

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana Z. Matić

***IN VITRO* ISPITIVANJE ANTITUMORSKE
AKTIVNOSTI EKSTRAKATA ENDEMIČNE
BILJNE VRSTE *Helichrysum zivojinii*
Černjavski et Soška**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana Z. Matić

***IN VITRO* INVESTIGATION OF
ANTITUMOR ACTIVITIES OF EXTRACTS
OF ENDEMIC PLANT SPECIES
Helichrysum zivojinii Černjavski et Soška**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

dr Dušanka Savić-Pavićević
vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Zorica Juranić
naučni savetnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Vlatka Vajs
redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Ivana Aljančić
naučni savetnik Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Univerziteta u Beogradu

dr Katarina Šavikin
naučni savetnik Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić"

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u okviru projekta 175011 „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“ pod rukovodstvom dr Zorice Juranić, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Ispitivani ekstrakti su dobijeni i hemijski okarakterisani u Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu u okviru projekta 172053 pod rukovodstvom prof. dr Vlatke Vajs, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Neizmernu zahvalnost dugujem mentoru dr Zorici Juranić na svemu što me je naučila od samih početaka mog bavljenja naučno-istraživačkim radom do danas. Svojim znanjem, iskustvom, idejama i dragocenim savetima pružila je izuzetan intelektualni doprinos mom razvoju kao istraživača. Puno hvala na svim naučnim izazovima i brojnim prilikama koje mi je pružila tokom zajedničkog rada.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Dušanki Savić-Pavićević na stručnoj pomoći i vrednim savetima prilikom izrade doktorske disertacije.

Prof. dr Vlatki Vajs i dr Ivani Aljančić sam posebno zahvalna na prilici da ispitujem ekstrakte endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii*, na odličnoj saradnji, ukazanom poverenju, kao i na dragocenim sugestijama koje su unapredile moju doktorsku disertaciju.

Dr Katarini Šavikin dugujem zahvalnost na izuzetnoj saradnji u proteklom periodu, kao i na korisnim savetima tokom pisanja doktorske teze.

Zahvaljujem se kolegama iz Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora na prijatnom radnom okruženju, timskom radu, savetima, podršci i razumevanju: Tanji Petrović, kojoj sam posebno zahvalna na izuzetnoj stručnoj pomoći i savetima u izvođenju eksperimentalnog dela rada, dr Željku Žižku, kome zahvaljujem na prenetom znanju i pruženoj pomoći; zahvaljujem se i svojim dragim kolegamicama Mariji Đorđić Crnogorac, Ani Damjanović Veličković, Branki Kolundžiji, Nađi Grozdanić-Stanisavljević, Tatjani Stanojković, Milici Grujić i Irini Besu Žižak. Zahvalnost dugujem i kolegici dr Nevenki Gligorijević iz Laboratorije za eksperimentalnu farmakologiju na korisnim savetima. Zahvaljujem se i svim kolegama iz Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju.

***In vitro* ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata
endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii*
Černjavski et Soška**

Rezime

Bioaktivni sastojci biljnih vrsta nalaze se u centru pažnje istraživanja u savremenoj onkologiji zbog svoje moguće uloge u hemiopreveniraju, odnosno inhibiciji različitih koraka procesa maligne transformacije. Antikancerski potencijal biljnih jedinjenja zasniva se na mogućnosti redukcije slobodnih radikala, regulacije karcinogen-aktivirajućih i karcinogen-detoksifikujućih enzima, kao i mogućnosti inhibicije inflamatornih citokina, zatim na mogućnosti da dovedu do promena u regulaciji faktora rasta i ciljnih molekula signalnih puteva koji kontrolišu ćelijski rast, proliferaciju i apoptozu, kao i angiogenezu, invaziju i metastazu malignih ćelija.

Osnovni cilj istraživanja je bio da se ispita citotoksičnost, odnosno odrede intenzitet i mehanizmi citotoksičnog dejstva pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška prema specifičnom malignom ćelijskom tipu, kao i da se odredi selektivnost u antitumorskom dejstvu prema nizu humanih malignih ćelija, kako u odnosu na poreklo - tip tumora, tako i u odnosu na zdrave mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC). Kako bi se doprinelo boljoj proceni antitumorskog potencijala ekstrakata, ispitan je i uticaj ekstrakata na invazivnost humanih metastatskih malignih ćelija i na angiogenezu endotelijalnih ćelija. Hemijska karakterizacija biljnih ekstrakata je imala za cilj da omogući razumevanje veze između kvalitativnog sastava i intenziteta citotoksične aktivnosti ekstrakata.

Citotoksična aktivnost pet ekstrakata endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška je ispitana na sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), Fem-x (melanom), K562 (mijeloidna leukemija), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), kao i prema EA.hy926

ćelijama (transformisane humane endotelijalne ćelije umbilikalne vene). Obzirom da su pri primeni antitumorskih agenasa u direktnom kontaktu sa njima i zdrave imunokompetentne ćelije koje su uključene u imunsku kontrolu razvoja tumora, njihova vijabilnost je od izuzetnog značaja za opštu kontrolu tumora. Zato je ispitano citotoksično dejstvo biljnih ekstrakata na normalne PBMC. Ispitivani ekstrakti (heksanski (1), dihlormetanski (2), etil-acetatni (3), *n*-butanolski (4) i metanolski ekstrakt (5)), su ispoljili selektivnu dozno-zavisnu citotoksičnu aktivnost prema ciljnim malignim ćelijskim linijama, kao i prema zdravim imunokompetentnim PBMC koje su bile stimulisane da proliferišu, dok je njihova citotoksična aktivnost bila manje izražena prema nestimulisanim PBMC. Svi ispitivani ekstrakti su pokazali znatno viši intenzitet citotoksične aktivnosti prema HeLa, Fem-x i K562 ćelijama u odnosu na intenzitet aktivnosti prema normalnim PBMC, kako prema nestimulisanim PBMC tako i prema PBMC koje su mitogenom bile stimulisane da proliferišu. Biljni ekstrakti su pokazali slabiji intenzitet citotoksične aktivnosti prema nestimulisanim PBMC u odnosu na PBMC koje su bile stimulisane fitohemaglutininom da proliferišu. Veoma je važno da se istakne da su heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) ispoljili visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema ciljnim HeLa i K562 malignim ćelijama u odnosu na normalne PBMC.

Morfološka analiza tipa ćelijske smrti HeLa ćelija, kao i analiza distribucije HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon dejstva ekstrakata, pokazale su da je svaki od pet testiranih ekstrakata pri višim koncentracijama indukovao apoptozu u ciljnim HeLa ćelijama. Primenom specifičnih inhibitora kaspaza je utvrđeno da su ispitivani ekstrakti uzrokovali apoptozu HeLa ćelija posredstvom unutrašnjeg puta aktivacije i spoljašnjeg puta aktivacije.

Analiza uticaja ekstrakata na migraciju i invazivnost humanih MDA-MB-231 ćelija adenokarcinoma dojke je pokazala da je heksanski ekstrakt (1) primenjen pri niskoj netoksičnoj koncentraciji ispoljio najizraženije supresivno dejstvo na migraciju, kao i na invazivni potencijal ciljnih ćelija. Dihlormetanski ekstrakt (2) pri niskoj netoksičnoj koncentraciji je ostvario značajan inhibitorski efekat na invazivni potencijal MDA-MB-231 ćelija.

Svaki od pet testiranih ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* primenjen pri niskoj netoksičnoj koncentraciji pokazao je svojstvo da inhibira migraciju humanih transformisanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene EA.hy926, odnosno ostvarili su supresivno dejstvo na inicijalni korak u procesu angiogeneze. Pored značajnog inhibitornog dejstva na migraciju ciljnih EA.hy926 ćelija, heksanski ekstrakt (1) je ispoljio i izraženu antiangiogenetsku aktivnost. Ostali testirani ekstrakti su ispoljili blag antiangiogenetski efekat *in vitro*.

In vitro ispitivanje antitumorske aktivnosti pet ekstrakata endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška je ukazalo na značajan antitumorski potencijal heksanskog (1) i dihlormetanskog (2) ekstrakta, obzirom da su pomenuti ekstrakti ispoljili izraženo citotoksično dejstvo prema ciljnim malignim ćelijskim linijama, zatim visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema specifičnim malignim ćelijskim tipovima u odnosu na normalne PBMC, kao i antiinvazivna i antiangiogenetska svojstva.

Ključne reči: *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška, citotoksičnost, maligne ćelije, normalne PBMC, apoptoza, invazivnost, angiogeneza *in vitro*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Eksperimentalna onkologija

UDK broj: [582.998.1:615.332]:576.5 (043.3)

***In vitro* investigation of antitumor activities of extracts of
endemic plant species *Helichrysum zivojinii***

Černjavski et Soška

Abstract

Bioactive constituents of plants are in the center of attention of modern cancer research due to their prospective role in cancer chemoprevention based on the suppression of different stages in malignant transformation. The anticancer potential of plant compounds could be attributed to their ability to scavenge free radicals, regulate carcinogen-activating and –detoxifying enzymes and inhibit inflammatory cytokines, than to induce changes in the regulation of growth factors and target molecules in oncogenic signal transduction pathways implicated in cell growth, proliferation, apoptosis, as well as in angiogenesis, invasion and metastasis of cancer cells.

The aim of this research was to investigate the cytotoxicity, more exactly to determine the intensity and mechanisms of the cytotoxic actions of the five extracts isolated as fractions from the endemic plant species *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška against specific malignant cell type, as well as to determine the selectivity in their antitumor actions against malignant cell lines of different tumor origin and against healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC). To fully evaluate the antitumor potential of extracts, the examination of their effects on the invasiveness of human metastatic malignant cells as well as on the angiogenesis of endothelial cells was done. Chemical characterization of plant extracts was performed in order to understand the relation between qualitative composition and intensity of cytotoxic action of the investigated extracts.

The cytotoxic activities of the five extracts of the endemic plant species *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška were tested against selected human malignant cell lines: HeLa (cervix adenocarcinoma), Fem-x (melanoma), K562 (myelogenous leukemia), MDA-MB-361 (breast adenocarcinoma), MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma), as well as against

transformed human umbilical vein endothelial EA.hy926 cells. Considering the possible effects of applied antitumor drugs on normal healthy immunocompetent cells, which are implicated in the immune control of tumor development, their viability is significant for tumor control. For that reason, the cytotoxic actions of the plant extracts were evaluated against normal PBMC. The investigated extracts (hexane extract (1), dichloromethane extract (2), ethyl-acetate extract (3), *n*-butanol extract (4) and methanol extract (5)) exerted selective dose-dependent cytotoxic actions against target malignant cell lines and against healthy immunocompetent PBMC stimulated to proliferate, while their cytotoxic actions were not as pronounced against unstimulated PBMC. All of these extracts exhibited considerably higher intensities of cytotoxic action against HeLa, Fem-x and K562 cells when compared to intensities of action against PBMC, both resting and mitogen-stimulated. The plant extracts showed lower intensity of cytotoxic activity against resting PBMC in comparison to PBMC stimulated to proliferate by the mitogen phytohemagglutinin. It is very important to stress that hexane extract (1) and dichloromethane extract (2) exhibited highly selective antitumor actions against target HeLa and K562 malignant cells in comparison to their actions against normal PBMC.

Morphological analysis of the mode of HeLa cell death in addition to analysis of changes in the cell cycle phase distribution of target HeLa cells treated with the extracts, showed that each of the five investigated extracts applied at a higher concentration induced apoptotic cell death. The apoptotic mechanisms induced by the tested extracts were determined using specific caspase inhibitors; it was demonstrated that extracts induced apoptosis in target HeLa cells through the activation of both intrinsic and extrinsic signaling pathways.

Examination of effects of the extracts on the migration and invasiveness of human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells showed that hexane extract (1) applied at a low non-toxic concentration exhibited the most prominent inhibitory effect on the migration as well as on the invasive potential of target cells. Dichloromethane extract (2) applied at a low non-toxic concentration showed the notable inhibition of MDA-MB-231 cells invasion.

Each of the five tested *Helichrysum zivojinii* extracts applied at a non-toxic concentrations was found to inhibit migration of human transformed umbilical vein

endothelial EA.hy926 cells and therefore exerted suppressive action on this initial step in angiogenesis. The prominent inhibitory effect of the hexane extract (1) on EA.hy926 cells migration was associated with a notable antiangiogenic action of this extract. The other four tested extracts demonstrated mild antiangiogenic activities *in vitro*.

In vitro investigation of antitumor activities of the five extracts of the endemic plant species *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška points to significant antitumor potential of the hexane extract (1) and dichloromethane extract (2) which can be attributed to their pronounced cytotoxic actions against target malignant cell lines, high selectivity in their antitumor actions against specific malignant cell types in comparison to normal PBMC, as well as to exerted antiinvasive and antiangiogenic properties.

Key words: *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška, cytotoxicity, malignant cells, normal PBMC, apoptosis, invasiveness, angiogenesis *in vitro*

Scientific field: Biology

Scientific discipline: Experimental oncology

UDC number: [582.998.1:615.332]:576.5 (043.3)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Značaj biljaka za razvoj antitumorskih lekova.....	1
1.2. Moguća uloga jedinjenja biljaka u hemioprevenciji i terapiji raka.....	5
1.3. Fenolna jedinjenja biljaka.....	7
1.3.1. Flavonoidi.....	7
1.3.2. Neflavonoidna fenolna jedinjenja.....	9
1.4. Osnovna svojstva malignih ćelija.....	12
1.5. Molekularni mehanizmi antikancerskog dejstva jedinjenja biljaka.....	18
1.6. Biološka aktivnost biljaka roda <i>Helichrysum</i>	22
2. Ciljevi istraživanja.....	26
3. Materijal i metode.....	27
3.1. Ekstrakti endemične biljne vrste <i>Helichrysum zivojinii</i> Černjavski et Soška.....	27
3.2. Hemijska karakterizacija biljnih ekstrakata.....	28
3.3. Ćelijske linije.....	29
3.4. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	30
3.5. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata.....	31
3.5.1. Tretman ćelijskih linija.....	31
3.5.2. Tretman PBMC.....	32
3.5.3. Određivanje preživljavanja ćelija.....	33
3.6. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti.....	35
3.7. Analiza faza ćelijskog ciklusa.....	37

3.8. Određivanje ciljnih kaspaza.....	39
3.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata na migraciju ćelija – <i>in vitro</i> "scratch"esej.....	41
3.10. Test invazivnosti (" <i>invasion assay</i> ")	42
3.11. <i>In vitro</i> esej angiogeneze – " <i>endothelial cell tube formation</i> " esej	44
4. Rezultati.....	46
4.1. Hemijska analiza ekstrakata biljke <i>Helichrysum zivojinii</i>	46
4.2. <i>In vitro</i> citotoksična aktivnost ekstrakata biljke <i>Helichrysum zivojinii</i>	48
4.3. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti.....	55
4.4. Analiza promena u distribuciji faza ćelijskog ciklusa.....	56
4.5. Određivanje ciljnih kaspaza.....	60
4.6. Efekat ekstrakata na migraciju ćelija.....	64
4.7. Efekat ekstrakata na invazivnost	67
4.8. Efekat ekstrakata na angiogenezu.....	68
5. Diskusija.....	70
6. Zaključci	87
7. Literatura	89

1. Uvod

1.1. Značaj biljaka za razvoj antitumorskih lekova

Biljke predstavljaju izuzetno bogat izvor potencijalnih antitumorskih agenasa koji mogu da inhibiraju inicijaciju, promociju i progresiju kancera, delujući na ciljne molekule onkogenih signalnih puteva. Bioaktivni sastojci biljnih vrsta nalaze se u centru pažnje istraživanja u savremenoj onkologiji zbog svoje moguće uloge u hemiopreveniraju, odnosno inhibiciji različitih koraka procesa maligne transformacije. Antikancerski potencijal biljnih konstituenata zasniva se na mogućnosti redukcije slobodnih radikala, regulacije karcinogen-aktivirajućih i karcinogen-detoksifikujućih enzima, kao i mogućnosti inhibicije inflamatornih citokina, zatim na mogućnosti da dovedu do promena u regulaciji faktora rasta i ciljnih molekula signalnih puteva koji kontrolišu ćelijski rast, proliferaciju i apoptozu, kao i angiogenezu, invaziju i metastazu malignih ćelija [1-4]. Pronalaženje novih antikancerskih agenasa koji bi ispoljavali izraženo selektivno antitumorsko dejstvo prema malignim ćelijama, kao i minimalno toksično dejstvo prema zdravim netransformisanim ćelijama, a posebno prema zdravim imunokompetentnim ćelijama, koje su uključene u imunsku kontrolu supresije tumora, od izuzetnog je značaja za razvoj novih lekova u onkologiji.

Značajno mesto među citotoksičnim lekovima koji se koriste u hemioterapiji malignih tumora zauzimaju sekundarni metaboliti biljaka ili njihovi polusintetički derivati, kao i jedinjenja sintetisana na osnovu strukture izvornog biljnog jedinjenja, poput taksana, vinka alkaloida, epipodofilotoksina i kamptotecina [5-8].

Jedan od prvih antikancerskih lekova koji je sedamdesetih godina prošlog veka izolovan iz ekstrakta pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) je diterpenoid taksol, poznat pod imenom paklitaksel [9]. Obzirom da bi dobijanje potrebnih količina taksola, prisutnog u kori i iglicama pacifičke tise, dovelo do uništenja ovog retkog četinarara, bilo je neophodno pronaći

alternativne načine sinteze paklitaksela. Grupa istraživača na čelu sa Robertom Holtonom uspjela je da sintetiše paklitaksel koristeći 10-deacetilbakatin, izolovan iz iglica evropske tise (*Taxus baccata*), kao prekursor [10,11]. Devedesetih godina dvadesetog veka proces polusinteze paklitaksela je i patentiran; farmaceutska kompanija Bristol Myers Squibb preuzela je licencu nad ovim i budućim patentima. Polazeći od 10-deacetilbakatina sintetisan je još jedan taksan – docetaksel (poznat i kao taksotere), polusintetički analog paklitaksela. Oba taksana su antimitotski hemioterapeutici koji stimulišu polimerizaciju mikrotubula i time usporavaju ili potpuno inhibiraju mitozu i dovode do apoptoze malignih ćelija. Pokazano je da se taksani vežu za β -tubulin na unutrašnjoj strani mikrotubule, pri čemu indukujući konformacionu promenu povećavaju afinitet tubulina prema susednim molekulima, stabilizuju mikrotubule i povećavaju nivo polimerizacije mikrotubula [12]. Paklitaksel se danas primenjuje u terapiji kancera dojke, karcinoma jajnika, Kaposijevog sarkoma asociranog sa AIDS-om, kao i nesitnoćelijskog karcinoma pluća [13]. Docetaksel se koristi u terapiji lokalno uznapredovalog ili metastatskog kancera dojke, uznapredovalog kancera stomaka, kao i u terapiji lokalno uznapredovalog ili metastatskog nesitnoćelijskog kancera pluća, hormon-refraktornog metastatskog kancera prostate i skvamoznog ćelijskog karcinoma glave i vrata [13]. Razvijena je i nova druga generacija taksana s ciljem da se poveća njihova antitumorska efikasnost i selektivnost, kao i da se smanji štetno toksično dejstvo. *Nab*-paklitaksel (Abraxane®), forma paklitaksela vezanog za albumin u vidu nanočestice je odobren od strane FDA (engl. *U.S. Food and Drug Administration*) za kliničku upotrebu u terapiji raka dojke i nesitnoćelijskog karcinoma pluća, dok je kabazitaksel, polusintetički dimetiloksi derivat docetaksela, odobren za terapiju hormon-refraktornog metastatskog kancera prostate [14]. U toku su klinička istraživanja moguće primene nekoliko analoga i prolekova taksana.

Ekstrakti zimzelene biljke *Catharanthus rosea*, poznate i kao *Vinca rosea*, su se primenjivali u tradicionalnoj medicini mnogih naroda u tretmanu hiperglikemije, hemoragije, bolova zuba, kao i za zaceljivanje rana. Upravo je hipoglikemijski efekat ekstrakata ove biljke podstakao dve istraživačke grupe da nezavisno započnu hemijsku karakterizaciju ekstrakata, izolaciju i identifikaciju biološki aktivnih sekundarnih

metabolita [15]. Otkriveno je da ekstrakti lišća biljke *Catharanthus rosea* dovode do dužeg preživljavanja ili čak izlečenja miševa sa akutnom limfoblastnom leukemijom. Od 30 izolovanih alkaloida, najznačajniju antitumorsku aktivnost pokazala su dva jedinjenja – vinblastin i vinkristin [15], koja su postala predmet brojnih kliničkih istraživanja. Danas se vinblastin primenjuje u terapiji Hočkinovog i non-Hočkinovog limfoma, Kapošijevog sarkoma, horiokarcinoma, kancera dojke i kancera testisa [13]. Vinkristin se koristi u terapiji akutne leukemije, Hočkinovog i non-Hočkinovog limfoma, zatim rabdomiosarkoma, neuroblastoma i Vilmsovog tumora [13]. Razvijeni su i novi polusintetički vinka alkaloidi: vinorelbin i vinflunin [16]. Vinorelbin se primenjuje u terapiji nesitnoćelijskog kancera pluća i metastatskog kancera dojke [13]. Vinka alkaloidi su antimitotski hemioterapeutici koji pri višim koncentracijama dovode do depolimerizacije mikrotubula i razgrađuju mitotsko deobno vreteno, čime dovode do zastoja u mitozu malignih ćelija i njihove apoptoze [12]. Vinblastin se veže za specifični "Vinca vezujući domen" na β -tubulinu, indukujući konformacionu promenu tubulina, koja dovodi do povećanja afiniteta prema molekulima β -tubulina. Međutim, vezivanje jednog ili dva molekula vinblastina za β -tubulin na pozitivnom kraju mikrotubule dovoljno je da vinblastin pri nižim koncentracijama uzrokuje značajnu supresiju dinamike mikrotubula, odnosno da dovede do značajnog smanjenja stope rasta i skraćivanja mikrotubula [12].

Zahvaljujući brojnim lekovitim svojstvima, biljke *Podophyllum peltatum* (američka mandragora) i *Podophyllum emodi*, srodna vrsta sa Himalaja, se koriste u narodnoj medicini više od 1000 godina. Podaci iz literature ukazuju da su se ekstrakti ovih biljaka dobijeni od korena i rizoma, koji su naročito bogati lignanima i glikozidima lignana, upotrebljavali kao emetici i purgativi, zatim kao antihelmintici, protivotrovi za zmijski otrov, kao sredstva za iskašljavanje, a poznata je bila i njihova primena u tretmanu raka [17,18]. Kao najznačajniji bioaktivni sastojak ekstrakta identifikovan je podofilotoksin. Iako je ispoljio značajna antitumorska svojstva [17,18], klinička istraživanja su ukazala na izrazitu toksičnost podofilotoksina [19,20]. Među brojnim novosintetisanim derivatima podofilotoksina, kao najefikasniji antitumorski agensi izdvojili su se etopozid i tenipozid [21]. Etopozid se primenjuje u terapiji karcinoma testisa, sitnoćelijskog i nesitnoćelijskog

karcinoma pluća, zatim u terapiji limfoma, leukemija, kao i karcinoma jajnika i neuroblastoma [13,22,23]. Dok se analog etopozida tenipozid koristi u terapiji leukemija i limfoma, kao i malignih tumora centralnog nervnog sistema [13,22,23]. Etopozid i tenipozid inhibiraju DNK topoizomerazu II; formiranjem ternarnog kompleksa sa DNK topoizomerazom II i DNK dovode do pojave brojnih dvostrukih prekida na molekulu DNK, a zatim i do pokretanja apoptotske ćelijske smrti [21-23]. Kaspaza-2 bi mogla da učestvuje u pokretanju unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze pri pojavi oštećenja u genomu ćelija koje su tretirane etopozidom [24].

Kamptotecini predstavljaju još jednu grupu citotoksičnih lekova biljnog porekla koji imaju značajnu ulogu u terapiji malignih bolesti [25]. Iz ekstrakta dobijenog iz kore kineskog drveta *Camptotheca acuminata* 1966. godine izolovan je kamptotecin, pentaciklični hinolinski alkaloid [26]. U prekliničkim, kao i u početnim fazama kliničkih istraživanja, kamptotecin je pokazao obećavajuća antitumorska svojstva. Međutim, kamptotecin je ispoljio i niz nepovoljnih svojstava, kao što su visoka toksičnost, loša rastvorljivost i hidroliza u fiziološkim uslovima, zbog čega je upotreba ovog jedinjenja u kliničkoj praksi bila onemogućena. Kako bi se prevazišle loše karakteristike kamptotecina, sintetisani su brojni derivati, među kojima su se kao najbolji pokazali polusintetički analozi irinotekan i topotekan, koji su i odobreni za kliničku upotrebu [25]. Irinotekan se koristi u terapiji metastatskog kolorektalnog kancera, dok se topotekan primenjuje u terapiji kancera grlića materice, kancera jajnika i sitnoćelijskog kancera pluća [13,25]. DNK topoizomeraza I je ciljni molekul kamptotecina [27,28]. Naime, kamptotecini se vežu za kompleks DNK topoizomeraze I i DNK, dovode do stabilizacije kompleksa i sprečavaju ponovnu ligaciju, čime indukuju pojavu jednolančanih prekida na DNK. Nailazak replikacione viljuške na kompleks koji čine specifični kamptotecin, DNK i DNK topoizomeraza I, uzrokuje pojavu ireverzibilnih dvostrukih prekida na DNK, a zatim i do apoptoze. Stoga su kamptotecini citotoksični agensi koji su specifični za S fazu ćelijskog ciklusa [27,28]. Mnoštvo sintetičkih derivata kamptotecina koji su razvijeni s ciljem da se poveća antitumorska aktivnost, solubilnost, stabilnost, kao i dostupnost u organizmu, a da se smanji štetni, toksični efekat, predmet su kliničkih istraživanja, kao što su rubitekan, lutrotekan,

egzatekan, gimatekan, karenitekan, silatekan, diflomotekan [25]. Takođe, razvijeni su i različiti nekovalentni (micele, lipozomi, nanočestice, hidrogelovi), kao i kovalentni makromolekularni konstrukti (micele, linearni ili razgranati polimeri, proteini) kamptotecina s ciljem da se terapijski agens efikasnije isporuči do ciljnog mesta [25].

1.2. Moguća uloga jedinjenja biljaka u hemioprevenciji i terapiji raka

Literaturni podaci ukazuju na mogućí značaj voća i povrća, zatim različitih prirodnih proizvoda i biljnih ekstrakata, kao i brojnih jedinjenja izolovanih iz biljaka, u hemioprevenciji i/ili terapiji malignih oboljenja. Prvobitno je bilo zastupljeno mišljenje da isključivo makronutrijenti (ugljeni hidrati, proteini, masti, biljna vlakna) i mikronutrijenti (vitamini i minerali) mogu da imaju povoljne efekte na zdravlje ljudi. U međuvremenu je otkriveno mnoštvo različitih sastojaka biljaka koji bi mogli da budu korisni u prevenciji kancera, ali i u prevenciji hroničnih bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja [4].

Hemioprevencija podrazumeva upotrebu prirodnih ili sintetičkih agenasa s ciljem da suprimiraju, odnosno uspore ili spreče karcinogenezu [2,4,29,30]. Hemiopreventivni agensi mogu da se podele u dve kategorije: blokirajuće i suprimirajuće agense [31]. Hemiopreventivni blokirajući agensi blokiraju inicijacionu fazu tumorigeneze, odnosno sprečavaju karcinogene da stignu do ciljnog mesta, inhibiraju njihovu aktivaciju, ili onemogućavaju njihovu interakciju sa DNK, RNK ili proteinima [4]. Hemiopreventivni suprimirajući agensi inhibiraju rast i preživljavanje maligno transformisanih ćelija, odnosno suprimiraju fazu promocije i progresije tumora [4].

U odnosu na osnovne karakteristike maligne ćelije, hemiopreventivni agensi mogu da se podele na: inhibitore ćelijskog ciklusa, modulare apoptoze, inhibitore intraćelijskih puteva prenosa signala, antiangiogene agense i antiinvazivne agense [30].

Postoje tri nivoa hemioprevencije:

1. primarna hemioprevencija kancera kod zdravih osoba, kao i osoba koje poseduju visok rizik od pojave kancera;
2. sekundarna hemioprevencija kancera kod pacijenata sa prekanceroznim lezijama ili kod pacijenata sa preinvazivnim displazijama;
3. tercijarna hemioprevencija kod pacijenata koji su uspešno lečeni od kancera kako bi se sprečila ponovna pojava malignog tumora, zatim usporila ili potpuno sprečila pojava metastaza, kao i razvoj novih sekundarnih primarnih tumora [29,30].

Primena hemiopreventivnih agenasa biljnog porekla kod pacijenata sa kancerom u kombinaciji sa hemioterapeuticima bi mogla da ima povoljan aditivan ili sinergistički efekat, koji bi mogao da doprinese povećanju uspešnosti onkološke terapije [2]. Pokazano je da prirodni proizvodi i jedinjenja izolovana iz biljaka mogu da povećaju osetljivost hemioirezistentnih malignih ćelija na indukciju apoptoze ili na inhibiciju proliferacije, kao i da smanje štetne toksične efekte hemioterapije [32]. Dodatno, rezultati brojnih istraživanja ukazuju da biljni ekstrakti i jedinjenja ispoljavaju radioprotektivni efekat na normalne ćelije, kao i da mogu da povećaju efekat jonizujućeg zračenja na maligne ćelije [33]. Na taj način sastojci biljaka bi mogli da povećaju efikasnost i smanje toksičnost radioterapije, i da omoguće prevazilaženje radiorezistencije.

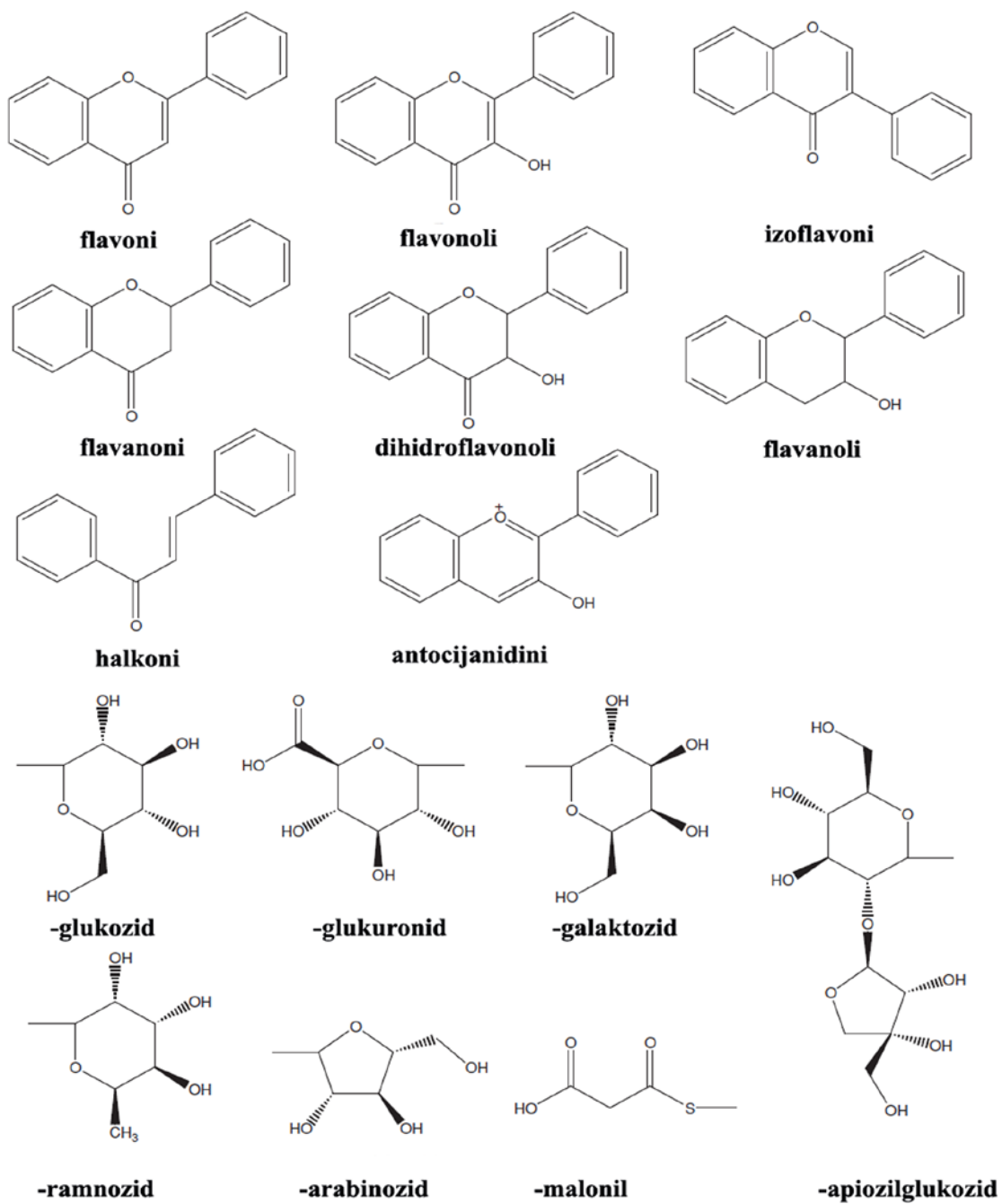
Hemiopreventivni potencijal prirodnih proizvoda i biljnih jedinjenja se zasniva na njihovom selektivnom citotoksičnom dejstvu na maligno transformisane ćelije, kao i na relativno niskom toksičnom dejstvu na normalne ćelije. Najznačajnija jedinjenja koja bi mogla da imaju važnu ulogu u hemioprevenciji raka mogu da se podele u nekoliko grupa: fenolna jedinjenja, vitamini (vitamini A, C, D, E), karotenoidi, alkaloidi, organosumporna jedinjenja, jedinjenja koja sadrže selen i masne kiseline.

1.3. Fenolna jedinjenja biljaka

Fenolna jedinjenja predstavljaju sekundarne metabolite biljaka koji u svojoj strukturi sadrže jedan ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili nekoliko hidroksilnih grupa [34-36]. Do sada je izolovano i identifikovano preko 8000 fenolnih jedinjenja biljaka. Kvalitativni i kvantitativni hemijski sastav fenolnih jedinjenja je specifičan za svaku biljnu vrstu, kao i za određena biljna tkiva. Pomenuti bioaktivni sastojci biljaka nastaju biosintetskim putem preko šikiminske kiseline, fenilpropanoide ili flavonoide. Na osnovu broja i aranžmana ugljenikovih atoma, fenoli biljaka mogu da se podele na dve velike klase: flavonoide i neflavonoidna fenolna jedinjenja [34,35].

1.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najbrojnija grupa fenolnih jedinjenja biljaka koja sadrže petnaest ugljenikovih atoma; molekul flavonoida se sastoji od dva aromatična prstena povezana mostom koji čine tri ugljenikova atoma [34-37]. Prisutni su kod mahovina, paprati, golosemenica i skrivenosemenica [37]. Ova grupa sekundarnih metabolita ima značajnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima biljaka, kao što su zaštita od UV zračenja, pigmentacija, stimulacija fiksacije azota i rezistencija na različita oboljenja biljaka [35]. Flavonoidna jedinjenja mogu da budu u formi aglikona, odnosno u slobodnoj formi, i u formi glikozida, pri čemu šećerni ostatak može da sadrži jedan do tri molekula monosaharida. U zavisnosti od tipa glikozidne veze, postoje *O*-glikozidi flavonoida i *C*-glikozidi flavonoida. Klasa flavonoida može da se podeli na sledeće podklase: flavoni, izoflavoni, flavonoli, dihidroflavonoli, flavanoni, izoflavanoni, flavani, flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli, halkoni i dihidrohalkoni, auron i antocijani [34-36]. Strukture različitih flavonoida i njihovih glikozida predstavljene su na Slici 1.1.



Slika 1.1. Strukture flavonoida i flavonoidnih glikozida [36]

Flavonoli predstavljaju najbrojniju grupu flavonoidnih jedinjenja. Najznačajniji bioaktivni flavonoli su kvercetin i njegovi glikozidi rutin, izokvercetin, kvercitrin, zatim kemferol, miricetin i izoramnetin. Flavoni su po svojoj hemijskoj strukturi slični flavonolima, od kojih se razlikuju odsustvom hidroksilne grupe na trećem prstenu. Najzastupljeniji flavoni su apigenin, luteolin, bajkalein i hrizin, kao i njihovi glikozidi. Glikozidi flavonola i flavona se često koriste kao markeri u hemotaksonomiji [37]. Flavanoli su strukturno najkompleksniji flavonoidi; katehin, epikatehin, epigalokatehin, epikatehin galat i epigalokatehin galat predstavljaju flavanole koji poseduju značajnu biološku aktivnost. Antocijanidini i njihovi konjugovani derivati antocijanini predstavljaju grupu flavonoida koja je široko rasprostranjena kod viših biljaka. Njihovo prisustvo u cvetovima i plodovima biljaka je odgovorno za crvenu, plavu ili purpurnu boju ovih biljnih organa. Najzastupljeniji antocijanidini su: pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin. U tkivima biljaka nalaze se i njihovi glikozidni derivati antocijanini. Flavanoni su izuzetno reaktivna grupa flavonoidnih jedinjenja, koja često podležu hidroksilaciji, glikozilaciji ili metilaciji. To su prvi flavonoidni produkti flavonoidnog biosintetičkog puta. U najznačajnije bioaktivne flavanone spadaju naringenin i glikozid naringin, zatim hesperetin i njegovi glikozidi hesperidin i neohesperidin, eriodiktiol i glikozid eriocitrin. Biosinteza grupe izoflavona odvija se preko flavonoidnog biosintetičkog puta. Izoflavoni genistein i daidzein lako podležu hidroksilaciji, metilaciji i prenilaciji, pri čemu nastaju brojni izoflavonoidi poput kumestana, rotenoida i pterokarpina.

1.3.2. Neflavonoidna fenolna jedinjenja

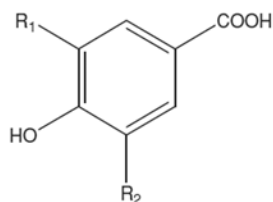
Fenolne kiseline i njihovi derivati predstavljaju veliku grupu fenolnih jedinjenja, koja su prisutna u velikom broju biljnih vrsta [34-36]. Sadrže jednu karboksilnu grupu i najmanje jednu fenolnu hidroksilnu grupu. Fenolne kiseline mogu da se podele na dve grupe jedinjenja: derivati hidroksibenzojeve kiseline, odnosno hidroksibenzoati (galna kiselina, elagna kiselina, protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina i siringinska kiselina) i derivati cimetine kiseline, odnosno hidroksicinamati (kafena kiselina, ferulinska kiselina, *p*-

kumarinska kiselina, hlorogenska kiselina i sinapinska kiselina). Fenolne kiseline mogu da se jave u slobodnoj formi ili u formi konjugata, najčešće kao estri ili amidi.

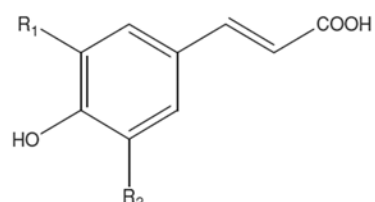
Kumarini predstavljaju laktone koji nastaju ciklizacijom *cis-orto* hidroksicimetne kiseline [34-36]. Naime, ova fenilpropanska jedinjenja nastaju iz fenilalanina od cimetne i *p*-kumarinske kiseline. U biljnim tkivima postoje u slobodnoj i glikozilovanoj formi. Većina kumarina je hidroksilovana na sedmom atomu ugljenika. Najrasprostranjeniji su jednostavni hidroksil kumarini (eskuletin, skopoletin), furokumarini i izofurokumarini (psoralen i izopsoralen), piranokumarini (ksantiletin, seselin), bikumarini i dihidroizokumarini (bergenin).

Stilbeni su grupa polifenola koji imaju dva aromatična prstena povezana etenskim mostom [34-36]. Ovi polifenolni fitoaleksini nastaju u višim biljkama kao odgovor na različite vidove sredinskog stresa, kao što su UV zračenje, bakterijska, virusna ili gljivična infekcija. Jedan od najviše izučavanih bioaktivnih polifenola biljaka je resveratrol (3,4',5 trihidroksistilben), koji se javlja u formi *trans* i *cis* izomera. Glikozilacija u biljnim tkivima štiti resveratrol od oksidativne degradacije i doprinosi njegovoj stabilnosti. Značajni stilbeni su i piceatanol i njegov glukozid astringin, kao i pterostilben.

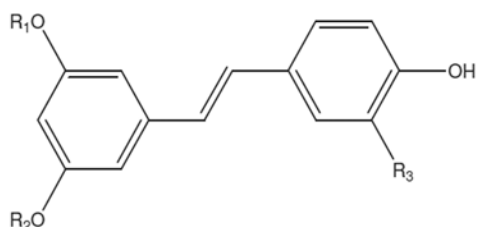
Tanini su polifenolna jedinjenja koja mogu da se podele u tri klase: hidrolizujuć tanini (galotanini i elagitanini), kondenzovani tanini (proantocijanidini) i kompleksni tanini [34-36,38]. Hidrolizujuć tanini mogu da se degraduju do šećera i fenolnih kiselina kao posledica promena pH vrednosti, zatim enzimske ili neenzimske hidrolize. Kondenzovani tanini su strukturno kompleksniji i nastaju kondenzacijom nekoliko molekula flavanola (katehina i epikatehina) ili flavan-3,4-diola. Strukture neflavonoidnih fenolnih jedinjenja predstavljene su na Slici 1.2.

A

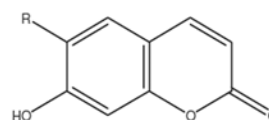
R₁=H, R₂=H: *p*-hidroksibenzojeva kiselina
 R₁=H, R₂=OH: protokatehinska kiselina
 R₁=OH, R₂=OH: galna kiselina
 R₁=OCH₃, R₂=H: vanilinska kiselina
 R₁=OCH₃, R₂=OCH₃: siringinska kiselina



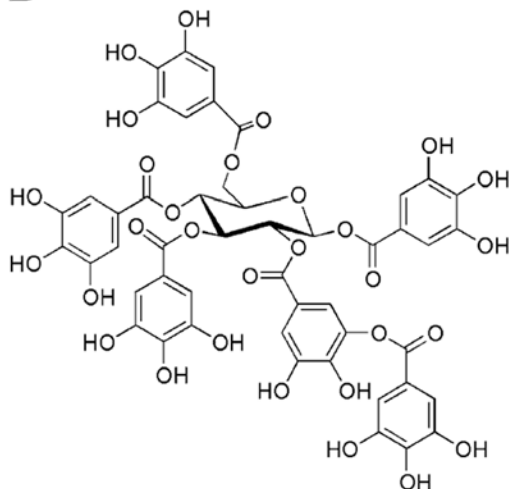
R₁=H, R₂=H: *p*-kumarinska kiselina
 R₁=H, R₂=OH: kafena kiselina
 R₁=H, R₂=OCH₃: ferulinska kiselina
 R₁=OCH₃, R₂=OCH₃: sinapinska kiselina

B

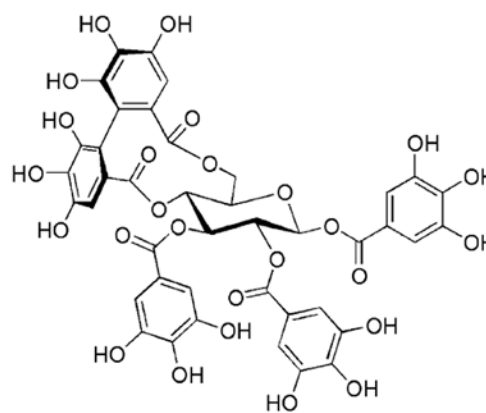
R₁=H, R₂=H, R₃=H: *trans*-resveratrol
 R₁=H, R₂=Gluc, R₃=H: *trans*-piceid
 R₁=CH₃, R₂=CH₃, R₃=H: *trans*-pterostilben
 R₁=H, R₂=H, R₃=OH: *trans*-piceatanol

C

R=OH: eskuletin
 R=OCH₃: skopoletin

D

2-O-digaloi-1,3,4,6-tetra-O-galoi-β-D-glukopiranoza



telimagrandin II

Slika 1.2. Strukture neflavonoidnih fenolnih jedinjenja: (A) fenolne kiseline [34], (B) stilbeni [34], (C) kumarini [34], (D) tanini [38]

1.4. Osnovna svojstva malignih ćelija

Kancer predstavlja genetičko oboljenje somatske ćelije koja akumulacijom mutacija postaje genomski nestabilna i proliferativno nadmoćna u odnosu na normalne ćelije tkiva u čiji sastav ulazi. Postoji više od 100 različitih tipova malignih tumora, kao i podtipova malignih tumora koji mogu da se jave u okviru određenih organa [39]. Razumevanje kompleksnih mehanizama procesa karcinogeneze od izuzetnog je značaja za razvoj novih agenasa koji bi mogli da se primenjuju u hemiopreveniraju i/ili terapiji malignih oboljenja. Osnovne karakteristike koje maligne ćelije stiču tokom višestepenog procesa razvoja tumora [39-41], a koje omogućavaju rast malignog tumora i metastatičku diseminaciju su:

1. održavanje proliferativne signalizacije
2. neosetljivost na supresore rasta
3. izbegavanje ćelijske smrti
4. replikativna imortalizacija
5. stimulisanje angiogeneze
6. aktivacija invazivnosti i metastaziranja.

Maligno transformisane ćelije ne zavise od spoljašnjih mitogenih signala (faktori rasta, komponente ekstraćelijskog matriksa i adhezivni molekuli). Naime, maligne ćelije koriste nekoliko strategija kako bi sebi omogućile samostalnost i hroničnu proliferaciju [40]. Poseduju sposobnost autokrine signalizacije, odnosno same sintetisu faktore rasta koji se vežu za receptore na površini ćelije i aktiviraju proliferaciju. Dodatno, maligne ćelije mogu da stimulišu normalne ćelije koje ulaze u sastav strome malignog tumora da oslobađaju faktore rasta koji su im neophodni [42]. Na površini malignih ćelija dolazi i do prekomerne ekspresije receptora za faktore rasta, čime postaju osetljive i na bazalne koncentracije faktora rasta, na koje normalne ćelije ne reaguju. Strukturne promene receptora za faktore rasta uzrokovane mutacijom dovode do njihove funkcionalne aktivacije u odsustvu liganda. Maligne ćelije mogu da održavaju aktivnim signalne puteve koji stimulišu proliferaciju i

konstitutivnom aktivacijom nizvodnih komponenti koje prenose signal od receptora do krajnjeg efektor. Pored ovih mehanizama koji omogućavaju proliferativnu samostalnost, somatske mutacije mogu da aktiviraju dodatne nizvodne signalne puteve. Deregulacija signalnih puteva koji imaju ulogu da putem negativne povratne sprege smanje proliferativnu signalizaciju takođe doprinosi stimulaciji proliferacije. Najznačajnije komponente pomenutog mehanizma su Ras onkoprotein, PTEN fosfataza i mTOR kinaza [40]. Na ovaj način, može da dođe i do pojave rezistencije na antikancerske lekove koji deluju na komponente signalnih puteva koji stimulišu proliferaciju.

Neosetljivost na supresore rasta, odnosno na antimitogene signale koji negativno regulišu ćelijsku proliferaciju predstavlja važno svojstvo maligne ćelije. Dva ključna tumor supresora koji imaju funkciju centralnog kontrolora u okviru dve komplementarne regulatorne mreže koje na osnovu signala koje primaju odlučuju da li će ćelija proliferisati ili će aktivirati programe senescencije i apoptoze su Rb protein i p53 protein [39-41]. Većina antiproliferativnih signala prenosi se preko Rb proteina. Stoga je mutaciona inaktivacija ključnog supresora proliferacije jedan od mehanizama koji omogućava malignoj ćeliji da postane neosetljiva na antimitogene signale. Dešava se i mutacija p15 i p21 tumor supresorskih gena. Zapravo u malignim ćelijama mogu da budu prisutni različiti defekti u funkcionisanju Rb signalnog puta čime je omogućena perzistentna ćelijska proliferacija. TGF- β je jedan od najpoznatijih antimitogenih signala, koji stabilizacijom kompleksa Rb-E2F zadržava ćeliju u G1 fazi koja prelazi u G₀. Mutacije na receptoru za TGF- β kao i mutacije koje dovode do gubitka SMAD proteina koji prenosi signal sa receptora za TGF- β mogu da onemoguće supresiju proliferacije. TGF- β može da uvede ćeliju u terminalnu diferencijaciju posredstvom blokiranja ekspresije c-myc gena.

Apoptoza predstavlja prirodnu barijeru koja treba da spreči nastanak kancera. Apoptotsku mašineriju čine uzvodni regulatori i nizvodni efektori [40,43]. Regulatorne komponente apoptotske mašinerije su spoljašnji put aktivacije apoptoze koji prenosi ekstraćelijske signale smrti, i unutrašnji put aktivacije apoptoze koji prima i integriše intraćelijske signale. Smatra se da važniju ulogu u sprečavanju tumorigeneze ima unutrašnji apoptotski put [40]. Mutacionom inaktivacijom glavnog pokretača apoptoze, p53 tumor

supresora, maligno transformisane ćelije stiču sposobnost da je uspešno izbegnu [40]. Druga mogućnost za izbegavanje apoptoze je mutaciona inaktivacija komponenti p53 signalne mreže. Strategije koje maligne ćelije koriste da bi izbegle apoptozu uključuju i povećanje ekspresije antiapoptotskih regulatora (Bcl-2, Bcl-x_L), inaktivaciju proapoptotskih faktora (Bax, Bim, Puma) i narušavanje spoljašnjeg puta aktivacije indukovanim ligandima smrti (inaktivacija Fas receptora) [40]. Podaci iz literature ukazuju da autofagija predstavlja dodatnu prepreku za tumorigenezu [44]. Pokazano je da radioterapija i određeni citotoksični lekovi posredno mogu da dovedu do povećanja autofagije malignih ćelija. Međutim, autofagne maligne ćelije počinju da se skupljaju i prelaze u stanje reverzibilne dormancije. Na taj način preživele ćelije mogu da dovedu do ponovnog rasta tumora nakon terapije citotoksičnim agensima [44]. Iako se čini da je aktivacija ćelijske smrti nekrozom jedan od načina za eliminaciju malignih ćelija, treba imati u vidu da nekroza doprinosi inflamaciji i razvoju tumora [40]. Naime, nekrotične ćelije oslobađanjem proinflamatornih signala regrutuju inflamatorne ćelije imunskog sistema, čime zapravo mogu da dovedu do proliferacije malignih ćelija, stimulacije angiogeneze i invazivnosti.

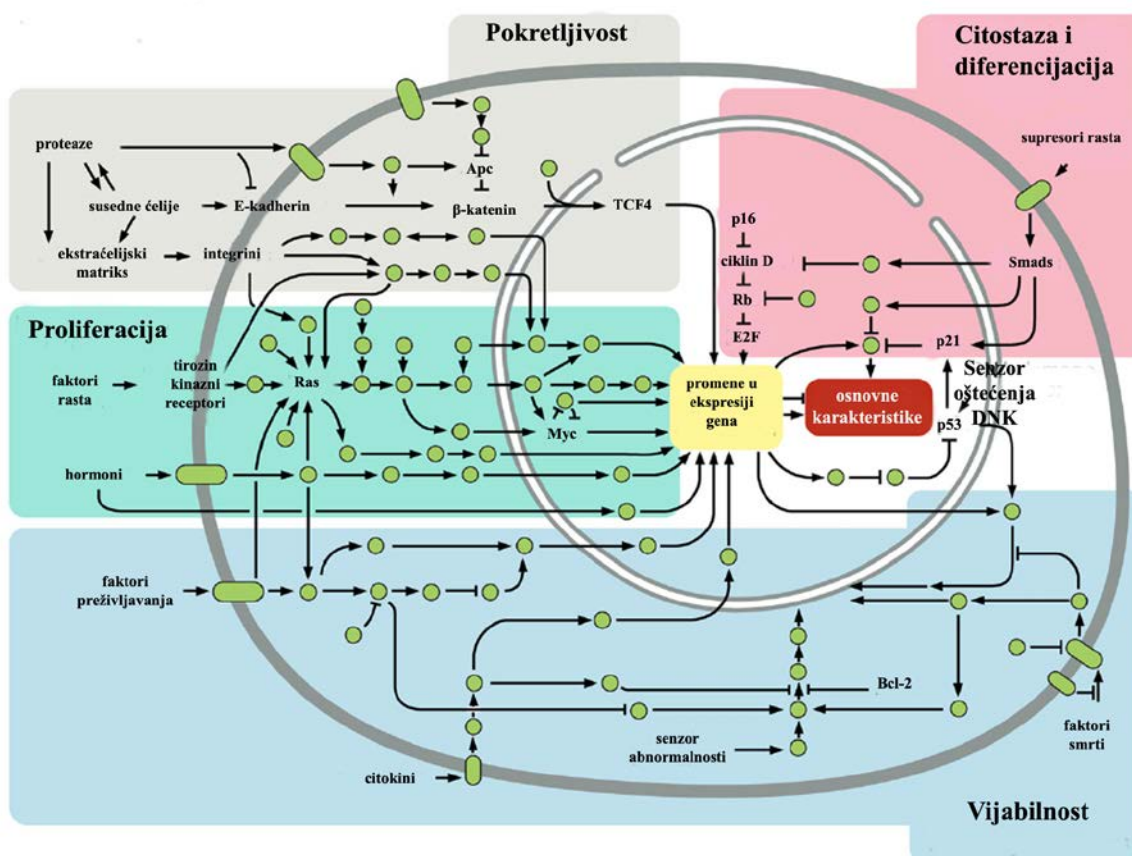
Kada transformisana ćelija stekne i četvrto svojstvo – neograničeni replikativni potencijal postaje imortalizovana, odnosno besmrtna. Neoplastične ćelije postižu replikativnu imortalizaciju tako što uspevaju da održe telomernu DNK dovoljno dugačkom da spreče aktivaciju senescencije ili apoptoze i to povećanom ekspresijom telomeraze ili manje zastupljenim alternativnim mehanizmom održavanja telomera koji se zasniva na rekombinaciji [40]. Međutim, rezultati ispitivanja premalignih i malignih lezija dojkve ukazuju da privremeno odsustvo aktivnosti telomeraze doprinosi neoplastičnoj transformaciji [45,46]. Odlaganje aktivacije telomeraza u premalignim lezijama omogućava nastanak tumor-promovišućih mutacija, dok aktivacija telomerazne aktivnosti u malignim lezijama omogućava stabilizaciju mutiranog genoma i replikativnu imortalizaciju [40,45,46].

Angiogeneza omogućava malignom tumoru stvaranje sistema krvnih sudova koji mu omogućavaju snabdevanje hranljivim materijama i kiseonikom, kao i eliminaciju produkata metabolizma i ugljen-dioksida [40]. Formiranje tumor-asocirane vaskulature angiogenezom

predstavlja odlučujući faktor koji utiče na rast svih tumora većih od 0.2 mm [41]. Stoga se proces angiogeneze aktivira u ranoj fazi razvoja invazivnih tumora. Stimulacija angiogeneze se dešava zahvaljujući povećanju ekspresije gena koji kodiraju proangiogene regulatorne proteine, poput VEGF, FGF, HIF-1 α , TGF- α , TGF- β . Pokazano je i da se aktivator angiogeneze VEGF može čuvati u latentnoj formi u ekstraćelijskom matriksu, a zatim matriksna metaloproteinaza-9 može da ga aktivira i oslobodi [40,47]. Takođe, dolazi i do smanjenja ekspresije inhibitora angiogeneze, kao što su trombospondin-1, angiostatin (fragment plazminogena), endostatin (fragment kolagena tipa 18), anastelin (fragment fibronektina), vazostatin (fragment kalretikulina), IFN- α , IL-1 β , IL-12, IL-18 [39-41]. Kod nekih tipova kancera onkogeni kao što su Ras ili c-myc mogu da indukuju povećanje ekspresije proangiogenih faktora, dok kod nekih tipova kancera imunske inflamatorne ćelije stvaraju faktore koji indukuju angiogenezu [40].

Invazivnost i metastaziranje omogućavaju malignim ćelijama da napuste primarni tumor i kolonizuju novi region u organizmu gde će inicijalno imati više prostora i biti bolje snabdevene nutrijentima [39]. Invazivno-metastatsku kaskadu čini serija bioloških procesa: prvo dolazi do lokalne invazije malignih ćelija, zatim do intravazacije, odnosno ulaska malignih ćelija u lokalne krvne i limfne sudove, prolazak kroz sistem krvnih i limfnih sudova, ekstravazacija – izlazak invazivnih malignih ćelija iz lumena sudova u parenhim udaljenog tkiva, formiranje mikrometastaza – malih skupina malignih ćelija i finalna kolonizacija, odnosno rast mikrometastatskih lezija do makroskopskih tumora [40,41,48]. Aktivacijom programa epitelijalno-mezenhimske tranzicije u maligno transformisanim ćelijama dolazi do gubitka profila genske ekspresije specifičnog za epitelijalne ćelije i uspostavlja se profil genske ekspresije koji je karakterističan za mezenhimske ćelije i koji malignim ćelijama omogućava invazivnost i metastatičnost [40,41]. Dolazi do gubitka ekspresije jednog od glavnih supresora invazivnosti i metastaziranja - E-kadherina, kao i citokeratina. Dok se aktivira ekspresija N-kadherina, vimentina, PDGF receptora, kao i $\alpha_v\beta_6$ integrina. Važna karakteristika epitelijalno-mezenhimske tranzicije je i aktivacija ekspresije i povećana sekrecija ekstraćelijskih proteaza (MMP-2 i MMP-9), kao i sekrecija fibronektina. Grupa transkripcionih faktora (Snail, Slug, Twist, Zeb1/2) koja poseduje

plejotropnu aktivnost i koji su obično aktivni samo u periodu rane embriogeneze, omogućava aktivaciju programa epitelijalno-mezenhimske tranzicije [40,41]. Signali iz stromalne mikrosredine maligne ćelije, kao i genetičke i epigenetičke promene u genomu ćelije, omogućavaju aktivaciju pomenutih transkripcionih faktora. Smatra se da metastatske maligne ćelije mogu da povrate neinvazivna svojstva posredstvom mezenhimsko-epitelijalne tranzicije kako bi uspešno formirale nove tumorske kolonije [40].



Slika 1.3. Intraćelijske signalne mreže koje regulišu funkcije maligne ćelije

Složene integrisane signalne mreže funkcionišu unutar normalne ćelije, dok njihovo reprogramiranje omogućava regulaciju osnovnih karakteristika maligne ćelije. Podmreže, označene zasebnim poljima, su specijalizovane da rukovode specifičnim svojstvima. Ovakav prikaz je pojednostavljen, jer između podmreža postoji komunikacija. Dodatno, obzirom da je maligna ćelija u tumorskoj mikrosredini izložena brojnim signalima, svaka od ovih podmreža je povezana sa signalima koji potiču od drugih ćelija iz tumorske mikrosredine. [40]

Genomska nestabilnost i inflamacija omogućavaju malignoj ćeliji da stekne osnovna funkcionalna svojstva [40]. Genomska nestabilnost promovira proces karcinogeneze tako što povećava stopu mutacija u onkogenima i tumor supresorskim genima. Na taj način tokom klonalne ekspanzije određeni mutirani genotip dobija selektivnu prednost u odnosu na ostale genotipove ostalih subklonova ćelija, koja mu omogućava dalju ekspanziju i dominaciju u lokalnoj tkivnoj sredini [40]. Inzlamatorni odgovor snabdeva tumorsku mikrosredinu važnim bioaktivnim molekulima, poput faktora rasta koji obezbeđuju konstantnu proliferaciju malignih ćelija, faktore preživljavanja pomoću kojih izbegavaju ćelijsku smrt, proangiogene faktore, enzime koji modifikuju ekstraćelijski matriks i induktivne signale koji aktiviraju angiogenezu, invazivnost i metastaziranje [40]. Inzlamatorne ćelije oslobađaju i reaktivne kiseonične intermedijere, koji su mutageni za obližnje ćelije [49].

Pored pomenutih šest karakteristika, značajna karakteristika maligne ćelije je i reprogramiranje energetskog metabolizma koji omogućava rast i proliferaciju malignih ćelija [40]. Energetski metabolizam glukoze maligne ćelije preusmeren je na aerobnu glikolizu. Ovo njihovo svojstvo prvi je zapazio Oto Warburg [50,51]. Kako bi proizvele dovoljno energije, maligne ćelije povećavaju ekspresiju glukoznih transportera i na taj način povećavaju unos glukoze. Smatra se da važnu ulogu u deregulaciji energetskog metabolizma maligne ćelije imaju pored hipoksije i aktivirani onkogeni (Ras i myc) i mutirani tumor supresori (p53) [40,52,53]. Literaturni podaci ukazuju na još jedno važno svojstvo malignih ćelija - mogućnost da izbegnu antitumorski imunski odgovor, u kome učestvuju T limfociti, B limfociti, makrofagi i NK ćelije [40]. Zapaženo je da maligne ćelije sekrecijom TGF- β i drugih imunosupresivnih faktora posredno mogu da spreče CD8+ citotoksične T limfocite i NK ćelije da ostvare svoju aktivnost [54].

1.5. Molekularni mehanizmi antikancerskog dejstva jedinjenja biljaka

Ekstrakti i fenolna jedinjenja biljaka mogu da deluju na brojne ciljne molekule signalnih puteva u maligno transformisanoj ćeliji, napadajući tako istovremeno više osnovnih svojstava kancera. Obzirom da različiti tipovi malignih tumora koriste različite mehanizme kako bi stekli osnovne karakteristike tokom višestepenog procesa tumorigeneze, antikancerski efekat sastojaka biljaka je u izvesnoj meri specifičan za određene tipove kancera. Rasvetljavanje molekularnih mehanizama antikancerskog dejstva ekstrakata i jedinjenja biljaka od izuzetnog je značaja za njihovu potencijalnu primenu u hemioprevenciji i/ili terapiji raka.

Mogući značaj fenolnih jedinjenja biljaka u hemioprevenciji delom se zasniva na njihovoj antioksidativnoj aktivnosti, kojom štite biomolekule, poput DNK, RNK, proteina i lipida od oksidativnog oštećenja [55,56]. Fenolni antioksidansi direktno redukuju reaktivne kiseonične i azotne intermedijere i tako mogu da prekinu oksidacioni lanac propagacije. Antioksidativna aktivnost biljnih fenola zavisi od njihove hemijske strukture; broj i pozicija supstituenata (hidroksilnih i metoksilnih grupa), kao i mogućnost delokalizacije elektrona određuju njihov antioksidativni potencijal. Međutim, neka fenolna jedinjenja mogu da ostvaruju i prooksidativnu aktivnost [57,58] kada dolazi do njihove autooksidacije i stvaranja reaktivnih intermedijera. Kada njihova koncentracija pređe određeni kritični nivo, ista fenolna jedinjenja pokazuju antioksidativno dejstvo. Prooksidativna i antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja zavise i od redoks potencijala unutar ciljne ćelije. Maligne ćelije odlikuje viši nivo endogenog oksidativnog stresa i izmenjen redoks status u odnosu na normalne ćelije. Stoga bi maligne ćelije mogle da budu osetljivije od normalnih ćelija na agense koji poput fenola mogu da dovedu do dodatnog povećanja produkcije reaktivnih kiseoničnih intermedijera i indukcije apoptoze [59].

Brojna istraživanja pokazuju da fenoli biljaka mogu da blokiraju aktivaciju karcinogena inhibicijom enzima faze I (citohrom P450), kao i da povećaju gensku ekspresiju karcinogen-detoksifikujućih enzima faze II (glutation reduktaza, glutacion S-transferaza,

UDP glukuronil transferaza, NADPH kvinon oksidoreduktaza) [3,55]. Fenolna jedinjenja dovode do povećanja ekspresije karcinogen-detoksifikujućih i antioksidativnih enzima posredstvom aktivacije Nrf2 (engl. *nuclear factor E2-related factor 2*) transkripcionog faktora, koji se veže za ARE (engl. *antioxidant response element*) sekvencu u okviru promotora gena koji kodiraju pomenute enzime [4,55,60].

Antiproliferativna aktivnost fenolnih antioksidanasa se zasniva na modulaciji brojnih komponenti kontrolnog sistema ćelijskog ciklusa, zatim komponenti pomoćnog sistema koji reguliše prolazak ćelije kroz kontrolne tačke ćelijskog ciklusa, kao i komponenti signalnih puteva koji regulišu te sisteme [3,55,61]. Biljna fenolna jedinjenja u malignim ćelijama mogu da dovedu do zastoja u G1 fazi ćelijskog ciklusa sniženjem ekspresije ciklina D, ciklina E, ciklin-zavisnih kinaza (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6) i PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*). Uočeno je da mogu da povećaju ekspresiju inhibitora ciklin-zavisnih kinaza, poput p21 i p27. Sniženjem ekspresije ciklina A i ciklina B, kao i povećanjem ekspresije ciklina E, mogu da indukuju zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa. Takođe, zapaženo je da fenolna jedinjenja mogu da dovedu i do zastoja u G2/M fazi snižavanjem ekspresije specifičnih ciklina (ciklin A, ciklin B, ciklin D). Fenolna jedinjenja mogu da ispolje antiproliferativni efekat zahvaljujući dejstvu na brojne ciljne molekule intraćelijskih signalnih puteva koje aktiviraju faktori rasta.

Hemiopreventivni i/ili kancer-terapeutski potencijal biljnih ekstrakata i fenolnih jedinjenja se zasniva i na indukciji apoptoze u maligno transformisanim ćelijama [3,55,61]. Biljni fenoli mogu da dovedu do apoptoze ciljnih malignih ćelija indukcijom spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze preko receptora smrti (CD95 receptor i TRAIL receptori) ili indukcijom unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze preko mitohondrija. Uočeno je da mogu istovremeno da aktiviraju oba apoptotska mehanizma. Pokazano je da snižavaju gensku ekspresiju regulatornih antiapoptotskih proteina (Bcl-2, Bcl-x_L, Bfl-1, c-FLIP, survivin, XIAP, cIAP1, cIAP2), dok povećavaju nivo genske ekspresije regulatornih proapoptotskih proteina (Bax, Bak, Bad). Ciljni molekuli na koje deluju ekstrakti i fenoli biljaka su i kaspaze (kaspaza-8, kaspaza-9, kaspaza-3, kaspaza-7), kao i PARP. Bioaktivna fenolna jedinjenja mogu da inhibiraju NF-κB ili AP-1 transkripcioni faktor, kao i da povećaju

ekspresiju p53 transkripcionog faktora, čime dovode do apoptoze. Dodatno, pokazano je da mogu da ostvare proapoptotski efekat posredstvom dejstva na kinaze i druge komponente PI3/Akt kinaznog signalnog puta i MAP kinaznih signalnih puteva, kao i Stat3/Stat5 signalnog puta.

Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata i fenolnih jedinjenja biljaka značajno doprinosi njihovom kancer-supresivnom dejstvu [3,55,56,61]. Zapaženo antiinflamatorno dejstvo fenolnih antioksidanasa se zasniva na inhibiciji ciklooksigenaze-2, koja zatim uzrokuje smanjenu sintezu prostaglandina. Fenoli biljaka mogu da uzrokuju inhibiciju ekspresije gena koji kodira ciklooksigenazu-2 posredstvom inhibicije NF- κ B ili AP-1 transkripcionog faktora. Dodatno, pokazano je da mogu da inhibiraju TNF- α , čime dovode i do supresije NF- κ B transkripcionog faktora, kao i ciklooksigenaze-2. NF- κ B transkripcioni faktor, koji reguliše ekspresiju citokina, hemokina i ciklooksigenaze-2, predstavlja svojevrsan most između inflamacije i kancera, stoga je njegova selektivna inhibicija vrlo značajna za hemiopreveniraju kancera. Fenolni antioksidansi mogu da inhibiraju i 5-lipooksigenazu i 12-lipooksigenazu, čime dovode do smanjenja nivoa leukotriena. Zahvaljujući inhibiciji inducibilne azot-oksida sinteze, biljni fenoli smanjuju stvaranje azot-oksida, koji ima značajnu ulogu u inflamaciji i tumorigenezi.

Rezultati brojnih studija ukazuju da ekstrakti određenih biljaka, kao i brojna fenolna jedinjenja poreklom iz biljaka, mogu da ispoljavaju antiangiogenetsko dejstvo [3,55,61,62]. Bioaktivni fenoli biljaka snižavaju nivo genske ekspresije proangiogenih regulatornih proteina poput VEGF, HIF-1 α , FGF, TGF- β . Uočeno je da mogu da inhibiraju matriksnu metaloproteinazu-9, i tako sprečavaju oslobađanje VEGF iz ekstraćelijskog matriksa. Takođe, pokazano je da mogu da povećaju ekspresiju TIMP-1 proteina, koji inhibira aktivnost matriksnih metaloproteinaza. Antiangiogenetski efekat mogu da ostvare i inhibicijom NF- κ B ili AP-1 transkripcionog faktora, kao i modulacijom komponenti PI3-Akt kinaznog signalnog puta ili MAP kinaznih signalnih puteva, kao i STAT3 signalnog puta.

Biljni ekstrakti i fenoli ostvaruju inhibitorni efekat na invazivnost i metastaziranje malignih ćelija [55,63,64]. Pokazano je da dovode do inhibicije aktivnosti i/ili ekspresije

matriksne metaloproteinaze-2 i matriksne metaloproteinaze-9, kao i fokalne adhezione kinaze. Inhibicijom NF- κ B ili AP-1 transkripcionog faktora, ili dejstvom na specifične komponente ERK/MAP kinaznog signalnog puta, p38/MAP kinaznog signalnog puta i PI3K/Akt kinaznog signalnog puta ostvaruju sniženje nivoa genske ekspresije pomenutih proteina. Antimetastatski efekat mogu da ispolje i zahvaljujući inhibiciji Slug i Zeb1 transkripcionih faktora koji regulišu epitelijalno-mezenhimsku tranziciju. Mogu da inhibiraju migraciju ćelija posredstvom supresije urokinaznog tipa plazminogen aktivatora i njegovog receptora. Zapaženo je da fenoli biljaka mogu da suprimiraju migraciju i invazivnost malignih ćelija povećanjem ekspresije E-kadherina, kao i inhibicijom specifičnih integrina (integrin α_v , integrin α_5 , integrin β_1 , integrin β_3).

Rezultati brojnih studija su pokazali da se mogući značaj bioaktivnih fenolnih jedinjenja biljaka u hemiopreveniriji kancera delom ogleda i u mogućnosti da regulišu ekspresiju gena posredstvom dejstva na komponente osnovnih mehanizama epigenetičkih procesa [65-67]. Pokazano je da mogu da inhibiraju DNK metiltransferazu I, bilo putem direktne interakcije, ili putem supresije genske ekspresije delujući na p21, AP-1 ili PTEN fosfatazu [65,66]. Na taj način uzrokuju hipometilaciju promotora tumor supresorskih gena, kao što su PTEN, BRCA1, p16, RAR β , MGMT, GSTP1, CDKN2A, hMLH1. Ovaj efekat je od naročitog značaja imajući u vidu da hipermetilacija CpG ostrvaca u promotorima tumor supresorskih gena dovodi do njihove selektivne inaktivacije u malignim ćelijama. Fenoli biljaka mogu da regulišu gensku ekspresiju i putem uticaja na kovalentne modifikacije histona [65,66]. Naime, uočeno je da fenolna jedinjenja inhibiraju aktivnost histon deacetilaza i histon acetiltransferaza, i tako mogu da dovedu do aktivacije tumor supresorskih gena (p21, p16, p53, PTEN) i inaktivacije onkogenih u malignim ćelijama (hTERT). Inhibicijom enzima koji vrše modifikacije histona, mogu da dovedu i do inhibicije NF- κ B signalnog puta. Antitumorski potencijal fenolnih jedinjenja se zasniva i na mogućnosti regulacije tumor supresorskih i onkogenih miRNK koje imaju izuzetno važnu ulogu u kontroli genske ekspresije [65-67].

1.6. Biološka aktivnost biljaka roda *Helichrysum*

Rodu *Helichrysum* (familija Asteraceae) pripada približno šesto biljnih vrsta, koje su rasprostranjene u Evropi, Africi, Aziji i Australiji [68]. Vrste roda *Helichrysum* su jednogodišnje biljke ili višegodišnje zeljaste biljke ili žbunovi. Ime ovog biljnog roda vodi poreklo od grčkih reči "*helios*" (sunce) i "*chrysos*" (zlatno), koje upućuju na karakteristične svetle žute cvetove koje imaju neke vrste poput *Helichrysum italicum* i *Helichrysum plicatum*. Rod *Helichrysum* odlikuje visok nivo polimorfizama, koji se odnose na tipove staništa, listove i glavičaste cvasti. Biljke roda *Helichrysum* su kserofite koje pretežno rastu na peskovitom zemljištu ili ilovači i to na nadmorskim visinama i do 1700 m [69].

Helichrysum zivojinii Černjavski et Soška je endemična biljna vrsta koja raste na planini Galičica u Makedoniji na krečnjačkim liticama na 1000-1700 m nadmorske visine [70-72]. Visina stabljike je prosečno oko 50 cm; listovi u osnovi su dugački 7 cm, široki 6-8 mm, dok su gornji listovi široki 2-4 mm; glava cveta ima prečnik oko 7-8 mm; cveta u periodu od jula do avgusta, cvetovi su žute boje. Na osnovu morfoloških karakteristika, predstavlja vrstu koja je intermedijarna u odnosu na vrste *Helichrysum plicatum* i *Helichrysum orientale* [70-72].



Slika 1.4. *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška [I. Stevkovski, 2008, Makedonska Pošta, MK027.08]

Poznato je da se brojne biljne vrste koje pripadaju rodu *Helichrysum* koriste u narodnoj medicini u mnogim regionima sveta, uključujući Mediteran i Balkansko poluostrvo [68, 73-75]. Lekovite biljke roda *Helichrysum* se najčešće koriste u vidu infuza ili dekokta za tretman različitih poremećaja gastro-intestinalnog i urinarnog trakta. Koriste se i kod prehlade, gripa i bronhitisa, zatim kod srčanih tegoba, hipertenzije i anksioznosti. Obloge sa čajem, etarskim uljem ili kreme sa ekstraktima ovih biljaka upotrebljavaju se za površinske povrede i rane, akne, dermatitis i ekcem, kao i za reumatske bolove. Jedna od najpoznatijih lekovitih biljaka ovog roda je *Helichrysum italicum*, poznata i pod imenom smilje. Etarska ulja ove biljke primenjuju se i u farmaceutskoj industriji [69].

Za biljke roda *Helichrysum* karakteristično je mnoštvo raznovrsnih sekundarnih metabolita, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, kumarini, acetofenoni, floriglucini, α -pironi, diterpeni, triterpeni i seskviterpeni [68,76-83]. Od značaja je istaći da je kvalitativan i kvantitativan hemijski sastav u izvesnoj meri specifičan za određene morfološke grupe biljaka iz roda *Helichrysum*, kao i za vrste koje naseljavaju različite regione [68]. Rezultati analize etarskih ulja dobijenih iz biljne vrste *Helichrysum italicum*, ali poreklom sa različitih lokaliteta, pokazuju razlike u njihovom hemijskom sastavu, koje su uslovljene specifičnim genotipom, vegetacionim ciklusom, kao i faktorima sredine karakterističnim za određeno geografsko područje [82,84-86].

Podaci iz literature ukazuju da ekstrakti i sastojci biljnih vrsta roda *Helichrysum* mogu da ispoljavaju značajna biološka i farmakološka svojstva, poput antibakterijske, antivirusne, antifungalne, antioksidativne, antiinflamatorne i antihiperglikemijske aktivnosti [87-98].

Tako je pokazano da su hloroformski i etil-acetatni ekstrakt biljke *Helichrysum compactum* ostvarili značajnu antibakterijsku aktivnost prema sledećim bakterijskim vrstama: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; uočeno je i antifungalno dejstvo pomenutih ekstrakata prema vrsti *Candida albicans* [87]. Dodatno, oba ekstrakta su ispoljila i antioksidativnu aktivnost. Ispitivanje dejstva dietil-etarskog ekstrakta biljke *Helichrysum italicum* je pokazalo da je ovaj ekstrakt redukovao rast različitih sojeva bakterije *Staphylococcus aureus*, kao i da je inhibirao aktivnost različitih bakterijskih enzima: koagulaza, dezoksiribonukleaza, termonukleaza i

lipaza [88]. Antimikrobnu aktivnost pokazao je i etanolni ekstrakt dobijen iz cvetova biljke *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum* [89]. Zapaženo je da je etarsko ulje dobijeno od biljke *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym ispoljilo dobru antifungalnu aktivnost prema vrstama *Pythium ultimum* i *Sclerotium rolfsii*, kao i nešto slabiju aktivnost prema *Phytophthora capsici* i *Septoria tritici* [90]. Vodeni ekstrakt južnoafričke lekovite biljke *Helichrysum aureonitens* je pokazao antivirusnu aktivnost prema herpes simpleks virusu tipa 1 u ćelijama fibroblasta pluća *in vitro*, dok pri istoj primenjenoj koncentraciji nije uočeno citotoksično dejstvo prema ispitivanim ćelijama [91]. Uočeno je da je arzanol, floriglucinol α -piron izolovan iz acetonskog ekstrakta vrste *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*, inhibirao replikaciju virusa HIV-1 u T limfocitima [92].

Analiza antioksidativnih svojstava vodenog ekstrakta biljke *Helichrysum longifolium* je pokazala izražen antioksidativni kapacitet ekstrakta bogatog flavonoidima [93]. U jednoj *in vivo* studiji biološkog dejstva vodenog i etanolnog ekstrakta biljke *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* na pacovima sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom je pokazano da su ekstrakti ispoljili značajno antioksidativno i antihiperglikemijsko dejstvo [94]. Rezultati *in vitro* i *in vivo* ispitivanja su ukazali da su metanolni ekstrakt biljke *Helichrysum italicum*, kao i ekstrakti dobijeni njegovom frakcionacijom, ostvarili izrazito antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo [95]. Nekoliko acetofenon glukozida je izolovano iz pomenutih ekstrakata i ta jedinjenja su i identifikovana kao glavne biološki aktivne komponente [96,97]. Jedan od najznačajnijih i najviše izučavanih bioaktivnih jedinjenja izolovanih iz biljke *Helichrysum italicum* je arzanol [92,98]. Antiinflamatorno dejstvo arzanola se zasniva na inhibiciji NF- κ B transkripcionog faktora, ciklooksigenaze-1, ciklooksigenaze-2 i 5-lipooksigenaze, kao i na efektu da inhibira oslobađanje proinflamatornih citokina [92,98].

Rezultati istraživanja ukazuju na značajan antitumorski potencijal ekstrakata i jedinjenja biljaka roda *Helichrysum* [98-105]. Pokazano je da je etarsko ulje dobijeno od vrste *Helichrysum gymnocephalum* ispoljilo citotoksično dejstvo na humane ćelije adenokarcinoma dojke MCF-7 [99]. Dodatno, zapaženo je da su ekstrakti pripremljeni od cvetova biljke *Helichrysum plicatum* ostvarili značajnu antioksidativnu aktivnost i citotoksičnu aktivnost prema humanim malignim ćelijskim linijama [100]. Kancer-

supresivno dejstvo pokazali su i ekstrakti južno-afričkih vrsta roda *Helichrysum* [101,102]. Dodatno, pokazano je da se antikancerski potencijal metanolskih ekstrakata biljaka *Helichrysum pallasii* (Sprengel) Ledeb., *Helichrysum armenium* DC subsp. *araxinum* (Kirp.) Takht i *Helichrysum plicatum* DC subsp. *plicatum*, koje rastu na području Turske, zasniva na inhibiciji DNK topoizomeraze I [103]. Uočeno je i antiproliferativno dejstvo etanolskog ekstrakta *Helichrysum maracandicum* prema SENCAR ćelijama (mišje transformisane ćelije kože), kao i supresivni efekat na ekspresiju p38 MAP kinaze [104]. Ispitivanje citotoksičnosti arzanola je pokazalo da ovaj bioaktivni konstituent biljke *Helichrysum italicum* pri koncentraciji od 50 μ M izraženo smanjuje preživljavanje humanih ćelija karcinoma pluća A549 [98]. Međutim, pri koncentracijama do 40 μ M arzanol nije ispoljio značajnu citotoksičnost prema mišjim VERO ćelijama [105].

2. Ciljevi istraživanja

Osnovna ideja istraživanja je pronalaženje novih potencijalnih antitumorskih agenasa, sastojaka biljaka, koji bi ispoljavali selektivnu citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijama, kao i minimalnu toksičnost prema zdravim ćelijama.

Osnovni cilj ovog istraživanja je bilo određivanje intenziteta citotoksičnog dejstva pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška prema nizu humanih malignih ćelijskih linija, kao i određivanje selektivnosti u intenzitetu tog dejstva. Obzirom da su pri primeni antitumorskih agenasa u direktnom kontaktu sa njima i zdrave imunokompetentne ćelije koje su uključene u imunsku kontrolu razvoja tumora, njihova vijabilnost je od izuzetnog značaja za opštu kontrolu tumora. Zato je ispitano citotoksično dejstvo biljnih ekstrakata na zdrave mononuklearne ćelije periferne krvi. Zatim je određivana selektivnost u antitumorskom dejstvu prema specifičnom malignom ćelijskom tipu u odnosu na mononuklearne ćelije periferne krvi. Hemijska karakterizacija biljnih ekstrakata je imala za cilj razumevanje veze između kvalitativnog sastava i intenziteta citotoksične aktivnosti ekstrakata.

S ciljem razumevanja mehanizama citotoksičnog dejstva ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* analizirana je distribucija malignih ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa nakon dejstva ekstrakata. Dodatno, definisan je i tip ćelijske smrti koju indukuju ekstrakti. Ukoliko bi se utvrdilo apoptotsko dejstvo ekstrakata, od značaja je bilo i rasvetljavanje signalnog puta kojim indukuju apoptozu malignih ćelija određivanjem ciljnih kaspaza. Kako bi se doprinelo boljoj proceni antitumorskog potencijala ekstrakata, ispitan je i uticaj ekstrakata na invazivnost humanih metastatskih malignih ćelija i na angiogenezu endotelijalnih ćelija.

3. Materijal i metode

3.1. Ekstrakti endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška

Biljni materijal je sakupljen iz prirodnih populacija *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška u periodu cvetanja tokom jula 2010. godine (lokalitet: vrh Tomoros (1700 m nadmorske visine), planina Galičica u Makedoniji). Prikupljene biljne uzorke identifikovao je Vlade Matevski iz Instituta za biologiju pri Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta „Sveti Ćirilo i Metodije“ u Skoplju. Uzorkovani primerak biljke *Helichrysum zivojinii* je deponovan u Makedonski nacionalni herbarijum pod rednim brojem MKNH121335.

Osušeni i samleveni u vidu praha nadzemni delovi biljke *Helichrysum zivojinii* (330 g) su dva puta ekstrahovani *n*-heksanom u ultrazvučnom kupatilu tokom 45 min. Ekstrakti su zatim koncentrisani uparavanjem na vakuum uparivaču i dobijen je (1) heksanski ekstrakt (4.2 g). Primenom rastvarača rastuće polarnosti biljni materijal je sukcesivno ekstrahovan na isti način i dobijeni su (2) dihlormetanski ekstrakt (1.4 g), (3) etil-acetatni ekstrakt (0.7 g), (4) *n*-butanolski ekstrakt (5.4 g) i na samom kraju (5) metanolski ekstrakt (12.4 g). Ekstrakti su čuvani na -20°C. Štok rastvori ispitivanih ekstrakata koncentracije 5 mg/ml su napravljeni u dimetil sulfoksidu, i čuvani su na +4°C.

3.2. Hemijska karakterizacija biljnih ekstrakata

HPLC-MS (engl. *high performance liquid chromatography-mass spectrometry*) analiza je vršena na hromatografskom sistemu Agilent 1100 koji sadrži binarnu pumpu, rezervoar mobilne faze, degaser, autoinjektor, kolonu Li Chrospher 100 RP 18 (250 x 4 mm, dijametar stacionarne faze 5 μm), detektor sa diodnim nizom povezan sa ESI-TOF (engl. *electrospray ionization-time of flight*) masenim spektrometrom model 6210 (Agilent Technologies). Mobilnu fazu su sačinjavali 0.2% rastvor mravlje kiseline u vodi (rastvor A) i 100% acetonitril (rastvor B). Primenjen je sledeći gradijent elucije: 0-5 min 10-20% B, 5-10 min 20% B, 10-20 min 20-30% B, 20-30 min 30-70% B, 30-35 min 70-100% B, 35-40 min 70% B, 40-41 min 100-10% B, 41-45 min 10% B, pri brzini protoka od 1 ml/min. Zapremina uzorka koji je injektiran na kolonu je bila 10 μl . Temperatura kolone je bila 25°C. Za detekciju efluenta korišćeni su detektor sa diodnim nizom (190-550 nm) i maseni detektor (ESI) koji je radio u negativnom režimu na atmosferskom pritisku; odnos mase (m) i naelektrisanja jona u vakuumu (z) varirao je od 100 m/z do 2500 m/z , pri čemu su parametri ESI masenog spektrometra bili sledeći: voltaža kapilare: 4000 V, temperatura gasa: 350°C, pritisak raspršivača: 45 psig, voltaža fragmentora: 140 V. Za analizu dobijenih podataka korišćen je Mass Hunter Workstation program.

Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (NMR) je korišćena za dodatnu strukturnu analizu komponenti ekstrakata primenom Varian Gemini 200 spektrometra. Analizirani su ^1H NMR spektri komponenti ekstrakata koji su rastvarani u deuterisanom hloroformu i deuterisanom dimetil sulfoksidu. Kao interni standard korišćen je tetrametilsilan.

3.3. Čelijske linije

Potencijalno antitumorsko dejstvo pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška ispitivano je na sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), Fem-x (melanom), K562 (mijeloidna leukemija), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), kao i na humanim transformisanim endotelijalnim ćelijama umbilikalne vene EA.hy926. Fem-x ćelijska linija je dobijena od profesora dr Nikole Vujanovića sa Univerziteta u Pittsburgu (Pittsburg, Sjedinjene Američke Države). Sve ostale pomenute ćelijske linije su nabavljene od ustanove American Type Culture Collection (Manasas, VA, Sjedinjene Američke Države).

HeLa, Fem-x, MDA-MB-361, MDA-MB-231 i EA.hy926 adherentne ćelijske linije su održavane u kulturi u vidu monosloja u kompletnom hranljivom medijumu, dok je K562 ćelijska linija održavana u kulturi u suspenziji. Kompletni hranljivi medijum predstavlja RPMI 1640, pH 7.2, u koji se dodaje 10% serum fetalnog govečeta (FBS, engl. *fetal bovine serum*), termički inaktivisan tokom 30 minuta na 56°C, L-glutamin (3 mM), streptomycin (100 µg/ml), penicilin (100 IU/ml) i HEPES (25 mM). Važno je napomenuti da je jedino za održavanje kulture EA.hy926 ćelija korišćen umesto RPMI 1640, DMEM hranljivi medijum sa visokim nivoom glukoze (4.5 g/l) i natrijum piruvatom. Čelijske kulture su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO₂ i zasićenim vodenom parom.

Reagensi za održavanje ćelijskih kultura: RPMI 1640, DMEM, FBS, L-glutamin i HEPES su proizvodi kompanije PAA (Pasching, Austrija). Antibiotici koji su dodavani u medijum su nabavljeni od kompanije Galenika a.d. (Beograd, Srbija).

3.4. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC) su izolovane iz heparinizovane periferne krvi zdravih dobrovoljnih davalaca centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću medijuma za separaciju (Lymphoprep™, Nycomed, Oslo, Norveška). Medijum za separaciju PBMC - Lymphoprep™ sadrži polisaharide i natrijum diatrizoat i formira gradijent gustine od 1.077 ± 0.001 g/ml. Periferna krv sa heparinom se centrifugira 10 min na 2000 rpm. Zatim se plazma i interfaza koja sadrži leukocite (engl. *buffy coat*) aspiriraju i prebace na medijum za separaciju, odnosno Lymphoprep™ u epruveti i uzorak se centrifugira 35 min na 2000 rpm. Nakon centrifugiranja u epruveti se mogu uočiti tri faze. Gornja faza predstavlja plazmu. U središnjoj fazi ispod plazme se nalaze mononuklearne ćelije periferne krvi (limfociti i monociti), dok se na dnu nalaze eritrociti i granulociti. Izolovane PBMC se zatim isperu tri puta u Hemacelu (vodeni rastvor u kome se nalaze 145 mM Na⁺, 5.1 mM K⁺, 6.2 mM Ca²⁺, 145 mM Cl⁻, 35 g/l želatinoznih polimera, pH 7.4). Zatim se odlije Hemacel i ćelijski talog se resuspenduje u potpunom hranljivom medijumu RPMI 1640 sa 10% FBS-om.

Etički komitet Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije je odobrio protokol istraživanja citotoksičnog dejstva ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na humane imunokompetentne PBMC. Oba zdrava dobrovoljna davaoca krvi koja su učestvovala u istraživanju potpisala su Informisani pristanak.

3.5. *In vitro* ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata

3.5.1. Tretman ćelijskih linija

HeLa (2,000 ćelija/100 μ l po sudiću), Fem-x (2,000 ćelija/100 μ l po sudiću), MDA-MB-361 (10,000 ćelija/100 μ l po sudiću), MDA-MB-231 (5,000 ćelija/100 μ l po sudiću) i EA.hy926 ćelije (3,000 ćelija/100 μ l po sudiću) su zasejane u sudiće mikrotitar ploča sa 96 sudića. Nakon inkubacije od 20 h tokom koje dolazi do adhezije ćelija, u odgovarajuće sudiće plejtova dodato je po 50 μ l rastvora ispitivanih ekstrakata (pet različitih finalnih koncentracija). K562 ćelije (5,000 ćelija/100 μ l po sudiću) koje rastu u suspenziji su zasejane 2 h pre dodavanja rastvora ekstrakata. U kontrolnim uzorcima ćelije su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma (dodato po 50 μ l medijuma). Ćelijske suspenzije odgovarajuće gustine, kao i rastvori testiranih ekstrakata različitih finalnih koncentracija su pripremani u potpunom hranljivom medijumu RPMI 1640 bez fenol crvenog i sa 10% FBS-om.

Finalne koncentracije rastvora pet ispitivanih ekstrakata pripremljenih od štokova rastvora koncentracije 5 mg/ml u dimetil sulfoksidu iznosile su za sledeće ekstrakte:

- heksanski i dihlormetanski ekstrakt: 6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml i 100 μ g/ml (za sve ispitivane ćelijske linije);
- etil-acetatni i *n*-butanolski ekstrakt: 6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml i 100 μ g/ml (za HeLa, Fem-x, K562 i MDA-MB-361 ćelije), odnosno 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml i 200 μ g/ml (za MDA-MB-231 i EA.hy926 ćelije);
- metanolski ekstrakt: 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml i 150 μ g/ml ili 200 μ g/ml (za sve ispitivane ćelijske linije).

Nakon dodavanja rastvora ispitivanih biljnih ekstrakata ćelije su inkubirane naredna 72 h.

Tretman ciljnih ćelija cisplatinom, poznatim citostatikom, služio je u analizama kao pozitivni kontrolni eksperiment.

Svaki eksperiment je izveden u triplikatu. Urađena su minimum tri do četiri nezavisna eksperimenta.

3.5.2. Tretman PBMC

Zdrave imunokompetentne PBMC (150,000 ćelija/100 μ l po sudiću) su zasejane u sudiće mikrotitar ploča sa 96 sudića u hranljivom medijumu ili hranljivom medijumu koji sadrži mitogen fitohemaglutinin (PHA) čija je finalna koncentracija 5 μ g/ml). Nakon 2 h inkubacije, dodato je po 50 μ l rastvora ispitivanih ekstrakata (pet različitih finalnih koncentracija), dok je u sudiće kontrolnih uzoraka ćelija dodat samo hranljivi medijum. Suspenzije PBMC odgovarajuće gustine, kao i rastvori testiranih ekstrakata različitih finalnih koncentracija su pripremani u kompletnom hranljivom medijumu RPMI 1640 bez fenol crvenog i sa 10% FBS-om.

Finalne koncentracije rastvora ispitivanih ekstrakata pripremljenih od štokova rastvora koncentracije 5 mg/ml u dimetil sulfoksidu iznosile su: 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml i 200 μ g/ml za svaki od pet testiranih ekstrakata.

Nakon dodavanja rastvora ispitivanih biljnih ekstrakata PBMC su inkubirane naredna 72 h.

Tretman humanih PBMC cisplatinom služio je u analizama kao pozitivni kontrolni eksperiment.

Svaki eksperiment je izveden u triplikatu. Urađena su dva nezavisna eksperimenta.

PHA je nabavljen od proizvođača INEP (Beograd, Srbija).

3.5.3. Određivanje preživljavanja ćelija

Citotoksična aktivnost određenog agensa može biti direktna, što znači da dolazi do indukcije ćelijske smrti – apoptoze i/ili nekroze, i indirektna, kada agens indukuje reproduktivnu ćelijsku smrt, pri čemu ćelije ostaju žive, ali dolazi do inhibicije ćelijskog rasta i proliferacije (antiproliferativna aktivnost). Direktna citotoksična aktivnost se određuje na osnovu broja mrtvih ćelija ili smanjene ćelijske vijabilnosti. Parametar C[%] predstavlja razliku između broja ćelija na početku eksperimenta (N_0) i broja ćelija na kraju eksperimenta (N) podeljen sa N_0 i pomnožen sa 100, $C[\%] = (N_0 - N) \times 100 / N_0$. Ćelijska vijabilnost, V[%], predstavlja odnos živih ćelija i ukupnog broja ćelija pomnožen sa 100. Antiproliferativna aktivnost jedinjenja može se determinisati posredstvom inhibicije ćelijskog rasta; parametar IG_{50} definiše se kao koncentracija agensa koja inhibira ćelijski rast za 50%. Direktna i indirektna citotoksičnost agensa se određuju na osnovu ćelijskog preživljavanja, S[%], (S – engl. *survival*) koje predstavlja odnos broja živih ćelija prisutnih nakon dejstva agensa i broja živih ćelija u kontrolnom ćelijskom uzorku, pomnožen sa 100. Mera citotoksične aktivnosti agensa je parametar IC_{50} koji se definiše kao koncentracija agensa koja inhibira preživljavanje ciljnih ćelija za 50%.

Preživljavanje ciljnih ćelija određivano je MTT kolorimetrijskim testom, kojim se određuje ćelijsko preživljavanje na osnovu količine redukovanog kolorimetrijskog reagensa u metabolički aktivnim ćelijama. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je žuta tetrazolijumska so koja se u živim, biohemijski aktivnim ćelijama redukuje do formazana, nerastvornog kristala ljubičaste boje. Dodavanjem deterdženta SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*) dolazi do rastvaranja formazana i stvara se obojeni rastvor koji ima maksimum apsorpcije na 570 nm. Količina rastvorenog formazana direktno je proporcionalna broju živih ćelija. Postupak za određivanje preživljavanja ciljnih ćelija MTT kolorimetrijskom testom razvio je Mosmann [106], a zatim su Ohno i Abe modifikovali proceduru [107].

Rastvor MTT kolorimetrijskog reagensa napravljen je u PBS-u (engl. *phosphate buffered saline*) pri koncentraciji od 5 mg/ml.

Nakon inkubacije ciljnih ćelija u prisustvu testiranih biljnih ekstrakata u trajanju od 72 h, u uzorke sa ćelijama i odgovarajuće blankove uzoraka mikrotitar ploča sa 96 sudića dodato je po 10 µl MTT reagensa. Uzorci su inkubirani 4 h na 37°C, a potom je u uzorke dodato po 100 µl 10% SDS-a. Ploče su inkubirane tokom noći, a zatim je narednog dana očitavana apsorbanca na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču Multiskan EX Thermo Labsystems. MTT i SDS su proizvodi kompanije Sigma Aldrich (Sent Luis, Misuri, Sjedinjene Američke Države).

Da bi se dobilo ćelijsko preživljavanje S[%] apsorbanca uzorka ćelija (Au), koje su rasle u prisustvu biljnih ekstrakata različitih koncentracija, podeli se sa apsorbancom kontrolnog uzorka ćelija (Ak), koje su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma, i pomnoži sa 100. Treba imati u vidu da se apsorbanca blanka uvek oduzima od apsorbance odgovarajućeg ćelijskog uzorka.

Dakle, ćelijsko preživljavanje je određivano na osnovu formule:

$$S[\%]=(Au/Ak)\times 100$$

3.6. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti

Tip ćelijske smrti (apoptoza i/ili nekroza) koju indukuju testirani ekstrakti biljke *Helichrysum zivoinii* pri višim koncentracijama je definisan na osnovu analize morfoloških promena na tretiranim HeLa ćelijama primenom fluorescentnog mikroskopa. Kao reagens za vizualizaciju tih promena korišćena je smeša akridin oranža i etidijum bromida.

HeLa ćelije (100,000) su zasejane na pokrovna mikroskopska stakla u 2 ml kompletnog hranljivog medijuma u petri šoljama. Nakon inkubacije od 20 h, ćelijama je uklonjen medijum. Ciljne HeLa ćelije su zatim tretirane rastvorima ispitivanih ekstrakata u kompletnom hranljivom medijumu, dok je ćelijama u kontrolnom uzorku dodat svež kompletni hranljivi medijum. Finalne koncentracije ekstrakata su odgovarale koncentraciji IC₉₀ koja je određena za svaki od pet ispitivanih ekstrakata tokom njihovog kontinualnog dejstva u periodu od 72 h (IC₉₀ predstavlja koncentraciju testiranog ekstrakta koja inhibira preživljavanje ciljnih ćelija za 90%). Nakon inkubacije od 24 h, ciljne ćelije kontrolnog uzorka, kao i ćelije tretirane ekstraktima, su bojene smešom boja (18 µl) akridin oranž/etidijum bromid (finalna koncentracija 3 µg/ml akridin oranža u PBS-u i 10 µg/ml etidijum bromida u PBS-u), i njihove morfološke karakteristike su analizirane na fluorescentnom mikroskopu korišćenjem fluorescein izotiocijanat filter seta, a zatim su ciljne ćelije i fotografisane.

Akridin oranž je katjonska fluorescentna boja koja emituje zelenu fluorescenciju kada intereaguje sa dvolančanim molekulom DNK, dok emituje crvenu fluorescenciju kada se veže za jednolančani molekul DNK ili RNK. Obzirom da je permeabilan za ćelije, akridin oranž ulazi i u žive ćelije, kao i u ćelije u apoptozi ili nekrozi. Etidijum bromid je fluorescentna boja koja se interkalacijom veže za dvolančani molekul DNK, i fluorescira narandžasto. Može da uđe samo u mrtve ćelije koje su izgubile integritet plazma membrane.

Akridin oranž može da uđe u ćeliju koja se nalazi u ranoj fazi apoptoze, i nukleus se boji zeleno. U ćeliju u kasnoj fazi apoptoze koja je izgubila integritet plazma membrane, ulaze i akridin oranž i etidijum bromid, i nukleus postaje narandžasto-crvene boje. Ćelije koje nisu ušle u apoptozu, imaju uniforman nukleus zelene boje sa nešto intenzivnije obojenim nukleolusima. Ćelije u ranoj fazi apoptoze odlikuje kondenzacija hromatina i promena oblika nukleusa, da bi zatim došlo i do fragmentacije nukleusa i nastanka protruzija na ćelijskoj membrani. Dolazi do daljeg skupljanja ćelije, formiranja ispupčenja i mehurova – (engl. *blebs*) i na kraju nastaju apoptotska tela u kojima se nalaze ćelijske organele i fragmenti jedra. Morfološke karakteristike ćelije u nekrozi su: vakuolizacija citoplazme, bubrenje mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma, piknoza jedra, zatim dolazi do pojave oštećenja na ćelijskoj membrani i do oslobađanja ćelijskog sadržaja. Nekrotske ćelije u okviru uzorka koji se boji smešom akridin oranž/etidijum bromid karakteriše dobro očuvani nukleus narandžaste boje. Tek u kasnijim fazama nekroze dolazi do njegove dezintegracije.

3.7. Analiza faza ćelijskog ciklusa

Dejstvo testiranih ekstrakata na promenu u distribuciji ciljnih HeLa ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa ispitano je analizom na protočnom citometru [108].

HeLa ćelije su zasejane u 2 ml potpunog hranljivog medijuma u sudiće ploče sa 6 sudića. Gustine HeLa ćelija u odgovarajućim uzorcima bile su specifične za određeno vreme inkubacije kao i za primenjenu koncentraciju testiranih ekstrakata. Nakon inkubacije od 20 h, uklonjen je medijum. U kontrolne uzorke HeLa ćelija dodat je svež kompletni hranljivi medijum, dok su u ostale ćelijske uzorke dodati rastvori testiranih ekstrakata u potpunom hranljivom medijumu. Finalne koncentracije ekstrakata su odgovarale koncentracijama IC_{50} i IC_{90} koje su određene za svaki od pet ispitivanih ekstrakata tokom njihovog kontinualnog dejstva u periodu od 72 h. Dejstvo ekstrakata na HeLa ćelije pri primenjenoj koncentraciji od IC_{50} analizirano je nakon 24, 48 i 72 h inkubacije, dok je dejstvo ekstrakata pri koncentraciji od IC_{90} analizirano nakon 24 h i 48 h.

Gustine HeLa ćelija bile su sledeće:

- inkubacija od 24 h: kontrolni uzorak – 150,000 ćelija; uzorak tretiran ekstraktom pri koncentraciji IC_{50} - 180,000 ćelija; uzorak tretiran ekstraktom pri koncentraciji IC_{90} – 210,000 ćelija,
- inkubacija od 48 h: kontrolni uzorak – 100,000 ćelija; uzorak tretiran ekstraktom pri koncentraciji IC_{50} - 140,000 ćelija; uzorak tretiran ekstraktom pri koncentraciji IC_{90} – 180,000 ćelija,
- inkubacija od 72 h: kontrolni uzorak – 50,000 ćelija; uzorak tretiran ekstraktom pri koncentraciji IC_{50} - 100,000 ćelija.

Nakon odgovarajućeg vremena inkubacije, kontrolni i tretirani uzorci HeLa ćelija su sakupljeni tripsinizacijom i isprani jednom u PBS-u. Nakon toga u uzorke ćelija u epruvetama za citometar je dodato 200 μ l hladnog PBS-a na ledu. Odmah zatim pažljivo (kap po kap) je dodato 2 ml hladnog 70% etanola pri vorteksovanju. Epruvete sa fiksiranim

ćelijskim uzorcima su čuvane na -20°C minimum nedelju dana. Zatim su uzorci HeLa ćelija isprani PBS-om kako bi se uklonili ostaci etanola. Uzorci su potom inkubirani u $500\ \mu\text{l}$ rastvora PBS-a koji sadrži ribonukleazu A (finalna koncentracija $200\ \mu\text{g/ml}$) i propidijum jodid (finalna koncentracija $20\ \mu\text{g/ml}$) 30 min na 37°C . Propidijum jodid je fluorescentna boja koja se veže za molekul DNK interkalacijom. Pošto propidijum jodid može da se veže i za molekule RNK, pri analizi faza ćelijskog ciklusa važno je tretirati uzorke ribonukleazom A kako bi se degrađovala RNK. Ribonukleaza A i propidijum jodid bili su proizvod kompanije Sigma Aldrich.

Pripremljeni ćelijski uzorci su nakon inkubacije analizirani na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države), podešenim tako da detektuje 10,000 događaja. Intenzitet fluorescencije propidijum jodida, koji je ekscitovan na 488 nm argon-jonskim laserom detektovan je na FL2 kanalu. Dobijeni podaci su analizirani uz pomoć CELLQuest softvera (BD Biosciences). Odnosno, na osnovu dobijenih DNK histograma (broj događaja u odnosu na FL2-A (engl. *FL2-area*)) određivan je procenat ciljnih HeLa ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Prateći plot FL2-A u odnosu na FL2-W (engl. *FL2 width*) je omogućio da analiza DNK sadržaja ćelija uključi samo pojedinačne ćelije, odnosno omogućio je da se iz analize isključe ćelijski agregati i ćelijski debris.

3.8. Određivanje ciljnih kaspaza

Identifikacija ciljnih kaspaza preko kojih ispitivani ekstrakti biljke *Helichrysum zivojinii* indukuju apoptozu ciljnih HeLa ćelija vršena je određivanjem procenta HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon dejstva ekstrakata u trajanju od 24 h, a koje su pretretirane specifičnim inhibitorima kaspaza analizom na protočnom citometru.

U eksperimentima su korišćeni sledeći specifični inhibitori kaspaza:

- Z-DEVD-FMK (Z-D(OMe)-E(OMe)-V-D(OMe)-FMK) – inhibitor kaspaze-3,
- Z-IETD-FMK (Z-I-E(OMe)-T-D(OMe)-FMK) – inhibitor kaspaze-8,
- Z-LEHD-FMK (Z-L-E(OMe)-H-D(OMe)-FMK) – inhibitor kaspaze-9.

Fluorometil keton derivatizovani peptidi: Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK i Z-LEHD-FMK su ireverzibilni, ćelijski permeabilni specifični inhibitori odgovarajućih kaspaza, koji ne ispoljavaju citotoksično dejstvo na tretirane ćelije. Vezivanjem za aktivno mesto specifične kaspaze, svaki od pomenutih sintetičkih peptida efikasno inhibira aktivnost kaspaznih proteaza i na taj način se sprečava indukcija apoptoze u ciljnim ćelijama. Pokazano je da uspešno inhibiraju indukciju apoptoze u brojnim malignim ćelijskim linijama, kao i u normalnim ćelijama [109-111]. Specifični inhibitori kaspaza koji su korišćeni u ispitivanju nabavljeni su od kompanije R&D Systems (Mineapolis, Sjedinjene Američke Države). Rastvaranjem inhibitora u DMSO-u neposredno pred analizu, pripremljeni su štokovi rastvora koncentracije 10 mM, koji su čuvani na -20°C.

HeLa ćelije su zasejane u 2 ml kompletnog hranljivog medijuma u sudiće ploče sa 6 sudića. Za svaki od pet ispitivanih ekstrakata, postavljena su po četiri uzorka HeLa ćelija (jedan referentni uzorak koji je tretiran samo rastvorom ekstrakta i po tri uzorka koji su preinkubirani odgovarajućim specifičnim inhibitorima kaspaza). Nakon inkubacije od 20 h, ćelijama je uklonjen medijum. Kontrolnom uzorku HeLa ćelija je dodato 1.5 ml kompletnog hranljivog medijuma. Referentnim uzorcima HeLa ćelija dodato je 1.5 ml kompletnog hranljivog medijuma, dok je u preostale uzorke dodato po 1.5 ml hranljivog

medijuma koji sadrži odgovarajući inhibitor kaspaze (Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK ili Z-LEHD-FMK) tako da je finalna koncentracija inhibitora u 2 ml medijuma iznosila 40 μ M. Uzorci su zatim inkubirani 2 h. Nakon toga je u uzorke HeLa ćelija dodato po 0.5 ml medijuma sa odgovarajućim ekstraktom, tako da finalna koncentracija u 2 ml odgovara koncentraciji IC₉₀ koja je određena nakon kontinualnog dejstva ekstrakata u trajanju od 72 h. U kontrolni uzorak HeLa ćelija dodat je samo hranljivi medijum. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h, uzorci ciljnih HeLa ćelija su fotografisani, sakupljeni tripsinizacijom, isprani u PBS-u i fiksirani u 70% hladnom etanolu. Posle minimum nedelju dana čuvanja na -20°C, ćelijski uzorci su bojeni propidijum jodidom. Odnosno, uzorci HeLa ćelija su isprani PBS-om, potom su inkubirani u 500 μ l rastvora PBS-a koji sadrži ribonukleazu A (finalna koncentracija 200 μ g/ml) i propidijum jodid (finalna koncentracija 20 μ g/ml) 30 min na 37°C. Analizom na protočnom citometru određivan je procenat HeLa ćelija u subG1 fazi za svaki od postavljenih uzoraka ćelija.

3.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata na migraciju ćelija – *in vitro* "scratch"esej

In vitro "scratch" esej je korišćen za ispitivanje uticaja pet ekstrakata biljke *Helichrysum zivoinii* na migraciju epitelijalnih MDA-MB-231 ćelija i endotelijalnih EA.hy926 ćelija. Esej u izvesnoj meri oponaša migraciju ćelija u *in vivo* uslovima i poznat je pod imenom "wound healing" esej [112]. Naime, uočeno je da prilikom odstranjivanja dela endotela krvnih sudova dolazi do aktivacije migracije endotelijalnih ćelija ka regionu gde je nastala povreda s ciljem da se zatvori novostvorena "rana".

MDA-MB-231 (80,000 ćelija/0.6 ml po sudiću) i EA.hy926 ćelije (60,000 ćelija/0.6 ml po sudiću) su zasejane u sudiće ploče sa 24 sudića. Ćelije su zatim inkubirane 20 h u potpunom hranljivom medijumu kako bi se formirao konfluentni monosloj adherentnih ćelija. Potom je sterilnim žutim nastavkom za pipetu (p200) zagreban gusti monosloj ciljnih ćelija čime je formirana prava centralna linija u okviru monosloja. Pomenuta linija treba da ima istu širinu celom dužinom. Uzorci ćelija su potom blago isprani toplim hranljivim medijumom, kako bi se uklonile ćelije koje su se tom prilikom odlepile od donje površine sudića za koju su bile adherirane, i kako bi ivice linije postale potpuno ravne i ujednačene. U uzorke ciljnih ćelija dodato je po 0.6 ml rastvora ispitivanih biljnih ekstrakata u potpunom hranljivom medijumu. U kontrolne uzorke ćelija dodato je 0.6 ml kompletnog hranljivog medijuma. Primenjene koncentracije testiranih ekstrakata pri kojima nisu ispoljavali toksično dejstvo na ciljne ćelije bile su:

- heksanski i dihlormetanski ekstrakt: 6.25 i 12.5 µg/ml,
- etil-acetatni ekstrakt: 12.5 i 25 µg/ml,
- *n*-butanolski i metanolski ekstrakt: 25 i 50 µg/ml.

Odgovarajuće ciljne centralne prave linije u okviru konfluentnog ćelijskog monosloja fotografisane su neposredno po formiranju (0 h), kao i nakon 24 h i 48 h inkubacije.

3.10. Test invazivnosti ("*invasion assay*")

Efekat ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na invazivnost humanih metastatskih ćelija adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 je ispitan testom invazivnosti [113,114], u kojem su korišćeni "*BD BioCoatTM MatrigelTM*" inserti (BD354480, BD Biosciences). Pomenuti inserti imaju na svojoj donjoj površini mikroporoznu membranu (dijametar pore je 8 µm), koja je prekrivena tankim slojem matrigela (smeša proteina ekstraćelijskog matriksa koja ima svojstva bazalne membrane).

MDA-MB-231 ćelije su neposredno pred eksperiment izglednjivane 4 h u hranljivom medijumu RPMI 1640 sa 0.4% FBS-om. U međuvremenu u inserte sa matrigelom i odgovarajuće sudiće ploče sa 24 sudića dodato je po 0.5 ml RPMI hranljivog medijuma bez FBS-a i tokom 2 h vršena je rehidracija u inkubatoru na 37°C. Nakon inkubacije, neposredno pre dodavanja medijuma i ćelijskih suspenzija, uklonjen je medijum za rehidraciju. U donje sudiće ploče-sistema sa 24 sudića dodato je po 0.75 ml kompletnog hranljivog medijuma RPMI 1640 sa 10% FBS-om, koji služi kao hemoatraktant. Suspenzije MDA-MB-231 ćelija (50,000 ćelija/250 µl RPMI hranljivog medijuma sa 0.4% FBS-om) sipane su u gornje sudiće sistema, odnosno inserte sa matrigelom. Zatim je u kontrolni uzorak MDA-MB-231 ćelija u gornjem sudiću, tj. insertu dodato 0.25 ml hranljivog medijuma (RPMI 1640 sa 0.4% FBS-om), dok je u ostale ćelijske uzorke dodato po 0.25 ml rastvora testiranih ekstrakata u pomenutom hranljivom medijumu. Primenjene netoksične koncentracije ispitivanih ekstrakata kojima su ćelije bile izložene u gornjem sudiću u 0.5 ml medijuma (RPMI 1640 sa 0.4% FBS-om), bile su sledeće za svaki ekstrakt:

- heksanski i dihlormetanski ekstrakt: 6.25 i 12.5 µg/ml,
- etil-acetatni ekstrakt: 12.5 i 25 µg/ml,
- *n*-butanolski i metanolski ekstrakt: 25 i 50 µg/ml.

Veoma je značajno da se istakne da komponente ekstrakta tokom inkubacije mogu da difunduju u hranljivi medijum u donjem sudiću (0.75 ml), tako da su finalne koncentracije rastvora ekstrakata kojima su ćelije bile izložene zapravo dodatno razblažene dva i po puta.

Koncentracije ekstrakata kojima su ćelije tretirane, odabrane su na osnovu rezultata MTT testa nakon 48 h i 72 h inkubacije, kao i posmatranjem morfologije ciljnih ćelija pod invertnim fazno-kontrastnim mikroskopom.

Nakon 48 h inkubacije, MDA-MB-231 ćelije koje nisu uspele da prođu kroz mikroporoznu membranu, uklonjene su sa gornje površine membrane u okviru inserta blagim trljanjem štapićem umotanim u vatu, koja je bila natopljena hranljivim medijumom. U odgovarajućim insertima koji su se nalazili u sudićima ploče sa 24 sudića, ciljne MDA-MB-231 ćelije koje su uspele da razgrade matrigel, i tako prođu kroz mikropore membrane, bile su adherirane za njenu donju površinu. Inserti su potom prebačeni u sudiće nove ploče sa 24 sudića, u koje je prethodno sipano po 0.5 ml rastvora (0.05% tripsin/0.02% EDTA u PBS-u koji sadrži kalcein acetoksimetilestar finalne koncentracije 4 μ M). Kalcein acetoksimetilestar je nefluorescentno jedinjenje koje je permeabilno za ćelijsku membranu. Kada uđe u ćeliju, intraćelijske esteraze ga hidrolizuju do fluorescentnog anjona kalceina. Pomenuta boja je u testu invazivnosti korišćena za fluorescentnu detekciju vijabilnih ciljnih MDA-MB-231 ćelija. Nakon premeštanja inserata, oni su inkubirani 1 h na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO₂ i zasićenim vodenom parom. Suspenzije obojenih ciljnih ćelija su potom prebačene u duplikatu (2x0.25 ml) u sudiće mikrotitar ploče sa 96 sudića. Apsorbanca uzoraka ćelija je zatim očitavana na čitaču Fluoroskan Ascent ThermoLabsystems (talasna dužina ekstinkcije - 485 nm, talasna dužina emisije- 538 nm).

3.11. *In vitro* esej angiogeneze – "*endothelial cell tube formation*" esej

Mogući uticaj ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na inhibiciju angiogeneze EA.hy926 ćelija je ispitivan na osnovu analize morfoloških promena ciljnih ćelija, odnosno njihove sposobnosti da na sloju matrigela formiraju tubularne strukture nalik na mreže - "*endothelial cell tube formation*" esej ili *in vitro* esej angiogeneze [115]. EA.hy926 endotelijalna ćelijska linija je uspostavljena hibridizacijom primarnih humanih ćelija umbilikalne vene i tioguanin-rezistentnog klona humanih ćelija karcinoma pluća A549 [116]. Zapaženo je da kada EA.hy926 ćelije rastu na površini matriksnog matrigela mogu da se izdužuju, reorganizuju, međusobno povezuju i formiraju tubularne strukture nalik na kapilare, odnosno mreže. Daljim umrežavanjem mogu da formiraju i serije poligonalnih struktura koje imaju zid sačinjen od dva do tri sloja ćelija. Pomenute strukture nazivaju se kompleksne mreže [115]. U eseju je korišćen "*BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix*" (BD 356234). Matriksni matrigel predstavlja preparat solubilizovane bazalne membrane koji je izolovan iz EHS (engl. *Engelbreth-Holm-Swarm*) mišjeg sarkoma, tumora u kojem su bogato zastupljeni proteini ekstraćelijskog matriksa. Sadrži niz proteina ekstraćelijskog matriksa, poput laminina, kolagena tipa IV, heparan sulfat proteoglikana i entaktina/nidogena, kao i različite faktore rasta (TGF- β , EGF, FGF, IGF i tPA).

Za svaki eksperiment, matriksni matrigel, koji se čuva na -20°C, je otapan na +4°C na ledu tokom noći. Tokom noći na +4°C ohlađeni su i ploča sa 24 sudića i nastavci za pipete. U sudiće ploče sa 24 sudića, koja se nalazila na ploči sa ledom, dodato je po 200 μ l ohlađenog matriksnog matrigela. Rad na hladnom treba da spreči nastanak gela. Nakon toga, ploča je inkubirana 2 h na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO₂ i zasićenim vodenom parom. Tokom inkubacije na donjoj površini sudića formira se sloj matrigela u vidu čvrstog gela. U sudiće je potom dodata suspenzija EA.hy926 ćelija u kompletnom hranljivom medijumu DMEM sa 10% FBS-om (40,000 ćelija/400 μ l). U kontrolni uzorak ćelija je dodato 200 μ l kompletnog hranljivog medijuma, dok je u preostale uzorke dodato 200 μ l rastvora ispitivanih biljnih ekstrakata.

Primenjene finalne koncentracije testiranih ekstrakata pri kojima nisu ispoljavali toksično dejstvo na ciljne ćelije bile su:

- heksanski i dihlormetanski ekstrakt: 12.5 µg/ml,
- etil-acetatni ekstrakt: 25 µg/ml,
- *n*-butanolski i metanolski ekstrakt: 50 µg/ml.

Uzorci EA.hy926 ćelija su inkubirani 20 h. Tokom inkubacije EA.hy926 ćelije su periodično analizirane pod mikroskopom. Nakon inkubacije, ciljne ćelije su i fotografisane.

4. Rezultati

4.1. Hemijska analiza ekstrakata biljke *Helichrysum zivoinii*

Rezultati NMR spektroskopske analize su pokazali da su heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) imali vrlo sličan ^1H NMR spektar, pri čemu su komponente ekstrakata bile rastvorene u deuterisanom hloroformu. Signali oba pomenuta ekstrakta u ^1H NMR spektru ukazali su da se radi o kompleksnim smešama jedinjenja, u kojima preovlađuju relativno nepolarna jedinjenja (region δ 0.8-2.2). LC-DAD analiza otkrila je prisustvo flavonoida molekularne formule $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (344) u heksanskom ekstraktu, dok je u dihlormetanskom ekstraktu uočeno prisustvo flavanona naringenina i flavona apigenina. Tri jedinjenja koja su bila prisutna u oba ekstrakta su predstavljena u Tabeli 4.1.; prikazane su i njihove pretpostavljene molekularne formule, kao i izmerene m/z vrednosti dobijene ESI-TOF masenom spektrometrijom koje odgovaraju identifikovanim jonima. LC-DAD analiza pokazala je i da pomenuta jedinjenja nisu imala moć apsorpcije u UV spektru, što ukazuje na prisustvo struktura bez hromofora.

Etil-acetatni ekstrakt (3) i *n*-butanolski ekstrakt (4), rastvoreni u deuterisanom dimetil sulfoksidu, pokazali su u ^1H NMR spektru približno identične grupe signala u sledećim regionima: δ 12.5-13.9 (hidroksi protoni), δ 5.9-8.1 (protoni na aromatičnom prstenu koji je supstituisan jednom hidroksilnom grupom ili sa više hidroksilnih grupa), i δ 4.7-5.5 (grupa protona koji odgovaraju šećernoj jedinici). ^1H NMR spektar metanolskog ekstrakta (5), koji je bio rastvoren u deuterisanom dimetil sulfoksidu, je podsećao na spektre etil-acetatnog i *n*-butanolskog ekstrakta na osnovu prisustva signala u regionu δ 5.9-8.1 (aromatični protoni), kao i na osnovu detektovanog signala u regionu δ 13.9 (hidroksi proton). Međutim, ^1H NMR spektar metanolskog ekstrakta se razlikovao u odnosu na spektre etil-acetatnog i *n*-butanolskog ekstrakta na osnovu prisustva signala u regionu δ 4.7-5.5, koji odgovaraju protonima šećernih jedinica. LC-DAD analiza i analiza ESI-TOF masenom

spektrometrijom tri polarnija ekstrakta (ekstrakti 3, 4 i 5) ukazala je na prisustvo vrlo sličnih konstituenata u svakom od njih. Pored hlorogenske kiseline, detektovani su aglikoni flavonoida i flavonoid *O*-glikozidi. Detektovano je prisustvo sledećih *O*-glikozida: glukozid (ili galaktozid) kvercetina, glukozid apigenina, glukozid kemferola (ili luteolina), kao i još jedan glukozid kemferola (ili luteolina ili 6-hidroksiapigenina). Pokazano je i prisustvo aglikona flavonoida – apigenina i naringenina. Ftalna kiselina je nađena u dihlormetanskom, etil-acetatnom, *n*-butanolskom i metanolskom ekstraktu.

Tabela 4.1. Komponente ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz *Helichrysum zivojinii*

	Jedinjenja	Ekstrakti				
		Heksanski (1)	CH ₂ Cl ₂ (2)	EtOAc (3)	BuOH (4)	MeOH (5)
1.	C ₈ H ₆ O ₄ (166) ftalna kiselina	–	+	+	+	+
2.	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ (464) <i>O</i> -glc ili <i>O</i> -gal kvercetina	–	–	+	+	+
3.	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ (516) hlorogenske kiseline	–	–	+	+	++ ^a
4.	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (448) <i>O</i> -glc apigenina	–	–	+	++ ^a	+
5.	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ (432) <i>O</i> -glc kemferola ili luteolina	–	–	+	+	+
6.	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (448) <i>O</i> -glc apigenina	–	–	+	+	+
7.	C ₁₉ H ₃₀ O ₁₄ ili C ₂₆ H ₂₆ O ₉ (482)	+	+	–	–	–
8.	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ (286) <i>O</i> -glc kemferola, luteolina ili 6- hidroksiapigenina	–	–	+	+	+
9.	C ₂₁ H ₂₄ O ₉ ili C ₁₄ H ₂₈ O ₁₄ (420)	+	+	–	–	–
10.	C ₁₅ H ₁₂ O ₅ (272) naringenin	–	+	+	+	+
11.	C ₂₂ H ₂₆ O ₉ ili C ₁₅ H ₃₀ O ₁₄ (434)	+	+	–	–	–
12.	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ (270) apigenin	–	+	++ ^a	+	+
13.	C ₂₁ H ₁₈ O ₄ (334)	+	–	–	–	–
14.	C ₁₈ H ₁₆ O ₇ (344)	+	–	–	–	–

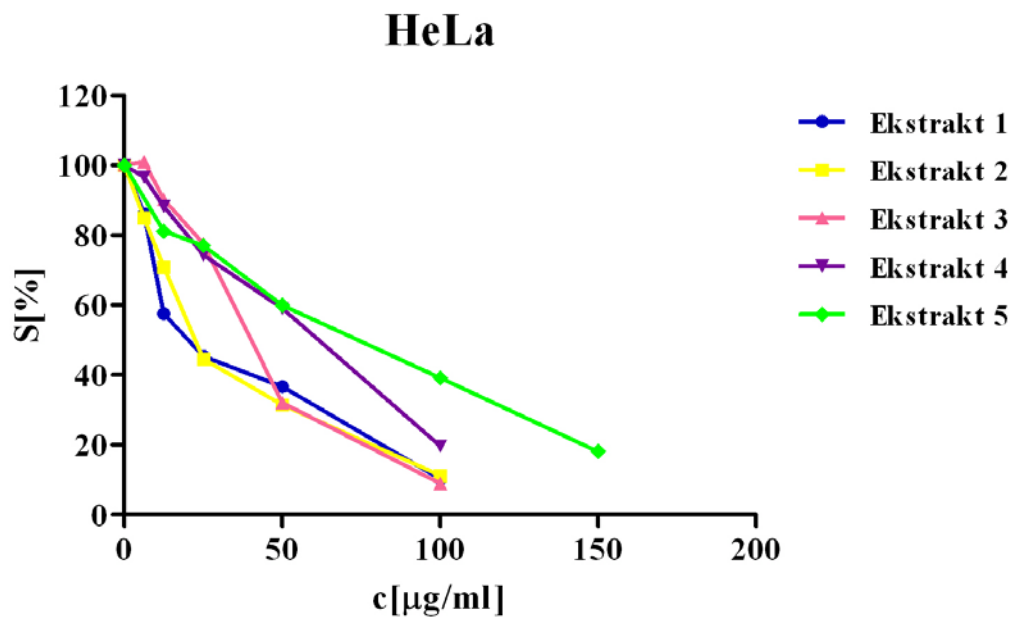
^a – najzastupljenija komponenta u određenom ekstraktu

4.2. *In vitro* citotoksična aktivnost ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*

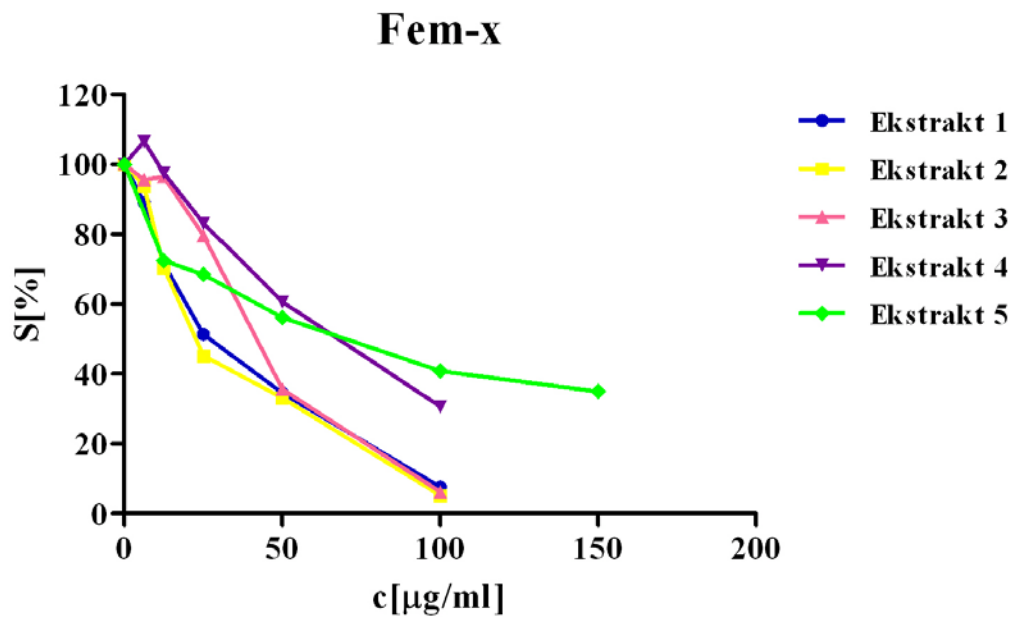
Citotoksična aktivnost pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška je ispitana na sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), Fem-x (melanom), K562 (mijeloidna leukemija), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), kao i na EA.hy926 ćelijama (transformisane humane endotelijalne ćelije umbilikalne vene). Svi testirani ekstrakti su ispoljili selektivno dozno-zavisno citotoksično dejstvo prema malignim ćelijskim linijama, kao i prema endotelijalnim EA.hy926 ćelijama (Slika 4.1., Tabela 4.2.). Pad u preživljavanju ciljnih ćelija koje su tretirane ispitivanim ekstraktima predstavljen je na Slici 4.1.

Heksanski ekstrakt (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) su ispoljili najvišu citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijskim linijama i prema EA.hy926 ćelijama. Etil-acetatni ekstrakt (3) i *n*-butanolski ekstrakt (4) ispoljili su manje izražen citotoksični efekat na testirane ćelijske linije, dok je metanolski ekstrakt (5) pokazao najnižu citotoksičnost.

Ukoliko se posmatra osetljivost različitih ćelijskih linija na citotoksično dejstvo ispitivanih biljnih ekstrakata, od značaja je da se istakne da su K562 ćelije mijeloidne leukemije bile najosetljivije na citotoksičnost heksanskog ekstrakta (1) i etil-acetatnog ekstrakta (3). Osetljivost humanih ćelija adenokarcinoma cerviksa HeLa, melanomskih Fem-x ćelija i ćelija adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 je bila niža u slučaju pomenutih ekstrakata. Humane ćelije adenokarcinoma dojke MDA-MB-361 i humane transformisane endotelijalne ćelije umbilikalne vene EA.hy926 bile su najmanje osetljive na toksično dejstvo ispitivanih ekstrakata.

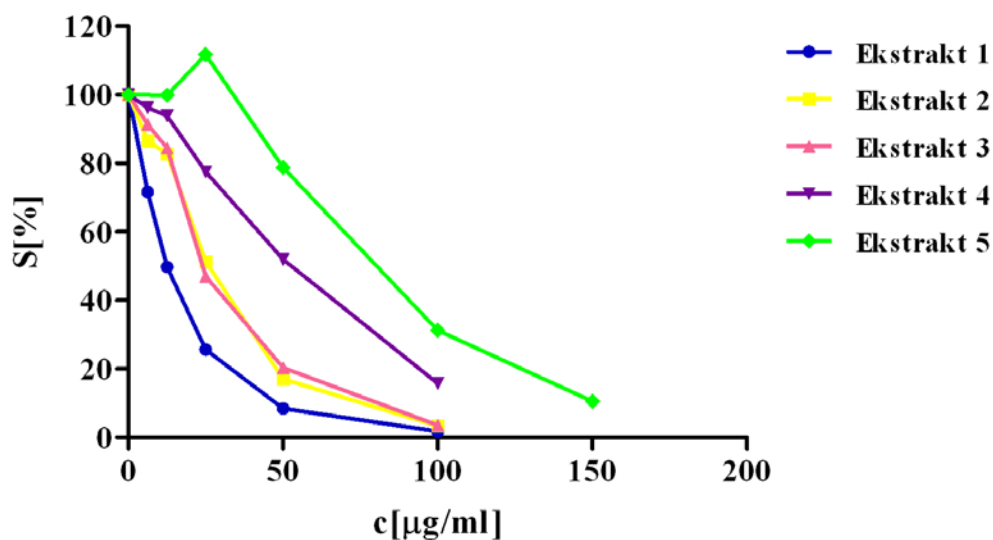


Slika 4.1. (a) Zavisnost preživljavanja HeLa ćelija od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.



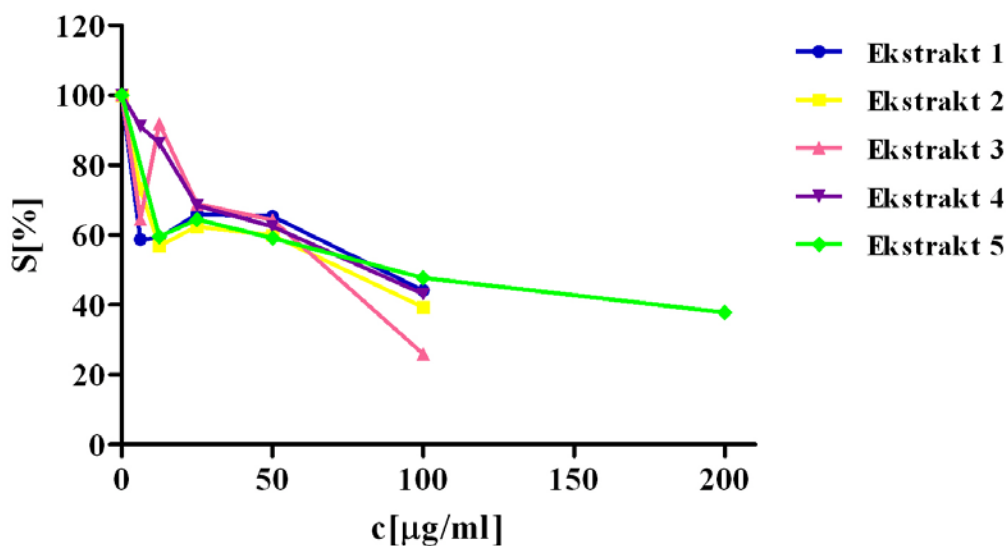
Slika 4.1. (b) Zavisnost preživljavanja Fem-x ćelija od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.

K562



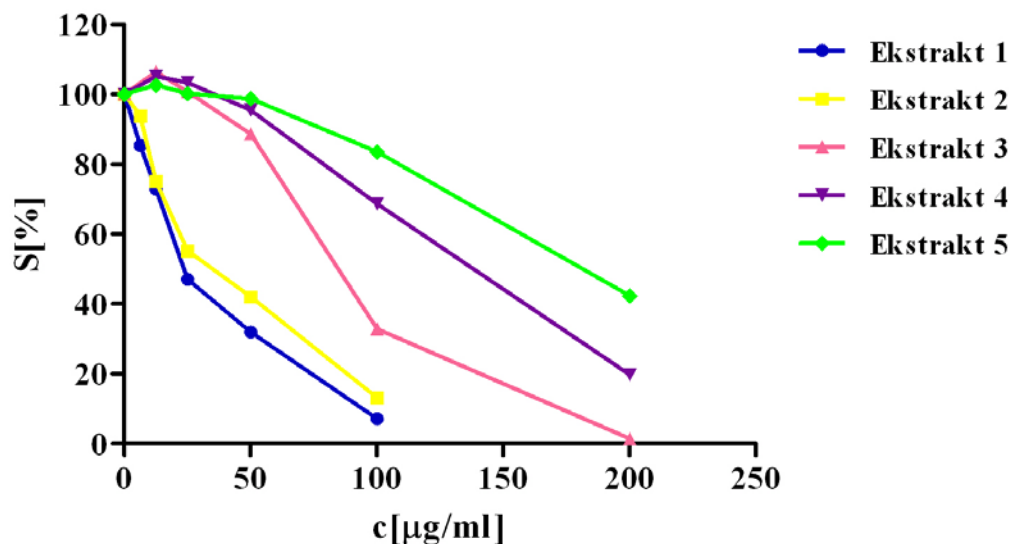
Slika 4.1. (c) Zavisnost preživljavanja K562 ćelija od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.

MDA-MB-361



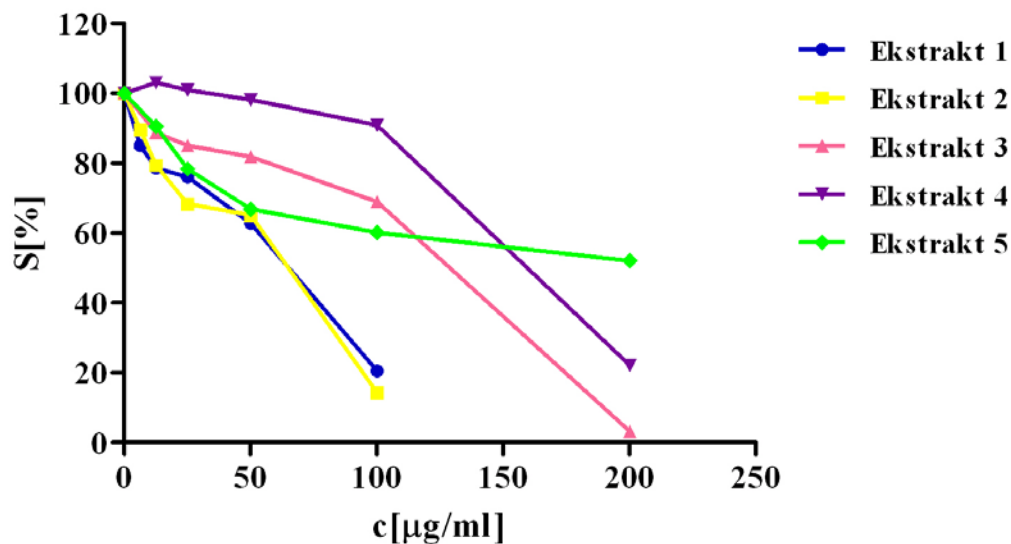
Slika 4.1. (d) Zavisnost preživljavanja MDA-MB-361 ćelija od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.

MDA-MB-231



Slika 4.1. (e) Zavisnost preživljavanja MDA-MB-231 ćelija od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.

EA.hy926



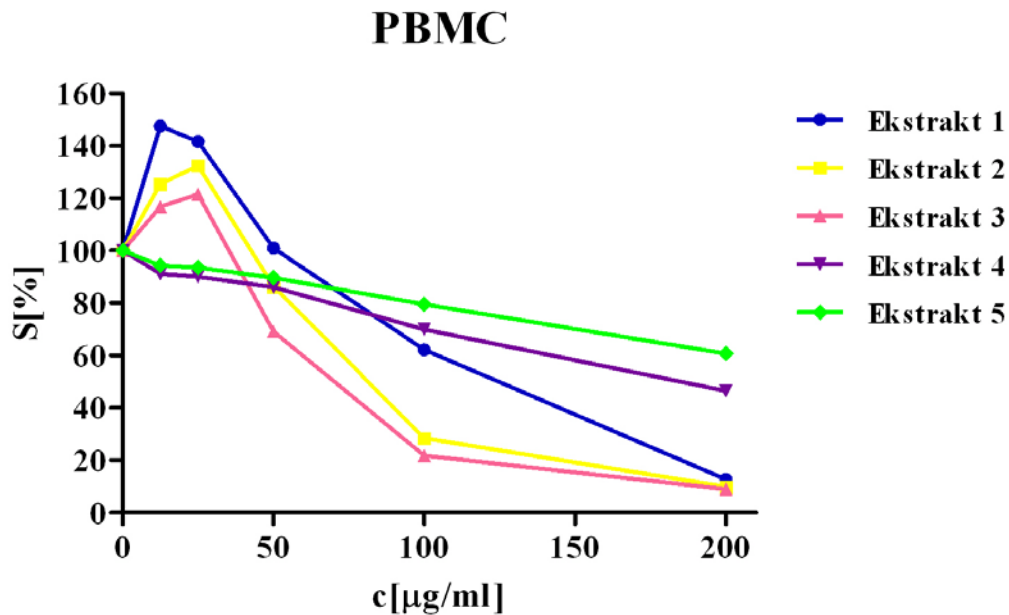
Slika 4.1. (f) Zavisnost preživljavanja EA.hy926 ćelija od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.

Tabela 4.2. Koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* koje su inhibirale ćelijsko preživljavanje za 50%

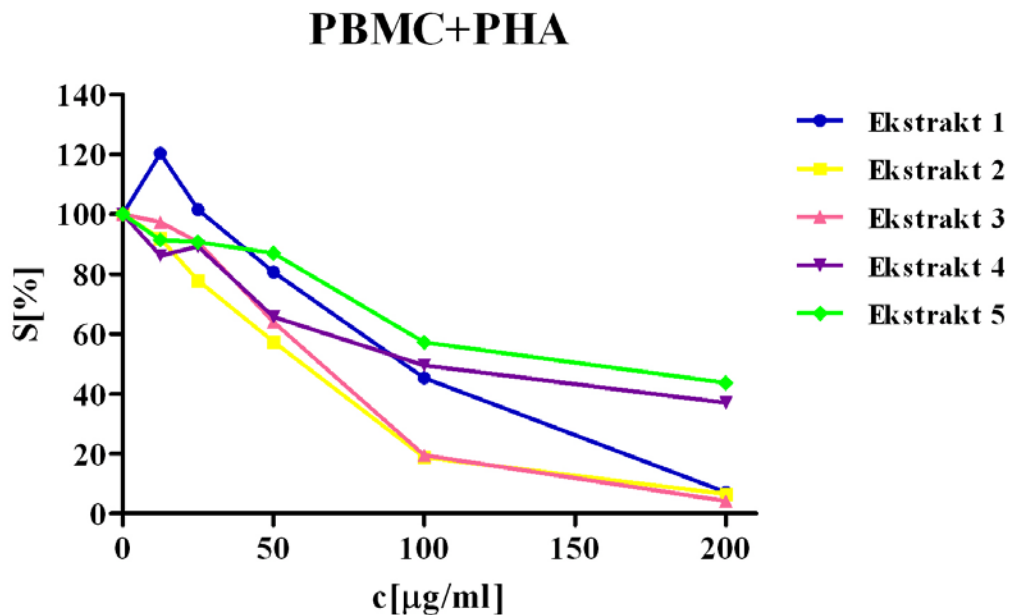
	HeLa	Fem-x	K562	MDA-MB-361	MDA-MB-231	EA.hy926
Ekstrakt 1	24.63 ± 4.12	28.85 ± 5.49	11.78 ± 0.94	81.74 ± 6.27	21.99 ± 2.71	67.39 ± 3.21
IC₅₀ [µg/ml]						
Ekstrakt 2	20.11 ± 4.49	23.64 ± 1.41	23.82 ± 6.54	81.74 ± 13.31	30.52 ± 7.21	62.55 ± 7.61
IC₅₀ [µg/ml]						
Ekstrakt 3	37.98 ± 2.33	47.04 ± 4.79	27.52 ± 4.96	79.93 ± 13.49	88.81 ± 6.51	111.29 ± 19.45
IC₅₀ [µg/ml]						
Ekstrakt 4	56.70 ± 6.05	74.84 ± 7.55	50.37 ± 3.28	69.96 ± 11.70	133.92 ± 7.02	164.11 ± 9.07
IC₅₀ [µg/ml]						
Ekstrakt 5	84.68 ± 10.39	77.29 ± 6.55	74.88 ± 7.57	94.92 ± 6.85	181.07 ± 0.53	≈200
IC₅₀ [µg/ml]						
Cisplatina	5.60 ± 1.41	5.02 ± 0.59	5.35 ± 0.70	28.23 ± 5.04	28.40 ± 2.57	10.96 ± 2.16
IC₅₀ [µM]						

Napomena: vrednosti IC₅₀ u tabeli su predstavljene kao $\bar{X} \pm SD$ određene na osnovu tri nezavisna eksperimenta

Citotoksično dejstvo pet ekstrakata izolovanih iz biljke *Helichrysum zivojinii* ispitano je i na humanim zdravim imunokompetentnim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC), i to na nestimulisanim PBMC i PBMC koje su bile stimulisane da proliferišu mitogenom fitohemaglutininom (PHA). Rezultati analiza na PBMC predstavljeni su na Slici 4.2., kao i u Tabeli 4.3.



Slika 4.2. (a) Zavisnost preživljavanja PBMC od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.



Slika 4.2. (b) Zavisnost preživljavanja mitogenom stimuliranih PBMC od koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, određena MTT testom nakon 72 h inkubacije.

Tabela 4.3. Koncentracije ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* koje su inhibirale preživljavanje PBMC za 50%

	PBMC	PBMC+PHA
Ekstrakt 1 IC₅₀ [µg/ml]	131.59 ± 9.93	99.07 ± 8.02
Ekstrakt 2 IC₅₀ [µg/ml]	81.74 ± 0.50	67.65 ± 11.37
Ekstrakt 3 IC₅₀ [µg/ml]	74.82 ± 6.51	61.86 ± 5.53
Ekstrakt 4 IC₅₀ [µg/ml]	185.17	92.20 ± 9.01
Ekstrakt 5 IC₅₀ [µg/ml]	>200	128.12 ± 35.46
Cisplatina IC₅₀ [µM]	>33.34	>33.34

Napomena: vrednosti IC₅₀ u tabeli su predstavljene kao $\bar{X} \pm SD$ određene na osnovu dva nezavisna eksperimenta

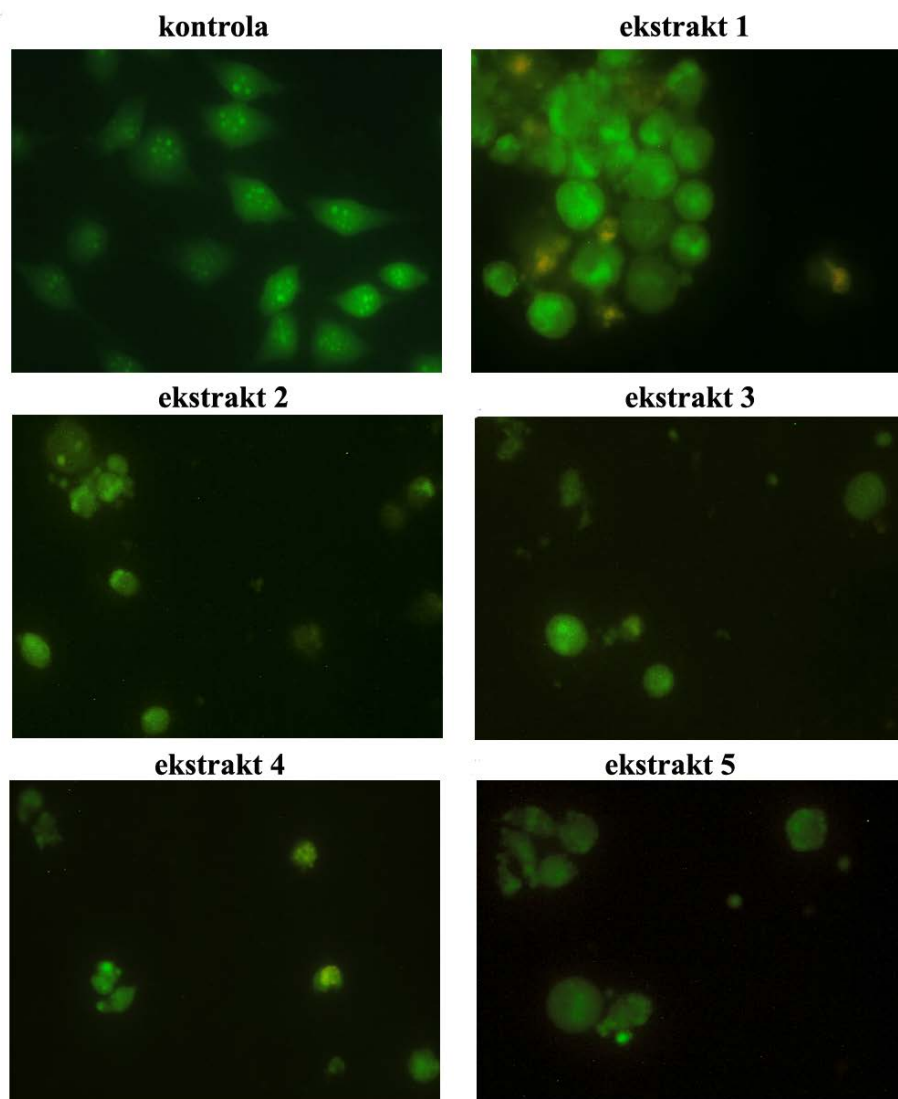
Tabela 4.4. Selektivnost u antitumorskom dejstvu ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*

Koeficijent selektivnosti u antitumorskom dejstvu	IC₅₀PBMC/ IC₅₀ HeLa	IC₅₀PBMC+PHA/ IC₅₀ HeLa	IC₅₀PBMC/ IC₅₀ K562	IC₅₀PBMC+PHA/ IC₅₀ K562
Ekstrakt 1	5.34	4.02	11.17	8.41
Ekstrakt 2	4.06	3.36	3.43	2.84
Ekstrakt 3	1.97	1.63	2.78	2.25
Ekstrakt 4	3.27	1.63	3.68	1.83
Ekstrakt 5	>2.36	1.51	2.67	1.71

Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata prema normalnim PBMC pokazalo je da su svi testirani ekstrakti ispoljili značajno niže citotoksično dejstvo na nestimulisane PBMC u odnosu na PBMC, koje su bile stimulisane fitohemaglutininom da proliferišu. Dihlormetanski (2) i etil-acetatni ekstrakt (3) su ostvarili izraženiji citotoksični efekat na PBMC u odnosu na efekat preostala tri ekstrakta. S ciljem dalje procene antitumorskog potencijala ekstrakata, određena je i selektivnost u antitumorskom dejstvu prema specifičnom malignom ćelijskom tipu u odnosu na zdrave PBMC (Tabela 4.4.). Najvišu selektivnost u antitumorskom dejstvu pokazao je heksanski ekstrakt (1), posebno u odnosu na K562 ćelije. Dihlormetanski ekstrakt (2) takođe je pokazao dobru selektivnost u antitumorskom dejstvu.

4.3. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti

Kako bi se ispitalo da li ekstrakti biljke *Helichrysum zivojinii* ispoljavaju proapoptotski efekat, definisan je tip ćelijske smrti koju indukuju ekstrakti u ciljnim HeLa ćelijama, na osnovu analize morfoloških karakteristika ćelija obojenih smešom akridin oranž/etidijum bromid fluorescentnom mikroskopijom.

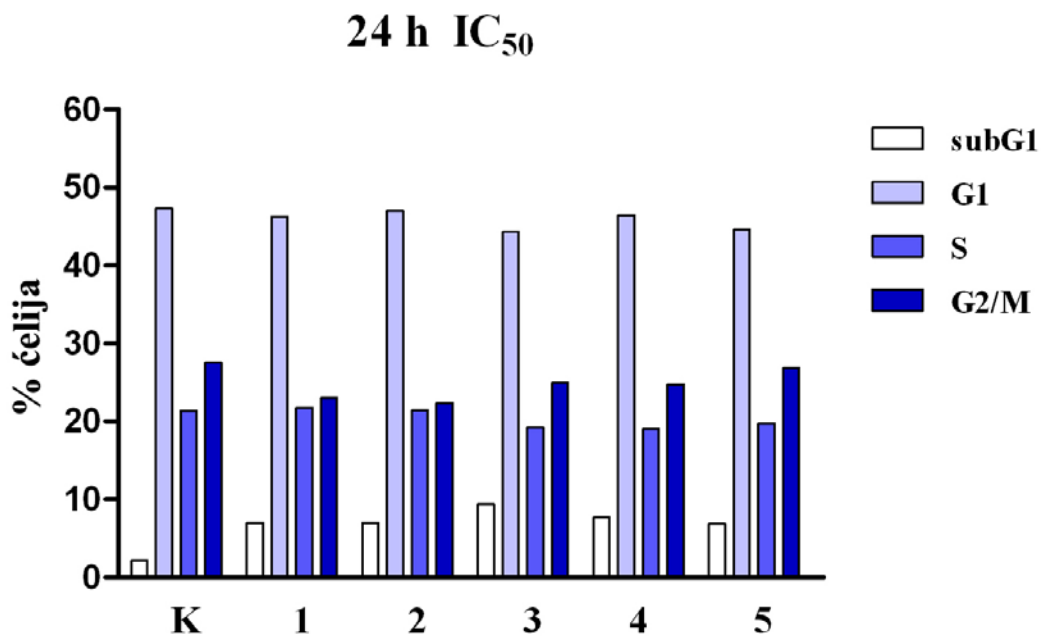


Slika 4.3. Fotomikrografije HeLa ćelija obojenih smešom boja akridin oranž/etidijum bromid nakon 24 h dejstva ekstrakata

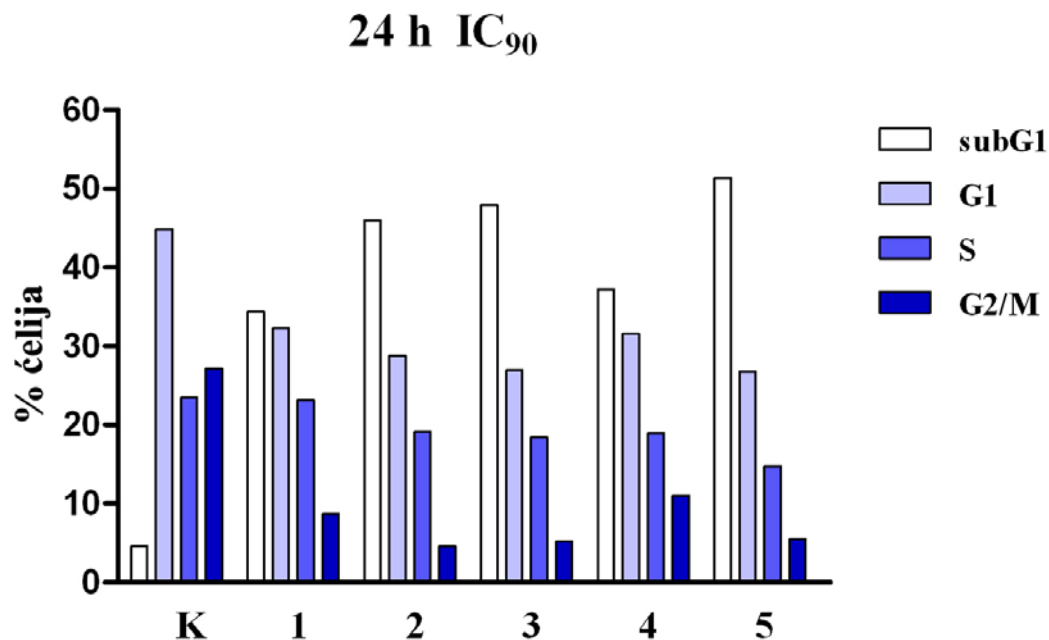
Morfološka analiza je pokazala da su svi testirani ekstrakti primenjeni pri koncentraciji IC₉₀ indukovali apoptozu u HeLa ćelijama nakon dejstva u trajanju od 24 h (Slika 4.3.) Zapažene su tipične morfološke karakteristike apoptoze, kao što su skupljanje ćelija, kondenzacija nukleusa, fragmentacija nukleusa; uočene su i narandžasto-crveno obojene ćelije u kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze (uočeno u ćelijama izloženim heksanskom ekstraktu (1)), kao i apoptotska tela. Time je potvrđeno da se citotoksičnost ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* zasniva na izraženom proapoptotskom efektu.

4.4. Analiza promena u distribuciji faza ćelijskog ciklusa

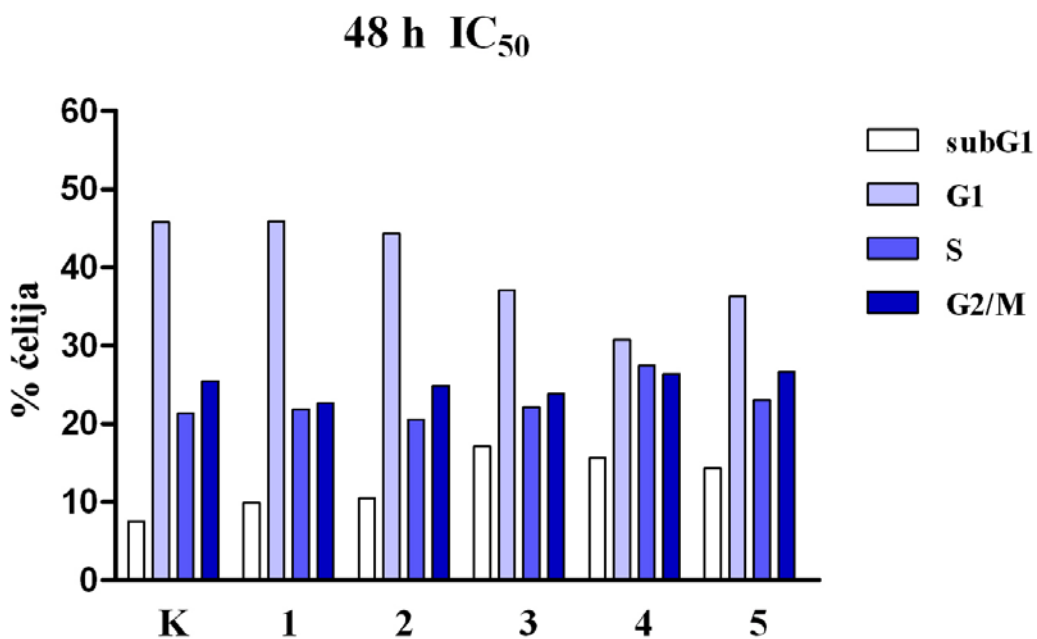
S ciljem razumevanja mehanizama citotoksičnog dejstva ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, analizirana je distribucija malignih HeLa ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa nakon dejstva ekstrakata (Slika 4.4.). Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da su svi testirani ekstrakti primenjeni pri koncentraciji IC₅₀ doveli do vremenski-zavisnog povećanja procenta ciljnih HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa. Već nakon 24 h dejstva svi ispitivani biljni ekstrakti primenjeni pri koncentraciji IC₉₀ doveli su do značajnog povećanja procenta ciljnih HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na procenat kontrolnog uzorka HeLa ćelija u subG1 fazi. Zapaženo je da su biljni ekstrakti pri koncentraciji IC₅₀ indukovali blagu akumulaciju HeLa ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa nakon 72 h dejstva. Značajno je napomenuti da analiza uticaja ekstrakata pri koncentraciji IC₉₀ na promenu u distribuciji faza ćelijskog ciklusa nakon 72 h nije rađena, jer je prethodno uočeno da je pri višim koncentracijama ekstrakata nakon tog vremenskog intervala u uzorcima ćelija prisutan jako mali broj vijabilnih ćelija.



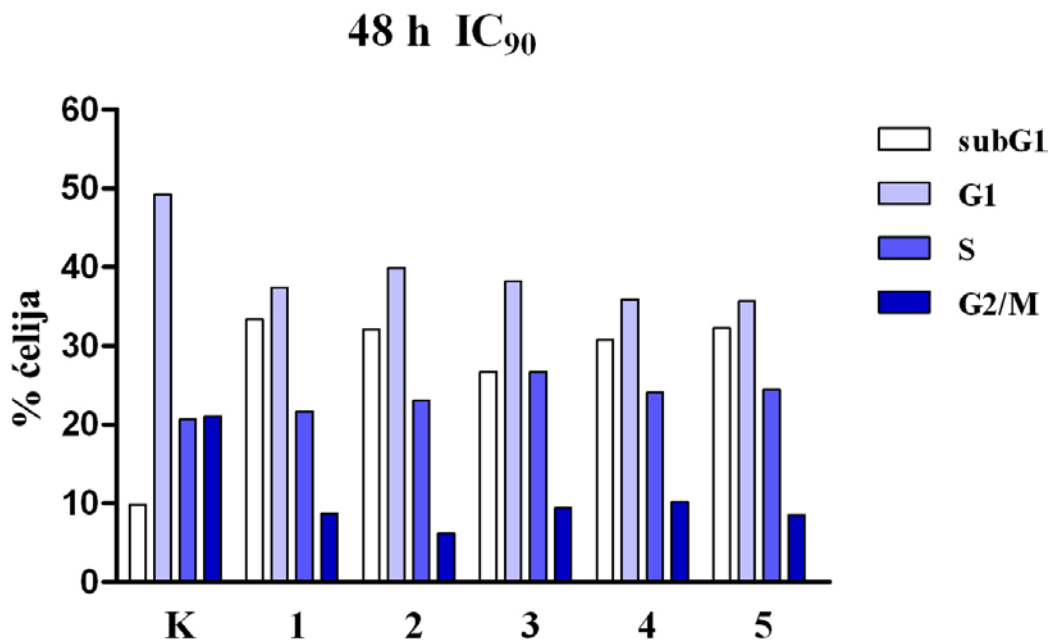
Slika 4.4. (a) Uticaj ekstrakata pri koncentraciji IC₅₀ na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h (K-kontrolni uzorak, 1-5-odgovarajući ekstrakti)



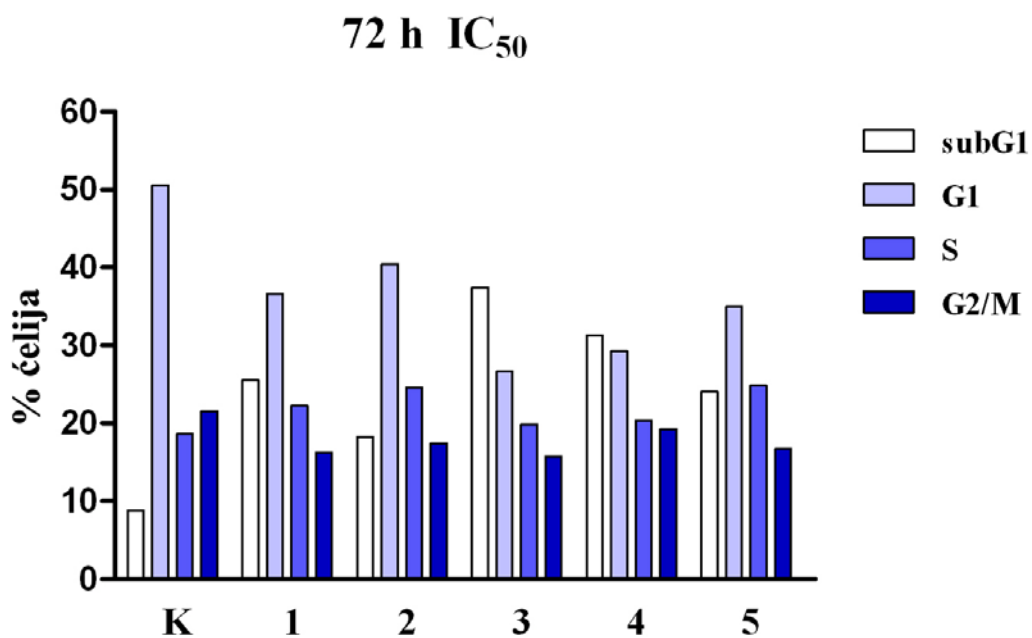
Slika 4.4. (b) Uticaj ekstrakata pri koncentraciji IC₉₀ na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h (K-kontrolni uzorak, 1-5-odgovarajući ekstrakti)



Slika 4.4. (c) Uticaj ekstrakata pri koncentraciji IC₅₀ na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 48 h (K-kontrolni uzorak, 1-5-odgovarajući ekstrakti)



Slika 4.4. (d) Uticaj ekstrakata pri koncentraciji IC₉₀ na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 48 h (K-kontrolni uzorak, 1-5-odgovarajući ekstrakti)

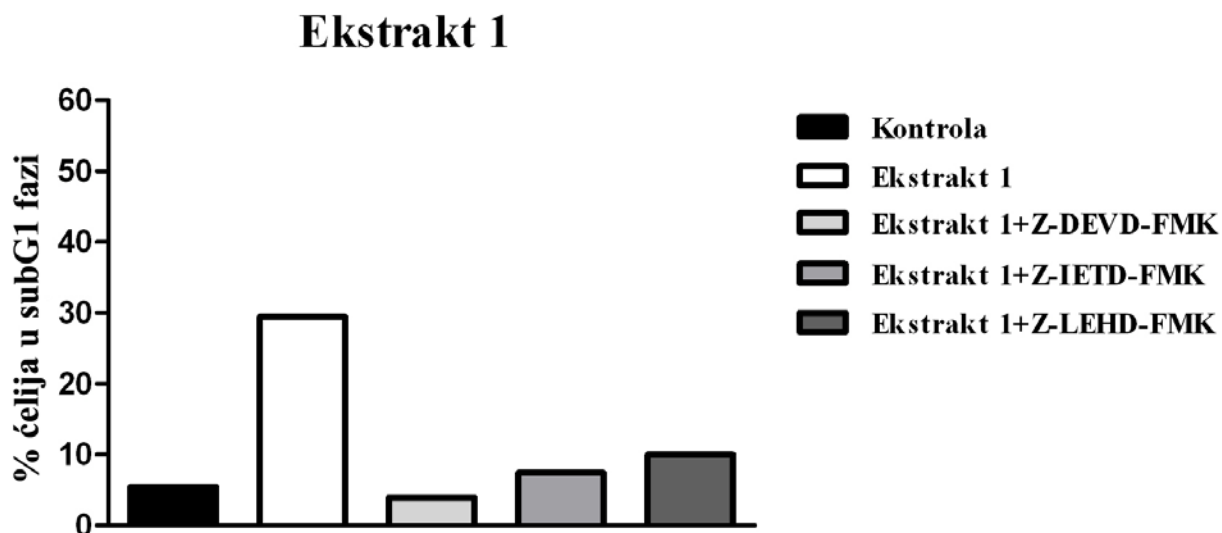


Slika 4.4. (e) Uticaj ekstrakata pri koncentraciji IC₅₀ na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 72 h (K-kontrolni uzorak, 1-5-odgovarajući ekstrakti)

4.5. Određivanje ciljnih kaspaza

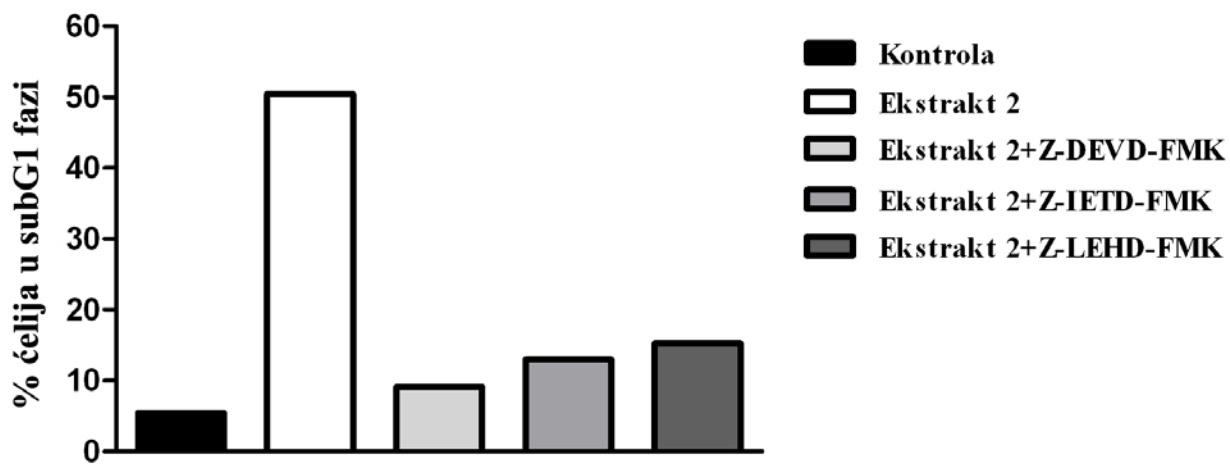
Obzirom da je pokazano da ekstrakti endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* ispoljavaju proapoptotsko dejstvo prema HeLa ćelijama, od značaja je bilo da se rasvetli signalni put kojim indukuju apoptozu u HeLa ćelijama pri višim koncentracijama određivanjem ciljnih kaspaza.

Za svaki od pet ispitivanih ekstrakata uočeno je da je prisustvo specifičnog inhibitora kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK), odnosno specifičnog inhibitora kaspaze-8 (Z-IETD-FMK) ili specifičnog inhibitora kaspaze-9 (Z-LEHD-FMK) u uzorku HeLa ćelija koji je tretiran odgovarajućim ekstraktom, dovelo do izrazitog smanjenja procenta apoptotskih HeLa ćelija u subG1fazi u odnosu na procenat ćelija u subG1 fazi u tretiranom uzorku HeLa ćelija koji nije bio pretretiran odgovarajućim inhibitorom (Slika 4.5.). Efekat inhibitora kaspaze-3 na morfologiju HeLa ćelija koje su bile izložene dejstvu testiranih ekstrakata predstavljen je na Slici 4.6.



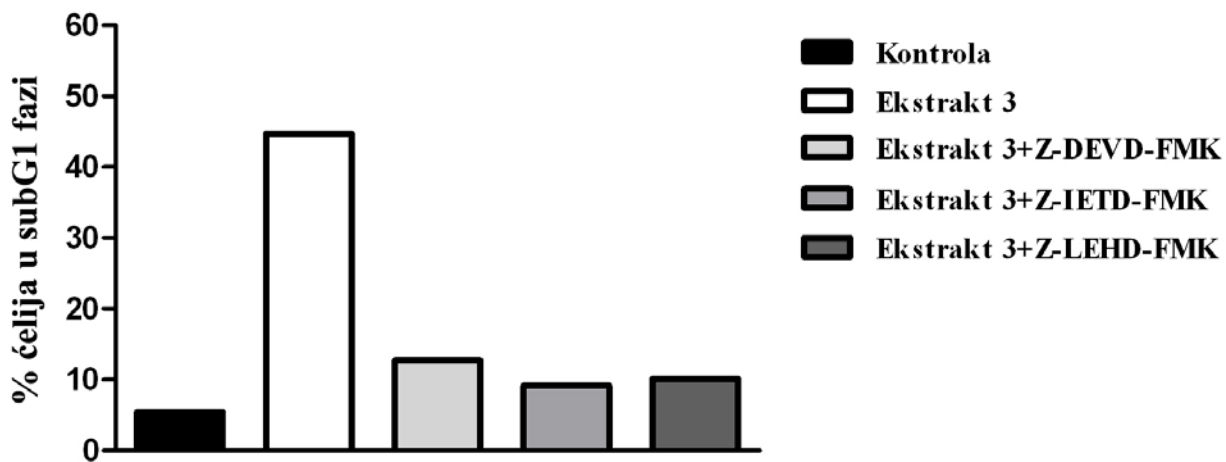
Slika 4.5. (a) Efekat specifičnih inhibitora kaspaza na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi nakon 24 h dejstva heksanskog ekstrakta (1) pri koncentraciji IC_{90}

Ekstrakt 2



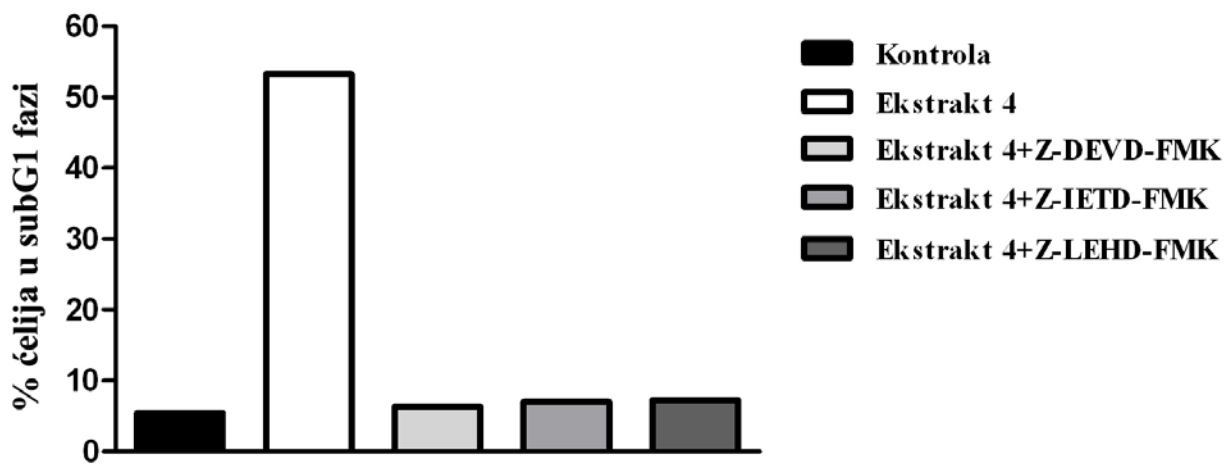
Slika 4.5. (b) Efekat specifičnih inhibitora kaspaza na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi nakon 24 h dejstva dihlorometanskog ekstrakta (2) pri koncentraciji IC_{90}

Ekstrakt 3



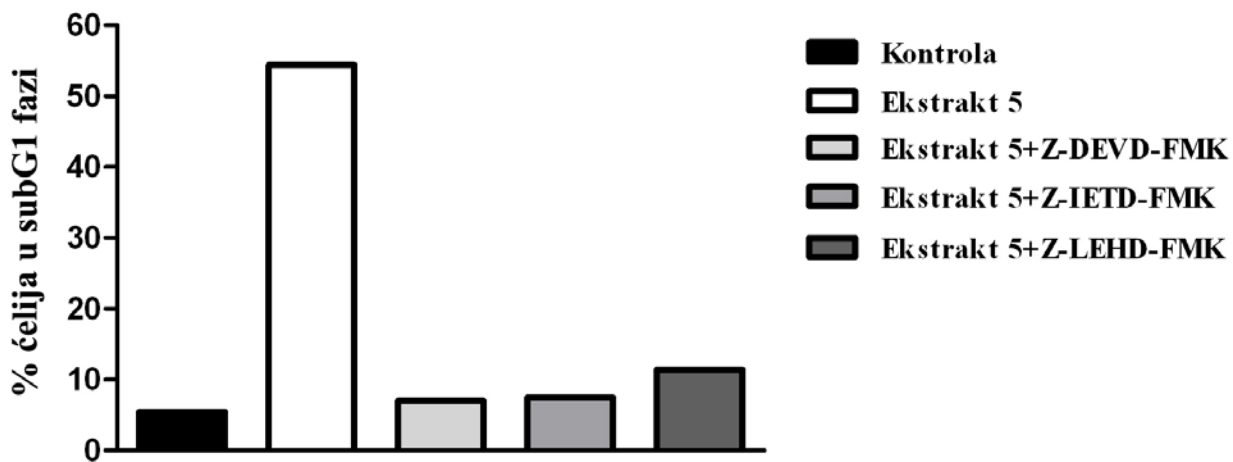
Slika 4.5. (c) Efekat specifičnih inhibitora kaspaza na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi nakon 24 h dejstva etil-acetatnog ekstrakta (3) pri koncentraciji IC_{90}

Ekstrakt 4

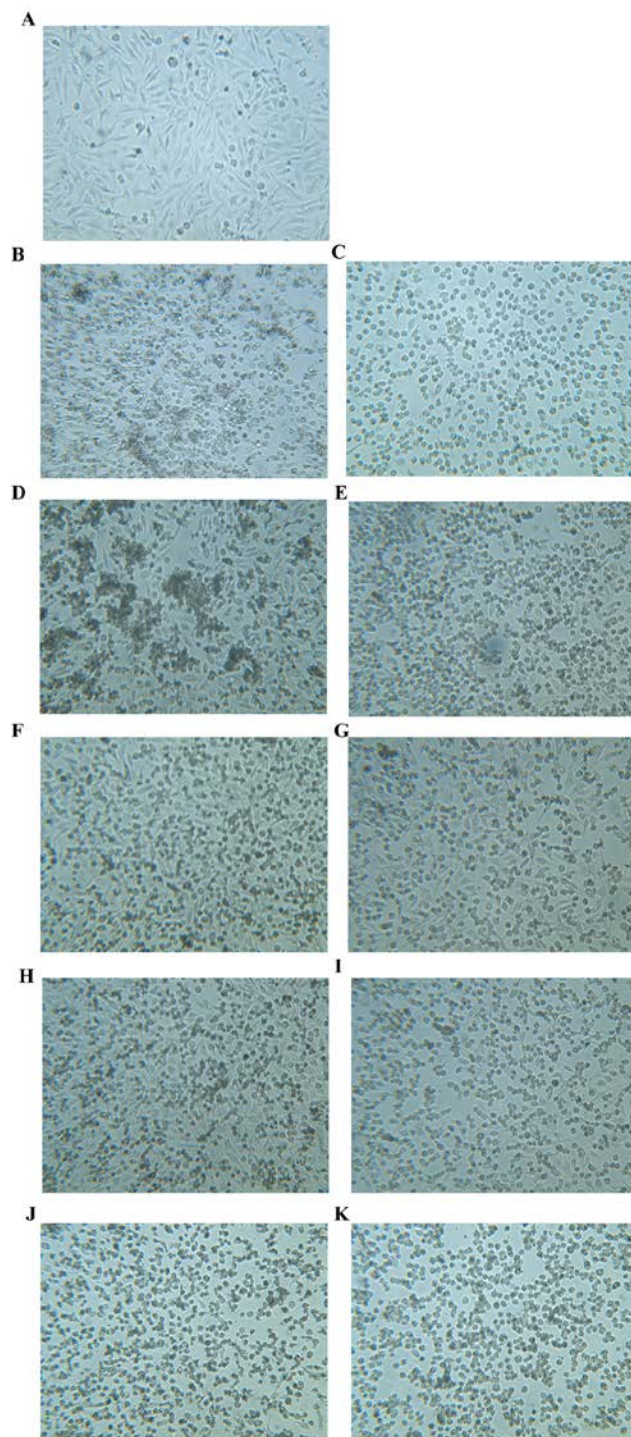


Slika 4.5. (d) Efekat specifičnih inhibitora kaspaza na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi nakon 24 h dejstva *n*-butanolskog ekstrakta (4) pri koncentraciji IC₉₀

Ekstrakt 5



Slika 4.5. (e) Efekat specifičnih inhibitora kaspaza na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi nakon 24 h dejstva metanolskog ekstrakta (5) pri koncentraciji IC₉₀

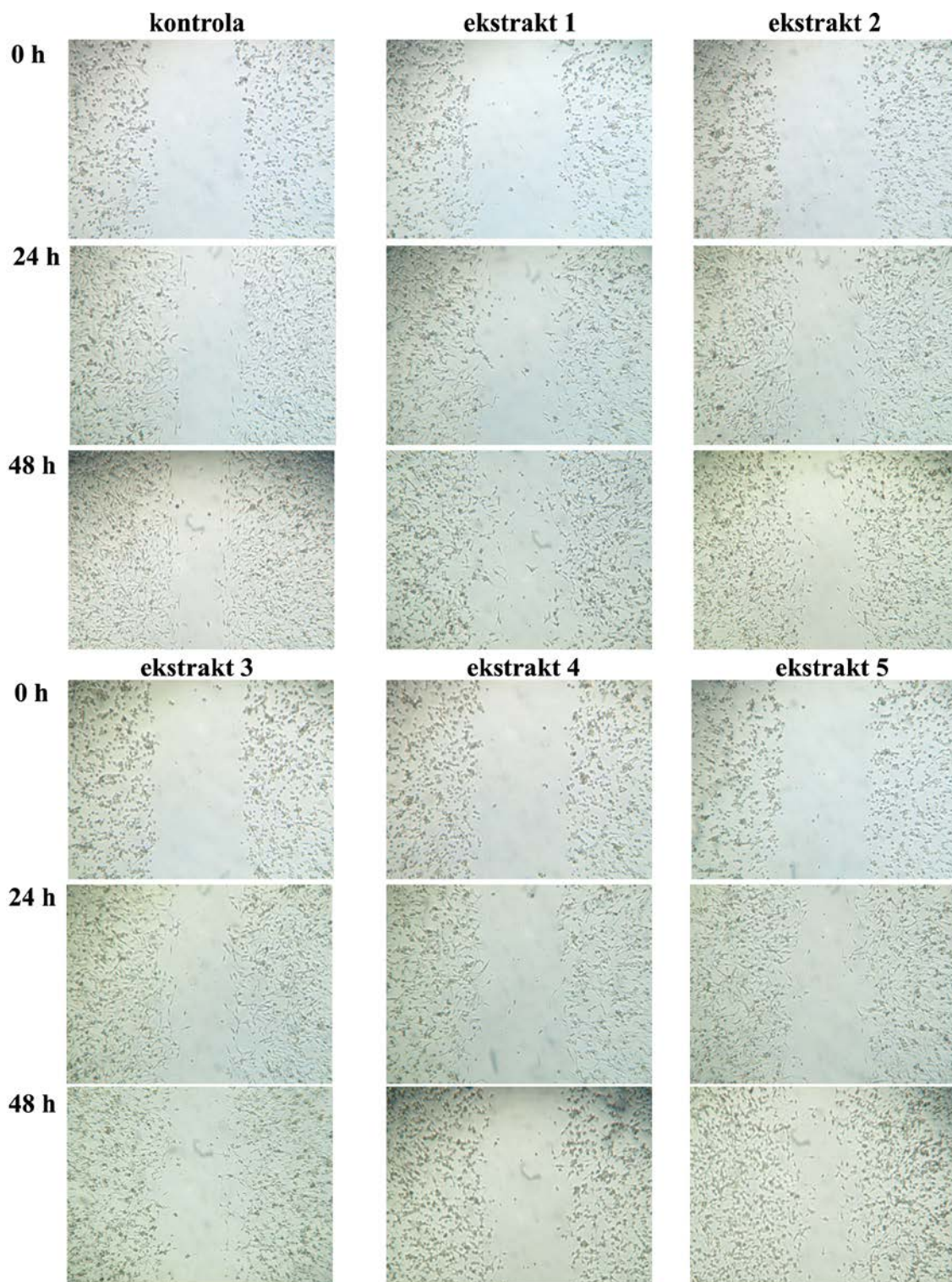


Slika 4.6. Efekat pretretmana HeLa ćelija inhibitorom kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK)
 (A – kontrola; B – ekstrakt 1, C – ekstrakt 1+Z-DEVD-FMK; D – ekstrakt 2, E – ekstrakt 2+Z-DEVD-FMK;
 F – ekstrakt 3, G – ekstrakt 3+Z-DEVD-FMK; H – ekstrakt 4, I – ekstrakt 4+Z-DEVD-FMK; J – ekstrakt 5, K
 – ekstrakt 5+Z-DEVD-FMK)

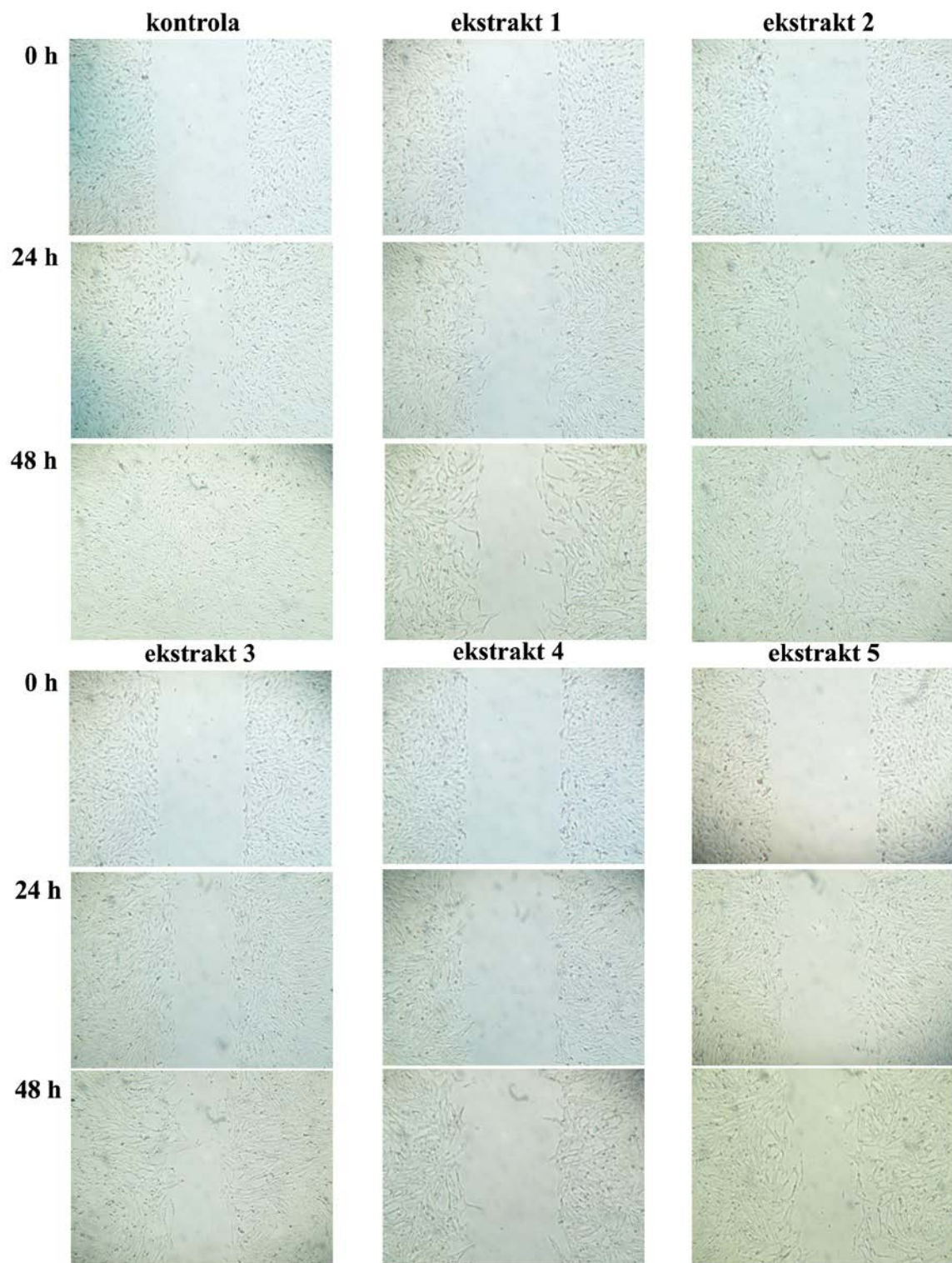
4.6. Efekat ekstrakata na migraciju ćelija

Primenom *in vitro* "scratch" eseja, poznatog i kao "wound healing" esej, ispitan je uticaj pet ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na migraciju humanih ćelija adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i humanih transformisanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene EA.hy926. Efekat ekstrakata na migraciju MDA-MB-231 ćelija je predstavljen na Slici 4.7. Može se uočiti da su heksanski ekstrakt (1) pri koncentraciji 12.5 µg/ml, etil-acetatni ekstrakt (3) pri koncentraciji 25 µg/ml i *n*-butanolski ekstrakt (4) pri koncentraciji 50 µg/ml značajno inhibirali migraciju ciljnih MDA-MB-231 ćelija. Dodatno, dihlormetanski ekstrakt (2) pri koncentraciji 12.5 µg/ml i metanolski ekstrakt (5) pri koncentraciji 50 µg/ml su ispoljili slab inhibitorni efekat na migraciju MDA-MB-231 ćelija. Niže testirane koncentracije biljnih ekstrakata nisu pokazale inhibitorno dejstvo na migraciju ovih ćelija.

Na Slici 4.8. jasno se može uočiti da su svi ekstrakti ispoljili inhibitorno dejstvo na migraciju EA.hy926 ćelija. Najizraženiji inhibitorni efekat na migraciju EA.hy926 ćelija pokazali su heksanski ekstrakt (1) pri koncentraciji 12.5 µg/ml i *n*-butanolski ekstrakt (4) pri koncentraciji 50 µg/ml. Etil-acetatni ekstrakt (3) pri koncentraciji 25 µg/ml i metanolski ekstrakt (5) pri koncentraciji 50 µg/ml takođe su ostvarili značajnu inhibiciju migracije ciljnih EA.hy926 ćelija. U poređenju sa dejstvom pomenuta četiri ekstrakta, dihlormetanski ekstrakt (2) pri koncentraciji 12.5 µg/ml je pokazao najslabije inhibitorno dejstvo na migraciju EA.hy926 ćelija. Značajno je i spomenuti da dihlormetanski ekstrakt pri dvostruko nižoj testiranoj koncentraciji nije pokazao inhibitorno dejstvo na ćelijsku migraciju. Dok su ostali testirani ekstrakti pri nižoj primenjenoj koncentraciji ostvarili slabiji inhibitorni efekat na migraciju EA.hy926 ćelija.



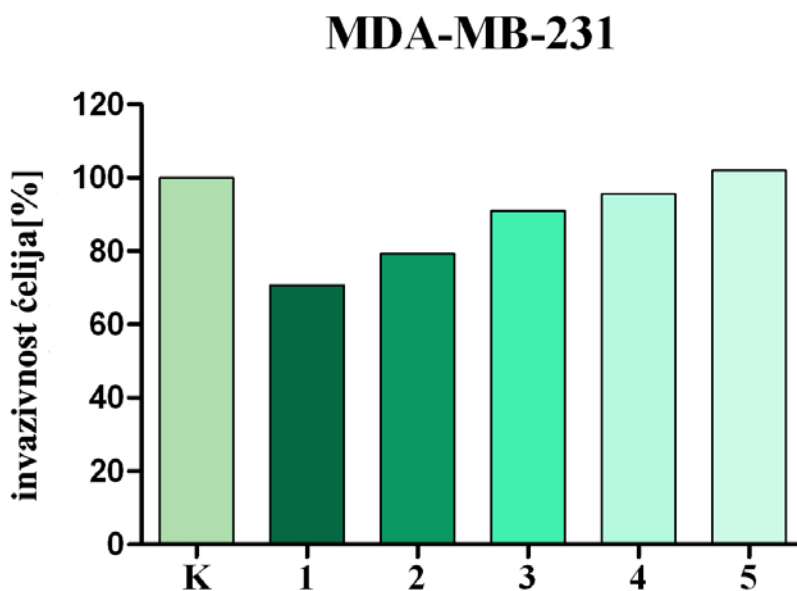
Slika 4.7. Efekat ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na migraciju MDA-MB-231 ćelija (ekstrakti 1,2: c=12.5 µg/ml; ekstrakt 3: c=25 µg/ml; ekstrakti 4 i 5: c=50 µg/ml)



Slika 4.8. Efekat ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na migraciju EA.hy926 ćelija (ekstrakti 1,2: c=12.5 µg/ml; ekstrakt 3: c=25 µg/ml; ekstrakti 4 i 5: c=50 µg/ml)

4.7. Efekat ekstrakata na invazivnost

Mogući antimetastatski potencijal ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* pri niskim netoksičnim koncentracijama je ispitan na MDA-MB-231 ćelijama. Rezultati testa invazivnosti su pokazali da su heksanski ekstrakt (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) pri koncentraciji od 12.5 µg/ml (odnosno pri finalnoj koncentraciji od 5 µg/ml), koja je netoksična, redukovali invazivnost MDA-MB-231 ćelija za 29% (1) i 21% (2) u odnosu na invazivnost ćelija u kontrolnom uzorku (Slika 4.9.). Etil-acetatni ekstrakt (3) pri netoksičnoj koncentraciji od 25 µg/ml (odnosno pri finalnoj koncentraciji od 10 µg/ml), je smanjio invazivnost MDA-MB-231 ćelija za samo 9% u odnosu na kontrolni uzorak. S druge strane, *n*-butanolski ekstrakt (4) i metanolski ekstrakt (5) primenjeni pri netoksičnoj koncentraciji od 50 µg/ml (odnosno pri finalnoj koncentraciji od 20 µg/ml) nisu pokazali inhibitorni efekat na invazivni potencijal MDA-MB-231 ćelija.



Slika 4.9. Efekat ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na invazivni potencijal MDA-MB-231 ćelija

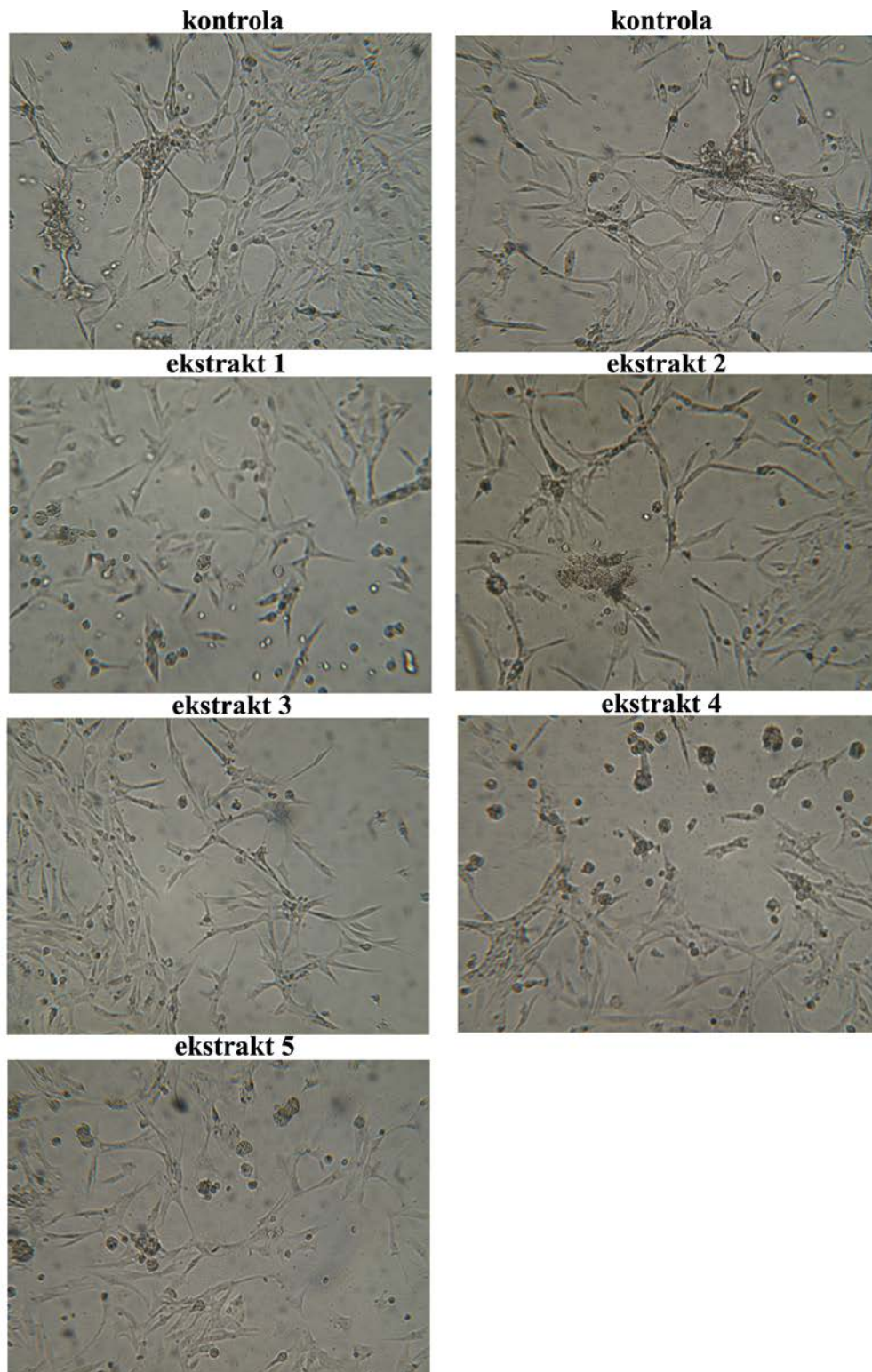
(K-kontrolni uzorak, 1-5-odgovarajući ekstrakti; ekstrakti 1,2: $c_f=5$ µg/ml; ekstrakt 3: $c_f=10$ µg/ml; ekstrakti 4 i 5: $c_f=20$ µg/ml)

4.8. Efekat ekstrakata na angiogenezu

Antiangiogenetska svojstva pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* su ispitana na EA.hy926 ćelijama primenom "*endothelial cell tube formation*" eseja, poznatog i kao *in vitro* esej angiogeneze.

Reprezentativne fotomikrografije nakon 24 h inkubacije EA.hy926 ćelija u kontrolnom uzorku, kao i EA.hy926 ćelija koje su bile izložene testiranim ekstraktima primenjenim pri niskim netoksičnim koncentracijama prikazane su na Slici 4.10.

Heksanski ekstrakt (1) primenjen pri koncentraciji od 12.5 µg/ml je pokazao izraženu antiangiogenetsku aktivnost. Naime, u uzorku EA.hy926 ćelija koje su tretirane pomenutim ekstraktom je zapažen znatno manji broj raširenih i međusobno povezanih ćelija, kao i manji broj tubularnih i poligonalnih struktura u odnosu na uzorak EA.hy926 ćelija koje su rasle samo u prisustvu kompletnog hranljivog medijuma. Od značaja je da se istakne da su dihlormetanski ekstrakt (2) pri netoksičnoj koncentraciji od 12.5 µg/ml, etil-acetatni ekstrakt (3) pri netoksičnoj koncentraciji od 25 µg/ml, kao i *n*-butanolski ekstrakt (4) i metanolski ekstrakt (5) pri netoksičnoj koncentraciji od 50 µg/ml ispoljili blago inhibitorno dejstvo na *in vitro* angiogenezu EA.hy926 ćelija.



Slika 4.10. Efekat ekstrakata biljke *Helichrysum zivoinii* na angiogenezu EA.hy926 ćelija (ekstrakti 1,2: c=12.5 µg/ml; ekstrakt 3: c=25 µg/ml; ekstrakti 4 i 5: c=50 µg/ml)

5. Diskusija

Jedan od osnovnih ciljeva u savremenoj eksperimentalnoj onkologiji je pronalaženje novih efikasnijih antitumorskih agenasa, koji će moći uspešno da spreče rast i dalju progresiju malignih tumora, zahvaljujući selektivnom dejstvu na ciljne molekule onkogenih signalnih puteva koji kontrolišu osnovna svojstva malignih ćelija: održavanje proliferativne signalizacije, neosetljivost na supresore rasta, izbegavanje ćelijske smrti, replikativnu imortalizaciju, stimulisanje angiogeneze, aktivaciju invazivnosti i metastaziranja, reprogramiranje energetskeg metabolizma i izbegavanje antitumorskog imunskog odgovora. Važno je da se istakne da značajnu ulogu u supresiji kancera mogu da imaju i agensi koji ispoljavaju selektivno antiinflamatorno dejstvo. Ključni značaj u identifikaciji i razvoju novih kancer-hemiopreventivnih i kancer-terapeutskih agenasa ima i njihova selektivnost u antitumorskom dejstvu prema malignim ćelijama u odnosu na zdrave netransformisane ćelije, a posebno u odnosu na normalne, netransformisane ćelije koje imaju visoku stopu proliferacije, kao što su progenitorske ćelije krvne loze i progenitorske ćelije intestinalnih epitelijalnih ćelija.

Mnoštvo sekundarnih metabolita biljaka, a posebno bioaktivna fenolna jedinjenja, nalaze se poslednjih godina u centru pažnje istraživanja u oblasti razvoja novih antikancerskih agenasa. Mogući kancer-supresivni značaj biljnih fenolnih jedinjenja ogleda se u njihovom antioksidativnom i antiinflamatornom dejstvu, antiproliferativnom i proapoptotskom dejstvu, kao i na antiangiogenetskom i antimetastatskom efektu. Svojstvo biljnih jedinjenja da ispoljavaju dejstvo na više ciljnih molekula deregulisanih signalnih puteva u malignim ćelijama, odnosno da istovremeno deluju inhibitorno na nekoliko osobenosti maligno transformisanih ćelija, je od posebne važnosti za potencijalnu primenu biljnih jedinjenja u hemiopreveniriji i/ili terapiji kancera.

Literaturni podaci ukazuju da bi biljne vrste iz roda *Helichrysum* mogle da predstavljaju značajan izvor jedinjenja sa potencijalnim antitumorskim dejstvom [92-105]. Naime, uočeno je da fenolni antioksidansi ovih biljaka mogu da inhibiraju DNK topoizomerazu I,

p38 MAP kinazu, NF- κ B transkripcijski faktor, ciklooksigenazu i lipooksigenazu, kao i oslobađanje proinflamatornih citokina. Pokazano je da ekstrakti nekih biljnih vrsta roda *Helichrysum* ispoljavaju antioksidativnu, antiinflamatornu i citotoksičnu aktivnost.

Predstavljeno istraživanje u okviru doktorske disertacije dovelo je do potpuno novih saznanja u literaturi o intenzitetu i mehanizmima antitumorskog dejstva pet ekstrakata koji su izolovani u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška.

Ispitivani ekstrakti biljke *Helichrysum zivojinii* (heksanski (1), dihlormetanski (2), etil-acetatni (3), *n*-butanolski (4) i metanolski ekstrakt (5)), ostvarili su selektivnu dozno-zavisnu citotoksičnu aktivnost prema ciljnim malignim ćelijskim linijama, kao i prema zdravim imunokompetentnim PBMC koje su bile stimulisane da proliferišu, dok je njihova citotoksična aktivnost bila manje izražena prema nestimulisanim PBMC. Najvišu citotoksičnu aktivnost prema testiranim malignim ćelijskim linijama ispoljili su heksanski (1) i dihlormetanski (2) ekstrakt. Značajno je da se napomene da su K562 ćelije mijeloidne leukemije bile značajno osjetljivije na citotoksično dejstvo heksanskog ekstrakta (1) u odnosu na ostale ispitivane ćelijske linije. Heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) su pokazali najizraženiji citotoksični efekat na HeLa, Fem-x, K562 i MDA-MB-231 ćelije. Citotoksično dejstvo pomenutih ekstrakata na EA.hy926 ćelije bilo je gotovo dvostruko ili trostruko niže, dok su najnižu aktivnost ispoljili prema MDA-MB-361 ćelijama (sa približno četverostruko nižim intenzitetom dejstva u odnosu na HeLa, Fem-x i K562 ćelije). Citotoksičnost etil-acetatnog ekstrakta(3) prema specifičnim malignim ćelijskim linijama je bila niža u odnosu na heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2). K562 ćelije su bile osjetljivije od ostalih malignih ćelijskih tipova na dejstvo ovog ekstrakta. HeLa i Fem-x ćelije su bile manje osjetljive na dejstvo pomenutog ekstrakta. Još niža citotoksična aktivnost je ispoljena na ćelijskim linijama adenokarcinoma dojke MDA-MB-361 i MDA-MB-231, koje su ispoljile i vrlo sličnu osjetljivost, što nije bio slučaj za prva dva ekstrakta. Najniža citotoksična aktivnost zapažena je prema EA.hy926 ćelijama. Četvrta dobijena frakcija, odnosno *n*-butanolski ekstrakt (4) je pokazao znatno nižu citotoksičnu aktivnost u odnosu na prethodne ekstrakte. Najizraženije citotoksično dejstvo ekstrakt je ostvario na

HeLa i K562 ćelijama. Nešto nižu citotoksičnost ekstrakt je ispoljio na Fem-x i MDA-MB-361 ćelijama, koje su pokazale i vrlo sličnu osetljivost. Interesantno je da su MDA-MB-231 ćelije pokazale nižu osetljivost na toksičnost ovog ekstrakta u odnosu na MDA-MB-361 ćelije. Citotoksično dejstvo *n*-butanolskog ekstrakta bilo je približno tri puta niže na EA.hy926 ćelijama u odnosu na HeLa i K562 ćelije. Metanolski ekstrakt (5) je ostvario najslabije citotoksično dejstvo u odnosu na ostale frakcije. HeLa, Fem-x i K562 ćelije su pokazale sličnu osetljivost na citotoksičnost pomenutog ekstrakta. Neznatno nižu osetljivost ispoljile su MDA-MB-361 ćelije. Intenzitet citotoksičnog dejstva ovog ekstrakta bio je dva puta viši prema MDA-MB-361 ćelijama u odnosu na MDA-MB-231 ćelje.

Zapažena selektivnost u antitumorskom dejstvu ekstrakata prema malignim ćelijskim linijama poreklom od različitih tipova tumora mogla bi da se objasni dejstvom različitih konstituenata ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na specifične ciljne molekule onkogenih signalnih puteva koji regulišu ćelijski rast, proliferaciju i apoptozu. Znatno viši intenzitet citotoksičnog dejstva koji su ostvarili heksanski (1), dihlormetanski (2) i etil-acetatni ekstrakt (3) prema HeLa, Fem-x i K562 ćelijama, koje odlikuje visoka stopa proliferacije, u odnosu na intenzitet citotoksične aktivnosti prema MDA-MB-361 ćelijama, koje odlikuje niža stopa proliferacije, mogao bi da ukaže da pomenuti ekstrakti ispoljavaju selektivni antiproliferativni efekat posredstvom uticaja na intraćelijske signalne kaskade koje kontrolišu proliferaciju malignih ćelija poreklom od različitih tipova tumora.

Izuzetno je važno da se istakne da su svi ispitivani ekstrakti biljke *Helichrysum zivojinii* ispoljili znatno viši intenzitet citotoksične aktivnosti prema HeLa, Fem-x i K562 ćelijama u odnosu na aktivnost prema normalnim PBMC, kako prema nestimulisanim tako i prema PBMC koje su bile stimulisane da proliferišu. Svaki od pet biljnih ekstrakata, primenjen pri koncentracijama koje su bile visoko citotoksične za maligne ćelije, pokazao je nisku toksičnost prema normalnim imunokompetentnim PBMC, koje imaju ključnu ulogu u odbrani imunskog sistema protiv malignih tumora. Dobra selektivnost u antitumorskom dejstvu prema ciljnim specifičnim malignim ćelijskim linijama u odnosu na zdrave imunokompetentne PBMC ukazuje na značajan antitumorski potencijal ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, a posebno heksanskog (1) i dihlormetanskog ekstrakta (2).

Heksanski ekstrakt (1) je pokazao izrazito visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema K562 ćelijama mijeloidne leukemije u odnosu na nestimulisane i mitogenom stimulisane PBMC. Značajnu selektivnost u antitumorskom dejstvu pokazao je i prema HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa u odnosu na zdrave PBMC. Međutim, vrednosti koeficijenta selektivnosti u antitumorskom dejstvu su bile nešto niže u slučaju HeLa ćelija, u odnosu na K562 ćelije. Visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema HeLa i K562 ćelijama u odnosu na nestimulisane i stimulisane imunokompetentne PBMC ispoljio je i dihlormetanski ekstrakt (2). Etil-acetatni ekstrakt (3) pokazao je dobru selektivnost u dejstvu prema K562 ćelijama u odnosu na zdrave PBMC. Takođe, *n*-butanolski (4) i metanolski ekstrakt (5) su ispoljili značajnu razliku u intenzitetu citotoksičnog dejstva prema HeLa i K562 ćelijama u odnosu na intenzitet dejstva prema PBMC koje nisu bile stimulisane da proliferišu.

Veoma je važno da se istakne da su svi testirani biljni ekstrakti pokazali slabiji intenzitet citotoksične aktivnosti prema nestimulisanim PBMC u odnosu na PBMC koje su bile stimulisane fitohemaglutininom da proliferišu. Ovaj podatak ukazuje da ekstrakti poseduju svojstvo da inhibiraju proliferaciju PBMC koja je aktivirana mitogenom. Zapravo, ispitivani ekstrakti bi mogli i da suprimiraju određene imunske funkcije, a posebno nespecifičnu stimulaciju antigenom. Dodatno, niži citotoksični efekat na nestimulisane PBMC u odnosu na mitogenom stimulisane PBMC, predstavlja još jedan podatak koji upućuje da bi specifične komponente signalnih puteva koji regulišu proliferaciju ćelija, mogli biti ciljni molekuli preko kojih ekstrakti biljke *Helichrysum zivojinii* ostvaruju svoje dejstvo.

Ispitivanje citotoksičnog dejstva ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* je pokazalo da su heksanski (1), dihlormetanski (2) i etil-acetatni ekstrakt (3) pri nižim testiranim koncentracijama stimulisali proliferaciju mirujućih PBMC. Efekat stimulacije proliferacije PBMC je u skladu sa poznatim efektom veoma niskih doza X zračenja na stimulaciju proliferacije ozračenih ćelija [117]. Zapaženi efekat tri pomenuta ekstrakta pri niskim koncentracijama na PBMC, koje su ključni učesnici imunskog odgovora, ukazuje na potencijalnu primenu ovih agenasa u stimulaciji imuniteta. Bilo bi značajno i da se ispita

aktivnost tri pomenuta ekstrakta na specifične subpopulacije PBMC, kao i da se rasvetle mogući mehanizmi preko kojih ostvaruju stimulaciju proliferacije PBMC. Potencijalni imunostimulatorni efekat heksanskog (1), dihlormetanskog (2) i etil-acetatnog ekstrakta (3) pri niskim koncentracijama mogao bi da se objasni i modulacijom produkcije citokina u limfocitima, uključujući IL-2, IFN- γ , kao i IL-4 i IL-6. Pokazano je da fenolna jedinjenja poput kvercetina, kemferola i apigenina mogu da ostvaruju imunoregulatorno dejstvo [118-120]. Specifično dejstvo ekstrakata na imunokompetentne PBMC moglo bi da se ostvaruje i preko NF- κ B transkripcionog faktora.

Rezultati ispitivanja intenziteta citotoksičnog dejstva pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška su u skladu sa prethodno pokazanim antikancerskim dejstvom različitih ekstrakata biljaka koje pripadaju rodu *Helichrysum* [99-104]. Analiza biološke aktivnosti ekstrakata pripremljenih od cvetova *Helichrysum plicatum* [100], biljke sa kojom vrsta *Helichrysum zivojinii* deli neka zajednička svojstva, je pokazala da pomenuti biljni ekstrakti ispoljavaju citotoksično dejstvo prema HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa, pri čemu su se vrednosti parametra IC₅₀ nalazile u opsegu od 41.9-42.1 μ g/ml [100]. Heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) biljke *Helichrysum zivojinii* pokazali su znatno viši intenzitet citotoksične aktivnosti prema ciljnim HeLa ćelijama (IC₅₀ (heksanski ekstrakt): 24.63 μ g/ml, IC₅₀ (dihlormetanski ekstrakt): 20.11 μ g/ml) u odnosu na pomenute ekstrakte. Dok je citotoksično dejstvo etil-acetatnog ekstrakta (3) biljke *Helichrysum zivojinii* prema HeLa ćelijama bilo sličnog intenziteta (IC₅₀: 37.98 μ g/ml). S druge strane, citotoksičnost dihlormetanskog (2) i etil-acetatnog (3) ekstrakta vrste *Helichrysum zivojinii* bila je sličnog intenziteta prema K562 ćelijama (IC₅₀ (dihlormetanski ekstrakt): 23.82 μ g/ml, IC₅₀ (etil-acetatni ekstrakt): 27.52 μ g/ml) u odnosu na dejstvo etil-acetatnog ekstrakta *Helichrysum plicatum* (IC₅₀: 25.9 μ g/ml) [100]. Međutim, heksanski ekstrakt (1) *Helichrysum zivojinii* je ostvario citotoksično dejstvo dvostruko višeg intenziteta prema K562 ćelijama u odnosu na etil-acetatni ekstrakt *Helichrysum plicatum* na čije su citotoksično dejstvo K562 ćelije bile najosetljivije [100]. Razlike u intenzitetu citotoksične aktivnosti ekstrakata dobijenih u vidu frakcija iz nadzemnih delova biljke *Helichrysum zivojinii* i ekstrakata dobijenih od cvetova

srodne biljne vrste *Helichrysum plicatum* su uzrokovane razlikama u kvantitativnom i kvalitativnom hemijskom sastavu pomenutih ekstrakata.

Pokazano je i antikancersko dejstvo ekstrakata niza biljnih vrsta roda *Helichrysum* koje naseljavaju prostore Južne Afrike [101,102]. Dihlormetanski ekstrakt dobijen od korena biljke *Helichrysum nudifolium* Less. ostvario je izraženu citotoksičnu aktivnost prema humanim melanomskim ćelijama UACC62, prema humanim MCF-7 ćelijama adenokarcinoma dojke, kao i prema TK-10 ćelijama renalnog kancera [101]. Koncentracija pri kojoj je ekstrakt ostvario totalnu inhibiciju rasta melanomskih ćelija nakon 48 h dejstva iznosila je 8.43 µg/ml, dok je u slučaju MCF-7 ćelija ta koncentracija iznosila 14.43 µg/ml [101]. *In vitro* ispitivanje dejstva ekstrakata južno-afričkih vrsta biljaka roda *Helichrysum* je pokazalo da su 33 od 35 ispitana ekstrakta različitih vrsta ispoljila citotoksično dejstvo prema MCF-7 ćelijama adenokarcinoma dojke [102]. Citotoksično dejstvo pomenutih ekstrakata bilo je značajno niže prema SF-268 ćelijama glioblastoma. Značajno je napomenuti da su ekstrakti sedam biljnih vrsta roda *Helichrysum* pokazali značajno viši intenzitet citotoksičnog dejstva prema MCF-7 ćelijama adenokarcinoma dojke u odnosu na intenzitet dejstva prema Grahamovim transformisanim humanim epitelijalnim ćelijama bubrega (nemaligna ćelijska linija). Pomenuti ekstrakti pri koncentraciji od 100 µg/ml nakon 48 h dejstva su redukovali rast ciljnih MCF-7 ćelija na manje od 25% u odnosu na kontrolni uzorak. Ekstrakti sledećih biljnih vrsta su pokazali značajnu selektivnu citotoksičnu aktivnost: *Helichrysum callicomum* Harv., *Helichrysum felinum* Less., *Helichrysum herbaceum* (Andr.) Sweet, *Helichrysum kraussii* Sch. Bip., *Helichrysum miconiifolium* DC, *Helichrysum odoratissimum* (L.) Sweet, *Helichrysum rosum* (Berg.) Less. cf. var. *rosum*. Međutim, podaci iz iste studije [102] ukazali su da su ekstrakti nekih biljnih vrsta roda *Helichrysum* pokazali nespecifičnu citotoksičnost, a neki su čak pokazali višu toksičnost prema nemaligim ćelijama.

Kancer-supresivni efekat pokazao je i etanolni ekstrakt biljke *Helichrysum maracandicum*, koja raste na području Uzbekistana [104]. Zapažen je i viši intenzitet citotoksičnog dejstva ovog ekstrakta na SENCAR mišje transformisane ćelije epitela kože (SST) u odnosu na intenzitet dejstva na SENCAR mišje transformisane tumorske ćelije

(SST-T). Pomenuti ekstrakt je već nakon 24 h inhibirao preživljavanje SST ćelija za 50% pri koncentraciji od 25 µg/ml, odnosno ciljnih SST-T ćelija pri koncentraciji od 62 µg/ml. *In vivo* ispitivanje njegovog antikancerskog dejstva na eksperimentalnim miševima je pokazalo da je primena pomenutog etanolskog ekstrakta dovela do smanjenja broja miševa koji su razvijali papilome. Izraženu citotoksičnu aktivnost pokazalo je i etarsko ulje biljke *Helichrysum gymnocephalum* [99]. Pri koncentraciji od 16 mg/l ovo etarsko ulje je inhibiralo preživljavanje ciljnih MCF-7 ćelija adenokarcinoma dojke za 50% nakon 48 h dejstva.

S druge strane, rezultati *in vitro* ispitivanja citogenetičkog efekta na humanim limfocitima metanolskih ekstrakata trinaest biljnih vrsta roda *Helichrysum*, koje su karakteristične za tursku floru i koje se primenjuju u narodnoj medicini, ukazali su da ekstrakti nekih biljnih vrsta pri višim koncentracijama ispoljavaju genotoksični efekat [121,122]. U jednoj studiji [121] je pokazano da su metanolski ekstrakti dve podvrste *Helichrysum armenium* subsp. *armenium* i podvrste *Helichrysum armenium* subsp. *araxinum* pri koncentraciji od 50 µg/ml i 100 µg/ml doveli do statistički značajnog smanjenja mitotičkog indeksa i replikacionog indeksa limfocita u odnosu na kontrolni uzorak; dok su pri koncentraciji od 100 µg/ml doveli po povećanja učestalosti limfocita sa mikronukleusima. Navedeni podaci ukazuju na genotoksičnost testiranih ekstrakata. Efekat pomenutih ekstrakata je bio još izraženiji pri koncentracijama od 500 i 1000 µg/ml. Ista studija je pokazala da su pri visokim koncentracijama od 500 i 1000 µg/ml metanolski ekstrakti vrsta *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri*, *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum*, *Helichrysum compactum* i *Helichrysum artvinense* doveli do redukcije mitotičkog i replikacionog indeksa limfocita, kao i do povećanja učestalosti limfocita sa mikronukleusima. Interesantno je zapažanje da su ekstrakti dve vrste *Helichrysum chasmolyticum* i *Helichrysum graveolens* primenjeni pri koncentracijama od 50, 100, 500 i 1000 µg/ml uzrokovali povećanje mitotičkog i replikacionog indeksa u kulturi humanih limfocita. Podaci iz druge studije [122] takođe su ukazali na *in vitro* genotoksičnost prema humanim limfocitima metanolskih ekstrakata *Helichrysum sanguineum* i *Helichrysum noeanum* već pri koncentraciji od 50 µg/ml, kao i ekstrakta *Helichrysum pamphylicum* pri

koncentraciji od samo 10 µg/ml. U istoj studiji nije uočeno genotoksično dejstvo ekstrakta *Helichrysum orientale* čak ni pri koncentraciji od 1000 µg/ml. Ovi podaci ukazuju da je prilikom ispitivanja različitih aspekata biološkog dejstva biljnih ekstrakata, uključujući i potencijalno antikancersko dejstvo, neophodno već u prvim fazama istraživanja ispitati dejstvo agenasa na različitim tipovima normalnih ćelijskih linija, kao i na zdravim imunokompetentnim PBMC. Međutim, izuzetno je važno da se za *in vitro* analize odaberu koncentracije ekstrakata koje će približno odgovarati fiziološkim koncentracijama.

Iako postoje literaturni podaci o citotoksičnoj aktivnosti ekstrakata biljaka roda *Helichrysum*, malo je podataka o mehanizmima citotoksične aktivnosti ekstrakata pomenutih biljnih vrsta, kao i o mogućem uticaju na druga osnovna svojstva malignih ćelija poput stimulacije angiogeneze, invazivnosti i metastaziranja. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti HeLa ćelija adenokarcinoma cerviksa, kao i analiza distribucije HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa, pokazale su da su pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* pri višim koncentracijama indukovali apoptozu u ciljnim HeLa ćelijama. S ciljem da se dodatno potvrdi proapoptotski efekat testiranih ekstrakata, kao i da se identifikuju ciljne kaspaze preko kojih ekstrakti aktiviraju apoptozu ciljnih ćelija, primenjeni su specifični ireverzibilni peptidni inhibitori kaspaza (Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK). Značajno smanjenje procenta apoptotskih HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa koje su tretirane svakim od pet testiranih ekstrakata u kombinaciji sa specifičnim inhibitorom kaspaze u odnosu na procenat ciljnih ćelija u subG1 fazi koje su bile tretirane samo odgovarajućim ekstraktom, ukazuje da je svaki od pet testiranih ekstrakata pri višim koncentracijama indukovao apoptozu aktivacijom kaspaze-3, osnovne efektorske kaspaze, kao i posredstvom aktivacije kaspaze-8 i kaspaze-9. Dakle, konstituenti ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* su indukovali apoptozu ciljnih HeLa ćelija preko unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze (posredstvom kaspaze-9), i spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze (posredstvom kaspaze-8). Treba imati u vidu da između dva signalna puta aktivacije apoptoze postoji određena veza, tako da je moguće da aktivacijom jednog signalnog puta, dođe i do nizvodne aktivacije drugog signalnog puta.

Zahvaljujući svojstvu da aktiviraju apoptotsku ćelijsku smrt u malignim ćelijama, kao i selektivnosti u antitumorskom dejstvu prema ciljnim malignim ćelijama u odnosu na zdrave imunokompetentne PBMC, testirani ekstrakti endemične biljke *Helichrysum zivojinii* poseduju značajan antitumorski potencijal. Važno je da se istakne da bi upravo novi antitumorski agensi koji indukuju apoptozu malignih ćelija i time suprimiraju dalji rast tumora mogli da imaju vrlo značajnu ulogu u kliničkom tretmanu malignih oboljenja [123-125].

Važan korak u daljoj proceni antitumorskog potencijala ekstrakata endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* bio je i da se ispita da li testirani ekstrakti ostvaruju inhibitorno dejstvo na migraciju ćelija, invazivnost i angiogenezu, odnosno da li poseduju svojstvo da dodatnim mehanizmima suprimiraju rast i dalju progresiju malignih tumora. Iako do sada nije bilo poznato u savremenoj literaturi da li ekstrakti biljnih vrsta roda *Helichrysum* mogu da ispoljavaju antiinvazivno i antiangiogenetsko dejstvo, saznanja da mnoga biljna fenolna jedinjenja mogu da modulišu više komponenti onkogenih signalnih puteva i da tako ostvare ciljano dejstvo na više različitih svojstava maligno transformisane ćelije, su predstavljala osnovno polazište za dalja ispitivanja.

Analiza uticaja ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* na migraciju i invazivnost humanih MDA-MB-231 ćelija adenokarcinoma dojke je pokazala da je heksanski ekstrakt (1) primenjen pri niskoj netoksičnoj koncentraciji ispoljio najizraženije supresivno dejstvo na migraciju, kao i na invazivni potencijal ciljnih ćelija redukujući invazivnost tretiranih ćelija za 29% u odnosu na kontrolni uzorak. Dihlormetanski ekstrakt (2) pri niskoj netoksičnoj koncentraciji je ostvario značajan inhibitorni efekat na invazivni potencijal MDA-MB-231 ćelija, pri čemu je doveo do smanjenja invazije ciljnih ćelija za 21% u odnosu na invazivnost ćelija u kontrolnom uzorku. Međutim, pomenuti ekstrakt je pokazao slabo inhibitorno dejstvo na migraciju ciljnih MDA-MB-231 ćelija. Iako je etil-acetatni ekstrakt (3) značajno suprimirao migraciju ciljnih MDA-MB-231 ćelija, pokazao je vrlo slab inhibitorni efekat na invazivnost ciljnih ćelija. Uočena razlika u dejstvu pomenutog ekstrakta je verovatno delom uslovljena i razlikama u primenjenim finalnim netoksičnim koncentracijama u dva testa, kao i specifičnim osobenostima svakog od primenjenih

testova. Dodatno, *n*-butanolni ekstrakt (4) je jedino ispoljio značajno supresivno dejstvo na migraciju MDA-MB-231 ćelija. S druge strane, metanolni ekstrakt (5) nije ispoljio inhibitorno dejstvo na invazivnost MDA-MB-231 ćelija, dok je ispoljio slab inhibitorni efekat na migraciju ciljnih ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju na značajan antiinvazivni potencijal heksanskog (1) i dihlormetanskog ekstrakta (2) biljke *Helichrysum zivojinii*. Bioaktivna jedinjenja prisutna u heksanskom ekstraktu (1) bi mogla da deluju na ciljne molekule intraćelijskih signalnih kaskada koje regulišu migraciju i invazivnost ćelija adenokarcinoma dojke, dok bi aktivni konstituenti dihlormetanskog ekstrakta (2) mogli da ispoljavaju efikasniju inhibiciju procesa invazivnosti zahvaljujući ciljanom dejstvu na molekularne komponente intraćelijskih puteva koji regulišu invazivnost ćelija adenokarcinoma dojke.

Svaki od pet testiranih ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* pokazao je svojstvo da efikasno inhibira migraciju humanih transformisanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene EA.hy926, odnosno ostvarili su supresivno dejstvo na inicijalni korak u procesu angiogeneze. Pored značajnog inhibitornog dejstva na migraciju ciljnih EA.hy926 ćelija, heksanski ekstrakt (1) je ispoljio i izraženu antiangiogenetsku aktivnost *in vitro*. Ostali testirani ekstrakti su ispoljili blag antiangiogenetski efekat. Veća efikasnost koju su dihlormetanski (2), etil-acetatni (3), *n*-butanolni (4) i metanolni ekstrakt (5) ispoljili u inhibiciji migracije ciljnih EA.hy926 ćelija u odnosu na inhibiciju angiogeneze *in vitro* ukazuje da bi pomenuti ekstrakti mogli da ostvaruju specifično dejstvo na komponente intraćelijskih regulatornih puteva koji kontrolišu migraciju endotelijalnih ćelija.

Hemijska karakterizacija pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz biljne vrste *Helichrysum zivojinii* je pokazala prisustvo bioaktivnih fenolnih jedinjenja. Za određene fenole testiranih ekstrakata postoje podaci u literaturi koji svedoče o njihovom kancer-supresivnom dejstvu.

Pokazano je da hlorogenske kiseline, koje su detektovane u etil-acetatnom (3), *n*-butanolnom (4) i metanolnom (5) ekstraktu ispoljavaju značajna antikancerska svojstva. Uočeno je da hlorogenska kiselina ostvaruje citotoksično dejstvo na niz humanih malignih ćelijskih linija: HeLa ćelije adenokarcinoma cerviksa, A549 ćelije karcinoma pluća, K562

ćelije mijeloidne leukemije, Bcr-Abl⁺ ćelijske linije hronične mijeloidne leukemije, HSC-2 ćelije oralnog skvamoznog karcinoma, HSG ćelije tumora pljuvačnih žlezda [126-130]. Uočeno je da je citotoksični efekat hlorogenske kiseline bio viši prema A549 ćelijama karcinoma pluća u odnosu na normalne fibroblaste pluća MRC-5, ukazujući na selektivnost u antikancerskom dejstvu [127]. U istoj studiji je zapaženo da hlorogenska kiselina indukuje formiranje kompleksa DNK i DNK topoizomeraze I ili DNK topoizomeraze II verovatno posredstvom vodonik peroksida, zatim dovodi do oštećenja DNK u K562 ćelijama, što uzrokuje aktivaciju apoptoze ciljnih ćelija [127]. Rezultati druge studije su pokazali da je hlorogenska kiselina indukovala apoptozu Bcr-Abl⁺ ćelijske linije hronične mijeloidne leukemije posredstvom inhibicije Bcr-Abl kinaze i c-Abl kinaze [128]. Dodatna istraživanja su ukazala da hlorogenska kiselina dovodi do povećanja intraćelijske koncentracije reaktivnih kiseoničnih intermedijera u K562 ćelijama, kao i da indukuje apoptozu u K562 ćelijama preko unutrašnjeg i spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze [129]. Važno je i saznanje da hlorogenska kiselina može da ispoljava i radioprotektivni efekat prema humanim limfocitima. Naime, zapaženo je da hlorogenska kiselina smanjuje stepen oštećenja DNK koje je izazvano radijacijom [131]. Hlorogenska kiselina je pokazala i inhibitorno dejstvo na invazivnost AH109A pacovskih ćelija hepatoma, pri čemu pri istom opsegu koncentracija nije ispoljavala antiproliferativno dejstvo [132]. Uočen je i snažan inhibitorni efekat hlorogenske kiseline na aktivnost matriksne metaloproteinaze-9 u Hep3B humanoј ćelijskoј liniji hepatocelularnog karcinoma, dok pri istim koncentracijama nije zapaženo citotoksično dejstvo [133]. Takođe, pokazan je i inhibitorni efekat hlorogenske kiseline na migraciju humanih U-87 ćelija glioblastoma, kao i na sekreciju matriksne metaloproteinaze-2 [134]. Dodatno, zapažen je i supresivni efekat derivata hlorogenske kiseline 3-kafeoil-4-dikafeolikvinske kiseline na migraciju i invazivnost humanih HT-1080 ćelija fibrosarkoma [135].

Bioaktivni flavon apigenin, čije je prisustvo pokazano u dihlormetanskom (2), etilacetatnom (3), *n*-butanolskom (4) i metanolskom ekstraktu (5) pokazuje značajna antitumorska svojstva *in vitro* [55,61,62,64,120]. Pokazano je da apigenin ostvaruje antiproliferativnu i proapoptotsku aktivnost prema različitim tipovima malignih ćelija, kao

što su ćelijske linije kancera dojke (MDA-MB-453, MDA-MB-468, MCF-7), cerviksa (HeLa), jajnika (A2780), prostate (PC-3, LNCaP, DU145), kolona (SW480, Caco-2, HT-29), želuca (SGC-7901), jetre (HepG2), zatim pluća (A549), tireoidne žlezde (UCLA RO82W-1), neuroblastoma (NUB-7, LAN-5, SK-N-BE(2)) i različitih hematoloških maligniteta (K562, Jurkat, HL-60, THP-1) [136-149]. Rezultati jednog istraživanja su pokazali da je apigenin indukovao apoptozu humanih MDA-MB-453 ćelija karcinoma dojke pokretanjem i spoljašnjeg i unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze [137]. Uočeno je da je apigenin u tretiranim HeLa ćelijama doveo do povećanja ekspresije p21 proteina i do zastoja u G1 fazi ćelijskog ciklusa, a doveo je i do aktivacije apoptoze, pri čemu je uočeno da apigenin indukuje ekspresiju p53, što je uzrokovalo i povećanje ekspresije Fas/Apo1 i kaspaze-3 [139]. Dodatno, apigenin je smanjio ekspresiju antiapoptotskog proteina Bcl-2 [139]. Rezultati jednog istraživanja su ukazali da apigenin indukuje apoptozu THP-1 humanih ćelija akutne monocitne leukemije aktivacijom kaspaze-9 i kaspaze-3 posredstvom protein kinaze C δ [149]. A dokazano je i unutarćelijsko prisustvo apigenina u blizini mitohondrija u THP-1 ćelijama [149]. Zapaženo je i da apigenin ostvaruje inhibično dejstvo na migraciju i invazivnost humanih MDA-MB-231 ćelija adenokarcinoma dojke posredstvom blokade PI3K/Akt kinaznog signalnog puta, kao i supresije funkcije integrina β 4 [150]. Uočeno je da je apigenin inhibirao adheziju, migraciju i invaziju A2780 ćelija karcinoma jajnika preko fokalne adhezione kinaze (FAK), a antimetastatski efekat apigenina potvrđen je i u *in vivo* eksperimentima [151]. Takođe, pokazano je i da je apigenin doveo do redukcije pokretljivosti i invazivnosti PC-3 ćelija kancera prostate, kao i do remodeliranja organizacije citoskeleta, pri čemu je doveo i do inhibicije FAK/Src signalnog puta [152]. Kancer-supresivni potencijal apigenina zasniva se i na inhibiciji angiogeneze. Pokazano je da je apigenin doveo do supresije ekspresije HIF-1 α i VEGF u PC-3 i DU145 malignim ćelijama, a ispoljio je i inhibični efekat na tumorsku angiogenezu *in vivo* [153]. Apigenin je ostvario inhibični efekat na migraciju, proliferaciju i formiranje tubularnih struktura HUVEC ćelija (humane endotelijalne ćelije umbilikalne vene) [154]. Antiangiogenetski efekat apigenina zasnivao se na modulaciji JAK/STAT i ERK signalnih puteva [154].

Podaci iz literature ukazuju i na značajna kancer-supresivna svojstva flavonola kvercetina, čiji su *O*-glikozidi detektovani u etil-acetatnom (3), *n*-butanolskom (4) i metanolskom ekstraktu (5) [55,61,62,64,155,156]. Kvercetin ispoljava antikancersku aktivnost prema nizu humanih malignih ćelijskih tipova, poput HeLa ćelija adenokarcinoma cerviksa, MDA-MB-453 ćelija karcinoma dojke, ćelijskih linija adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7, A431 ćelija epidermalnog karcinoma, LoVo ćelija karcinoma kolona, HepG2 ćelija hepatocelularnog karcinoma, ćelijskih linija oralnog kancera (SCC-1483, SCC-25 i SCC-QLL1), zatim A549 ćelija karcinoma pluća, K562 ćelija mijeloidne leukemije, U-138 MG ćelija glioblastoma [157-167]. Rezultati jednog istraživanja su pokazali da je kvercetin ispoljio izraženo citotoksično dejstvo prema HeLa ćelijama [157]. Doveo je do zastoja ciljnih HeLa ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, kao i do pokretanja apoptoze aktivacijom unutrašnjeg (mitohondrijalnog) puta posredstvom p53 signalnog puta. U HeLa ćelijama tretiranim kvercetinom je detektovano povećanje ekspresije Bax, Bad, Apaf-1, kaspaze-3 i kaspaze-9, p53, p21, IκB, dok je detektovano sniženje ekspresije ciklina D, PCNA, NF-κB, Bcl-2, Bcl-XL [157]. Pokazano je i da je kvercetin indukovao zastoj u G2/M fazi ćelijskog ciklusa K562 ćelija mijeloidne leukemije, kao i da je indukovao apoptozu [164]. Uočeno je da je kvercetin doveo do zastoja u S fazi ćelijskog ciklusa i do pokretanja apoptoze u MCF-7 ćelijama adenokarcinoma dojke posredstvom aktivacije kaspaze-6, kaspaze-8 i kaspaze-9 [160]. U MCF-7 ćelijama koje su tretirane kvercetinom uočeno je sniženje ekspresije ciklina A i ciklina E, CDK2, Bcl-2, XIAP, dok je došlo do povećanja ekspresije p53 i p57. Dodatno, podaci iz jedne studije ukazuju da je kvercetin ispoljio antiproliferativni i propapoptotski efekat na MDA-MB-231 ćelije adenokarcinoma dojke [161]. Indukcija apoptoze zasnivala se na aktivaciji kaspaze-3, kaspaze-8 i kaspaze-9. Pored citotoksičnog dejstva na A431 ćelije epidermalnog karcinoma, zapaženo je i da je kvercetin ispoljio antimetastatski efekat na ciljne A431 ćelije posredstvom smanjenja sekrecije matriksne metaloproteinaze-2 i matriksne metaloproteinaze-9 [159]. Dodatno, kvercetin je doveo do značajne inhibicije invazivnosti MDA-MB-231 ćelija, kao i do smanjenja aktivnosti matriksne metaloproteinaze-3 [168]. Takođe, uočen je i inhibitorski efekat kvercetina na angiogenezu HUVEC ćelija, koja je bila stimulirana VEGF-om [169].

Kancer-supresivna svojstva ispoljava i bioaktivni flavanon naringenin, čije je prisustvo pokazano u dihlormetanskom (2), etil-acetatnom (3), *n*-butanolskom (4) i metanolskom ekstraktu (5) [55,64]. Pokazano je da naringenin ostvaruje citotoksično dejstvo na niz malignih ćelijskih linija: ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7, MDA-MB-231), HeLa ćelije adenokarcinoma cerviksa, ćelije kancera jetre (HepG2, Hep3B, Huh7), PK-1 ćelije kancera pankreasa, Caco-2 ćelije kancera kolona, ćelijske linije kancera stomaka (KATOIII, MKN-7), ćelijske linije leukemije (Jurkat, HL-60, U937, NALM-6, THP-1) [170-172]. Rezultati analize dejstva naringenina na HL-60 ćelije promijelocitne leukemije ukazali su da indukuje apoptozu ciljnih ćelija posredstvom aktivacije kaspaze-3 i kaspaze-9, kao i aktivacije NF- κ B transkripcionog faktora [171]. Uočeno je da naringenin dovodi do pokretanja apoptoze u tretiranim THP-1 ćelijama akutne monocitne leukemije aktivacijom kaspaze-8, kaspaze-9 i efektorske kaspaze-3 [172]. U istoj studiji je zapaženo da naringenin u ciljnim THP-1 ćelijama dovodi do sniženja ekspresije Bcl-2, povećanja ekspresije Bax, i ostvaruje inhibitorno dejstvo na PI3K/Akt signalni put. Pokazano je i da naringenin dovodi do sniženja ekspresije regulatornih proteina odgovornih za epitelijalno-mezenhimsku tranziciju u ćelijama kancera pankreasa (AsPC-1 i PANC-1) posredstvom inhibicije TGF- β 1/Smad3 signalnog puta. Na taj način naringenin je ispoljio inhibitorno dejstvo na migraciju i invazivnost ciljnih ćelija kancera pankreasa [173]. Jedna *in vivo* studija je ukazala da je naringenin doveo do značajnog smanjenja broja plućnih metastaza u C57BL6/N miševima u koje su bile implantirane mišje B16-F10 metastatske melanomske ćelije [174]. Dodatno, kancer-supresivni potencijal naringenina zasniva se i na anti-angiogenetskoj aktivnosti [175].

Značajna antikancerska svojstva poseduje i kemferol, čiji su *O*-glukozidi detektovani u etil-acetatnom (3), *n*-butanolskom (4) i metanolskom ekstraktu (5) [55,61,64,176]. Brojna istraživanja ukazuju na antiproliferativnu i proapoptotsku aktivnost kemferola prema različitim tipovima humanih malignih ćelijskih linija, poput MCF-7 i MDA-MB-453 ćelija kancera dojke, HeLa ćelija adenokarcinoma cerviksa, OVCAR-3 ćelija adenokarcinoma jajnika, A549 ćelija karcinoma pluća, A172 ćelija glioblastoma, U-2 OS ćelija osteosarkoma, HCT 116 ćelija kolorektalnog karcinoma, zatim SK-MEL-5 i SK-MEL-28

ćelija melanoma, A431 ćelija epidermalnog karcinoma, ćelijskih linija leukemije (K562, U937, HL-60) [177-186]. Pokazano je da je kemferol indukovao apoptozu MCF-7 ćelija adenokarcinoma dojke preko aktivacije ERK signalnog puta [177]. Dodatno, proapoptotska aktivnost kemferola prema A549 ćelijama karcinoma pluća zasnivala se na aktivaciji MAP kinazne signalne kaskade [178]. S druge strane, tretman kemferolom doveo je do zastoja u G2/M fazi ćelijskog ciklusa ciljnih MDA-MB-453 ćelija karcinoma dojke posredstvom inhibicije CDK2, ciklina A i ciklina B, kao i do indukcije apoptoze posredstvom aktivacije p53 [186]. Rezultati jedne studije su pokazali da je kemferol-7-*O*- β -D-glukozid uzrokovao zastoj u G2/M fazi ćelijskog ciklusa i aktivaciju apoptoze u ciljnim HeLa ćelijama [182]. U tretiranim HeLa ćelijama detektovano je povećanje ekspresije Bax, sniženje ekspresije Bcl-2, kao i inhibicija nukleusne translokacije NF- κ B transkripcionog faktora. Zapaženo je da je kemferol indukovao apoptozu K562 ćelija mijeloidne leukemije preko inhibicije PI3K/Akt signalnog puta, što je uzrokovalo pokretanje unutrašnjeg (mitohondrijalnog) puta aktivacije apoptoze [181]. Kemferol ostvaruje i antiinvazivni i antiangiogenetski efekat. Pokazano je da kemferol ispoljava inhibitorno dejstvo na invazivni potencijal MDA-MB-231 ćelija adenokarcinoma dojke [168]. Uočeno je da je kemferol inhibirao angiogenezu ćelija kancera jajnika posredstvom supresije ekspresije VEGF. Na osnovu dobijenih rezultata predloženo je da se pomenuti antiangiogenetski efekat kemferola ostvaruje preko dejstva na ERK-NF κ B-cMyc-p21-VEGF signalni put [187].

Antikancerski potencijal luteolina, čiji su *O*-glukozidi konstituenti etil-acetatnog (3), *n*-butanolskog (4) i metanolskog ekstrakta (5), zasniva se na antiproliferativnoj, proapoptotskoj aktivnosti, zatim na antimetastatskim i antiangiogenetskim svojstvima [55,61,62,64,188,189]. Podaci iz literature svedoče o citotoksičnoj aktivnosti luteolina prema sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HepG2 ćelijama hepatocelularnog karcinoma, A549 ćelijama karcinoma pluća, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama adenokarcinoma dojke, HL-60 i K562 ćelijama leukemije, HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa, SK-OV-3 ćelijama adenokarcinoma jajnika, DU145 ćelijama kancera prostate, A431 ćelijama epidermalnog karcinoma, HT-29 i SW620 ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma [159,190-198]. Pokazano je da je luteolin indukovao apoptozu ciljnih

HeLa ćelija posredstvom povećanja ekspresije DR5, kao i aktivacije kaspaze-8, kaspaze-9, kaspaze-10 i kaspaze-3 [196]. S druge strane, nije uočen proapoptotski efekat luteolina prema humanim PBMC [196]. Zapaženo je i da je luteolin inhibirao aktivnost Aurora B serin/treonin kinaze, jednog od regulatora mitoze u tretiranim HeLa ćelijama [195]. Dodatno je pokazano da je indukcija apoptoze u HeLa ćelijama tretiranim luteolinom povezana sa indukcijom degradacije fosforilisanog STAT3 posredstvom asocijacije luteolina sa Hsp90 molekularnim šaperonom, čiji je klijent protein upravo STAT3 [198]. Luteolin je doveo i do zastoja ćelijskog ciklusa u S i G2/M fazama, kao i do indukcije apoptoze u ciljnim MDA-MB-231 ćelijama adenokarcinoma dojke [193]. U MDA-MB-231 ćelijama tretiranim luteolinom detektovano je sniženje ekspresije Akt, PLK1, ciklina A, ciklina B1, CDK2, CDC2 i Bcl-XL, dok je došlo do povišenja ekspresije p21 i Bax. Anti-invazivni efekat luteolina pokazan je prema MDA-MB-231 ćelijama (klon 1833), LNM35 ćelijama kancera pluća, MCF-7/6 ćelijama adenokarcinoma dojke [190]. Luteolin je ispoljio inhibitorski efekat na formiranje tubularnih struktura HUVEC ćelija [154]. Anti-angiogenetska aktivnost luteolina bila je ostvarena posredstvom JAK/STAT3 signalnog puta i MAP kinaznog signalnog puta [154].

In vitro ispitivanje antitumorske aktivnosti pet ekstrakata izolovanih u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška je ukazalo na značajan antitumorski potencijal heksanskog (1) i dihlormetanskog ekstrakta (2). Heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) su ispoljili izraženo citotoksično dejstvo prema ciljnim malignim ćelijskim linijama, zatim visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema specifičnim malignim ćelijskim tipovima u odnosu na zdrave imunokompetentne PBMC, kao i antiinvazivna i antiangiogenetska svojstva. Značajno je i da se istakne da ova dva ekstrakta pri netoksičnim koncentracijama pri kojima su ostvarivali inhibitorski efekat na ćelijsku migraciju, invazivnost i angiogenezu, ne samo da nisu ispoljavali toksično dejstvo prema zdravim PBMC, već su i stimulisali njihovu proliferaciju. Fenolni konstituenti heksanskog (1) i dihlormetanskog ekstrakta (2), koji ostvaruju inhibitorsko dejstvo na više osnovnih svojstava malignih ćelija, pri čemu pokazuju izuzetno nisku citotoksičnost prema zdravim ćelijama, mogli bi da predstavljaju nove potencijalne antikancerske agense.

Možda bi upravo potencijalna primena ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii*, koje odlikuje specifični kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih jedinjenja, mogla da omogući efikasniji i selektivniji *in vitro* kancer-hemiopreventivni i/ili kancer-terapeutski efekat u odnosu na potencijalnu primenu pojedinačnih bioaktivnih fenolnih jedinjenja. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da bi značajan kancer-supresivni potencijal ekstrakata endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* mogao dalje da se ispituje i u potpunosti rasvetli u *in vivo* istraživanjima.

6. Zaključci

- Ekstrakti endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* (heksanski (1), dihlormetanski (2), etil-acetatni (3), *n*-butanolski (4) i metanolski ekstrakt (5)), ispoljavaju selektivnu dozno-zavisnu citotoksičnu aktivnost prema ciljnim malignim ćelijskim linijama, kao i prema zdravim imunokompetentnim PBMC koje su mitogenom stimulisane da proliferišu, dok je njihova citotoksična aktivnost manje izražena prema nestimulisanim PBMC.
- Svi ispitivani ekstrakti ispoljavaju znatno viši intenzitet citotoksične aktivnosti prema HeLa, Fem-x i K562 ćelijama u odnosu na intenzitet aktivnosti prema normalnim PBMC, kako prema nestimulisanim tako i prema PBMC koje su stimulisane mitogenom da proliferišu.
- Citotoksično dejstvo ekstrakata je znatno slabijeg intenziteta prema nestimulisanim PBMC u odnosu na PBMC koje su stimulisane da proliferišu.
- Heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) ispoljavaju visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema ciljnim HeLa i K562 malignim ćelijama u odnosu na nestimulisane i mitogenom stimulisane normalne PBMC.
- Svaki od pet ekstrakata biljke *Helichrysum zivojinii* pri višim koncentracijama indukuje apoptozu ciljnih HeLa ćelija posredstvom unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze i spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze.
- Heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) pri niskim netoksičnim koncentracijama ostvaruju značajno inhibitorno dejstvo na invazivnost MDA-MB-231 ćelija adenokarcinoma dojke.
- Svaki od pet testiranih ekstrakata je pokazao svojstvo da efikasno inhibira migraciju humanih transformisanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene EA.hy926.

- Heksanski ekstrakt (1) ispoljava izraženu antiangiogenetsku aktivnost *in vitro*. Ostali testirani ekstrakti ispoljavaju blag antiangiogenetski efekat *in vitro*.
- Ekstrakti izolovani u vidu frakcija iz endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* poseduju značajan antitumorski potencijal zahvaljujući selektivnom i izraženom antiproliferativnom i proapoptotskom dejstvu prema malignim ćelijama u odnosu na normalne PBMC.
- Najznačajniji antitumorski potencijal imaju heksanski (1) i dihlormetanski ekstrakt (2) obzirom da ispoljavaju najizraženiju citotoksičnu aktivnost prema ciljnim malignim ćelijama, visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu prema malignim u odnosu na normalne ćelije, kao i značajnu antiinvazivnu i antiangiogenetsku aktivnost *in vitro*.

7. Literatura

1. Amin ARM, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM: Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol* 2009; 27:2712-2725.
2. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X: Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? *Pharm Res* 2010; 27:950-961.
3. Neergheen VS, Bahorun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI: Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* 2010; 278:229-241.
4. Surh YJ: Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:768-780.
5. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S: Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 2009; 59:365-378.
6. Pan L, Chai H, Kinghorn AD: The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett* 2010; 3:1-8.
7. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ: Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 2009; 109:3012-3043.
8. Newman DJ, Cragg GM: Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75:311-335.
9. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93:2325-2327.
10. Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S: First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J Am Chem Soc* 1994; 116:1597-1598.
11. Holton RA, Kim HB, Somoza C, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S: First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings. *J Am Chem Soc* 1994; 116:1599-1600.

12. Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:253-265.
13. <http://www.cancer.gov>
14. Yared JA, Tkaczuk KHR: Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6:371-384.
15. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP Jr: The Vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 1963; 23:1390-1427.
16. Duflos A, Kruczynski A, Barret JM: Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002; 2:55-70.
17. Damayanthi Y, Lown YW: Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem* 1998; 5:205-252.
18. Imbert TF: Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 1998; 80:207-222.
19. Greenspan EM, Leiter J, Shear MJ: Effect of alpha-peltatin, beta-peltatin, podophyllotoxin on lymphomas and other transplanted tumors. *J Natl Cancer Inst* 1950; 10:1295-1333.
20. Leiter J, Downing V, Hartwell JL, Shear MJ: Damage induced in sarcoma 37 with podophyllin, podophyllotoxin alpha-peltatin, beta-peltatin, and quercetin. *J Natl Cancer Inst* 1950; 10: 1273-1293.
21. Hande KR: Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; 34:1514-1521.
22. Hartmann JT, Lipp HP: Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* 2006; 29:209-230.
23. Hande KR: Topoisomerase II inhibitors. *Update Cancer Ther* 2008; 3:13-26.
24. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S: Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277:29803-29809.
25. Venditto VJ, Simanek EE: Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the *in vivo* literature. *Mol Pharm* 2010; 7:307-349.

26. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA: Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. J Am Chem Soc 1966; 88:3888-3890.
27. Garcia-Carbonero R, Supko JG: Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. Clin Cancer Res 2002; 8:641-661.
28. Pommier Y: Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer 2006; 6:789-802.
29. Gescher AJ, Sharma RA, Steward WP: Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. Lancet Oncol 2001; 2:371-379.
30. Thiery-Vuillemin A, Nguyen T, Pivot X, Spano JP, Dufresne A, Soria JC: Molecularly targeted agents: their promise as cancer chemopreventive interventions. Eur J Cancer 2005; 41:2003-2015.
31. Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer. Cancer Res 1985; 45:1-8.
32. Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB: Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. Antioxid Redox Signal 2005; 7:1630-1647.
33. Nambiar D, Rajamani P, Singh RP: Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. Mutat Res 2011; 728:139-157.
34. Wahle KWJ, Brown I, Rotondo D, Heys SD: Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. Adv Exp Med Biol 2010; 698:36-51.
35. Plants: Diet and health. British nutrition foundation. Edit. G. Goldberg; Willey Blackwell 2003; 27-48.
36. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y: Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutr Cancer 2010; 62:1-20.
37. Iwashina T: The structure and distribution of the flavonoids in plants. J Plant Res 2000; 113:287-299.
38. Niemetz R, Gross GG: Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. Phytochemistry 2005; 66:2001-2011.
39. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57-70.

40. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
41. Weinberg RA: *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor et Francis Group 2007.
42. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL: Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* 2008; 6:1521-1533.
43. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; 26:1324-1337.
44. White E, DiPaola RS: The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5308-5316.
45. Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo WL, Ljung BM, Chew K, Myambo K, Miranda M, Krig S, Garbe J, Stampfer M, Yaswen P, Gray JW, Lockett SJ: *In situ* analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 2004; 36:984-988.
46. Raynaud CM, Hernandez J, Llorca FP, Nuciforo P, Mathieu MC, Commo F, Delalogue S, Sabatier L, André F, Soria JC: DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am J Clin Oncol* 2010; 33:341-345.
47. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z: Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141:52-67.
48. Talmadge JE, Fidler IJ: AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010; 70:5649-5669.
49. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M: Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140:883-899.
50. Warburg O: On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123:309-314.
51. Warburg O: On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124:269-270.
52. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB: The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; 7:11-20.
53. Jones RG, Thompson CB: Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 2009; 23:537-548.

54. Yang L, Pang Y, Moses HL: TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; 31:220-227.
55. Ramos S: Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:507-526.
56. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW: Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther* 2011; 130:310-324.
57. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72:145-171.
58. Juranić Z, Žižak Ž: Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. *Biofactors* 2005; 23:207-211.
59. Trachootham D, Alexandre J, Huang P: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:579-591.
60. Yu X, Kensler T: Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res* 2005; 591:93-102.
61. Aggarwal BB, Shishodia S: Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 71:1397-1421.
62. Bhat TA, Singh RP: Tumor angiogenesis-a potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:1334-1345.
63. Weng CJ, Yen GC: Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev* 2012; 38:76-87.
64. Weng CJ, Yen GC: Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive *in vitro* anti-invasive and *in vivo* anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31:323-351.
65. Link A, Balaguer F, Goel A: Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1771-1792.
66. Stefanska B, Karlic H, Varga F, Fabianowska-Majewska K, Haslberger A: Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components-the implications in cancer prevention. *Br J Pharmacol* 2012; 167:279-297.

67. Parasramka MA, Ho E, Williams DE, Dashwood RH: MicroRNAs, diet, and cancer: new mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals. *Mol Carcinog* 2012; 51:213-230.
68. Lourens ACU, Viljoen AM, van Heerden FR: South African *Helichrysum* species: a review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *J Ethnopharmacol* 2008, 119:630-652.
69. Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E, Avato P: Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman. *Ind Crop Prod* 2009; 29: 395-403.
70. Černjavski P, Soška T: *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška sp.nova. *Repert spec nov regni veg*, Berlin 1940; 49: 282-283.
71. Černjavski P: Prilog za florističko poznavanje šire okoline Ohridskog jezera. Posebna izdanja, Srpska Kraljevska Akademija, Prirodnjački i matematički spisi, Beograd 1943; 35:11-88.
72. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA: *Flora europaea* 1-5, Cambridge University Press, Cambridge 1964-1980.
73. Passalacqua NG, Guarrera PM, De Fine G: Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia* 2007; 78:52-68.
74. Redžić SS: The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. *Coll Antropol* 2007; 31:869-890.
75. Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T: Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2001; 75:95-115.
76. Jakupovic J, Kuhnke J, Schuster A, Metwally MA, Bohlmann F: Phloroglucinol derivatives and other constituents from South African *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 1986; 25:1133-1142.
77. Jakupovic J, Zdero C, Grenz M, Tschirz F, Lehmann L, Hashemi-Nejad SM, Bohlmann F: Twenty-one acylphloroglucinol derivatives and further constituents from South African *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 1989; 28:1119–1131.

78. Jakupovic J, Schuster A, Bohlmann F, Ganzer U, King RM, Robinson H: Diterpenes and other constituents from Australian *Helichrysum* and related species. *Phytochemistry* 1989; 28:543–551.
79. Maffei Facino R, Carini M, Franzoi L, Pirola O, Bosisio E: Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). *Pharmacol Res* 1990; 22:709-721.
80. Al-Rehaily AJ, Albishi OA, El-Olemy MM, Mossa JS: Flavonoids and terpenoids from *Helichrysum forskahlii*. *Phytochemistry* 2008; 69:1910-1914.
81. Gouveia S, Castilho PC: Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–(–)–ESI-MSⁿ method. *Food Chem* 2011; 129: 333-344.
82. Mancini E, De Martino L, Marandino A, Scognamiglio MR, De Feo V: Chemical composition and possible *in vitro* phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Molecules* 2011; 16:7725-7735.
83. Kulevanova S, Stefova M, Stafilov T: HPLC identification and determination of flavone aglycones in *Helichrysum plicatum* DC. (Asteraceae). *Pharmazie* 2000; 55:391-392.
84. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabetta W, Blanco A, Lorusso E, Avato P: Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Ind Crop Prod* 2010; 32:639-649.
85. Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini AF: Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France). *Flavour Frag J* 2001; 16: 30–34.
86. Paolini J, Desjobert JM, Costa J, Bernardini AF, Buti Castellini C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I: Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands. *Flavour Frag J* 2006; 21:805–808.
87. Süzgeç S, Meriçli AH, Houghton PJ, Çubukçu B: Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. *Fitoterapia* 2005; 76:269-272.

88. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germanò MP, Alonzo V: Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2001; 17:517-520.
89. Demir A, Mercanoglu Taban B, Aslan M, Yesilada E, Aykut Aytac S: Antimicrobial effect of *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum*. Pharm Biol 2009; 47:289-297.
90. Angioni A, Barra A, Arlorio M, Coisson JD, Russo MT, Pirisi FM, Satta M, Cabras P: Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. J Agric Food Chem 2003; 51:1030-1034.
91. Meyer JJM, Afolayan AJ, Taylor MB, Engelbrecht L: Inhibition of herpes simplex virus type 1 by aqueous extracts from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). J Ethnopharmacol 1996; 52:41-43.
92. Appendino G, Ottino M, Marquez N, Bianchi F, Giana A, Ballero M, Sterner O, Fiebich BL, Munoz E: Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol α -pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. J Nat Prod 2007; 70:608-612.
93. Aiyegoro OA, Okoh AI: Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. BMC Complement Altern Med 2010; 10:21.
94. Aslan M, Deliorman Orhan D, Orhan N, Sezik E, Yesilada E: *In vivo* antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulums in streptozotocin-induced-diabetic rats. J Ethnopharmacol 2007; 109:54-59.
95. Sala A, Recio M, Giner RM, Máñez S, Tournier H, Schinella G, Ríos JL: Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. J Pharm Pharmacol 2002; 54:365-371.
96. Sala A, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL: New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with antiinflammatory activity. J Nat Prod 2001; 64:1360-1362.
97. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Ríos JL: A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. Eur J Pharmacol 2003; 460:219-226.

98. Bauer J, Koeberle A, Dehm F, Pollastro F, Appendino G, Northoff H, Rossi A, Sautebin L, Werz O: Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 2011; 81:259-268.
99. Afoulous S, Ferhout H, Raelison EG, Valentin A, Moukarzel B, Couderc F, Bouajila J: *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. *Molecules* 2011; 16:8273-8291.
100. Bigović D, Šavikin K, Janković T, Menković N, Zdunić G, Stanojković T, Djurić Z: Antiradical and cytotoxic activity of different *Helichrysum plicatum* flower extracts. *Nat Prod Commun* 2011; 6:819-822.
101. Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, Senabe J: *In vitro* anticancer screening of South African plants. *J Ethnopharmacol* 2008; 119:455-461.
102. Lourens ACU, Van Vuuren SF, Viljoen AM, Davids H, Van Heerden FR: Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of selected South African *Helichrysum* species. *S Afr J Bot* 2011; 77:229-235.
103. Kucukoglu O, Ozturk B, Kamataki T, Topcu Z: Inhibitory activities of *Helichrysum* taxa on mammalian type I DNA topoisomerase. *Pharm Biol* 2006; 44:189-193.
104. Yagura T, Motomiya T, Ito M, Honda G, Iida A, Kiuchi F, Tokuda H, Nishino H: Anticarcinogenic compounds in the Uzbek medicinal plant, *Helichrysum maracandicum*. *J Nat Med* 2008; 62:174-178.
105. Rosa A, Deiana M, Atzeri A, Corona G, Incani A, Melis MP, Appendino G, Dessì MA: Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chem Biol Interact* 2007; 165:117-126.
106. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
107. Ohno M, Abe T: Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods* 1991; 145:199-203.

108. Ormerod MG: Flow cytometry. A practical approach. Oxford University Press 2000.
109. Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH: The anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on propyl gallate-treated HeLa cells in relation to reactive oxygen species and glutathione levels. *Arch Toxicol* 2009; 83:825-833.
110. Day TW, Wu CH, Safa AR: Etoposide induces protein kinase C δ - and caspase-3-dependent apoptosis in neuroblastoma cancer cells. *Mol Pharmacol* 2009; 76:632-640.
111. Kaioumova D, Süsal C, Opelz G: Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Hum Immunol* 2001; 62:64-74.
112. Liang CC, Park AY, Guan JL: *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc* 2007; 2:329-333.
113. Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN: A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47:3239-3245.
114. Partridge J, Flaherty P: An *In vitro* FluoroBlok tumor invasion assay. *J Vis Exp* 2009; 29:e1475.
115. Aranda E, Owen GI: A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res* 2009; 42:377-389.
116. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB: Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:3734-3737.
117. Wu B, Wei Y, Liu FQ, Zhang Q, Wang CB, Bai H: Biological effects of low dose X-irradiation on human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Exp Hematol/Chinese Assoc Pathophysiol* 2011; 19:1214-1217.
118. Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, Chadha KC, Chawda R, Nair H, Kumar N, Nair RE, Schwartz SA: The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL-4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1593:29-36.

119. Okamoto I, Iwaki K, Koya-Miyata S, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M: The flavonoid kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8⁺ T cell engraftment. *Clin Immunol* 2002; 103:132-144.
120. Shukla S, Gupta S: Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res* 2010; 27:962-978.
121. Eroğlu HE, Aksoy A, Hamzaoğlu E, Budak Ü, Albayrak S: Cytogenetic effects of nine *Helichrysum* taxa in human lymphocytes culture. *Cytotechnology* 2009; 59:65-72.
122. Eroğlu EH, Hamzaoğlu E, Aksoy A, Budak Ü, Özkul Y: *In vitro* genotoxic effects of four *Helichrysum* species in human lymphocytes cultures. *Biol Res* 2010; 43:177-182.
123. Fischer U, Schulze-Osthoff K: Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 2005; 12:942-961.
124. Long JS, Ryan KM: New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012; 31:5045-5060.
125. Mansilla S, Llovera L, Portugal J: Chemotherapeutic targeting of cell death pathways. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12:226-238.
126. Hemaiswarya S, Doble M: Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. *Phytomedicine* 2013; 20:151-158.
127. Burgos-Morón E, Calderón-Montaña JM, Orta ML, Pastor N, Pérez-Guerrero C, Austin C, Mateos S, López-Lázaro M: The coffee constituent chlorogenic acid induces cellular DNA damage and formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes in cells. *J Agric Food Chem* 2012; 60:7384-7391.
128. Bandyopadhyay G, Biswas T, Roy KC, Mandal S, Mandal C, Pal BC, Bhattacharya S, Rakshit S, Bhattacharya DK, Chaudhuri U, Konar A, Bandyopadhyay S: Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in chronic myelogenous leukemic cells. *Blood* 2004; 104:2514-2522.
129. Rakshit S, Mandal L, Pal BC, Bagchi J, Biswas N, Chaudhuri J, Chowdhury AA, Manna A, Chaudhuri U, Konar A, Mukherjee T, Jaisankar P, Bandyopadhyay S: Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl⁺ CML cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1662-1675.

130. Jiang Y, Kusama K, Satoh K, Takayama E, Watanabe S, Sakagami H: Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. *Phytomedicine* 2000; 7:483-491.
131. Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T, Vatan O, Yilmaz D, Cavas T, Tunc S, Ozkan L, Bilaloglu R: Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 2013; 53:359-363.
132. Yagasaki K, Miura Y, Okauchi R, Furuse T: Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology* 2000; 33:229-235.
133. Jin UH, Lee JY, Kang SK, Kim JK, Park WH, Kim JG, Moon SK, Kim CH: A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci* 2005; 77:2760-2769.
134. Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, Annabi B: The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell Int* 2006; 6:7.
135. Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Chun HK, Chung YC, Kim SK, Kim BH, Kwon KI, Jeong TC, Lee KY, Jeong HG: 3-Caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* inhibits tumor cell invasion by regulating protein kinase C- δ -dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicol Lett* 2010; 198:200-209.
136. Way TD, Kao MC, Lin JK: Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett* 2005; 579:145-152.
137. Choi EJ, Kim GH: Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 44:260-265.
138. Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ: Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2001; 21:413-420.

139. Zheng PW, Chiang LC, Lin CC: Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76:1367-1379.
140. Li ZD, Hu XW, Wang YT, Fang J: Apigenin inhibits proliferation of ovarian cancer A2780 cells through Id1. *FEBS Lett* 2009; 583:1999-2003.
141. Morrissey C, O'Neill A, Spengler B, Christoffel V, Fitzpatrick JM, Watson RW: Apigenin drives the production of reactive oxygen species and initiates a mitochondrial mediated cell death pathway in prostate epithelial cells. *Prostate* 2005; 63:131-142.
142. Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T: Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *Int J Oncol* 2005; 26:185-189.
143. Wang W, VanAlstyne PC, Irons KA, Chen S, Stewart JW, Birt DF: Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer* 2004; 48:106-114.
144. Wu K, Yuan LH, Xia W: Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4461-4464.
145. Yee SB, Lee JH, Chung HY, Im KS, Bae SJ, Choi JS, Kim ND: Inhibitory effects of luteolin isolated from *Ixeris sonchifolia* Hance on the proliferation of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Arch Pharm Res* 2003; 26:151-156.
146. Lu HF, Chie YJ, Yang MS, Lee CS, Fu JJ, Yang JS, Tan TW, Wu SH, Ma YS, Ip SW, Chung JG: Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway. *Int J Oncol* 2010; 36:1477-1484.
147. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ: Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res* 1999; 19:4297-4303.
148. Torkin R, Lavoie JF, Kaplan DR, Yeger H: Induction of caspase-dependent, p53-mediated apoptosis by apigenin in human neuroblastoma. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:1-11.
149. Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI: Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC δ and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:681-692.

150. Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH: Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and β 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 226:178-191.
151. Hu XW, Meng D, Fang J: Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. *Carcinogenesis* 2008; 29:2369-2376.
152. Franzen CA, Amargo E, Todorović V, Desai BV, Huda S, Mirzoeva S, Chiu K, Grzybowski BA, Chew TL, Green KJ, Pelling JC: The chemopreventive bioflavonoid apigenin inhibits prostate cancer cell motility through the focal adhesion kinase/Src signaling mechanism. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2:830-841.
153. Fang J, Zhou Q, Liu LZ, Xia C, Hu X, Shi X, Jiang BH: Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis* 2007; 28:858-864.
154. Lamy S, Akla N, Ouanouki A, Lord-Dufour S, Béliveau R: Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Exp Cell Res* 2012; 318:1586-1596.
155. Murakami A, Ashida H, Terao J: Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 2008; 269:315-325.
156. Dajas F: Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J Ethnopharmacol* 2012; 143:383-396.
157. Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S: The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *Eur J Pharmacol* 2010; 649:84-91.
158. Zhang H, Zhang M, Yu L, Zhao Y, He N, Yang X: Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:1589-1599.
159. Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton E Jr, Lee MT: Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on

cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 1999; 128:999-1010.

160. Chou CC, Yang JS, Lu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Tang NY, Chung JG, Chou MJ, Teng YH, Chen DR: Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res* 2010; 33:1181-1191.

161. Chien SY, Wu YC, Chung JG, Yang JS, Lu HF, Tsou MF, Wood WG, Kuo SJ, Chen DR: Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28:493-503.

162. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS: Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res* 2008; 31:1281-1285.

163. Mu C, Jia P, Yan Z, Liu X, Li X, Liu H: Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2). *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007; 29:179-183.

164. Brisdelli F, Coccia C, Cinque B, Cifone MG, Bozzi A: Induction of apoptosis by quercetin: different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Mol Cell Biochem* 2007; 296:137-149.

165. Kuo PC, Liu HF, Chao JI: Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279:55875-55885.

166. Kang JW, Kim JH, Song K, Kim SH, Yoon JH, Kim KS: Kaempferol and quercetin, components of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. *Phytother Res* 2010; 24 Suppl 1:S77-82.

167. Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F, Tamajusuku AS, Wink MR, Salbego C, Battastini AM: Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* 2006; 17:663-671.

168. Phromnoi K, Yodkeeree S, Anuchapreeda S, Limtrakul P: Inhibition of MMP-3 activity and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line by bioflavonoids. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30:1169-76.
169. Kim JD, Liu L, Guo W, Meydani M: Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J Nutr Biochem* 2006; 17:165-176.
170. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, Ishikawa M: Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:527-530.
171. Kanno S, Tomizawa A, Ohtake T, Koiwai K, Ujibe M, Ishikawa M: Naringenin-induced apoptosis via activation of NF- κ B and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol Lett* 2006; 166:131-139.
172. Park JH, Jin CY, Lee BK, Kim GY, Choi YH, Yeong YK: Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:3684-3690.
173. Lou C, Zhang F, Yang M, Zhao J, Zeng W, Fang X, Zhang Y, Zhang C, Liang W: Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PLoS One* 2012; 7:e50956.
174. Lentini A, Forni C, Provenzano B, Beninati S: Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin and hesperitin correlate to reduction of the *in vivo* metastatic potential. *Amino Acids* 2007; 32:95-100.
175. Li WW, Li VW, Hutnik M, Chiou AS: Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention. *J Oncol* 2012; 2012:879623.
176. Chen AY, Chen YC: A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem* 2013; 138:2099-2107.
177. Kim BW, Lee ER, Min HM, Jeong HS, Ahn JY, Kim JH, Choi HY, Choi H, Kim EY, Park SP, Cho SG: Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition. *Cancer Biol Ther* 2008; 7:1080-1089.

178. Nguyen TT, Tran E, Ong CK, Lee SK, Do PT, Huynh TT, Nguyen TH, Lee JJ, Tan Y, Ong CS, Huynh H: Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. *J Cell Physiol* 2003; 197:110-121.
179. Jeong JC, Kim MS, Kim TH, Kim YK: Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochem Res* 2009; 34:991-1001.
180. Bestwick CS, Milne L, Duthie SJ: Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. *Chem Biol Interact* 2007; 170:76-85.
181. Marfe G, Tafani M, Indelicato M, Sinibaldi-Salimei P, Reali V, Pucci B, Fini M, Russo MA: Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *J Cell Biochem* 2009; 106:643-650.
182. Xu W, Liu J, Li C, Wu HZ, Liu YW: Kaempferol-7-*O*-beta-D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. *Cancer Lett* 2008; 264:229-240.
183. Huang WW, Chiu YJ, Fan MJ, Lu HF, Yeh HF, Li KH, Chen PY, Chung JG, Yang JS: Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:1585-1595.
184. Cho YY, Yao K, Pugliese A, Malakhova ML, Bode AM, Dong Z: A regulatory mechanism for RSK2 NH(2)-terminal kinase activity. *Cancer Res* 2009; 69:4398-4406.
185. Luo H, Rankin GO, Li Z, Depriest L, Chen YC: Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chem* 2011; 128:513-519.
186. Choi EJ, Ahn WS: Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutr Res Pract* 2008; 2:322-325.
187. Luo H, Rankin GO, Juliano N, Jiang BH, Chen YC: Kaempferol inhibits VEGF expression and *in vitro* angiogenesis through a novel ERK-NFκB-cMyc-p21 pathway. *Food Chem* 2012; 130:321-328.

188. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM: Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8:634-646.
189. Seelinger G, Merfort I, Wölflle U, Schempp CM: Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* 2008; 13:2628-2651.
190. Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B, Iratni R, Takahashi T, Gaben AM, Bracke M, Awad S, John A, Kamalboor HA, Al Sultan MA, Arafat K, Gespach C, Petroianu G: Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 651:18-25.
191. Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH: Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 203:124-131.
192. Cai X, Ye T, Liu C, Lu W, Lu M, Zhang J, Wang M, Cao P: Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicol In Vitro* 2011; 25:1385-1391.
193. Lee EJ, Oh SY, Sung MK: Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:4136-4143.
194. Cheng AC, Huang TC, Lai CS, Pan MH: Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Pharmacol* 2005; 509:1-10.
195. Xie F, Lang Q, Zhou M, Zhang H, Zhang Z, Zhang Y, Wan B, Huang Q, Yu L: The dietary flavonoid luteolin inhibits Aurora B kinase activity and blocks proliferation of cancer cells. *Eur J Pharm Sci* 2012; 46:388-396.
196. Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Nakanishi R, Nishino H, Matsui H, Sakai T: Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene* 2005; 24:7180-7189.
197. Kilani-Jaziri S, Frachet V, Bhourri W, Ghedira K, Chekir-Ghedira L, Ronot X: Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. *Drug Chem Toxicol* 2012; 35:1-10.

198. Fu J, Chen D, Zhao B, Zhao Z, Zhou J, Xu Y, Xin Y, Liu C, Luo L, Yin Z: Luteolin induces carcinoma cell apoptosis through binding Hsp90 to suppress constitutive activation of STAT3. PLoS One 2012; 7:e49194.

Ivana Z. Matić je rođena 21.03.1983. godine u Beogradu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 02.03.2009. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija sa prosečnom ocenom 9.66 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Eksperimentalni deo diplomskog rada uradila je u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora pod mentorstvom naučnog savetnika dr Zorice Juranić. Nakon diplomiranja, svoj naučno-istraživački rad nastavila je kao istraživač-pripravnik u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora pod rukovodstvom dr Zorice Juranić. U oktobru 2009. godine upisala je doktorske akademske studije molekularne biologije eukariota na Biološkom fakultetu. Zvanje istraživač-saradnik stekla je 2010. godine. Angažovana je na projektu 175011 „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Ivana je do sada publikovala 14 naučnih radova: 7 M₂₁ kategorije, 6 M₂₂ kategorije i 1 M₂₃ kategorije, kao i veći broj saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima. Od 2010. godine član je Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR). Član je i sekretar Srpskog društva istraživača raka (SDIR) od 2011. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана З. Матић

број индекса M3006/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

In vitro испитивање антитуморске активности екстраката ендемичне биљне врсте

Helichrysum zivojinii Černjavski et Soška

- 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, 23.09.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана З. Матић

Број индекса M3006/2009

Студијски програм молекуларна биологија

Наслов рада *In vitro* испитивање антитуморске активности екстраката ендемичне
биљне врсте *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška

Ментори проф.др Душанка Савић-Павићевић, научни саветник др Зорица
Јуранић

Потписани/а Ивана Матић

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, 23.09.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

In vitro испитивање антитуморске активности екстраката ендемичне биљне врсте

Helichrysum zivojinii Černjavski et Soška

која је моје ауторско дело.

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

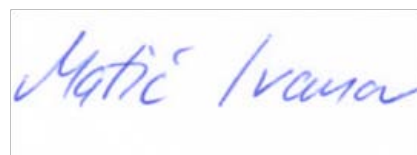
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 23.09.2013.



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.