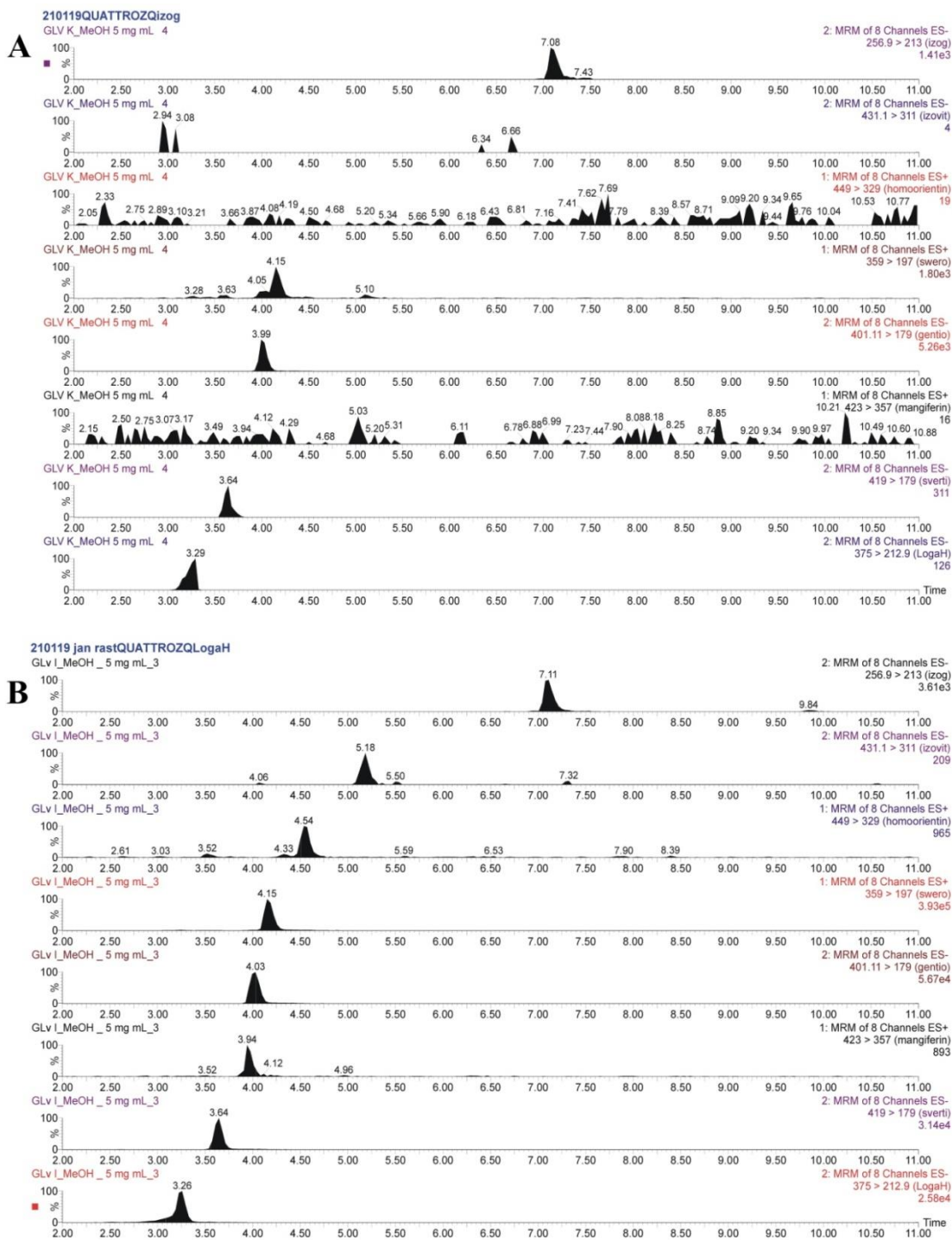


Slika 10. MRM hromatogrami 50% EtOH plantažnih ekstrakata lincure u koncentraciji od 10 mg mL<sup>-1</sup> u ESI modu: A) GLK; B) GLL



Slika 11. MRM hromatogrami MeOH plantažnih ekstrakata lincure u koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> u ESI modu: A) GLK; B) GLL





Slika 12. MRM hromatogrami MeOH *in vitro* ekstrakata lincure u koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> u ESI modu: A) GLvK; B) GLvI

Kvantitativna analiza ekstrakata *G. lutea* je pokazala da je najveća količina genciopikrozida detektovana u ekstraktu poreklom od *in vitro* izdanka (GLvI MeOH). Dodatno, genciopikrozid se pokazao kao najzastupljeniji konstituent i u ekstraktima poreklom od korenova kako plantažnih, tako i *in vitro* biljaka (GLK 50% EtOH, GLK MeOH, GLvK MeOH). Dalje, velike količine homoorientina i izoviteksina, koji pripadaju grupi C-glukoflavona, su detektovane u 50% vodeno-etanolnom ekstraktu

plantažno gajenog lista biljke (GLL 50% EtOH). Što se tiče metanolnog plantažno gajenog lista (GLL MeOH), najzastupljeniji konstituent je bio loganska kiselina. Supstance čiji je udeo u ekstraktima takođe bio veći od 1% su: a) sverozid u GLK 50% EtOH; b) genciopikrozid i loganska kiselina u GLL 50% EtOH; c) sverozid u GLK MeOH; d) genciopikrozid u GLL MeOH; e) sverozid, svertiamarin i loganska kiselina u GLvI MeOH. Iako u manjim količinama, ksantoni mangiferin i izogentizin su takođe identifikovani u ekstraktima lincure. Generalno, testirani konstituenti lincure koji pripadaju iridoidnoj/sekoiridoidnoj grupi jedinjenja (loganska kiselina, genciopikrozid, sverozid, svertiamarin) su detektovani u većim količinama u izdanku *in vitro* biljaka, u poređenju sa drugim ekstraktima (Tabela 7.).

Tabela 7. Sadržaj (%) glavnih konstituenata u ekstraktima *G. lutea*

Konstituent (%)	GLK 50% EtOH	GLL 50% EtOH	GLK MeOH	GLL MeOH	GLvK MeOH	GLvI MeOH
Genciopikrozid	5,058±0,291 <sup>a</sup>	1,141±0,147 <sup>b</sup>	4,424±0,339 <sup>a</sup>	1,528±0,170 <sup>b</sup>	1,949±0,101 <sup>b</sup>	<b>11,463±0,098<sup>c</sup></b>
Sverozid	2,080±0,270 <sup>a</sup>	0,207±0,034 <sup>b</sup>	1,999±0,052 <sup>a</sup>	0,232±0,033 <sup>b</sup>	0,184±0,005 <sup>b</sup>	3,495±0,125 <sup>c</sup>
Svertiamarin	0,631±0,032 <sup>a</sup>	0,301±0,036 <sup>a</sup>	0,551±0,017 <sup>a</sup>	0,302±0,007 <sup>b</sup>	0,046±0,005 <sup>c</sup>	1,338±0,056 <sup>d</sup>
Loganska kiselina	0,710±0,148 <sup>a</sup>	1,792±0,096 <sup>b</sup>	0,706±0,006 <sup>a</sup>	1,789±0,152 <sup>b</sup>	0,031±0,005 <sup>c</sup>	2,271±0,184 <sup>d</sup>
Mangiferin	<LOD	0,129±0,023	<LOD	0,049±0,003 <sup>a</sup>	<LOD	0,110±0,022 <sup>b</sup>
Izogentizin	0,259±0,086 <sup>a</sup>	0,231±0,053 <sup>a</sup>	0,136±0,019 <sup>a</sup>	0,049±0,002 <sup>b</sup>	0,022±0,011 <sup>a</sup>	0,039±0,007 <sup>a</sup>
Homoorientin	0,025±0,005 <sup>a</sup>	3,999±0,122 <sup>b</sup>	0,019±0,002 <sup>a</sup>	0,692±0,064 <sup>b</sup>	<LOD	0,140±0,020 <sup>c</sup>
Izoviteksin	0,013±0,005 <sup>a</sup>	3,038±0,487 <sup>b</sup>	0,006±0,003 <sup>a</sup>	0,739±0,033 <sup>b</sup>	<LOD	0,114±0,001 <sup>c</sup>

Rezultati su izraženi kao % sadržaja ekstrakata ± standardne devijacije. LOD (limit detekcije): za mangiferin=0.93 µg mL<sup>-1</sup>; za homoorientin=0.83 µg mL<sup>-1</sup>; za izoviteksin=0.22 µg mL<sup>-1</sup>. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa. Vrednosti sa različitim slovima u svakom redu pokazuju statistički značajnu razliku u količini istog konstituenta između ekstrakata.

#### 4.2.2. Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida

Hemijska karakterizacija je uključivala i određivanje sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida u svim korišćenim ekstraktima lincure. Rezultati su predstavljeni kao mg ekvivalenata galne kiseline na 1 g suve mase biljnog ekstrakta (mg GEK g<sup>-1</sup>) prilikom određivanja sadržaja polifenola, odnosno kao mg ekvivalenata kvercetina na 1 g suve mase biljnog ekstrakta (mg QEK g<sup>-1</sup>) pri određivanju sadržaja flavonoida (Tabela 8.). Najveći sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida je zabeležen za GLL 50% EtOH i GLvI MeOH, a samo nešto manji za GLL MeOH ekstrakte. Može se primetiti da je sadržaj obe grupe jedinjenja veći u nadzemnim delovima biljaka. Bez obzira na način gajenja biljaka i rastvarač korišćen prilikom ekstrakcije, količina ukupnih polifenola i flavonoida je bila skoro 2 puta veća u ekstraktima listova/izdanaka u poređenju sa ekstraktima korenova.

Tabela 8. Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida u ekstraktima *G. lutea*

Ekstrakti	Ukupni polifenoli (mg GEK g <sup>-1</sup> )	Ukupni flavonoidi (mg QEK g <sup>-1</sup> )
GLK 50% EtOH	25,8±3,2 <sup>a</sup>	1,4±0,1 <sup>a</sup>
GLL 50% EtOH	<b>53,4±3,5<sup>b</sup></b>	<b>20,7±1,8<sup>b</sup></b>
GLK MeOH	22,7±3,3 <sup>a</sup>	1,1±0,1 <sup>a</sup>
GLL MeOH	<b>44,7±3,5<sup>b</sup></b>	<b>18,2±2,7<sup>b</sup></b>
GLvK MeOH	23,9±1,7 <sup>a</sup>	1,8±0,4 <sup>a</sup>
GLvI MeOH	<b>50,8±0,5<sup>b</sup></b>	<b>21,6±3,1<sup>b</sup></b>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa. Vrednosti sa različitim slovima u svakoj koloni pokazuju statističku značajnost između ekstrakata.

### 4.3. Antibakterijska aktivnost ekstrakata *G. lutea* i njenih konstituenata

Antibakterijski efekat ekstrakata lincure i njenih konstituenata ispitan je prema kontaminantima hrane, kako patogenim bakterijama, tako i uzročnicima njenog kvarenja, primenom mikrodilucionog testa. Dodatno, uzimajući u obzir da su bakterije u formi biofilma dosta rezistentnije na primenu antimikrobnih agenasa, ispitan je sposobnost ekstrakata i konstituenata lincure da sprečavaju formiranje biofilma odabranih sojeva.

#### 4.3.1. Određivanje minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija ekstrakata i konstituenata *G. lutea*

Primenom mikrodilucine metode ispitan je antibakterijska aktivnost ekstrakata *G. lutea* prema 8 bakterijskih sojeva (Tabela 9.). Gram pozitivne bakterije su pokazale znatno veću osetljivost na delovanje ekstrakata u odnosu na gram negativne sojeve (Cvetković i sar., 2018). Analiza dobijenih MIK i MBK vrednosti je ukazala na sledeće: (i) komparacija aktivnosti ekstrakata plantažno i *in vitro* gajenih biljaka ukazuje na veću aktivnost drugo pomenutih, dok je (ii) komparacija aktivnosti ekstrakata poreklom iz različitih biljnih delova ukazala na veću koncentraciju biološki aktivnih jedinjenja u nadzemnim organima (listovi i izdanci) nego u korenovima. Najizraženiji efekat je detektovan nakon tretmana GLvI MeOH ekstraktom na *S. aureus* i *L. monocytogenes*, sa MIK/MBK vrednostima od 0,156/1,25 mg mL<sup>-1</sup>, odnosno 0,3125 i 0,625 mg mL<sup>-1</sup>. Nešto manju osetljivost na delovanje GLvI MeOH ekstrakta je pokazao *B. subtilis*, sa detektovanim MIK i MBK vrednostima od 1,25 i 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Ekstrakt GLvK MeOH je takođe ispoljio antibakterijski efekat prema *L. monocytogenes* i *S. aureus*, pri čemu su MIK vrednosti detektovane na 0,625 mg mL<sup>-1</sup>, dok su se MBK vrednosti kretale u opsegu 1,25-2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Kada je reč o ekstraktima listova plantažno gajene lincure, najefikasnijim se pokazao GLL MeOH i to prema *B. subtilis* i *E. faecalis* sa MIK vrednostima od 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, i MBK vrednostima od 5 mg mL<sup>-1</sup>. Što se tiče antibakterijske aktivnosti ekstrakata korenova plantažno gajene lincure, ona se kretala u opsegu od 5-10 mg mL<sup>-1</sup>. Antibakterijski efekat ekstrakata prema gram negativnim bakterijama je izostao u opsegu testiranih koncentracija (do 10 mg mL<sup>-1</sup>), sa izuzetkom *P. aeruginosa*, na kojem su detektovane MIK vrednosti od 10 mg mL<sup>-1</sup> i to za ekstrakte plantažno gajene *G. lutea*.

U cilju bližeg determinisanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata lincure i procene potencijalnog udela njenih konstituenata u uočenoj aktivnosti, ispitan je i antibakterijska aktivnost čistih supstanci koje su zastupljene u testiranim ekstraktima. Primenom mikrodilucione metode analizirana je aktivnost sekoiridoidnih (genciopikrozid, sverozid, svertiamarin), ksantonskih (mangiferin) i C-glukoflavonskih jedinjenja (izoviteksin, homoorientin) i to prema sojevima koji su pokazali najveću osetljivost prema ekstraktima lincure, uključujući *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 10. može se zaključiti da je *L. monocytogenes* pokazala najveću osetljivost prema testiranim jedinjenjima, naročito nakon tretmana mangiferinom i homoorientinom sa MIK vrednostima od 15,6 odnosno 62,5 µg mL<sup>-1</sup>. Efekat sverozida, svertiamarina i izoviteksina prema *L. monocytogenes* je bio nešto slabiji sa MIK vrednošću od 250 µg mL<sup>-1</sup>, dok je efekat genciopikrozida potpuno izostao. Ostali testirani sojevi su pokazali slabiju osetljivost, pri čemu se antibakterijski efekat konstituenata kretao u opsegu MIK vrednosti od 500-1000 µg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 9. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije ekstrakata lincure na odabranim bakterijskim sojevima

Bakterije/Ekstrakti	GLK 50%EtOH (mg mL <sup>-1</sup> )		GLL 50%EtOH (mg mL <sup>-1</sup> )		GLK MeOH (mg mL <sup>-1</sup> )		GLL MeOH (mg mL <sup>-1</sup> )		GLvK MeOH (mg mL <sup>-1</sup> )		GLvI MeOH (mg mL <sup>-1</sup> )		Streptomicin (µg mL <sup>-1</sup> )	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	5	10	5	10	5	10	2,5	5	5	10	1,25	2,5	1,56	3,125
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5	10	5	10	5	10	2,5	5	nd*	nd	5	10	12,5	25
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	10	nd	10	nd	nd	nd	5	10	<b>0,625</b>	1,25	<b>0,3125</b>	0,625	25	50
<i>S. aureus</i> MSSA ATCC 25923	5	10	5	10	nd	nd	5	10	<b>0,625</b>	2,5	<b>0,156</b>	1,25	6,25	12,5
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	nd	nd	nd	nd	10	nd	5	nd	5	10	5	10	6,25	12,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,125	6,25
<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,5	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	10	nd	10	nd	10	nd	10	nd	nd	nd	nd	nd	12,5	50

nd\*- Nije detektovano u opsegu testiranih koncentracija (0,078-10 mg mL<sup>-1</sup>). Streptomicin je korišćen kao pozitivna kontrola u opsegu koncnetracija 0,78-100 µg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 10. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije konstituenata lincure na odabranim bakterijskim sojevima

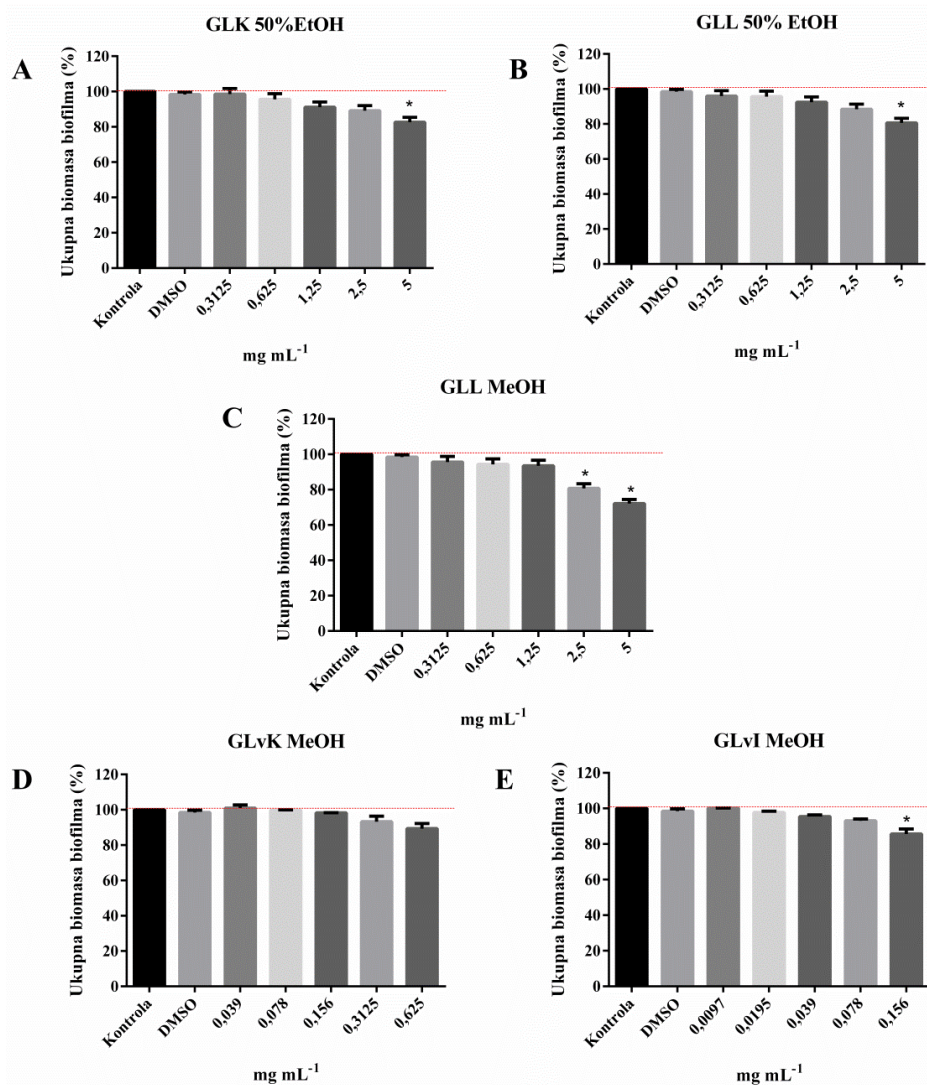
Bakterije/ Konstituenti	G (µg mL <sup>-1</sup> )		S (µg mL <sup>-1</sup> )		Sv (µg mL <sup>-1</sup> )		M (µg mL <sup>-1</sup> )		I (µg mL <sup>-1</sup> )		H (µg mL <sup>-1</sup> )	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	nd*	nd	1000	nd	1000	nd	500	1000	500	nd	500	1000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	nd	nd	nd	nd	1000	nd	nd	nd	1000	nd	nd	nd
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	nd	nd	250	1000	250	nd	<b>15,6</b>	nd	250	500	<b>62,5</b>	nd
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	nd	nd	1000	nd	1000	nd	nd	nd	1000	nd	nd	nd

nd\*-Nije detektovano u opsegu testiranih koncentracija (7,8-1000 µg mL<sup>-1</sup>).

G-genciopikrozid; S-sverozid; Sv-svertiamarin; M-mangiferin; I-izoviteksin; H-homoorientin.

### 4.3.2. Efekat ekstrakata i konstituenata *G. lutea* na formiranje biofilma odabranih sojeva

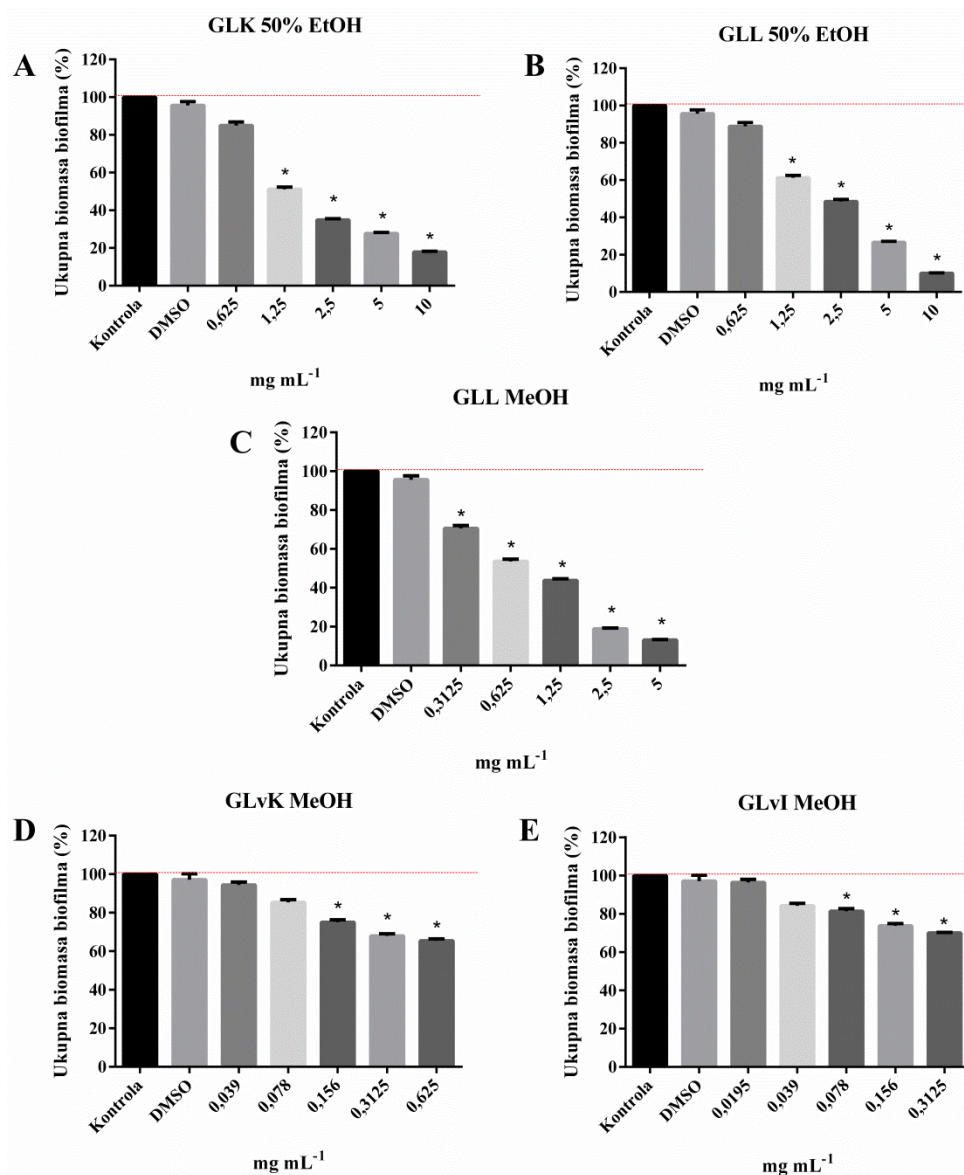
U daljem ispitivanju antibakterijske aktivnosti ekstrakata i konstituenata lincure, analiziran je njihov efekat na sprečavanje formiranja biofilma bojenjem njegove ukupne biomase kristal violetom. Na osnovu rezultata mikrodilucionog testa (Tabela 9.) odabrani su oni sojevi koji su pokazali veći stepen osetljivosti prema ekstraktima i konstituentima, a to su bili *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Koncentracije test supstanci korišćene u ispitivanju antibiofilm efekta su se kretale u opsegu od  $(1/16 - 1)$  MIK vrednosti. Kada je reč o ekstraktima, ispitan je efekat svih, osim GLK MeOH, s obzirom da on nije pokazao antibakterijski efekat na testiranim sojevima. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da je aktivnost ekstrakata dozno-zavisna. U slučaju *S. aureus*, primećuje se nešto slabija aktivnost ekstrakta u inhibiciji formiranja biofilma (Slika 13, Tabela 8.1., Prilog). Najjači efekat je ispoljio GLL MeOH ekstrakt koji je pri najvećoj testiranoj kocentraciji sprečio formiranje biofilma za 27,9%, dok se inhibicija formiranja biofilma delovanjem ostalih ekstrakata kretala u opsegu 10,7-19,4%.



Slika 13. Uticaj ekstrakata *G. lutea* na formiranje biofilma *S. aureus*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. DMSO-kontrola rastvarača. Statistička značajnost u odnosu na DMSO je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ).

S druge strane, efekat ekstrakata na formiranje biofilma *L. monocytogenes* je bio dosta izraženiji (Slika 14, Tabela 8.1., Prilog). Najjači efekat je ostvaren nakon tretmana GLL 50% EtOH ekstraktom, pri čemu je aktivnost rasla sa porastom koncentracije, a inhibicija formiranja biofilma se kretala od 11,1% do čak 90%. Nadalje, zapažena je i aktivnost GLL MeOH i GLK 50% EtOH ekstrakata sa maksimalnom inhibicijom formiranja biofilma od 86,9% odnosno 82,2%. Nešto slabiji efekat je zabeležen za *in vitro* ekstrakte lincure, pri čemu se procenat inhibicije formiranja biofilma GLvK MeOH ekstrakta kretao u opsegu od 5,6-34,6%, a GLvI MeOH ekstrakta od 3,5-30%.

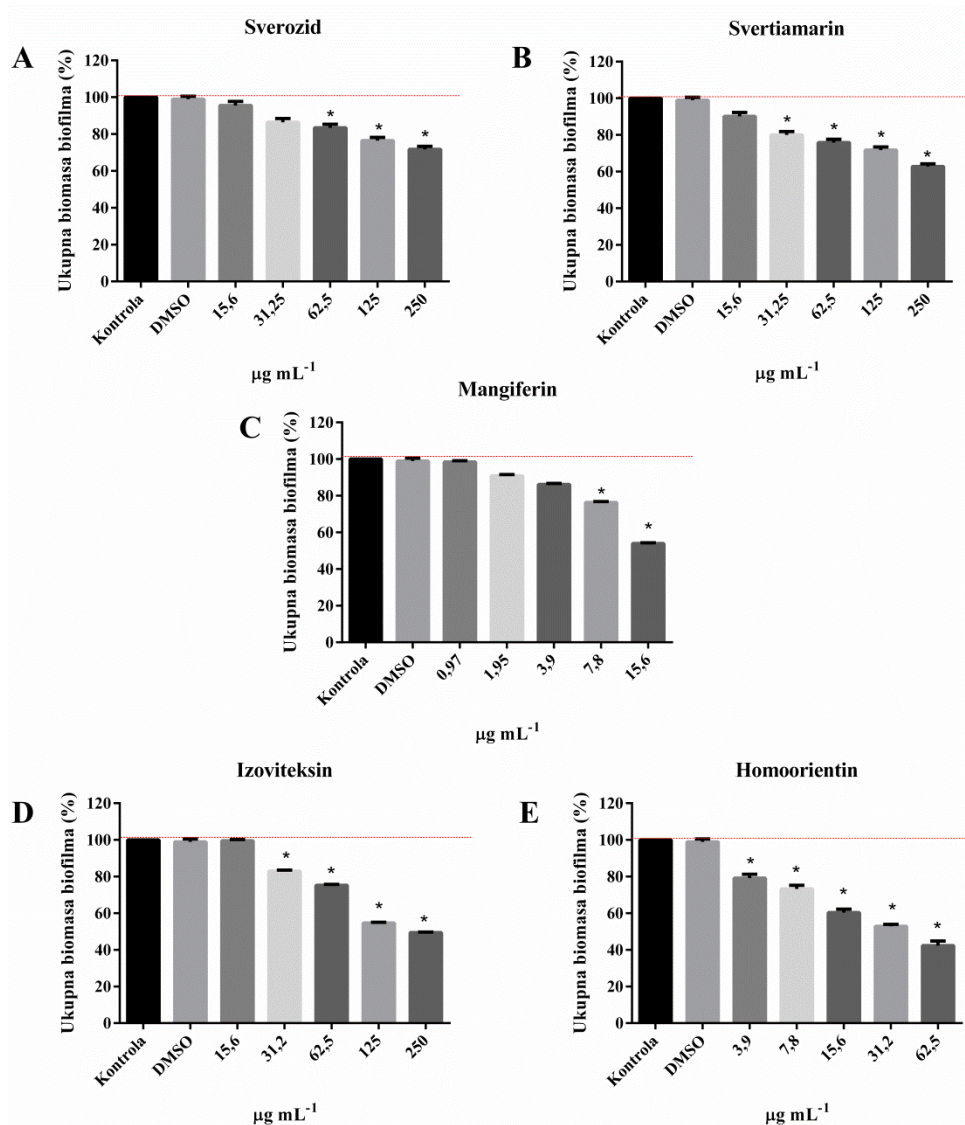


Slika 14. Uticaj ekstrakata *G. lutea* na formiranje biofilma *L. monocytogenes*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±standardne devijacije. DMSO-kontrola rastvarača. Statistička značajnost u odnosu na DMSO je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ).

U daljem istraživanju antibiofilm aktivnosti *G. lutea*, ispitan je efekat konstituenata da sprečavaju formiranje biofilma. Kao i u slučaju ekstrakata, izbor konstituenata i soja prema kojem je ispitan efekat zaviso je od rezultata mikrodilucione metode. Uzimajući u obzir ove rezultate (Tabela 10.), ispitan je antibiofilm aktivnost sverozida, svertiamarina, mangiferina, izoviteksina i

homoorientina prema *L. monocytogenes* koja se pokazala najosetljivijom na delovanje ovih konstituenata. Najizraženiji antibiofilm efekat je zabeležen za homoorientin, koji je pri svim testiranim koncentracijama pokazao značajnu inhibitornu aktivnost u opsegu 20,8-57,6% (Slika 15; Tabela 8.1., Prilog). Dosta dobar efekat su pokazali i mangiferin i izoviteksin, pri čemu su na najvećim testiranim koncentracijama inhibirali formiranje biofilma *L. monocytogenes* za 46% odnosno 50,6%. S druge strane, slabiji antibiofilm efekat je pokazan za sverozid i svertimarin, sa maksimumom inhibicije formiranja biofilma od 28,2% odnosno 37,2% pri najvećim testiranim koncentracijama.



Slika 15. Uticaj konstituenata *G. lutea* na formiranje biofilma *L. monocytogenes*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. DMSO-kontrola rastvarača. Statistička značajnost u odnosu na DMSO je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata *G. lutea* prema IQ i PhIP mutagenima

Antigenotoksični efekat ekstrakata lincure prema mutagenima iz hrane IQ i PhIP ispitan je na bakterijskom model sistemu (*S. typhimurium* TA1535), kao i na humanim ćelijama (HepG2), primenom SOS/*umuC*, odnosno alkalnog komet testa. U cilju ispitivanja antigenotoksičnog efekta bilo

je neophodno odrediti necitotoksične doze ekstrakata i mutagena. Takođe je bilo potrebno odrediti negenotoksične doze ekstrakta, odnosno genotoksične doze mutagena, koje su zatim kombinovane u testovima procene antigenotoksičnosti.

#### 4.4.1. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata *G. lutea* u SOS/*umuC* testu

Kako bi se ispitao genotoksični efekat uzoraka bilo je neophodno najpre obaviti preliminarna ispitivanja koja su trebala da pruže informaciju o opsegu koncentracija supstanci koje je moguće testirati. Naime, svako ispitivanje antigenotoksičnosti podrazumeva prethodno testiranje citotoksičnosti, kako bi se utvrdio netoksični opseg koncentracija, kao i genotoksičnosti, kako bi bio određen negenotoksični opseg ekstrakata i genotoksične doze mutagena.

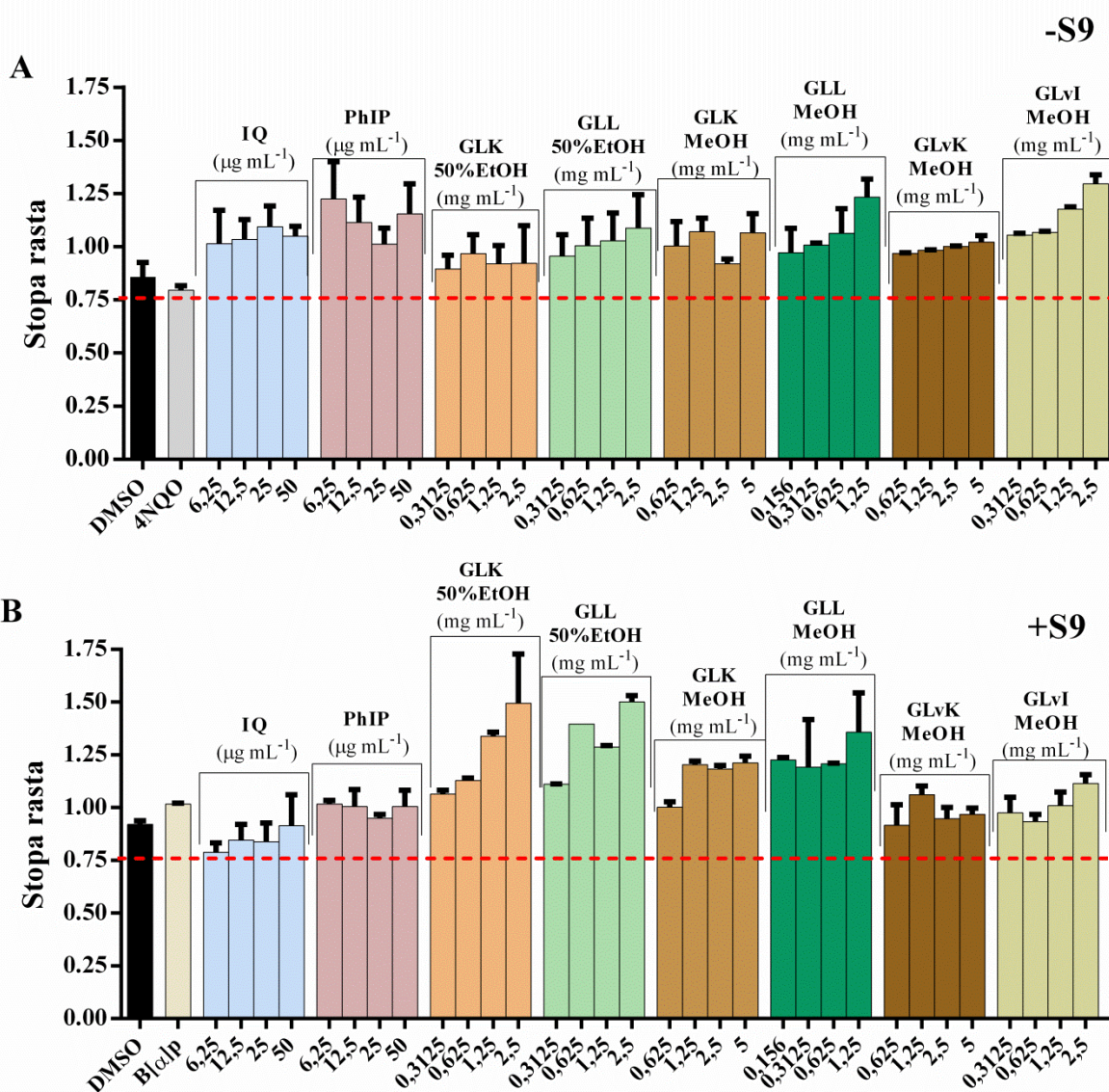
##### 4.4.1.1. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci na *S. typhimurium* TA1535 soju

Necitotoksične koncentracije ekstrakata i mutagena određivane su primenom mikrodilucione metode, pri čemu su dobijeni podaci o MIK vrednostima test supstanci (Tabeli 11.). Za ispitivanje genotoksičnog potencijala korišćene su doze počev od MIK vrednosti i niže. S obzirom da je dužina tretmana ekstraktima u ovom testu znatno kraća u poređenju sa mikrodilucionim testom, očekivano je da inhibicija rasta odsustvuje ili barem bude značajno manje izražena. Odsustvo citotoksičnosti odabranih koncentracija test supstanci je dodatno potvrđeno nakon određivanja stope rasta u SOS/*umuC* testu. Rezultati stope rasta u odsustvu i prisustvu metaboličke aktivacije su prikazani na Slici 16; na osnovu njih se može uočiti da su vredosti stope rasta za sve testirane supstance veće od granične vrednosti postavljene protokolom testa (0,75), što ukazuje na odsustvo toksičnog efekta supstanci.

Tabela 11. MIK vrednosti testiranih supstanci

Test supstance	MIK vrednosti
GLK 50% EtOH	2,5 mg mL <sup>-1</sup>
GLL 50% EtOH	2,5 mg mL <sup>-1</sup>
GLK MeOH	5 mg mL <sup>-1</sup>
GLL MeOH	1,25 mg mL <sup>-1</sup>
GLvK MeOH	5 mg mL <sup>-1</sup>
GLvI MeOH	2,5 mg mL <sup>-1</sup>
IQ	50 µg mL <sup>-1</sup>
PhIP	50 µg mL <sup>-1</sup>





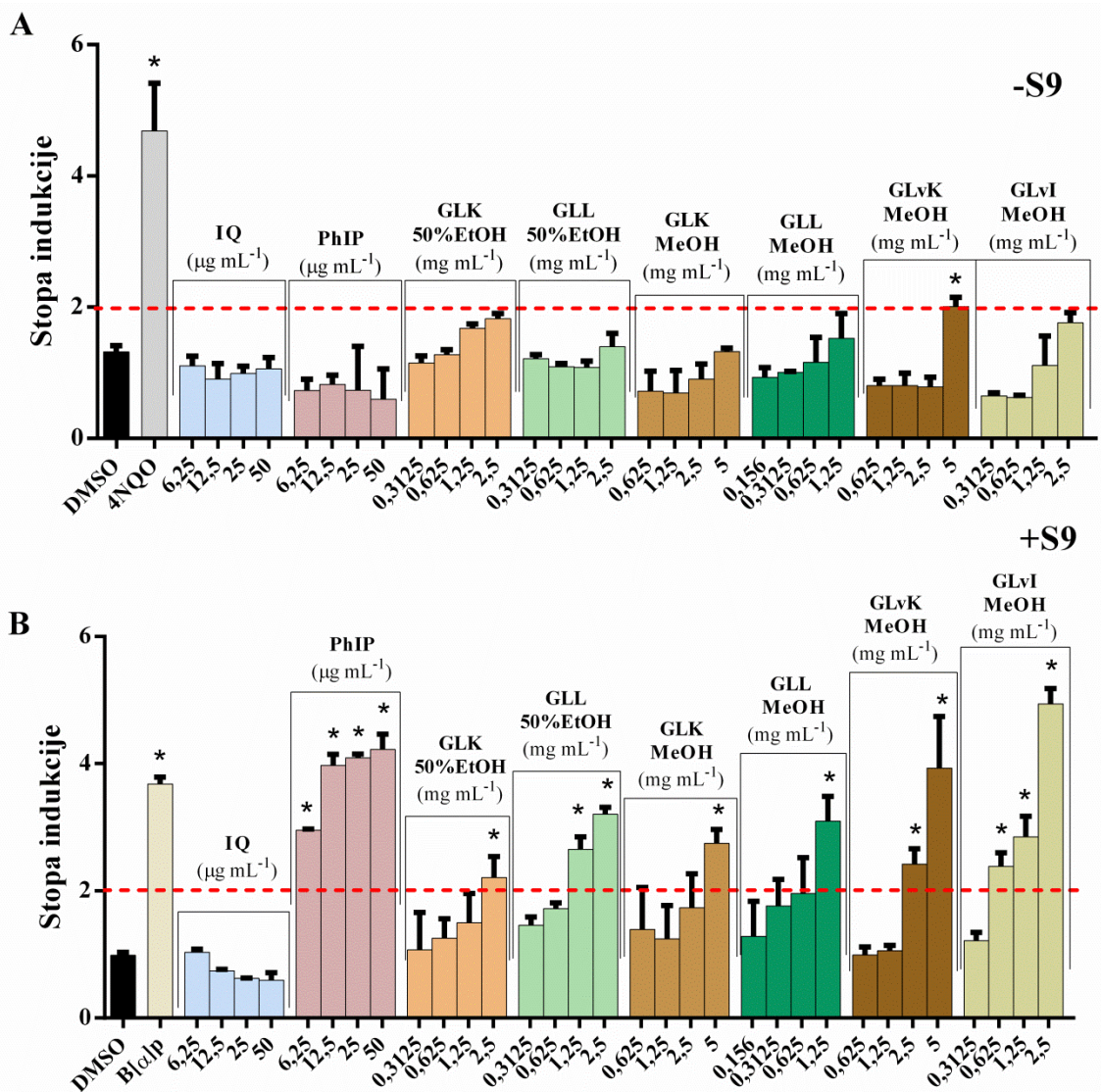
Slika 16. Uticaj test supstanci na stopu rasta bakterije *S. typhimurium* u SOS/*umuC* testu u odsustvu (A) i prisustvu (B) metaboličke aktivacije (S9 frakcija).

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti stope rasta  $\pm$  standardne devijacije. Crvena linija pozicionirana na 0,75 predstavlja prag ispod kog se efekat smatra citotoksičnim. DMSO (10%) - kontrola rastvarača; 4NQO (0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i B[a]p (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) – pozitivne kontrole.

#### 4.4.1.2. Procena genotoksičnosti test supstanci u SOS/*umuC* testu

Genotoksični potencijal ekstrakata i mutagena je ispitan u odsustvu i prisustvu metaboličke aktivacije, određivanjem stope indukcije DNK oštećenja. Determinacija stope indukcije u eksperimentima bez S9 frakcije je pokazala da samo najviša testirana koncentracija GLvK MeOH ekstrakta ispoljava nešto slabiji genotoksični efekat (Slika 17A), dok je genotoksičnost svih ostalih testiranih ekstrakata izostala (Cvetković i sar., 2020a). S druge strane, nakon testiranja u prisustvu metaboličke S9 frakcije, svi ekstrakti su na određenim koncentracijama pokazali genotoksični efekat (Slika 17B), pri čemu je GLvI MeOH ekstrakt ispoljio najveću sposobnost indukcije DNK oštećenja i to na najvišoj testiranoj koncentraciji, sa stopom indukcije od čak  $4,9 \pm 0,2$ . Zbog toga, niže

negenotoksične koncentracije ekstrakata (do  $0,3125 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLL MeOH i GLvI MeOH,  $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLL 50% EtOH,  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLK 50% EtOH i GLvK MeOH i  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLK MeOH, i) su izabrane za dalja testiranja antigenotoksičnosti. S druge strane, analiza genotoksičnosti mutagena je ukazala na odsustvo iste prilikom testiranja bez metaboličke aktivacije. Dodavanje S9 frakcije je dovelo do metaboličke konverzije i aktivacije samo PhIP mutagena, dok je genotoksični efekat IQ mutagena potpuno izostao (Slika 17B). Na osnovu rezultata genotoksičnosti mutagena, u daljem radu ispitana je antigenotoksičnost ekstrakata lincure prema PhIP mutagenu primenjenom u koncentraciji od  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obzirom da pri ovoj dozi indukuje dovoljan genotoksični odgovor sa stopom indukcije od  $3,9 \pm 0,2$ .

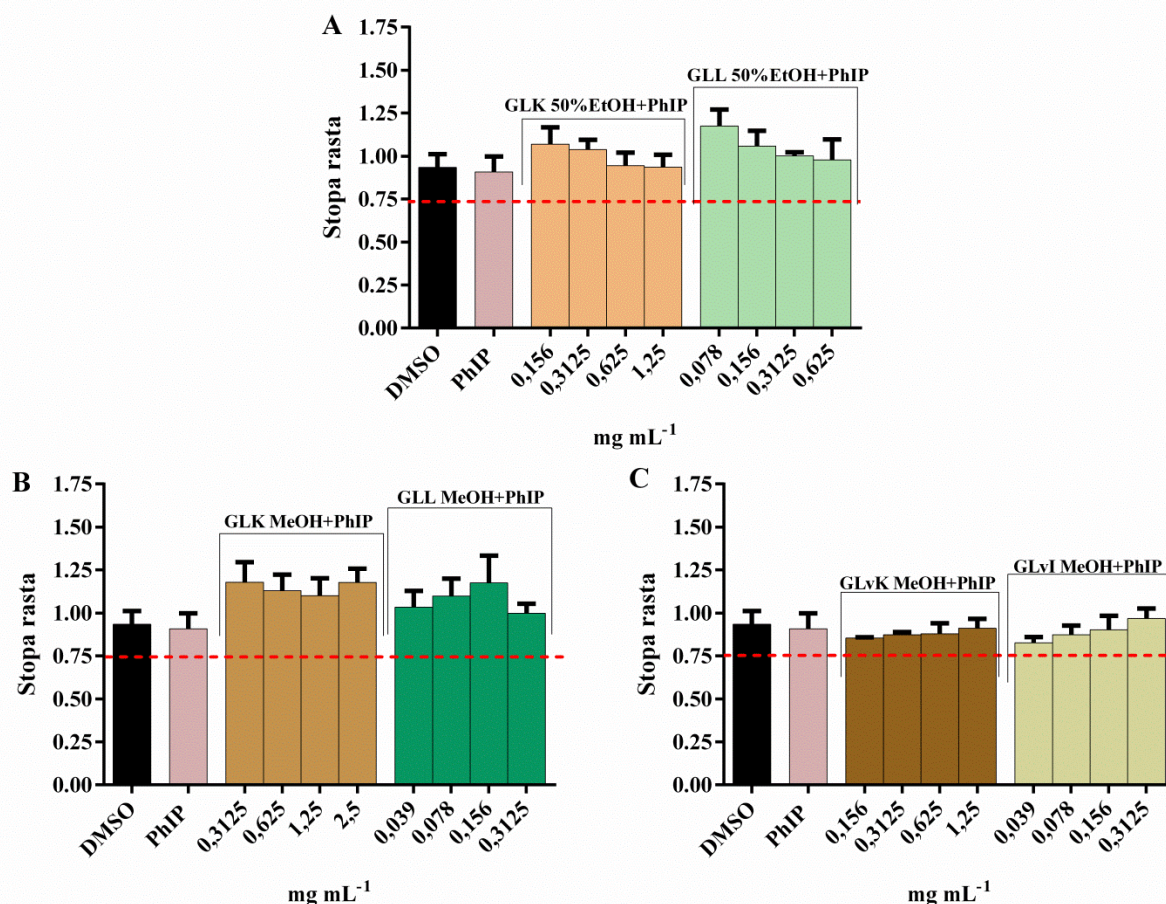


Slika 17. Uticaj test supstanci na stopu indukcije DNK oštećenja u SOS/*umuC* testu u odsustvu (A) i prisustvu (B) metaboličke aktivacije (S9 frakcija).

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti stopa indukcije  $\pm$  standardne devijacije. Crvena linija pozicionirana na 2 predstavlja prag iznad kog se efekat smatra genotoksičnim. DMSO (10%) – kontrola rastvarača; 4NQO ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i B[a]p ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) - pozitivne kontrole. Statistička značajnost u odnosu na DMSO je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.4.1.3. Procena antigenotoksičnog efekta ekstrakata *G. lutea* prema PhIP mutagenu u SOS/*umuC* testu

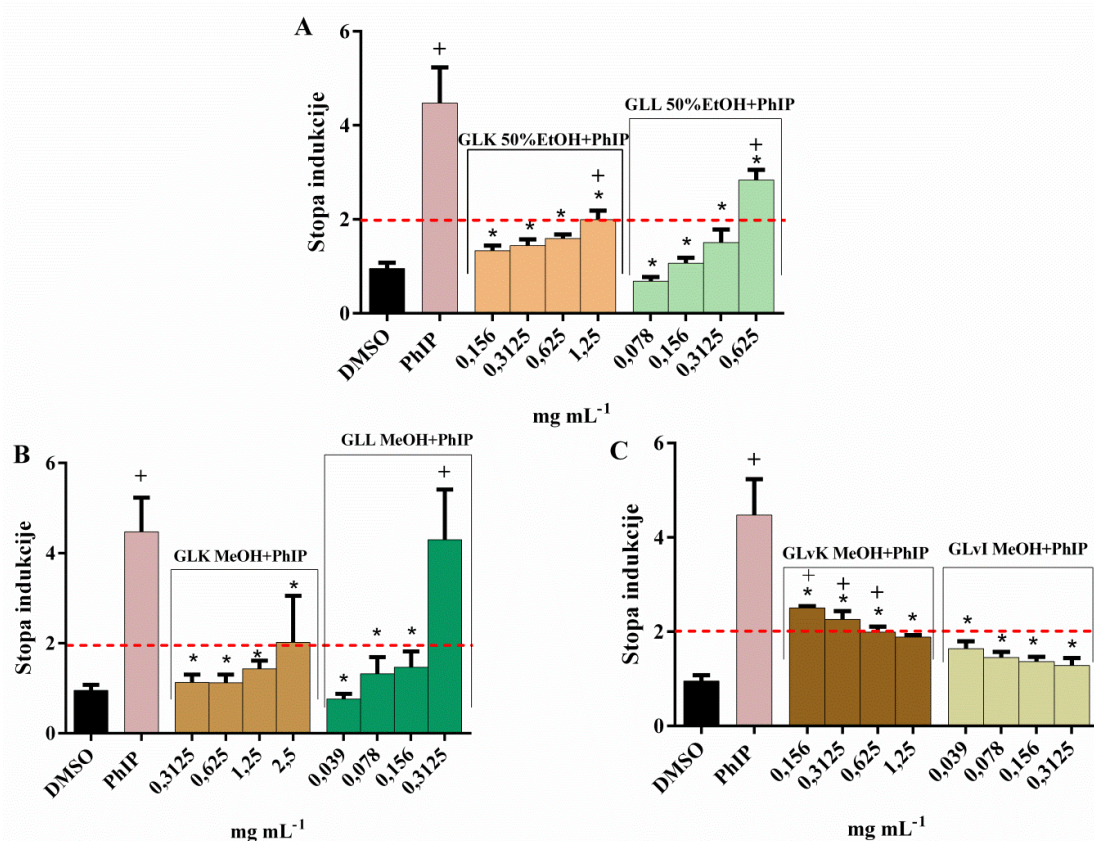
Antigenotoksičnost ekstrakata ispitana je primenom ko-tretmana sa PhIP mutagenom (Cvetković i sar., 2020a). Na osnovu rezultata stope rasta ko-tretmana, prikazanih na Slici 18, pokazano je odsustvo toksičnosti svih kombinacija ekstrakata i mutagena.



Slika 18. Uticaj ko-tretmana ekstrakata *G. lutea* i PhIP (12,5 µg mL<sup>-1</sup>) na stopu rasta *S. typhimurium* u SOS/*umuC* testu: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti stope rasta ± standardne devijacije. Crvena linija pozicionirana na 0,75 predstavlja prag ispod kog se efekat smatra citotoksičnim. DMSO (10%) - kontrola rastvarača.

Rezultati testiranja antigenotoksičnosti su pokazali da su svi testirani ekstrakti značajno redukovali oštećenja na DNK molekulu izazvana delovanjem PhIP mutagena (Slika 19.). Treba naglasiti da sa izuzetkom GLvK MeOH ekstrakta, svi ostali ekstrakti su bar pri određenim koncentracijama indukovali izuzetni genoprotektivni efekat prema PhIP-u, pri čemu su snizili stopu indukcije ispod 2 (prag genotoksičnosti). Zanimljiva je činjenica da su ekstrakti plantažno gajene lincure redukovali DNK oštećenja uspešnije na nižim koncentracijama, pri čemu su se najefikasnijim pokazali ekstrakti listova, sa procentima inhibicije PhIP-indukovane genotoksičnosti od 85% za GLL 50% EtOH i 83% za GLL MeOH. Dodatno, ekstrakti *in vitro* gajene lincure su takođe pokazali značajan inhibitorski potencijal (58% i 71% inhibicija PhIP-indukovane genotoksičnosti je zabeležena za GLvK MeOH, odnosno za GLvI MeOH), pri čemu su odgovori bili dozno-zavisni (Tabela 12.).



Slika 19. Antigenotoksični efekat ekstrakata *G. lutea* prema PhIP ( $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mutagenu u SOS/*umuC* testu: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti stopa indukcije  $\pm$  standardne devijacije. Crvena linija pozicionirana na 2 predstavlja prag iznad kog se efekat smatra genotoksičnim. DMSO (10%) – kontrola rastvarača. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa ( $p < 0,05$ ): + statistička značajnost u odnosu na DMSO; \* statistička značajnost u odnosu na PhIP.

Tabela 12. Inhibicija (%) PhIP - indukovane genotoksičnosti nakon ko-tretmana sa *G. lutea* ekstraktima u SOS/*umuC* testu

	+PhIP ( $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ )			
mg mL <sup>-1</sup>	0,156	0,3125	0,625	1,25
<b>GLK 50% EtOH</b>	70%	68%	64%	55%
mg mL <sup>-1</sup>	0,078	0,156	0,3125	0,625
<b>GLL 50% EtOH</b>	85%	76%	66%	36%
mg mL <sup>-1</sup>	0,3125	0,625	1,25	2,5
<b>GLK MeOH</b>	75%	74%	67%	54%
mg mL <sup>-1</sup>	0,039	0,078	0,156	0,3125
<b>GLL MeOH</b>	83%	70%	67%	4%
mg mL <sup>-1</sup>	0,156	0,3125	0,625	1,25
<b>GLvK MeOH</b>	44%	49%	55%	58%
mg mL <sup>-1</sup>	0,039	0,078	0,156	0,3125
<b>GLvI MeOH</b>	63%	67%	69%	71%

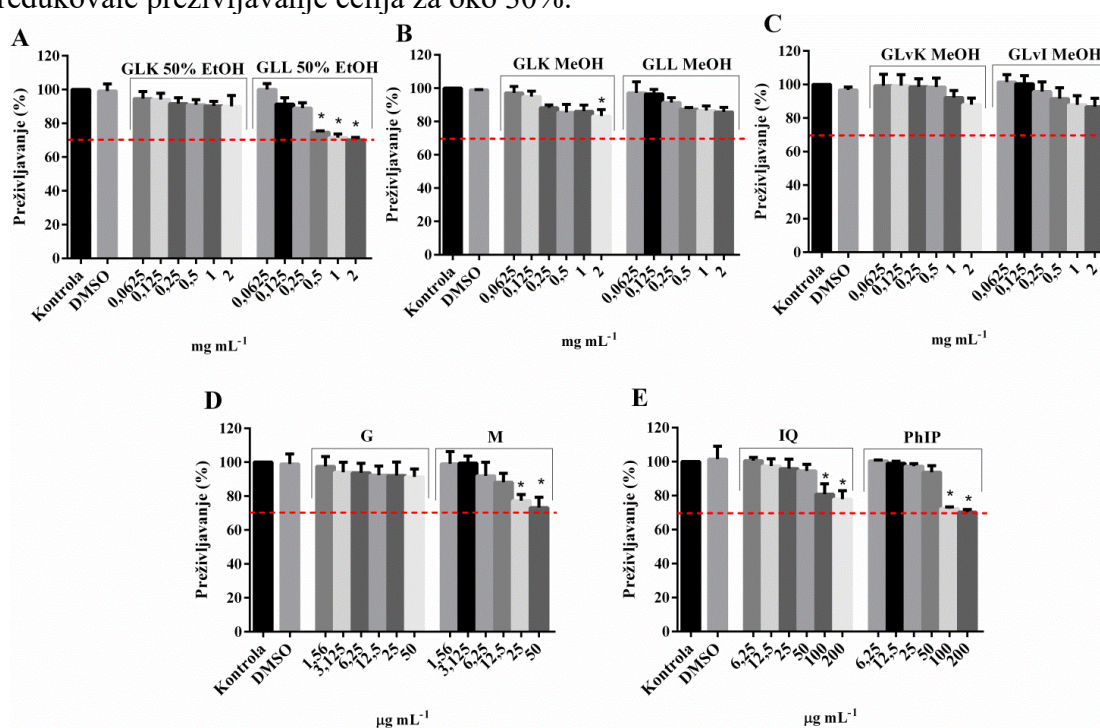
Inhibicija je izračunata u odnosu na srednju vrednosti stope indukcije.

#### 4.4.2. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata *G. lutea* primenom alkalnog komet testa

Kao što je prethodno navedno (poglavlje 4.4.1.) preliminarna ispitivanja obuhvatila su određivanje necitotoksičnog opsega svih test supstanci, kao i utvrđivanje negenotoksičnog opsega ekstrakata/konstituenata, odnosno genotoksičnih doza mutagena.

##### 4.4.2.1. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci na HepG2 ćelijama primenom MTT testa

Kako bi se odredile koncentracije test supstanci koje ne snižavaju vijabilnost ćelija primenjen je MTT test. Pored ekstrakata lincure, u daljem radu ispitana je i antigenotoksičnost konstituenata genciopikrozida i mangiferina, tako da je samim tim bilo potrebno uspostaviti necitotoksične koncentracije i ovih jedinjenja. Preživljavanje HepG2 ćelija nakon tretmana GLK 50% EtOH ekstraktom i genciopikrozidom nije bilo značajno smanjeno, bez obzira na primenjenu koncentraciju test supstanci (Slika 20A, 20D; Cvetković i sar., 2020b). Takođe, vijabilnost ćelija nakon izlaganja metanolnim ekstraktima plantažno gajene lincure, kao i *in vitro* gajene lincure je prevazilazila 80% (Slika 20B, 20C), što je bilo iznad postavljenog praga značajne citotoksičnosti (minimum 70% preživljavanja). S druge strane, preživljavanje ćelija nakon tretmana GLL 50% EtOH ekstraktom i mangiferinom je maksimalno redukovano za oko 30% pri višim testiranim koncentracijama (Slika 20A, 20D). Slično, vijabilnost HepG2 ćelija nakon izlaganja mutagenima se kretala preko 70% (Slika 20E). Za ispitivanje genotoksičnog potencijala odabrane su kao maksimalne, one koncentracije test supstanci koje su redukovale preživljavanje ćelija za oko 30%.

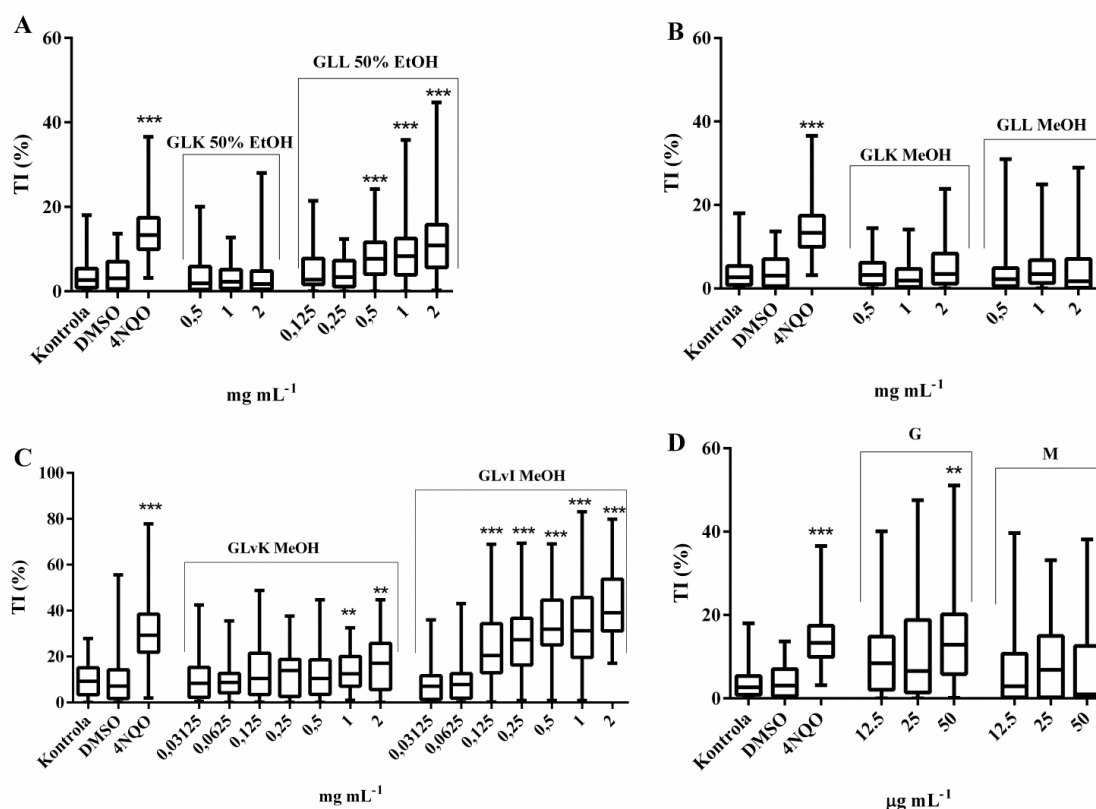


Slika 20. Citotoksični potencijal ekstrakata, konstituenata i mutagena na HepG2 ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) Ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*; D) Konstituenti - genciopikrozid (G), mangiferin (M); E) Mutageni - IQ, PhIP.

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti % preživljavanja ± standardne devijacije. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\*p < 0,05). Crvena linija pozicionirana na 70% predstavlja prag ispod kog se efekat smatra citotoksičnim.

#### 4.4.2.2. Procena genotoksičnog potencijala test supstanci na HepG2 ćelijama primenom alkalnog komet testa

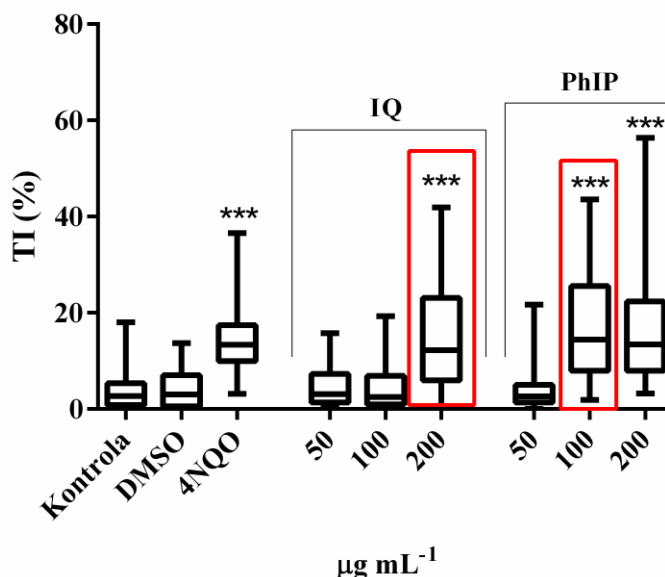
Genotoksičnost ekstrakata, konstituenata i mutagena analizirana je nakon izlaganja HepG2 ćelija necitotoksičnim koncentracijama test supstanci tokom 24h (Cvetković i sar., 2020a; 2020b). Što se tiče 50% EtOH ekstrakata plantažno gajene lincure, ekstrakt korena nije indukovao oštećenja DNK molekula u opsegu primenjenih koncentracija, dok je ekstrakt lista ispoljio genotoksični potencijal pri određenim testiranim dozama (Slika 21A). Dalje, rezultati analize genotoksičnosti MeOH ekstrakata plantažno gajene lincure su pokazali odsustvo genotoksičnog efekta u testiranom opsegu koncentracija oba ekstrakta (Slika 21B). S druge strane, *in vitro* ekstrakt korena je pokazao blagi genotoksični efekat na dve najviše testirane koncentracije. Najveći porast učestalosti oštećenja DNK molekula u poređenju sa kontrolom rastvarača je zabeležen za *in vitro* ekstrakt izdanka i to u širokom opsegu testiranih koncentracija (samo je najmanja testirana koncentracija, tj 0,0625 mg mL<sup>-1</sup> bila negenotoksična, Slika 21C). Kada je reč o testiranim konstituentima lincure, genciopikrozid je ispoljio blaži genotoksični potencijal na najvišoj primenjenoj dozi, dok je genotoksični efekat mangiferina izostao u opsegu testiranih koncentracija (do 50 µg mL<sup>-1</sup>, Slika 21D). U daljem radu, za ispitivanje antigenotoksičnog potencijala odabrane su samo negenotoksične doze ekstrakata i konstituenata (do 2 mg mL<sup>-1</sup> za GLK 50% EtOH, GLK MeOH i GLL MeOH, do 0,25 mg mL<sup>-1</sup> za GLL 50% EtOH, do 0,5 mg mL<sup>-1</sup> za GLvK MeOH, do 0,0625 mg mL<sup>-1</sup> za GLvI MeOH, do 25 µg mL<sup>-1</sup> za G i do 50 µg mL<sup>-1</sup> za M).



Slika 21. Genotoksični potencijal ekstrakata i konstituenata *G. lutea*: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*; D) Konstituenti – genciopikrozid (G), mangiferin (M).

Rezultati su predstavljani kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. 4NQO (2 µg mL<sup>-1</sup>) – pozitivna kontrola. Statistička značajnost je testirana u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) primenom neparametrijskog Mann-Whitney U testa (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

U daljem istraživanju bilo je neophodno ispitati i genotoksični potencijal mutagena IQ i PhIP, kako bi se potvrdila njihova genotoksičnost i uspostavile doze koje dovode do dovoljnog oštećenja DNK molekula koja bi se mogla koristiti u testovima antigenotoksičnosti. Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 22. može se zaključiti da su oba mutagena ispoljila genotoksični efekat na višim testiranim koncentracijama. Kada je u pitanju IQ, genotoksični potencijal je zabeležen pri najvećoj testiranoj koncentraciji ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) koja je izabrana za ispitivanje antigenotoksičnosti. S druge strane, PhIP je ispoljio nešto jači genotoksični potencijal, indukujući oštećenja DNK molekula na dozama od 100 i  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Obzirom da je nivo oštećenja na datim dozama približan, za ispitivanje antigenotoksičnosti prema PhIP mutagenu odabrana je doza od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

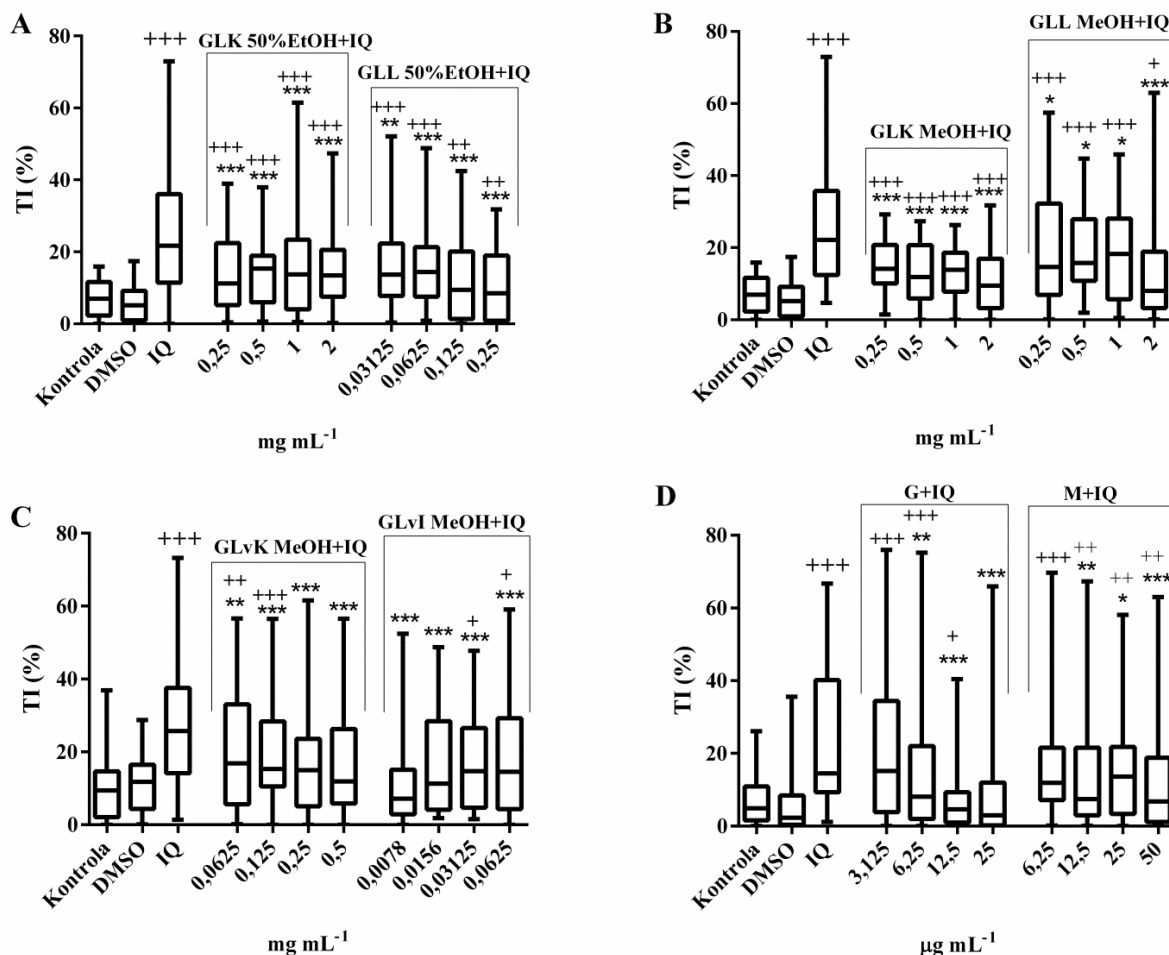


Slika 22. Genotoksični potencijal mutagena IQ i PhIP

Rezultati su predstavljani kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. 4NQO ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) – pozitivna kontrola. Statistička značajnost je testirana u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) primenom neparametrijskog Mann-Whitney U testa (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4.2.3. Procena antigenotoksičnog efekta ekstrakata i konstituenata *G. lutea* prema IQ i PhIP mutagenima primenom alkalnog komet testa

Genoprotektivni efekat ekstrakata i konstituenata prema IQ i PhIP mutagenima je analiziran na HepG2 ćelijama primenom njihovog ko-tretmana sa mutagenima tokom 24h (Cvetković i sar., 2019; 2020a; 2020b). Rezultati testiranja antigenotoksičnosti prema IQ ukazuju da su svi ekstrakti kao i konstituenti značajno redukovali oštećenja izazvana ovim mutagenom (Slika 23; Tabela 13.). Može se primetiti da su ekstrakti plantažno gajene lincure pokazali nešto veći genoprotektivni efekat prema IQ u odnosu na ekstrakte *in vitro* gajene lincure. Najveći protektivni efekat je ispoljio GLK MeOH ekstrakt sa inhibicijom IQ-indukovane genotoksičnosti od čak 68%. Slični efekat je zabeležen za GLL 50% EtOH ekstraktom sa procentom inhibicije od 66%. Što se tiče *in vitro* ekstrakata, GLvK MeOH je ispoljio dozno-zavisni odgovor sa maksimumom inhibicije IQ-indukovanog oštećenja od 42%, dok je za GLvI MeOH ekstrakt zabeležen najviši stepen inhibicije (60%) na najnižoj primenjenoj koncentraciji. Kada je reč o protektivnom efektu konstituenata, oba jedinjenja su ispoljila dozno-zavisni odgovor, s tim što je genciopikrozid bio značajno uspešniji u inhibiciji IQ-indukovane genotoksičnosti sa procentom od 68%. S druge strane, mangiferin je ispoljio nešto slabiji efekat, sa maksimumom inhibicije IQ-indukovanog oštećenja od 37%



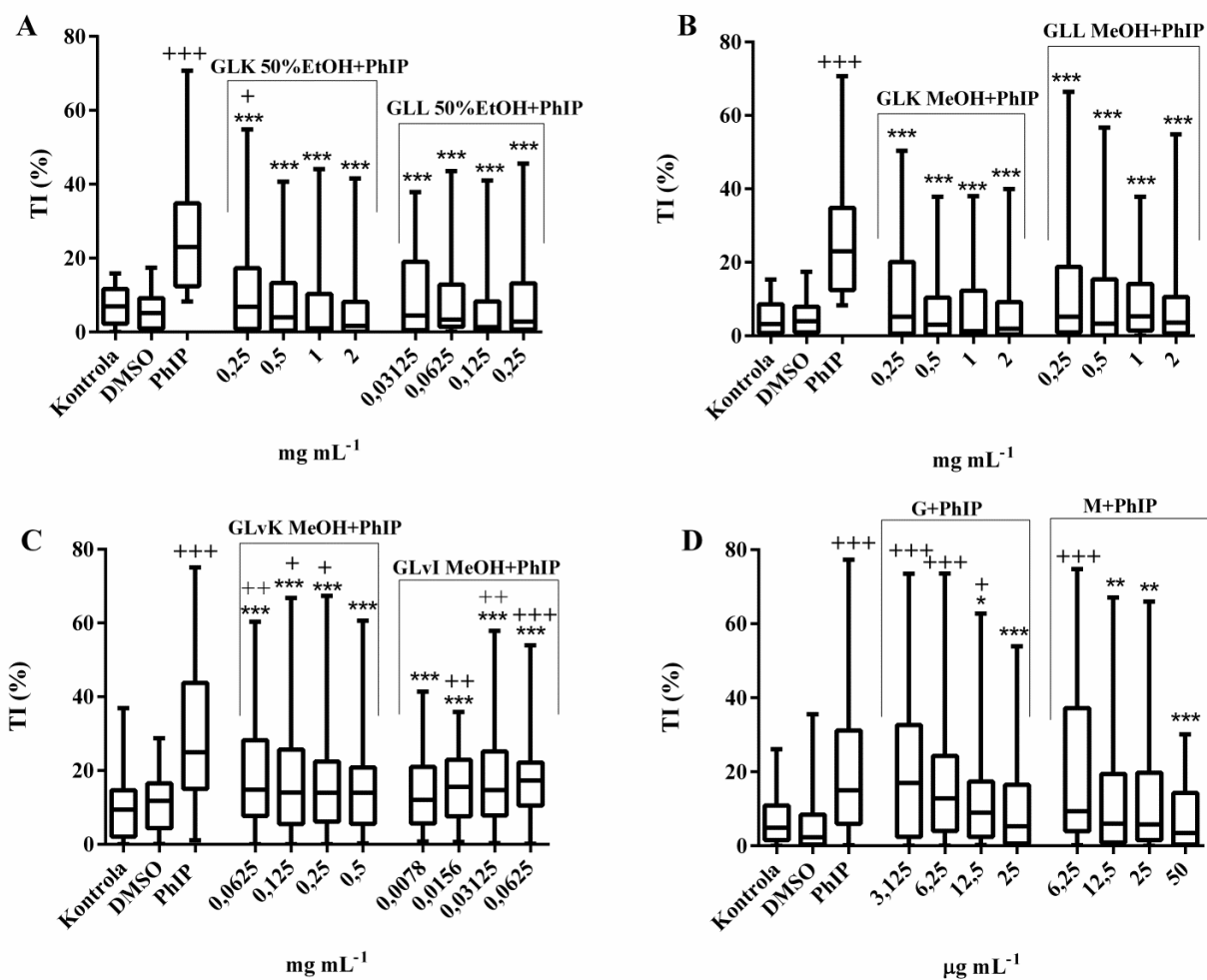
Slika 23. Antigenotoksični potencijal ekstrakata i konstituenata *G. lutea* prema IQ (200 µg mL<sup>-1</sup>): A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*; D) Konstituenti - genciopikrozid, mangiferin.

Rezultati su predstavljani kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana primenom Mann-Whitney *U* testa:

- između ko-tretmana i mutagena (\**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001).
- u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO, 1% (+*p*<0,05; ++*p*<0,01; +++*p*<0,001).

Slični rezultati su dobijeni i prilikom testiranja antigenotoksičnog efekta ekstrakata i konstituenata prema PhIP mutagenu. Svi testirani biljni derivati su doprineli značajnom smanjenju oštećenja DNK molekula idukovanog PhIP mutagenom (Slika 24; Tabela 13.). Kao i u slučaju genoprotektivnog efekta prema IQ i ovde su ekstrakti plantažno gajene lincure pokazali nešto jači efekat u odnosu na ekstrakte *in vitro* gajene biljke. Među ekstraktima plantažno gajene *G. lutea* najistaknutiji genoprotektivni efekat je zabeležen za GLK MeOH i GLK 50% EtOH koji su inhibirali PhIP-indukovanu genotoksičnost za 78% odnosno 77%. Što se tiče ekstrakata listova plantažno gajene lincure, inhibicija PhIP-indukovanog oštećenja se kretala do 70%. Ekstrakt korena *in vitro* gajene lincure je pokazao nešto jači genoprotektivni efekat prema PhIP mutagenu u odnosu na IQ, sa maksimalnom inhbicijom od 51%. Što se tiče GLvI MeOH, kao i u slučaju antigenotoksičnog efekta prema IQ i ovde je najveća inhibicija PhIP-indukovane genotoksičnosti od 53% zabeležena na najnižoj primenjenoj dozi. Konstituenti su takođe pokazali značajan protektivni efekat prema oštećenjima izazvanim delovanjem PhIP mutagena, pri čemu je mangiferin bio uspešniji u redukciji oštećenja sa procentom inhbicije od 67%.





Slika 24. Antigenotoksični potencijal ekstrakata i konstituenata *G. lutea* prema PhIP (100 µg mL<sup>-1</sup>): A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*; D) Konstituenti - genciopikrozid (G), mangiferin (M).

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana primenom Mann-Whitney *U* testa:

- između ko-tretmana i mutagena (\**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001).
- u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO, 1% (+*p*<0,05; ++*p*<0,01; +++*p*<0,001).

Tabela 13. Inhibicija (%) IQ/PhIP – indukovane genotoksičnosti nakon ko-tretmana sa ekstraktima i konstituentima *G. lutea* u alkalnom komet testu

	+IQ (200 µg mL <sup>-1</sup> )				+PhIP (100 µg mL <sup>-1</sup> )			
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
<b>GLK 50%EtOH</b>	56%	57%	53%	56%	60%	66%	70%	77%
mg mL <sup>-1</sup>	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,03125	0,0625	0,125	0,25
<b>GLL 50%EtOH</b>	46%	48%	65%	66%	65%	66%	70%	64%
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
<b>GLK MeOH</b>	54%	59%	60%	68%	59%	69%	73%	78%
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
<b>GLL MeOH</b>	40%	41%	42%	58%	59%	65%	67%	69%
mg mL <sup>-1</sup>	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,0625	0,125	0,25	0,5
<b>GLvK MeOH</b>	27%	35%	38%	42%	38%	43%	46%	51%
mg mL <sup>-1</sup>	0,0078	0,0156	0,03125	0,0625	0,0078	0,0156	0,03125	0,0625
<b>GLvI MeOH</b>	60%	44%	40%	38%	53%	49%	42%	40%
µg mL <sup>-1</sup>	3,125	6,25	12,5	25	3,125	6,25	12,5	25
<b>Genciopikrozid</b>	14%	41%	66%	68%	12%	25%	44%	48%
µg mL <sup>-1</sup>	6,25	12,5	25	50	6,25	12,5	25	50
<b>Mangiferin</b>	31%	32%	36%	37%	13%	45%	46%	67%

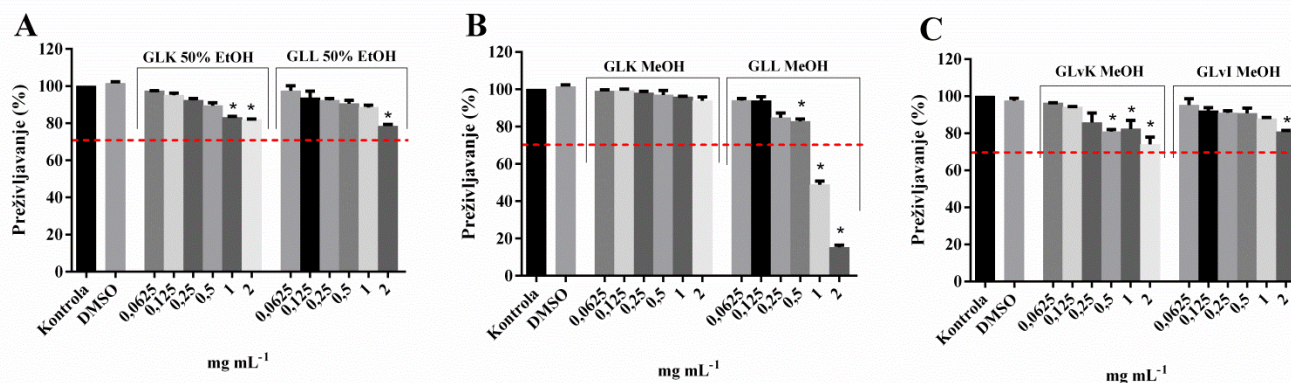
Inhibicija je izračunata u odnosu na srednje vrednosti TI.

#### 4.5. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta ekstrakata *G. lutea* prema UV zračenju

Antigenotoksičnost ekstrakata lincure prema UVC i UVA zračenju ispitana je na MRC-5 i Hs 294T ćelijskim linijama primenom alkalnog komet testa. Kao i u prethodnoj fazi ispitivanja antigenotoksičnosti, bilo je neophodno odrediti necitotoksične i negenotoksične koncentracije ekstrakata, kao i doze UV zračenja koje dovode do odgovarajućeg nivoa oštećenja na DNK molekulu.

##### 4.5.1. Određivanje necitotoksičnih koncentracija test supstanci na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom MTT testa

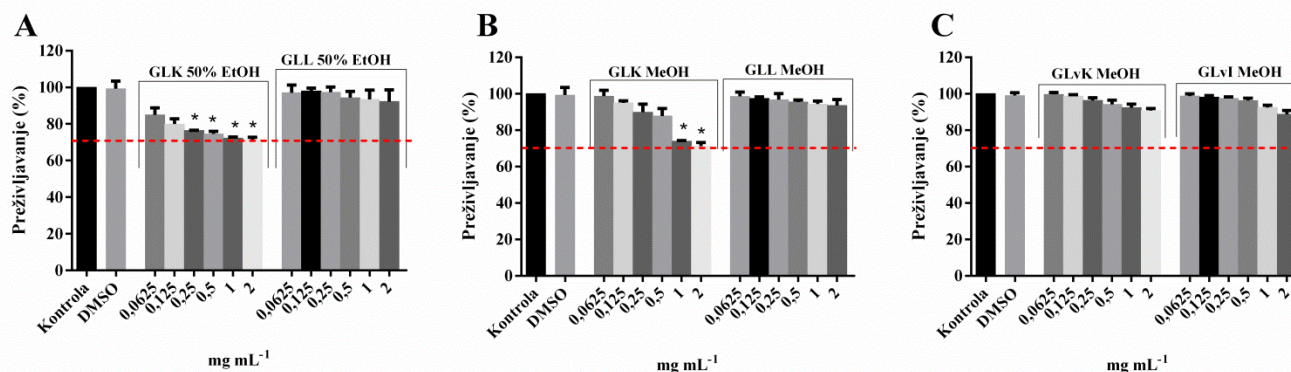
Kako bi se odredile koncentracije ekstrakata koje bi mogle da se koriste u testiranju antigenotoksičnosti, najpre je ispitana njihova citotoksičnost primenom MTT testa na MRC-5 i Hs 294T ćelijama. Preživljavanje MRC-5 ćelija nakon tretmana 50% EtOH ekstraktima plantažno gajene lincure je maksimalno redukovano za oko 20% pri najvećim testiranim koncentracijama. Što se tiče MeOH ekstrakata plantažno gajene lincure, ekstrakt korena nije ispoljio citotoksični efekat, dok je ekstrakt lista značajno smanjio procenat preživljavanja pri koncentracijama od 1 i 2 mg mL<sup>-1</sup> (Cvetković i sar., 2018). Kada su u pitanju ekstrakti *in vitro* gajene lincure, vijabilnost MRC-5 ćelija je nakon tretmana ekstraktom korena smanjena za oko 25% pri najvećoj primenjenoj dozi, dok se preživljavanje ćelija nakon tretmana ekstraktom izdanka kretalo preko 80% (Slika 25.).



Slika 25. Citotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* na MRC-5 ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) Ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti % preživljavanja  $\pm$  standardne devijacije. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ). Crvena linija pozicionirana na 70% predstavlja prag ispod kog se efekat smatra citotoksičnim.

Kada je u pitanju citotoksični potencijal ekstrakata na Hs 294T ćelijskoj liniji, na osnovu rezultata prikazanih na Slici 26. može se primetiti da ekstrakti GLK 50% EtOH i GLK MeOH redukuju preživljavanje ćelija za oko 30%. S druge strane, nakon tretmana 50% EtOH i MeOH ekstraktima listova plantažno gajene lincure, vijabilnost Hs 294T ćelija se kretala iznad 90%. Slično, tretman ekstraktima *in vitro* gajene lincure nije doveo do značajne redukcije preživljavanja ćelija. Za ispitivanje genotoksičnog potencijala ekstrakata, odabrane su koncentracije na kojima je preživljavanje ćelija bilo preko 70%.



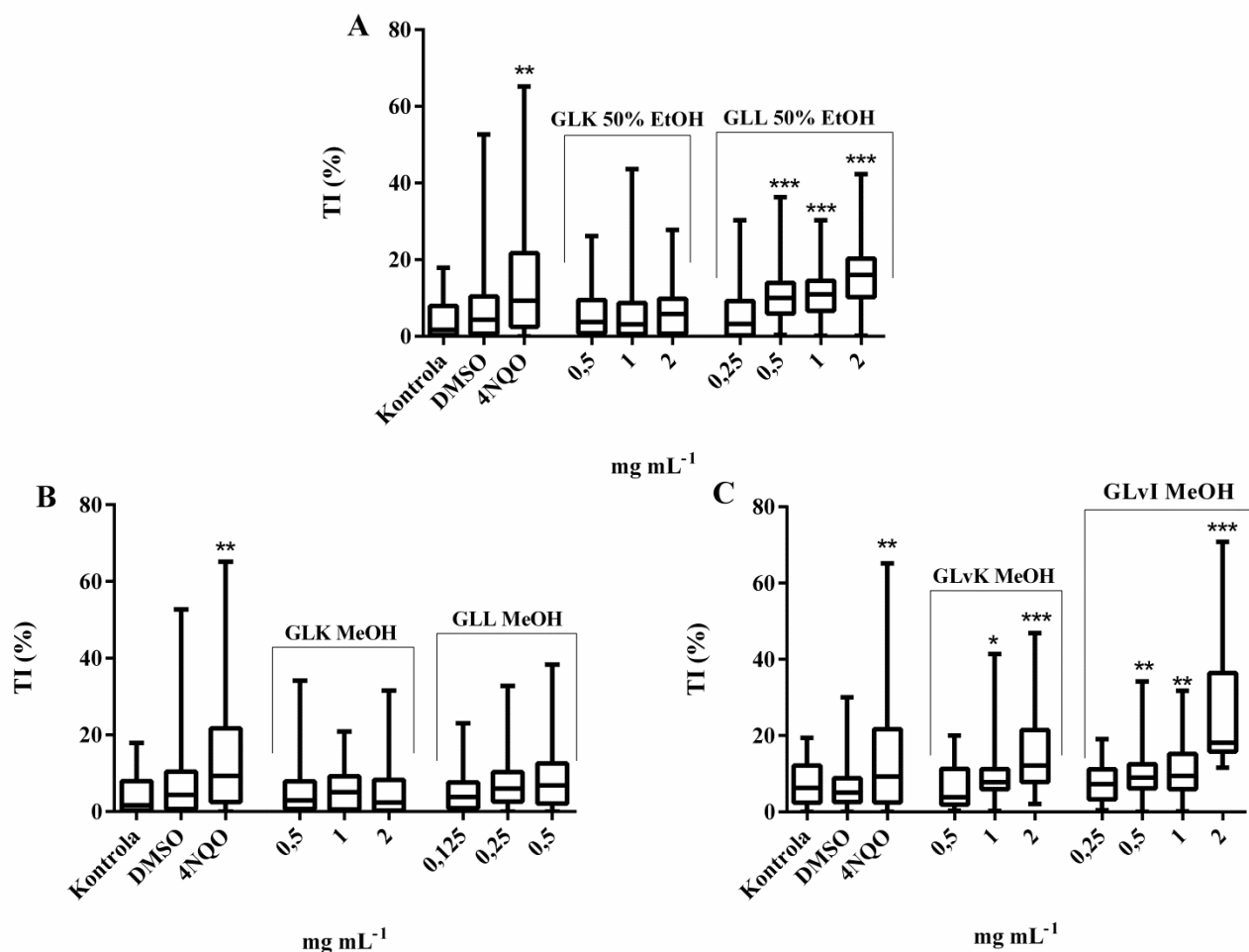
Slika 26. Citotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* na Hs 294T ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) Ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti % preživljavanja  $\pm$  standardne devijacije. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ). Crvena linija pozicionirana na 70% predstavlja prag ispod kog se efekat smatra citotoksičnim.

#### 4.5.2. Procena genotoksičnog potencijala ekstrakata na MRC-5 i Hs 294T ćelijama primenom alkalnog komet testa

Genotoksičnost ekstrakata ispitana je nakon izlaganja MRC-5 i Hs 294T ćelija tretmanu u trajanju od 24h, primenom alkalnog komet testa. Rezultati analize genotoksičnosti (Slika 27.) ukazali

su na odsustvo sposobnosti GLK 50% EtOH, GLK MeOH i GLL MeOH ekstrakata da indukuju oštećenja na DNK molekulu u opsegu testiranih koncentracija. S druge strane, statistički značajno povećanje stepena oštećenja DNK molekula zabeleženo je nakon tretmana GLL 50% EtOH ekstraktom svih koncentracija osim najmanje testirane ( $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Genotoksični efekat je primećen i nakon tretmana GLvK MeOH ekstraktom, dok je najveća indukcija oštećenja DNK molekula zabeležana nakon izlaganja MRC-5 ćelija GLvI MeOH ekstraktu u širokom opsegu koncentracija. Za ispitivanje antigenotoksičnog potencijala ekstrakata izabrane su negenotoksične koncentracije (do  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLK 50% EtOH i GLK MeOH, do  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLL MeOH i GLvK MeOH i do  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  za GLL 50% EtOH i GLvI MeOH ekstrakte).

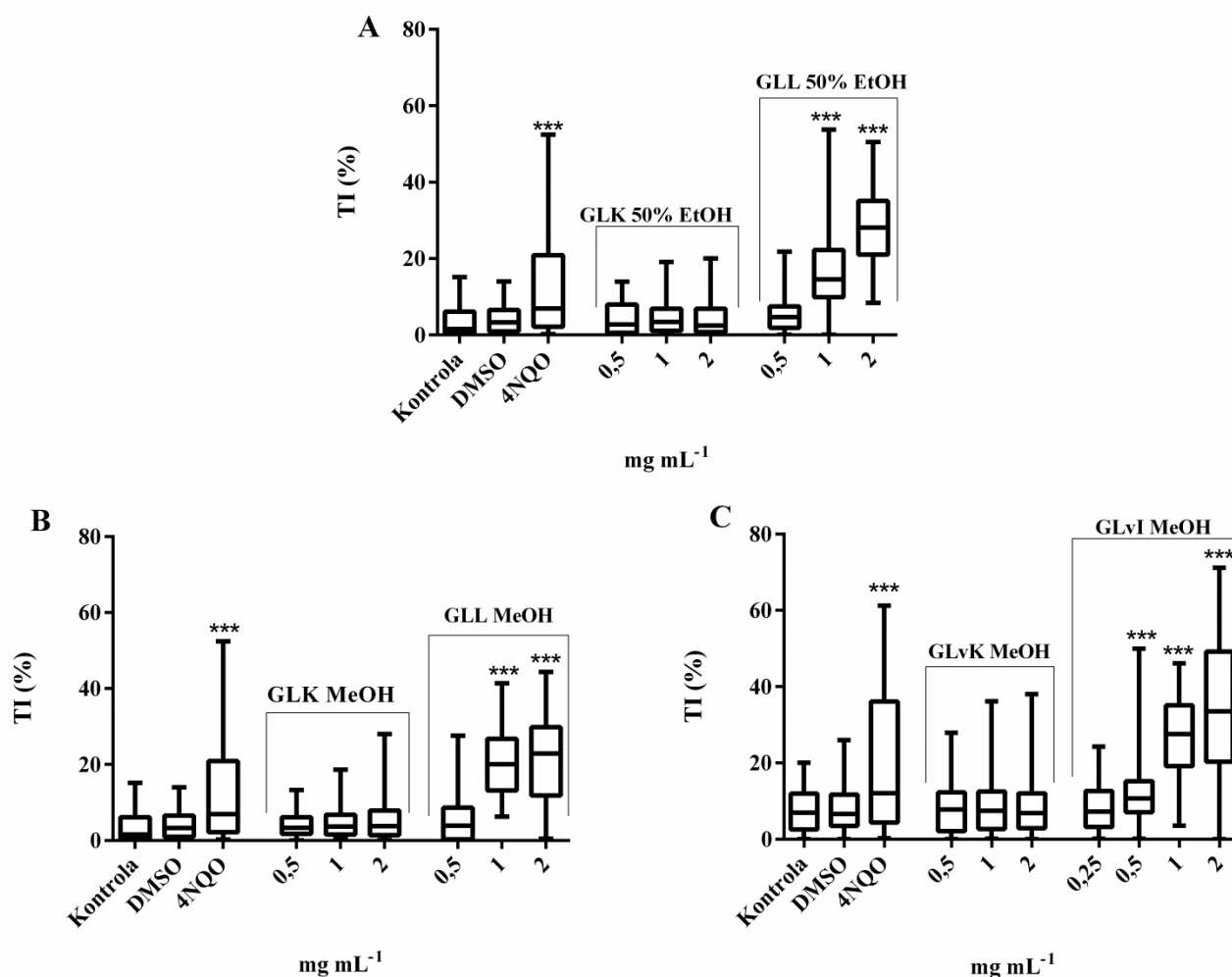


Slika 27. Genotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* na MRC-5 ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. 4NQO ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) – pozitivna kontrola. Statistička značajnost je testirana u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) primenom neparametrijskog Mann-Whitney *U* testa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Analiza genotoksičnosti ekstrakata na Hs 294T ćelijama ukazala je na odsustvo genotoksične aktivnosti svih ekstrakata korenova u opsegu testiranih koncentracija. Nakon tretmana ekstraktima listova plantažno gajene lincure, zabeležena je statistički značajna indukcija oštećenja na molekulu DNK pri koncentracijama od 1 i  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Kao i u slučaju MRC-5 ćelijske linije, najveći stepen oštećenja na DNK molekulu je izazvao GLvI MeOH ekstrakt (Slika 28.). U daljem radu, za procenu

antigenotoksičnog efekta odabrane su negenotoksične koncentracije ekstrakata (do 2 mg mL<sup>-1</sup> za GLK 50% EtOH, GLK MeOH i GLvK MeOH, do 0,5 mg mL<sup>-1</sup> za GLL 50% EtOH i GLL MeOH i do 0,25 mg mL<sup>-1</sup> za GLvI MeOH ekstrakte).



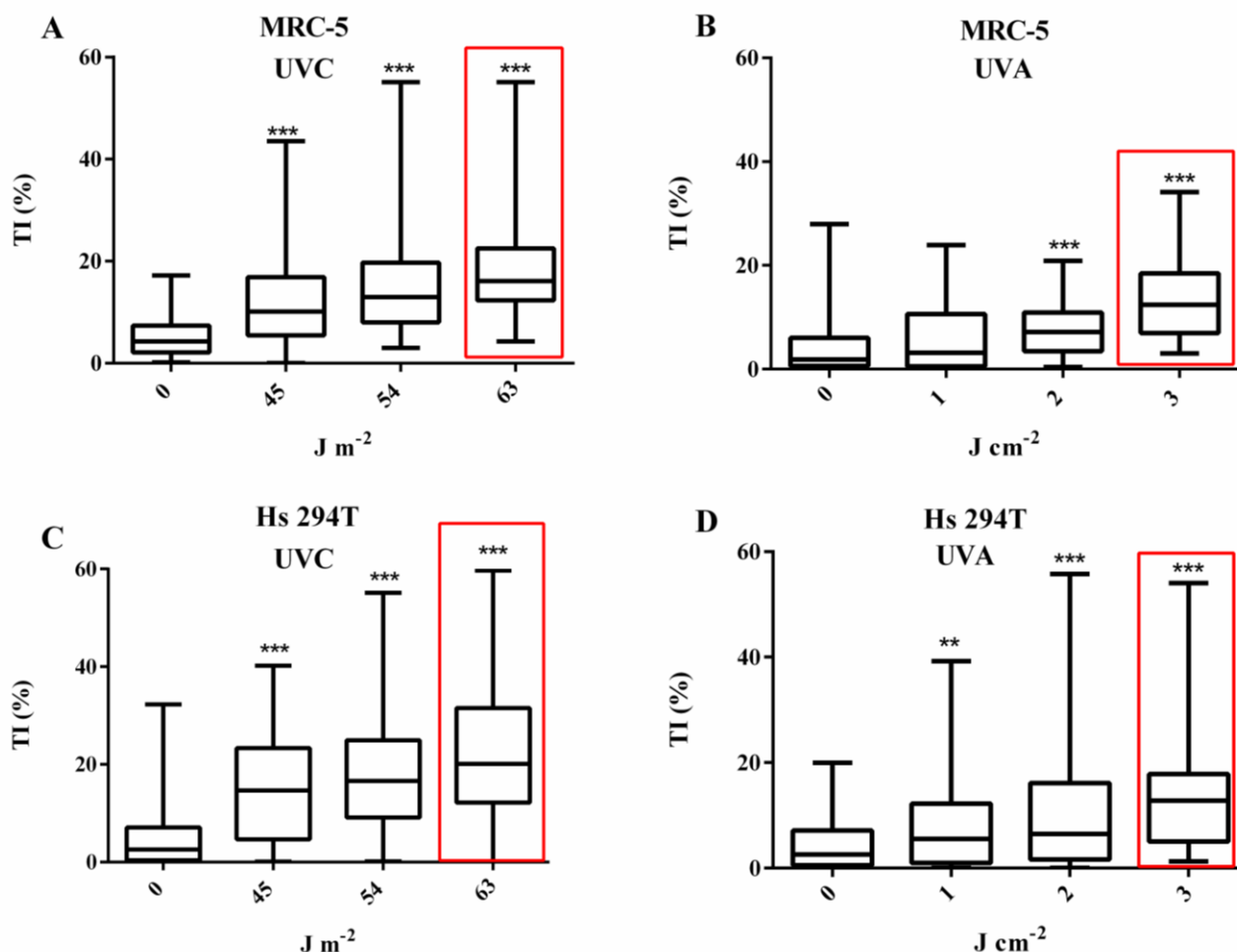
Slika 28. Genotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* na Hs 294T ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. 4NQO (2 µg mL<sup>-1</sup>) – pozitivna kontrola. Statistička značajnost je testirana u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) primenom neparametrijskog Mann-Whitney *U* testa (\*\*\*)*p*<0,001).

#### 4.5.3. Odabir neletalnih genotoksičnih doza UVC i UVA zračenja

Prilikom testiranja genotoksičnosti UVC i UVA zračenja bilo je neophodno pronaći dozu koja nema izrazit letalni efekat s jedne strane, dok s druge strane dovodi do dovoljne indukcije oštećenja molekula DNK. Letalni efekat UV zračenja je procenjen bojenjem tripan plavim nakon zračenja različitim dozama, a doze zračenja pri kojima je vijabilnost ćelija bila veća od 70% su dalje testirane na genotoksičnost primenom alkalnog komet testa (Tabela 8.2., Prilog). Rezultati ispitivanja genotoksičnog potencijala UVC zračenja na MRC-5 i Hs 294T ćelijama pokazali su da sve tri ispitane doze zračenja indukuju oštećenje na DNK molekulu. Doza UVC zračenja od 63 J m<sup>-2</sup> je izazvala najveći stepen oštećenja na DNK molekulu (Slika 29A, 29C), pri kojoj je preživljavanje MRC-5 ćelija

iznosilo 75%, a Hs 294T ćelija 78%. Uzimajući ove rezultate u obzir, ova doza je korišćena u narednim eksperimentima procene antigenotoksičnosti. Slični rezultati su dobijeni prilikom analiziranja genotoksičnosti UVA zračenja (Slika 29B, 29D). Najveća testirana doza od  $3 \text{ J cm}^{-2}$  je indukovala najviši nivo oštećenja, sa procentom preživljavanja ćelija preko 70%, tako da je izabrana za dalja ispitivanja antigenotoksičnosti.



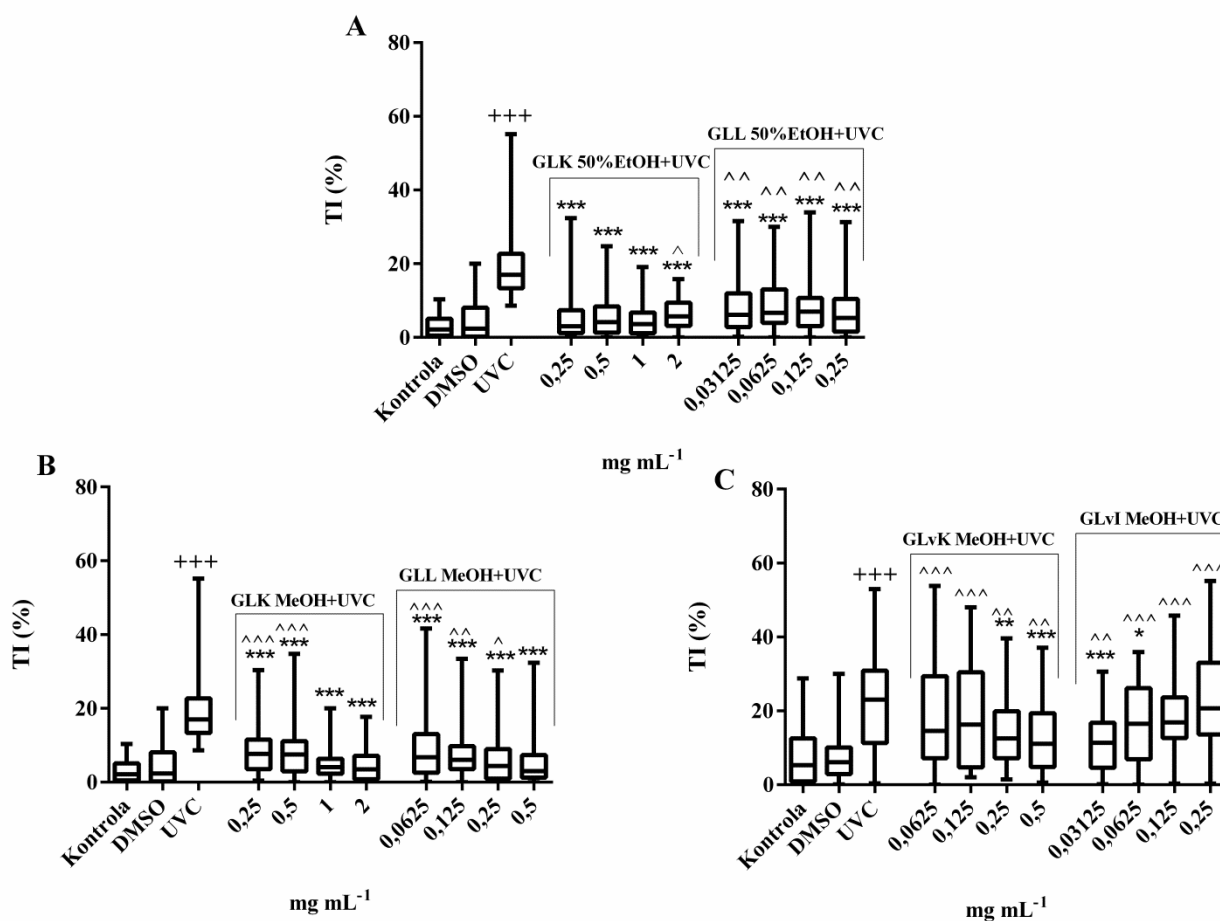
Slika 29. Genotoksični efekat UV zračenja na MRC-5 i Hs 294T ćelijama: A) UVC zračenje na MRC-5 ćelijama; B) UVA zračenje na MRC-5 ćelijama; C) UVC zračenje na Hs 294T ćelijama; D) UVA zračenje na Hs 294T ćelijama.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana u odnosu na neozračenu kontrolu primenom neparametrijskog Mann-Whitney  $U$  testa (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.5.4. Procena antigenotoksičnog efekta ekstrakata *G. lutea* prema UVC i UVA zračenju

Antigenotoksični efekat ekstrakata lincure prema UVC i UVA zračenju ispitan je na MRC-5 i Hs 294T ćelijama, izlaganjem ćelija odgovarajućim dozama zračenja nakon 24-časovnog pre-tretmana ekstraktima. Rezultati analize genoprotektivnog efekta ekstrakata prema UVC zračenju na MRC-5 ćelijama ukazuju da su svi ekstrakti plantažno gajene lincure značajno redukovali oštećenja na DNK molekulu izazvana ovim tipom zračenja (Slika 30A, 30B). Najveći protektivni efekat je zabeležen za ekstrakte korenova sa maksimalnom inhibicijom UVC-indukovane genotoksičnosti od 78% (Tabela 14.). S druge strane, nešto slabiji efekat je uočen za ekstrakte *in vitro* gajene lincure (Slika 30C).

Ekstrakt GLvK MeOH je, kao i ekstrakti plantažno gajene lincure, ispoljio dozno-zavisni odgovor sa maksimumom inhibicije UVC-idukovane genotoksičnosti od 43%. Što se tiče GLvI MeOH ekstrakta, najviši stepen genoprotektivnog efekta je zabeležen na najnižoj testiranoj koncentraciji (inhibicija 47%).



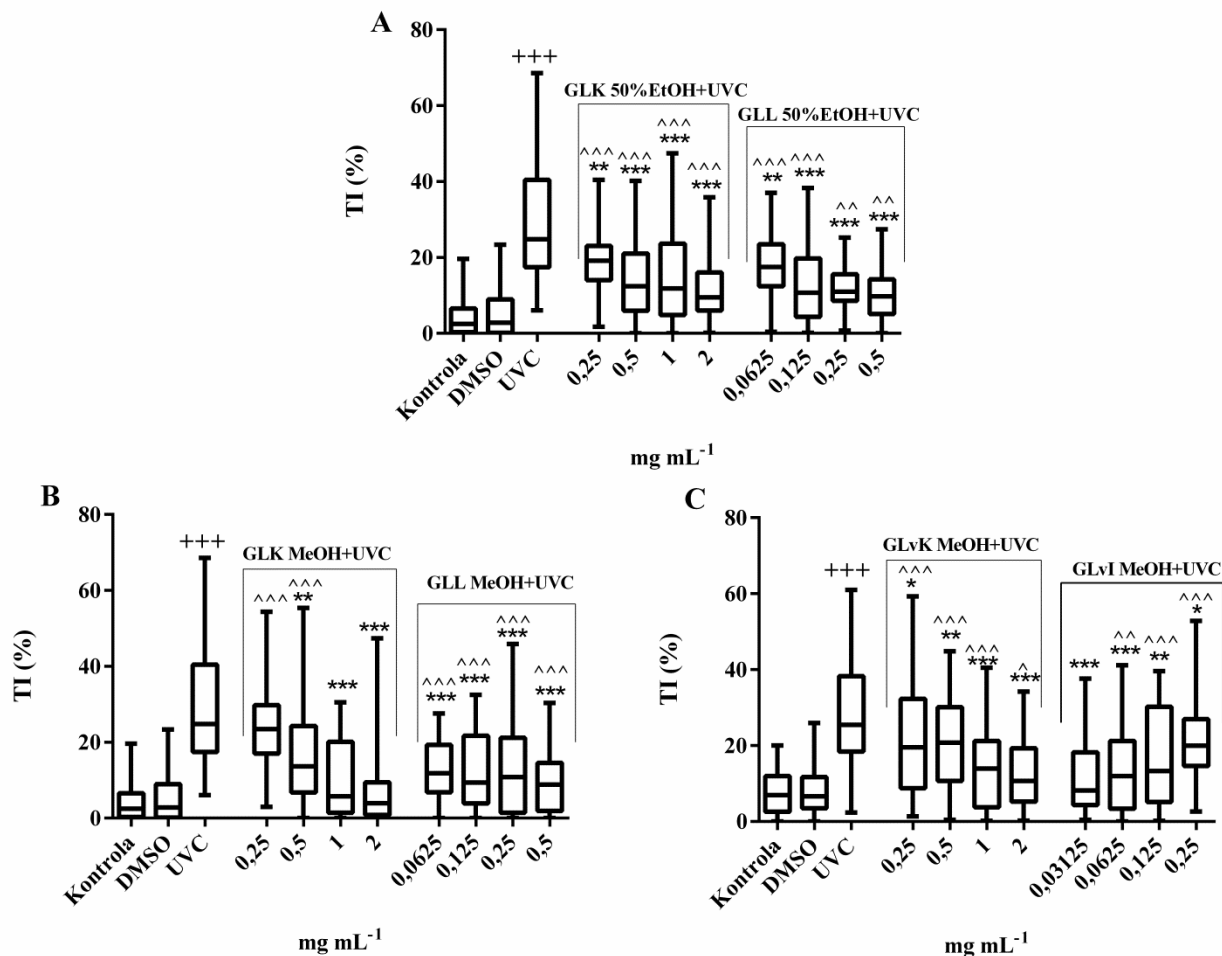
Slika 30. Antigenotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* prema UVC zračenju ( $63 \text{ J m}^{-2}$ ) na MRC-5 ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana primenom Mann-Whitney *U* testa:

- između ko-tretmana i UVC zračenja (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).
- UV tretmana u odnosu na neozračenu kontrolu (+++ $p < 0,001$ ).
- ko-tretmana u odnosu na kontrolu rastvarača, DMSO, 1% (^ $p < 0,05$ ; ^^ $p < 0,01$ ; ^^ $p < 0,001$ ).

Analizom genoprotektivnog efekta ekstrakata prema UVC zračenju na Hs 294T ćelijama može se uočiti da su svi ekstrakti statistički značajno redukovali genotoksičnost indukovanu ovim tipom zračenja pri određenim koncentracijama (Slika 31; Tabela 14.). Kao i u slučaju MRC-5 ćelija, ekstrakti su na Hs 294T ćelijama ispoljili dozno-zavisni odgovor, sa izuzetkom GLvI MeOH ekstrakta. Dodatno, ekstrakti plantažno gajene lincure su pokazali nešto veći genoprotektivni efekat u odnosu na ekstrakte *in vitro* gajene lincure. Najveća genoprotektivna aktivnost je uočena nakon tretmana GLK MeOH ekstraktom koji je inhibirao UVC-indukovanu genotoksičnost za 71%. Sličan efekat je zabeležen za GLL MeOH ekstrakt, sa inhibicijom genotoksičnosti od 66%. Kada su u pitanju ekstrakti *in vitro* gajene biljke, GLvK MeOH je ispoljio maksimum inhibicije UVC-indukovane genotoksičnosti (56%)

na najvišoj testiranoj koncentraciji, dok je za GLvI MeOH ekstrakt zabeležen najviši stepen inhibicije (58%) pri najnižoj primenjenoj dozi.



Slika 31. Antigenotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* prema UVC zračenju ( $63 \text{ J m}^{-2}$ ) na Hs 294T ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana primenom Mann-Whitney *U* testa:

- između ko-tretmana i UVC zračenja (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).
- UV tretmana u odnosu na neozračenu kontrolu (+++ $p < 0,001$ ).
- ko-tretmana u odnosu na kontrolu rastvarača, DMSO, 1% (^ $p < 0,05$ ; ^^ $p < 0,01$ ; ^^ $p < 0,001$ ).

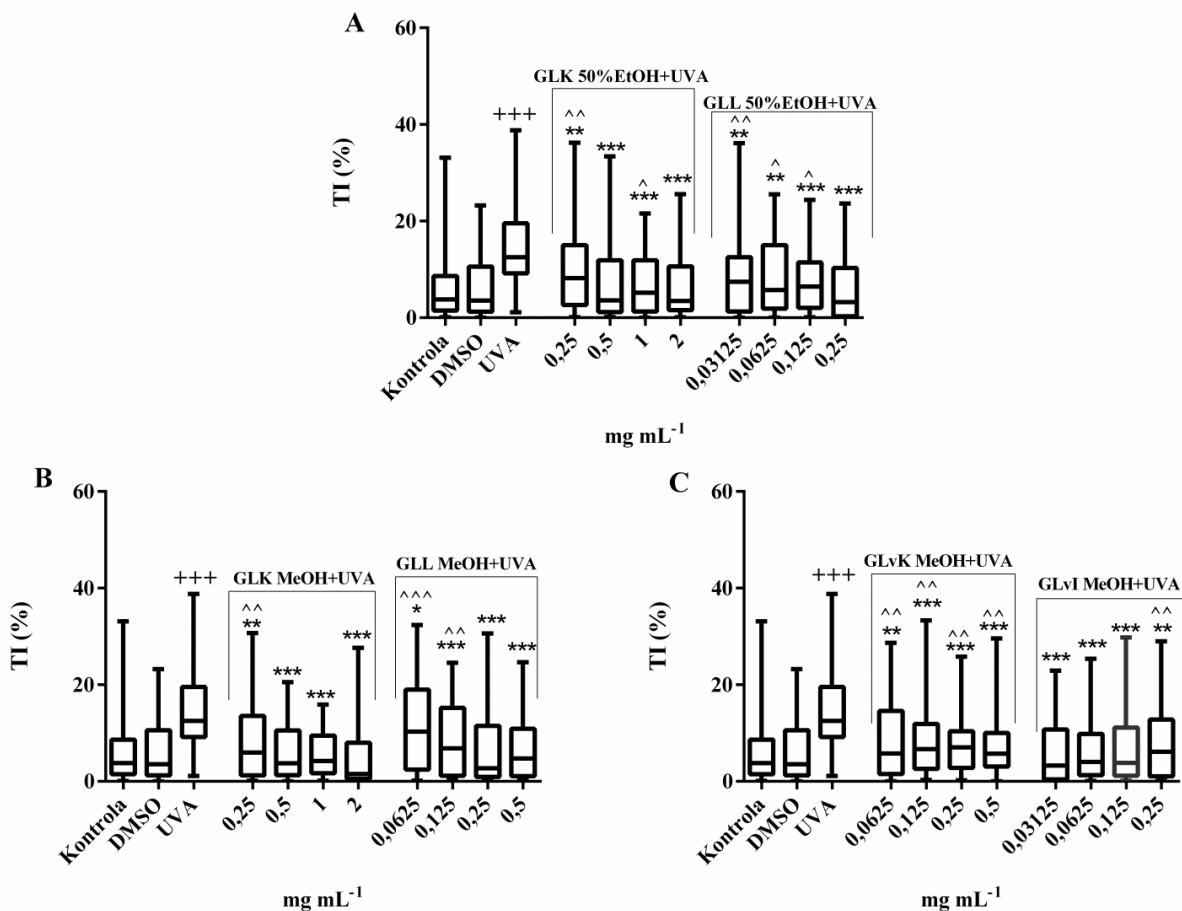


Tabela 14. Inhibicija (%) UVC-indukovane genotoksičnosti nakon tretmana ekstraktima *G. lutea* na MRC-5 i Hs 294T ćelijama u alkalnom komet testu

	MRC-5				Hs 294T			
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
GLK 50% EtOH	68%	69%	72%	78%	34%	48%	50%	59%
mg mL <sup>-1</sup>	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,0625	0,125	0,25	0,5
GLL 50% EtOH	54%	55%	58%	66%	33%	57%	59%	63%
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
GLK MeOH	59%	62%	75%	78%	17%	42%	63%	71%
mg mL <sup>-1</sup>	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,0625	0,125	0,25	0,5
GLL MeOH	52%	64%	65%	69%	56%	57%	58%	66%
mg mL <sup>-1</sup>	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,25	0,5	1	2
GLvK MeOH	17%	20%	37%	43%	23%	27%	50%	56%
mg mL <sup>-1</sup>	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,03125	0,0625	0,125	0,25
GLvI MeOH	47%	27%	19%	3%	58%	53%	39%	23%

Inhibicija je izračunata u odnosu na srednje vrednosti TI.

Prilikom ispitivanja antigenotoksičnog efekta ekstrakata lincure prema UVA zračenju dobijeni su slični rezultati. U slučaju MRC-5 ćelija, svi testirani ekstrakti su značajno doprineli smanjenju oštećenja izazvanom delovanjem UVA zračenja (Slika 32; Tabela 15.). Među ekstraktima plantažno gajene *G. lutea* najsnažniji efekat je zabeležen za GLL 50% EtOH i GLK MeOH ekstrakte, sa inhibicijom UVA-indukovane genotoksičnosti od 65% odnosno 64%. Što se tiče ekstrakata *in vitro* gajene lincure, kao i u slučaju analize genoprotektivnog efekta prema UVC zračenju, GLvK MeOH ekstrakt je ispoljio niži dozno-zavisni odgovor sa maksimumom inhibicije UVA-indukovanog oštećenja od 49%, dok je GLvI MeOH ekstrakt inhibirao indukovanu genotoksičnost za 60% i to na najmanjoj primenjenoj koncentraciji.

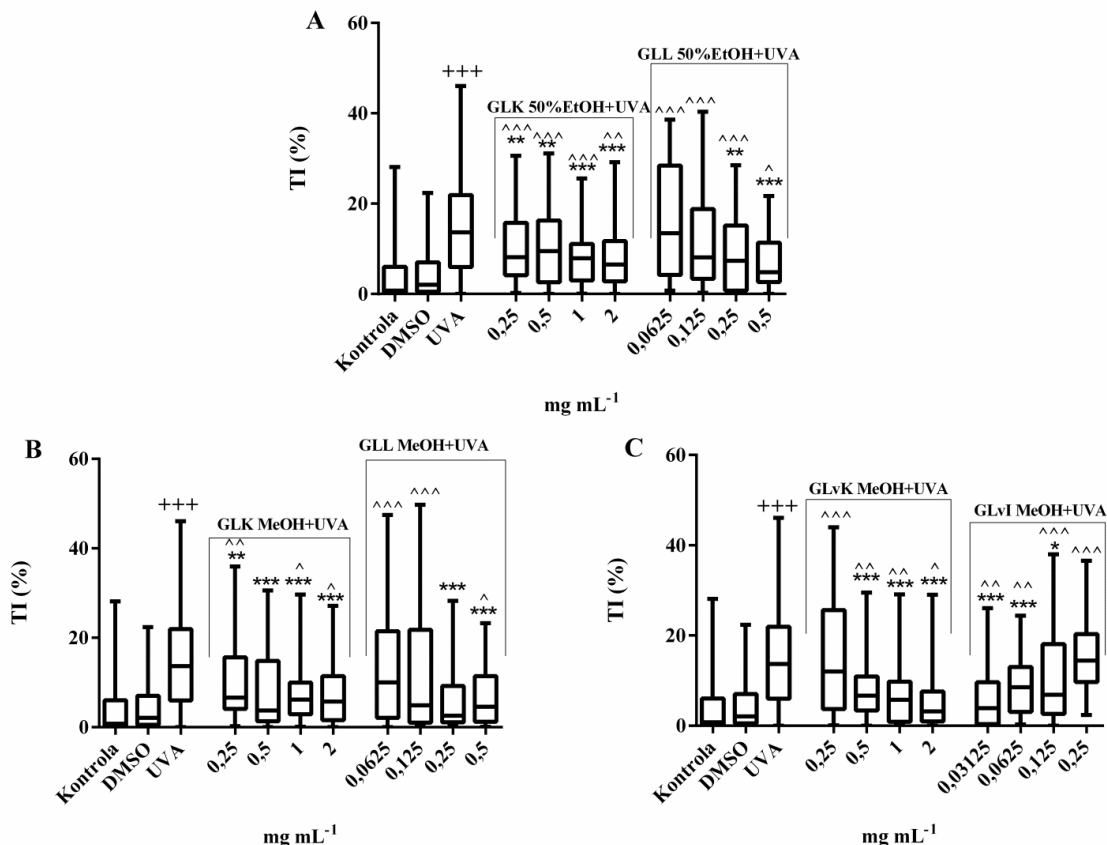


Slika 32. Antigenotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* prema UVA zračenju ( $3 \text{ J cm}^{-2}$ ) na MRC-5 ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana primenom Mann-Whitney *U* testa:

- između ko-tretmana i UVA zračenja (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).
- UV tretaman u odnosu na neozračenu kontrolu (+++ $p < 0,001$ ).
- ko-tretmana u odnosu na kontrolu rastvarača, DMSO, 1% (^ $p < 0,05$ ; ^^ $p < 0,01$ ; ^^ $p < 0,001$ ).

Kada su u pitanju Hs 294T ćelije, na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da su ekstrakti *G. lutea* bili uspešni u redukciji oštećenja DNK molekula izazvanim izlaganjem UVA zračenju (Slika 33; Tabela 15.). Primećeno je, kao i u prethodnim fazama ispitivanja UV-protektivnog delovanja, da sa porastom koncentracije raste i potencijal ekstrakata da redukuju genotoksičnost uzrokovanu delovanjem UVA zračenja, sa izuzetkom ekstrakta izdanka *in vitro* gajene lincure. Najefikasnijim u smanjenju stepena oštećenja DNK molekula među ekstraktima plantažno gajene biljke su se pokazali GLL 50% EtOH i GLL MeOH ekstrakti sa inhibicijom UVA-indukovane genotoksičnosti od 59%, odnosno 61%. Zanimljivo je da je među ekstraktima *in vitro* gajene lincure izraženiji genoprotektivni efekat ispoljio ekstrakt korena. GLvK MeOH je inhibirao genotoksičnost uzrokovanu UVA zračenjem za 69%, dok je inhibicija UVA-indukovanog DNK oštećenja nakon tretmana GLvI MeOH ekstraktom iznosila 61%.



Slika 33. Antigenotoksični potencijal ekstrakata *G. lutea* prema UVA zračenju (3 J cm<sup>-2</sup>) na Hs 294T ćelijama: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. Statistička značajnost je testirana primenom Mann-Whitney *U* testa:

- između ko-tretmana i UVA zračenja (\**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001).
- UV tretmana u odnosu na neozračenu kontrolu (+++*p*<0,001).
- ko-tretmana u odnosu na kontrolu rastvarača, DMSO, 1% (^*p*<0,05; ^^*p*<0,01; ^^*p*<0,001).

Tabela 15. Inhibicija (%) UVA-indukovane genotoksičnosti nakon tretmana ekstraktima *G. lutea* na MRC-5 i Hs 249T ćelijama u alkalnom komet testu

	MRC-5				Hs 294T			
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
GLK 50%EtOH	30%	44%	25%	57%	37%	42%	49%	50%
mg mL <sup>-1</sup>	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,0625	0,125	0,25	0,5
GLL 50%EtOH	38%	41%	47%	65%	1%	29%	42%	59%
mg mL <sup>-1</sup>	0,25	0,5	1	2	0,25	0,5	1	2
GLK MeOH	44%	58%	61%	64%	41%	50%	53%	54%
mg mL <sup>-1</sup>	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,0625	0,125	0,25	0,5
GLL MeOH	24%	44%	52%	55%	17%	25%	58%	61%
mg mL <sup>-1</sup>	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,25	0,5	1	2
GLvK MeOH	40%	42%	46%	49%	13%	50%	56%	69%
mg mL <sup>-1</sup>	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,03125	0,0625	0,125	0,25
GLvI MeOH	60%	57%	48%	40%	61%	47%	35%	5%

Inhibicija je izračunata u odnosu na srednje vrednosti TI.

#### 4.6. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata *G. lutea*

Uzimajući u obzir činjenicu da se delovanje testiranih mutagena u velikoj meri bazira na izazivanju oksidativnog oštećenja, u ovom radu ispitano je i nekoliko aspekata antioksidativnog delovanja odabranih ekstrakata i konstituenata *G. lutea*. Najpre je ispitana antioksidativna aktivnost primenom različitih metoda uključujući testove DPPH, TBA, heliranja jona gvožđa, FRAP i CUPRAC, kako bi se dobila što jasnija slika o antioksidativnom potencijalu test supstanci. U cilju utvrđivanja koji su konstituenti mogli doprineti ukupnom antioksidativnom potencijalu ekstrakata, u DPPH testu je ispitana i aktivnost odabranih čistih supstanci, i to genciopikrozida, sverozida, svertiamarina, mangiferina, homoorientina i izoviteksina.

Dodatno, praćen je efekat odabranih test supstanci na ekspresiju Nrf2 transkripcionog faktora, odgovornog za modulaciju aktivnosti antioksidativnih enzima. Dalje, imajući u vidu centralnu ulogu glutaciona u antioksidativnoj odbrani ćelija, utvrđen je efekat odabranih test supstanci na odnos redukovano i oksidovano glutaciona. Za praćenje ekspresije Nrf2 faktora i efekta na odnos redukovano i oksidovano glutaciona odabrani su 50% EtOH ekstrakti lincure, uzimajući u obzir činjenicu da se nijedan od testiranih ekstrakata nije posebno izdvajao u pogledu antigenotoksične aktivnosti, kao i da se za komercijalne svrhe ekstrakti lincure ekstrahuju uglavnom primenom 40-70% vodeno-etanolnog rastvarača. Uz to, činjenica da nastanak mutagena iz hrane IQ i PhIP ne može biti izbegnut prilikom obrade hrane na visokim temperaturama, kao i da oni zahtevaju metaboličku aktivaciju, istraživanje antioksidativne aktivnosti u ćelijama je ograničeno na HepG2 ćelijsku liniju. U ovoj fazi istraživanja je takođe ispitan i efekat konstituenata genciopikrozida i mangiferina.

##### 4.6.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost ekstrakata i konstituenata lincure da neutrališu slobodne radikale je ispitana primenom DPPH testa. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti su dati u Prilogu (Tabela 8.3.) i u Tabeli 16, gde su predstavljeni kao EC<sub>50</sub> vrednosti, odnosno kao efektivne koncentracije na kojima dolazi do neutralizacije 50% DPPH radikala. Niža EC<sub>50</sub> vrednost ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost test supstance i obrnuto. Najveća sposobnost neutralizacije slobodnih radikala među ekstraktima je pokazana za 50% EtOH ekstrakt lista, sa EC<sub>50</sub> vrednošću od  $27,5 \pm 3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Generalno, ekstrakti lista plantažno gajene lincure i *in vitro* izdanka su pokazali jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte korenova. Što se tiče konstituenata, najjaču aktivnost je pokazao mangiferin, sa EC<sub>50</sub> vrednošću od čak  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok za sverozid i svertiamarin nisu detektovane EC<sub>50</sub> vrednosti u testiranom opsegu koncentracija ( $>200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Tabela 16. EC<sub>50</sub> vrednosti ekstrakata i konstituenata lincure dobijnih u DPHH testu

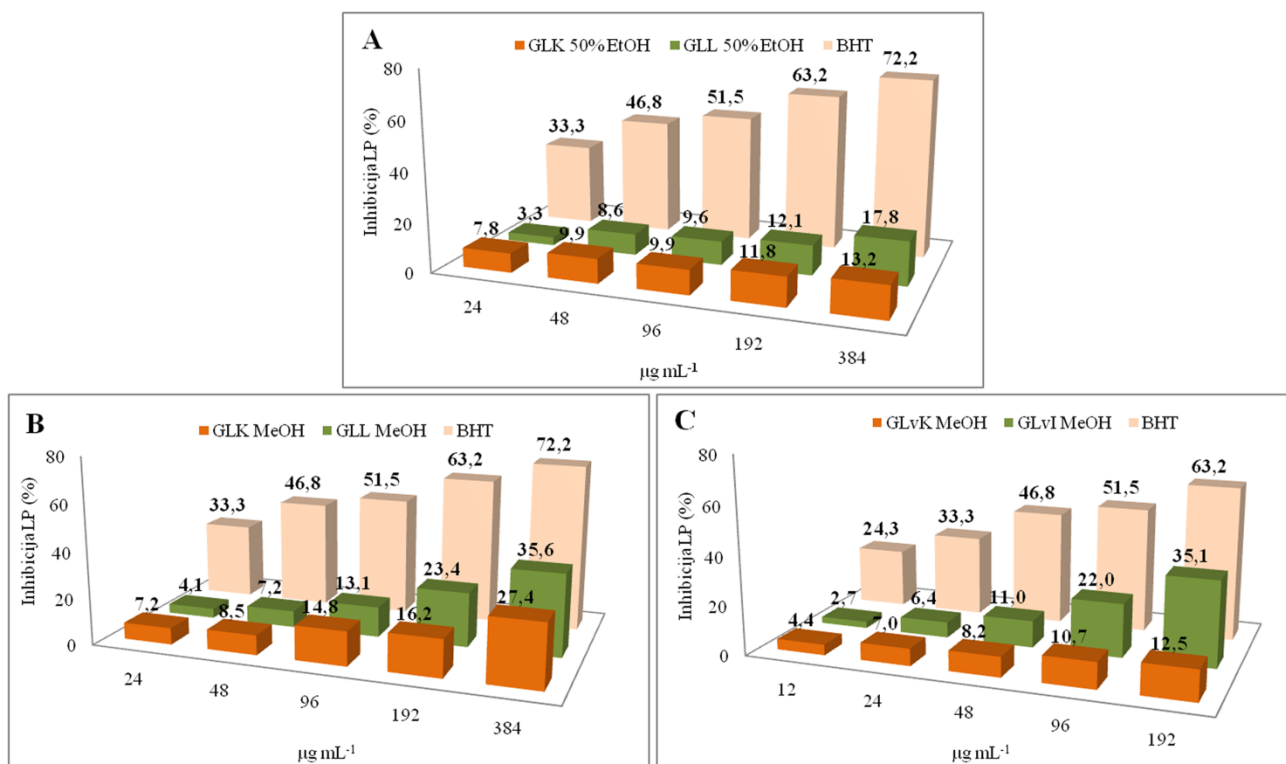
	EC <sub>50</sub> vrednosti (µg mL <sup>-1</sup> )
GLK 50% EtOH	335 ± 7,1 <sup>g</sup>
<b>GLL 50% EtOH</b>	<b>27,5 ± 3,5<sup>a</sup></b>
GLK MeOH	201 ± 4,2 <sup>f</sup>
GLL MeOH	53 ± 5,6 <sup>b</sup>
GLvK MeOH	165 ± 6,4 <sup>e</sup>
GLvI MeOH	73 ± 3,5 <sup>c</sup>
Genciopikrozid	119 ± 0,7 <sup>d</sup>
Sverozid	>200
Svertiamarin	>200
<b>Mangiferin</b>	<b>0,9 ± 0,1<sup>a</sup></b>
Izoviteksin	114,5 ± 2,1 <sup>d</sup>
Homoorientin	6,75 ± 0,3 <sup>a</sup>
Askorbinska kiselina	12,5 ± 0,3 <sup>a</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije.

Askorbinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa. Vrednosti obeležene različitim slovima u koloni se statistički značajno razlikuju.

#### 4.6.2. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije

Sposobnost ekstrakata da inhibiraju proces lipidne peroksidacije ispitana je primenom TBA testa, korišćenjem lipozoma kao modela ćelijske membrane, pri čemu je reakcija peroksidacije indukovana Fe<sup>2+</sup>/askorbat sistemom. Nakon određivanja količine obojenog produkta reakcije lipidne peroksidacije (MDA) uočeno je da je efikasnost bila relativno mala, tj. nije prešla 50% inhibicije, potrebnih za određivanje EC<sub>50</sub>, već su izračunati procenti inhibicije LP za ispitivane ekstrakte lincure. Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 34. i u Prilogu (Tabela 8.4.) može se zaključiti da su GLL MeOH i GlvI MeOH pokazali najjaču antioksidativnu aktivnost, sa inhibicijom LP od 35,6%, odnosno 35,1% pri najvišim testiranim koncentracijama (pri tome je aktivna koncentracija *in vitro* izdanka bila duplo manja). Procenat inhibicije LP je rastao sa povećanjem koncentracija svih testiranih ekstrakata. Kada je u pitanju GLL 50% EtOH ekstrakt, njegova sposobnost da inhibira proces peroksidacije je bila skoro dva puta manja u odnosu na metanolne ekstrakte lista plantažno i izdanka *in vitro* gajene lincure (maksimalne redukcije su iznosile ~35%). S druge strane, GLK MeOH sa inhibicijom LP od 27,4%, je pokazao nešto jači antioksidativni efekat u odnosu na GLK 50% EtOH. Što se ekstrakata *in vitro* gajenih biljaka tiče, treba imati u vidu da su oni, iz tehničkih razloga, primenjeni u nešto manjim koncentracijama, tako da je približno ista aktivnost (35% inhibicije) ostvarena sa dva puta manjom koncentracijom metanolnih ekstrakata (384 µg mL<sup>-1</sup> za metanolni ekstrakt lista, odnosno 192 µg mL<sup>-1</sup> za metanolni ekstrakt izdanka). Generalno, može se primetiti da su metanolni ekstrakti nadzemnih delova lincure bili delotvorniji u inhibiciji procesa LP, međutim u poređenju sa veštačkim antioskidantom BHT koji je korišćen kao pozitivna kontrola, aktivnost ekstrakata se može okarakterisati kao slaba do umerena.

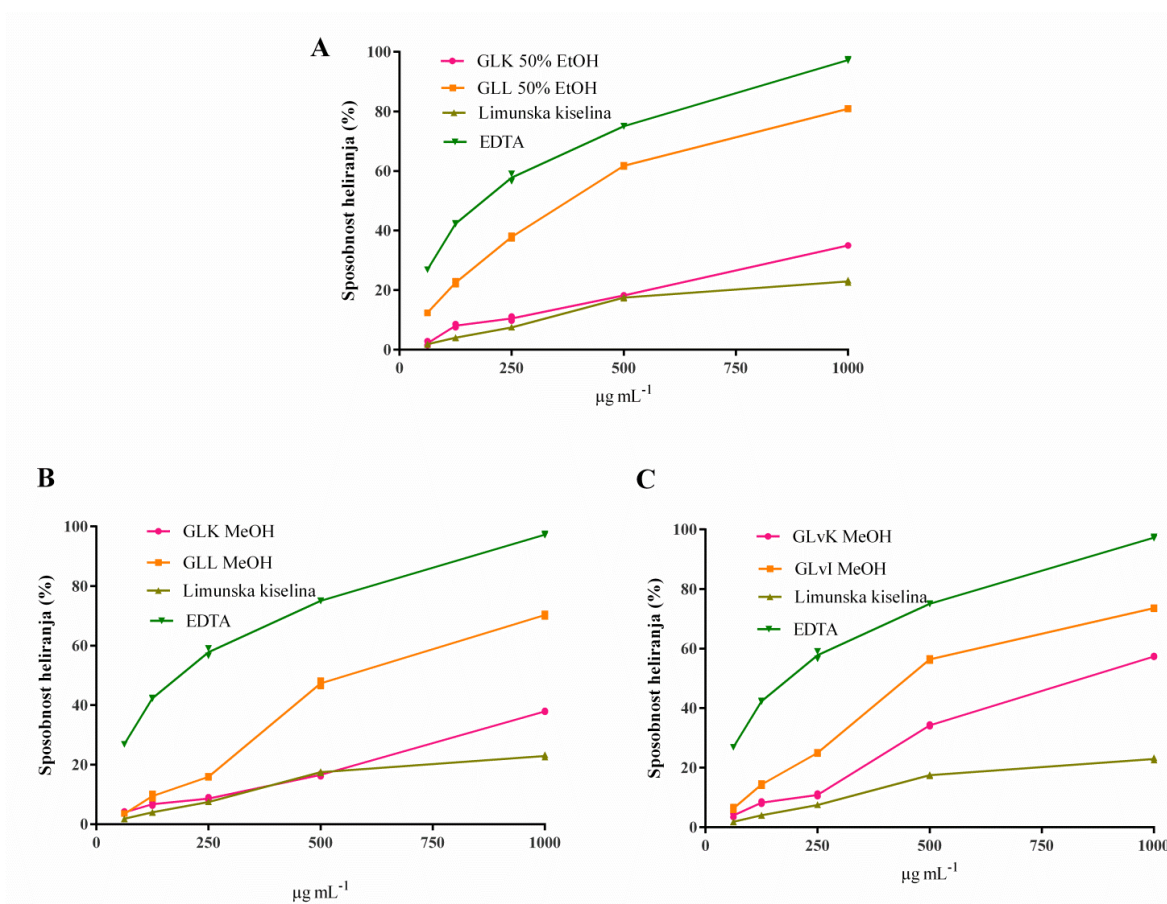


Slika 34. Inhibicija (%) lipidne peroksidacije ekstraktima *G. lutea*: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao procenti inhibicije LP u poređenju sa kontrolom rastvarača (DMSO). Prikazane su srednje vrednosti dva nezavisna eksperimenta.

#### 4.6.3. Određivanje sposobnosti ekstrakata da heliraju jone gvožđa

S obzirom da dvovalentni joni prelaznih metala kao što je  $\text{Fe}^{2+}$  mogu indukovati oksidativne promene i dovesti do iniciranja procesa lipidne peroksidacije i degradacije funkcionalnih komponenti, ispitana je i mogućnost ekstrakata da deluju kao helirajući agensi koji se kompetitivno vezuju za jone metala. Svi testirani ekstrakti lincure su pokazali umereni do jaki efekat, pri čemu je helirajuća sposobnost ekstrakata bila jača od sposobnosti limunske kiseline, ali slabija od EDTA, komercijalno korišćenih helirajućih agenasa. Ekstrakti nadzemnih delova su pokazali nešto jaču helirajuću sposobnost koja se kretala u opsegu 70-80%, dok se među ekstraktima korenova izdvojio GLvK MeOH ekstrakt sa helirajućom sposobnošću od 57% (Slika 35; Tabela 8.5, Prilog).



Slika 35. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstrakata *G. lutea*: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. Limunska kiselina i EDTA su korišćene kao pozitivne kontrole.

Rezultati su dodatno i kvantifikovani računjanem EC<sub>50</sub> vrednosti, odnosno koncentracije ekstrakta na kojoj je helirano 50% jona Fe<sup>2+</sup>. Najizraženiji efekat je primećen za GLL 50% EtOH ekstrakt sa EC<sub>50</sub> vrednošću od 485,5 ± 6,4 µg mL<sup>-1</sup> (Tabela 17.), koji je na najvećoj testiranoj koncentraciji helirao skoro 80% jona gvožđa, dok je helirajuća sposobnost EDTA na istoj koncentraciji iznosila 97%.

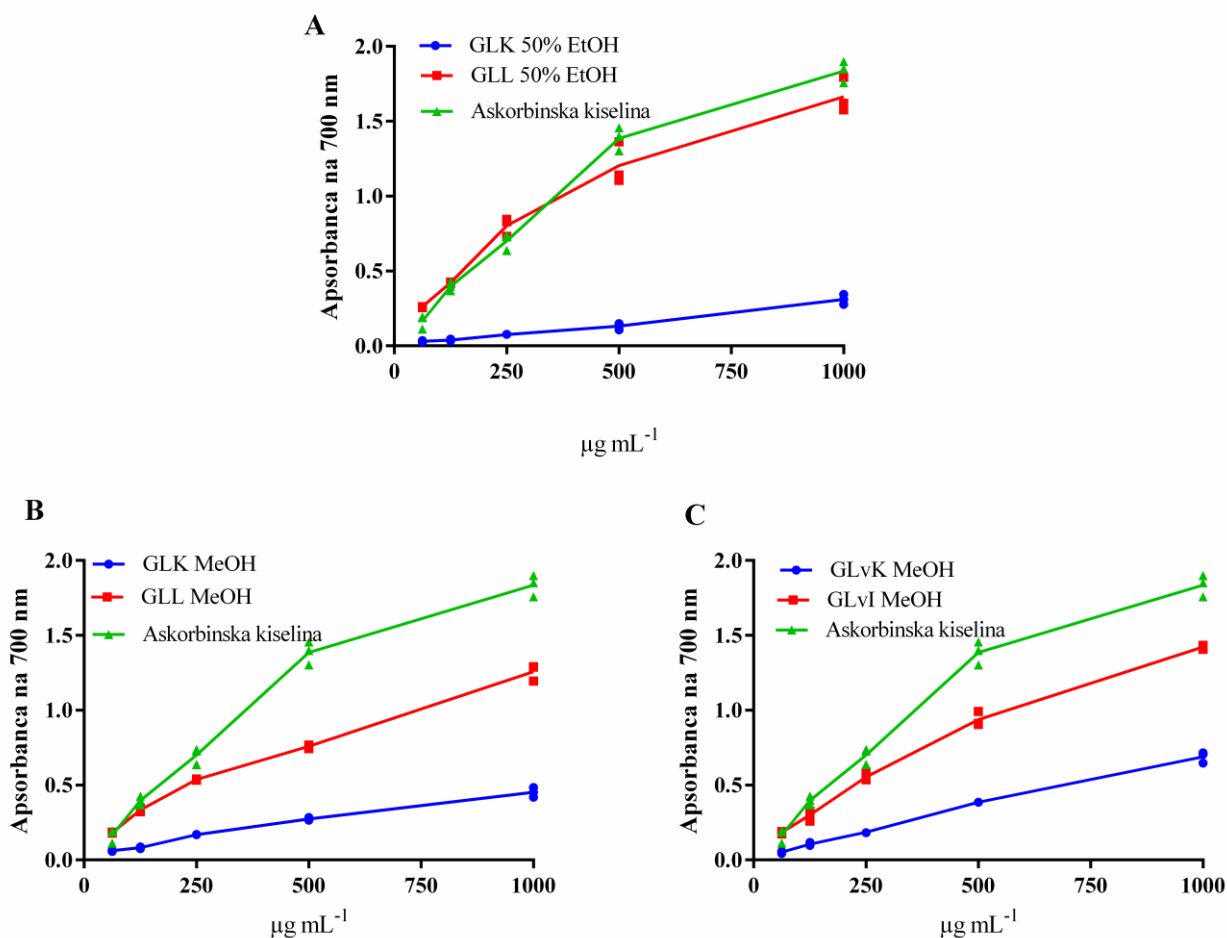
Tabela 17. EC<sub>50</sub> vrednosti ekstrakata *G. lutea* za sposobnost heliranja jona gvožđa

	EC <sub>50</sub> vrednosti (µg mL <sup>-1</sup> )
GLK 50% EtOH	>1000
<b>GLL 50% EtOH</b>	<b>485,5 ± 6,4<sup>b</sup></b>
GLK MeOH	>1000
GLL MeOH	676,5 ± 6,0 <sup>d</sup>
GLvK MeOH	857 ± 12,7 <sup>e</sup>
GLvI MeOH	596,5 ± 7,8 <sup>c</sup>
Limunska kiselina	>1000
EDTA	245 ± 7,1 <sup>a</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±standardne devijacije. Limunska kiselina i EDTA su korišćene kao pozitivne kontrole. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA primenom Tukey-ovog testa. Vrednosti obeležene različitim slovima u koloni se međusobno statistički značajno razlikuju.

#### 4.6.4. Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP test)

FRAP test se zasniva na sposobnosti antioksidanta da redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  pri čemu se pozitivna reakcija prati promenom boje od žute do zelene i plave. Veća vrednost izmerene apsorbance ukazuje i na veću redukcionu sposobnost test supstance. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom testu (Slika 36, Tabela 18; Tabela 8.6, Prilog) dobija se uvid o redukcionoj moći korišćenih ekstrakata. Etanolni ekstrakt lista plantažno gajene lincure je pokazao značajnu sposobnost redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ , pri čemu je efekat ekstrakta bio izjednačen sa efektom askorbinske kiseline (model antioksidant) već na koncentraciji od  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Što se tiče ostalih testiranih ekstrakata nadzemnih delova biljke, niže koncentracije su imale približno isti efekat kao i pozitivna kontrola, međutim, sa porastom koncentracije grafici efektivnosti se vidno razdvajaju, pri čemu je efikasnost biljnih ekstrakata manja. S druge strane, ekstrakti korenova, kako plantažno, tako i *in vitro* gajene lincure, su ispoljili značajno slabiji efekat u poređenju sa askorbinskom kiselinom.



Slika 36. Sposobnost redukcije jona  $\text{Fe}^{3+}$  ekstraktima *G. lutea*: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Askorbinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola.

Na osnovu rezultata  $\text{EC}_{50}$  vrednosti kojima su predstavljene efektivne koncentracije na kojima je apsorbance iznosila 0,5, može se zaključiti da je GLL 50% EtOH ekstrakt ispoljio najjaču



redukcionu sposobnost sa  $EC_{50}$  vrednošću od čak  $137,5 \pm 6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ostvarujući tako jači efekat od askorbinske kiseline ( $EC_{50}=165,5 \pm 4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

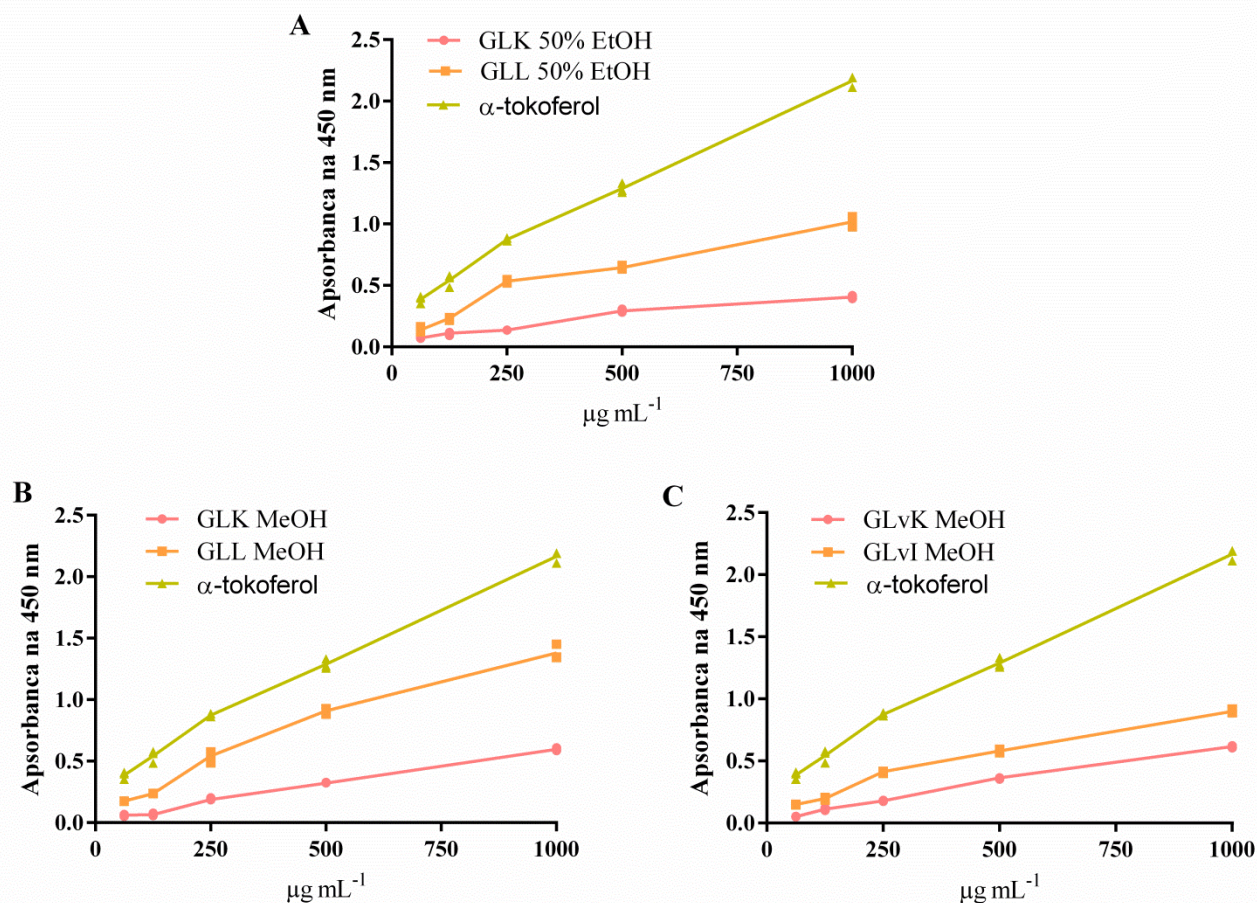
Tabela 18.  $EC_{50}$  vrednosti ekstrakata *G. lutea* za sposobnost redukcije jona  $\text{Fe}^{3+}$

	$EC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$
GLK 50% EtOH	>1000
<b>GLL 50% EtOH</b>	<b><math>137,5 \pm 6,4^a</math></b>
GLK MeOH	>1000
GLL MeOH	$286 \pm 5,6^d$
GLvK MeOH	$710 \pm 7,1^e$
GLvI MeOH	$255 \pm 7,1^c$
Askorbinska kiselina	$165,5 \pm 4,9^b$

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Askorbinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa. Vrednosti obeležene različitim slovima u koloni se statistički značajno razlikuju.

#### 4.6.5. Određivanje sposobnosti redukcije jona bakra (CUPRAC test)

CUPRAC metoda se zasniva na transferu elektrona između antioksidanta i oksidanta ( $\text{Cu}^{2+}$ ), pri čemu dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{1+}$ . U ovoj metodi, antioksidativni potencijal test supstanci procenjen je merenjem apsorbance obojenog produkta, a vrednost testa se ogleda u činjenici da se reakcija odvija pri skoro fiziološkoj pH vrednosti. Viša vrednost apsorbance ukazuje i na jaču redukcionu sposobnost. Kao i u prethodnom testu procene redukcionne sposobnosti ekstrakata lincure, ona je rasla sa porastom primenjenih koncentracija. Na osnovu rezultata ispitivanja sposobnosti ekstrakata da redukuju jone  $\text{Cu}^{2+}$ , prikazanih na Slici 37, u Tabeli 19. i Prilogu (Tabela 8.7.) može se zaključiti da su ekstrakti ispoljili slabu do umerenu aktivnost. Ekstrakti listova plantažno i izdanka *in vitro* gajene *G. lutea* su pokazali i u ovom testu jaču aktivnost u odnosu na testirane ekstrakte korenova. Najizraženiji efekat je ispoljio GLL MeOH ekstrakt, dok je sledeći po jačini bio GLL 50% EtOH ekstrakt. Iako je GLL MeOH bio najefikasniji od svih testiranih ekstrakata, sa  $EC_{50}$  vrednošću od  $277 \pm 7,1$ , ipak se pokazao značajno slabijim redukcionom sredstvom u poređenju sa model antioksidantom  $\alpha$ -tokoferolom ( $EC_{50}=93,5 \pm 2,1$ ).



Slika 37. Sposobnost redukcija jona  $\text{Cu}^{2+}$  ekstraktima *G. lutea*: A) 50% EtOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; B) MeOH ekstrakti plantažno gajene *G. lutea*; C) MeOH ekstrakti *in vitro* gajene *G. lutea*.

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije.  $\alpha$ -tokoferol je korišćen kao pozitivna kotrola.

Tabela 19.  $\text{EC}_{50}$  vrednosti ekstrakata *G. lutea* za sposobnost redukcije jona  $\text{Cu}^{2+}$

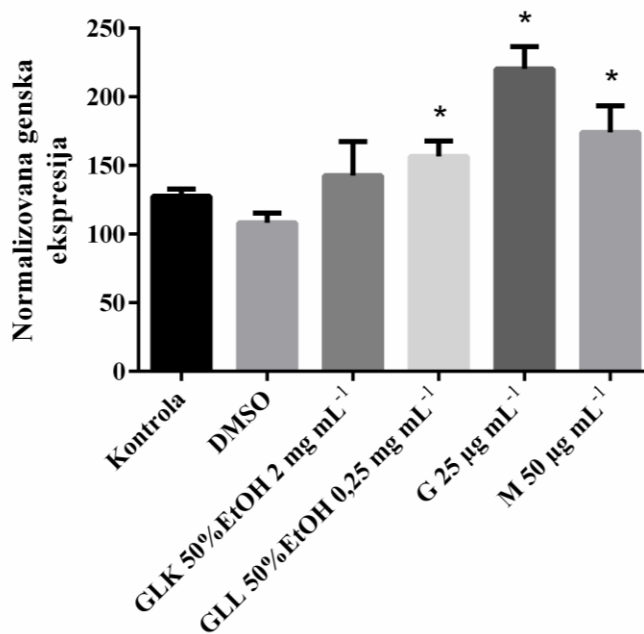
	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
GLK 50% EtOH	>1000
GLL 50% EtOH	$367 \pm 8,5^c$
GLK MeOH	$826,5 \pm 4,9^f$
<b>GLL MeOH</b>	<b><math>277 \pm 7,1^b</math></b>
GLvK MeOH	$786,5 \pm 3,5^e$
GLvI MeOH	$459 \pm 5,6^d$
$\alpha$ -tokoferol	$93,5 \pm 2,1^a$

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±stadardne devijacije.  $\alpha$ -tokoferol je korišćen kao pozitivna kontrola. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa. Vrednosti obeležene različitim slovima u koloni se statistički značajno razlikuju.

#### 4.6.6. Uticaj ekstrakata i konstituenata *G. lutea* na ekspresiju *Nrf2* gena u HepG2 ćelijama

Efekat 50% EtOH ekstrakata, genciopikrozida i mangiferina na ekspresiju *Nrf2* gena, praćen je primenom kvantitativne PCR metode u realnom vremenu. Prilikom ispitivanja efekta test supstanci da

modulišu ekspresiju ovog gena, odabrane su najefektivnije antigenotoksične koncentracije ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , redom za GLK 50% EtOH, GLL 50% EtOH, genciopikrozid i mangiferin). Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 38. može se uočiti da sve test supstance povećavaju ekspresiju *Nrf2* gena u odnosu na kontrolu rastvarača. Najistaknutiji efekat je zabeležen nakon tretmana ćelija genciopikrozidom. S druge strane, iako je GLK 50% EtOH povećao ekspresiju *Nrf2* gena, njegov efekat nije bio statistički značajan.



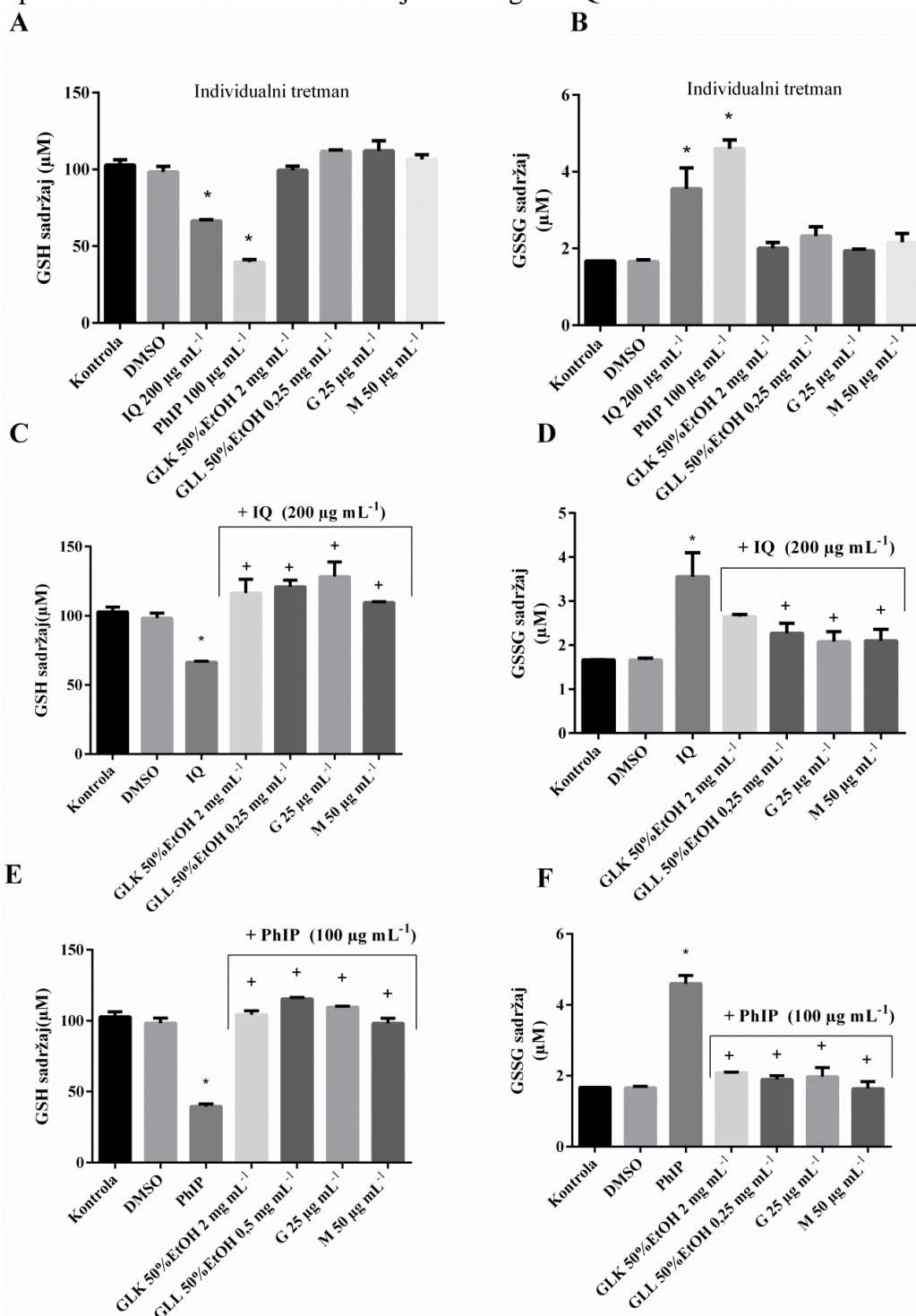
Slika 38. Efekat 50% EtOH ekstrakata i konstituenata *G. lutea* na ekspresiju *Nrf2* gena u HepG2 ćelijama.

Genciopikrozid (G); Mangiferin (M). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije. Statistička značajnost je analizirana u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO, 1%) pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.6.7. Uticaj ekstrakata i konstituenata *G. lutea* na sadržaj i odnos redukovanog i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG) u HepG2 ćelijama

Sadržaj redukovanog (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa i njihov odnos su određeni u lizatima tretiranih HepG2 ćelija. Ćelije su bile izložene individualnim tretmanima 50% EtOH ekstrakata, genciopikrozida i mangiferina u koncentracijama koje su se pokazale najefikasnijim u testovima antigenotoksičnosti, kao i individualnim tretmanima mutagenima (koncentracije koje su korišćene za indukciju oštećenja u testu antigenotoksičnosti). Dodatno, ispitan je i uticaj ko-tretmana ekstrakata i konstituenata sa mutagenima na sadržaj i odnos GSH/GSSG. Na osnovu rezultata sadržaja GSH i GSSG (Slika 39.) uočava se da individualni tretmani mutagenima IQ i PhIP (Slika 39A, 39B) značajno snižavaju sadržaj GSH, a povećavaju sadržaj GSSG, tj. dovode do trošenja redukovane forme glutationa. S druge strane, testirani ekstrakti i konstituenti nisu imali statistički značajan efekat na sadržaj redukovanog i oksidovanog glutationa u poređenju sa kontrolom rastvarača (Slika 39A, 39B). Značajno povećanje sadržaja redukovanog glutationa je zabeleženo nakon ko-tretmana biljnih derivata sa IQ, u odnosu na sam mutagen (Slika 39C, 39D). Slični rezultati su dobijeni i nakon ko-tretmana ekstraktima/konstituentima i PhIP mutagenom, kada je takođe uočeno značajno povećanje sadržaja GSH, odnosno smanjenje sadržaja GSSG. Odnos redukovanog i oksidovanog glutationa je dat u Tabeli

16, pri čemu dobijeni rezultati ukazuju i potvrđuju potencijal biljnih derivata da obnove sadržaj GSH u ćeliji, koji je prethodno bio oksidovan delovanjem mutagena IQ i PhIP.



Slika 39. Efekat individualnih tretmana ekstrakata i konstituenata *G. lutea* (A, B) i ko-tretmana sa IQ (C, D) i PhIP (E, F) na sadržaj GSH i GSSG.

Genciopikrozid (G); Mangiferin (M). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa:

- u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO, 1% (\*p < 0,05);
- ko-tretmana u odnosu na IQ/PhIP (+p < 0,05).

Tabela 20. Odnos GSH/GSSG u HepG2 ćelijama nakon individualnog tretmana test supstancama i ko-tretmana ekstraktima/konstituentima sa mutagenom IQ/PhIP

GSH/GSSG		Ko-tretman	
Individualni tretman		+ IQ	+ PhIP
Kontrola	59,6±2,1		
DMSO	<b>57,3±3,8</b>		
IQ (200 µg mL <sup>-1</sup> )	<b>16,9±3,1*</b>		
PhIP (100 µg mL <sup>-1</sup> )	<b>6,6±0,0*</b>		
GLK 50% EtOH (2 mg mL <sup>-1</sup> )	47,8±5,0	41,9±2,9 <sup>+</sup>	48±1,8 <sup>#</sup>
GLL 50% EtOH (0,25 mg mL <sup>-1</sup> )	46,4±5,5	51,5±3,2 <sup>+</sup>	59,9±2,9 <sup>#</sup>
G (25 µg mL <sup>-1</sup> )	55,9±4,9	59,9±1,7 <sup>+</sup>	54,1±7,7 <sup>#</sup>
M (50 µg mL <sup>-1</sup> )	47,8±6,9	50,7±6,3 <sup>+</sup>	58,2±5,0 <sup>#</sup>

Genciopikrozid (G); Mangiferin (M). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±standardne devijacije dva individualna eksperimenta. Statistička značajnost je analizirana pomoću one-way ANOVA, primenom Dunnet-ovog testa:

- u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO, 1% (\*p<0,05);
- ko-tretmana u odnosu na IQ (+p<0,05);
- ko-tretmana u odnosu na PhIP (#p<0,05).

## 5. Diskusija

Prisustvo i rast mikroorganizama u hrani može prouzrokovati kvarenje namirnica, ili dovesti do pojave infekcija i razvoja bolesti (Marriott i sar., 2006), zbog čega je neophodno koristiti različite aditive sa potencijalom u prezervaciji hrane. Uzimajući u obzir činjenicu da mnogobrojni veštački sintetisani konzervansi dovode do brojnih neželjenih efekata (Sasaki i sar., 2002; Randhawa i Bahna, 2009), poslednjih godina su istraživanja usmerena i ka identifikaciji antimikrobnih agenasa prirodnog porekla. Iz tog razloga se lekovite i aromatične biljke u velikoj meri istražuju kao izvor potencijalno efikasnih, antimikrobnih jedinjenja koja mogu da poboljšaju sigurnost hrane i spreče razvoj mikroorganizama u njoj (Rios i Recio, 2005). S druge strane, izloženost živih organizama različitim genotoksičnim faktorima može dovesti do oštećenja na DNK molekulu i do razvoja različitih bolesti. S obzirom da se pojava mutagena u hrani, pre svega heterocikličnih aromatičnih amina koji nastaju termičkom obradom hrane bogate proteinima, ne može izbeći, vrlo je bitno pronaći način kojim bi se redukovao njihov genotoksični potencijal (Ferguson i sar., 2004). Uz to, jedan od najprisutnijih fizičkih genotoksičnih agenasa u prirodi je ultraljubičasto zračenje koje interaguje sa molekulom DNK i dovodi do genomske nestabilnosti (Matsumura i Ananthaswamy, 2004). Uzimajući u obzir prethodno navedeno, tokom poslednjih godina sve su intenzivnije studije koje se bave ispitivanjem efekata mnogobrojnih prirodnih agenasa, pre svega biljaka i njihovih sekundarnih metabolita, u cilju pronalazjenja novih, netoksičnih, genoprotektivnih fito-antimutagena koji imaju sposobnost redukcije oštećenja molekula DNK.

Međutim, zbog sve većeg interesovanja i potražnje za sirovim lekovitim materijalom, brojnost mnogih biljnih vrsta se smanjuje. Neke od njih su ugrožene usled dejstva antropogenog faktora, pa se radi njihove zaštite uvode zabrane sakupljanja biljnog materijala sa prirodnih staništa. Pored plantažnog gajenja biljaka, kao jednog vida očuvanja biljnih vrsta u njihovim prirodnim staništima, dobar način za očuvanje ugroženih vrsta i dobijanje dodatnog zdravog sadnog biljnog materijala je i *in vitro* kultura gajenja (Hussain i sar., 2012).

U ovom radu ispitane su antimikrobne i antigenotoksične aktivnosti ekstrakata *Gentiana lutea*, pri čemu su priprema test supstanci, a naročito odabir praćenih bioloških efekata bili u velikoj meri usklađeni sa etnofarmakološkom primenom ove biljke. Naime, činjenica da se lincura tradicionalno koristi kod brojnih poremećaja digestivnog trakta (Tucakov, 1996) usmerila nas je da ispitujemo njen antimikrobni potencijal prema patogenima i kontaminantima hrane, a antigenotoksični potencijal upravo prema mutagenima iz hrane. Ohrabreni snažnim antigenotoksičnim potencijalom koji je detektovan u odnosu na mutagene iz hrane, tj. potvrdom da derivati lincure mogu snažno redukovati nastanak, odnosno pospešiti ispravku lezija na molekulu DNK, istraživanje smo proširili i na UV zračenje, tj. ispitali smo UV-protektivni potencijal derivata ove biljke. S druge strane, kako bi se uskladili s tradicionalnim načinima pripreme lekovitih preparata lincure, u istraživanje smo uključili 50% vodeno-etanolne ekstrakte korenova *G. lutea*, koji imitiraju lekovite tinkture pripremljene u alkoholu ili rakiji, ali smo u istraživanje uvrstili i metanolne ekstrakte, koje smo izabrali na osnovu podataka iz ranijih studija u kojima je pokazano da je najveći prinos sekoiridoida *G. lutea* dobijen prilikom ekstrakcije ovim rastvaračem (Kušar i sar., 2010). Uz to, u istraživanje smo uvrstili i ekstrakte listova, imajući u vidu da su biološke aktivnosti nadzemnih delova biljke veoma oskudno ispitivane. Zatim, uzimajući u obzir činjenicu da je biljka zbog svojih lekovitih svojstava prekomerno eksploatisana, te da je pod zakonskom legislativom zaštite, deo ove disertacije je posvećen i uspostavljanju *in vitro* biljne kulture *G. lutea*. Uporedna analiza bioloških aktivnosti ekstrakata pripremljenih iz nadzemnih (list/izdanak) i podzemnih (koren) delova plantažno i *in vitro* gajene lincure, koja predstavlja okosnicu ovog rada, treba da odgovori na pitanja optimizacije uslova gajenja i

načina pripreme biljnih ekstrakata, te usmeri dalja istraživanja u cilju optimalnog iskorišćenja antimikrobnog i antigenotoksičnog potencijala ove biljke u medicinske svrhe. Iako je zabeležen širok spektar bioloških aktivnosti ekstrakata plantažno gajene lincure (Nastasijević i sar., 2012; 2016; Mirzaee i sar., 2017), literaturni podaci o antimikrobnom, a pre svega antigenotoksičnom efektu lincure su jako oskudni, dok podataka o aktivnosti ekstrakata *in vitro* gajene lincure nema, te ih je neophodno dopuniti.

U ovom istraživanju, najpre je uspostavljena *in vitro* kultura *G. lutea*. Variranjem uslova gajenja uspešno je postignuto umnožavanje izdanaka, kao i njihovo ožiljavanje formiranjem adventivnih korenova. Praćeni parametri rasta i prinos sveže i suve mase biljaka lincure ukazali su na mogućnost dobijanja i gajenja čitavih biljaka ove vrste u *in vitro* uslovima. Do sada nema literaturnih podataka o ovako uspešnom i vremenski kratkom (10 nedelja) načinu rasta *G. lutea* u laboratorijskim uslovima, a u cilju dobijanja dovoljnih količina biljnog materijala za ispitivanje bioloških aktivnosti. Što se tiče biljnog materijala sa plantaže, obezbeđeni su osušeni listovi i korenovi biljaka starih 7 godina, s obzirom da Radanović i sar. (2014) ističu da se optimalno prisustvo biološki aktivnih materija u korenu postiže tek nakon 4-6 godina rasta u prirodnim uslovima/na plantaži. Zatim su ekstrakti pripremani i urađena je hemijska analiza 50% EtOH i MeOH ekstrakata korena i lista plantažno gajene lincure, kao i analiza MeOH ekstrakata korena i izdanka *in vitro* gajene *G. lutea*. U daljem radu, ispitan je antibakterijski i antibiofilm potencijal ekstrakata i odabranih konstituenata lincure prema kontaminantima hrane. Pored toga, utvrđen je antigenotoksični efekat svih ekstrakata i odabranih konstituenata prema mutagenima iz hrane (IQ i PhIP) i UV zračenju. Na kraju, kako bi se objasnila uloga antioksidativnih mehanizama u uočenoj antigenotoksičnosti, ispitan je antioksidativni potencijal ekstrakata lincure sa različitih aspekata.

Na osnovu rezultata hemijske analize ekstrakata korenova plantažno gajene lincure, primećuje se da su sekoiridoidi, kojima pripadaju genciopikrozid, sverozid i svertiamarin, najzastupljenija grupa jedinjenja prisutna u ovim ekstraktima, kako u 50% EtOH, tako i u MeOH. U spomenutim ekstraktima, zapaženo je i prisustvo iridoidnog jedinjenja loganske kiseline. Uzimajući u obzir dosadašnje objavljene podatke o hemijskom profilu korena lincure, sadržaj genciopikrozida i sverozida prisutan u našim ekstraktima je sličan kao u prethodnim studijama (Öztürk i sar., 2006; Barbaro i sar., 2009; Kušar i sar., 2010; Nastasijević i sar., 2012), dok je količina detektovanog svertiamarina bila nešto veća. S druge strane, sadržaj ksantona i C-glukoflavona u ekstraktima korenova je bio nizak, što je takođe u skladu sa literaturnim podacima (Aberham i sar., 2007).

Zanimljivi rezultati su dobijeni prilikom hemijske analize ekstrakata listova plantažno gajene lincure, pri čemu su uočene razlike u sadržaju pojedinih grupa jedinjenja između 50% EtOH i MeOH ekstrakata, što je u skladu s činjenicom da profil ekstrahovanih jedinjenja u velikoj meri zavisi od polarnosti i hemijskih karakteristika rastvarača (Do i sar., 2014). Kada je u pitanju 50% EtOH ekstrakt, najzastupljenija grupa jedinjenja prisutna u njegovom sastavu su C-glukoflavoni, pre svega homoorientin i izoviteksin. Dodatno, ksanton mangiferin i iridoid loganska kiselina su takođe detektovani. S druge strane, u MeOH ekstraktu najdominatnija detektovana komponenta je bila loganska kiselina. Pored toga, u ekstraktima listova je detektovan i sadržaj genciopikrozida, sverozida, svertiamarina i izogentizina, što je u skladu sa prethodno objavljenim podacima o hemijskom profilu listova plantažno gajene *G. lutea* (Šavikin i sar., 2009; Kušar i sar., 2010; Balijagić i sar., 2012). Što se tiče količine ukupnih polifenola i flavonoida u ekstraktima plantažno gajene lincure, primećuje se da su oba rastvarača bila pogodna za njihovu ekstrakciju, što je u skladu s činjenicom da se polarni rastvarači, uključujući metanol i etanol, mogu koristiti za njihovu ekstrakciju (Do i sar., 2014). Iako se smeše vode i etanola smatraju povoljnijim ekstraktantima, pre svega zbog neškodljivosti za ljudsku upotrebu, ali i zbog činjenice da po pravilu daju veći prinos i ukupnih polifenola i flavonoida u poređenju s metanolom (Wang i Helliwell, 2001; Bonoli i sar., 2004), postoje podaci da je metanol

povoljniji rastvarač za ekstrakciju polifenola manje molekulske mase, kao i sekoiridoida (Dai i Mumper, 2010; Kušar i sar., 2010). Naši rezultati, međutim, koji ukazuju na veće prisustvo ukupnih polifenola i flavonida u 50% EtOH nego u MeOH ekstraktima istih organa plantažno gajenih biljaka, idu u prilog podacima koje su naveli Wang i Helliwell (2001) i Bonoli i sar. (2004).

Zatim, treba napomenuti da su ekstrakti listova skoro dva puta bogatiji ovim grupama jedinjenja. Poređenjem sa studijom koju su sproveli Nastasijević i sar. (2012) može se zaključiti da se u ekstraktima korenova korišćenim u našem istraživanju nalazila manja količina ukupnih polifenola. S druge strane, detektovana količina polifenola u ekstraktima listova je znatno veća u odnosu na prethodno objavljene podatke (Balijagić i sar. 2012). Međutim, nije neobično očekivati promenljiv sadržaj sekundarnih metabolita u ekstraktima lincure u različitim studijama, s obzirom na činjenicu da su staništa biljaka, njihova starost, kao i postupci prerade i ekstrakcije različiti (Aiello i sar., 2003; González-López i sar., 2014; Radanović i sar., 2014). Rezultati koji su dobijeni ekstrakcijom *in vitro* gajene lincure potvrđuju ovu činjenicu, obzirom da su dati ekstrakti imali nešto drugačiji hemijski profil. U ekstraktu korena detektovan je samo nešto veći sadržaj genciopikrozida. S druge strane, iridoidni kompleks *in vitro* izdanka se uglavnom sastojao od genciopikrozida, sverozida, svertiamarina i loganske kiseline, pri čemu je njihov sadržaj bio 2 do čak 8 puta veći u odnosu na količine detektovane u svim ekstraktima plantažno gajene biljke; što se tiče metanolnog ekstrakta plantažno gajenog lista, u njemu je bilo oko 5 puta manje iridoida. U ranijim istraživanjima hemijskog profila *in vitro* kultivisane *G. lutea* pokazano je prisustvo genciopikrozida i svertiamarina u metanolnom ekstraktu izdanka (Menković i sar., 2000), dok su sverozid i loganska kiselina po prvi put detektovani u ovoj studiji, kao deo iridoidnog kompleksa *in vitro* izdanka. Dalje, količina ukupnih polifenola i flavonoida je takođe bila znatno veća u nadzemnom delu *in vitro* gajene biljke u poređenju sa korenom. Istraživanje koje su sproveli Catanà i sar. (2017) pokazalo je da je sadržaj ukupnih polifenola u korenu *in vitro* gajene *G. lutea* iznosio 1,356 mg GEK g<sup>-1</sup>, ukazujući na značajno veću količinu ukupnih polifenola (23,9 mg GEK g<sup>-1</sup>) u ekstraktu korena *in vitro* gajene lincure u našem istraživanju. Uzimajući u obzir visok sadržaj iridoida i polifenola u GLVI MeOH ekstraktu, zajedno sa visokom stopom rasta u definisanim *in vitro* uslovima, može se sugerisati da bi nadzemni delovi *in vitro* gajene *G. lutea* mogli da predstavljaju pogodan materijal za ekstrakciju poznatih i dalja ispitivanja potencijalno novih biološki aktivnih jedinjenja.

Kako bi se analizirala varijabilnost sadržaja iridoidnih jedinjenja uočena u metanolnim ekstraktima plantažnog i *in vitro* porekla, treba imati na umu da je proces produkcije sekundarnih metabolita jako složen i uključuje njihovu biosintezu, transport i skladištenje u odgovarajućim organima, kao i upotrebu od strane biljke. Takođe, treba uzeti u obzir i činjenicu da mesta skladištenja sekundarnih metabolita nisu uvek ista kao i mesta njihove biosinteze (Wink, 1990). Velika količina iridoida u izdanku *in vitro* gajene lincure, pre svega genciopikrozida, ukazuje na mogućnost njihove sinteze u nadzemnim delovima biljke, slično kao i u slučaju *in vitro* gajene *Scrophularia nodosa*, gde je takođe zabeležen visok sadržaj sekoiridoidnih jedinjenja u izdanku, dok je njihova sinteza izostala u korenu (Sesterhenn i sar., 2007). Iako u literaturi nema potvrde o tome da je relativno visok sadržaj sekoiridoida u korenu lincure rezultat transporta i skladištenja, a ne biosinteze, naši rezultati ukazuju na ovu mogućnost. U prilog tome ide i razlika u količinama iridoidnih jedinjenja zavisna od starosti korišćenih biljnih uzoraka: u ekstraktu 7 godina starog korena plantažno gajene biljke nalazilo se značajno više iridoida, nego u 9 nedelja starim adventivnim korenovima *in vitro* gajenih biljaka. S druge strane, ukoliko se sinteza određenih sekundarnih metabolita ipak odvija u korenu, što je neophodno dalje istraživati, moguće je pospešiti razvoj *in vitro* korena i samim tim produkciju određenih jedinjenja, dodavanjem odgovarajućih sastojaka poput elicitora, saharoze, fitohormona, gvožđe-nitrata itd. u medijum za *in vitro* kultivaciju (Sharma i sar., 1993; Momčilović i sar., 1997; Petrova i sar., 2011).



U sledećoj fazi istraživanja bavili smo se ispitivanjem antimikrobnog potencijala ekstrakata i konstituenata *G. lutea*. S obzirom na povećanje rezistencije mikroorganizama koji kontaminiraju hranu i dovode do njenog kvarenja ili do razvoja bolesti kod korisnika, veoma je bitno pronaći alternativnu strategiju za suzbijanje ovih problema. Jedan od načina jeste upravo ispitivanje antimikrobnog efekta biljnih derivata sa ciljem pronalaska agenasa prirodnog porekla sa potencijalom u prezervaciji hrane. U našem radu ispitan je antibakterijski efekat ekstrakata i konstituenata lincure prema odabranim sojevima, uzročnicima kvarenja hrane, kao i patogenim bakterijama. Na osnovu rezultata MIK testa, dobijena antibakterijska aktivnost plantažno gajenih ekstrakata lincure se može okarakterisati kao umerena do slaba. Generalno gledano, ekstrakti su pokazali jači antibakterijski efekat prema testiranim gram pozitivnim bakterijama, dok su gram negativne pokazale veći stepen rezistencije. Ovakav rezultat nije neuobičajen, uzimajući u obzir poznatu činjenicu da su gram negativne bakterije zbog građe u ćelijskom zidu rezistentnije od gram pozitivnih (Breijyeh i sar., 2020). Najosetljivijim su se pokazali sojevi *B. subtilis* i *E. faecalis* nakon tretmana GLL MeOH ekstraktom sa MIK vrednošću od 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Dobijeni rezultati se mogu smatrati obećavajućim, uzimajući u obzir činjenicu da su bakterije roda *Bacillus*, naročito vrsta *B. subtilis*, sposobne da izazovu kvarenje namirnica poput hleba (Thompson i sar., 1993), dok *E. faecalis* može biti odgovoran za kvarenje termički obrađenog mesa, jer je sposoban da preživi visoke temperature. Dodatno, bakterije roda *Enterococcus* mogu dovesti do intoksikacije hranom usled produkcije biogenih amina (Oprea i Zervos, 2007). Pregledom literature zaključuje se da je ograničen broj studija koje se bave ispitivanjem antimikrobnog efekta *G. lutea*. Jedno od istraživanja je ono sprovedeno od strane Šavikin i sar. (2009) koji su pokazali da metanolni ekstrakt lista lincure iz prirode ima znatno jači antibakterijski efekat prema širokom opsegu gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, sa MIK vrednostima u opsegu 0,12-0,31 mg mL<sup>-1</sup>, što je višestruko bolja aktivnost od one dobijene u našem radu. Dodatno, literaturni podaci ukazuju i na studije u kojima je ispitana antibakterijska aktivnost drugih vrsta roda *Gentiana*, uključujući *G. kurro* (Baba i Malik, 2014) i *G. asclepiadea* (Stefanović i sar., 2018), čiji su različito pripremljeni ekstrakti korena i listova ispoljili inhibitornu aktivnost prema određenim bakterijskim sojevima.

S druge strane, ekstrakti *in vitro* gajene lincure su pokazali nešto jači efekat, naročito prema sojevima *S. aureus* i *L. monocytogenes*, sa MIK vrednostima u opsegu od 0,156-0,625 mg mL<sup>-1</sup>. Imajući u vidu da je *S. aureus* glavni uzrok gastroenteritisa izazvanog konzumacijom hrane kontaminirane enterotoksinima (Le Loir i sar., 2003), dobijeni rezultati antistafilokokne aktivnosti *in vitro* ekstrata lincure mogu biti od značaja. Takođe, inhibicija rasta *L. monocytogenes* je jako značajna, s obzirom na činjenicu da je ova bakterija invazivni patogen, sposoban da preživi niske temperature i pH vrednosti. Ona kod ljudi izaziva listeriozu, najčešće kao posledicu konzumacije kontaminiranih mlečnih proizvoda ili nedovoljno kuvane hrane, ili kao rezultat kontaminacije opreme za preradu hrane, što dalje vodi i kontaminaciji proizvedenih namirnica (Gao i sar., 2019).

Antibakterijskoj aktivnosti su mogli doprineti ukupni fenoli i flavonoidi detektovani u ekstraktima, s obzirom da je poznato da fenolne kiseline, tanini i flavonoidi mogu inhibirati rast i aktivnost mnogih mikroorganizama. Baktericidni efekat fenolnih jedinjenja se ostvaruje kroz različite mehanizme, uključujući smanjenje fluidnosti ćelijske membrane, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina i ćelijskog zida (Takó i sar., 2020). Takođe, mnogi polifenoli ostvaruju sinergistički efekat sa konvencionalnim antibioticima, povećavajući tako njihovu efikasnost i redukujući primenjenu dozu antibiotika (Sanhueza i sar., 2017; Miklasińska-Majdanik i sar., 2018). U istraživanju koje su sporevili Taylor i sar. (2005) pokazano je da flavonoid katehin probija lipidnu barijeru ćelijske membrane što dovodi do „curenja“ intramembranskog materijala i agregacije lipozoma. Mori i sar. (1987) su u svojoj studiji pokazali potencijal flavonoida da inhibiraju sintezu DNK i RNK molekula, sugerišući da B prsten flavonoida ima ulogu interkalirajućeg agenasa, što sledstveno sprečava sintezu nukleinskih kiselina. Još jedan od mogućih mehanizama antibakterijske aktivnosti flavonoida koji predlažu

Ohemeng i sar. (1993) i Plaper i sar. (2003) podrazumeva inhibiciju enzima DNK giraze, što dovodi do smrti ćelije. Međutim, bez obzira na činjenicu da polifenoli doprinose antimikrobnom potencijalu, u našem radu jasna korelacija količine ukupnih polifenolnih jedinjenja i flavonoida sa antibakterijskom aktivnošću nije uočena, što navodi na činjenicu da su i konstituenti drugih hemijskih familija, u prvom redu iridoidne grupe jedinjenja, uključeni u ovu aktivnost.

U pokušaju da bliže analiziramo uočeni antibakterijski efekat ekstrakata i potencijalni udeo konstituenata, u sledećem koraku smo ispitali i antibakterijsku aktivnost odabranih čistih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je *L. monocytogenes* najosetljiviji soj, naročito nakon izlaganja mangiferinu i homoorientinu. Dodatno, sverozid, svertiamarin i izoviteksin su takođe ispoljili umereni antibakterijski efekat. Slični rezultati su dobijeni i u studijima Šavikin i sar. (2009), Samaddar i sar. (2013) i Adamczak i sar. (2019), u kojima je pokazan antimikrobni efekat mangiferina, svertiamarina, izoviteksina i homoorientina. Iako je efekat mangiferina prema *S. aureus* u našem istraživanju izostao, u studiji Mazlan i sar. (2019) pokazan je sinergizam mangiferina sa tetraciklinom, ampicilinom, nalidiksinskom kiselinom i baktrimom (sulfametoksazol i trimethoprim), što je sugerisalo da mangiferin potencijalno pospešuje ulaz antibiotika ili ometa ciljno mesto odgovorno za razvoj rezistencije, doprinoseći baktericidnom/bakteristatskom dejstvu leka. Zanimljivo je da su svi testirani sojevi pokazali rezistenciju prema gencio-pikrozidu, nasuprot podacima iz literature u kojima je detektovan njegov jak antimikrobni efekat prema paleti gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (Kumarasamy i sar., 2003; Šiler i sar., 2010). Uzimajući u obzir hemijski sastav ekstrakata kao i rezultate antibakterijske aktivnosti konstituenata, može se pretpostaviti da su najverovatnije različite interakcije između njih, uključujući i sinergističke, doprinele sveukupnoj antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata.

Imajući u vidu činjenicu da formiranje biofilma predstavlja veliki problem u različitim sferama života, uključujući i industriju hrane, sledeći deo ovog istraživanja bavio se ispitivanjem antibiofilm aktivnosti ekstrakata lincure i njihovih konstituenata. S obzirom da su patogeni mikroorganizmi sposobni da formiraju biofilm na površini hrane, opremi za proizvodnju i pakovanje hrane, kao i da su u formi biofilma 10 do 1000 puta rezistentniji na delovanje antimikrobnih agenasa (Shi i Zhu, 2009), neophodno je pronaći alternativni način kako bi se redukovale štetne posledice. Jedna od strategija u borbi protiv bakterija koje formiraju biofilm je inhibicija inicijalnog pričvršćivanja ćelija za površinu, što dalje sprečava kolonizaciju i razvoj infekcije (Francolini i Donelli, 2010). U našoj studiji ispitan je potencijal ekstrakata da sprečavaju formiranje biofilma bakterija koje su se pokazale najosetljivijim u MIK testu, tj. *S. aureus* i *L. monocytogenes*, jednih od najčešćih patogena hrane, odgovornih za pojavu infekcija kod čoveka (Qian i sar., 2020). Opšte gledano, ekstrakti su ispoljili značajno jači antibiofilm efekat prema *L. monocytogenes*. Kada je u pitanju *S. aureus*, najbolja aktivnost zabeležena je za GLL MeOH ekstrakt i to nakon primenjene inhibitorne koncentracije, dok su s druge strane GLL 50% EtOH, GLK 50% EtOH i GLL MeOH ekstrakti pokazali izvanredni potencijal da inhibiraju formiranje biofilma *L. monocytogenes* i na sub-inhibitornim koncentracijama. Potencijal ekstrakata da sprečavaju formiranje biofilma na koncentracijama nižim od inhibitorne je u skladu sa studijom koji su sprovedli Ding i sar. (2017), koja je pokazala da prirodni antimikrobni proizvodi na sub-inhibitornim koncentracijama mogu da poremete formiranje biofilma. Kada je u pitanju antibiofilm aktivnost biljnih derivata roda *Gentiana*, dosadašnja saznanja su veoma oskudna. Stefanović i sar. (2018) su detektovali antibiofilm aktivnost ekstrakata lista i korena *G. asclepiadea* prema *S. aureus* i *P. aeruginosa*, sa potencijalom da inhibiraju proces formiranja biofilma od 50%. Uočena antibiofilm aktivnost testiranih ekstrakata u našoj studiji se verovatno može objasniti činjenicom da pojedine biljne fenolne komponente, pa samim tim i ekstrakti bogati fenolima, mogu ispoljiti antibiofilm i/ili anti-QS (eng. *anti-quorum sensing*) efekte (Takó i sar., 2020). Fenolna jedinjenja sprečavaju formiranje biofilma inhibicijom različitih regulatornih mehanizama: blokirajući signalnu komunikaciju, redukujući

pokretljivost bakterija, smanjujući sposobnost adhezije, inhibirajući ekspresiju virulentnih faktora odgovornih za patogenost (Eydelnant i Tufenkji, 2008; Xu i sar., 2011; Borges i sar., 2012; Asfour, 2018). U istraživanju Lin i sar. (2011) pokazano je da taninska kiselina izolovana iz *Eustigma oblongifolium* inhibira formiranje biofilma *S. aureus* sprečavajući inicijalno pričvršćivanje za površinu i sintezu polisaharidnih intercelularnih adhezivnih komponenti. Takođe, treba imati u vidu i činjenicu da antimikrobni agensi prirodnog porekla na sub-inhibitornim koncentracijama poseduju mogućnost moduliranja transkripcije gena odgovornih za formiranje biofilma (Goh i sar., 2002; Yim i sar., 2011). Lee i sar. (2013) su pokazali da ekstrakt *Alnus japonica* bogat kvercetinom i taninskom kiselinom ispoljava snažan antibiofilm efekat prema *S. aureus*, snižavajući ekspresiju gena *icaA* i *icaD* iz *icaADBC* operona odgovornog za formiranje biofilma. S druge strane, glavni geni uključeni u inicijalno pričvršćivanje *L. monocytogenes* su povezani sa sintezom flagela i pokretljivošću (Chang i sar., 2012). Dodatno, pokazano je i da DnaK protein toplotnog šoka klase I doprinosi formiranju biofilma i toleranciji na sredstva za dezinfekciju kod *L. monocytogenes* (van der Veen i Abee, 2010). Upadhyay i sar. (2013) su u svom istraživanju pokazali da terpeni biljnog porekla (karvakrol, timol, eugenol, *trans*-cinamaldehyd) snižavaju ekspresiju gena *flaA*, *fliP*, *fliG*, *flgE*, *motA* i *motB*, odgovornih za inicijalno pričvršćivanje *L. monocytogenes*, kao i *dnaK* gena i *prfA* gena, transkripcionog aktivatora gena odgovornih za virulenciju.

Kako bi analizirali potencijalno učešće konstituenata lincure u uočenom antibiofilm efektu ekstrakata prema *L. monocytogenes*, ispitan je i potencijal konstituenata odabranih na osnovu rezultata MIK testa da inhibiraju formiranje biofilma. Sva testirana jedinjenja su ispoljila dozno-zavisni odgovor i na sub-inhibitornim koncentracijama sprečila formiranje biofilma u određenom procentu (23-47%). Na osnovu ovog rezultata, kao i na osnovu aktivnosti ekstrakata može se zaključiti da su testirana jedinjenja sposobna da inhibiraju stvaranje biofilma putem mehanizama koji ne podrazumevaju isključivo bakteriostatsko i baktericidno dejstvo prema ćelijama u planktonskom obliku. Najistaknutiji efekat je zabeležen za C-glukoflavone izoviteksin i homoorientin. Uzimajući u obzir hemijski sastav GLL 50% EtOH ekstrakta, koji je inhibirao formiranje biofilma *L. monocytogenes* za čak 90%, može se pretpostaviti da je za uočenu aktivnost verovatno odgovoran i antibiofilm potencijal C-glukoflavona. Treba uzeti u obzir i uočenu antibiofilm aktivnost sekoiridoida, najprisutnijih u GLK 50% EtOH ekstraktu, kao i sinergističko delovanje svih konstituenata prisutnih u ekstraktu. Što se tiče ekstrakata dobijenih od *in vitro* gajenih biljaka, oni su ispitivani u značajno manjim koncentracijama (određenim na osnovu njihovih manjih MIK vrednosti), a poređenje sa efektom odgovarajućih koncentracija MeOH ekstrakta lista plantažno gajene biljke, vednosti inhibicije su bile približne. Interesantno da je i koren *in vitro* gajene biljke pokazao solidnu antibiofilm aktivnost, iako procentualno učešće ispitivnih konstituenata nije bilo visoko. Ovo poslednje ukazuje na doprinos biološki aktivnih jedinjenja koja tek trebaju da budu identifikovana. Imajući u vidu navedene rezultate i činjenice koji se tiču antibiofilm aktivnosti, prethodna obrada različitih površina u industriji hrane preparatima na bazi biljnih derivata bi proizvela nepovoljnu adherentnu sredinu i samim tim mogla smanjiti učestalost infekcija uzrokovanih bakterijskim biofilmovima.

U sledećem delu ove doktorske disertacije bavili smo se proučavanjem antigenotoksičnih svojstava ekstrakata i odabranih konstituenata lincure prema IQ i PhIP mutagenima. Ovi mutageni se formiraju tokom pripreme hrane bogate proteinima na visokim temperaturama, pirolizom proteina, amino kiselina ili kreatinina, i mogu biti prisutni u ishrani čoveka u značajnim koncentracijama u zavisnosti od dijetetskih navika (Goldman i Shields, 2003), zbog čega je neophodno redukovati njihovo štetno dejstvo primenom različitih antimutagena. Da biološki aktivna jedinjenja biljnog porekla mogu redukovati genotoksičnost indukovanu ovim mutagenima potvrđuje rad Mitić-Ćulafić i sar. (2016), u kome je pokazana antigenotoksičnost pojedinih monoterpena. U našem radu je ispitan genoprotektivni potencijal korišćenjem bakterijskih i sisarskih *in vitro* modela.

Eksperimenti u kojima je korišćen bakterijski model sistem su urađeni u prisustvu i odsustvu S9 frakcije koja se koristi kako bi se oponašao metabolički sistem sisara. Na ovaj način omogućeno je razlikovanje direktne mutagene aktivnosti test supstanci i njihovih promutagenih svojstava (Mortelmans i Zeiger, 2000). Međutim, nedostatak bakterijskog modela za detekciju mutagena je odsustvo enzima za detoksifikaciju faze II u S9 frakciji poreklom od pacova (Winter i sar., 2008). Iz tog razloga genotoksična/antigenotoksička aktivnost test supstanci je ispitana i na metabolički aktivnim HepG2 ćelijama jetre koje sadrže sve neophodne enzime faze I i II za aktivaciju/detoksifikaciju različitih ksenobiotika (Mersch-Sundermann i sar., 2004). U našem istraživanju pokazana je dualna genotoksična/antigenotoksična priroda derivata *G. lutea*, koja je zavisila od korišćenog test sistema, a naročito od primenjenje koncentracije. Generalno gledano, pojedini ekstrakti i konstituenti su ispoljili genotoksični efekat pri visokim koncentracijama, dok je primenom nižih negenotoksičnih doza uočena značajna zaštita od IQ- i PhIP-indukovane genotoksičnosti.

Posmatrajući rezultate SOS/*umuC* testa, može se primetiti da je slabiji genotoksični efekat u odsustvu S9 frakcije ispoljio samo GLvK MeOH ekstrakt, pri najvišoj testiranoj koncentraciji. S druge strane, svi testirani ekstrakti su pri određenim koncentracijama nakon dodavanja S9 frakcije indukovali oštećenja na DNK molekulu, ukazujući na činjenicu da deluju kao potencijalni promutageni koji zahtevaju metaboličku aktivaciju. Međutim, rezultati ispitivanja genotoksičnosti na humanim HepG2 ćelijama su potvrdili značajan genotoksični efekat samo *in vitro* ekstrakata i GLL 50% EtOH ekstrakta. Dodatno, najviša testirana doza genciopikrozida je indukovala oštećenja na DNK molekulu. U skladu sa uočenim genotoksičnim potencijalom ekstrakata je i studija koju su sprovedi Patenković i sar. (2013), pokazujući ko-mutageni efekat ekstrakta korena lincure sa metil metanosulfonatom na modelu *Drosophila melanogaster*. Pregledom literature može se uočiti da su ekstrakti poreklom od drugih biljaka roda *Gentiana* takođe ispitani u pogledu njihove sposobnosti da izazivaju oštećenja na genetičkom materijalu. Genotoksični efekat ekstrakata poreklom od cvetova *G. asclepiadea* pokazali su Hudecová i sar. (2010), dok su Mihailović i sar. (2015) prijavili sposobnost ekstrakata listova *G. cruciata* da indukuju oštećenja na DNK molekulu. Uočena genotoksičnost ekstrakata, naročito GLvI MeOH ekstrakta bi mogla da se pripíše i određenim konstituentima i njihovom potencijalu da indukuju DNK oštećenja. Pokazana genotoksičnost genciopikrozida u našoj studiji ukazuje na mogući doprinos ovog jedinjenja u sveukupno uočenoj genotoksičnosti ekstrakata. Takođe, sposobnost sverozida, svertiamarina i loganske kiseline da povećavaju procenat DNK oštećenja, dokazana u istraživanju Sobot i sar. (2020), doprinosi objašnjenju genotoksičnog efekta ekstrakata dobijenog u našoj studiji. Međutim, treba imati u vidu da su ekstrakti kompleksne smeše i da pojediničane komponente najverovatnije ne doprinose same dobijenoj aktivnosti. S druge strane, odsustvo genotoksičnosti mangiferina pokazano u našem istraživanju je u skladu sa dostupnom literaturom. Reddeman i sar. (2019) su demonstrirali da ekstrakt lista manga, koji sadrži 60% mangiferina nije ispoljio genotoksični efekat u bakterijskom testu reverznih mutacija i u mikronukleus testu *in vivo* na miševima.

Prilikom ispitivanja genotoksičnosti mutagena u SOS/*umuC* testu, IQ nije uspeo da ispolji genotoksični efekat u opsegu testiranih koncentracija, tako da je testiranje antigenotoksičnosti prema njemu izostalo u ovom testu. Iako je IQ dobro izučen promutagen koji zahteva metaboličku aktivaciju (Goldam i Shields, 2003), u našem istraživanju nije uspešno aktiviran uprkos dodavanju S9 frakcije. S obzirom da je P450 (CYP1A2) enzim, odgovaran za metaboličku aktivaciju heterocikličnih aromatičnih amina (Kawaguchi i sar., 2018), prisutan u komercijalno nabavljenoj S9 frakciji, moguće objašnjenje odsustva aktivacije IQ mutagena leži u činjenici da humani enzimi jetre poseduju veću katalitičku efikasnost u odnosu na odgovarajuće enzime poreklom od jetre pacova (Turesky i sar., 1999).

Što se tiče antigenotoksičnog potencijala u komet testu, svi testirani ekstrakti i konstituenti lincure primenjeni u nižim, negenotoksičnim, dozama su ispoljili jaku zaštitu protiv IQ- i PhIP-

indukovanih oštećenja na DNK molekulu. U prilog našim rezultatima ide i prethodno objavljena studija koju su sprovedi Djukanovic i sar. (2019), u kojoj je pokazano postojanje genoprotektivnog efekta ekstrakata korena i lista plantažno gajene lincure prema veštačkom zaslađivaču saharinu. Slično našim rezultatima, ekstrakti *G. asclepiadea* su ispoljili protektivni efekat prema oksidativnom oštećenju indukovanom primenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hudecová i sar., 2012), kao i prema etil metanosulfonatu (Mihailović i sar., 2013). Matić i sar. (2013) su takođe pokazali potencijal ekstrakata podzemnih i nadzemnih delova *G. cruciata* da redukuju oštećenja na DNK molekulu izazvana delovanjem etil metansulfonata.

Otkriće da ekstrakti poseduju genotoksični potencijal s jedne strane, a ujedno pokazuju i antigenotoksičnu aktivnost primenjeni u nižim dozama, ukazuje na moguće postojanje fenomena označenog kao hormezis. Termin hormezis se duži niz godina upotrebljava kako bi se objasnila situacija u kojoj je određena supstanca sposobna da indukuje biološki suprotne efekte pri različitim koncentracijama. Najčešće dolazi do indukcije stimulativnog i korisnog odgovora pri nižim dozama i inhibitornog ili toksičnog efekta pri visokim dozama test supstanci (Dragičević i sar., 2003; Calabrese i Mattson, 2017). Tako je na primer poznato da je vitamin A u veoma niskim dozama esencijalan za normalan razvoj i funkciju oka, dok u većim dozama može izazvati glavobolje, pospanost, promenljiva mentalna stanja itd. (Hathcock i sar., 1990). Dalje objašnjenje ovog fenomena podrazumeva da test supstanca primenjena u nižim dozama indukuje blagi stres, što sledstveno dovodi do aktivacije signalnih puteva i unutrašnjih promena pružajući tako otpor jačem stresoru (Son i sar., 2008). Ovakav suprotni efekat zavisao od koncentracije nije neobičan kada su u pitanju prirodna jedinjenja. Dodatno, kriva odgovora u obliku slova „J“, dobijena u našoj studiji za ekstrakt GLVI MeOH u komet testu i za sve ekstrakte plantažno gajene lincure u SOS/*umuC* testu, gde se zaštitni efekat dobija pri niskim koncentracijama, a slaba zaštita ili odsustvo iste na višim primenjenim dozama, nije retka pojava kada je reč o studijama antimutagenoze (Knausmüller i sar., 2002). Rezultati studija Nikolić i sar. (2011; 2015) su takođe potvrdili postojanje hormezisa za monoterpene kamfor, eukaliptol i tujon, koji su ispoljili blagu genotoksičnost, ali su pri nižim dozama stimulisali DNK reparacione mehanizme i indukovali genoprotektivni efekat. Takođe, mnoge supstance sa genoprotektivnim efektom su označene kao „Janus“ mutageni, odnosno kancerogeni i mutageni agensi koji u zavisnosti od tipa ćelija ili doze mogu delovati kao antikancerogeni i antimutageni (von Borstel i Higgins, 1998). Uzimajući u obzir činjenicu da su uočeni i genotoksični i antigenotoksični efekti testiranih ekstrakata i konstituenata, kao i literaturne podatke o suprotnim efektima ekstrakata biljaka roda *Gentiana*, neophodno je biti oprezan prilikom tumačenja rezultata.

Dobijeni rezultati ukazuju da se uočeni antigenotoksični potencijal ekstrakata lincure može pripisati i pojedinačnim testiranim konstituentima. Iako količina mangiferina nije bila visoka u ekstraktima poreklom od nadzemnih delova biljaka, naši rezultati koji pokazuju genoprotektivni efekat mangiferina, kao i prethodno objavljena studija Rao i sar. (2009), u kojoj je demonstriran antigenotoksični efekat mangiferina prema kadmijum hloridu, nagoveštavaju potencijalni doprinos ovog konstituenta u uočenom protektivnom efektu. Takođe, antigenotoksični potencijal genciopikrozida, po prvi put pokazan u našoj studiji, je svakako doprineo sveukupnom genoprotektivnom efektu ekstrakata. Međutim, treba imati na umu i uticaj drugih konstituenata, kao i međusobne interakcije između njih. Dalje, uočeni genoprotektivni efekat se može objasniti i prisustvom polifenola u njima, naročito kada je reč o ekstraktima poreklom od nadzemnih delova biljke, bez obzira na način gajenja. Poznato je iz literaturnih podataka da polifenoli mogu ostvariti antigenotoksični efekat posredstvom različitih mehanizama. Tako je pokazano da su polifenolna jedinjenja sposobna da štite od različitih genotoksina posredstvom nekoliko mehanizama, od kojih su najčešći: (i) promene u nivou ekspresije enzima odgovornih za detoksifikaciju, (ii) povećanje ekspresije antioksidativnih enzima, (iii) interakcija sa DNK reparacionim i replikacionim procesima, (iv) direktna inhibicija formiranja DNK adukata, i (v) sakupljanje slobodnih radikala (Ferguson, 2001). Istraživanje koje su

sproveli Plazar i sar. (2007) je ukazalo na antigenotoksični efekat ksantohumola, flavonoida prisutnog u hmelju, prema IQ i B[a]P, koji se ostvaruje najverovatnije sprečavanjem metaboličke aktivacije promutagena inhibicijom citohrom P450 enzima i/ili aktivacijom antioksidativnih enzima kao i enzima odgovornih za detoksifikaciju. Zaštita od oksidativnih oštećenja je jedna od najšire opisanih osobina polifenola na kojoj se i bazira široka upotreba ovih jedinjenja. Pored sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, antioksidativna sposobnost polifenola se ogleda i u sprečavanju lipidne peroksidacije, kao i u helaciji metalnih jona poput bakra i gvožđa, koji mogu da iniciraju produkciju hidroksil radikala putem Haber-Weissove i Fentonove reakcije (Ferguson i sar., 2004). Takođe, određeni polifenoli mogu indukovati enzime faze II, kao što je glutation transferaza, koja doprinosi eliminaciji reaktivnih vrsta kiseonika ili indukuje aktivnost drugih antioksidativnih enzima poput metalotioneina, sposobnog da vezuje metale (Ferguson, 2001).

U sledećoj fazi ove doktorske disertacije ispitivali smo protektivni efekat ekstrakata lincure prema genotoksičnim efektima UV zračenja. Poslednjih godina, učestalost različitih bolesti i poremaćaja povezanih sa izloženošću UV zračenju se alarmanto povećala. Hronična izloženost sisarskih ćelija UV zračenju dovodi do mnogobrojnih bioloških odgovora, uključujući razvoj edema, opekotina, supresije imunskog odgovora, oštećenja DNK molekula, fotostarenja i melanogeneze. Sve ove promene su direktno ili indirektno uključene u nastanak kancera kože (Svobodová i sar., 2003). Jedan od pristupa u zaštiti od štetnih efekata UV zračenja jeste upotreba aktivnih fotoprotektivnih agenasa koji se inkorporiraju u proizvode za zaštitu i negu kože, dok se drugi pristup oslanja na antioksidativna svojstva biološki aktivnih nutrijenata koji se mogu koristiti kao dodatak ishrani ljudi, a koji se zasniva na činjenici da su oštećenja izazvana UV zračenjem u velikoj meri posledica oksidativnog stresa (Tebbe, 2001).

U našem radu ispitana je sposobnost ekstrakata da redukuju oštećenja izazvana delovanjem UVC i UVA zračenja na normalnim fibroblastima (MRC-5) i melanocitama (Hs 294T). Iako ozonski omotač efikasno apsorbuje UVC zračenje, ovaj tip zračenja odabran je u našim eksperimentima jer predstavlja najštetniji tip zračenja, ostvarujući jasan genotoksični i mutageni efekat u nekoliko *in vivo* i *in vitro* model sistema (Pfeifer i sar., 2005), pa može biti dobar model za analizu UV-protektivnog delovanja. Dodatno, u okviru spektra talasnih dužina UVC zračenja nalazi se i apsorpcioni spektar baza DNK molekula (260 nm), usled čega dolazi do direktnog oštećenja DNK molekula. S druge strane, skoro 95% UVA zračenja dospeva do zemlje i prodire duboko u epidermis i dermis kože, najčešće dovodeći do produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, što posledično može indukovati oštećenja na DNK molekulu, proteinima, lipidima i saharidima (Svobodová i sar., 2006).

Kao i u prethodnom delu ispitivanja antigenotoksičnog efekta ekstrakata, i u ovom delu najpre je bilo neophodno utvrditi necitotoksične i negenotoksične koncentracije biljnih ekstrakata. Iako su ranija istraživanja ukazala na potencijalni citotoksični efekat različitih ekstrakata korena i lista lincure (Balijagić i sar., 2012; Rodrigues i sar., 2019), naši ekstrakti uglavnom nisu ispoljili citotoksični efekat nakon tretmana obe ćelijske linije, sa izuzetkom GLL MeOH ekstrakta koji je na najvišim testiranim koncentracijama redukovao vijabilnost MRC-5 ćelija. Dalje, ispitivanje genotoksičnosti ekstrakata pokazalo je da ekstrakti nadzemnih delova lincure indukuju oštećenja na DNK molekulu pri visokim primenjenim dozama. Naročito je bio izražen efekat ekstrakta GLvI MeOH na obe ćelijske linije. Posmatrajući njegov hemijski sastav, moguće je da je genciopikrozid, koji je u ovom ekstraktu najzastupljeniji, doprineo uočenoj aktivnosti i na MRC-5 i Hs 294T ćelijama. Ovo je u skladu i sa prethodno diskutovanim rezultatima dobijenim na HepG2 ćelijama. Slični rezultati su dobijeni i u studiji Mustafayeva i sar. (2010), gde je takođe pokazana genotoksična aktivnost ove komponente, najverovatnije kroz indukciju oksidativnih oštećenja na DNK molekulu. Dodatno, prilikom diskusije dobijenih rezultata treba uzeti u obzir i moguće postojanje interakcija između pojedinačnih komponenti i njihovo potencijalno sinergističko delovanje.

U sledećem koraku bilo je neophodno uspostaviti sub-letalne doze UV zračenja koje indukuju dovoljno oštećenja na DNK molekulu i koje bi se koristile u testiranju antigenotoksičnosti. Na osnovu rezultata može se primetiti da su MRC-5 ćelije nešto manje osetljive na delovanje istih doza UVC i UVA zračenja u odnosu na Hs 294T ćelije. Jedno od mogućih objašnjenja jeste i činjenica da normalne melanocyte poseduju redukovanu sposobnost reparacije oksidativnih oštećenja i fotoprodukata nastalih delovanjem UV zračenja. Naime, Wang i sar. (2009) su pokazali u svom istraživanju da UVC i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukovana oštećenja DNK molekula dovode do znato veće stope mutacija u normalnim melanocitama nego u normalnim fibroblastima kože. Kada je reč o antigenotoksičnosti, svi ekstrakti su ispoljili značajan potencijal da redukuju oštećenja na DNK molekulu izazvana delovanjem UVC i UVA zračenja. Inhibicija UVC-indukovanog oštećenja je dostigla čak 78% na MRC-5 ćelijama, dok je na Hs 294T ćelijama najviši procenat inhibicije iznosio 71%. Kada je u pitanju UVA zračenje, zabeleženi su slični rezultati, pri čemu je na MRC-5 ćelijama inhibicija UVA-indukovanog oštećenja iznosila 64%, odnosno 69% na Hs 294T ćelijama. Nešto slabiji inhibicioni efekat je detektovan jedino u slučaju ekstrakata dobijenih od *in vitro* gajenih biljaka i UVC zračenja. Interesantno je da je u slučaju ekstrakata izdanka dobijena obrnuto proporcionalna zavisnost od primenjene koncentracije, dok je u slučaju ekstrakta korena efekat bio doznno zavistan.

Dobijen genoprotektivni efekat ekstrakata lincure je u skladu sa brojnim literaturnim podacima o aktivnosti biljaka i njihovih ekstrakata, naročito onih sa visokim antioksidativnim potencijalom, da redukuju oštećenja izazvana delovanjem UV zračenja. U istraživanju koje su sprovedi Almeida i sar. (2015) je dobijena jaka protektivna aktivnost ekstrakta lista pitomog kestena prema genotoksičnosti indukovanoj UVA zračenjem na humanim keratinocitama, pri čemu je uočena aktivnost povezana sa direktnom antioksidativnom aktivnošću ekstrakta. Najintenzivnije proučavani, u pogledu zaštite od UV zračenja, jesu polifenoli pronađeni u zelenom čaju. Pokazano je da ova jedinjenja štite protiv UV-indukovanih DNK oštećenja i apoptoze u humanim keratinocitama (Schwarz i sar., 2008). Ova zaštita je u korelaciji sa indukcijom sekrecije interleukina-12 (IL-12), implicirajući da je IL-12 bitan posrednik zaštitnih efekata polifenola zelenog čaja. Dodatno, lokalna primena polifenolske frakcije zelenog čaja je inhibirala stvaranje UV-indukovanog eritema kože, kao i formiranje DNK pirimidinskih dimera (Katiyar i sar., 2001). Kada je u pitanju *G. lutea*, podataka o njenoj UV-protektivnoj ulozi nema u dostupnoj literaturi. S druge strane, pokazana je radioprotektivna aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta korena lincure kao i mangiferina u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Menkovic i sar., 2010). U njihovom istraživanju, oralno konzumiran ekstrakt lincure je doveo do smanjenja citotoksičnosti izazvane X-zracima na normalnim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PMBC), a da pri tome osetljivost malignih ćelija na zračenje nije bila smanjena. Radioprotektivna aktivnost ekstrakata u ovoj studiji bila je pripisana i prisustvu mangiferina, a u prilog tome ide i istraživanje Song i sar. (2013). Naime, ovi autori su pokazali da je ekstrakt manga, bogat mangiferinom, uspešno smanjio proces starenja kože, inhibirao stvaranje bora i gubitak vlakna kolagena kod miševa, koji su konzumirali ekstrakt oralno. Iako je u našim ekstraktima poreklom od nadzemnih delova zabeležena manja količina mangiferina, može se pretpotaviti da je i on mogao doprineti uočenoj genoprotektivnoj aktivnosti.

Kao i u prethodnom delu istraživanja, treba obratiti pažnju na zavisnost ostvarenog genotoksičnog/antigenotoksičnog efekta ekstrakata od koncentracije, naročito kada je u pitanju GLvI MeOH ekstrakt. Može se primetiti da on daje antigenotoksični odgovor u obliku krive „J“ što ukazuje na postojanje hormezisa (Calabrese i Mattson, 2017), odnosno na sposobnost ekstrakata da i pri niskim koncentracijama indukuju oštećenja i ujedno stimulišu reparacione mehanizme, kojima se ispravljaju i oštećenja izazvana UV zračenjem. S druge strane, pri visokim koncentracijama ekstrakta raste stepen oštećenja DNK, što dovodi do zasićenja reparacionih mehanizama i za posledicu ima odsustvo protektivnog efekta. Šta više, GLvI MeOH ekstrakt je na većim koncentracijama bio genotoksičan.

Kako bi analizirali mehanizme ostvarenog antigenotoksičnog potencijala, a imajući u vidu da svi korišćeni mutageni indukuju oksidativni stres, ispitivana su i antioksidativna svojstva derivata lincure sa različitih aspekata. Što se tiče mutagena iz hrane IQ i PhIP, u prilog ovom ide i podatak da navedeni mutageni dovode i do oksidativnih oštećenja na molekulu DNK. Naime, kao što je već napomenuto, IQ i PhIP mutageni efekat ostvaruju putem dva mehanizma. Prvi podrazumeva aktivaciju mutagena kroz seriju reakcija koje uključuju citohrom P450, što dalje dovodi do stvaranja elektrofilnih derivata, kao što je nitrenijum jon koji se kovalentno vezuje za DNK formirajući DNK adukte i dovodeći do hromozomskih aberacija (Goldman i Shields, 2003). Drugi mehanizam ostvarivanja genotoksičnosti IQ i PhIP podrazumeva produkciju reaktivnih vrsta kiseonika, što vodi oksidativnom stresu (Najafzadeh i sar., 2009; Li i sar., 2013). Potencijal IQ i PhIP mutagena da dovode do oksidativnih oštećenja na DNK molekulu opravdava praćenje antioksidativnih svojstava test supstanci u ovoj fazi istraživanja. Treba uzeti u obzir i činjenicu da prilikom ko-tretmana, kada su HepG2 ćelije simultano izložene ekstraktima i mutagenima, ekstrakti mogu zaštititi ćelije od oksidativnih oštećenja na DNK molekulu direktnim sakupljanjem slobodnih radikala i heliranjem toksičnih jona metala (Anderson i sar., 2000). Dodatno, ekstrakti mogu ostvariti svoju antioksidativnu aktivnost i uticajem na unutrašnju antioksidativnu zaštitu, koja uključuje stimulaciju antioksidativnih enzima i endogenih antioksidanata. Naravno, nije isključena ni mogućnost direktne hemijske modifikacije mutagena u negenotoksične intermedijere, što bi moglo biti istraženo u budućnosti.

Visoki kapacitet GLL 50% EtOH, GLL MeOH i GLvI MeOH ekstrakata da neutrališu slobodne radikale, pokazan u DPPH testu, se može objasniti upravo većim procentom ukupnih polifenola u ovim ekstraktima. Dodatno, potvrđena je i sposobnost pojedinačnih konstituenata da sakupljaju DPPH radikale. Izuzetna aktivnost mangiferina u DPPH testu, pokazana u našem istraživanju, kao i umerena aktivnost izoviteksina, su u skladu sa literaturnim podacima (Wauthoz i sar., 2007; He i sar., 2016). Homoorientin je takođe ispoljio značajnu sposobnost neutralisanja slobodnih radikala i najverovatnije doprineo uočenoj aktivnosti pre svega GLL 50% EtOH ekstrakta u kome je i najzastupljeniji. S druge strane nešto umerenija aktivnost genciopikrozida dobijena u našem radu je u skladu sa radom Kumarasamy i sar. (2003). Može se pretpostaviti da potvrđena aktivnost loganske kiseline da neutrališe slobodne radikale u radu Abirami i sar. (2019) takođe utiče na sveukupnu aktivnost ekstrakata lincure, naročito GLL MeOH. Dodatna procena antioksidativne aktivnosti ekstrakata urađena je praćenjem redukcione sposobnosti, kao i inhibicije Fentonove reakcije kroz helaciju jona gvožđa. Naši rezultati ukazuju da ekstrakti *G. lutea*, pre svega nadzemnih delova biljke, ispoljavaju svoje antioksidativne aktivnosti i putem ova dva mehanizma. Rezultati FRAP testa su pokazali da su ekstrakti nadzemnih delova lincure, bez obzira na korišćen rastvarač i način gajenja, bili sposobni da redukuju feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) formu, ukazujući na njihov potencijal da inhibiraju oštećenja posredovana metalnim jonima povećanjem antioksidativnog kapaciteta. Precizniji podaci o redukcionalnoj sposobnosti su dobijeni u CUPRAC testu, u kome se absorbanca dobijenog obojenog produkta meri pri skoro fiziološkoj pH vrednosti, što je od značaja kada se imaju u vidu kiseli uslovi postignuti u FRAP testu (pH 3,6; Özyürek i sar., 2011). Nešto slabija sposobnost redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  jona u odnosu na pozitivnu kontrolu testa (vitamin E) je zabeležena za ekstrakte nadzemnih delova, dok su ekstrakti korenova pokazali značajno manju aktivnost u ovom testu. Dalje, imajući u vidu činjenicu da metalni joni mogu da izazovu lipidnu peroksidaciju, što posledično dovodi do produkcije slobodnih radikala i lipidnih peroksida (Selamoglu i sar. 2017), sposobnost supstanci da heliraju metalne jone je od velikog značaja. Kao i u prethodnim testovima procene antioksidativnosti, i u testu heliranja jona gvožđa ekstrakti GLL 50% EtOH, GLL MeOH i GLvI MeOH su ispoljili jaču aktivnost, potvrđujući činjenicu da su ukupni polifenoli odgovorni za uočene antioksidativne aktivnosti ekstrakata. Suprotno ovim, rezultati TBA testa su pokazali slab do umereni efekat ekstrakata lincure, ukazujući da ne mogu dobro da zaštite membrane ćelija od lipidne peroksidacije. Varijabilni rezultati dobijeni u prethodno navedenim



testovima i TBA testu bi mogli da se objasne činjenicom da je TBA test dizajniran za praćene lipofilnih antioksidanata, ali ne i hidrofilnih. Ovakvo zapaženje je u skladu sa „polarnim paradoksom“ koji su postulirali Porter i sar. (1989), kao i sa sličnim rezultatima studije Wangenstein i sar. (2004), u kojoj je pokazana jaka antioksidativna aktivnost ekstrakta korijandera u DPPH testu, ali ujedno i odustvo inhibicije lipidne peroksidacije.

Literaturni podaci ukazuju da suplementacija namirnicama različitim antioksidantima može biti efikasna mera za redukciju štetnih posledica heterocikličnih aromatičnih amina, poput IQ i PhIP. Tako je pokazano da fenolni antioksidanti poput katehina iz zelenog čaja, luteolina, kvercetina i kafeinske kiseline inhibiraju formiranje PhIP i MeIQx (Oguri i sar., 1998). Dodatno, Kurzawa-Zegota i sar. (2012) su u svojoj studiji pokazali jak protektivni efekat kvercetina i rutina protiv IQ i PhIP mutagena. Iako je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida približno dva puta manji u ekstraktima korenova, a i njihova se antioksidativna aktivnost pokazala slabijom, ipak se ne može isključiti doprinos ove grupe jedinjenja u uočenoj antigenotoksičnosti. Međutim, s obzirom na jak intezitet dobijenog genoprotektivnog efekta ovih ekstrakata, druge grupe bioaktivnih jedinjenja se takođe mogu smatrati odgovornim, što zahteva dodatna istraživanja.

U daljem radu, ispitana je sposobnost 50% vodeno-etanolnih ekstrakata lincure, kao i genciopikrozida i mangiferina da posreduju u enzimskoj odbrani, praćenjem uticaja test supstanci na ekspresiju Nrf2 transkripcionog faktora. Pored direktne antioksidativne aktivnosti koja se ogleda u sakupljanju i neutralizaciji reaktivnih vrsta kiseonika, postoje i indirektni antioksidanti čija aktivnost podrazumeva aktivaciju Nrf2-ARE signalnog puta (Hybertson i sar., 2019). Ovaj signalni put je jedan od glavnih mehanizama ćelijske odbrane od oksidativnog oštećenja, u kome se aktivirani Nrf2 faktor vezuje za ARE elemente (eng. *antioxidant response elements*), prisutne u promoterskim regionima mnogih antioksidativnih gena. Ovo posledično dovodi do ekspresije mnogih citoprotektivnih enzima, uključujući hem oksigenazu-1, NAD(P)H hinon oksidoreduktazu, glutamat-cisteinsku ligazu i dr. (Nguyen i sar., 2009; Liang i sar., 2019). Naši rezultati su pokazali da GLL 50% EtOH, mangiferin i naročito genciopikrozid povećavaju ekspresiju Nrf2 faktora, što ukazuje na mogući doprinos ovog efekta u uočenoj antigenotoksičnosti.

Dodatno, Nrf2-ARE signalni put ne kontroliše samo redoks homeostazu, već je uključen i u zaštitu ćelija od elektrofilnih stresora, stimulišući enzime za detoksifikaciju faze I i II, kao i transportere za efluks faze III, čime se umanjuju elektrofilna oštećenja na DNK molekulu (Bai i sar., 2016). Na primer, pokazano je da je glutation S-transferaza, enzim koji pripada superfamiliji metaboličkih enzima faze II, pozitivno regulisan Nrf2 transkripcionim faktorom (Hayes i Dinkova-Kostova, 2014). Imajući u vidu činjenicu da i IQ i PhIP zahtevaju obradu putem metaboličkih enzima, kao i da je jedan od mehanizama njihove genotoksičnosti upravo produkcija elektrofilnih derivata koji oštećuju DNK (Sugimura i sar., 2004), detektovana antigenotoksičnost GLL 50% EtOH, genciopikrozida i mangiferina bi dodatno mogla da se pripíše i povećanoj aktivnosti ovih enzima. Regulacija ekspresije Nrf2-ARE signalnog puta od strane biljnih supstanci je već zabeležena u literaturi. Pokazano je da izoflavoni, grupa flavonoida raznovrsnih bioloških aktivnosti, štiti HepG2 ćelije od oksidativnog stresa izazvanog delovanjem *tert*-butil hidropersida, upravo stimulišući ekspresiju Nrf2 transkripcionog faktora i posledično indukujući aktivaciju citoprotektivnih enzima (Liang i sar., 2019). Slični rezultati su dobijeni i u studiji Zhai i sar. (2013), u kojoj je pokazano da je izoflavon genistein povećao ekspresiju hem-oksigenaze-1 i katalitičke subjedinice glutamat-cisteinske ligaze kroz aktivaciju Nrf2-ARE signalnog puta, redukujući tako oksidativna oštećenja nastala delovanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u Caco-2 ćelijama. Hybertson i sar. (2019) su u svom istraživanju pokazali da dijetetski suplement sastavljen od ekstrakata ruzmarina, ašvagande i japanskog bagrema stimuliše ekspresiju Nrf2 faktora, što dovodi i do pozitivne regulacije citoprotektivnih enzima i zaštite HepG2 ćelija od oksidativnog stresa.

Kako bi dobili što bolji uvid u celokupni oksidativni status HepG2 ćelija nakon individualnih tretmana 50% EtOH ekstraktima, genciopikrozidom i mangiferinom, kao i nakon ko-tretmana derivatima lincure sa IQ i PhIP mutagenima, analiziran je sadržaj i odnos redukovano (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa u ćelijama. GSH predstavlja glavni vid neenzimske antioksidativne zaštite u ćeliji, redukujući različite perokside, hidroperokside i radikale. Nakon neutralizacije reaktivnih vrsta koja uključuje oksidaciju redukovano glutationa, tj. prevođenje GSH u GSSG (dejtstvom glutation peroksidaze), dolazi do obrnutog procesa: GSSG se glutation reduktazom redukuje do GSH, koji je ponovo spreman da odgovori na oksidativni stres i neutrališe oksidante (Mytilineou i sar., 2002). Zbog toga je veoma bitno da u ćeliji postoji dobar odnos GSH/GSSG. Ozbiljno trošenje GSH ostavlja ćelije osetljivijim na oksidativna oštećenja izazvana dejstvom radikala i povećava tiolaciju proteina ili oksidaciju tiolne grupe, što može dovesti do disbalansa u nivou kalcijuma u ćeliji. Stalni porast nivoa kalcijuma može prouzrokovati oštećenje citoskeleta, što dovodi do smrti ćelije (Castell i sar., 1997). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su IQ i naročito PhIP doveli do značajnog trošenja redukovano glutationa i ujedno do povećanja količine GSSG. S druge strane, testirane biljne supstance su neznatno smanjile odnos GSH/GSSG u odnosu na kontrolu, s tim što efekat nije bio statistički značajan. Ovakva aktivnost nije neobična, s obzirom da je u literaturi zabeleženo da pojedini polifenoli, kao što je ruzmarinska kiselina, snižavaju količinu GSH, što potencijalno ukazuje na pro-oksidativni efekat ovih jedinjenja (Lima i sar., 2006). S druge strane, kombinovani tretmani biljnim supstancama i mutagenima su značajno doprineli zaštiti od trošenja redukovano glutationa. Ovaj efekat je naročito izražen za snažnije antioksidante i/ili regulatore ekspresije Nrf2 faktora, kao što su GLL 50% EtOH, genciopikrozid i mangiferin. Slični rezultati su dobijeni u istraživanju Alía i sar. (2006), u kojem je pretretman HepG2 ćelija kvercetinom potpuno sprečio trošenje GSH uzrokovano dejstvom *tert*-butil hidroperoksida.

Da bi analizirali antigenotoksični efekat biljnih ekstrakata prema UV zračenju, bitno je napomenuti da mehanizmi njegovog genotoksičnog delovanja, pored fotoprodukata, nastalih usled direktnog delovanja UVC zračenja, nastaju i brojna oksidativna oštećenja DNK. Pereira i sar. (2009) su u svom radu primenom modifikovanog komet testa demonstrirali da se stepen oštećenja DNK molekula povećava u UVC ozračenim ćelijama (fibroblasti pluća hrčka, V79) inkubiranim sa enzimima Fpg i Endo III koji prepoznaju oksidovane purine i pirimidine, ukazujući tako na potencijal UVC zračenja da indukuje oksidativna oštećenja. S obzirom da oba tipa UV zračenja korišćena u ovoj studiji mogu uzrokovati oksidativni stres, suplementacija antioksidantima kroz namirnice ili njihova topikalna aplikacija može zaštititi ćelije od indukcije patoloških stanja poput fotostarenja i kancera kože (Inal i Kahraman, 2000). Uzimajući u obzir rezultate ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata u hemijskim testovima, možemo da pretpostavimo da je jedan od mehanizama kojim se ostvaruje antigenotoksičnost ekstrakata upravo njihova sposobnost da deluju kao primarni antioksidanti. Efekat antioksidanata na DPPH radikal se ostvaruje kroz njihovu sposobnost doniranja vodonika. Iako je u našem radu zabeležen nešto manji nivo sposobnosti neutralisanja DPPH radikala ekstraktima lincure u odnosu na askorbinsku kiselinu, ipak se može zaključiti da ekstrakti, pre svega poreklom od nadzemnih delova biljaka, poseduju proton-donirajuću sposobnost i da mogu inhibirati slobodne radikale. Dalje, dokazana sposobnost ekstrakata da heliraju jone gvožđa doprinosi svakako uočenom genoprotektivnom efektu, s obzirom da se na taj način sprečava početak lipidne peroksidacije koja može biti indukovana delovanjem UV zračenja (Pereira i sar., 2009). Treba uzeti u obzir i prisustvo polifenolnih jedinjenja u ekstraktima; naime, i oni mogu sprečiti nastanak UV-indukovanih slobodnih radikala i lipidnu peroksidaciju, redukujući tako štetne efekte ovog zračenja. Na primer, pokazano je da kvercetin suplementiran *in vivo* na pacovima štiti antioksidativni sistem kože, stimulišući aktivnost glutation peroksidaze, glutation reduktaze, katalaze i superoksid dismutaze od oštećenja izazvanih UVA zračenjem (Inal i sar., 2001). Takođe, u *in vitro* uslovima, kvercetin i njegovi derivati su uspešno

inhibirali UVC-indukovanu lipidnu peroksidaciju (Saija i sar., 2003). Veza između antioksidativne i UV-protektivne aktivnosti je takođe pokazana za ekstrakte borovnice. Svobodová i sar. (2008) su demonstrirali protektivni efekat ekstrakata borovnice prema UVA zračenju na keratinocitama, objašnjavajući ga sposobnošću ekstrakta da inhibira UV-indukovanu lipidnu peroksidaciju, kao i da smanji potrošnju GSH u ćelijama. Slični rezultati su dobijeni u istraživanju Calò i sar. (2014) u kome je uočen UVA i UVB protektivni efekat vodenog ekstrakta borovnice na keratinocitama pretretiranim ekstraktom. Dodatno, ekstrakt borovnice bogat polifenolima i antocijaninima je uspešno neutralisao slobodne radikale, inhibirao lipidnu peroksidaciju i redukovao UVA-indukovanu apoptozu.

S obzirom da su ekstrakti korenova lincure u našem radu pokazali slab do umeren antioksidativni efekat, moguće je da ostvaruju svoju UV-protektivnu ulogu posredstvom drugih mehanizama. Jedan od mogućih mehanizama zaštite od UV zračenja jeste sposobnost protektivnih agenasa da apsorbuju UV zračenje. Poznato je da mnogi biljni sekundarni metaboliti deluju kao „UV blokatori“ koji poseduju mogućnost apsorpcije UV zračenja, štiteći tako biljke od štetnih efekata zračenja (Saewan i Jimtaisong, 2015). Objavljeni rezultati studije Pereira i sar. (2009) upravo ukazuju na potencijalnu mogućnost ekstrakata tri antarktičke biljne vrste da vrše apsorpciju UVC zračenja. S druge strane, možemo pretpostaviti da je usled pretremana ćelija ekstraktima jedan od mogućih mehanizama genoprotektivnog efekta i stimulacija ekspresije gena uključenih u mehanizme reparacije, pre svega u nukleotidnu ekscizionu reparaciju (NER), kako bi se što bolje ispravila oštećenja indukovana UV zračenjem. U ranijim istraživanjima je pokazano da saponini, glikozidi izolovani iz biljke *Tribulus terrestris*, u humanim keratinocitama stimulišu ekspresiju XPA i XPC gena, ključnih u NER-u (Sisto i sar., 2012). Takođe, polifenoli iz zelenog čaja su uspešno stimulisali NER i snizili procenat UVB-indukovanih fotoprodukata u fibroblastima tretiranim ovim jedinjenjima (Katiyar, 2011). Imajući u vidu činjenicu da su antimutageni podeljeni u dve velike kategorije (Kada i sar., 1986; De Flora, 1998), možemo reći da ekstrakti svakako pripadaju grupi dezmutagena, s obzirom na njihovu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala. Takođe, ne treba isključiti mogućnost delovanja ekstrakata kao bioantimutagena kroz modulaciju i stimulaciju reparativnih mehanizama ćelije, što zahteva dodatna istraživanja. Činjenica da je ljudska koža stalno izložena UV zračenju, što dovodi do raznih patobioloških ćelijskih promena, dodatno stimuliše ovakva istraživanja. Zbog toga, neophodno je razumeti molekularne mehanizme nastanka UV-indukovanih oštećenja i protektivne aktivnosti biološki aktivnih jedinjenja, kako bi se što uspešnije osmišljavale i formulisale nove terapijske strategije. Upravo sekundarni metaboliti biljaka predstavljaju odlične kandidate za primenu u prevenciji štetnih efekata UV zračenja.

Posmatrajući rezultate ove doktorske disertacije, možemo na kraju konstatovati da ispitivani ekstrakti *G. lutea* poseduju solidan antibakterijski efekat, kao i izvanredan antigenotoksični potencijal prema mutagenima iz hrane i UV zračenju. Imajući to u vidu, mogu se preporučiti za dalja istraživanja kao potencijalni prirodni konzervansi hrane, dijetetski suplementi, kao i mogući dodaci proizvodima za zaštitu od UV zračenja. Međutim, uočena dualna genotoksična/antigenotoksična aktivnost ekstrakata iziskuje oprez prilikom odabira rastvarača i naročito koncentracija ekstrakata, u cilju njihove bezbedne upotrebe u različitim oblastima. Na kraju, treba istaći i činjenicu da su ekstrakti *in vitro* gajene lincure pokazali značajne biološke aktivnosti. S obzirom na veliku potražnju za ovom biljnom vrstom, *in vitro* produkovani materijal lincure takođe može predstavljati značajan izvor farmakološki bitnih jedinjenja.

## 6. Zaključci

Dobijeni rezultati su ukazali na ispunjenost postavljenih ciljeva i omogućili izvođenje sledećih zaključaka:

1. Uspešno je uspostavljena *in vitro* kultura lincure (*Gentiana lutea* subsp. *symphiandra* (Murb.) Hayek) i dobijen je kvalitetan biljni materijal za ekstrakciju.
2. Ekstrahovani su koren i list plantažno gajene *G. lutea* primenom 100% metanola i 50% vodeno-etanolnog rastvora, kao i koren i izdanak *in vitro* gajene biljke primenom 100% metanola.
3. Kvantitativnom analizom ekstrakata pomoću UPLC-PDA MS/MS je utvrđeno da je genciopikrozid dominantan u korenu, sa najvećim udelom u 50% vodeno-etanolnom ekstraktu (5,1%), ali i u metanolnom ekstraktu *in vitro* izdanka (11,4%). S druge strane, homoorientin (3,9%) i izoviteksin (3%), odnosno loganska kiselina (1,8%), bili su najzastupljenije komponente lista u 50% vodeno-etanolnom, odnosno metanolnom ekstraktu. Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida bio je skoro dva puta veći u nadzemnim delovima biljke, a najveći prinosi su dobijeni ekstrakcijom iz lista, primenom 50% vodeno-etanolnog rastvora (53,4 mg GEK g<sup>-1</sup>, odnosno 20,7 mg QEK g<sup>-1</sup>).
4. Mikrodilucionni test je pokazao znatno veću osetljivost gram pozitivnih bakterija, a najosetljivije su bile *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* i to na ekstrakte dobijene od *in vitro* gajenih biljaka (opseg MIK i MBK vrednosti je iznosio 0,156-0,625, odnosno 0,625-2,5 mg mL<sup>-1</sup>). Dodatno, *L. monocytogenes* je pokazala najveću osetljivost i prema konstituentima lincure, a detektovane MIK vrednosti bile su 15,6-62,5 µg mL<sup>-1</sup> za mangiferin i homoorientin, i 250 µg mL<sup>-1</sup> za sverozid, svertiamarin i izoviteksin.
5. Potencijal sprečavanja formiranja biofilma bio je umeren u slučaju *S. aureus*, pri čemu je najveća inhibicija (27,9%) zabeležena za metanolni ekstrakt lista, odnosno snažan u slučaju *L. monocytogenes*, kod koje je inhibicija išla do čak 90%, što je detektovano za 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista. Efekat konstituenata u istom testu primenjenom na *L. monocytogenes* je bio najizraženiji za homoorientin (57,6%), a zatim slede izoviteksin (50,6%), mangiferin (46%), svertiamarin (37,2%) i sverozid (28,2%).
6. Ispitivanje genotoksičnosti/antigenotoksičnosti prema PhIP mutagenu u SOS/*umuC* testu je ukazalo na fenomen hormezis, tj. ekstrakti su imali genotoksični efekat na višim, odnosno protektivni u slučaju nižih primenjenih koncentracija. U prisustvu S9 frakcije svi testirani ekstrakti su bili genotoksični, dok je u njenom odsustvu taj efekat uočen samo za koren *in vitro* gajene lincure. Sa druge strane, antigenotoksični efekat prema PhIP mutagenu je detektovan za sve ekstrakte, a najbolji je bio u slučaju plantažno gajenih listova (inhibicije od 85% za 50% vodeno-etanolni i 83% za metanolni ekstrakt).
7. Primena alkalnog komet testa na ćelijama hepatokarcinoma (HepG2) je pokazala da 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista, oba ekstrakta *in vitro* gajene biljke i genciopikrozid ispoljavaju genotoksičnost na višim koncentracijama, ali i antigenotoksičnost prema mutagenima iz hrane na nižim dozama (maksimalne inhibicije su iznosile 42-68% za IQ, odnosno 48-70% za PhIP), što takođe ukazuje na hormezis. S druge strane, oba ekstrakta korena plantažne biljke, metanolni ekstrakt lista i mangiferin su, u opsegu testiranih koncentracija, pokazali samo antigenotoksični efekat, sa najvećim inhibicijama IQ- i PhIP- indukovane genotoksičnosti (68% i 78%) dobijenim primenom metanolnog ekstrakta korena plantažno gajene biljke.
8. Za potrebe testiranja UV-protektivnog efekta, određene su genotoksične doze UVC i UVA zračenja u eksperimentalnom modelu alkalnog komet testa na humanim fibroblastima (MRC-5)

- i ćelijama melanoma (Hs 294T), i one su za obe ćelijske linije iznosile  $63 \text{ J m}^{-2}$ , odnosno  $3 \text{ J cm}^{-2}$ .
9. Analiza genotoksičnosti ekstrakata na MRC-5 i Hs 294T ćelijama je ukazala na genotoksičnost pri najvišim testiranim koncentracijama po sledećem obrascu: 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista i ekstrakt *in vitro* izdanka na obe ćelijske linije, ekstrakt *in vitro* korena na MRC-5 i metanolni ekstrakt lista plantažno gajene biljke na Hs 294T ćelijskoj liniji.
  10. Evaluacija UV-protektivnog potencijala je ukazala da je najbolja antigenotoksičnost u slučaju UVC zračenja postignuta sa ekstraktima korena plantažno gajene biljke (inhibicija od 78% za oba ekstrakta na MRC-5 ćelijama, odnosno 71% za metanolni ekstrakt na Hs 294T ćelijama). Sa druge strane, najefikasnijim u redukciji UVA-indukovanih oštećenja na MRC-5 ćelijama se pokazao 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista (65%), dok je na Hs 294T ćelijama ekstrakt korena *in vitro* gajene biljke bio najuspešniji (69%).
  11. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata i konstituenata primenom testova DPPH, TBA, FRAP, CUPRAC i heliranja jona gvožđa pokazalo je znatno veću aktivnost ekstrakata nadzemnih delova biljke, bez obzira na način gajena i primenjeni test. 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista se pokazao najboljim u DPPH, FRAP i testu heliranja jona gvožđa ( $EC_{50}$  vrednosti su iznosile  $27,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $137,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $485,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), dok je metanolni ekstrakt lista bio najuspešniji u CUPRAC testu ( $EC_{50}=277 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i inhibiciji lipidne peroksidacije (35,6% sa najvećom testiranom koncentracijom). Dodatno, testiranje konstituenata primenom DPPH testa je izdvojilo mangiferin kao najaktivniji ( $EC_{50}=0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).
  12. Praćenje uticaja 50% vodeno-etanolnih ekstrakata, genciopikrozida i mangiferina na ekspresiju Nrf2 transkripcionog faktora, odgovornog za regulaciju enzima antioksidativne zaštite, u HepG2 ćelijama je ukazalo na sposobnost svih test supstanci da povećavaju njegovu ekspresiju, pri čemu je najizraženiji efekat detektovan za genciopikrozid.
  13. Analiza sadržaja i odnosa GSH/GSSG u HepG2 ćelijama, koja odslikava opšti oksidativni status, je ukazala na značajnu potrošnju GSH nakon tretmana sa IQ i PhIP, ali i sposobnost njegove regeneracije u slučaju ko-tretmana ovim mutagenima i 50% vodeno-etanolnim ekstraktima, odnosno konstituentima genciopikrozidom i mangiferinom. Najuspešniji su bili genciopikrozid u slučaju IQ, odnosno 50% vodeno-etanolni ekstrakt lista i mangiferin u slučaju PhIP, uspevši da količinu GSH vrate na nivo netretirane kontrole.
  14. Imajući u vidu rezultate ove doktorske disertacije, može se zaključiti da i metanolni i 50% vodeno-etanolni ekstrakti *G. lutea* ispoljavaju dobar antibakterijski efekat i odličan genoprotektivni efekat prema mutagenima iz hrane, kao i prema UV zračenju, te se mogu preporučiti za dalju analizu u cilju dobijanja potencijalnih prirodnih dijetetskih suplemenata i UV-protektivnih agenasa. Dodatno, zapažanje da ekstrakti *in vitro* gajene lincure takođe ispoljavaju značajnu biološku aktivnost, ukazuje da ovaj vid gajenja može predstavljati siguran način za dobijanje zdravog biljnog materijala za izolaciju bitnih farmakološki aktivnih jedinjenja.

## 7. Literatura

- Aberham, A., Schwaiger, S., Stuppner, H., Ganzera, M., 2007. Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthenes and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS. *J Pharm Biomed Anal.*, 45, 437-442.
- Abirami, A., Sinsinwar, S., Rajalakshmi, P., Brindha, P., Rajesh, Y. B., Vadivel, V., 2019. Antioxidant and cytoprotective properties of loganic acid isolated from seeds of *Strychnos potatorum* L. against heavy metal induced toxicity in PBMC model. *Drug Chem. Toxicol.*, 1-11.
- Adamczak, A., Ożarowski, M., Karpiński, T. M., 2020. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *J. Clin. Med.*, 9, 109.
- Afaq, F., Mukhtar, H., 2002. Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin Pharmacol Physiol*, 15, 297-306.
- Aiello, N., Bontempo, R., Vender, C., 2013. Use of morphological features and amarogentin content for characterization of wild yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) populations in north-east Italy. *Acta Bot Gallica.*, 160, 33-41.
- Alekperov, U. K., 2002. Plant antimutagens and their mixtures in inhibition of genotoxic effects of xenobiotics and aging processes. *Eur J Cancer Prev*, 11, 8-11.
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B., Bravo, L., Goya, L., 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol App Pharmacol*, 212, 110-118.
- Almeida, I. F., Pinto, A. S., Monteiro, C., Monteiro, H., Belo, L., Fernandes, J., Bento, A. R., Duarte, T. L., Garrido, J., Bahia, M. F., Sousa Lobo, P. C., Costa, P. C., 2015. Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. *J Photochem Photobiol*, 144, 28-34.
- Alonso, A. N., Perry, K. J., Regeimbal, J. M., Regan, P. M., Higgins, D. E., 2014. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *PloS one*, 9, e113696.
- Anderson, R. F., Amarasinghe, C., Fisher, L. J., Mak, W. B., Packer, J. E., 2000. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Radic. Res.*, 33, 91-103.
- Anter, J., Romero-Jiménez, M., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, A., Muñoz-Serrano, A., 2011. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J. Med. Food*, 14, 276-283.
- Antolak, H., Kregiel, D., 2017. Food preservatives from plants. *InTech*: Berlin, Germany, 45-85.
- Aprotosoai, A. C., Luca, V. S., Trifan, A., Miron, A., 2019. Antigenotoxic potential of some dietary non-phenolic phytochemicals. In: Atta-ur-Rahman (eds.), *Studies in natural products chemistry*, vol. 60, Elsevier, 223-229.
- Arima, H., Ashida, H., Danno, G. I., 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 1009-1014.
- Asfour, H. Z., 2018. Anti-quorum sensing natural compounds. *J Microsc Ultrastruct*, 6, 1.

- Atlı Şekeroğlu, Z., Akar, A., Şekeroğlu, V., 2013. Evaluation of the cytogenotoxic damage in immature and mature rats exposed to 900 MHz radiofrequency electromagnetic fields. *Int J Rad Bio*, 89, 985-992.
- Azman, N. A., Gordon, M. H., Skowrya, M., Segovia, F., Almajano, M. P., 2015. Use of lyophilised and powdered *Gentiana lutea* root in fresh beef patties stored under different atmospheres. *J Sci Food Agric*, 95, 1804-1811.
- Baba, S. A., Malik, S. A., 2014. Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of methanolic extracts of *Gentiana kurroo* royle. *Saudi J. Biol. Sci.*, 21, 493-498.
- Bacanlı, M., Başaran, A. A., Başaran, N., 2015. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chem. Toxicol.*, 81, 160-170.
- Bai, X., Chen, Y., Hou, X., Huang, M., Jin, J., 2016. Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters. *Drug Metab. Rev.*, 48, 541-567.
- Balijagić, J., Janković, T., Zdunić, G., Bošković, J., Šavikin, K., Gočevac, D., Stanojković, T., Jovančević, M., Menković, N., 2012. Chemical profile, radical scavenging and cytotoxic activity of yellow Gentian leaves (*Genitaneae luteae folium*) grown in northern regions of Montenegro. *Nat Prot Commun.*, 7, 1934578X1200701119.
- Bakkiyaraj, D., Nandhini, J. R., Malathy, B., Pandian, S. K., 2013. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling*, 29, 929-937.
- Barbaro, M., Giovanardi, R., Rossano, I., Cividino, S., 2009. Produttività di popolazioni spontanee di *Gentiana lutea* subsp. *symphyandra* (Murb.) Hayek e popolazioni coltivate di *Gentiana lutea* subsp. *lutea* L. Sviluppo della filiera produttiva della genziana maggiore in Friuli-Venezia Giulia n, 21, 51-68.
- Belić, M., Zdravković-Korać, S., Janošević, D., Savić, J., Todorović, S., Banjac, N., Milojević, J., 2020. Gibberellins and light synergistically promote somatic embryogenesis from the *in vitro* apical root sections of spinach. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 142, 537-548.
- Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 724-732.
- Bhattacharya, S., 2011. Natural antimutagens: a review. *Res. J. Med. Plant*, 5, 116-126.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M. F., 2004. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 52, 5195-5200.
- Borges, A., Saavedra, M. J., Simões, M., 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, 28, 755-767.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., Karaman, R., 2020. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25, 1340.
- Byarugaba, D. K., 2010. Mechanisms of antimicrobial resistance. In: *Antimicrobial resistance in developing countries*, Springer, New York, NY, 15-26.

- Calabrese, E. J., Mattson, M. P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ Aging Mech of Dis*, 3, 1-8.
- Calò, R., Marabini, L., 2014. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA-and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *J Photochem Photobiol*, 132, 27-35
- Cao, J., Liu, X., Hao, J., Zhang, X., 2005. Tissue culture and plantlet regeneration of *Gentiana macrophylla*. *Acta Bot. Sin.*, 25, 1101.
- Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X., Bort, R., 1997. *In vitro* investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. In: Seiler J. P., Vilanova E. (eds.), vol. 19, *Applied toxicology: approaches through basic science*, Springer, Berlin, Heidelberg, 313-321.
- Catană, R., Holobiuc, I., Mitoi, M., 2017. The antioxidant properties of *Gentiana lutea* root cultures. *AgroLife Sci. J.*, 6, 51-57.
- Chang, Y., Gu, W., Fischer, N., McLandsborough, L., 2012. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, 2051-2062.
- Chen, L., Hu, J. Y., Wang, S. Q., 2012. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol*, 67, 1013-1024.
- Chiu, C. P., Yang, D. Y., Chen, B. H., 1998. Formation of heterocyclic amines in cooked chicken legs. *J. Food Prot*, 61, 712-719.
- Cho, H. S., Lee, J. H., Cho, M. H., Lee, J., 2015. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. *Biofouling*, 31, 1-11.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., 2000. Natural products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry and molecular biology of plants*, vol. 24, 1250-1319.
- Cvetković, S., Todorović, S., Nastasijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Đukanović, S., Knežević-Vukčević, J., Nikolić, B., 2020a. Assessment of genoprotective effects of *Gentiana lutea* extracts prepared from plants grown in field and *in vitro*. *Ind Crops Prod*, 154, 112690.
- Cvetković, S., Nastasijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Đukanović, S., Tenji, D., Knežević-Vukčević, J., Nikolić, B., 2020b. New insight into antigenotoxic activity of *Gentiana lutea* extracts – Protective effect against food borne mutagens. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 858-860, 503251.
- Cvetković, S., Nastasijević, B., Đukanović, S., Mitić-Ćulafić, D., Knežević-Vukčević, J., Marković, T., Radanović, D., Nikolić B., 2018. Antibacterial and cytotoxic potential of *Gentiana lutea* root and leaf extracts. 6<sup>th</sup> Workshop of Specific Methods for Food Safety and Quality, Belgrade, Serbia, Proceedings, ISBN 978-86-7306-148-1, 171, PC7.
- Cvetkovic, S., Djukanovic, S., Mitic-Culafic, D., Nastasijevic, B., Knezevic-Vukcevic, J., Nikolic, B., 2019. Protective effect of *Gentiana lutea* root and leaf extracts against heterocyclic aromatic amines IQ and PhIP produced in thermally processed meat. The 60<sup>th</sup> International Meat Industry Conference Meatcon 2019, Kopaonik, Serbia, Proceedings, ISSN: 1755-1307.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, 23, 174-181.
- Dai, J., Mumper, R. J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.



- Dar, S. A., Yousuf, A. R., Balkhi, M. H., 2016. An introduction about genotoxicology methods as tools for monitoring aquatic ecosystem: present status and future perspectives. *Fish Aquac J*, 7, 2.
- De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 402, 151-158.
- De Flora, S., Ferguson, L. R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res*, 591, 8-15.
- de Gruijl, F., Leun, J., 2000. Environment and health: 3. Ozone depletion and ultraviolet radiation. *Cmaj*, 163, 851-855.
- Ding, W. Y., Li, Y. H., Lian, H., Ai, X. Y., Zhao, Y. L., Yang, Y. B., Han, Q., Liu, X., ChenX. Z., He, Z., 2017. Sub-minimum inhibitory concentrations of rhubarb water extracts inhibit *Streptococcus suis* biofilm formation. *Front Pharmacol*, 8, 425.
- Djukanovic, S., Cvetkovic, S., Mitic-Culafic, D., Knezevic-Vukcevic, J., Nikolic, B., 2019. Antigenotoxic potential of *Gentiana lutea* extracts against the food sweetener saccharin. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 333, 012059.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal*, 22, 296-302.
- Dragičević, M., Platiša, J., Nikolić, R., Todorović, S., Bogdanović, M., Mitić, N., Simonović, A., 2013. Herbicide phosphinothricin causes direct stimulation hormesis. *Dose-Response*, 11.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., Kadekaro, A. L., 2018. Natural antioxidants: multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. *Front Pharmacol*, 9, 392.
- Erden Inal, M., Kahraman, A., Köken, T., 2001. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol*, 26, 536-539.
- European Medicines Agency (EMA), 2018. Assessment Report on *Gentiana lutea* L., Radix. EMA/607863/2017
- Eydelnant, I. A., & Tufenkji, N., 2008. Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir*, 24, 10273-10281.
- Francolini, I., Donelli, G., 2010. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59, 227-238.
- Ferguson, L. R., Philpott, M., Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198, 147-159.
- Ferguson, L. R., 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res*, 307, 395-410.
- Ferguson, L. R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* 475, 89-111.
- Ferguson, L. R., 2002. Natural and human-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Toxicology*, 181, 79-82.
- Ferguson, L. R., Bronzetti, G., De Flora, S., 2005. Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer. *Mutat Res*, 591, 3-7.
- Ferguson, L. R., Philpott, M., 2008. Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 28, 313-329.

- Fiuk, A., Rybczyński, J. J., 2008. Morphogenic capability of *Gentiana kurroo* Royle seedling and leaf explants. *Acta Physiol Plant*, 30, 157-166.
- Galie, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*, 9, 898.
- Gao, Z., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Zhong, W., Chen, K., Guo, J., 2019. Anti-Listeria activities of linalool and its mechanism revealed by comparative transcriptome analysis. *Front Microbiol*, 10, 2947.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*, 91, 317-331.
- Goh, E. B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M. G., Davies, J., 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci*, 99, 17025-17030.
- Goldman, R., Shields, P. G., 2003. Food mutagens. *J. Nutr.*, 133, 965S-973S.
- Gomes-Carneiro, M. R., Dias, D. M., De-Oliveira, A. C. A. X., Paumgartten, F. J., 2005. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of  $\alpha$ -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 585, 105-112.
- González-López, O., Carro, G., Aiello, N., Scartezzini, F., Casquero, P. A., 2014. Main bitter compounds of *Gentiana lutea* var. *aurantiaca* roots wild collected in the Leon Province (Spain). *Planta Med.*, 80, P2B22.
- Gooderham, N. J., Murray, S., Lynch, A. M., Yadollahi-Farsani, M., Zhao, K., Boobis, A. R., Davies, D. S., 2001. Food-derived heterocyclic amine mutagens: variable metabolism and significance to humans. *Drug Metab Dispos*, 29, 529-534.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J., 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev*, 18, 241-272.
- Hashempour-Baltork, F., Hosseini, H., Shojae-Aliabadi, S., Torbati, M., Alizadeh, A. M., Alizadeh, M., 2019. Drug resistance and the prevention strategies in food borne bacteria: An update review. *Adv. Pharm. Bull.*, 9, 335.
- Hathcock, J. N., Hattan, D. G., Jenkins, M. Y., McDonald, J. T., Sundaresan, P. R., Wilkening, V. L., 1990. Evaluation of vitamin A toxicity. *Am J Clin Nutr*, 52, 183-202.
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S., & McCord, J. M., 2019. Phytochemical combination PB125 activates the Nrf2 pathway and induces cellular protection against oxidative injury. *Antioxidants*, 8, 119.
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 39, 199-218.
- Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23, 66-72.
- He, M., Min, J. W., Kong, W. L., He, X. H., Li, J. X., Peng, B. W., 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115, 74-85.

- Hudecová, A., Hašplová, K., Miadoková, E., Magdolenová, Z., Rinna, A., Collins, A. R., Gálová, E., Vuculčíková, D., Gregán, F., Dušinská, M., 2012. *Gentiana asclepiadea* protects human cells against oxidation DNA lesions. *Cell Biochem. Funct.*, 30, 101-107.
- Hudecová, A., Hašplová, K., Miadoková, E., Magdolenová, Z., Rinna, A., Gálová, E., Ševčovičová, A., Vuculčíková, D., Gregán, F., Dušinská, M., 2010. Cytotoxic and genotoxic effect of methanolic flower extract from *Gentiana asclepiadea* on COS 1 cells. *Neuro Endocrinol Lett*, 31, 21
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., Ullah, I., 2012. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: *Recent advances in plant in vitro culture*, 1-28.
- Hussein, M. R., 2005. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*, 32, 191-205.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T., 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189, 21-39.
- Inal, M. E., Kahraman, A., 2000. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*, 154, 21-29.
- Izquierdo-Vega, J.A., Morales-González, J.A., SánchezGutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Sosa-Delgado, S. M., Sumaya-Martínez, M. T., Morales-González, Á., Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E., 2017. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients*, 9, 102.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., Sakariah, K. K., 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.*, 36, 117-122.
- Jensen S.R., Schripsema, J., 2002. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In: Struwe L., Albert V. (eds.) vol. 6, *Gentianaceae – Systematics and Natural History*, Cambridge University Press, 573-631.
- Jiang, M., Cui, B. W., Wu, Y. L., Nan, J. X., Lian, L. H., 2020. Genus *Gentiana*: A review on phytochemistry, pharmacology and molecular mechanism. *J Ethnopharmacol*, 113391.
- Jiang, R.W., Wong, K.L., Chan, Y. M., Xu, H.X., But, P. P.H., Shaw, P.C., 2005. Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis. *Phytochemistry*, 22, 2674-2680.
- Kada, T., Inoue, T., Ohta, T., Shirasu, Y., 1986. Antimutagens and their modes of action. In: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Springer, Boston, MA, 181-196.
- Kadariya, J., Smith, T. C., Thapaliya, D., 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Res. Int.*, 2014.
- Kaisarevic, S., Dakic, V., Hrubik, J., Glisic, B., Lübcke-von Varel, U., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Teodorovic, I., Brack, W., Kovacevic, R., 2015. Differential expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in H4IIE rat hepatoma cells exposed to TCDD and PAHs. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 39, 358-368.
- Kanki, M., Naruse, H., Kawatsu, K., 2018. Comparison of listeriolysin O and phospholipases PlcA and PlcB activities, and initial intracellular growth capability among food and clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*, 124, 899-909.
- Katiyar, S. K., 2011. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Arch Biochem Biophys*, 508, 152-158.

- Katiyar, S. K., Afaq, F., Perez, A., Mukhtar, H., 2001. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*, 22, 287-294.
- Kawaguchi, S., Nakamura, T., Tsuda, S., Murashige, R., Sasaki, Y. F., 2018. Detection of *in vitro* genotoxicity of pro-mutagens using the comet assay under human and rat liver S9 fractions. *MOJ Toxicol*, 4, 255-261.
- Kim, K. Y., Frank, J. F., 1995. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *J Food Prot*, 58, 24-28.
- King, R.S., Kadlubar, F.F., Turesky, R.J., 2000. In vivo metabolism of heterocyclic amines. In: Nagao, M., Sugimura, T. (eds.), Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 90–111.
- Kizil, M., Oz, F., Besler, H. T., 2011. A review on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amines. *J Food Process Technol*, 2, 1-5.
- Knasmüller, S., Steinkellner, H., Majer, B. J., Nobis, E. C., Scharf, G., Kassie, F., 2002. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1051-1062.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalđe, M., Kostić, J., Sunjog, K., Nikolić, B., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., 2016. Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Bot Serb*, 40, 29-36.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Sarker, S.D., 2003. Bioactivity of gentiopicoside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia*. 74,151-154
- Kurzawa-Zegota, M., Najafzadeh, M., Baumgartner, A., Anderson, D., 2012. The protective effect of the flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 124-129.
- Kušar, A., Šircelj, H., Baričević, D., 2010. Determination of seco-iridoid and 4-pyrone compounds in hydro-alcoholic extracts of *Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murb. leaves and roots by using high performance liquid chromatography. *ISR J PLANT SCI.*, 58, 291-296.
- Lee, B. H., Hébraud, M., Bernardi, T., 2017. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. *Front Microbiol*, 8, 2221.
- Lee, J. H., Park, J. H., Cho, H. S., Joo, S. W., Cho, M. H., Lee, J., 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 29, 491-499.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. [i] *Staphylococcus aureus* [/i] and food poisoning. *Genet. Mol. Res.*, 2, 63-76.
- Li, R., Tian, J., Li, W., Xie, J., 2013. Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) on histopathology, oxidative stress, and expression of c-fos, c-jun and p16 in rat stomachs. *Food Chem. Toxicol.*, 55, 182-191.
- Liang, F., Cao, W., Huang, Y., Fang, Y., Cheng, Y., Pan, S., Xu, X., 2019. Isoflavone biochanin A, a novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element activator, protects against oxidative damage in HepG2 cells. *Biofactors*, 45, 563-574.
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci.*, 79, 2056-2068.

- Lin, M. H., Chang, F. R., Hua, M. Y., Wu, Y. C., Liu, S. T., 2011. Inhibitory effects of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1021-1027.
- Liu, C., Gao, P., Xu, S. C., Wang, Y., Chen, C. H., He, M. D., Yu, Z. p., Zhou, Z., 2013. Mobile phone radiation induces mode-dependent DNA damage in a mouse spermatocyte-derived cell line: a protective role of melatonin. *Int J Rad Bio*, 89, 993-1001.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4, 118.
- López-Romero, D., Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro-Cevallos, G., Sánchez-Gutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Alvarez-Gonzales, I., Morales-González, Á., Madrigal-Santillán, E., 2018. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients*, 10, 1954.
- Mamedov, N., 2012. Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. *Med Aromat Plants*, 1, e133.
- Marković, T., Radanović, D., 2011. Plantažiranje žute lincure (*Gentiana lutea* L.) u bdrsko-planinskom region Srbije; Doprinis održivom razvoju njenog prirodnog resursa. Institut za proučavanje lekovicog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd.
- Marković, T., Radanović, D., Nastasijević, B., Antić-Mladenović, S., Vasić, V., Matković, A., 2019. Yield, quality and safety of yellow gentian roots produced under dry-farming conditions in various single basal fertilization and planting density models. *Ind Crop Prod.*, 132, 236-244.
- Marriott, N. G., Gravani, R. B., Schilling, M. W., 2006. *Principles of food sanitation*, vol. 22. New York: Springer.
- Matić, S., Stanić, S., Solujić, S., Stanković, N., Mladenović, M., Mihailović, V., 2013. Protective role of methanol extracts of *Gentiana asclepiadea* L. and *G. cruciata* L. against genotoxic damage induced by ethyl methanesulfonate. *Genetika*, 45, 329-340.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H. N., 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 195, 298-308.
- Mazlan, N. A., Azman, S., Ghazali, N. F., Yusri, P. Z. S., Idi, H. M., Ismail, M., Sekar, M., 2019. Synergistic antibacterial activity of mangiferin with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Drug Invent. Today*, 12, 14-17.
- McCord, J. M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108, 652-659.
- Megha, K., Deshmukh, P. S., Banerjee, B. D., Tripathi, A. K., Ahmed, R., Abegaonkar, M. P., 2015. Low intensity microwave radiation induced oxidative stress, inflammatory response and DNA damage in rat brain. *Neurotoxicology*, 51, 158-165.
- Melnikova, V. O., Ananthaswamy, H. N., 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mut Res*, 571, 91-106.
- Menkovic, N., Juranic, Z., Stanojkovic, T., Raonic-Stevanovic, T., Šavikin, K., Zdunić, G., Borojevic, N., 2010. Radioprotective activity of *Gentiana lutea* extract and mangiferin. *Phytother Res*, 24, 1693-1696.
- Menković, N., Šavikin-Fodulović, K., Momcilović, I., Grubišić, D., 2000. Quantitative determination of secoiridoid and  $\gamma$ -pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured *in vitro*. *Planta Med.*, 66, 96-98.

- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., Kassie, F., 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198, 329-340.
- Mihailovic, V., Matic, S., Mišić, D., Solujic, S., Stanic, S., Katanic, J., Mladenovic, M., Stankovic, N., 2013. Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of different fractions of *Gentiana asclepiadea* L. roots extract. *EXCLI J*, 12, 807.
- Mihailović, V., Mišić, D., Matic, S., Mihailović, M., Stanić, S., Vrvic, M. M., Katanić, J., Mladenović, M., Stanković, N., Boroja, T., Stanković, M. S., 2015. Comparative phytochemical analysis of *Gentiana cruciata* L. roots and aerial parts, and their biological activities. *Ind Crop Prod*, 73, 49-62.
- Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Wąsik, T. J., 2018. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Int J Environ Res Public Health*, 15, 2321.
- Mirzaee, F., Hosseini, A., Jouybari, H. B., Davoodi, A., Azadbakht, M., 2017. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. *J Tradit Complement Med*, 7, 400-408.
- Mitić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Berić, T., Nikolić, B., Stanković, S., Simić, D., 2001. Natural antioxidants and their mechanisms in inhibition of mutagenesis, In: Molecular and Genetic Interactions Involving Phytochemicals (COST 916), Kreft, I., and Škrabanja, V., (eds.), Univ. Ljubljana and The Slovenian Academy of Sciences and Arts, 67-74.
- Mitić-Ćulafić, D., Žegura, B., Filipič, M., Nikolić, B., Jovanović, M., Knežević-Vukčević, J., 2016. Antigenotoxic potential of plant monoterpenes linalool, myrcene and eucalyptol against IQ- and PhIP-induced DNA damage. *Bot Serb*, 40, 37-42.
- Mitić-Ćulafić, D., Žegura, B., Nikolić, B., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Filipič, M., 2009. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 260-266.
- Miyata, M., Takano, H., Guo, L. Q., Nagata, K., Yamazoe, Y., 2004. Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B 1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis*, 25, 203-209.
- Momčilović, I., Grubišić, D., Nešković, M., 1997. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 49, 141-144.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455, 29-60.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- Moura, D. J., Richter, M. F., Boeira, J. M., Pêgas Henriques, J. A., Saffi, J., 2007. Antioxidant properties of  $\beta$ -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22, 293-302.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Murkovic, M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J Chromatogr B*, 802, 3-10.

- Mustafayeva, K., Di Giorgio, C., Elias, R., Kerimov, Y., Ollivier, E., De Méo, M., 2010. DNA-damaging, mutagenic, and clastogenic activities of gentiopicroside isolated from *Cephalaria kotschy* roots. *J Natl Prod*, 73, 99-103.
- Mytilineou, C., Kramer, B.C., Yabut, J.A., 2002. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord*, 8, 385-387.
- Nagarathna, P. K. M., Wesley, M. J., Reddy, P. S., Reena, K., 2013. Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 22, 236-43.
- Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Sugimura, T., 1977. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett*, 2, 221-226.
- Najafzadeh, M., Reynolds, P. D., Baumgartner, A., Anderson, D., 2009. Flavonoids inhibit the genotoxicity of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f]-quinoline (IQ) in lymphocytes from patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Mutagenesis*, 24, 405-411.
- Nastasijević, B.J., 2016. Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*) - inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.
- Nastasijević, B., Lazarević-Pašti, T., Dimitrijević-Branković, S., Pašti, I., Vujačić, A., Joksić, G., Vasić, V., 2012. Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts. *J Pharm Biomed Anal.*, 66, 191-196.
- Nastasijević, B., Milošević, M., Janjić, G., Stanić, V., Vasić, V., 2016. *Gentiana lutea* extracts and their constituents as inhibitors of synaptosomal Ecto-NTPDase. *Int J Pharmacol*, 12, 272-289.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, 284, 13291-13295.
- Nikolić, B., Jovanović, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., 2015. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chem.-Biol. Interact.*, 242, 263-271.
- Nikolić B., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Knežević-Vukčević J., 2012. Molecular mechanisms of action of antimutagens from sage (*Salvia officinalis*) and basil (*Ocimum basilicum*). In: R. Mishra (ed.) *Mutagenesis*, InTech, Rijeka, Croatia, 85-112. ISBN 978-953-51-0707-1.
- Nikolić, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., 2011. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *E. coli* and mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 2035-2045.
- Nikolić, B., Vasiljević, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., 2015. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chem Biol Interact*, 242, 263-271.
- Nikolić, B., Stanojević, J., Mitić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Simić, D., 2004. Comparative study of the antimutagenic potential of Vitamin E in different *E. coli* strains. *Mutat. Res.*, 564, 31-38.
- Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gačić, B., Simić, D., Knežević-Vukčević, J., 2006. The effects of vitamin C on oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, 449-456.

- Oda, Y., 2016. Development and progress for three decades in umu test systems. *Genes Environ*, 38, 24.
- Oguri, A., Suda, M., Totsuka, Y., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 1998. Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mut Res*, 402, 237-245.
- Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., Barrett, J. F., 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg Med Chem Lett*, 3 225-230.
- Oprea, S. F., Zervos, M. J., 2007. *Enterococcus* and its association with foodborne illness. In: Simjee S. (eds.), *Foodborne Diseases*, Humana Press, 157-174.
- Ordoñez, A. A. L., Gomez, J. D., Vattuone, M. A., Isla, M. I., 2006. Antioxidant activities of *Sechiamedula* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem*. 97, 452-458.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr*, 44, 307-315.
- Özkan, G., Sagdiç, O., Göktürk Baydar, N., Kurumahmutoglu, Z., 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *J Sci Food Agric*, 84, 1807-1811.
- Öztürk, M., Duru, M.E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., Özler, M.A., 2011. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 1353-1360.
- Öztürk, N., Korkmaz, S., Öztürk, Y., Başer, K.H., 2006. Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. *Planta Med.*, 72, 289-294.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends Analyt Chem*, 30, 652-664.
- Pan, Y., Zhao, Y. L., Zhang, J., Li, W. Y., Wang, Y. Z., 2016. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae). *Chem Biodivers*, 13, 107-150.
- Pandey, M. M., Rastogi, S., Rawat, A. K. S., 2013. Indian traditional ayurvedic system of medicine and nutritional supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013.
- Patenković, A., Stamenković-Radak, M., Nikolić, D., Marković, T., Anđelković, M., 2013. Synergistic effect of *Gentiana lutea* L. on methyl methanesulfonate genotoxicity in the *Drosophila* wing spot test. *J Ethnopharmacol*, 146, 632-636.
- Pattison, D. I., Davies, M. J., 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. In: *Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability*, vol. 96, Birkhäuser Basel, 131-157.
- Pereira, B. K., Rosa, R. M., da Silva, J., Guecheva, T. N., de Oliveira, I. M., Ianistcki, M., Benvegnú, V. C., Furtado, G. V., Ferraz, A., Richter, M. F., Schroder, N., Pereira, A. B., Henriques, J. A. P., 2009. Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models. *J Photochem Photobiol B*, 96, 117-129.



- Perić, M., Dmitrović, S., Živković, S., Filipović, B., Skorić, M., Simonović, A., Todorović, S., 2012. *In Vitro* Growth, Morphogenesis, and Acclimatization of Endangered *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge. *HortScience*, 47, 1123-1128.
- Petrova, M., Zayova, E., Vitkova, A., 2011. Effect of silver nitrate on *in vitro* root formation of *Gentiana lutea*. *Rom Biotechnol Lett*, 16, 53-58.
- Petrovska, B. B., 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*, 6, 1.
- Pfeifer, G. P., You, Y. H., Besaratinia, A., 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*, 571, 19-31.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., Jerala, R., 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 530-536.
- Plazar, J., Žegura, B., Lah, T. T., Filipič, M., 2007. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo (a) pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 632, 1-8.
- Prakash, O., Singh, R., Kumar, S., Srivastava, S., Ved, A., 2017. *Gentiana lutea* Linn.(Yellow Gentian): A comprehensive. *J. Ayu.*, 3, 175-181
- Prasad, S., Kumar Yadav, V., Srivastava, S., Shukla, Y., 2008. Protective effects of lupeol against benzo [a] pyrene induced clastogenicity in mouse bone marrow cells. *Mol Nutr Food Res*, 52, 1117-1120.
- Porter, W. L., Black, E. D., Drolet, A. M., 1989. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J Agric Food Chem*, 37, 615-624.
- Qian, W., Liu, M., Fu, Y., Zhang, J., Liu, W., Li, J., Li, X., Li, Y., Wang, T., 2020. Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microb Pathog*, 142, 104056.
- Radanović, D., Marković, T., Vasin, J., Banjac, D., 2016. The efficiency of using different mulch films in the cultivation of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) in Serbia. *Ratar. Povrt.*, 53, 30-37.
- Radanović, D., Marković, T., Aiello, N., Fusani, P., 2014. Cultivation trials on *Gentiana lutea* L. in Southern and South-eastern Europe. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 1, 113-122.
- Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2008. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicol Lett*, 177, 66-73.
- Randhawa, S., Bahna, S. L., 2009. Hypersensitivity reactions to food additives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 9, 278-283.
- Rao, B. S., Sreedevi, M. V., Rao, B. N., 2009. Cytoprotective and antigenotoxic potential of Mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 592-600.
- Rawat, S., 2015. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian J Plant Sci Res*, 5, 47-56.

- Reddeman, R. A., Glávits, R., Endres, J. R., Clewell, A. E., Hirka, G., Vértesi, A., Béres, E., Szakonyiné, I. P., 2019. A toxicological evaluation of mango leaf extract (*Mangifera indica*) containing 60% mangiferin. *J Toxicol*, 2019.
- Rios, J. L., Recio, M. C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 100, 80-84.
- Roccaro, A. S., Blanco, A. R., Giuliano, F., Rusciano, D., Enea, V., 2004. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 1968-1973.
- Rodrigues, C., Karmali, A., Machado, J., 2019. The extracts of *Gentiana lutea* with potential cytotoxic effects on human carcinoma cell lines: A preliminary study. *Eur J Integr Med*, 27, 34-38.
- Saewan, N., Jimtaisong, A., 2015. Natural products as photoprotection. *J Cosmet Dermatol*, 14, 47-63.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Yilmaz, M. T., Yetim, H., 2011. Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. *J Food Sci*, 76, M515-M521.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M. L., Tita, B., Messina, C., Bonina, F. P., Rocco, C., Nicolosi, G., Castelli, F., 2003. 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur J Pharm Biopharm*, 56, 167-174.
- Samaddar, T., Chaubey, B., Jha, S., Jha, T. B., 2013. Determination of swertiamarin and amarogentin content and evaluation of antibacterial activity in Eastern Himalayan species of *Swertia* L. *Pharmacogn. Commun.*, 3.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., Wilkens, M., 2017. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one*, 12, e0172273.
- Sánchez-Lamar, A., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Gensabella, G., Degrassi, F., De Salvia, F., 2005. *Punica granatum* L. whole fruit extract as a protection against hydrogen peroxide induced damage. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 10, 1-9.
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 519, 103-119.
- Šavikin, K., Menković, N., Zdunić, G., Stević, T., Radanović, D., Janković, T., 2009. Antimicrobial Activity of *Gentiana lutea* L. Extracts. *Z. Naturforsch.*, 64, 339 – 342.
- Schelin, J., Susilo, Y. B., Johler, S., 2017. Expression of staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation. *Toxins*, 9, 401.
- Schwarz, A., Maeda, A., Gan, D., Mammone, T., Matsui, M. S., Schwarz, T., 2008. Green tea phenol extracts reduce UVB-induced DNA damage in human cells via interleukin-12. *Photochem. Photobiol.*, 84, 350-355.
- Selamoglu, Z., Dugun, C., Akgul, H., Gulhan, M. F., 2017. In-vitro antioxidant activities of the ethanolic extracts of some contained-allantoin plants. *Iran J Pharm Res*, 16, 92.
- Sesterhenn, K., Distl, M., Wink, M., 2007. Occurrence of iridoid glycosides in *in vitro* cultures and intact plants of *Scrophularia nodosa* L. *Plant cell reports.*, 26, 365-371.
- Shakya, A. K., 2016. Medicinal plants: Future source of new drugs. *Int. J. Herb. Med.*, 4, 59-64.

- Sharma, N., Chandel, K.P.S., Paul, A., 1993. *In vitro* propagation of *Gentiana kurroo*-an indigenous threatened plant of medicinal importance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 34, 307-309.
- Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.*, 20, 407-413.
- Šiler, B., Mišić, D., Nestorović, J., Banjanac, T., Glamočlija, J., Soković, M., Ćirić, A., 2010. Antibacterial and antifungal screening of *Centaureum pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. *Nat Prod Commun*, 5, 1934578X1000501001.
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., Azeredo, J., 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J Food Prot*, 71, 1379-1385.
- Simić, D., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Mitić, D., Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Stanković, S., 2002. Genotoxic effects of environmental pollutants; genotoxic monitoring and detection of antigenotoxic effects, In: Antić, D.P. and Vujić, Lj. S (eds.) Environmental Recovery of Yugoslavia., Vinča Institute of Nuclear Sciences, Beograd, 378-382.
- Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT*, 43, 573-583.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Sisto, M., Lisi, S., D'Amore, M., De Lucro, R., Carati, D., Castellana, D., La Pesa, V., Zuccarello, V., Lofrumento, D. D., 2012. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage. *J Photochem Photobiol B*, 117, 193-201.
- Sivaranjani, M., Gowrishankar, S., Kamaladevi, A., Pandian, S. K., Balamurugan, K., Ravi, A. V., 2016. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes*—An *in vitro* and *in vivo* approach. *Int J Food Microbiol*, 237, 73-82.
- Skarupova, D., Vostalova, J., Svobodova, A. R., 2020. Ultraviolet A protective potential of plant extracts and phytochemicals. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 164.
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., Radulović, S., 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of *in vitro* grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind Crop Prod*, 38, 153-159.
- Slany, M., Oppelt, J., Cincarova, L., Slany, M., 2017. Formation of *Staphylococcus aureus* biofilm in the presence of sub-lethal concentrations of disinfectants: a transcriptomic analysis using RNA-seq 2. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., Mučaji, P., 2016. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, 21, 1717.
- Sobot, A. V., Savic, J., Trickovic, J. F., Drakulic, D., Joksic, G., 2020. Toxicity assessment of *Gentiana lutea* L. root extract and its monoterpene compounds. *Indian J. Exp. Biol.*, 58, 609-616.
- Son, T. G., Camandola, S., Mattson, M. P., 2008. Hormetic dietary phytochemicals. *Neuromolecular Med.*, 10, 236.

- Song, J. H., Bae, E. Y., Choi, G., Hyun, J. W., Lee, M. Y., Lee, H. W., Chae, S., 2013. Protective effect of mango (*Mangifera indica* L.) against UVB-induced skin aging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 29, 84-89.
- Sperber, W. H., 2009. Introduction to the microbiological spoilage of foods and beverages. In: *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. Springer, New York, NY, 1-40.
- Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S. D., 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- Stanojević, J., Berić, T., Opačić, B., Vuković-Gačić, B., Simić, D., Knežević-Vukčević, J., 2008. The effect of essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biol. Sci.*, 60, 93-102.
- Stefanović, O., Ličina, B., Vasić, S., Radojević, I., Čomić, L., 2018. Bioactive extracts of *Gentiana asclepiadea*: Antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activity. *Bot Serb*, 42, 223-229.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, 40, 175-179.
- Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, A., 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.*, 120, 159-167.
- Sugimura, T. (2002). Food and cancer. *Toxicology*, 181, 17-21.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., Nagao, M., 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci*, 95, 290-299.
- Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D., 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 147, 137-145.
- Svobodová, A., Rambousková, J., Walterová, D., Vostalová, J., 2008. Bilberry extract reduces UVA-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes: A pilot study. *Biofactors*, 33, 249-266.
- Svobodová, A., Walterová, D., Vostalová, J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150, 25.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 9, 1236-1243.
- Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., Vágvölgyi, C., 2020. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants*, 9, 165.
- Tasheva, K., Kosturkova, G., 2013. Role of biotechnology for protection of endangered medicinal plants. In: *Environmental biotechnology-New approaches and prospective applications*, 235-238.
- Taylor, P. W., Hamilton-Miller, J. M., Stapleton, P. D., 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol*, 2, 71.
- Tebbe B., 2001. Relevance of oral supplementation with antioxidant for prevention and treatment of skin disorders. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 296-302.
- Tenover, F. C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*, 119, S3-S10.
- Thompson, J.M., Dodd, C.E., Waites, W.M., 1993. Spoilage of bread by *Bacillus*. *Int Biodeterior Biodegradation*, 32, 55-66.

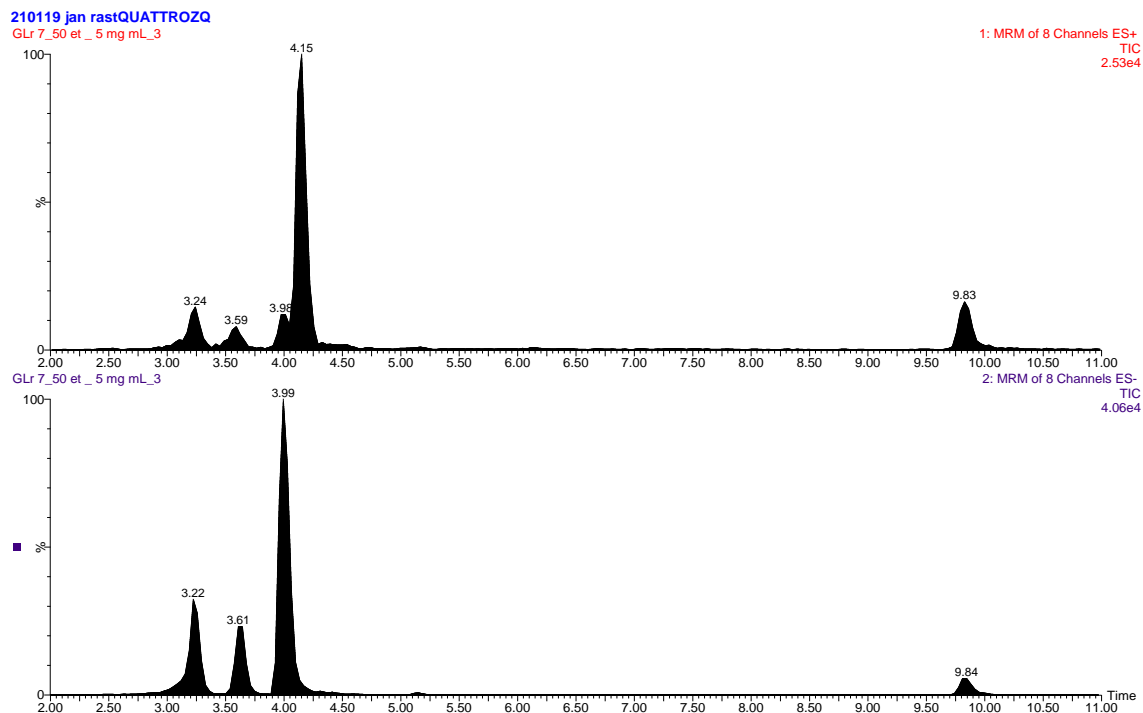
- Todorović, S., Giba, Z., Bačić, G., Nikolic, M., Grubišić, D., 2008. High seed Mn content does not affect germination of *in vitro* produced *Centaureum pulchellum* seeds. *Environ Exp Bot*, 64, 322-324.
- Trautinger, F., 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol*, 26, 573-577.
- Tseng, Y.H., Yang, J.H., Mau, J.L., 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.*, 107, 732-738.
- Tucakov, J., 1996. Lečenje biljem - fitoterapija. Beograd: Rad
- Turesky, R. J., 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Lett*, 168, 219-227.
- Turesky, R. J., Constable, A., Fay, L. B., Guengerich, F. P., 1999. Interspecies differences in metabolism of heterocyclic aromatic amines by rat and human P450 1A2. *Cancer Lett*, 143, 109-112.
- Turesky, R. J., Le Marchand, L., 2011. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol*, 24, 1169-1214.
- Turesky, R. J., Vouros, P., 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine–DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *J Chromatogr B*, 802, 155-166.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R. J. A. E. M., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1561-1568.
- Umbuzeiro, G. D. A., Heringa, M., Zeiger, E., 2016. In vitro genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. In: *In vitro Environmental Toxicology-Concepts, Application and Assessment*, Springer International Publishing, 59-80.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., Venkitanarayanan, K., 2013. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*, 36, 79-89.
- van der Veen, S., Abee, T., 2010. HrcA and DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 156, 3782-3790.
- Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H., McLean, R. J., 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 78, 302-310.
- Vergara, A., Normanno, G., Di Ciccio, P., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Parisi, A., Santagada, G., Colagiorgi, A., Zanardi, S., Ianieri, A., 2017. Biofilm formation and its relationship with the molecular characteristics of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Food Sci*, 82, 2364-2370.
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D., 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*, 17, 11-21.
- Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G. W., Geisler, R., Schirmer, K., Scholz, S., 2007. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquat. Toxicol*, 81, 355-364.
- Von Borstel, R. C., Higgins, J. A., 1998. Janus carcinogens and mutagens. *Mutat Res*, 402, 321-329.
- Vuković-Gačić, B., Nikčević, S., Berić-Bjedov, T., Knežević-Vukčević, J., Simić, D., 2006a. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-

- induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1730-1738.
- Vuković-Gačić, B., Simić, D., Knežević-Vukčević, J., 2006b. *Escherichia coli* assay system for detection of plant antimutagens and their mechanisms of action. In: Verschaeve, L., (ed.), *Topical Issues in Applied Microbiology and Biotechnology*, Kerala, India: Research Signpost. 61-86.
- Wang, H. T., Choi, B., Tang, M. S., 2010. Melanocytes are deficient in repair of oxidative DNA damage and UV-induced photoproducts. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 12180-12185.
- Wang, H., Helliwell, K., 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int*, 34, 223-227.
- Wangensteen, H., Samuelsen, A. B., Malterud, K. E., 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem*, 88, 293-297.
- Wauthoz, N., Balde, A., Balde, E. S., Van Damme, M., Duez, P., 2007. Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. bark and pharmacological studies of its main C-glucosylxanthone, mangiferin. *Int J Biomed Pharm Sci*, 1, 112-119.
- Wesolowska, M., Skrzypczak, L., Dudzinska, R., 1985. Rodzaj *Gentiana* L. w kulturze in vitro. *Acta Pol. Pharm*, 42, 79-83.
- Wilson, B. G., Bahna, S. L., 2005. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 95, 499-507.
- Wink, M., 1990. Physiology and secondary product formation in plants. In: Charlwood B.V., Rhodes M.J.C. (eds.), *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe (30): secondary products from plant tissue culture*, Clarendon Press, Oxford, 23-41.
- Winter, H. K., Ehrlich, V. A., Grusch, M., Lackner, A., Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., Mikulits, W., Knasmüller, S., 2008. Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 657, 133-139.
- Xu, X., Zhou, X. D., Wu, C. D., 2011. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents chemother*, 55, 1229-1236.
- Yim, G., McClure, J., Surette, M. G., Davies, J. E., 2011. Modulation of *Salmonella* gene expression by subinhibitory concentrations of quinolones. *J Antibiot*, 64, 73-78.
- Zhai, X., Lin, M., Zhang, F., Hu, Y., Xu, X., Li, Y., Liu, K., Ma, X., Zian, X., Yao, J., 2013. Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res*, 57, 249-259.
- Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M., Wei, H., 1997. Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic Bio Med*, 23, 980-985.
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., Zhong, N., 2017. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv.*, 7, 36670-36683.
- Zöchling, S., Murkovic, M., 2002. Formation of the heterocyclic aromatic amine PhIP: identification of precursors and intermediates. *Food Chem*, 79, 125-134.

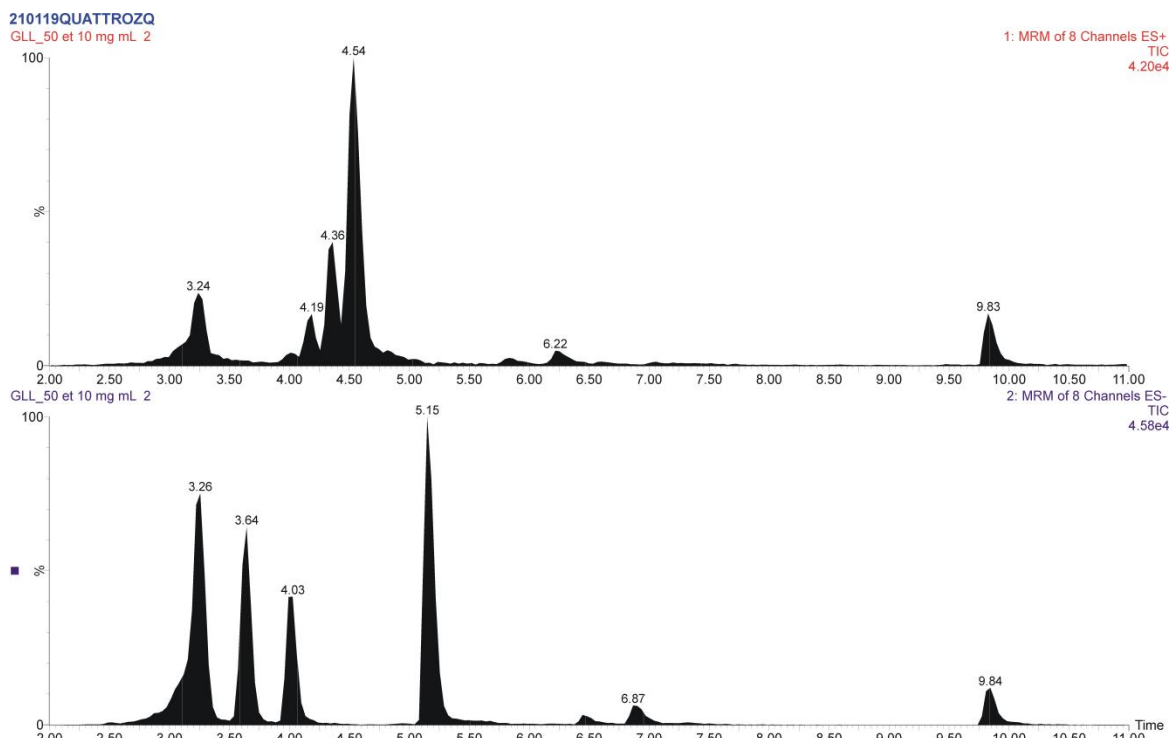
## 8. Prilozi

## 8.1. UPLC-PDA MS/MS analiza ekstrakata

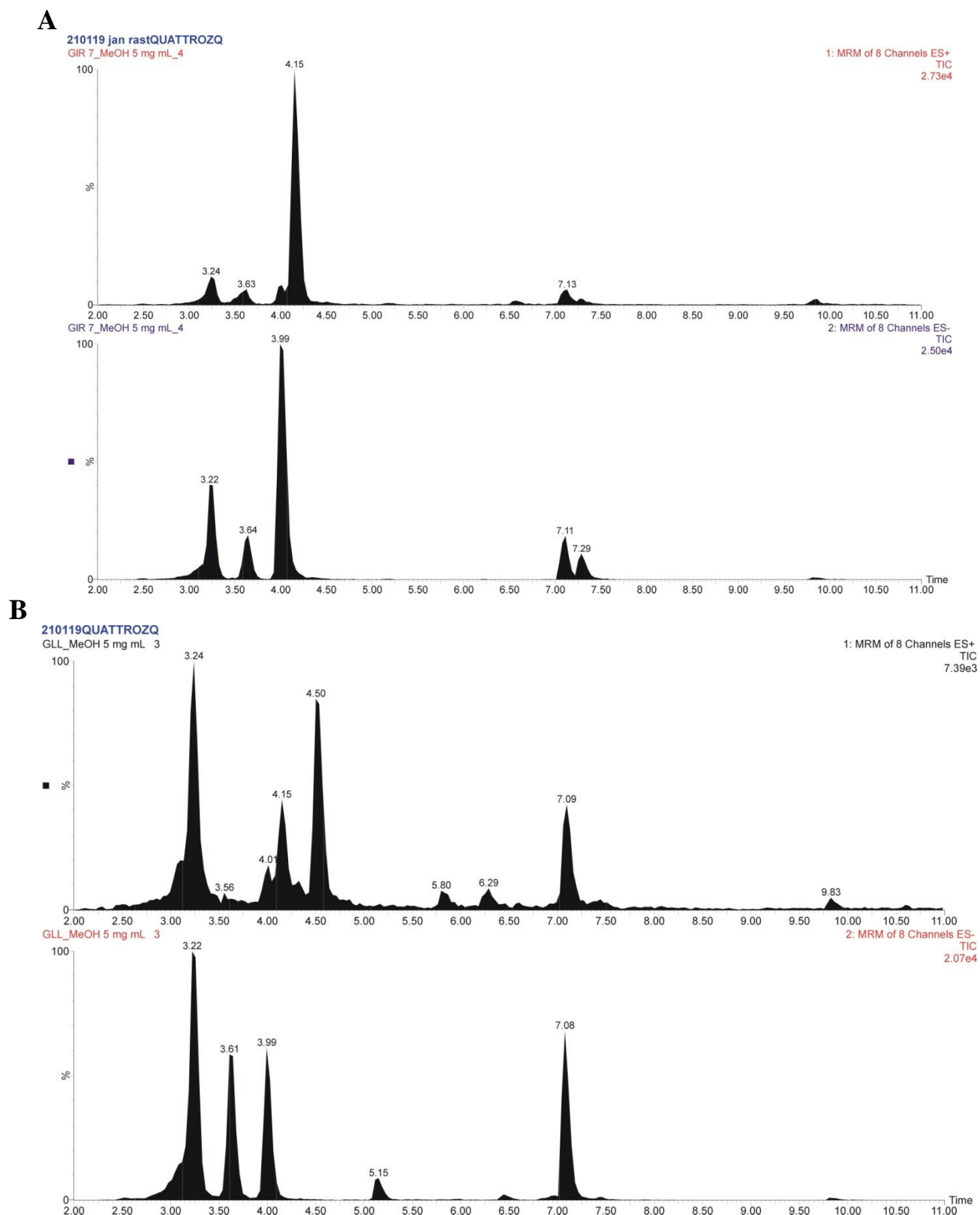
A



B

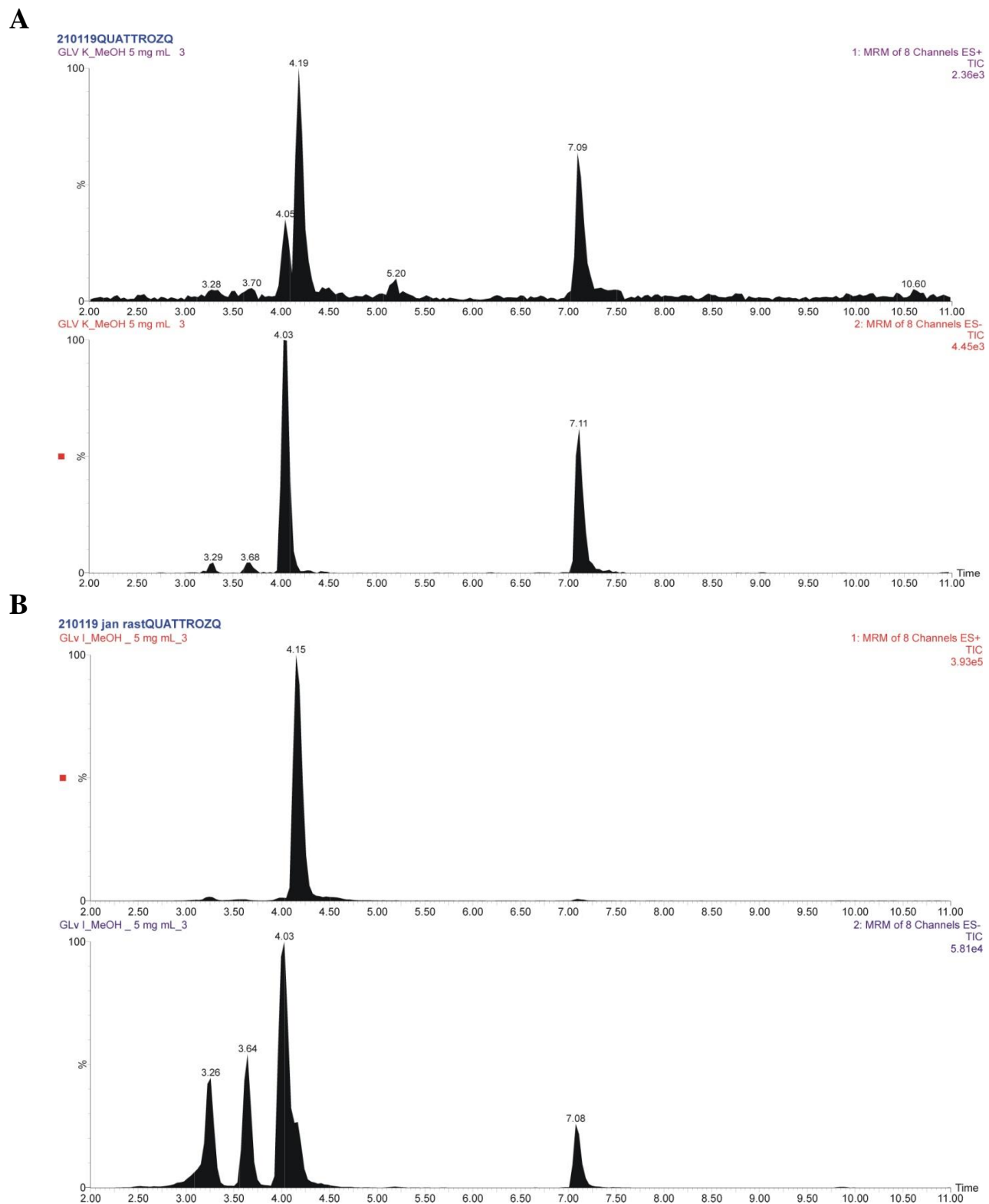


Slika 8.1. UPLC-MS/MS TIC hromatogrami 50% EtOH plantažnih ekstrakata u koncentraciji 10 mg mL<sup>-1</sup>: A) GLK; B) GLL



Slika 8.2. UPLC-MS/MS TIC hromatogrami MeOH plantažnih ekstrakata u koncentraciji 5 mg mL<sup>-1</sup>: A) GLK; B) GLL

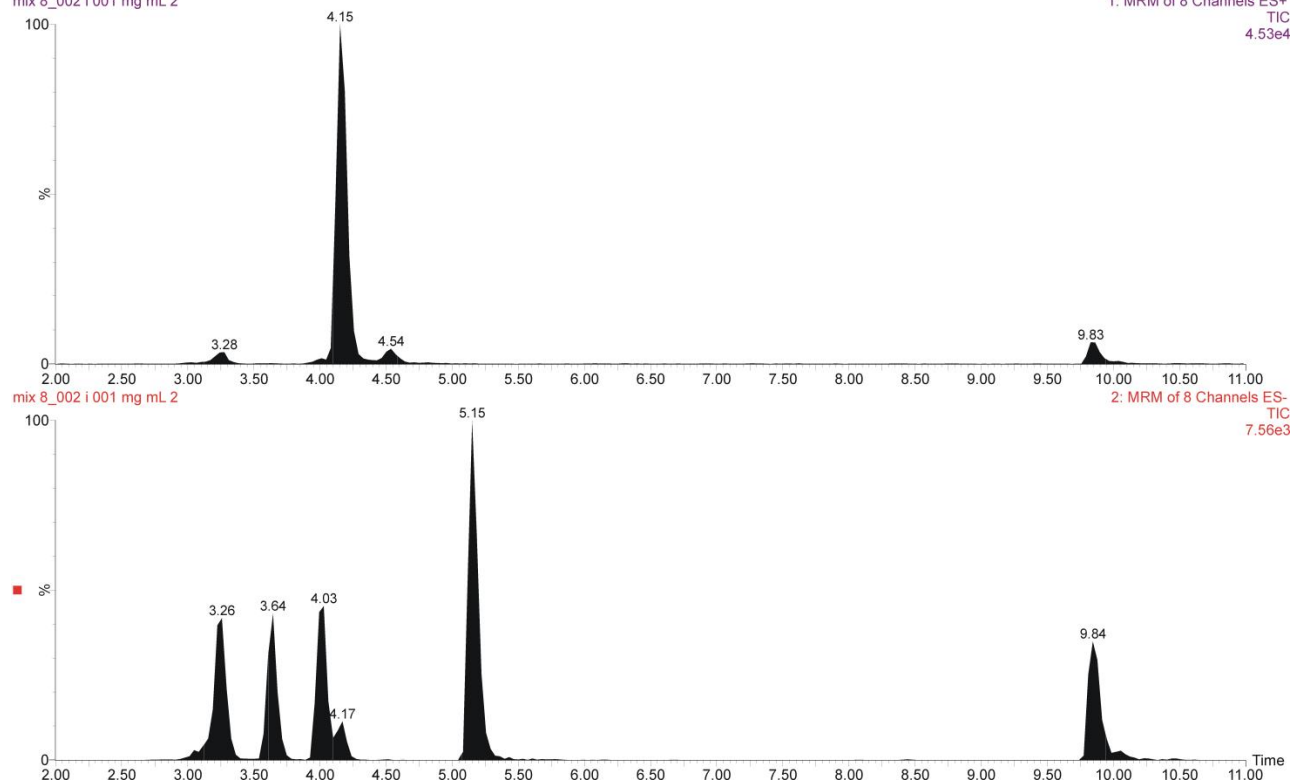




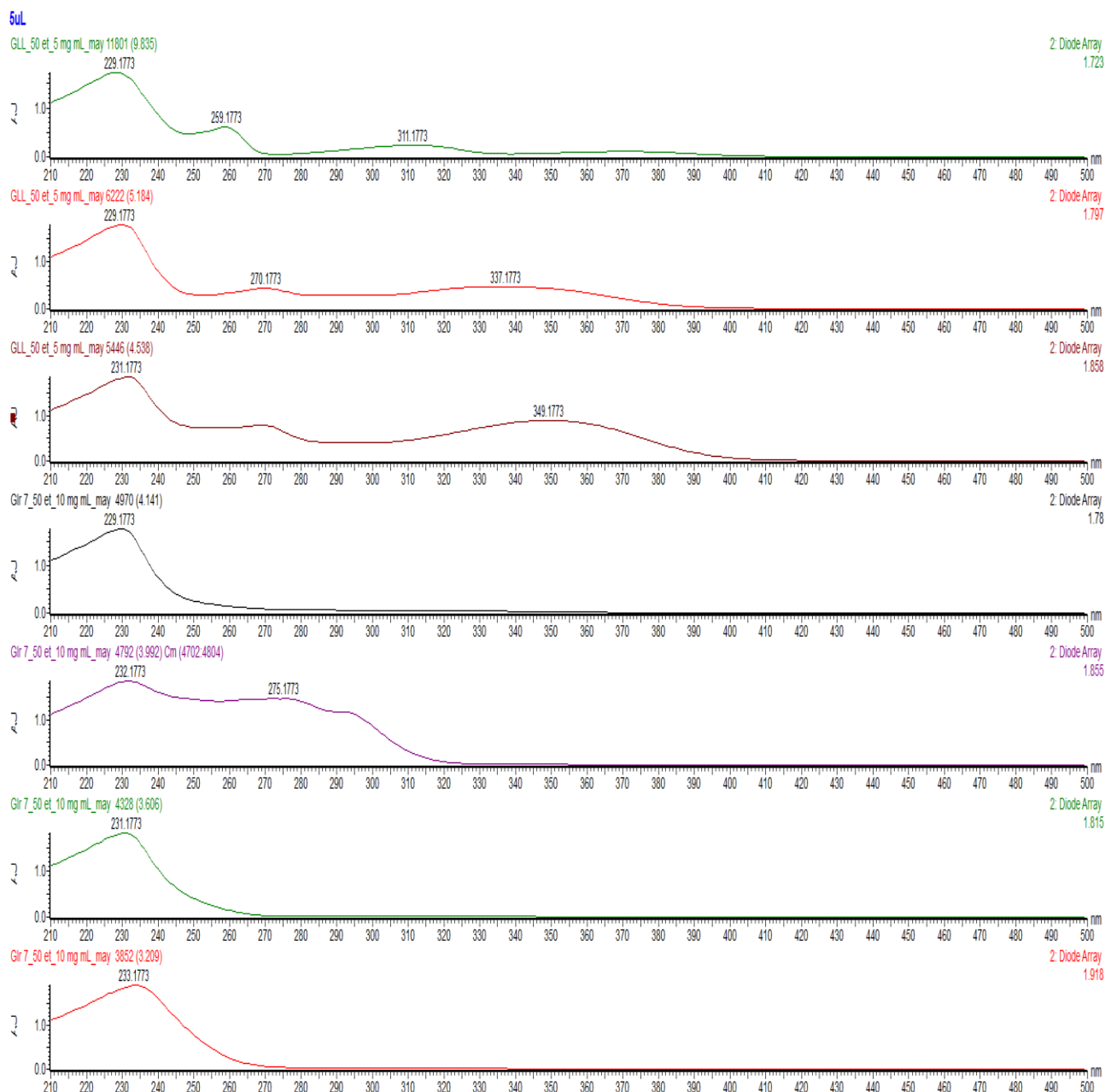
Slika 8.3. UPLC-MS/MS TIC hromatogrami MeOH *in vitro* ekstrakata u koncentraciji 5 mg mL<sup>-1</sup>: A) GLvK; B) GLvI

## metoda 14hQUATTROZQ

mix 8\_002 i 001 mg mL 2

1: MRM of 8 Channels ES+  
TIC  
4.53e4

Slika 8.4. UPLC-MS/MS TIC hromatogrami smeše osam *G. Lutea* konstituenata u koncentraciji od  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  (svertiamarin, sverozid, mangiferin, homoorientin, izoviteksin, izogentizin) i  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  (genciopikrozid, loganska kiselina)



Slika 8.5. UPLC/PDA hromatogram: apsorpcioni spektri izogentizina, izoviteksina, homoorientina, sverozida, genciopikrozida, svertiamarina i loganske kiseline (odozdo na gore)

\*Mangiferin je detektovan samo MS/MS analizom zato što je njegovo retenciono vreme blizu retencionog vremena genciopikrozida i nije se jasno video PDA detekcijom pod primenjenim uslovima elucije.

8.2. Efekat ekstrakata i konstituenta *G. lutea* na formiranje biofilma odabranih sojevaTabela 8.1. Inhibicija (%) formiranja biofilma *S. aureus* i *L. monocytogenes* nakon tretmana ekstraktima i konstituentima *G. lutea*

		<i>S.aureus</i>					<i>L. monocytogenes</i>					
<b>GLK 50%EtOH</b>	mg mL <sup>-1</sup>	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	mg mL <sup>-1</sup>	0,625	1,25	2,5	5	10
	I (%)	<b>1,5±3,2</b>	<b>4,4±3,1</b>	<b>8,8±3,0</b>	<b>10,9±2,9</b>	<b>17,4±2,7</b>	<b>I (%)</b>	<b>15,2±1,9</b>	<b>48,8±1,1</b>	<b>65,2±0,8</b>	<b>72,4±0,6</b>	<b>82,2±0,4</b>
<b>GLL 50%EtOH</b>	mg mL <sup>-1</sup>	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	mg mL <sup>-1</sup>	0,625	1,25	2,5	5	10
	I (%)	<b>4,1±3,1</b>	<b>4,4±3,1</b>	<b>7,6±3,0</b>	<b>11,5±2,9</b>	<b>19,4±2,6</b>	<b>I (%)</b>	<b>11,1±2,0</b>	<b>38,8±1,3</b>	<b>51,5±1,1</b>	<b>73,4±0,6</b>	<b>90,0±0,2</b>
<b>GLL MeOH</b>	mg mL <sup>-1</sup>	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	mg mL <sup>-1</sup>	0,3125	0,625	1,25	2,5	5
	I (%)	<b>4,3±3,1</b>	<b>5,7±3,1</b>	<b>6,4±3,1</b>	<b>19,3±2,7</b>	<b>27,9±2,4</b>	<b>I (%)</b>	<b>29,6±1,6</b>	<b>46,5± 1,2</b>	<b>56,3± 1,0</b>	<b>81,1± 0,4</b>	<b>86,9± 0,3</b>
<b>GLvK MeOH</b>	mg mL <sup>-1</sup>	0,039	0,078	0,156	0,3125	0,625	mg mL <sup>-1</sup>	0,039	0,078	0,156	0,3125	0,625
	I (%)	<b>-1,0±1,7</b>	<b>0,3±0,2</b>	<b>1,8±0,2</b>	<b>6,7±3,1</b>	<b>10,7±2,9</b>	<b>I (%)</b>	<b>5,6± 1,5</b>	<b>14,6± 1,4</b>	<b>24,9± 1,2</b>	<b>32,1± 1,1</b>	<b>34,6± 1,1</b>
<b>GLvI MeOH</b>	mg mL <sup>-1</sup>	0,0097	0,0195	0,039	0,078	0,156	mg mL <sup>-1</sup>	0,0195	0,039	0,078	0,156	0,3125
	I (%)	<b>-0,2±0,1</b>	<b>2,3±0,8</b>	<b>4,5±0,8</b>	<b>6,9±0,9</b>	<b>14,3±2,8</b>	<b>I (%)</b>	<b>3,5± 1,6</b>	<b>15,8± 1,4</b>	<b>18,6± 1,3</b>	<b>26,2± 1,2</b>	<b>30,0± 0,3</b>
<b>Sverozid</b>							μg mL <sup>-1</sup>	15,6	31,25	62,5	125	250
							<b>I (%)</b>	<b>4,4± 2,2</b>	<b>13,5± 2,0</b>	<b>16,5± 1,9</b>	<b>23,5± 1,7</b>	<b>28,2± 1,6</b>
<b>Svertiamarin</b>							μg mL <sup>-1</sup>	15,6	31,25	62,5	125	250
							<b>I (%)</b>	<b>9,8± 2,1</b>	<b>20,0± 1,8</b>	<b>24,1± 1,7</b>	<b>28,2± 1,6</b>	<b>37,2± 1,4</b>
<b>Mangiferin</b>							μg mL <sup>-1</sup>	0,97	1,95	3,9	7,8	15,6
							<b>I (%)</b>	<b>1,5± 0,7</b>	<b>9,1± 0,6</b>	<b>13,8± 0,6</b>	<b>23,7± 0,5</b>	<b>46,0± 0,4</b>
<b>Izoviteksin</b>							μg mL <sup>-1</sup>	15,6	31,25	62,5	125	250
							<b>I (%)</b>	<b>0,4± 0,7</b>	<b>17,0± 0,6</b>	<b>24,7± 0,5</b>	<b>45,3± 0,4</b>	<b>50,6± 0,4</b>
<b>Homoorientin</b>							μg mL <sup>-1</sup>	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5
							<b>I (%)</b>	<b>20,8± 2,0</b>	<b>26,7± 2,0</b>	<b>39,7± 1,9</b>	<b>47,1± 1,1</b>	<b>57,6± 2,5</b>

Inhibicija je izračunata na osnovu srednjih vrednosti ukupne biomase biofilma.

### 8.3. Uspostavljanje neletalnih genotoksičnih doza UVC i UVA zračenja

Tabela 8.2. Vijabilnost MRC-5 i Hs 294T ćelija nakon izlaganja UVC i UVA zračenju

Doze zračenja	UVC				UVA				
	MRC-5		Hs 294T		MRC-5		Hs 294T		
broj ćelija/mL	% vijabilnosti	broj ćelija/mL	% vijabilnosti	broj ćelija/mL	% vijabilnosti	broj ćelija/mL	% vijabilnosti	broj ćelija/mL	% vijabilnosti
0 J m <sup>-2</sup>	1,32*10 <sup>6</sup>	100 %	1,65*10 <sup>6</sup>	100%	0 J cm <sup>-2</sup>	1,77*10 <sup>6</sup>	100%	1,65*10 <sup>6</sup>	100%
45 J m <sup>-2</sup>	1,12*10 <sup>6</sup>	84%	1,56*10 <sup>6</sup>	96%	1 J cm <sup>-2</sup>	1,54*10 <sup>6</sup>	87%	1,62*10 <sup>6</sup>	98%
54 J m <sup>-2</sup>	1,02*10 <sup>6</sup>	77%	1,40*10 <sup>6</sup>	84%	2 J cm <sup>-2</sup>	1,43*10 <sup>6</sup>	81%	1,54*10 <sup>6</sup>	93%
63 J m <sup>-2</sup>	0,99*10 <sup>6</sup>	75%	1,29*10 <sup>6</sup>	78%	3 J cm <sup>-2</sup>	1,29*10 <sup>6</sup>	73%	1,45*10 <sup>6</sup>	87%

### 8.4. Ispitivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata *G. lutea*

#### 8.4.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala

Tabela 8.3. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala ekstraktima *G. lutea*

	10	50	100	200	400
GLK 50%EtOH	2,9±1,1	8,0±1,4	22,1±2,9	34,0±4,8	58,0±0,1
GLL 50%EtOH	42,6±1,5	61,6±0,2	67,6±0,4	75,5±0,9	87,2±0,5
GLK MeOH	1,9±0,1	9,4±3,2	28,3±2,6	49,9±2,9	76,5±3,0
GLL MeOH	36,3±3,8	50,1±1,9	66,6±3,5	74,5±4,4	86,3±1,4
GLvK MeOH	3,8±1,8	20,7±3,2	40,5±4,5	55,9±4,8	59,0±8,0
GLvI MeOH	19,3±1,5	34,5±4,2	59,5±4,4	75,5±2,0	85,1±4,8
Genciopikrozid	10,6±0,7	13,4±1,1	20,8±0,1	42,6±0,6	82,2±1,3
Sverozid	0,9±0,2	1,5±0,5	6,2±1,2	15,9±2,5	30,3±1,6
Svertiamarin	1,1±0,5	5,5±2,3	12,6±1,8	22,2±3,0	42,1±0,5
Mangiferin	33,8±2,1	82,7±9,2	90,7±2,1	92,4±1,4	93,0±2,5
Izoviteksin	1,6±0,4	5,2±1,1	18,4±1,2	40,7±3,1	88,4±1,3
Homoorientin	11,2±0,7	15,7±3,2	17,8±0,7	37,5±9,2	72,7±3,1
Askorbinska kiselina	26,6±1,6	50,7±0,5	71,7±0,7	89,5±6,7	96,6±0,2

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti % neutralizacije DPPH radikala±standardne devijacije.

### 8.4.2. Sposobnost inhibicija lipidne peroksidacije

Tabela 8.4. Uticaj ekstrakata *G. lutea* na inhibiciju lipidne peroksidacije

Koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )/Ekstrakti	12	24	48	96	192	384
GLK 50% EtOH	*nt	7,8 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 0,2	9,9 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 0,5	13,2 $\pm$ 0,7
GLL 50% EtOH	nt	3,3 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 1,7	9,6 $\pm$ 1,1	12,1 $\pm$ 3,1	17,8 $\pm$ 0,8
GLK MeOH	nt	7,2 $\pm$ 0,8	8,5 $\pm$ 0,6	14,8 $\pm$ 0,1	16,2 $\pm$ 1,0	27,4 $\pm$ 2,7
GLL MeOH	nt	4,1 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 0,6	13,1 $\pm$ 1,3	23,4 $\pm$ 3,9	35,6 $\pm$ 1,0
GLvK MeOH	4,4 $\pm$ 1,4	7,0 $\pm$ 1,0	8,2 $\pm$ 0,8	10,7 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 0,2	nt
GLvI MeOH	2,7 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 0,8	22 $\pm$ 0,7	35,1 $\pm$ 1,8	nt
BHT	24,3 $\pm$ 0,8	33,3 $\pm$ 0,5	46,8 $\pm$ 0,0	51,5 $\pm$ 0,6	63,2 $\pm$ 0,3	72,2 $\pm$ 0,1

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti inhibicije (%) lipidne peroksidacije  $\pm$  standardne devijacije.

\*nt-nije testirano

### 8.4.3. Određivanje sposobnosti ekstrakata da heliraju jone gvožđa

Tabela 8.5. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstraktima *G. lutea*

Koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )/Ekstrakti	62,5	125	250	500	1000
GLK 50% EtOH	2,2 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 1,0	18,2 $\pm$ 0,1	35,0 $\pm$ 0,0
GLL 50% EtOH	12,4 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,7	37,8 $\pm$ 0,6	61,7 $\pm$ 0,3	80,9 $\pm$ 0,1
GLK MeOH	3,9 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,7	8,6 $\pm$ 0,6	16,6 $\pm$ 0,6	37,9 $\pm$ 0,2
GLL MeOH	3,5 $\pm$ 0,2	9,4 $\pm$ 1,0	15,9 $\pm$ 0,2	47,3 $\pm$ 1,2	70,2 $\pm$ 0,6
GLvK MeOH	4,0 $\pm$ 0,8	8,3 $\pm$ 0,6	10,8 $\pm$ 0,6	34,2 $\pm$ 0,4	57,3 $\pm$ 0,2
GLvI MeOH	6,3 $\pm$ 0,6	14,4 $\pm$ 0,5	25,0 $\pm$ 0,3	56,4 $\pm$ 0,5	73,6 $\pm$ 0,2
Limunska kiselina	1,8 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	22,9 $\pm$ 0,6
EDTA	26,9 $\pm$ 0,1	42,3 $\pm$ 0,2	57,8 $\pm$ 1,8	75,0 $\pm$ 0,5	97,3 $\pm$ 0,3

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti heliranja jona gvožđa  $\pm$  standardne devijacije (%).

### 8.4.4. Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP test)

Tabela 8.6. Sposobnost redukcija jona gvožđa ekstraktima *G. lutea*

Koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )/Ekstrakti	62,5	125	250	500	1000
GLK 50% EtOH	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03
GLL 50% EtOH	0,26 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,14	1,66 $\pm$ 0,12
GLK MeOH	0,06 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,03
GLL MeOH	0,18 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,6	1,26 $\pm$ 0,05
GLvK MeOH	0,05 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,04
GLvI MeOH	0,18 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,05	1,42 $\pm$ 0,01
Askorbinska kiselina	0,17 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,08	1,84 $\pm$ 0,07

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti apsorbanci na 700nm  $\pm$  standardne devijacije.

### 8.4.5. Određivanje sposobnosti redukcije jona bakra (CUPRAC test)

Tabela 8.7. Sposobnost redukcije jona bakra ekstraktima *G. lutea*

Koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )/Ekstrakti	62,5	125	250	500	1000
GLK 50% EtOH	0,07±0,00	0,11±0,02	0,14±0,02	0,29±0,01	0,41±0,01
GLL 50% EtOH	0,14±0,02	0,23±0,01	0,53±0,01	0,65±0,02	1,02±0,04
GLK MeOH	0,06±0,05	0,07±0,01	0,19±0,05	0,32±0,07	0,60±0,01
GLL MeOH	0,18±0,00	0,24±0,06	0,54±0,05	0,91±0,02	1,38±0,06
GLvK MeOH	0,05±0,00	0,11±0,01	0,18±0,06	0,36±0,01	0,62±0,01
GLvI MeOH	0,15±0,03	0,20±0,01	0,41±0,04	0,58±0,01	0,90±0,02
$\alpha$ -tokoferol	0,39±0,03	0,54±0,05	0,87±0,09	1,29±0,04	2,16±0,07

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti apsorbanci na 450nm±standardne devijacije.

## BIOGRAFIJA

Stefana Cvetković je rođena 21.12.1989. u Vranju, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/09. Diplomirala je na modulu Molekularna biologija i fiziologija 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,18. Školske 2014/15 upisala je master studije na matičnom fakultetu na modulu Biologija mikroorganizama i master rad odbranila sa ocenom 10. Školske 2015/16 godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Mikrobiologija. Od juna 2018. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na projektu osnovnih istraživanja „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“ OI172058. U decembru 2019. godine prelazi u zvanje istraživač saradnik. Kao student doktorskih studija učestvuje u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju iz predmeta Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji. Počev od školske 2016/17 učestvuje u realizaciji seminara iz Biologije u Istraživačkoj stanici Petnica, u svojstvu saradnika. Od novembra 2020. godine izabrana je u zvanje asistent na Katedri za mikrobiologiju.

Stefana Cvetković je član Srpskog biološkog društva, Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva genetičara Srbije, Evropskog društva za mutagenezu životne sredine i genomiku (*European Environmental Mutagenesis and Genomics Society*, EEMGS) i Federacije evropskih mikrobioloških društava (*Federation of European Microbiological Societies*, FEMS). Do sada je objavila šest naučnih radova u međunarodnim časopisima kategorije M21a, M22 i M23. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu učestvovala je sa 21 saopštenjem.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Стефана Д. Цветковић  
број индекса Б3010/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстракта линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у  
плантажним и лабораторијским условима

- 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, 01.06.2021.

Стефана Д. Цветковић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора           Стефана Д. Цветковић          

Број индекса           Б3010/2015          

Студијски програм           Биологија          

Наслов рада Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстраката линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима

Ментор           Проф. др Биљана Николић          

Потписани/а           Стефана Д. Цветковић          

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.06.2021.

          Стефана Д. Цветковић

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстраката линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима

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, 01.06.2021.

  
Stefana Njivekovic

1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.