

UNIVERZITET U BEOGRADU

Biološki fakultet

Dijana B. Topalović

**Procena antigenotoksičnog potencijala  
etanolnog ekstrakta lista masline  
(*Olea europaea* L.)**

**u prisustvu hormona tiroksina, adrenalina,  
estradiola i dietilstilbestrola u leukocitima  
periferne krvi *in vitro* kod čoveka**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

Faculty of Biology

Dijana B. Topalović

**Evaluation of antigenotoxic potential of  
ethanolic olive leaf extract (*Olea europaea* L.)  
on the effect of thyroxine, adrenaline, estradiol  
and diethylstilbestrol in human peripheral  
blood leukocytes *in vitro***

DOCTORAL DISSERTATION

BELGRADE, 2019.

## **Mentori**

**dr Lada Živković**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

**dr Marija Savić Veselinović**, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

## **Članovi komisije:**

**dr Lada Živković**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

**dr Marija Savić Veselinović**, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Ninoslav Đelić**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Fakultet veterinarske medicine

datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2019. godine

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za patobiologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta "Aberacije ćelijskog ciklusa i uticaj oksidativnog stresa na neurodegenerativne procese i malignu transformaciju ćelije (OI 173034)", kojim rukovodi prof. dr Biljana Potparević. Želela bih da izrazim zahvalnost svima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.*

*Prvenstveno želim da se zahvalim mentorkama i članovima komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije:*

*dr Ladi Živković, na uloženom trudu, idejama, vremenu i pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije;*

*dr Mariji Savić Veselinović, na sugestijama i korisnim savetima koji su doprineli izgledu finalne vezije ove doktorske disertacije;*

*dr Ninoslavu Đeliću na korisnim i brojnim stručnim sugestijama tokom izrade i pisanja ove teze, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Želim da se posebno zahvalim prof. dr Biljani Potparević, koja mi je ukazala poverenje, primila me u svoj tim, doprinela da proširim svoje naučno-istraživačke vidike, i omogućila mi da razvijam svoj naučni put.*

*Zahvaljujem dr Dragani Dekanski iz Instituta za istraživanje i razvoj Galenike a.d., na neposrednom angažovanju i rukovođenju pri izvođenju farmakološko genotoksikoloških ispitivanja, za tumačenje rezultata i izradu publikacija.*

*Zahvaljujem se svim kolegincama, saradnicama i osoblju Farmaceutskog fakulteta koji su me podržavali, razumevali i bodrili kroz godine.*

*Posebno hvala mojoj porodici, porodicama Kraft, Žukovec, Velimirović, Šipetić i Topalović, mojim kumama i njihovim porodicama, kao i svim prijateljima, na ljubavi koju primam od njih, na podršci, na sigurnosti i snazi koju mi daju.*

*Najdublju zahvalnost dugujem mojim roditeljima, na vaspitanju, bezrezervnoj ljubavi, pomoći i podršci koju su mi pružali i pružaju, koji su mi snaga i oslonac svih ovih godina, i bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.*

*Hvala mojim momcima, koji su istrpeli mnogo kako bi ova teza ugledala svetlost dana i bez kojih ništa ne bi imalo smisla. Mom Adamu, na svakom trenutku, podršci, razumevanju i strpljenju. Mom Robertu, za koga živim. Njemu posvećujem ovaj rad.*

*Autor*

# **Procena antigenotoksičnog potencijala etanolnog ekstrakta lista masline (*Olea europaea* L.) u prisustvu hormona tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola u leukocitima periferne krvi *in vitro* kod čoveka**

## **SAŽETAK**

Hormoni su organska jedinjenja različite hemijske prirode koji svojim dejstvom utiču na rast, funkciju i metabolizam organizma. Povišene koncentracije hormona dovode do stvaranja slobodnih radikala, što može izazvati oksidativni stres i oštećenja DNK molekula. Poznato je da komponente tradicionalne mediteranske ishrane imaju pozitivne efekte na smanjenje oksidativnog stresa i prevenciju mnogih bolesti. Brojne *in vitro* i *in vivo* studije su potvrdile korisne efekte suvog ekstrakta lista masline (DOLE) i njegovih sastojaka, kao i zaštitni potencijal u odnosu na oksidativna oštećenja DNK molekula. Stoga, glavni cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita antigenotoksični potencijal spektra koncentracija suvog ekstrakta lista masline u leukocitima periferne krvi čoveka u prisustvu hormona tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola *in vitro*. Ispitivanje je obavljeno primenom alkalnog komet testa, osetljive i brze metode za određivanje i analizu primarnih oštećenja DNK u pojedinačnim ćelijama.

Rezultati ove studije su pokazali da su tiroksin, adrenalin, estradiol i dietilstibestrol sposobni da budu medijatori značajnog povećanja oštećenja DNK molekula. Suvi ekstrakt lista masline je u svim testiranim koncentracijama ispoljio značajan antigenotoksični potencijal u oba eksperimentalna protokola, u pretretmanu i posttretmanu. Praćenje kinetike reparacije DNK u prisustvu DOLE u odnosu na oštećenja izazvana hormonima je pokazalo da ekstrakt nije značajno uticao na stimulaciju reparacije oštećenja DNK.

Sumirajući rezultate ove disertacije, može se zaključiti da suvi ekstrakt lista masline poseduje izražen potencijal smanjenja primarnih oštećenja DNK izazvanih tiroksinom, adrenalinom, estradiolom i dietilstilbestrolom. Predstavljeni *in vitro* model na leukocitima periferne krvi čoveka pružio je podatke koji su korisni za buduće *in vivo* studije i klinička ispitivanja suvog ekstrakta lista masline.

**Ključne reči:** suvi ekstrakt lista masline (DOLE), tiroksin, adrenalin, estradiol, dietilstilbestrol, antigenotoksičnost, oštećenja DNK

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK:** 582.916.16: [577.113.4 + 577.212](043.3)

# **Evaluation of antigenotoxic potential of ethanolic olive leaf extract (*Olea europaea* L.) on the effect of thyroxine, adrenaline, estradiol and diethylstilbestrol in human peripheral blood leukocytes *in vitro***

## **ABSTRACT**

Hormones are organic compounds of different chemical nature that affect cell growth, function and metabolism. Elevated concentrations of hormones lead to the formation of free radicals, which can cause oxidative stress and damage to the DNA molecule. It is known that the components of traditional Mediterranean food have positive effects on the reduction of oxidative stress and the prevention of many diseases. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed the beneficial effects of dry olive leaf extract (DOLE) and its constituents, as well as protective potential on the oxidative damage of DNA molecules. Therefore, the main aim of this doctoral dissertation was to investigate the antigenotoxic potential of the spectrum of concentrations of dry olive leaf extract in peripheral blood leukocytes in the presence of hormone thyroxine, adrenaline, estradiol, and diethylstilbestrol *in vitro*. The study was performed using an alkaline comet assay, a sensitive and fast method for determining and analyzing primary DNA damage in individual cells.

The results of this study have shown that thyroxine, adrenaline, estradiol, and diethylstilbestrol are capable of being mediators of significant increase of DNA damage. Dry olive leaf extract demonstrated significant ability to reduce primary DNA damage at all tested concentrations and in both experimental protocols, in pretreatment and posttreatment. Monitoring the kinetics of DNA repair in the presence of DOLE in relation to damage induced by hormones has shown that the extract did not significantly affect the stimulation of DNA damage repair.

Summarizing the results of this dissertation, it can be concluded that the dry olive leaf extract possesses a strong potential to reduce primary DNA damage induced by thyroxine, adrenaline, estradiol, and diethylstilbestrol. The presented *in vitro* model on human peripheral blood leukocytes provided data that are useful for future *in vivo* studies and clinical trials of dry olive leaf extract.

**Keywords:** dry olive leaf extract (DOLE), thyroxine, adrenaline, estradiol, diethylstilbestrol, antigenotoxicity, DNA damage

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Genetics

**UDC:** 582.916.16: [577.113.4 + 577.212](043.3)



## LISTA SKRAĆENICA:

- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – superoksidni anjon, superoksidni radikal
- OH – hidroksil radikal
- 3T3 – standardna ćelijska linija fibroblasta
- 8-OHdG – 8-hidroksi 2-deoksiguanozin
- 8-oxo-dG – 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoksiguanozin (=8-OHdG)
- A – adrenalin
- ABTS<sup>+</sup> – 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina
- AD – adrenoreceptori
- ADP-Fe<sup>3+</sup> – adenzin difosfat helat
- AP – apurinska mesta
- cAMP – ciklični adenzin monofosfat
- CAT – katalaza
- COMT – katehol-O-metiltransferaza
- DES – dietilstilbestrol
- DES Q – DES hinon
- dGuo – deoksiguanozin
- DMSO – dimetil sulfoksid
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
- DOLE – engl. *dry olive leaf extract*, suvi ekstrakt lista masline
- DOPA – dihidroksifenilalanin
- DPPH – 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
- DSB – engl. *double strand breaks*, dvolančani prekidi DNK
- E1 – estron
- E2 – 17β-estradiol
- E3 – estriol
- EC<sub>50</sub> – polovina maksimalne efektivne koncentracije
- EDTA – etilen diamin tetra sirćetna kiselina
- ER – estrogeni receptor
- ERK – engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ekstracelularne signalom regulisane kinaze
- FAD – flavin adenin dinukleotid
- FapiGua – 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin

Fe<sup>3+</sup>/Cu<sup>2+</sup> – joni gvožđa i bakra  
FPG – formamidopirimidin DNK glikozilaza  
FRAP – engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, test ukupne redukcijske moći  
GAE/g – engl. *gallic acid equivalent*, jedinica za izražavanje totalne količine fenola  
GC-MS – gasna hromatografija-masena spektrometrija  
GP – glutation peroksidaza  
GPCR – engl. *G protein-coupled receptor*, G protein-vezujući receptori  
GPER – engl. *G protein-coupled estrogen receptor*, G protein-vezujući estrogenski receptor  
GSH – glutation  
GST – glutation-s-transferaza  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodonik-peroksid  
HCl – hlorovodonična kiselina  
HClO – hipohlorasta kiselina  
HepG2 – ćelijska linija raka jetre čoveka  
HPLC – tečna hromatografija visokih performansi  
HT – hidroksitirozol  
KE – katehol estrogenski  
LC-MS – tečna hromatografija- masena spektrometrija  
LMPA – engl. *low melting point agarose*, agarozna sa niskom tačkom topljenja  
MAO – monoamino-oksidaza  
MCF-7 – ćelijska linija raka dojke čoveka  
MCT – engl. *monocarboxylate family*, monokarboksilatna familija transportera TH  
Mg<sup>2+</sup> – jon magnezijuma  
NaCl – natrijum hlorid  
NAD<sup>+</sup> – koenzim nikotinamid adenin dinukleotid  
NaOH – natrijum hidroksid  
NMPA – engl. *normal melting point agarose*, agarozna sa normalnom tačkom topljenja  
OATP – engl. *organic anion transporter*, organski anjonski transporteri TH  
OLE – engl. *olive leaf extract*, ekstrakt lista masline  
One-way ANOVA – jednofaktorijalna analiza varijanse  
PBS – engl. *phosphate buffer saline*, fosfatni pufer  
Ph. Eur. – evropska farmakopeja  
Q – kvercetin  
RNS – engl. *reactive nitrogen species*, reaktivne vrste azota

ROS – engl. *reactive oxygen species*, reaktivne vrste kiseonika

SCE – engl. *sister chromatid exchange*, razmena sestriških hromatida

SCGE – engl. *single cell gel electrophoresis*, elektroforeza pojedinačnih ćelija (komet test)

SEM – engl. *standard error of the mean*, standardna greška

SOD – superoksid dismutaza

SSB – engl. *single strand breaks*, jednolančani prekidi DNK

T<sub>3</sub> – trijodtironin

T<sub>4</sub>, T – tiroksin

TH – tireoidni hormoni

TM4 – Sertoli ćelijska linija testisa miša

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

V79 – ćelijska linija kineskog hrčka

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. SINTEZA I MEHANIZAM DEJSTVA HORMONA</b> .....	1
1.1.1. Sinteza i mehanizam dejstva tireoidnih hormona .....	2
1.1.2. Sinteza i mehanizam dejstva kateholamina .....	4
1.1.3. Sinteza i mehanizam dejstva estrogena .....	6
1.1.4. Sinteza i mehanizam dejstva dietilstibestrola .....	8
<b>1.2. GENOTOKSIČNI EFEKTI HORMONA</b> .....	9
1.2.1. Genotoksični efekti tireoidnih hormona .....	10
1.2.2. Genotoksični efekti kateholamina .....	12
1.2.3. Genotoksični efekti estrogena .....	13
1.2.4. Genotoksični efekti dietilstilbestrola .....	15
<b>1.3. OKSIDATIVNI STRES</b> .....	16
1.3.1. Nastanak slobodnih radikala u ćelijama .....	17
1.3.2. Biomarkeri oksidativnog stresa .....	19
1.3.3. Komet test za detekciju oštećenja DNK .....	22
<b>1.4. ANTIOKSIDANSI</b> .....	24
1.4.1. Primena komet testa u ispitivanju efekata prirodnih proizvoda na DNK oštećenja .....	25
1.4.2. Ekstrakt lista masline .....	27
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	30
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	31
<b>3.1. MATERIJAL</b> .....	31
3.1.1. Ekstrakt lista masline .....	31
3.1.2. Hormoni .....	31
3.1.3. Hemikalije .....	31
3.1.4. Uzorci .....	32
<b>3.2. METODE</b> .....	32
3.2.1. Dizajn eksperimenata .....	32
3.2.2. Komet test .....	36
3.2.3. Analiza stepena DNK oštećenja .....	37
3.2.4. Statistička obrada podataka .....	39
<b>4. REZULTATI</b> .....	40
<b>4.1. ANALIZA STEPENA DNK OŠTEĆENJA</b> .....	40
4.1.1. Genotoksičnost hormona .....	40
4.1.2. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana hormonima .....	46

4.1.3.	Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana hormonima.....	55
4.1.4.	Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana hormonima. ....	59
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>68</b>
<b>5.1.</b>	<b>GENOTOKSIČNOST HORMONA</b> .....	<b>68</b>
5.1.1.	Genotoksičnost tiroksina .....	69
5.1.2.	Genotoksičnost adrenalina .....	70
5.1.3.	Genotoksičnost estradiola .....	71
5.1.4.	Genotoksičnost dietilstilbestrola.....	72
5.1.5.	Stepen oštećenja molekula DNK uzrokovanih dejstvom hormona .....	73
<b>5.2.</b>	<b>UTICAJ EKSTRAKTA LISTA MASLINE NA GENOTOKSIČNI EFEKAT HORMONA I KINETIKU ISPOLJAVANJA OŠTEĆENJA DNK IZAZVANIH TESTIRANIM HORMONIMA.....</b>	<b>74</b>
5.2.1.	Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat tiroksina.....	77
5.2.2.	Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat adrenalina .....	77
5.2.3.	Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat estradiola .....	79
5.2.4.	Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat dietilstilbestrola .....	80
<b>5.3.</b>	<b>ZAKLJUČNA RAZMATRANJA</b> .....	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCE</b> .....	<b>85</b>
<b>BIOGRAFIJA KANDIDATA</b>		
<b>PRILOZI</b>		

# 1. UVOD

## 1.1. SINTEZA I MEHANIZAM DEJSTVA HORMONA

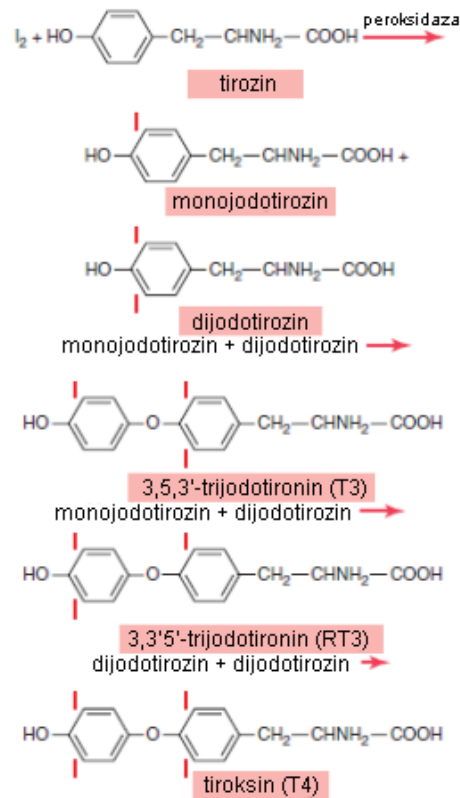
Hormoni su signalni molekuli koji služe za komunikaciju između organa i tkiva, pri fiziološkoj regulaciji varenja, disanja, senzorne percepcije, kretanja, spavanja, laktacije, rasta i razvoja, i aktivnosti ponašanja kao što su reprodukcija, raspoloženje i stres (Neave, 2008). Hormoni mogu regulisati procese na nivou celog organizma ili mogu delovati u okviru specifičnih tkiva ili tipova ćelija. Oni se izlučuju u krvotok i deluju na udaljene ćelije vezivanjem za specifične proteinske receptore, što dovodi do morfoloških ili funkcionalnih promena ciljnih ćelija. Hormonska sekrecija može se javiti u mnogim tkivima, kao odgovor na specifične biohemijske signale regulatornih sistema. Proteinski hormoni i kateholamini su rastvorljivi u vodi i zbog toga se lako transportuju kroz cirkulatorni sistem. Ostali hormoni, uključujući steroide i hormone štitne žlezde, su rastvorljivi u lipidima. Da bi se omogućila njihova distribucija, ovi hormoni se moraju povezati sa proteinima nosačima, kako bi se formirali ligand-protein kompleksi.

Većina hormona inicira ćelijski odgovor vezivanjem za intracelularne ili za receptore povezane sa ćelijskom membranom. Ćelija može imati ili nekoliko različitih tipova receptora koji prepoznaju isti hormon i aktiviraju različite puteve transdukcije signala, ili nekoliko različitih tipova receptora koji prepoznaju različite hormone i aktiviraju isti biohemijski put. Hormoni svoje efekte posredstvom receptora ostvaruju sporim genomskim i brzim negenomskim signalnim putevima (Ruhs i sar., 2017). Genomski efekti podrazumevaju regulaciju genske ekspesije, dok negenomski efekti ne aktiviraju jedarnu transkripciju gena već uključuju posttranslacionu modifikaciju proteina (Simoncini i sar., 2004; Barros i Gustafsson, 2011) ili aktivaciju signalnih kaskada (Bassett, 2011). Receptori za većinu peptidnih hormona su ugrađeni u plazma membranu. Interakcija ovih hormona i receptora obično pokreće kaskadu sekundarnih efekata unutar citoplazme ćelije, pri čemu često uključuju fosforilaciju ili defosforilaciju drugih citoplazmatskih proteina, promene u propustljivosti jonskih kanala ili povećanje koncentracije intracelularnih molekula koji mogu delovati kao sekundarni glasnici (npr. ciklični adenozin monofosfat, cAMP). Nasuprot tome, receptori za steroidne i tireoidne hormone nalaze se uglavnom u citoplazmi i jedrovom ovoju, mada mogu da budu prisutni i unutar ćelijske membrane. Da bi se vezali za adekvatne receptore, ovi hormoni moraju prvo proći kroz ćelijsku membranu. Steroidni hormoni prolaze

kroz membranu prostom difuzijom (ređe aktivnim transportom ili endocitozom) upravo zato što su rastvorljivi u lipidima, dok se u slučaju tireoidnih hormona zbog negativnog naelektrisanja njihovih fenolnih grupa pri fiziološkom pH njihov ulazak u ćeliju obavlja pomoću jodotironinskih transportera uz utrošak energije. Kombinovani kompleks hormon-receptor se potom transportuje kroz jedarnu membranu u jedro ćelije, gde se vezuje za specifične sekvence dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), regulišući ekspresiju određenih gena, čime se povećava sinteza odgovarajućih proteina (Beato i sar., 1996).

### **1.1.1. Sinteza i mehanizam dejstva tireoidnih hormona**

Tireoidni hormoni, trijodtironin ( $T_3$ ) i tetrajodtironin (tiroksin,  $T_4$ ), su derivati amino kiseline tirozin, koji su sintetisani u štitnoj žlezdi. Tiroksin proizvode folikularne ćelije štitne žlezde i smatra se prohormonom glavnog tireoidnog hormona  $T_3$  (Kansagra i sar., 2010). Dejodacija  $T_4$  u  $T_3$  se dešava u velikom broju tkiva, obzirom da je  $T_3$  oko četiri puta biološki aktivniji od  $T_4$  (Wass i Stewart, 2011). Prvi bitan korak u formiranju tireoidnih hormona (TH) je konverzija jodidnih jona u oksidovanu formu joda, koji tada direktno interaguje sa aminokiselinom tirozin (Slika 1). Ova oksidacija je omogućena delovanjem enzima peroksidaze i njegovog pratioca vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ), koji čine moćan sistem sposoban da oksiduje jodide. Peroksidaza se nalazi u apikalnoj membrani ćelije ili je pričvršćena tako da obezbeđuje oksidovani jod na mestu gde molekuli tireoglobulina izlazi iz Goldžijevog kompleksa i ulazi u koloid štitne žlezde (Guyton i Hall, 2016). Glavni hormonski proizvod pomenute reakcije je tiroksin. Tiroksin se formira spajanjem dva molekula dijodtirozina. Od ukupne količine metabolički aktivnih hormona, oko 93% je tiroksin, a 7% trijodtironin (Guyton i Hall, 2016). Kako bi došlo do regulacije genske aktivnosti i povećanja transkripcije, potrebno je da jedan jodid bude uklonjen iz molekula tiroksina. To se postiže dejstvom enzima jodotironin dejodinaza (St. Germain i sar., 2009), pri čemu nastaje trijodtironin. Aktivacija  $T_3$  iz prohormona  $T_4$  na nivou tkiva je sve više prepoznata kao važan mehanizam regulacije aktivnosti tireoidnih hormona (Brent, 2010).



Slika 1. Sinteza tiroksina (preuzeto i modifikovano iz Guyton i Hall, 2016)

Tireoidni hormoni su neophodni za normalni razvoj, diferencijaciju, rast i regulaciju metabolizma kod sisara (Dobrzyńska i sar., 2004; Zhang i Lazar, 2010; Brent, 2010). Funkcije  $T_3$  i  $T_4$  su kvalitativno iste, ali se oni razlikuju u brzini i intenzitetu delovanja (Guyton i Hall, 2016). Signalni put tireoidnih hormona je složen i visoko regulisan zahvaljujući ekspresiji ćelijskih i tkivno specifičnih transportera MCT (engl. *monocarboxylate family*) i OATP (engl. *organic anion transporter*), i njihovoj interakciji sa brojnim izoformama receptora ( $TR\alpha_1$ ,  $TR\alpha_2$ ,  $TR\alpha_3$ ,  $TR\beta_1$ ,  $TR\beta_2$  i  $TR\beta_3$ ), korepresorima i koaktivatorima (Cheng i sar., 2010; Williams, 2008). Pored toga, u mnogim slučajevima, putevi tireoidnih signala se ukrštaju s nizom različitih signalnih puteva (Brent, 2012).

Receptori hormona štitne žlezde pripadaju superfamiliji steroidnih i tireoidnih jedarnih receptora, koja uključuje i receptore za retinoide, vitamin D, masne kiseline i prostaglandine (Zhang i Lazar, 2010). Aktivnost hormona posredovana je od strane više izoformi receptora tireoidnih hormona, koje su kodirane sledećim genima – THRA za izoforme  $TR\alpha$  i THRB za izoforme  $TR\beta$ . Ovi geni imaju različite obrasce ekspresije tokom razvoja i u adultnim tkivima (Brent, 2012). Receptori hormona štitne žlezde su vezani za



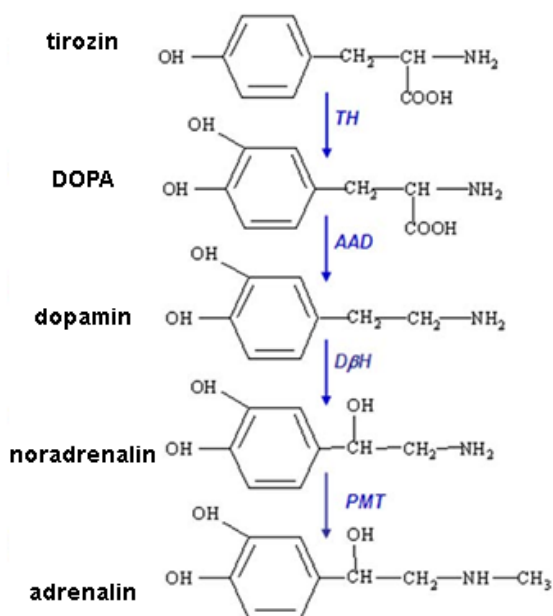
lance DNK molekula ili se nalaze u njihovoj blizini. Nakon vezivanja sa hormonom štitne žlezde, receptori se vezuju za promotorne sekvence ciljnih gena i otpočinju proces transkripcije. Pretpostavlja se da je dejstvo hormona štitne žlezde rezultat funkcije pomenutih novonastalih proteina (Guyton i Hall, 2016). Pored genomskih, tireoidni hormoni imaju i negenomске efekte u ćeliji, koji su nezavisni od njihovih efekata na transkripciju gena. Neki efekti tireoidnih hormona se javljaju u roku od nekoliko minuta, što je previše brzo da bi se objasnilo sintezom proteina. Delovanje tireoidnih hormona koje nije vezano za regulaciju genske ekspresije, uključuje regulaciju jonskih kanala i oksidativne fosforilacije, a podrazumeva i aktivaciju intracelularnih sekundarnih glasnika kao što je cAMP, ili kaskadni put za signalizaciju proteina kinaze. Takvi mehanizmi delovanja su uočeni u nekoliko različitih tkiva, uključujući srce i hipofizu, kao i masno tkivo (Guyton i Hall, 2016).

### **1.1.2. Sinteza i mehanizam dejstva kateholamina**

Kateholamini - dopamin, noradrenalin (norepinefrin) i adrenalin (epinefrin), spadaju u grupu endogenih kateholamina. Sintetišu se najvećim delom u hromafinim ćelijama srži nadbubrežne žlezde, ali se sintetišu i u mozgu (Kitahama i sar., 1985), kao i u postganglijskim vlaknima simpatičkog nervnog sistema (von Bohlen i Haibach, 2006). Prekursori kateholamina su amino kiseline fenilalanin i tirozin, koje su u velikoj koncentraciji zastupljene u plazmi i mozgu. Naime, sinteza kateholamina počinje od amino kiseline tirozina (Slika 2), čijom hidroksilacijom nastaje dihidroksifenilalanin (DOPA), koji se dekarboksilacijom prevodi u dopamin (Axelrod i Reisine, 1984). Oksidacijom dopamina nastaje noradrenalin. Finalni korak u biosintezi adrenalina je metilacija noradrenalinskog primarnog amina. Reakcija je katalizovana enzimom feniletanolamin N-metiltransferazom, koja je primarno zastupljena u citosolu endokrinih ćelija srži nadbubrežne žlezde, mada su niski nivoi ovog enzima registrovani u srcu i mozgu (Kitahama i sar., 1985).

Kateholamini deluju preko adrenergičkih receptora (adrenoreceptori, AD). Vezivanje kateholamina za adrenergičke receptore stimuliše simpatički nervni sistem i pokreće niz metaboličkih promena. Simpatički nervni sistem je odgovoran za reakciju “bori se ili beži” (engl. „*fight or flight*”), što podrazumeva širenje zenica, povećanje srčane frekvencije, mobilizaciju energije i preusmeravanje toka krvi iz ne-esencijalnih organa do skeletnih mišića (Bell, 2009; Khurana, 2008). Opšte povećanje simpatičke aktivnosti obično je praćeno povećanom koncentracijom adrenalina, ali postoji selektivnost tokom hipoksije i hipoglikemije, kada se znatno povećava količina noradrenalina u odnosu na adrenalin

(Feldberg i sar., 1934; Burn i sar., 1950). Iz tog razloga, mora postojati određena autonomija srži nadbubrega u odnosu na ostatak simpatičkog sistema.



Slika 2. Sinteza kateholamina (preuzeto i modifikovano iz Freestone i sar., 2008, Trends in Microbiology). TH – tirozin hidroksilaza; AAD – aromatična L-aminokiselinska dekarboksilaza; DβH – dopamin β-hidroksilaza; PMT – feniletanolamin N-metiltransferaza

Adrenalin je hormon, neurotransmiter i terapijski agens (Lieberman i sar., 2013). Kao hormon, adrenalin deluje na skoro sva tkiva u telu. Njegovo dejstvo se razlikuje po tipu tkiva i ekspresiji adrenergičnih receptora u tkivima. Na primer, visoki nivoi adrenalina uzrokuju opuštanje glatkih mišića u disajnim putevima, ali sa druge strane uzrokuju kontrakciju glatkih mišića koji čine većinu arteriola. Povećana sekrecija adrenalina se javlja kod feohromocitoma, hipoglikemije, infarkta miokarda i u manjoj meri u benignom esencijalnom tremoru (Goodman i Gilman, 2011). Polu život adrenalina u cirkulaciji je nekoliko minuta, i njegova razgradnja se odvija najvećim delom u jetri. Njegov katabolizam je posredovan metilacijom od strane katehol-O-metiltransferaze (COMT), koja je prisutna u sinaptičkoj pukotini i citosolu ćelija, ili deaminacijom od strane monoamin oksidaze (MAO), koja se nalazi u membrani mitohondrija. Za aktivnost ovih enzima su potrebni kofaktori -  $\text{Mg}^{2+}$  za COMT i flavin adenin dinukleotid (FAD) za MAO (Goodman i Gilman, 2011). Krajnji metabolit katabolizma adrenalina je vanilmandelična kiselina.

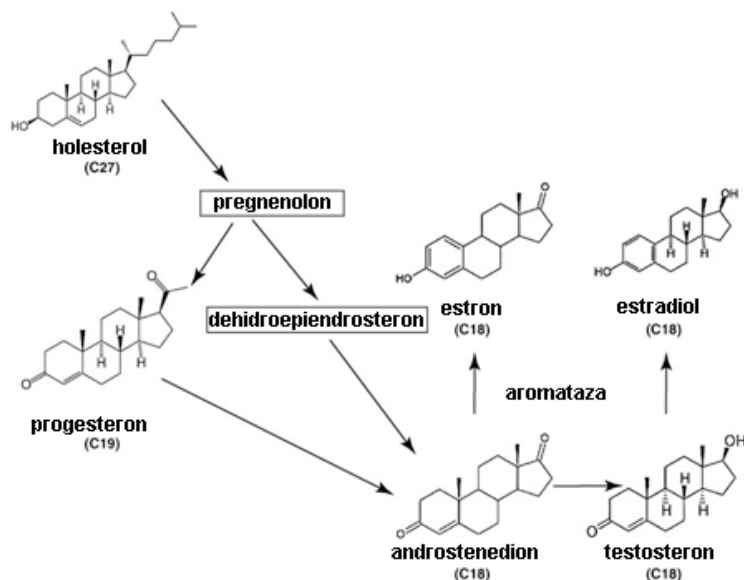
Adrenalin je neselektivni agonist svih adrenergičkih receptora. Ovi receptori spadaju u superfamiliju guanin nukleotid-vezujućih (GPCR) transmembranskih receptora, za čiju su aktivaciju potrebni ligandi. Svaki tip receptora preferira određenu klasu G proteina, za koju se vezuje (Goodman i Gilman, 2011). Veliki broj ćelija poseduje ove receptore. Postoje dve glavne grupe adrenergičnih receptora -  $\alpha$  i  $\beta$ , sa nekoliko podtipova.  $\alpha$  receptori imaju podtipove  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ , dok  $\beta$  receptori imaju podtipove  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ .  $\alpha$  receptori su manje osetljivi na adrenalin, pa na fiziološkim nivoima sekrecije adrenalina dominira  $\beta$ -adrenoreceptorina stimulacija. U farmakološkim dozama se prevazilazi vazodilatacija posredovana  $\beta$ -adrenoreceptorima, tako da visoki nivoi adrenalina u cirkulaciji izazivaju vazokonstrikciju posredovanu  $\alpha$ -adrenoreceptorima (Klabunde, 2012). Adrenoreceptori imaju različito dejstvo u zavisnosti od klase G proteina za koju se vezuju (Molina, 2004). Aktivacija  $\alpha_1$  receptora aktivira fosfoinozitol-specifičnu fosfolipazu C, koja dovodi do formiranja dva sekundarna glasnika (Jezdimirović, 2005). Sekundarni glasnici aktiviraju odgovarajuće enzime, dovodeći do fosforilacije ciljnih proteina u ćeliji (Tsujimoto i sar., 1989). Do fosforilacije odgovarajućih proteina dovodi i aktivacija  $\beta$  receptora, ali aktivacijom adenilat ciklaze, koja katalizuje sintezu cAMP-a od ATP-a. Sa druge strane,  $\alpha_2$  receptori inhibišu adenilat ciklazu, čime se smanjuje intracelularna koncentracija cAMP-a (Varagić i Milošević, 2003).

### **1.1.3. Sinteza i mehanizam dejstva estrogena**

Estrogeni pripadaju grupi steroidnih hormona koji se sintetišu prvenstveno u jajnicima i placenti kod žena, dok se kod muškaraca proizvode u tkivu testisa, nadbubrežnih žlezda i mozgu (Tanabe i sar., 1983; Sudhir i Komesaroff, 1999; Lee i sar., 2012). Kod zdrave žene koja nije u drugom stanju, estrogeni se u značajnim količinama izlučuju samo u jajnicima, dok se minimalne količine izlučuju u kori nadbubrežne žlezde (Guyton i Hall, 2016). Tri prirodno sintetisana estrogena su: estron (E1),  $\beta$ -estradiol (E2) i estriol (E3). Estrogeni se transportuju u krv pretežno vezani sa albuminom plazme i specifičnim estrogen vezujućim globulinima. Vezivanje između ovih hormona i proteina plazme je dovoljno labavo da oni tokom perioda od 30-ak minuta bivaju oslobođeni u tkiva (Guyton i Hall, 2016).

Prekursor za sintezu estrogena je holesterol. Glavni put sinteze estradiola uključuje sintezu 4-androstendiona iz holesterola, koji predstavlja prekursor za sintezu estrogena i androgenih hormona. 4-androstendion se delovanjem aromataze pretvara u estron, a zatim delovanjem  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze u estradiol. Alternativni put sinteze estradiola

uljučuje nastanak testosterona iz 4-androstendiona, koji se zatim aromatizacijom prevodi u estradiol (Slika 3). Poslednji korak u sintezi estrogena iz androgena katalizuje takođe aromataza (Simpson i sar., 2005).



Slika 3. Sinteza estradiola (preuzeto i modifikovano iz Cignarella i sar., 2010, Trends Pharmacol Sci)

Estradiol svoje genomske i negenomske efekte ostvaruje posredstvom specifičnih receptora za estrogene. Obe izoforme estrogenih receptora (ER), ER $\alpha$  i ER $\beta$ , pripadaju superfamiliji jedarnih steroidnih i tireoidnih receptora (Ling i sar., 2006; Zhang i Lazar, 2010). Pored ove dve izoforme, otkriven je i treći tip receptora za estrogene, transmembranski G protein-vezujući receptor za estrogen (engl. *G-protein coupled estrogen receptor*, GPER) (Nilsson i sar., 2011). ER $\alpha$  i ER $\beta$  mogu biti lokalizovani u citoplazmi, jedru i na plazma membrani ćelija. GPER, i ER lokalizovani na plazma membrani, imaju ulogu u negenomskim efektima estradiola (Murphy, 2011). Vezivanje estradiola za ER lokalizovane u citoplazmi i jedru, aktivira genomski signalni put, gde estradiol utiče na regulaciju genske ekspresije (Ling i sar., 2006). Konformacione promene kojima ER podležu u jedru, omogućavaju im direktnu interakciju sa molekulom dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), vršeći na taj način aktivaciju ili inhibiciju transkripcije ciljnih gena (Hewitt i Korach, 2002; Handgraaf i sar., 2013). Pored direktne interakcije sa DNK molekulom, ER može i indirektno da interaguje sa DNK, preko drugih transkripcionih faktora lokalizovanih u jedru.

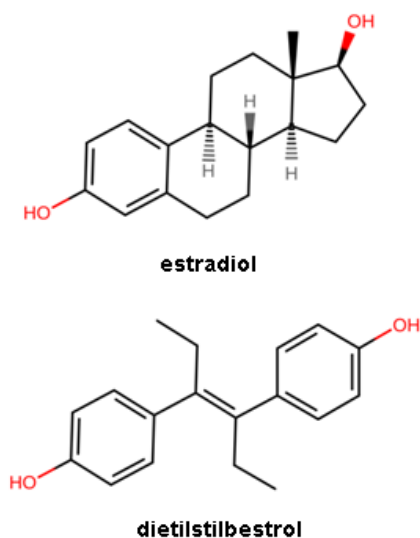
Glavni estrogen koji luče jajnici je  $\beta$ -estradiol. Estrogena potentnost  $\beta$ -estradiola je 12 puta veća od estrona i 80 puta veća od estriola. Uzimajući u obzir da je ukupni estrogenski efekat  $\beta$ -estradiola višestruko veći od ostala dva estrogena zajedno,  $\beta$ -estradiol se smatra glavnim estrogenom (Guyton i Hall, 2016). Estradiol ( $E_2$ ) je važan regulatorni faktor širokog spektra fizioloških procesa (Nelson i Bulun, 2001; Lee i sar., 2012; Cui i sar., 2013). Osim uticaja na reprodukciju i razvoj,  $E_2$  je uključen i u metaboličke procese u mnogim organima (Nelson i Bulun, 2001; Cui i sar., 2013). Estradiol predstavlja dominantnu formu estrogena kod žena tokom reproduktivnog perioda, dok se nakon menopauze ravnoteža među estrogenima menja u korist estrona (Barros i sar., 2006). Estradiol ima važne fiziološke uloge i kod muškaraca (Sudhir i Komesaroff, 1999).

#### **1.1.4. Sinteza i mehanizam dejstva dietilstibestrola**

Dietilstilbestrol (DES) je sintetički estrogen koji su 1938. godine razvili Charles Dodds i njegove kolege. Između 1940. i 1970. godine, DES je davan trudnicama za sprečavanje pobačaja i prevremenih porođaja (Henley i Korach, 2010). 1971. godine je dokazano da DES izaziva retki vaginalni tumor, kod devojčica i žena koje su bile izložene *in utero*. Nakon toga je američka Agencija za hranu i lekove (FDA) savetovala prestanak upotrebe DES-a kod trudnica (Henley i Korach, 2010). Kasnije studije su pokazale njegove višestruke štetne efekte kod muškaraca i žena, kao rezultat prenatalne izloženosti (Marselos i Tomatis, 1992; Giusti i sar., 1995). Osim prenatalno, izlaganje ljudi DES-u se dešava i unosom mesa od stoke koja je njime tretirana radi bržeg rasta, kao i lečenjem određenih stanja kao što su menopauzalni i postmenopauzalni poremećaji, rak dojke i prostate. Na osnovu the Fourth Annual Report on Carcinogens (1985), DES je uključen u listu karcinogena, a klasifikovan je i kao endokrini narušivač.

DES je vrlo snažan agonist oba estrogena receptora (Jordan, 2013). Ima otprilike 468% afiniteta estradiola za  $ER\alpha$  i 295% za  $ER\beta$  (Kuiper i sar., 1997). Međutim, vrednosti polovine maksimalne efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ) ukazuju da ima nekoliko puta veći afinitet za aktiviranje  $ER\beta$  u odnosu na  $ER\alpha$  (Coss i sar., 2012). Kako bi se razjasnila uloga estrogenog receptora ili DES-a kao hormonske supstance, razvijen je niz modela na glodarima u indukovanoj toksičnosti. Neonatalno tretiranje nemodifikovanih i ERKO nokaut miševa (engl. *estrogen receptor knockout mice*), pokazalo je da je toksičnost DES-a posredovana preko  $ER\alpha$ -zavisnog signalnog puta (Couse i sar., 2001). Pored ER-a, *in vitro* studija je utvrdila da DES poseduje relativno slabu aktivnost i kod različitih drugih steroidnih

hormonskih receptora, kao i značajan antagonizam androgenih, progesteronskih i mineralokortikoidnih receptora (Coss i sar., 2012).



Slika 4. Hemijska struktura estradiola i DES-a (preuzeto i modifikovano iz Wermouth i sar., 2015)

Dietilstilbestrol pripada grupi jedinjenja stilbestrola (4,4'-dihidroksistilben). DES je nesteroidni analog steroidnog estrogena estradiola. Izveden je iz prirodnog jedinjenja anetola, slabog estrogenog sastojka anisa i morača (Ravina, 2011). Kristalografija X-zracima je utvrdila da su molekulske dimenzije DES-a gotovo identične onima kod estradiola, naročito u odnosu na rastojanje između hidroksilnih grupa na oba kraja molekula (Sneider, 2005) (Slika 4). Kao dobro poznat teratogen i karcinogen, DES inhibira osu hipotalamus-hipofiza-gonade. Na taj način, on blokira sintezu testosterona u testisima, snižavajući i nivo testosterona u plazmi, što dovodi do hemijske kastracije (PubChem Compound Database; CID=448537). Za razliku od prirodnih estrogena, estrogeni lekovi, sintetski estrogeni životne sredine (DES) i fitoestrogeni, su stabilniji i ostaju duže u telu. U zavisnosti od nivoa prirodnog estrogena, estrogeni životne sredine mogu imati različite uticaje na estrogenu aktivnost (blokiranje ili ukidanje efekata estrogena) (Tapiero i sar., 2002).

## 1.2. GENOTOKSIČNI EFEKTI HORMONA

Studije mutagenih efekata hormona su izvođene u različitim *in vitro* i *in vivo* sistemima, od bakterija do sisara. Odabir hormona je uglavnom obuhvatao steroidne hormone, usled očigledne korelacije između pojave određenih tipova maligniteta i upotrebe

prirodnih i sintetičkih steroidnih hormona prilikom terapije (Đelić, 2001a; Liehr, 2001; Asselin-Labat i sar., 2010). Osim steroidnih hormona, i tireoidni hormoni su delovali kao ko-karcinogeni u razvoju kancera debelog creva (Iishi i sar., 1992) i želuca kod pacova (Iishi i sar., 1993).

Pored mutagenih, posebna pažnja se pridala ispitivanjima potencijalnih genotoksičnih efekata steroidnih hormona (Liehr, 2001; Li i sar., 1994) i njihovih nesteroidnih analoga (Shadab i sar., 2006; Fučić i sar., 2009). Sa druge strane, mnogo je manji broj studija u kojima su ispitivane sposobnosti drugih hormona da izazovu genotoksične efekte. Postoje literaturni podaci koji ukazuju na *in vitro* genotoksičnost tiroksina (Đelić i Anderson, 2003; Dobrzyńska i sar., 2004) i adrenalina (Radaković i sar., 2014; Đelić i sar., 2015). Pored genotoksičnih, neki autori navode i rezultate dobijene u testiranju hormona gde oni nisu ispoljili genotoksični efekat u određenim sistemima (Herzog i Leuschner, 1995; Đelić, 2001b; Đelić i sar., 2007a). Razlike između dobijenih rezultata genotoksičnosti hormona mogu biti uzrokovane ograničenjima samih test sistema, različitim nivoom reaktivnosti u *in vitro* i *in vivo* uslovima, kao i mogućim razlikama u tkivno specifičnoj ekspresiji genotoksičnih efekata (Đelić, 2001a).

### **1.2.1. Genotoksični efekti tireoidnih hormona**

Vezivanje tireoidnih hormona za specifične jedarne receptore u ciljnim ćelijama indukuje ekspresiju gena za sintezu enzima povezanih sa redoks procesima, što dovodi do povećane potrošnje kiseonika (Oppenheimer i sar., 1996). Oksidacija jodotironina može rezultovati formiranjem semihinona i ortohinona, tako što kataliza peroksidazom rezultuje dejodinacijom i hidrosilacijom joda u fenolnom prstenu tiroksina (Tseng i Latham, 1984). Ukoliko dodje do oksidacije *o*-hidroksi grupa, nastaju nestabilni hinol etri koji su podložni degradaciji do dijodtirozina ili dejodinovanog tirozina. Hinonoidni produkti tiroksina mogu da se vezuju za proteine, hemoglobin i mijeloperoksidazu (Klebanoff, 2005). Takođe, tireoidni hormoni mogu da dovedu do porasta peroksizomalne  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, praćene povećanjem intracelularne koncentracije  $H_2O_2$  i formiranjem reaktivnih vrsta kiseonika, koji mogu kovalentno da oštete molekul DNK (Saeter i Seglen, 1990). Povećani oksidativni stres je uključen u patogenezu mnogih ljudskih bolesti, uključujući hronična oboljenja vezana sa starenjem, rak, degeneraciju mišića i koronarne bolesti srca (Venditti i sar., 2003; Fernandez i sar., 2005; Chandra i sar., 2010; Schmidt-Ott i Ascheim, 2006).

Pojedina patološka stanja mogu izmeniti nivo tireoidnih hormona, menjajući stepen bazalnog metabolizma, što takođe utiče na porast oksidativnog stresa (Schmidt-Ott i Ascheim, 2006; Venditti i Di Meo, 2006; Villanueva i sar., 2013). Generalno, hipertireoidizam izaziva oksidativni stres, dok hipotireoidizam dovodi do blagog oksidativnog stresa (Magsino i sar., 2000; Venditti i Di Meo, 2006; Villanueva i sar., 2013). Tretman tiroksinom direktno stimuliše produkciju superoksidnih anjona u neutrofilima i makrofagima (Nishizawa i sar., 1998; Kanazawa i sar., 1992), a smanjuje nivo antioksidativne zaštite (Fernandez i sar., 1988; Saičić i sar., 2006). Osim lipidne peroksidacije, povišen nivo tireoidnih hormona izaziva i proteinsku oksidaciju u humanim leukocitima (Magsino i sar., 2000) i jetri pacova (Tapia i sar., 1999), dok neki eksperimentalni podaci pokazuju da tireoidni hormoni indukuju DNK oštećenja u ćelijama sperme (Dobrzynska i sar., 2004) i humanim limfocitima (Đelić i Anderson, 2003).

Činjenica da tireoidni hormoni utiču na više nivoa oksidativnog stresa može donekle razjasniti nedoslednost u literaturi o njihovom efektu (Villanueva i sar., 2013), kao i neslaganja u rezultatima vezanim za genotoksičnu aktivnost ovih hormona. Evaluacija mogućeg klastogenog efekta tiroksina na kulturama ćelija limfocita pune krvi nije pokazala statistički značajno prisustvo strukturnih hromozomskih aberacija, a tiroksin je samo pri najvećim koncentracijama značajno smanjio mitotski indeks (Đelić i sar., 2007a,b). Sa druge strane, prekomerne količine tireoidnih hormona izazvale su hipermetaboličko stanje *in vivo*, pri čemu je kod ispitivanih pacova ispoljen nizak antioksidantski kapacitet i povećano stvaranje slobodnih radikala (Venditti i sar., 1997). Antioksidansi (katalaza i kvercetin) su smanjili genotoksične efekte tireoidnih hormona (Dobrzynska i sar., 2004; Đelić i sar., 2015), što pruža indirektno dokaze da tireoidni hormoni izazivaju oksidativni stres u ciljnim ćelijama.

Ipak, citogenetička analiza efekata tiroksina na humane limfocite pune krvi dala je dvosmislene rezultate. Pokazano je povećanje učestalosti razmene sestrinskih hromatida (SCE) po ćeliji pri relativno visokim dozama tiroksina, ali rezultati mikronukleus testa su bili negativni (Đelić i sar., 2006). Istraživanja praćenja hromozomskih prekida u kulturama humanih limfocita pune krvi pokazala su odsustvo klastogenog efekta tiroksina (Đelić i sar., 2007a).



### 1.2.2. Genotoksični efekti kateholamina

Postoje eksperimentalne naznake da kateholne grupe dopamina, noradrenalina i adrenalina mogu biti uključene u redoks cikluse koje prati nastanak reaktivnih vrsta kiseonika (Moldeus i sar., 1983; Miura i sar., 2000; Đelić i Anderson, 2003; Dobrzyńska i sar., 2004). Eksperimentalni podaci potvrđuju sposobnost adrenalina da izazove promene na DNK molekulima u *in vitro* istraživanjima (Miura i sar., 2000; Đelić i Anderson, 2003; Dobrzynska i sar., 2004). Otpuštanje kateholamina u organizmu u količinama koje premašuju fiziološke koncentracije, izaziva citotoksični efekat u neuroblastima, ćelijama melanoma i miokarda (Behonick i sar., 2001; Miura i sar., 2000; Okamoto i sar., 1996). Utvrđeno je da kateholamini utiču na transkripciju gena direktno povezanih sa senzorima signalnih puteva DNK oštećenja i DNK reparacije (npr. RAD9), čime je pokazano da ovi hormoni utiču na povećanje nivoa oštećenja DNK (Flint i sar., 2007). Novija istraživanja pokazuju da adrenalin pri koncentracijama većim od terapijskih dovodi do značajnog smanjenja mitotskog indeksa *in vitro*, što se tumači verovatnim zaustavljenjem mitoze radi reparacije genetičkih oštećenja (Đelić i sar., 2015).

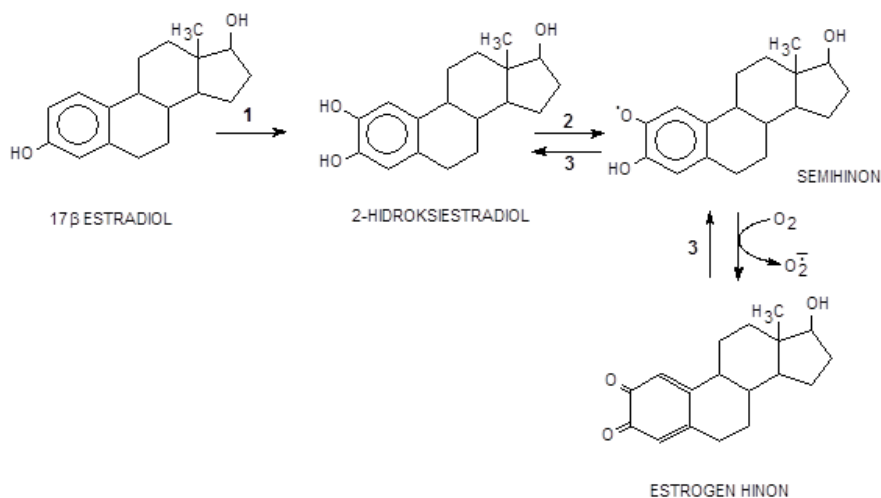
Brojne studije su pokazale da DNK oštećenja nastaju tokom oksidacije i ciklizacije adrenalina do semihinonskog noradrenohroma i adrenohroma, rezultujući stvaranjem nusprodukata kao što su reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Miura i sar., 2000; Bindoli i sar., 1990; Behonick i sar., 2001; Genova i sar., 2006). Stvaranje DNK reaktivnih vrsta preko hinona i semihinona predstavlja verovatan mehanizam genotoksičnog dejstva kateholamina (Moldeus i sar., 1983; McGregor i sar., 1988), i dešava se neenzimskim putem (Levay i sar., 1997; Spencer i sar., 2011) ili enzimskim putem (Bindoli i sar., 1992). Neenzimski nastanak DNK adukata je potvrđen činjenicom da supeoksidni anjoni, koji nastaju u reakciji semihinona sa molekularnim kiseonikom (Genova i sar., 2006), mogu izazvati prekide na hromozomima i razmenu sestrinskih hromatida (engl. *sister chromatid exchange*, SCE) u humanim limfocitima *in vitro* (M'Bemba-Meka i sar., 2007).

Pored prethodno navedenih istraživanja koja govore u prilog genotoksičnosti adrenalina, postoje i studije u kojima se zaključuje da njegovi genotoksični efekti nisu bili citogenetički detektibilni (Đelić i sar., 2015). U navedenom istraživanju su korišćeni SCE i mikronukleus test, i tom prilikom nije primećena značajna promena učestalosti razmene sestrinskih hromatida, a ni učestalosti mikronukleusa nisu dostigle statistički značajne promene u tretiranim kulturama humanih limfocita. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ranije studije genotoksičnosti dopamina (Moldeus i sar., 1983). U toj studiji su

rezultati mikronukleus testa na kostnoj srži bili negativni, a dopamin, kao jedinjenje sa kateholnom grupom, nije uticao ni na učestalost SCE u tretiranim kulturama humanih limfocita. Takođe, postoje podaci da adrenalin nije izazvao hromozomske aberacije u kulturi humanih limfocita pune krvi (Đelić i sar., 2003b).

### 1.2.3. Genotoksični efekti estrogena

S obzirom na to da su estrogeni fenoli, metabolizam njihovih fenolnih grupa može kod viših koncentracija estrogena ispoljiti štetne efekte u ćelijama, uključujući i oštećenje molekula DNK (Liehr i Roy, 1990). Prihvaćeno je shvatanje da redoks ciklusi pri značajno povišenim koncentracijama estrogena, postaju dominantni biohemijski procesi koji zasenjuju njihove hormonalne efekte. Redoks ciklusi, koji dovode do stvaranja slobodnih radikala, su osnova genotoksičnih efekata estrogena i sličnih jedinjenja (Slika 5). Pre nego što se uključi u redoks cikluse, estradiol se konvertuje u katehol estrogen aktivnošću enzima estrogen hidroksilaze (Đelić i Đelić, 2002).



Slika 5. Metabolička konverzija estradiola do katehol estrogena i redoks ciklus. 1 - estradiol 2-hidroksilaza; 2 - citohrom P 450 oksidaza; 3 - NADPH zavisna citohrom P 450 reduktaza (preuzeto iz Đelić, 1996)

Studije genotoksičnosti su upravo i fokusirane na katehol estrogene (KE), jer su oni hidrohini, koji se lako oksiduju na hinone i poluhinone, koji reaguju s DNK. Zabeleženo je nekoliko vrsta oštećenja DNK posredstvom slobodnih radikala koja indukuju estrogeni

metaboliti. Na primer, DNK jednolančani prekidi su izazvani pomoću 3,4-estron hinona u kulturi MCF-7 ćelija raka dojke (Nutter i sar., 1991; 1994), kao i *in vivo* u bubregu sirijskih hrčaka tretiranih sa 4-hidroksiestradiolom (Li i sar., 1994; Han i Liehr, 1994a). Osim toga, koncentracije 8-hidroksi 2-deoksiguanozina (8-OHdG) ili 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoksiguanozin (8-oxo-dG) DNK baza su povećane iznad kontrolnih vrednosti u DNK koja je inkubirana s katehol estrogenima i bakar (II) sulfatom *in vitro* (Mobley i sar., 1994). Povećanje koncentracije 8-oxo-dG je zabeleženo i *in vivo*, kod sirijskih hrčaka tretiranih sa 4-hidroksiestradiolom (Han i Liehr, 1994 b,c). Različite DNK adukte mogu stvoriti reaktivni metaboliti estradiola, npr. 2- i 4-hidroksiestradiol, kao i ROS, koji nastaju putem redoks ciklusa metabolita estradiola (Stack i sar., 1996).

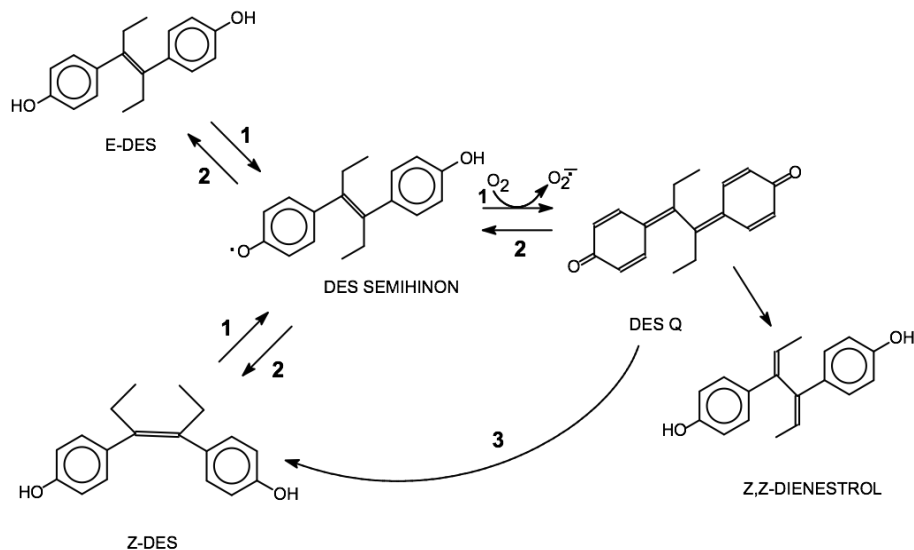
Oblici dejstva slobodnih radikala izazvani estradiolom uključuju povećanu oksidaciju proteina (Winter i Liehr, 1991) i peroksidaciju lipida u bubrezima hrčka (Roy i Liehr, 1994; Wang i Liehr, 1995). Studije su pokazale da 17 $\beta$ -estradiol dovodi do povećanja razmene sestrinskih hromatida (Ahmad i sar., 2000), prekida hromozoma, i da indukuje numeričke aberacije u humanim limfocitima i V79 ćelijama kineskog hrčka (Schuler i sar., 1998, Sato i sar., 1992; Đelić i sar., 2006). Takođe, zabeležena je i povećana učestalost mikronukleusa u kulturama humanih ćelija horionskih resica (Schuler i sar., 1996), V79 ćelijama kineskog hrčka (Eckert i Stopper, 1996), i bubrezima pacova (Banerjee i sar., 1991) tretiranih estradiolom.

Činjenica da estradiol utiče na više aspekata oksidativnog stresa može donekle razjasniti neslaganja u rezultatima vezanim za oštećenja hromozoma izazvanih ovim hormonom (Health Council of the Netherlands, 2013). E<sub>2</sub> nije dao pozitivan rezultat u kratkoročnim testovima genskih mutacija u *Salmonella typhimurium* testu i u kulturama sisarskih ćelija (Dhillon i Dhillon, 1995; Tsutsui i sar., 2000), niti je doveo do povećanja nivoa strukturnih aberacija hromozoma kultura embrionalnih ćelija sirijskog hrčka (Tsutsui i sar., 1997). Estradiol nije indukovao mikronukleuse u većem broju *in vivo* testova, uključujući periferne limfocite (Morita i sar., 1997) i spermicide miša (Pylkkänen i sar., 1991), kao i ćelije kostne srži pacova (Shelby i sar., 1997).

Podaci o genotoksičnoj aktivnosti estradiola uočeni su u različitim *in vitro* i *in vivo* sistemima, u kojima je zabeležena pojava DNK adukata, oksidovanih baza i jednolančanih prekida lanaca (Cavaliere i sar., 2000; Rajapakse i sar., 2005). Komet testom su potvrđena DNK oštećenja izazvana estradiolom kod MCF-7 ćelija raka dojke (Yared i sar., 2002), ljudskih limfocita i sperme (Anderson i sar., 2004; Cemeli i sar., 2004).

### 1.2.4. Genotoksični efekti dietilstilbestrola

Dietilstilbestrol, sintetički nesteroidni analog estradiola, ispoljava snažan citotoksični efekat, a pored toga poseduje kancerogeni i teratogeni efekat (Shadab, 2006). Redoks ciklusi, koji dovode do stvaranja slobodnih radikala, su osnova genotoksičnih efekata estrogena i sličnih jedinjenja. Za razliku od primarnih estrogena koji hidroksilacijom prelaze u katehol estrogene, DES je sposoban da bude direktno uključen u redoks reakcije (Đelić i Đelić, 2002). Reaktivni genotoksični intermedijer DES-a je DES hinon (DES Q), koji reaguje sa ćelijskim peptidima i proteinima (Liehr i sar., 1985), a vezuje se i za DNK, formirajući hemijski nestabilne adukte (Slika 6). Kovalentni DES-DNK adukti koji su detektovani u jetri, bubrezima i materici sirijskih hrčaka nakon samo jedne injekcije DES-a, identifikovani su pomoću kohromatografije sa aduktima dobijenim u *in vitro* reakcijama DES Q i DNK iz netretiranih hrčaka (Gladek i Liehr, 1989). Kod ljudi je zabeleženo da su DNK adukti uzrokovani DES-om 4-6 puta češći kod žena nego kod muškaraca (Gladek i Liehr, 1989). Takođe, koncentracija 8-oxo-dG DNK baza je povećana u odnosu na kontrolne vrednosti u DNK inkubiranoj s DES-om (Rosier i Van Peteghem, 1989).



Slika 6. Redoks ciklusi između DES i DES Q (DES hinon, dietilstilbestrol-4',4'' hinon) i stvaranje slobodnih radikala. 1 - citohrom P 450 oksidaza; 2 - NADPH zavisna citohrom P 450 reduktaza; 3 - hinon reduktaza; E-DES i Z-DES predstavljaju stereoizomerne oblike DES-a; Z,Z-dienestrol nastaje spontano od DES Q (preuzeto iz Đelić, 1996)

Kod sisara, DES deluje slično estrogenu, i deluje na bubrege, prostatu, vaginu i matericu, uzrokujući nestabilnost mikrosatelita i povećanje fosforilacije tirozina, što može uticati na ćelijski integritet i kontrolu ćelijskog ciklusa (Roy i sar., 1998). U *in vitro* modelu na miševima, DES je doveo do zaustavljanja mitoze (Fučić i sar., 2009), dok je u mikronukleus testu dao pozitivan rezultat u ćelijama limfoma (Oh i sar., 2010). Mikroerej (engl. *microarray*) analiza na TM4 Sertoli ćelijama testisa je pokazala da tretiranje ćelija DES-om dovodi do promene ekspresije gena uključenih u ćelijski razvoj i regulaciju ćelijskog ciklusa, što može pomoći u razumevanju molekularnih faktora koji izazivaju DES genotoksičnost (Oh i sar., 2010). Genotoksična aktivnost uključuje indukciju razmene sestrinskih hromatida (Rudiger i sar., 1979; Hill i Wolff, 1983), neplanirane sinteze DNK (Tsutsui i sar., 1984) i aneuploidije u ćelijama embriona sirijskog hrčka (Tsutsui i sar., 1983). DES takođe uzrokuje oštećenje mitohondrijalne DNK, posebno gena za citohrom *c* oksidazu (Thomas i Roy, 2001).

Ranija istraživanja genotoksične aktivnosti DES-a u različitim test sistemima su bila kontradiktorna. DES nije stvarao mutacije u testu na *Salmonella typhimurium*, u kulturama embriona sirijskog hrčka i u V79 ćelijama kineskog hrčka (Shadab i sar., 2006). S druge strane, DES je indukovao SCE u humanim fibroblastima i limfocitima (Hill i Wolff, 1983). Novija istraživanja su pokazala da je DES doveo do odlaganja proliferacije ćelija kod humanih limfocita (Shadab i sar., 2006), kao i da je u komet testu izazvao DNK oštećenja u limfocitima i spermiji čoveka (Cemeli i sar., 2004; Cemeli i Anderson, 2011).

### **1.3. OKSIDATIVNI STRES**

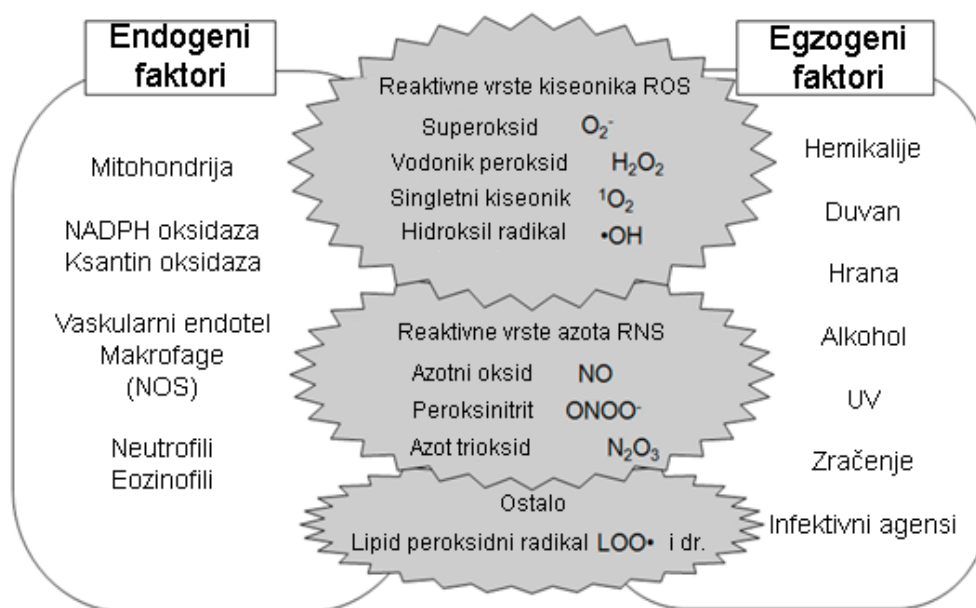
Poremećaj normalnog redoks stanja u ćelijama se naziva "oksidativni stres". Predstavlja neravnotežu između produkcije peroksida i slobodnih radikala, i sposobnosti bioloških sistema da neutrališu reaktivne intermedijere ili da poprave nastala oštećenja (Gagne, 2014). Oksidativni stres doprinosi procesu starenja (Dalle-Donne i sar., 2006), kao i mnogim patološkim stanjima, uključujući rak, Parkinsonovu bolest (Hwang, 2013), Alchajmerovu bolest (Valko i sar., 2007), aterosklerozu, hipertenziju (Dhalla i sar., 2000; Ker i sar., 1999), hroničnu opstruktivnu bolest pluća (Asami i sar., 1997), astmu (Dut i sar., 2008) i depresiju (Liu i sar., 2015). Svi aerobni organizmi su stalno izloženi oksidativnom stresu. Iz tog razloga, oni imaju integrisane antioksidativne sisteme koji su obično efikasni u blokiranju štetnih efekata slobodnih radikala. Međutim, u patološkim uslovima, antioksidativni sistemi

moгу biti preopterećeni (Birben i sar., 2012), što mođe uzrokovati da nastali peroksidi i slobodni radikali dovedu do oštećenja svih komponenti ćelije, uključujući proteine, lipide, ugljene hidrate i DNK (Dalle-Donne i sar., 2005).

### 1.3.1. Nastanak slobodnih radikala u ćelijama

Slobodni radikali su nestabilni produkti ćelijskog metabolizma koji sadrđe jedan ili više nesparenih elektrona (Valko i sar., 2007). Težeći da postignu elektronsku stabilnost, slobodni radikali oduzimaju elektron od stabilnih molekula. Time započinju lančanu reakciju oksidacije supstrata koja dovodi do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih promena biomolekula. Ova reakcija se nastavlja sve do trenutka dok ne dođe do njihove neutralizacije i sprečavanja dalje propagacije od strane endogenih ili egzogenih antioksidanasa (Valko i sar., 2007).

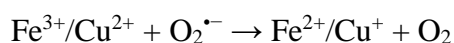
Slobodni radikali nastaju tokom normalnih metaboličkih procesa kao što su izlaganje visokim temperaturama ili usled metabolizam ksenobiotika (Parihar i sar., 1995; 1996). Oni imaju mnogobrojne fiziološke uloge, kao što su: učešće u ćelijskoj signalizaciji, odbrana od infektivnih agensa, regulacija genske ekspresije (Valko i sar., 2007). Osim toga, slobodni radikali mogu nastati u organizmu kao odgovor na elektromagnetno zračenje iz okoline, ili dospeti u organizam direktno kao oksidansi zagađivači (ozon i azot dioksid) (Betteridge, 2000) (Slika 7).



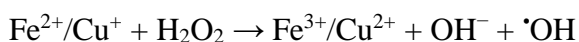
Slika 7. Vrste slobodnih radikala i njihovi izvori (preuzeto i modifikovano iz Kallaur i sar., 2017, Mol Neurobiol)

Postoje dve grupe slobodnih radikala: 1) ROS i 2) reaktivne vrste azota (engl. *reactive nitrogen species*, RNS). Interakcija između ROS i RNS reguliše vaskularni tonus ili zapaljenske procese u organizmu. Iako ROS i RNS imaju važne fiziološke funkcije, njihova prekomerna proizvodnja može prouzrokovati oštećenje ćelija (Reiter, 1996; Valko i sar., 2006).

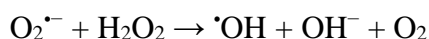
Reaktivne vrste kiseonika je kolektivni izraz ne samo za kiseonične radikale, već i za neke derivate kiseonika koji ne sadrže nesporene elektrone, kao što su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i hipohlorasta kiselina (HClO) (Hemnani i Parihar, 1998). Većina endogenih ROS nastaje tokom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (Finkel i Holbrook, 2000; Mikkelsen i Wardman, 2003). Dodatno, enzimski sistemi citosola, uključujući NADPH oksidaze i nusprodukte metabolizma peroksizoma, su takođe endogeni izvori ROS (Salmon i sar., 2004). Tri glavne ROS koje imaju fiziološki značaj u ćeliji su superoksidni anjon (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroksil radikal (•OH) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Birben i sar., 2012). S druge strane, ove ROS su implicirane i u patofiziologiji različitih stanja, uključujući hemoragični šok, aterosklerozu, akutnu hipertenziju i rak (Hemnani i Parihar, 1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastaje u mitohondrijama, peroksizomima, mikrozomima i ćelijskoj membrani. Najviše H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastaje u peroksizomima, gde je katalaza visoko aktivna, štiteći ovaj deo ćelije od oksidativnih oštećenja (Kisić Božović i sar., 2006). Toksičnost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije posledica direktnog dejstva na biomolekule, već njegove mogućnosti da reaguje sa superoksidnim anjonom, koji nastaje prvenstveno kao nusprodukt mitohondrijskog disanja. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaguju putem Haber-Weissovog ciklusa (Koppenol, 2001). Prvi korak u ovoj reakciji je reakcija O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sa oksidovanom formom metala.



Drugi korak je Fentonova reakcija (Reiter, 1997), gde redukovani metal reaguje sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gvožđe ili bakar (Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>), potrebni za ovu reakciju, su detektovani u jedru (Thorstensen i Romslo, 1984) i mogu biti vezani za DNK *in vivo*, ili oksidativni stres može dovesti do njihovog oslobađanja iz intracelularnih depoa.



U zbirnoj reakciji Haber-Weissovog ciklusa nastaje najreaktivnija vrsta kiseoničnih radikala, •OH.



Izvori njegove proizvodnje, osim Fentonove reakcije, su zračenje (Von Sonntag, 1987), razlaganje peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>) (Beckman i sar., 1994) i reakcija O<sub>2</sub><sup>-</sup> sa HClO (Candeias i sar., 1993). <sup>•</sup>OH se uglavnom navodi kao inicijator oštećenja DNK molekula. Pomenuti ciklus sprečavaju enzimi katalaza (engl. *catalase*, CAT) i glutation peroksidaza, ali i superoksid dizmutaza (engl. *superoxide dismutase*, SOD), koje razlažu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodu i kiseonik (Kisić Božović i sar., 2006).

Balans između fizioloških funkcija i patofizioloških stanja određuje se relativnim stopama formiranja i uklanjanja ROS. U normalnim metaboličkim uslovima, očekuje se nizak nivo oštećenja od oksidanasa koji nastaju u transportnom lancu elektrona u mitohondrijama i Fentonovoj reakciji. Kada njegovi prekursori nastaju u malim količinama, i nivo <sup>•</sup>OH je minimalan. Međutim, tokom oksidativnog stresa koji se javlja u patološkim uslovima, endogeni antioksidativni odbrambeni sistemi ne mogu da obezbede dovoljnu zaštitu (Thomas i sar., 2009). Sve je više dokaza koji ukazuju na mnoge međusobno povezane mehanizme, tokom patogeneze bolesti, koji povećavaju proizvodnju ROS i/ili smanjuju antioksidativnu zaštitu (Dalle-Donne i sar., 2005).

### **1.3.2. Biomarkeri oksidativnog stresa**

Informacije o prirodi ROS, kao i lokalizacija i efekti oksidativnog stresa, mogu se prikupiti iz analize biomarkera izolovanih iz tkiva i bioloških tečnosti. Biomarkeri su indikatori fiziološkog stanja i promena tokom procesa bolesti. Sve je više dokaza da visoki nivoi ROS izazivaju različite patološke posledice, što dovodi do ireverzibilne degeneracije ćelija i tkiva (Dalle-Donne i sar., 2005). Povećani oksidativni stres može da ošteti esencijalne enzime i strukturne proteine, može izazvati nekontrolisane lančane reakcije, kao što su peroksidacija lipida ili reakcije autooksidacije (npr. polimerizacija kateholamina) (Halliwell i Cross, 1994), a može i dovesti do oštećenja molekula DNK (Salmon i sar., 2004). ROS mogu direktno da stupe u vezu sa proteinima, posebno njihovim sulfhidrilnim grupama (Herington, 1986), dok peroksidacija membranskih lipida verovatno dovodi do poremećaja integriteta membrane (Richter, 1987; Vliet i Bast, 1992).

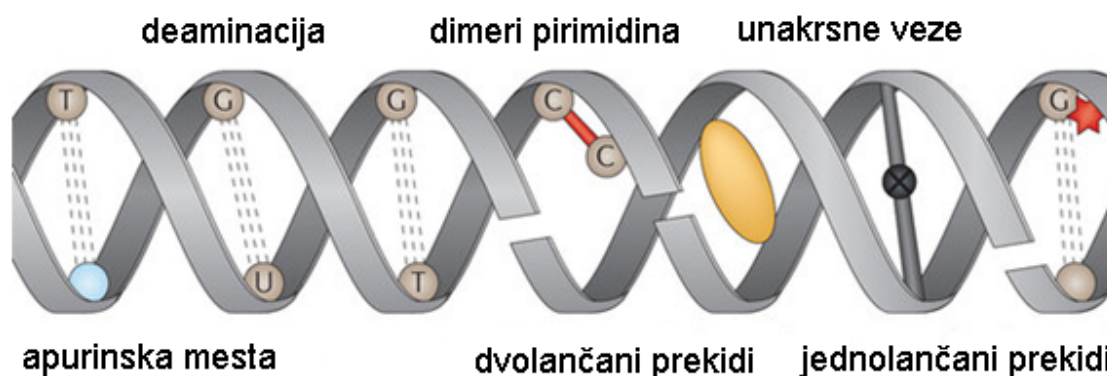
Iako se oksidativni stres sve više prepoznaje kao komponenta praktično svake bolesti, kod većine poremećaja oksidativni stres je posledica, a ne uzrok procesa primarne bolesti (Hallivell i Gutteridge, 1999; Dalle-Donne i sar., 2003). Da bi se ispitala uloga oksidativnog stresa i ROS u patogenezi i/ili progresiji neke bolesti, neophodna je upotreba odgovarajućih metoda detekcije. Zbog visoke reaktivnosti sa drugim molekulima i polu-života koji se može



meriti u sekundama, direktno i precizno određivanje nivoa ROS u ćelijama je otežano. Međutim, dejstvo ROS na biomolekule rezultuje u proizvodima oksidacije koji su znatno stabilniji od reaktivnih vrsta koje su ih modifikovale. Ovi proizvodi se koriste kao biomarkeri oksidativnog stresa. Specifičnost proizvoda koji nastaju omogućava da se odredi stepen oksidativnog oštećenja, ali i da se identifikuje sama priroda oksidansa koji je izazvao reakciju (Dalle-Donne i sar., 2005). Veliki broj metoda je razvijen i korišćen kako bi se merio stepen i priroda oksidativnog stresa, u koje spadaju oksidacija DNK i proteina, peroksidacija lipida i antioksidativni sistemi superoksid dismutaze i glutaciona (GSH) (Chang i sar., 2014; Frijhoff i sar., 2015).

### 1.3.2.1. Biomarkeri oksidativnog oštećenja DNK

Oksidacija DNK molekula tj. proces oksidativnog oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline se javlja kao posledica napada slobodnih radikala koji nastaju endogeno ili egzogeno. Nivo DNK oštećenja u uslovima povišenog oksidativnog stresa zavisi od reaktivne vrste koja je izazivač oštećenja, mesta nastanka reaktivnih vrsta, kao i od prisustva jona metala u njihovoj blizini. Dejstvom slobodnih radikala na molekul DNK mogu nastati različiti produkti i modifikacije oksidovanih šećera i baza kao što su: oksidovane purinske i pirimidinske baze, apurinska/apirimidinska mesta (AP), jednolančani i dvolančani DNK prekidi (Hemnani i Parihar, 1998; Benhusein i sar., 2010) (Slika 8).



Slika 8. Tipovi primarnih DNK oštećenja (preuzeto i modifikovano iz Helleday i sar., 2014, Nat Rev Genet)

Oksidovane baze i AP mesta mogu nastati oštećenjem šećerno-fosfatnog lanca DNK od strane hidroksil radikala ( $\cdot\text{OH}$ ). DNK oksidacija se najčešće javlja na ostacima guanina,

zbog visokog oksidacionog potencijala ove baze u odnosu na citozin, timin i adenin. Više od 20 lezija oksidativno oštećenih DNK baza je identifikovano do 2003. godine (Cooke i sar.). Dve najčešće oksidovane baze su dva proizvoda oksidacije guanina: 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoksiguanozin (8-oxo-dG) i FapiGua (2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin) (Dizdaroglu i sar., 1992). 8-oxo-dG dovodi do pojave transverzije guanina u timin. Povećani nivoi 8-oxo-dG u tkivu mogu poslužiti kao biomarker oksidativnog stresa (Willner, 2004; Evans i Cooke, 2004; Valavanidis i sar., 2013). Osim nastanka oksidovanih baza, indikator oksidativnih oštećenja na DNK molekulu je i fragmentacija dezoksiriboze i nastanak jednolančanih (engl. *single strand breaks*, SSB) i dvolančanih (engl. *double strand breaks*, DSB) prekida. Pokazano je da u prisustvu povećane količine ROS češće dolazi do prevođenja jednolančanih u dvolančane DNK prekide (Prise i sar., 1993).

Sva navedena oštećenja predstavljaju primarna DNK oštećenja. U normalnim fiziološkim uslovima, učestalost primarnih oksidativnih oštećenja DNK je oko  $1 \times 10^{-6}$  baza (Lu i sar., 2001). Kada se u ćeliji pojavi veći procenat oštećenja molekula DNK, dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, kao i sprečavanja replikacije kako bi se omogućilo dovoljno vremena za reparaciju. Do reparacije lezija dolazi delovanjem serije enzima (Clayson i sar., 1994; Wiseman i sar., 1995). DNK glikozilaze služe za popravku nekoliko baznih lezija DNK, uključujući oksidovane, metilovane i baze nastale procesom deaminacije. Postoji i sistem reparacija za osnovna mesta nastala spontanom depurinacijom (Hemnani i Parihar, 1998).

Oksidativno oštećenje DNK molekula se može registrovati na različite načine. Npr., visoka stopa oksidativnog oštećenja sisarske DNK, kao i zavisnost stope oštećenja sa brzinom metabolizma i obrnuta zavisnost sa životnim vekom organizma, je pokazana merenjem koncentracije oksidovanih DNK baza izlučenih u urinu nakon DNK reparacije (Hemnani i Parihar, 1998). Merenja oksidativnih oštećenja DNK se mogu izmeriti pomoću različitih tehnika - tečne hromatografije visoke performanse (HPLC) (Sabatini i sar., 2005), gasne hromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) (Mei i sar., 2005) i tečne hromatografije- masene spektrometrije (LC-MS) (Badouard i sar., 2008) ili merenje 8-oxo-dG. Međutim, hromatografske tehnike su sklone proizvodnji artefakata (Gedik i Collins, 2005), dok je merenje 8-oxo-dG nepouzdanost jer u velikoj meri zavisi od reakcionih uslova (Halliwell i Whiteman, 2004; Dizdaroglu i sar., 2002). Merenje oksidativnog oštećenja DNK može biti bazirano na inkubaciji DNK sa reparacionim endonukleazama koje uklanjaju oksidovane baze. Prekidi do kojih one dovode se mere različitim tehnikama, uključujući baznu eluciju (engl. *alkaline elution*) (Pflaum i sar., 1997), denaturaciju DNK u baznim

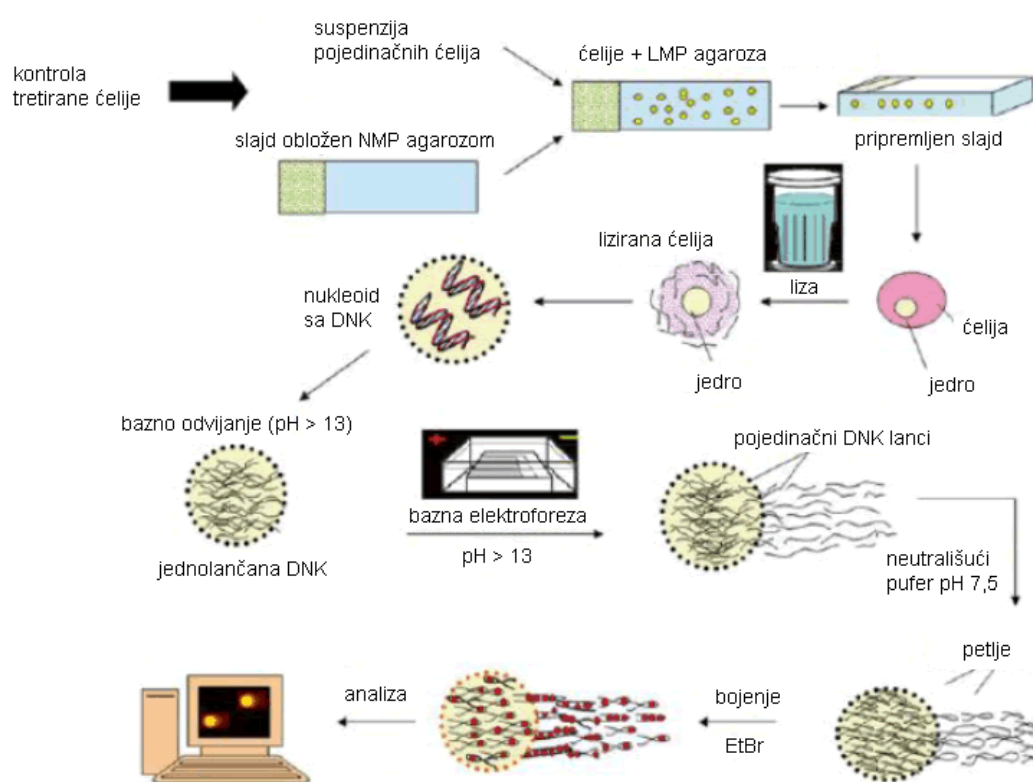
uslovima (engl. *alkaline unwinding*) (Hartwig i sar., 1996) i komet test (Collins i sar., 1996). Ove metode se kalibrišu u odnosu na prekide DNK koje se unose u ćelije pomoću jonizujućeg zračenja, pa su procene oksidovanih baza indirektna. Međutim, postoji bliska veza između ova tri različita pristupa, dajući procenu početnog nivoa oštećenja u normalnim ljudskim ćelijama od oko 0,5 formamidopirimidin DNK glikozilaznih (FPG) mesta na  $10^6$  dGuo (Gedik i sar., 2002).

### 1.3.3. Komet test za detekciju oštećenja DNK

Komet test ili elektroforeza DNK pojedinačnih ćelija (engl. *single cell gel electrophoresis*, SCGE) je brza i visoko osetljiva metoda za detekciju primarnih DNK oštećenja (Garaj-Vrhovac i Kopjar, 2003), koja se može primeniti u *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* sistemima (Cemeli i sar., 2009). Prvi su je razvili Östling i Johansson 1984. godine. Prednosti komet testa u odnosu na većinu citogenetičkih metoda za detekciju DNK oštećenja su jednostavnost i brzina izvođenja, bez potrebe za višednevnom kultivacijom ćelija i sterilnih uslova rada (Collins, 2004). Takođe, oštećenje DNK se meri na nivou pojedinačnih ćelija, pri čemu je analiza moguća na bilo kom tipu eukariotske ćelije, odnosno jedra, pod uslovom da se nalaze u suspenziji (Leroy, 1996; Lee i Steinert, 2003). Osim toga, moguće je dobiti pouzdan rezultat na relativno malom broju ćelija, jer je za dobijanje preciznih i ponovljivih rezultata dovoljno analizirati do 100 ćelija po uzorku. Komet test je našao primenu u genotoksikološkim istraživanjima, monitoring i molekularnim epidemiološkim studijama, kao i za evaluaciju antigenotoksičnih svojstava prirodnih antioksidanasa (Collins, 2004). Zbog sposobnosti da detektuje oksidativni stres *in vivo*, komet test se koristi kao biomarker u patologiji, ishrani, profesionalnoj izloženosti i zagađenju životne sredine (Cemeli i sar., 2009).

Osnovni princip komet testa zasniva se na migraciji denaturisane DNK u toku elektroforeze. Negativno naelektrisani fragmenti DNK migriraju u električnom polju kroz agarozni gel ka anodi. Prilikom posmatranja pod mikroskopom, u slučaju oštećenja DNK, uočljive su strukture koje podsećaju na komete, sa glavom koja sadrži neoštećenu DNK u regionu nukleusa (nukleoid), i repom koji sadrži DNK fragmente koji su dalje migrirali. Daljina migracije i/ili količina DNK koja migrira direktno ukazuju na količinu prekida tj. nivo oštećenja DNK molekula. Komete je moguće analizirati i klasifikovati na osnovu stepena oštećenja vizuelno ili korišćenjem odgovarajućeg programa na računaru (Slika 9).

Među različitim verzijama komet testa, bazna verzija koju su opisali Singh i sar. (1988) i koja uključuje odmotavanje DNK lanaca u baznim uslovima, omogućava detekciju širokog spektra DNK oštećenja. Značajne faze u toku izvođenja baznog komet testa su održavanje uzoraka na hladnom, radi usporavanja procesa u ćeliji tj. smanjenja nivoa reparacije DNK, razgradnja ćelijskih delova držanjem uzoraka u lizirajućem rastvoru, kao i raskidanje vodoničnih veza i rasplitanje lanaca DNK pod uticajem visoke pH. U baznoj verziji komet testa mogu se detektovati dvolančani i jednolančani prekidi DNK, osetljiva mesta koja se u baznim uslovima prevode u jednolančane prekide i jednolančani prekidi nastali kao rezultat nedovršene ekscizivne reparacije.



Slika 9. Šematski prikaz procesa komet testa (preuzeto i modifikovano iz Gharsalli, J Environ Anal Toxicol, 2016)

Pošto i smrt ćelije dovodi do oštećenja DNK, pre analize genotoksičnog potencijala neke supstance komet testom, određuje se vijabilnost ćelija. Vijabilnost ćelija može se odrediti „trypan blue“ testom koji omogućava bojenje isključivo mrtvih ćelija (Strober, 2015). Da bi se izbegli lažni pozitivni rezultati tj. da bi se potvrdilo da je u pitanju

genotoksični, a ne citotoksični efekat, potrebno je da vijabilnost ćelija koje se koriste u *in vitro* komet testu pređe 75% (Henderson i sar. 1998).

#### 1.4. ANTIOKSIDANSI

Antioksidans je svaka supstanca koja ima sposobnost da smanjuje ili sprečava oksidaciju nekog supstrata podložnog oksidaciji (Halliwell i Gutteridge, 1999). Antioksidansi se mogu podeliti u dve kategorije: enzimski i neenzimski. Glavni enzimski antioksidansi su SOD i katalaza. Osim ovih velikih, takođe su otkriveni i drugi antioksidantni enzimi, uključujući hem oksigenazu-1 i redoks proteine, kao što su peroksiredoksini, tioredoksini i glutaredoksini (Birben i sar., 2012). Neenzimski antioksidansi uključuju feritin, ceruloplazmin, i jedinjenja niske molekulske mase, kao što su vitamini, karotenoidi, polifenoli i glutation (Nimse i Pal, 2015).

Ćelijski antioksidansi ostvaruju svoju aktivnost u okviru primarne i sekundarne antioksidativne zaštite. Primarna antioksidativna zaštita podrazumeva antioksidanse koji sprečavaju stvaranje i propagaciju slobodnih radikala. Najčešći molekularni mehanizmi dejstva u primarnoj antioksidativnoj zaštiti su: hvatanje slobodnih radikala tj. doniranje protona i neutralizacija radikala, i heliranje, odnosno vezivanje prelaznih metala u neaktivnu formu. U primarnu antioksidativnu zaštitu spadaju: antioksidansi poreklom iz hrane (vitamini, polifenoli), endogeni antioksidansi (NADPH i NADH, ubihinon), enzimi (superoksid-dizmutaza -SOD, katalaza - CAT) i metalvezujućii proteini koji heliraju slobodne jone gvožđa i bakra. Antioksidansi sekundarne antioksidativne zaštite interaguju sa već oksidovanim produktima u ćeliji, i obuhvataju enzime koji učestvuju u reparaciji i dezintegraciji produkata oksidacije (Halliwell i sar., 1995; Halliwell, 2001). Antioksidansi su prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu svrstani u: preventivne antioksidanse, koji sprečavaju nastanak slobodnih radikala; antioksidanse hvatače slobodnih radikala i “reparacione” antioksidanse, koji obnavljaju ili uklanjaju oštećene biomolekule (Shi i sar., 2001).

Antioksidansi hrane su smatrani aditivima koji čuvaju hranljivu vrednost namirnica sprečavanjem oksidacije karotena, liposolubilnih vitamina i esencijalnih masnih kiselina. Brojne antioksidantne supstance su otkrivene i izolovane iz prirodnih izvora kao što su začini, povrće i voće. Biljna tkiva su prirodni izvori različitih vrsta antioksidativnih jedinjenja. Antioksidansi su grupisani kao vitamini (C, E, A, B), karotenoidi (kondenzovani

tanini, ksantofili i karoteni), flavonoidi (flavoni, izoflavini, flavonoli, flavanoli, flavanoni), fenolne kiseline (hidroksibenzoeva i hidroksicinaminska kiselina), fenolni alkoholi, stilbeni, lignani, tanini, antioksidansi koji sadrže sumpor, i novosintetisana jedinjenja (melanoidini) (Cömert i Gökmen, 2018). Iako su ranije studije bile fokusirane na antioksidativni kapacitet tokoferola, vitamina C i karotenoida, primećeno je da su fenolna jedinjenja, najbrojnija grupa sekundarnih metabolita biljaka, mnogo snažniji antioksidansi od ostalih (Rice-Evans i sar., 1996).

Kvercetin, kao najzastupljeniji flavonoid u hrani, se često koristi u studijama usmerenim na razumevanje uloga polifenola u aktivnosti antioksidanasa (Kapiszevska i sar., 2005). Brojne studije su potvrdile da su kvercetin i njegovi derivati potentni antioksidansi (Narayana i sar., 2001; Lakhanpal i sar., 2007). *In vitro*, kvercetin je već pokazao svoju sposobnost da zaštiti DNK humanih limfocita i sperme od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estrogena i mutagena koji potiču iz hrane (Aherne i O'Brien, 2000; Cemeli i sar., 2004). Glavni mehanizam njegove zaštite od oksidativnih oštećenja DNK podrazumeva uklanjanje slobodnih radikala (Ross i Kasum, 2002; Cemeli i sar., 2004; Vilms i sar., 2005; Cemeli i sar., 2009). Prvi način na koji kvercetin smanjuje nivo slobodnih radikala je njihova direktna neutralizacija (Middleton i sar., 2000; Mladenović, 2015). Osnova ovog mehanizma je reakcija kvercetina sa slobodnim radikalom, što rezultira nastankom stabilnijeg, manje reaktivnog kvercetinskog radikala (Erkoç i sar., 2003). Drugi način je sprečavanje njihovog nastanka u Fentonovoj reakciji (Middleton i sar., 2000; Mladenović, 2015). Osim smanjenja nivoa slobodnih radikala, mehanizmi delovanja kvercetina mogu biti i povećanje koncentracije enzimskih i neenzimskih komponenti sistema antioksidativne zaštite ćelija i stimulacija reparacije DNK molekula (Middleton i sar., 2000; Kadrabova i sar., 2012).

#### **1.4.1. Primena komet testa u ispitivanju efekata prirodnih proizvoda na DNK oštećenja**

Komet test se često koristi za ispitivanje antigenotoksičnog potencijala antioksidanasa. Tice i sar. (2000) su predložili nekoliko prednosti *in vitro* komet testa u poređenju sa drugim testovima genotoksičnosti: pokazao je osetljivost za otkrivanje niskih nivoa DNK oštećenja, potreban je mali broj ćelija po uzorku, fleksibilan je, nije skup i lak je za primenu, studije se mogu sprovoditi korišćenjem relativno malih količina ispitivane supstance i kratkotrajan je. Komet test se praktično može primeniti na bilo kom tipu ćelija, sve dok je moguće dobiti suspenziju pojedinačnih ćelija. Dok su ljudski limfociti i dalje

najpopularniji tip ćelija za potrebe monitoringa, takođe se koriste i bukalne, nosne, epitelne, placentalne i ćelije sperme (Anderson, 2001).

Cemeli i sar. (2009) smatraju da će uglavnom dva pravca razvoja komet testa konsolidovati ovaj test kao veoma vredno sredstvo u istraživanju antioksidanasa *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo*. (1) Mnogo napora se ulaže u uspostavljanje komet testa kao tehnike visokog protoka (Kiskins i sar., 2002). Već postoji veliki broj studija o antioksidantskim jedinjenjima npr. karotenoidima (Halliwell i Gutteridge, 1999), flavonoidima ili antioksidansima prirodnog ili sintetičkog porekla, i značajno se uvećava broj radova koji identifikuju nove potencijalne antioksidanse. Dakle, postoji potreba da ih procenimo brzo i pouzdano. (2) Većina istraživanja se fokusira na vezu između antioksidanasa (i mikronutrijenata) i reparacije DNK, kao indirektnog mehanizma za suočavanje sa oksidativnim stresom. Komet test može lako da izmeri kapacitet DNK reparacije i, zauzvrat, ovo se može koristiti kao biomarker za procenu efekata dijetetskih suplemenata (Collins i sar., 2003).

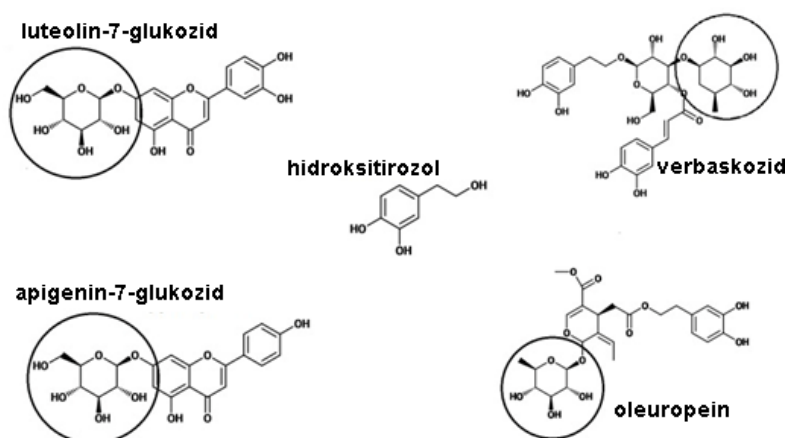
Upotreba određenih antioksidanasa je omogućila razjašnjenje mehanizma kojim širok spektar agenasa dovodi do oštećenja DNK (Cemeli i sar., 2009). Takođe, komet test je razotkrio prooksidantske/antioksidantske efekte različitih endogenih i egzogenih jedinjenja (Anderson i Philips, 1999). Antioksidansi imaju važnu ulogu u snižavanju nivoa oksidativnog oštećenja biomolekula u ćeliji. Na primer, više studija je potvrdilo da dodatak voća i povrća, vitamina C i E ili karotena ishrani snižava nivo oksidativnih oštećenja u limfocitima pušača (Duthie i sar., 1996) i ćelijama kolorektale mukoze kod ljudi (Leuratti i sar., 2002), kao i HepG2 ćelijama prethodno izlaganih atmosferskom zagađenju (Lazarova i Slamenova, 2004). Ovi nalazi su u saglasnosti sa opšteprihvaćenim konsenzusom da unos svežeg voća i povrća dovodi do smanjenja oksidativnih DNK oštećenja (Singh i sar., 2007).

Komet test je uspešan u ispitivanju interakcije antioksidanasa i genotoksičnih agenasa (Gajecka i sar., 1999) i pokazao se kao dobra tehnika za procenu da li antioksidansi/mikronutrijenti mogu da zaštite integritet genetičkog materijala (Cemeli i sar., 2009). Dosadašnja istraživanja su obuhvatala vitamine A, B, C, E i Q10, karotene, flavonoide, izoflavone i polifenole vina i čaja. Primena komet testa na humanim uzorcima može pomoći u definisanju suplemenata sa specifičnim antioksidansima koji menjaju nivo oštećenja DNK i otkriti u kojoj meri su nivoi antioksidansa uključeni u zaštitni efekat (Cemeli i sar., 2009). Činjenica da glavni mehanizam kojim hormoni izazivaju DNK oštećenja jeste stvaranje slobodnih radikala, prvenstveno reaktivnih vrsta kiseonika, sugerise da njihov efekat može biti modifikovan antioksidansima. I zaista, studije su pokazale da su vitamin E i kurkumin efikasni u zaštiti sperme pacova od oksidativnog stresa izazvanog

tiroksinom (Sahoo i sar., 2008). Takođe, pokazano je da su katalaza, superoksid dismutaza i vitamin C sposobni da smanje stepen DNK oštećenja u humanim limfocitima i spermijama izazvanih estradiolom i DES-om (Cemeli i sar., 2004; Shadab i sar., 2006).

#### 1.4.2. Ekstrakt lista masline

Poznato je da mnoge komponente tradicionalne mediteranske ishrane imaju pozitivne efekte na smanjenje oksidativnog stresa, upale i druge važne faktore rizika oboljenja. Istraživanje farmakoloških osobina bioaktivnih komponenti pomenutog načina ishrane je veoma aktuelno. Ključnu ulogu igraju polifenoli, kojih ima u velikoj količini, posebno u ekstra devičanskom maslinovom ulju (Vasto i sar., 2014a, b). Osim ploda, i list masline (*Olea europaea* L.) sadrži velike količine potencijalno korisnih fitohemikalija. Postoji pet grupa fenolnih jedinjenja koja su uglavnom prisutna u listovima masline: oleuropeozidi (oleuropein i verbaskozid); flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid luteolin i diosmetin); flavonoli (rutin); flavanoli (katehin); i supstituisani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kiselina, i kafeinska kiselina) (Sabry, 2014). HPLC-DAD analiza različitih ekstrakata lista masline je omogućila identifikaciju sedam fenolnih derivata (Slika 10): hidroksitirozol, verbaskoid, flavoni (luteolin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukozid), oleuropein, ligstrozid i oleuropein-aglikon (Guinda i sar., 2015).



Slika 10. Fenolni derivati zastupljeni u ekstraktu lista masline (preuzeto i modifikovano iz Boss i sar., Nutrients, 2016b)

Najveći antioksidativni potencijal i sposobnost uklanjanja slobodnih radikala od svih delova masline imaju listovi masline, zahvaljujući svom fitohemijskom sastavu. Sadržaj



oleuropeina u maslinovom ulju kreće se između 0,005% i 0,12%, dok se u listovima kreće između 1% i 14% (Japon-Lujan i sar., 2006). Oleuropein se pokazao kao snažan antioksidans sa antiinflamatornim osobinama. Njegova izražena sposobnost uklanjanja slobodnih radikala može biti zbog njegove sposobnosti heliranja jona metala kao što su  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  (Andrikopoulos i sar., 2002), kao i zbog njegovog potencijala da inhibira nekoliko enzima inflamatornog odgovora, kao što su lipoksigenaze (Visioli i sar., 2002). Za oleuropein, kao i njegov metabolit hidroksitirozol, je pokazano da uklanjaju superoksidne anjone, kao i da su inhibitori radikala nastalih iz hipohlorne kiseline (Chimi i sar., 1991). Oba jedinjenja, od kojih oleuropein pokazuje veću aktivnost, uklanjaju hidroksilne radikale (De la Puerta i sar., 1999), a zabeleženo je i da efikasno uklanjaju 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) radikale (Gordon i sar., 2001).

Proizvod koji je odabran za korišćenje u ovoj studiji predstavlja Benolea Olive Leaf Extract EFLA® 943, suvi ekstrakt lista masline (engl. *dry olive leaf extract*, DOLE), komercijalno dostupan u obliku kapsula (Slika 11). DOLE je uključen u evropsku farmakopeju (Ph. Eur.) kao standardizovani 80% suvi etanolni ekstrakt lista masline (Flemming i sar., 2014).



Slika 11. Komercijalni proizvodi koji sadrže Benolea Olive Leaf Extract EFLA® 943

To je dijetetski biljni proizvod sa visokim sadržajem flavonoida i polifenola, a oleuropein je, kao glavna bioaktivna komponenta, prisutan u visokoj koncentraciji (17%). Fitohemijska analiza komercijalnog ekstrakta lista masline je pokazala da se pored oleuropeina, u značajnoj količini mogu naći triterpeni i flavonoidi, kao što su luteolin, apigenin, rutin i kvercetin, kafeinska kiselina i tanini (Dekanski i sar., 2009c). Prema navodima proizvođača, ekstrakt poseduje sposobnost snižavanja krvnog pritiska i nivoa holesterola, a pomaže i u regulisanju nivoa šećera u krvi. Komercijalni DOLE proizvod je prisutan na tržištu kao suplement dugi niz godina, i nema literaturnih podataka koji govore o njegovim neželjenim dejstvima, ukoliko se primenjuje u preporučenim dozama. Bezbednost i neškodljivost upotrebe odgovarajuće doze ovog suplementa tokom vremenskog perioda potvrđena je u studijama na pacijentima sa hipertenzijom i reumatoidnim artritismom (Susalit i sar., 2010; Čabarkapa i sar., 2016).

Brojne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale blagotvorne efekte ekstrakta lista masline i njegovih sastojaka, uključujući antihipertenzivnu, antiaterogenu, antiinflamatornu, antikancerogenu, hipoholesterolemičnu i visoku antioksidativnu aktivnost (Hassen i sar., 2015; Talhaoui i sar., 2015; Čabarkapa i sar., 2016; Boss i sar., 2016a; Özcan i Matthäus, 2017). Naglašena antioksidativna svojstva DOLE u *in vitro* sistemima pripisana su fenolnim jedinjenjima, koja imaju značajnu antioksidativnu aktivnost *in vivo*, čak i nakon varenja ekstrakta (Martin-Vertedor i sar., 2016). Poznato je da ekstrakt ima najveću antioksidativnu aktivnost/sposobnost sakupljanja slobodnih radikala među 55 lekovitih biljaka, dvostruko višu od ekstrakta zelenog čaja (Vojcikovski i sar., 2007), i višu od vitamina C i E (Benavente-Garcia i sar., 2000). Tretman ekstraktom je pokazao sposobnost da smanji nivo 8-oxo-dG u kulturi humanih limfocita (Daradka i sar., 2018). Zaštitni efekat ekstrakta lista masline na oksidativna oštećenja DNK je opisan i kod oštećenja indukovanih sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kao i na genotoksičnost izazvanu forbol miristat acetatom i permترینom (Fabiani i sar., 2008; Anter i sar., 2011; Turkez i Togar, 2011).

DOLE je proučavan zbog svog zaštitnog potencijala protiv različitih bolesti i stanja, kao što su melanom (Miljković i sar., 2009), encefalomijelitis (Mijatović i sar., 2011), dijabetes (Cumaoglu i sar., 2011), bol (Esmaeili-Mahani i sar., 2010), cerebralna ishemija, hipertenzija (Dekanski i sar., 2011, 2014; Perrinjaquet-Moccetti i sar., 2008), reumatoidni artritis (Čabarkapa i sar., 2016) i trovanje olovom (Čabarkapa i sar., 2017). Uprkos pokazanim brojnim pozitivnim farmakološkim i biološkim svojstvima, i dugotrajnoj upotrebi u tradicionalnoj medicini, efekat ekstrakta lista masline na oštećenja DNK molekula izazvana hormonima do sada nije ispitivan.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U ovoj studiji smo odlučili da pojedinačno testiramo četiri hormona koja ispoljavaju svoje biološke efekte različitim molekularnim i biohemijsko-fiziološkim mehanizmima: dva nesteroidna derivata aminokiseline tirozin - adrenalin i tiroksin, i dva estrogena, steroidni prirodni - estradiol i nesteroidni veštački - dietilstilbestrol. Imajući u vidu da izazivanje DNK oštećenja stvaranjem slobodnih radikala, prvenstveno reaktivnih vrsta kiseonika, ima značajnu ulogu u genotoksičnom efektu svih odabranih hormona, to sugerise da njihov efekat može biti modifikovan antioksidansima. Brojne *in vitro* i *in vivo* studije su potvrdile višestruke korisne efekte ekstrakta lista masline i njegovih sastojaka, kao i njegov zaštitni potencijal kod oksidativnih oštećenja molekula DNK. U skladu s navedenim, ciljevi ove doktorske disertacije definisani su na sledeći način:

- Ispitati sposobnost hormona tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola da u različitim koncentracijama izazovu oštećenja DNK u leukocitima periferne krvi čoveka *in vitro*
- Ispitati antigenotoksični potencijal različitih koncentracija ekstrakta lista masline u prisustvu hormona tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola u leukocitima periferne krvi čoveka *in vitro*
- Proceniti kinetiku reparacije oštećene DNK u prisustvu ekstrakta lista masline u odnosu na oštećenja izazvana hormonima tiroksin, adrenalin, estradiol i dietilstilbestrol u leukocitima periferne krvi čoveka *in vitro*

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Ekstrakt lista masline

Proizvod pod nazivom Benolea<sup>®</sup> (Frutarom Ltd., Vadensvil, Švajcarska) je suvi etanolni ekstrakt lista masline koji je komercijalno dostupan u obliku kapsula. Ekstrakt unutar kapsula predstavlja Olive Leaf Extract EFLA<sup>®</sup> 943, proizveden od osušenih listova masline primenom etanolnog postupka ekstrakcije. Nakon procesa ekstrakcije i patentiranog procesa filtriranja (EFLA<sup>®</sup>Hyperpure), sirovi ekstrakt je osušen i standardizovan na 16-24% oleuropeina. U ovoj studiji, korišćena je serija sa pomenutim karakteristikama (EFLA<sup>®</sup> 943), nabavljena od proizvođača kao praškasta supstanca. Sertifikat analize proizvođača potvrdio je stabilnost i mikrobiološku čistoću, kao i sastav EFLA<sup>®</sup> 943 serije – oleuropein (17%), polifenoli (40,5%), acaciae gummi Ph. Eur. (nosač, 15%) i colloidal anhydrous silica Ph. Eur. (maksimalno 2%). Ukupan sadržaj fenola, određen Folin–Ciocalteu metodom, je 197,8 µg GAE/g suvog ekstrakta, a sadržaj ukupnih flavonoida je 0,29% i tanina 0,52%. Analiza ekstrakta HPLC metodom je pokazala detaljniji sastav fenolnih jedinjenja: apigenin-7-O-glukozid (0,07%), kvercetin (0,04%), luteolin-7-O-glukozid (0,04%) i kafeinska kiselina (0,02%) (Dekanski i sar., 2011).

Za eksperimentalno *in vitro* ispitivanje je korišćen ekstrakt koji je rastvaran mešanjem u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) 30 min na sobnoj temperaturi.

##### 3.1.2. Hormoni

U ovoj studiji su ispitivani hormoni levotiroksin-natrijum pentahidrat (T4, CAS No. 6106-07-6, Galenika, Beograd, Srbija), adrenalin (CAS No. 51-43-4, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, MO), 17β-estradiol (CAS No. 50-28-2, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, MO) i dietilstilbestrol (CAS No. 56-53-1, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, MO).

##### 3.1.3. Hemikalije

Za Komet test su upotrebljene sledeće hemikalije: agaroza normalne tačke topljenja (engl. *normal melting point agarose*, NMPA) (CAS No 9012-36-6, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD), agaroza niske tačke topljenja (engl. *low melting point agarose*, LMPA) (CAS No 39346-81-1, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD), EDTA (CAS No. 60-00-4, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), natrijum hlorid (CAS No. 7647-14-5, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), Tris (hidroksimetil aminometan) (CAS No. 77-86-1, Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, SAD), dimetil sulfoksid (DMSO, CAS No. 67-68-5, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), natrijum hidroksid (CAS No. 1310-73-2, TTT, Novaki, Hrvatska) i Triton X-100 Plus One (CAS No. 9002-93-1, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Za vizuelizaciju kometa upotrebljen je etidijum-bromid (2 µg/mL) (Cat No 1116080030, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka).

#### **3.1.4. Uzorci**

U istraživanje je bilo uključeno 6 osoba (5 žena i 1 muškarac) starosti od 20 do 40 godina. Ispitanici su regrutovani na dobrovoljnoj bazi, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Dobrovoljci nisu bili pušači, nisu koristili alkohol, lekove ili dijetetske suplemente. Protokole i informisani pristanak dobrovoljaca odobrio je Etički komitet Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odobrenje broj 1103/2). Uzorci periferne venske krvi su prikupljeni metodom vađenja iz prsta u heparinizovane endorf tube, nakon čega je odmah pristupano eksperimentima. Svi eksperimenti su izvedeni na Katedri za patobiologiju Farmaceutskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### **3.2. METODE**

#### **3.2.1. Dizajn eksperimenata**

##### **3.2.1.1. Broj i vijabilnosti ćelija**

Manuelno brojanje ćelija i procena njihove vijabilnosti rađeni su tokom svakog eksperimenta upotrebom boje tripan plavo u hemocitometru. 20 µL suspenzije ćelija je pomešano sa 20 µL 0,4% boje tripan plavo (engl. *trypan blue*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i inkubirano na sobnoj temperaturi 5 minuta, nakon čega je 10 µL obojene suspenzije

stavljeno u komoru (Neubauer). Brojanje ćelija je izvršeno pod svetlosnim mikroskopom (Olympus, CX21), na uvećanju 40×.

### 3.2.1.2. Genotoksični potencijal hormona

Uticaj tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola na stepen oštećenja DNK evaluiran je u opsegu koncentracija svakog od testiranih hormona pojedinačno. Uzorci ćelija su tretirani s odgovarajućim hormonom u trajanju od 30 minuta na 37 °C. Kao negativna kontrola uzet je rastvarač, odnosno PBS (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), dok je kao pozitivna kontrola korišćen 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAS No. 7722-84-1, ZORKA Pharma, Šabac, Srbija). Koncentracija od 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odabrana je kao najmanja koncentracija koja je izazivala značajno visok stepen DNK oštećenja nakon 30 minuta inkubacije u poređenju s netretiranim ćelijama, pri čemu je očuvana njihova vijabilnost.

Tiroksin je testiran u koncentracijama 5, 10, 50 i 150 µM. Tireoidni hormoni u rasponu koncentracija od 10 do 100 µM su doveli do oštećenja DNK u komet testu (Đelić i Anderson, 2003; Dobrzynska i sar., 2004). Koncentracija od 0,15 µM odgovara koncentraciji tiroksina u plazmi eutiroidnih osoba (Ganong, 1995), dok koncentracija od 1,5 µM prevazilazi serumsku koncentraciju tiroksina kod Grejvsove bolesti, poremećaja funkcije tireoidne žlezde, ali je uporediva sa stepenom T<sub>4</sub> u krvi kod akutnog predoziranja (Berkner i sar., 1991). Na osnovu uvida u literaturu, koncentracija tiroksina od 50 µM dovodi do značajnog smanjenja mitotskog indeksa (Đelić i sar., 2006a).

Adrenalin je testiran u koncentracijama 5, 10, 50 i 150 µM. Koncentracija od 0,01 µM odgovara stepenu adrenalina u plazmi tokom intenzivnog stresa kod ljudi (Zouhal i sar., 2008). Po literaturnim podacima, 5 µM adrenalin predstavlja maksimalnu terapijsku dozu kod ljudi (Đelić i sar., 2015). Ostale testirane koncentracije su 2, 10 i 30x veće od maksimalne terapijske doze. Takođe, testirane koncentracije su odgovarale onima koje su korišćene u ranijim ispitivanjima genotoksičnosti adrenalina (Đelić i sar., 2003a; Dobrzynska i sar., 2004; Radaković i sar., 2014).

Estradiol je testiran u koncentracijama 7, 70, 100 i 210 µM. Koncentracija od 7 µM predstavlja maksimalnu terapijsku dozu u humanoj medicini (Đelić i sar., 2006b). Ostale koncentracije su do 30x veće od maksimalne terapijske doze za žene. Koncentracija od 100 µM je korišćena u ranijim ispitivanjima (Cemeli i sar., 2011), gde je izazvala značajna DNK oštećenja u limfocitima i spermiji čoveka merenih komet testom.

DES je testiran u koncentracijama 70, 100, 140 i 210  $\mu\text{M}$ . On je u ranijim ispitivanjima sa komet testom korićen u koncentracijama od 100 i 175  $\mu\text{M}$ , pri kojima je doveo do značajnih oštećenja DNK molekula humanih limfocita i spermatozoida (Dobrzynska i sar., 2004; Cemeli i sar., 2011).

### **3.2.1.3. Antigenotoksični potencijal ekstrakta lista masline**

Pre procene antigenotoksičnog potencijala, testirano je da li ekstrakt lista masline ima sposobnost da izazove oštećenja DNK. Genotoksični efekat DOLE je testiran u tri koncentracije: 0,125 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL. Ove koncentracije ekstrakta su odabrane na osnovu koncentracija koje su se pokazale kao efikasne i bezbedne u ranijim *in vitro* studijama (Lee-Huang i sar., 2003; Turkez i Togar, 2011). Uzorci ćelija su tretirani s DOLE po 30 minuta na 37 °C. U ovom eksperimentu su korišćeni PBS kao negativna kontrola i 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kao pozitivna kontrola.

Antigenotoksični potencijal ekstrakta lista masline u odnosu na DNK oštećenja indukovana hormonima u leukocitima periferne krvi čoveka je ispitivan u dva eksperimentalna protokola: pretretmanu i posttretmanu. Za oba ispitivanja, DOLE je korišćen u tri prethodno odabrane koncentracije (0,125 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1mg/mL).

Pretretman - ćelije su tokom 30 minuta tretirane na 37 °C sa DOLE, isprane fosfatnim puferom, a zatim inkubirane sa svakim od četiri odabrana hormona pojedinačno, takođe na 37 °C u trajanju od 30 minuta.

Posttretman - ćelije su prvo inkubirane sa svakim od testiranih hormona 30 minuta na 37 °C, a nakon ispiranja PBS-om su tretirane na 37 °C u trajanju od 30 minuta sa DOLE.

U oba eksperimentalna protokola, kao negativne kontrole su korišćeni odgovarajući hormoni u odabranoj koncentraciji - 50  $\mu\text{M}$  tiroksin, 10  $\mu\text{M}$  adrenalin, 100  $\mu\text{M}$  estradiol i 100  $\mu\text{M}$  dietilstilbestrol, dok je kao pozitivna kontrola korišćen tretman s kvercetinom. U eksperimentu su korišćene najmanje koncentracije hormona koje su izazivale statistički značajno visok procenat ćelija s oštećenjima DNK nakon 30 minuta inkubacije u poređenju s netretiranim ćelijama, pri čemu je ispunjen kriterijum iz testa vijabilnosti ćelija (preko 90% u tripan plavo testu).

Rezultati ovih eksperimenata su poređeni sa rezultatima dobijenim u eksperimentima gde je kao izazivač oštećenja korišćen poznati oksidans,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U ovim eksperimentima su ćelije pod identičnim uslovima dva eksperimentalna protokola (pretretman i posttretman) tretirane s 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i tri koncentracije DOLE (0,125 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL).

#### **3.2.1.4.      Tretman antioksidansom kvercetinom**

Efekat kvercetina na oštećenja DNK izazvana testiranim hormonima je ispitivan u dva eksperimentalna protokola: pretretmanu i posttretmanu. U ovim eksperimentima, ćelije su tretirane antioksidansom kvercetinom (500  $\mu\text{M}$ ) i svakim od testiranih hormona pojedinačno (50  $\mu\text{M}$  tiroksin, 10  $\mu\text{M}$  adrenalin, 100  $\mu\text{M}$  estradiol i 100  $\mu\text{M}$  dietilstilbestrol). Rastvor kvercetin dihidrata 98% (CAS No 6151-25-3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) u PBS-u koncentracije 500  $\mu\text{M}$  je odabran na osnovu literaturnih podataka (Cemeli i sar., 2004; Đelić i sar., 2015, Vasiljević i sar., 2016; Živković i sar., 2017).

Pretretman - ćelije su tokom 30 minuta inkubirane na 37 °C sa kvercetinom, isprane fosfatnim puferom, a zatim tretirane odabranim koncentracijama svakog od četiri hormona pojedinačno, takođe na 37 °C u trajanju od 30 minuta.

Posttretman - ćelije su prvo tretirane 30 minuta na 37 °C odabranim koncentracijama svakog od četiri hormona pojedinačno, a nakon ispiranja PBS-om su inkubirane na 37 °C u trajanju od 30 minuta sa kvercetinom.

Dobijeni rezultati su poređeni sa podacima dobijenim u eksperimentima gde je kao uzročnik oštećenja korišćen poznati oksidans,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U ovim eksperimentima, ćelije su pod identičnim uslovima dva eksperimentalna protokola (pretretman i posttretman) tretirane sa 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i 500  $\mu\text{M}$  kvercetinom.

#### **3.2.1.5.      Uticaj DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK u prisustvu hormona**

Kako bi proceniti kinetiku reparacije oštećene DNK u prisustvu ekstrakta lista masline u odnosu na oštećenja izazvana hormona tiroksin, adrenalin, estradiol i dietilstilbestrol u leukocitima periferne krvi čoveka *in vitro*, ćelije su tretirane 30 minuta na 37 °C sa odgovarajućim hormonom pojedinačno (50  $\mu\text{M}$  tiroksin, 10  $\mu\text{M}$  adrenalin, 100  $\mu\text{M}$  estradiol i 100  $\mu\text{M}$  dietilstilbestrol), isprane fosfatnim puferom i inkubirane s DOLE (0,5 mg/mL) 15, 30, 45 i 60 minuta, u nezavisnim tretmanima. U eksperimentima sa procenom uticaja DOLE na kinetiku reparacije oštećenja DNK izazvanih hormonima, ekstrakt je korišćen u koncentraciji od 0,5 mg/mL, pošto je ova koncentracija dovela do najvećeg smanjenja procenta oštećenih ćelija u testovima posttretmana sa hormonima.

Ovi rezultati su poređeni sa rezultatima dobijenim u eksperimentima gde su ćelije tretirane 30 minuta na 37 °C sa odgovarajućim hormonom pojedinačno, isprane fosfatnim



puferom, a zatim je procenjen stepen oštećenja DNK u odvojenim vremenskim intervalima od 15, 30, 45 i 60 minuta nakon tretmana hormonom.

Dobijeni rezultati su poređeni sa podacima dobijenim u eksperimentima gde su ćelije tretirane 30 minuta na 37 °C sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isprane fosfatnim puferom, a zatim je evaluiran stepen oštećenja DNK u vremenskim intervalima od 15, 30, 45 i 60 minuta nakon tretmana sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.2.2. Komet test**

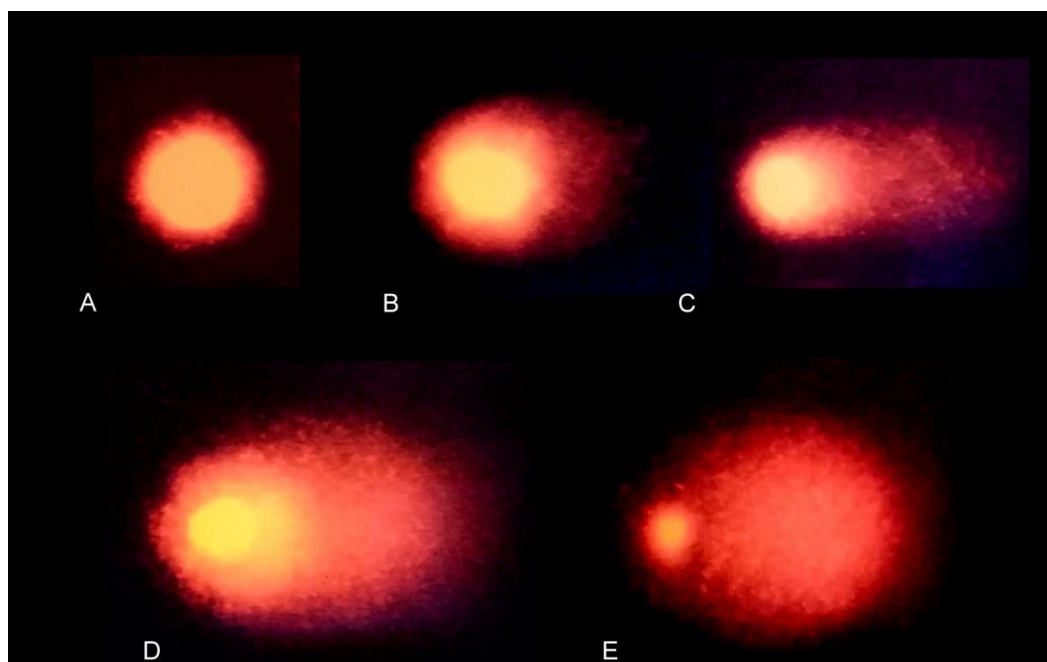
Bazna verzija komet testa je urađena prema protokolu opisanom od Singh i sar. (1988). Pre izvođenja eksperimenata, odmašćene mikroskopske pločice su obložene slojem 1% NMPA, a zatim ostavljene na sobnoj temperaturi minimalno 2-3 dana kako bi se agarozu osušila. Po 6 µL sveže prikupljenih uzoraka periferne krvi je resuspendovano u 100 µL 0,67% LMPA u plastičnim ependorf tubama zapremine 1,5 mL. Nakon mešanja, po 100 µL suspenzije je pipetiranjem preneto na svaku od prethodno pripremljenih staklenih mikroskopskih pločica. Za svakog donora, svi tretmani ćelija su rađeni u duplikatu. Suspenzije ćelija u agarozu su ravnomerno raširene na pločicama stavljanjem pokrovnih stakala, i ostavljene 5 min na 4 °C, da agarozni gel očvrstne. Nakon nežnog uklanjanja pokrovnih stakala, ćelijske suspenzije su izložene odgovarajućim tretmanima. Nakon tretmana, na ćelije je nanet još jedan sloj agaroze (100 µL 0,5% LMPA), stavljena su pokrovna stakla, i ostavljene su ponovo 5 min na 4 °C. Posle pažljivog uklanjanja pokrovnih stakala, pločice su poređane u plastične kivete za mikroskopske preparate, a zatim je u kivete dodat sveže pripremljen i ohlađen lizirajući rastvor (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X100 i 10% DMSO, pH 10, podešen sa NaOH). Uzorci su ostavljeni tokom noći na 4 °C u rastvoru visoke koncentracije deterdženata i soli, kako bi se omogućilo uklanjanje bioloških membrana, citoplazme i nukleoplazme, rastvaranje histona i oslobađanje DNK. Sledećeg dana, pločice su izvađene iz lizirajućeg rastvora, postavljene u kadicu za horizontalnu gel elektroforezu (proizvođač CHU2, povezana sa naponskom jedinicom EPS 601) i pažljivo prelivene hladnim, svežim rastvorom za elektroforezu (10 M NaOH, 200 mM EDTA, pH ≥ 13). Nakon 30 min denaturacije DNK, elektroforeza je obavljena na prethodno podešenom programu (25 V, 300 mA, 30 min). Navedeni koraci su obavljeni u tamnoj prostoriji, da bi se sprečilo dodatno oštećenje DNK pod uticajem UV zračenja. Nakon elektroforeze, pločice su uklonjene iz kadice i ispirane neutrališućim puferom (0,4 M Tris, pH 7,5 prilagođen sa HCl) dva puta, sa vremenskim razmacima od po 10 min. Treće ispiranje je izvršeno destilovanom vodom, nakon čega je na svaku pločicu naneto po 35 µL rastvora

etidijum bromida (20  $\mu\text{g/L}$ ), kako bi se omogućila vizuelizacija ćelija. 15 min nakon nanošenja fluorescentne boje, pristupilo se analizi.

### **3.2.3. Analiza stepena DNK oštećenja**

Nukleoid je struktura koja sadrži genetski materijal poreklom iz nukleusa, a koji nije okružen nukleusnom membranom i ne sadrži nukleoplazmu i histone. Strukture koje podsećaju na komete, poseduju „glavu” (nukleoid) koja sadrži neoštećenu DNK u regionu gde se nalazion nukleus pre tretmana lizirajućim rastvorom, i „rep” koji sadrži DNK fragmente koji su migrirali tokom elektroforeze. Kvantifikacija DNK oštećenja u leukocitima periferne krvi čoveka izvršena je evaluacijom ukupnog broja nukleoida bez i sa različitim stepenom fragmentacije DNK (Slika 12). Po donoru je prebrojano i analizirano ukupno 200 slučajno izabranih nukleoida (po 100 sa svake pločice duplikata). Preparati su analizirani na fluorescentom mikroskopu Olympus BX 50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka), opremljenom živinom lampom HBO (50 W, 516-560 nm Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), na uvećanju 100 $\times$ . Komete su nakon vizuelne analize, u zavisnosti od stepena oštećenja DNK, svrstavane u klase opisane od Anderson i sar. (1994). Na osnovu određene dužine i gustine fragmentisane DNK u “repu”, može se razlikovati 5 klasa kometa:

- klasa A, nukleoidi koji nemaju „rep” (< 5% oštećenja DNK),
- klasa B, nizak stepen oštećenja (5–20%),
- klasa C, srednji stepen oštećenja (20–40%),
- klasa D, visok stepen oštećenja (40–95%), i
- klasa E, potpuno oštećenje DNK (> 95%).



Slika 12. Klasifikovanje kometa vizuelnom procenom u 5 klasa na osnovu količine fragmentovane DNK u repu komete: (A) bez oštećenja, < 5%; (B) nizak stepen oštećenja, 5-20%; (C) srednji stepen oštećenja, 20-40%; (D) visok stepen oštećenja, 40-95%; (E) potpuno oštećenje, > 95%.

Na slici 12 prikazan je izgled nukleoida kod tretiranih ćelija, gde se mogu videti komete sa različitim stepenom migracije DNK fragmenata. Rezultati eksperimenata prikazani su na graficima i u tabelama kao zbir ukupnog oštećenja DNK, koje je okarakterisano kao migracija DNK preko 5% (zbir kometa klase B+C+D+E). Nakon računanja srednje vrednosti duplikata (po dve pločice za svakog donora), ukupni rezultati su dati kroz srednje vrednosti svih 6 donora zbirno, izražene kao procenat ćelija sa DNK oštećenjem  $\pm$  standardna greška (SEM). U testovima genotoksičnosti su dodatno prikazane i dve varijable distribucije DNK oštećenja – procenat ćelija s niskim i srednjim oštećenjem (kategorije kometa B i C), i procenat ćelija s visokim i potpunim oštećenjem (kategorije kometa D i E). Apoptotične i nekrotične ćelije su isključene iz brojanja i analize, a njihovo razlikovanje u odnosu na normalne ćelije je izvršeno prema uputstvima datim od strane Singh-a (2005). Za razliku od normalnih ćelija, kod apoptotičnih i nekrotičnih ćelija nisu uočljive komete. Kod njih je uočljiva gusta centralna zona sa ne baš jasno definisanom granicom i svetlija okolna struktura nalik oreolu (Singh, 2005).

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem kompjuterskog programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, SAD). Rezultati istraživanja su predstavljeni uz pomoć deskriptivnih statističkih parametara, srednje vrednosti  $\pm$  standardne greške, i prikazani su tabelarno ili grafički. Statistička značajnost razlika ispitivanih vrednosti između grupa u odnosu na odgovarajuće kontrole analizirana je jednofaktorijskom analizom varijanse (engl. *One-way ANOVA*) sa Tukey-ovim post-hoc testom, pošto distribucije varijabli nisu odstupale od normalne raspodele. Kao granica statističke značajnosti uzeta je vrednost od  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

### **4.1. ANALIZA STEPENA DNK OŠTEĆENJA**

Analiza genotoksičnog efekta spektra koncentracija hormona tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola izvršena je na leukocitima periferne krvi čoveka primenom komet testa. Pored toga, praćeni su mogući antigenotoksični efekti kvercetina i ekstrakta lista masline, kao i uticaj DOLE na kinetiku reparacije oštećenja DNK izazvanih hormonima. Tokom svakog tretmana, vijabilnost ćelija je proverena testom tripan plavo, i zabeleženo je da je vijabilnost bila veća od 90%, čime su se stekli uslovi za dalja istraživanja.

#### **4.1.1. Genotoksičnost hormona**

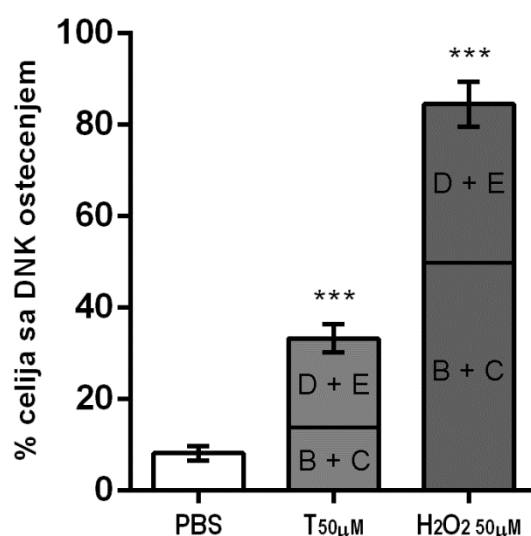
Kako bi se procenio genotoksični efekat, četiri odabrana hormona su pojedinačno ispitana u spektru koncentracija. Na osnovu rezultata dobijenih u analizi genotoksičnog efekta različitih koncentracija testiranih hormona, za dalja ispitivanja je odabrana koncentracija svakog od hormona koja je značajno povećavala procenat ćelija s oštećenjima DNK u odnosu na kontrolu.

##### **4.1.1.1. Genotoksičnost tiroksina**

U tabeli 1 su prikazani rezultati testiranja genotoksičnog efekta tiroksina u leukocitima periferne krvi čoveka. Vrednosti su prikazane kao procenat ćelija sa oštećenjima DNK (zbir kometa klase B+C+D+E), nakon tretmana sa četiri koncentracije tiroksina. Koncentracije tiroksina od 50 i 150  $\mu\text{M}$  su indukovale statistički značajno povećanje procenta ćelija sa oštećenjima DNK u odnosu na netretirane uzorke ( $p < 0,0001$ ).

reagens	PBS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M	tiroksin			
			5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	150 $\mu$ M
procenat oštećenih ćelija (%)	4,79 $\pm$ 0,89	84,5 $\pm$ 4,56***	6 $\pm$ 0,46	9,67 $\pm$ 1,21	33,33 $\pm$ 2,75***	64,5 $\pm$ 4,89***

Tabela 1. Procena genotoksičnog efekta tiroksina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za  $n=6$ . značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p<0,0001$



Grafikon 1. Efekat 50  $\mu$ M tiroksina na stepen oštećenja DNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p<0,0001$

*T<sub>50 $\mu$ M</sub>* – 50  $\mu$ M tiroksin

Na osnovu rezultata ispitivanja genotoksičnog efekta različitih koncentracija tiroksina, za dalja ispitivanja u ovoj studiji je odabrana koncentracija T<sub>4</sub> od 50  $\mu$ M. Na grafikonu 1 su prikazani efekti odabrane koncentracije tiroksina. Značajan stepen DNK oštećenja uočen je kako kod ćelija tretiranih tiroksinom, tako i kod ćelija tretiranih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U ovim eksperimentima, 50  $\mu$ M T<sub>4</sub> je doveo do oštećenja u 33,33% tretiranih ćelija, dok je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doveo do oštećenja DNK u 84,5% tretiranih ćelija. Dve varijable distribucije oštećenja DNK su prikazane na grafikonu 1 – srednja vrednost ćelija s niskim i srednjim stepenom oštećenja (kategorije kometa B i C), i srednja vrednost ćelija s visokim i potpunim oštećenjem (kategorije kometa D i E). Varijable su prikazane u odnosu na ukupan procenat

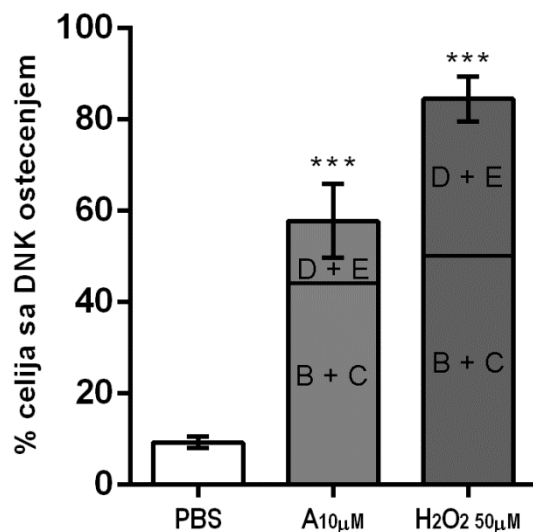
oštećenja DNK izazvan odgovarajućim oksidansom. Nakon tretmana tiroksinom, od ukupnog procenta oštećenih ćelija, 33,63% ćelija je bilo s niskim i srednjim oštećenjem (klase B+C) a 66,37% ćelija je bilo s visokim i potpunim oštećenjem (klase D+E). Nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 64,04% od ukupnog procena oštećenih ćelija je imalo oštećenja iz klasa B i C, dok je 35,96% ćelija imalo oštećenja iz klasa D i E. Može se uočiti da je zastupljenost ćelija sa višim stepenom DNK oštećenja veća u uzorcima tretiranim tiroksinom (66,37%) od uzoraka ćelija tretiranih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35,96%).

#### 4.1.1.2. Genotoksičnost adrenalina

Efekti adrenalina na oštećenja DNK u leukocitima periferne krvi čoveka su sumirani u tabeli 2. Adrenalin je u koncentracijama 10, 50 i 150 μM indukovao statistički značajno povećanje procenta ćelija sa oštećenom DNK u odnosu na netretirane uzorke ( $p < 0,0001$ ), ispoljivši genotoksičan efekat.

reagens	PBS	50μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	adrenalin			
			5 μM	10 μM	50 μM	150 μM
procentat oštećenih ćelija (%)	7,76±2,2	84,5±4,23***	10,15±2,89	57,83±3,4***	84,5±4,32***	92,3±5,64***

Tabela 2. Procena genotoksičnog efekta adrenalina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM za  $n=6$ . značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p < 0,0001$



Grafikon 2. Efekat odabrane koncentracije adrenalina na stepen oštećenja DNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p < 0,0001$

*A<sub>10µM</sub>* – 10  $\mu$ M adrenalin

Na osnovu rezultata genotoksičnosti, za dalja ispitivanja u ovoj studiji je odabrana koncentracija adrenalina od 10  $\mu$ M. Efekti odabrane koncentracije su prikazani na grafikonu 2. Značajan stepen DNK oštećenja u odnosu na kontrolu uočen je kod ćelija tretiranih adrenalinom i kod ćelija tretiranih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adrenalin je doveo do oštećenja u 57,83% tretiranih ćelija, dok je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doveo do oštećenja DNK u 84,5% tretiranih ćelija. Nakon tretmana adrenalinom, od ukupnog procenta oštećenih ćelija, 73,87% ćelija je bilo s niskim i srednjim oštećenjem (klase B+C) a 26,13% ćelija je bilo s visokim i potpunim oštećenjem (klase D+E). Nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 64,04% od ukupnog procenta oštećenih ćelija je imalo oštećenja iz klasa B i C, dok je 35,96% ćelija imalo oštećenja iz klasa D i E. Može se uočiti da je nakon tretmana adrenalinom i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod oba oksidansa veća zastupljenost ćelija s niskim i srednjim oštećenjem.

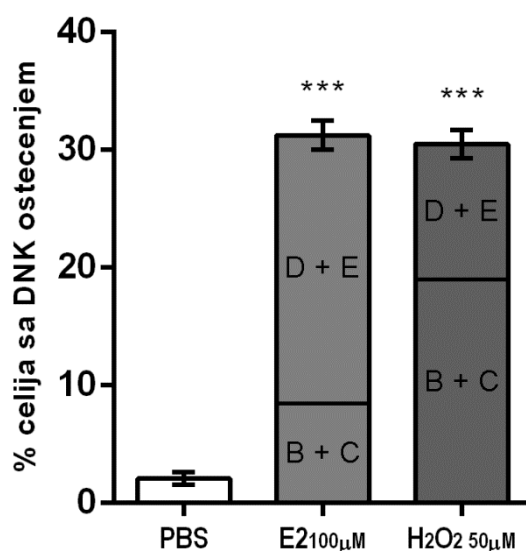
#### 4.1.1.3. Genotoksičnost estradiola

U tabeli 3 su prikazani efekti estradiola na oštećenja DNK u leukocitima periferne krvi čoveka. Genotoksičan efekat estradiola je ispoljen pri koncentracijama od 100 i 210  $\mu$ M, pošto su one dovele do statistički značajnog porasta procenta ćelija s oštećenjima DNK u odnosu na netretirane uzorke ( $p < 0,0001$ ).



reagens	PBS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M	estradiol			
			7 $\mu$ M	70 $\mu$ M	100 $\mu$ M	210 $\mu$ M
procenat oštećenih ćelija (%)	3,09 $\pm$ 0,94	30,5 $\pm$ 2,4***	2,5 $\pm$ 0,35	8,5 $\pm$ 2,74	31,25 $\pm$ 2,85***	39,5 $\pm$ 3,12***

Tabela 3. Procena genotoksičnog efekta 17 $\beta$ -estradiola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za  $n=6$ . značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p<0,0001$



Grafikon 3. Efekat odabrane koncentracije estradiola na stepen oštećenja DNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p<0,0001$

*E2<sub>100 $\mu$ M</sub> - 100 $\mu$ M estradiol*

Na osnovu rezultata dobijenih u analizi genotoksičnosti različitih koncentracija estradiola, za dalja ispitivanja je odabrana koncentracija od 100  $\mu$ M. Efekti odabrane koncentracije estradiola su prikazani na grafikonu 3. Značajan stepen oštećenja DNK u odnosu na kontrolu uočen je i kod ćelija tretiranih hormonom i kod ćelija tretiranih sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p<0,0001$ ). Estradiol se pokazao kao efikasan u izazivanju oštećenja na DNK molekulu u 31,25% tretiranih ćelija, dok je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doveo do oštećenja DNK u 30,5% tretiranih ćelija. Nakon tretmana estradiolom, od ukupnog procenta oštećenih ćelija, 21,55% ćelija je bilo s

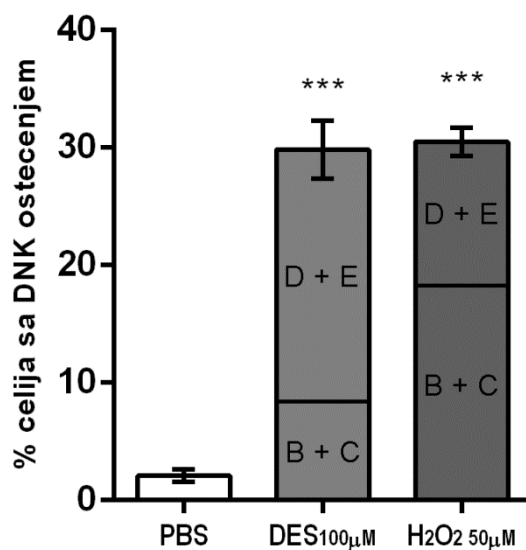
niskim i srednjim oštećenjem (klase B+C), a 78,45% ćelija je bilo s visokim i potpunim oštećenjem (klase D+E). Nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 64,04% od ukupnog procena oštećenih ćelija je imalo oštećenja iz klasa B i C, dok je 35,96% ćelija imalo oštećenja iz klasa D i E. Uočljiva je zastupljenost ćelija sa višim stepenom DNK oštećenja veća u uzorcima tretiranim estradiolom (78,45%) od uzoraka ćelija tretiranih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35,96%).

#### 4.1.1.4. Genotoksičnost DES

Efekti dietilstilbestrola na oštećenja DNK u leukocitima periferne krvi čoveka su sumirani u tabeli 4. DES je u koncentracijama od 100, 140 i 200 μM indukovao statistički značajno ( $p < 0,0001$ ) povećanje procenta ćelija sa DNK oštećenjima u odnosu na netretirane uzorke, ispoljivši genotoksičan efekat.

reagens	PBS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50μM	dietilstilbestrol			
			70 μM	100 μM	140 μM	210 μM
procenat oštećenih ćelija (%)	3,86±1,29	30,5±1,45***	7,5±2,8	29,83±2,36***	33,23±1,89***	43,5±2,1***

Tabela 4. Procena genotoksičnog efekta dietilstilbestrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM za  $n=6$ . značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p < 0,0001$



Grafikon 4. Efekat odabrane koncentracije dietilstilbestrola na stepen oštećenja DNK. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p < 0,0001$

*DES<sub>100µM</sub> – 100 µM dietilstilbestrol*

Na osnovu rezultata ispitivanja genotoksičnosti dietilstilbestrola, za korišćenje u ostalim eksperimentima je odabrana koncentracija od 100 µM. Efekti odabrane koncentracije DES-a su prikazani na grafikonu 4. Značajan stepen oštećenja DNK ( $p < 0,0001$ ) uočen je i kod ćelija koje su tretirane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kod onih tretiranih DES-om. Rezultati pokazuju da je DES uzrokovao oštećenja na DNK molekulu u 29,83% tretiranih ćelija, dok je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doveo do oštećenja DNK u 30,5% tretiranih ćelija. Nakon tretmana DES-om, od ukupnog procenta oštećenih ćelija, 23,97% ćelija je bilo s niskim i srednjim oštećenjem (klase B+C), a 76,03% ćelija je bilo s visokim i potpunim oštećenjem (klase D+E). Nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 64,04% od ukupnog procenta oštećenih ćelija je imalo oštećenja iz klasa B i C, dok je 35,96% ćelija imalo oštećenja iz klasa D i E. Očigledno da je stepen migracije DNK u ćelijama tretiranim DES-om (76,03%) viši nego kod onih koje su tretirane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35,96%).

#### 4.1.2. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana hormonima

Rezultati ispitivanja genotoksičnosti suvog ekstrakta lista masline prikazani su u tabeli 5. Ispitana je sposobnost ekstrakta da u koncentracijama od 0,125 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL indukuje DNK oštećenja u leukocitima periferne krvi čoveka (zbir kometa klase

B+C+D+E). Dobijeni rezultati pokazuju da ispitivane koncentracije nisu značajno povećale procenat ćelija sa DNK oštećenjima u odnosu na netretirane ćelije.

reagens	PBS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 $\mu$ M	DOLE		
			0,125 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL
procenat oštećenih ćelija (%)	2,5 $\pm$ 0,32	19 $\pm$ 1,2***	4,67 $\pm$ 0,8	3,33 $\pm$ 0,25	3,67 $\pm$ 0,49

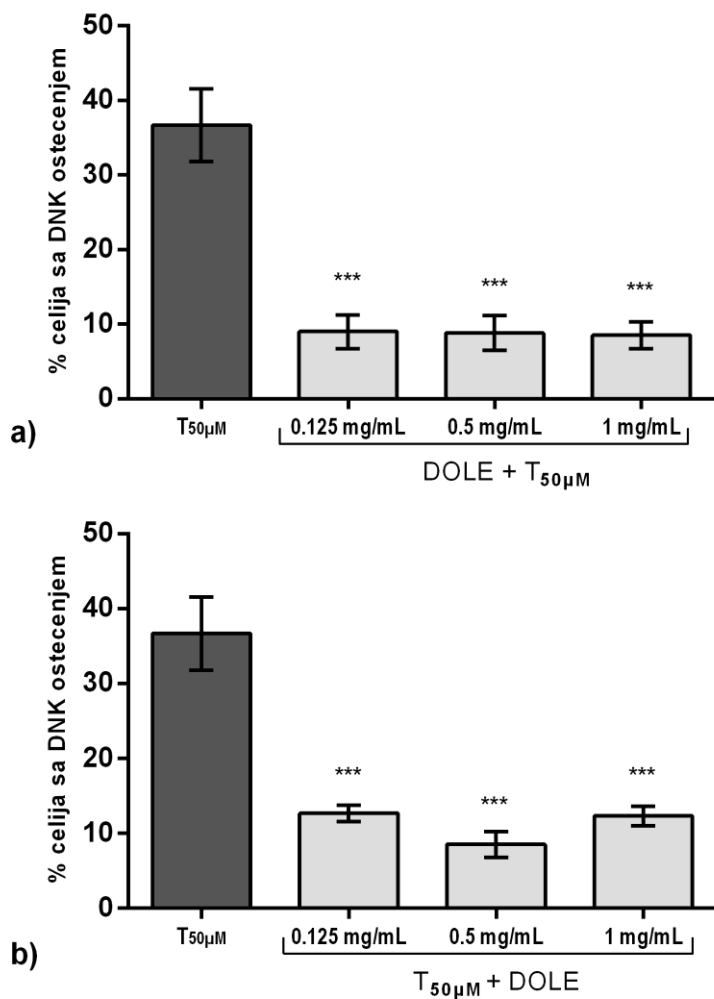
Tabela 5. Procena genotoksičnog efekta suvog ekstrakta lista masline. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za n=6. značajna razlika u odnosu na PBS, \*\*\*  $p < 0,0001$

*DOLE - suvi ekstrakt lista masline*

#### 4.1.2.1. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana tiroksinom

Rezultati efekta DOLE na procenat ćelija sa oštećenjima DNK izazvanih tiroksinom u pretretmanu su prikazani na grafikonu 5a. Najveći procenat ćelija sa oštećenjem DNK (zbir kometa klase B+C+D+E) je zabeležen u tretmanu s tiroksinom (36,67%). Uočljivo je da DOLE poseduje statistički značajan zaštitni efekat ( $p < 0,0001$ ) u sve tri korišćene koncentracije, ali da nema zavisnosti između koncentracije ekstrakta i njegovog efekta na DNK oštećenja izazvana tiroksinom (50  $\mu$ M). Procenat oštećenih ćelija, inkubiranih sa DOLE i nakon toga tiroksinom, je iznosio 4,25% za 0,125 mg/mL, 4,42% za 0,5 mg/mL i 3,58% za 1 mg/mL.

Na grafikonu 5b su prikazani rezultati efekta DOLE na procenat ćelija sa oštećenjima DNK izazvanih tiroksinom u posttretmanu. Procenat DNK oštećenja je značajno snižen ( $p < 0,0001$ ) dodatkom DOLE nakon tretmana hormonom primenom sve tri koncentracije ekstrakta. Rezultati pokazuju da je procenat ćelija s DNK oštećenjima iznosio 12,67% pri 0,125 mg/mL, 8,5% pri 0,5 mg/mL i 12,33% pri 1 mg/mL, pri čemu ne postoji zavisnost efekta od primenjene koncentracije ekstrakta.



Grafikon 5. Efekat ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana tiroksinom u a) pretretmanu (*DOLE + T<sub>50µM</sub>*) i b) posttretmanu (*T<sub>50µM</sub> + DOLE*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. značajna razlika u odnosu na T<sub>50µM</sub>, \*\*\* *p*<0,0001

*T<sub>50µM</sub>* – 50 µM tiroksin

*DOLE* - suvi ekstrakt lista masline

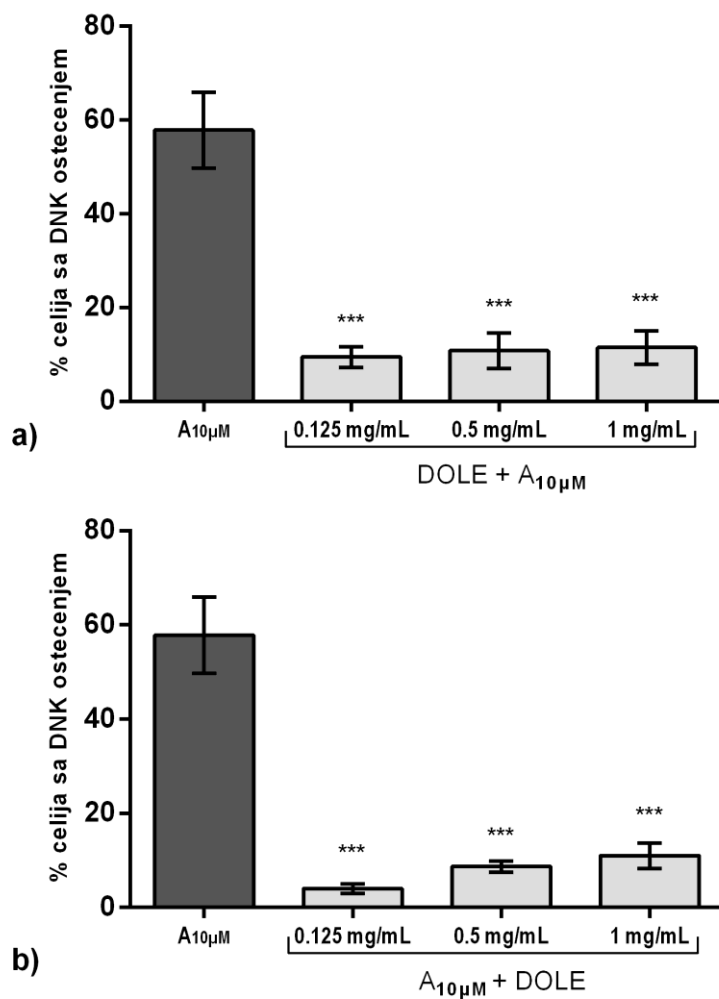
Poređenjem antigenotoksičnog efekta svih koncentracija ekstrakta u oba eksperimentalna protokola, uočljivo je da je efekat primene DOLE u pretretmanu na redukciju oštećenja DNK bio veći nego u posttretmanu, mada statistička značajnost između vrednosti dobijenih u pretretmanu i posttretmanu nije registrovana.

#### 4.1.2.2. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana adrenalinom

Efekti DOLE na DNK oštećenja izazvana adrenalinom u pretretmanu su predstavljeni na grafikonu 6a. Najveći procenat ćelija periferne krvi s oštećenjima DNK je zabeležen u tretmanu sa adrenalinom, 57,83%. Inkubacija ćelija s DOLE u pretretmanu je značajno smanjila ( $p < 0,0001$ ) procenat oštećenja DNK u odnosu na tretman adrenalinom u svim primenjenim koncentracijama ekstrakta, i iznosio je 9,5% za 0,125 mg/mL, 10,83% za 0,5 mg/mL i 11,5% za 1 mg/mL.

Rezultati efekta DOLE na procenat ćelija sa oštećenjima DNK izazvanih adrenalinom u posttretmanu su prikazani na grafikonu 6b. Procenat ćelija sa oštećenjem DNK tretiranih sa adrenalinom i nakon toga s DOLE je značajno smanjen ( $p < 0,0001$ ) dodatkom ekstrakta u sve tri koncentracije, i iznosio je 3,5% za 0,125 mg/mL, 9,5% za 0,5 mg/mL i 12,5% za 1 mg/mL.

Ako se uporedi antigenotoksični efekat svih koncentracija ekstrakta u oba eksperimentalna protokola, primetno je da je primena DOLE u posttretmanu smanjila procenat ćelija s DNK oštećenjima više nego u pretretmanu, mada statistička značajnost nije registrovana.



Grafikon 6. Efekat ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana adrenalinom u a) pretretmanu (*DOLE + A<sub>10µM</sub>*) i b) posttretmanu (*A<sub>10µM</sub> + DOLE*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. značajna razlika u odnosu na *A<sub>10µM</sub>*, \*\*\*  $p < 0,0001$

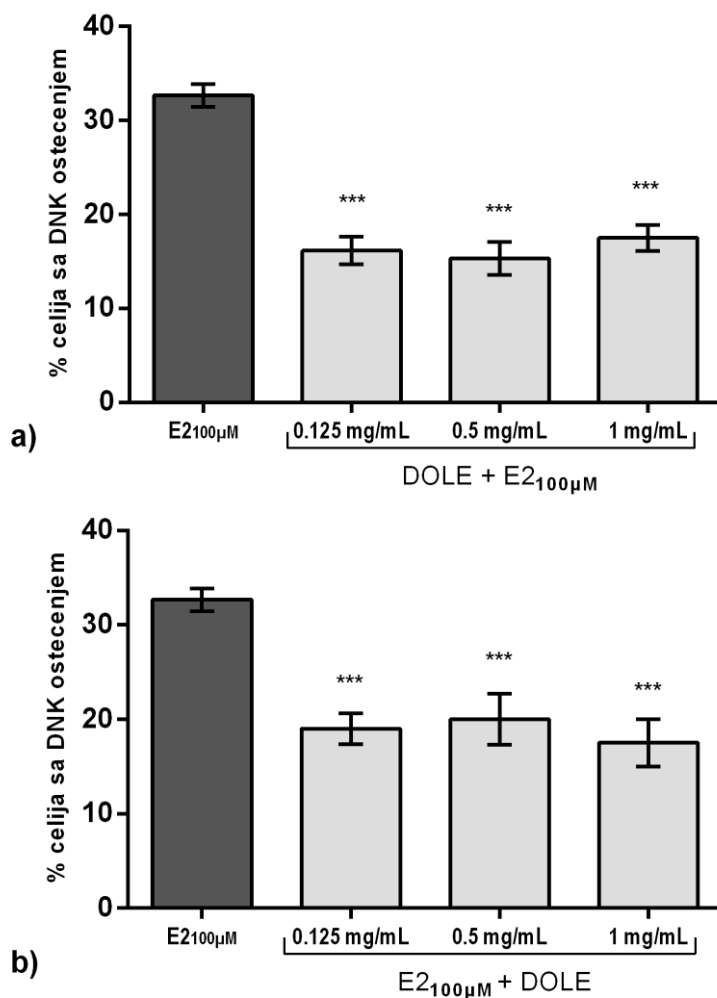
*A<sub>10µM</sub>* - 10µM adrenalin

*DOLE* - suvi ekstrakt lista masline

#### 4.1.2.3. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana estradiolom

Efekti ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana 17β-estradiolom u pretretmanu su prikazani na grafikonu 7a. Uočljivo je da je najviše ćelija pretrpelo oštećenje DNK u tretmanu estradiolom (100 µM), 32,67%. Dodavanje ekstrakta lista masline pre tretmana estradiolom je značajno smanjilo procenat ćelija sa oštećenjima DNK ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na tretman estradiolom. Procenat oštećenih ćelija inkubiranih sa DOLE pre njihovog

tretmana estradiolom je smanjen u sve tri koncentracije ekstrakta, i iznosio je 16,17% za 0,125 mg/mL, 15,33% za 0,5 mg/mL i 17,5% za 1 mg/mL.



Grafikon 7. Efekat ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana estradiolom u a) pretretmanu (*DOLE + E2<sub>100µM</sub>*) i b) posttretmanu (*E2<sub>100µM</sub> + DOLE*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na E2<sub>100µM</sub>, \*\*\*  $p < 0,0001$

*E2<sub>100µM</sub>* - 100µM estradiol

*DOLE* - suvi ekstrakt lista masline

Na grafikonu 7b su prikazani rezultati efekta DOLE na ćelije sa oštećenjima DNK izazvanih estradiolom, u posttretmanu. Procenat oštećenja DNK je značajno smanjen ( $p < 0,0001$ ) dodatkom DOLE nakon tretmana estradiolom u svim koncentracijama ekstrakta, i iznosio je 19% za 0,125 mg/mL, 20% za 0,5 mg/mL i 17,5% za 1 mg/mL.



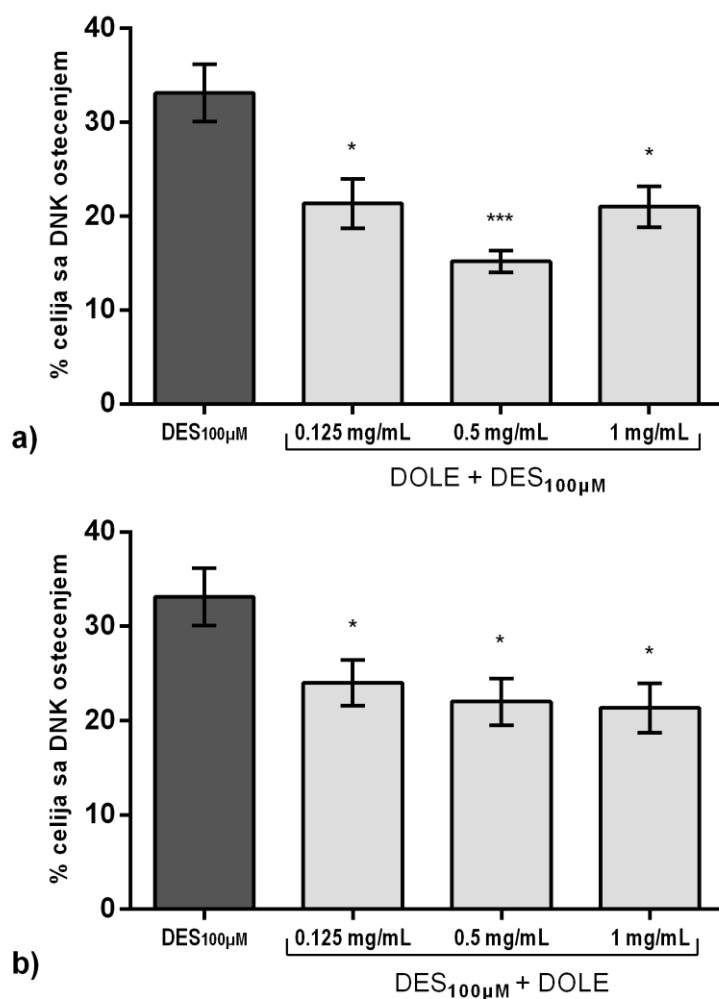
Poređenjem antigenotoksičnog efekta svih koncentracija ekstrakta u oba eksperimentalna protokola, uočljivo je da je primena DOLE u pretretmanu dovela do većeg smanjenja procenta ćelija s DNK oštećenjima izazvanih estradiolom nego u posttretmanu, iako statistička značajnost između vrednosti dobijenih u pretretmanu i posttretmanu ni u ovom slučaju nije registrovana.

#### **4.1.2.4. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana dietilstilbestrolom**

Procenat ćelija sa DNK oštećenjima izazvanim dietilstilbestrolom u pretretmanu sa DOLE je prikazan na grafikonu 8a. Najveći procenat ćelija sa DNK oštećenjima je registrovan u tretmanu s dietilstilbestrolom (33,13%). Uočljivo je da ekstrakt poseduje statistički značajan zaštitni efekat u svim korišćenim koncentracijama ( $p < 0,0001$ ). Procenat oštećenih ćelija inkubiranih s DOLE pre njihovog tretmana DES-om iznosio je 21% pri koncentraciji od 1 mg/mL, 15,17% pri 0,5 mg/mL i 21,33% pri 0,125 mg/mL.

Efekti ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana DES-om u posttretmanu prikazani su na grafikonu 8b. Procenat ćelija sa DNK oštećenjima je značajno smanjen ( $p < 0,0001$ ) dodavanjem DOLE nakon tretmana DES-om (100  $\mu$ M). Procenat oštećenih ćelija tretiranih s DES i nakon toga s DOLE je iznosio 24% za 0,125 mg/mL, 22% za 0,5 mg/mL i 21,33% za 1 mg/mL.

Kao i kod estradiola, i kod njegovog sintetičkog analoga DES-a, poređenjem efikasnosti sve tri koncentracije ekstrakta u oba eksperimentalna protokola, može se konstatovati da je primena DOLE u pretretmanu u većem procentu smanjila oštećenja DNK nego u posttretmanu, mada ni ovde statistička značajnost između vrednosti dobijenih u pretretmanu i posttretmanu nije registrovana.



Grafikon 8. Efekat ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana dietilstilbestroom u a) pretretmanu (*DOLE* + *DES<sub>100µM</sub>*) i b) posttretmanu (*DES<sub>100µM</sub>* + *DOLE*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. značajna razlika u odnosu na *DES<sub>100µM</sub>*, \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*  $p < 0,01$

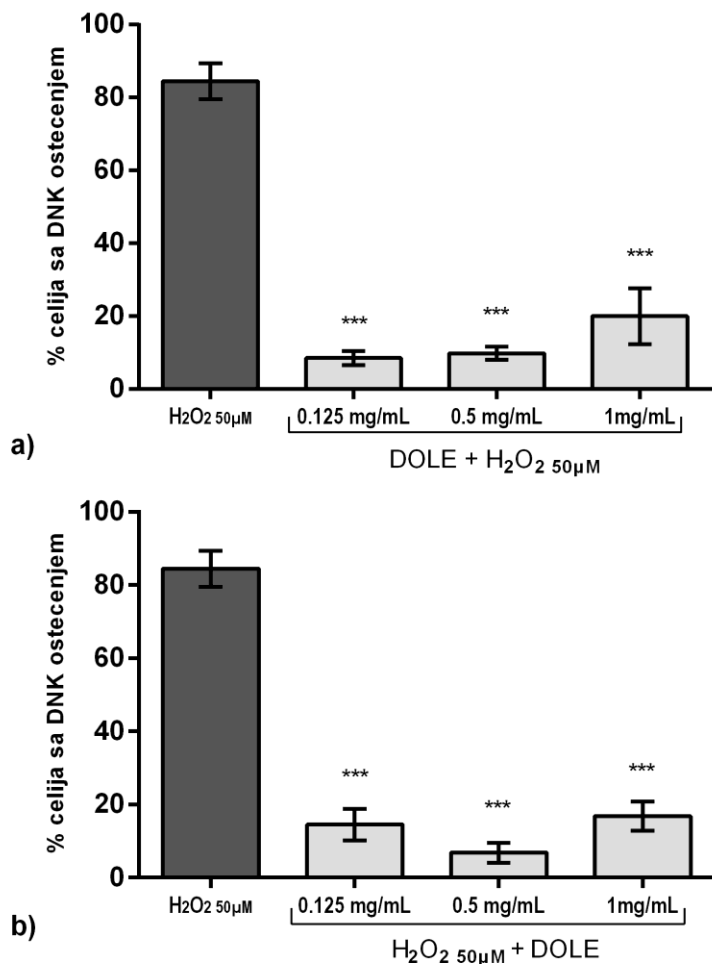
*DES<sub>100µM</sub>* – 100 µM dietilstilbestrol

*DOLE* - suvi ekstrakt lista masline

#### 4.1.2.5. Efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Rezultati efekta DOLE na oštećenja DNK izazvanih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) u pretretmanu su predstavljeni na grafikonu 9a. Najviše ćelija periferne krvi je pretrpelo oštećenja DNK u tretmanu sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 84,5% (zbir kometa klase B+C+D+E). Pretretman s DOLE je značajno

smanjio ( $p < 0,0001$ ) procenat ćelija s oštećenjima DNK u odnosu na tretman  $H_2O_2$ . Procenat oštećenih ćelija, inkubiranih s DOLE i nakon toga  $H_2O_2$ , je smanjen u sve tri koncentracije ekstrakta, i iznosio je 8,5% za 0,125 mg/mL, 9,83% za 0,5 mg/mL i 20% za 1 mg/mL.



Grafikon 9. Efekat ekstrakta lista masline na DNK oštećenja izazvana  $H_2O_2$  u a) pretretmanu ( $DOLE + H_2O_2$  50 $\mu$ M) i b) posttretmanu ( $H_2O_2$  50 $\mu$ M +  $DOLE$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na  $H_2O_2$  50 $\mu$ M, \*\*\*  $p < 0,0001$

$H_2O_2$  50 $\mu$ M – 50 $\mu$ M vodonik-peroksid

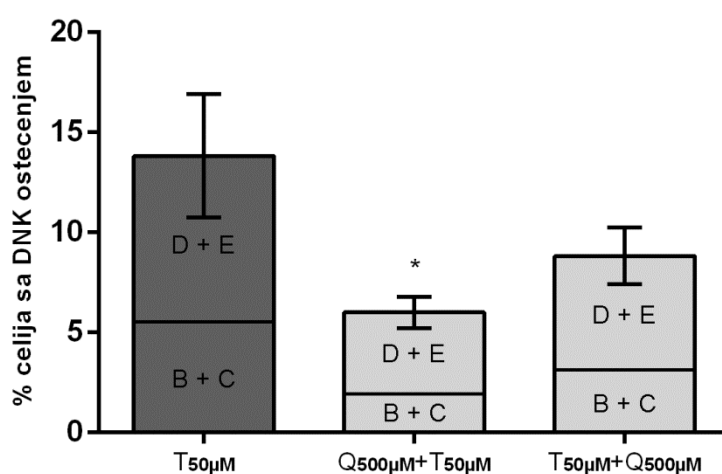
$DOLE$  - suvi ekstrakt lista masline

Efekti ekstrakta  $DOLE$  na DNK oštećenja izazvana  $H_2O_2$  u posttretmanu su prikazani na grafikonu 9b. Procenat ćelija sa oštećenjem DNK tretiranih sa  $H_2O_2$  i nakon toga s  $DOLE$  je značajno smanjen ( $p < 0,0001$ ) dodatkom ekstrakta u sve tri koncentracije, i iznosio je 14,5% za 0,125 mg/mL, 6,83% za 0,5 mg/mL i 16,83% za 1 mg/mL.

Poređenjem antigenotoksičnog efekta sve tri koncentracije ekstrakta u oba eksperimentalna protokola, primetno je da je DOLE u posttretmanu smanjio procenat ćelija s DNK oštećenjima izazvanih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u većem stepenu nego u pretretmanu, mada bez statističke značajnosti.

#### 4.1.3. Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana hormonima

##### 4.1.3.1. Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana tiroksinom



Grafikon 10. Efekat kvercetina na DNK oštećenja izazvana tiroksinom u dva eksperimentalna protokola: pretretman ( $Q_{500\mu M} + T_{50\mu M}$ ) i posttretman ( $T_{50\mu M} + Q_{500\mu M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na  $T_{50\mu M}$ , \*  $p < 0,01$

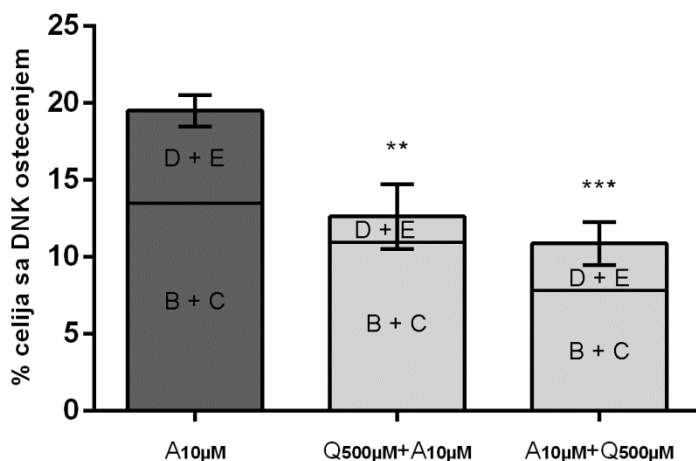
$T_{50\mu M}$  - 50  $\mu M$  tiroksin

$Q_{500\mu M}$  - 500  $\mu M$  kvercetin

Efekat kvercetina na oštećenja DNK molekula izazvana tiroksinom je prikazan na grafikonu 10. Na njemu je uočljivo da je kvercetin značajno smanjio ( $p < 0,01$ ) procenat ćelija sa oštećenjem DNK (zbir kometa klase B+C+D+E) u pretretmanu (6%), dok u posttretmanu nije doveo do značajnog smanjenja procenta ćelija sa DNK oštećenjima (8,83%) u odnosu na tiroksin (13,83%). Na grafikonu 10 je predstavljena zastupljenost ćelija s malim i srednjim stepenom oštećenja (klase B+C), kao i onih s visokim i totalnim oštećenjem (klase D+E) u odnosu na ukupan procenat ćelija sa oštećenjima DNK molekula. Uočljiv je veći procenat ćelija s visokim i totalnim oštećenjem DNK u svim tretmanima. Migracija DNK u ćelijama

tretiranim sa tiroksinom je bila 66,27% u kategorijama D i E, dok je u ćelijama kojima je dodat kvercetin u pretretmanu to iznosilo 62,5% i 60,38% u posttretmanu.

#### 4.1.3.2. Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana adrenalinom



Grafikon 11. Efekat kvercetina na DNK oštećenja izazvana adrenalinom u dva eksperimentalna protokola: pretretman ( $Q_{500\mu M} + A_{10\mu M}$ ) i posttretman ( $A_{10\mu M} + Q_{500\mu M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na  $A_{10\mu M}$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$

$A_{10\mu M}$  - 10  $\mu M$  adrenalin

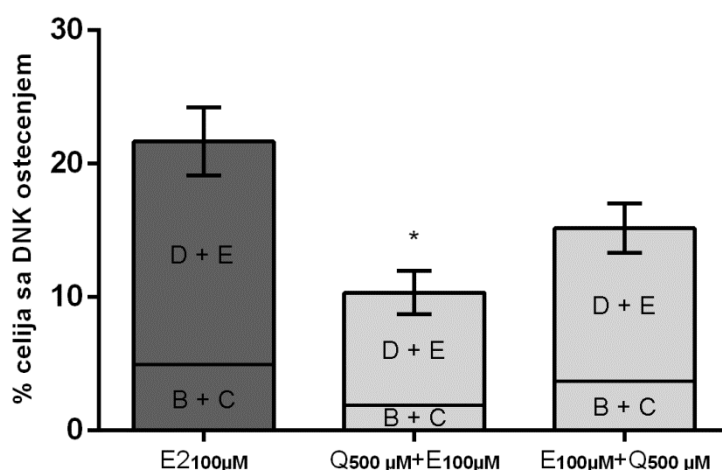
$Q_{500\mu M}$  - 500  $\mu M$  kvercetin

Na grafikonu 11 su prikazani efekti kvercetina na DNK oštećenja izazvana adrenalinom. Tretman kvercetinom je značajno smanjio ( $p < 0,0001$ ) procenat oštećenja DNK (zbir kometa klase B+C+D+E) u odnosu na tretman adrenalinom (19,5%), i iznosio je 12,63% u pretretmanu i 8,78% u posttretmanu. Statistička značajnost između vrednosti pre i posttretmana nije konstatovana. Na grafikonu 11 je prikazan stepen DNK oštećenja u tretiranim ćelijama, izražen sa dve varijable distribucije oštećenja DNK. U odnosu na ukupan procenat ćelija sa oštećenjima DNK molekula, u svim tretmanima je registrovano više ćelija s malim i srednjim oštećenjem (klase B+C) - 79,03% kod ćelija tretiranih adrenalinom, 97,8% u pretretmanu i 68,4% u posttretmanu kvercetinom.

Treba napomenuti da je adrenalin jedini uzročnik oštećenja DNK kod koga su rezultati dobijeni u eksperimentalnom tretmanu kvercetinom imali drukčiji trend u odnosu na ostale oksidanse, odnosno u ovom tretmanu je procenat oštećenih ćelija niži u posttretmanu,

nego u pretretmanu. Pored toga, u pre i posttretmanu kvercetinom u odnosu na adrenalin, detektovan je znatno veći udeo oštećenja B i C klasa kometa u odnosu na ukupan procenat ćelija s oštećenjima DNK.

#### 4.1.3.3. Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana estradiolom



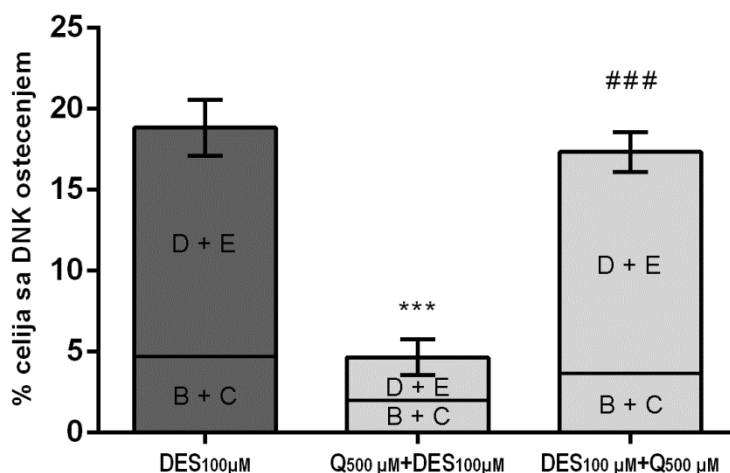
Grafikon 12. Efekat kvercetina na DNK oštećenja izazvana estradiolom u dva eksperimentalna protokola: pretretman ( $Q_{500\mu M} + E_{2100\mu M}$ ) i posttretman ( $E_{2100\mu M} + Q_{500\mu M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na  $E_{2100\mu M}$ , \*  $p < 0,01$

$E_{2100\mu M}$  - 100 µM estradiol

$Q_{500\mu M}$  - 500 µM kvercetin

Efekat kvercetina na oštećenja DNK molekula izazvana estradiolom je prikazan na grafikonu 12. Procenat ćelija sa oštećenjem DNK nakon tretmana estradiolom je bio 21,67%. Tretman kvercetinom pre dodavanja estradiola je značajno smanjio ( $p < 0,01$ ) stepen oštećenja izazvanih hormonom (10,33%), dok dodavanje kvercetina nakon tretmana hormonom nije dovelo do značajnog smanjenja stepena oštećenja, i iznosilo je 15,17%. Statistička značajnost efekta kvercetina u pre i posttretmanu nije konstatovana. U svim tretmanima je uočeno više ćelija s visokim i totalnim oštećenjem DNK. U ćelijama tretiranim sa E2 je u kategorijama D i E bilo njih 86,66%, dok je u ćelijama kojima je dodat kvercetin u pretretmanu bilo 90,32% ćelija i 82,42% u posttretmanu. Inkubacija s kvercetinom je pokazala statistički značajno bolji efekat u odnosu na najmanju i najveću koncentraciju DOLE u pretretmanu u odnosu na estradiol.

#### 4.1.3.4. Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana dietilstilbestrolom



Grafikon 13. Efekat kvercetina na DNK oštećenja izazvana dietilstilbestrolom u dva eksperimentalna protokola: pretretman ( $Q_{500\mu M} + DES_{100\mu M}$ ) i posttretman ( $DES_{100\mu M} + Q_{500\mu M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \*\*\* značajna razlika u odnosu na  $DES_{100\mu M}$ ; značajna razlika u odnosu na  $Q_{500\mu M}+DES_{100\mu M}$ , ###  $p<0,0001$

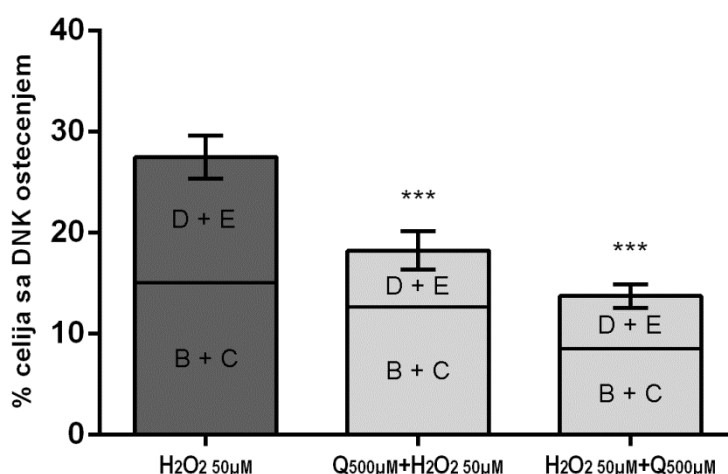
*DES<sub>100µM</sub> - 100 µM dietilstilbestrol*

*Q<sub>500µM</sub> - 500 µM kvercetin*

Na grafikonu 13 su prikazani efekti kvercetina na DNK oštećenja izazvana dietilstilbestrolom. Dobijene vrednosti pokazuju da je kvercetin doveo do značajnog smanjenja ( $p<0,0001$ ) procenta ćelija sa oštećenjima DNK izloženih DES-u (18,83%). U pretretmanu je registrovano 4,67% oštećenih ćelija, dok u posttretmanu statistička značajnost nije registrovana u odnosu na oštećenja izazvana DES-om (17,33% oštećenih ćelija). Razlika u vrednostima između procenta ćelija sa oštećenjem DNK izazvanih DES-om, u odnosu na procenat ćelija u pre i posttretmanu s kvercetinom je bila statistički značajna ( $p<0,0001$ ). U odnosu na ukupan procenat ćelija sa oštećenjima DNK molekula, u svim tretmanima je registrovano više ćelija s visokim i totalnim oštećenjem (klase D+E) - 84,27% kod ćelija tretiranih DES-om, 64,29% u pretretmanu i 83,65% u posttretmanu kvercetinom. Inkubacija s kvercetinom je pokazala statistički značajno bolji efekat u odnosu na sve tri koncentracije DOLE u pretretmanu u odnosu na DES.

#### 4.1.3.5. Efekti kvercetina na oštećenja DNK izazvana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Na grafikonu 14 su prikazani efekti kvercetina na DNK oštećenja izazvana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kvercetin je doveo do značajnog smanjenja ( $p < 0,0001$ ) procenta ćelija s oštećenjima DNK izazvanih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (27,5%) u oba eksperimentalna protokola, i iznosio je 18,25% u pretretmanu i 13,75% u posttretmanu. Statistička značajnost između efekta kvercetina u dva eksperimentalna protokola nije registrovana. Migracija DNK u ćelijama tretiranim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je bila 54,1% u kategorijama D i E, dok je u ćelijama kojima je dodat kvercetin u pretretmanu to iznosilo 39,4% i 34% u posttretmanu.



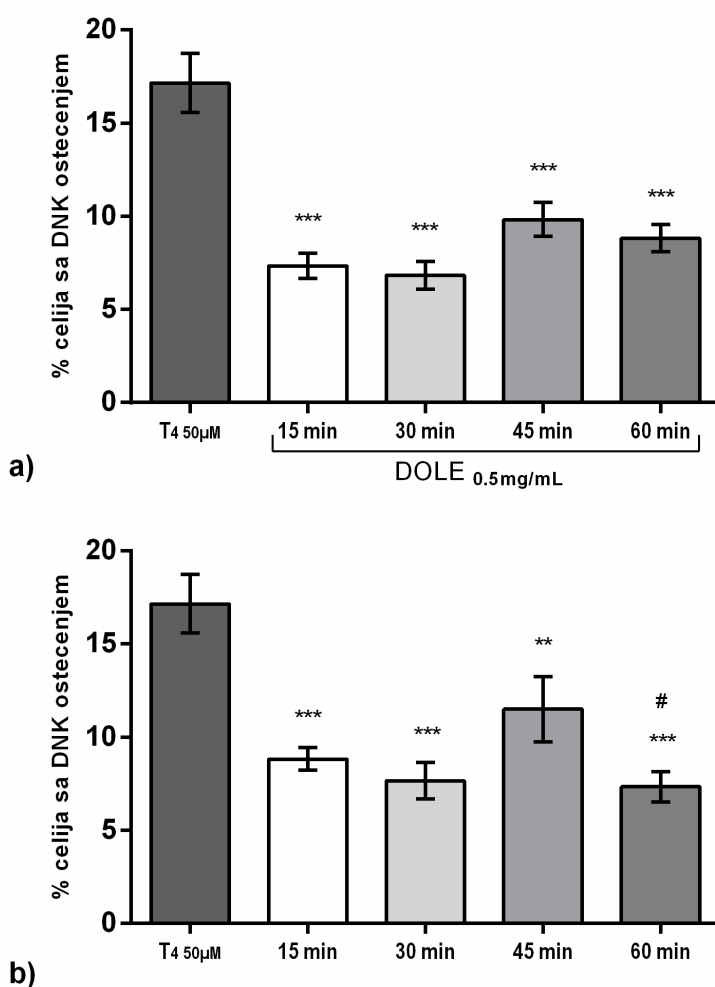
Grafikon 14. Efekat kvercetina na DNK oštećenja izazvana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u dva eksperimentalna protokola: pretretman (Q<sub>500µM</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50µM) i posttretman (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50µM + Q<sub>500µM</sub>). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. značajna razlika u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50µM, \*\*\*  $p < 0,0001$   
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50µM – 50 µM vodonik peroksid  
Q<sub>500µM</sub> - 500 µM kvercetin

#### 4.1.4. Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana hormonima

##### 4.1.4.1. Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana tiroksinom



Na grafikonu 15a je prikazana sposobnost DOLE da utiče na smanjenje DNK oštećenja izazvanih tiroksinom u vremenskim intervalima 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s hormonom. Tiroksin (50  $\mu$ M) je izazvao oštećenja DNK u 17,17% tretiranih ćelija (zbir kometa klasa B+C+D+E). Inkubacija s DOLE je značajno smanjila ( $p<0,0001$ ) oštećenja DNK uzrokovanih tiroksinom u svim merenim vremenskim intervalima. Procenat oštećenih ćelija je iznosio 7,33% nakon inkubacije 15 min sa DOLE, 6,83% nakon 30 min, 9,83% nakon 45 min i 8,83% 60 min nakon inkubacije s DOLE.



Grafikon 15. Vremenska dinamika reparacije oštećenja DNK u ćelijama 15, 30, 45 i 60 min nakon izlaganja tiroksinu a) u prisustvu DOLE, b) bez prisustva DOLE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na T<sub>4</sub>, \*\*\*  $p<0,0001$ , \*\*  $p<0,001$ ; značajna razlika u odnosu na 45 min, #  $p<0,01$

T<sub>4</sub> 50 $\mu$ M - 50  $\mu$ M tiroksin

DOLE 0,5 mg/mL - suvi ekstrakt lista masline

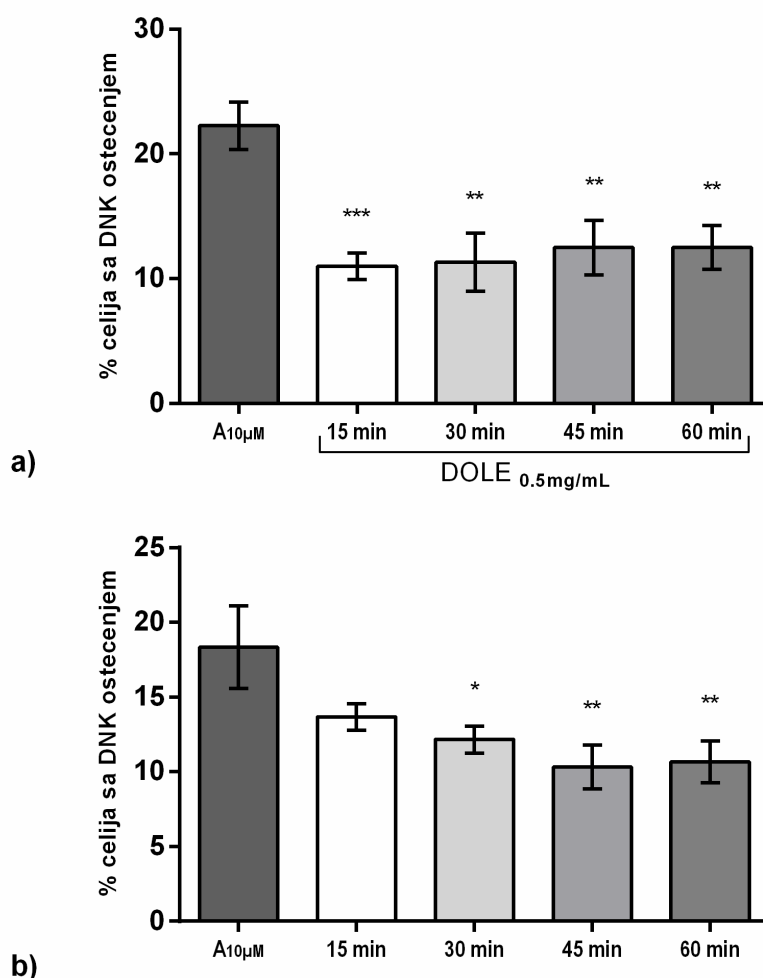
Sposobnost ćelija da isprave oštećenja DNK posle 15, 30, 45 i 60 min od tretmana s tiroksinom prikazana je na grafikonu 15b. Uočljivo je da su vrednosti statistički značajno niže ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na procenat oštećenja DNK izazvanih tiroksinom (17,17%) u svim merenim vremenskim intervalima. Procenat oštećenih ćelija nakon tretmana s tiroksinom je bio 8,83% (nakon 15 min), 7,67% (nakon 30 min), 11,5% (nakon 45 min) i 7,33% (nakon 60 min). 60 min nakon tretmana s tiroksinom je došlo do statistički značajnog ( $p < 0,01$ ) pada broja ćelija s oštećenjima DNK u odnosu na 45 min.

Poredeći rezultate reparacije oštećenja DNK u ćelijama izloženim tiroksinu, primetno je da su u uzorcima koji su inkubirani s DOLE dobijene vrednosti niže u svim vremenskim intervalima nego kod ćelija koje nisu. Statistička značajnost između rezultata ova dva eksperimenta nije registrovana. Takođe je uočljivo da je trend zastupljenosti oštećenja DNK isti u oba eksperimenta.

#### **4.1.4.2. Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana adrenalinom**

Sposobnost DOLE da utiče na smanjenje DNK oštećenja izazvanih adrenalinom u vremenskim intervalima 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana hormonom je prikazan na grafikonu 16a. Adrenalin (10  $\mu$ M) je izazvao oštećenja DNK u 22,25% tretiranih ćelija (zbir kometa klasa B+C+D+E). DOLE je značajno smanjio ( $p < 0,0001$ ) procenat oštećenja DNK uzrokovanih adrenalinom u svim vremenskim intervalima. Procenat oštećenih ćelija je iznosio 11% 15 min nakon inkubacije sa DOLE, 11,33% nakon 30 min, 12,5% nakon 45 min i 12,5% nakon 60 min.

Sposobnost ćelija da isprave oštećenja DNK uzrokovanih adrenalinom 15, 30, 45 i 60 min nakon tretiranja hormonom je prikazan na grafikonu 16b. Procenat oštećenih ćelija je iznosio 13,67% nakon 15 min, 12,17% nakon 30 min, 10,33% nakon 45 min i 10,67% nakon 60 min. Uočljivo je da su merene vrednosti kojima su izražena oštećenja DNK statistički značajno niže ( $p < 0,001$ ) u vremenskim intervalima 30, 45 i 60 min nakon tretmana adrenalinom u odnosu na sam tretman (22,25%).



Grafikon 16. Vremenska dinamika reparacije oštećenja DNK u ćelijama 15, 30, 45 i 60 min nakon izlaganja adrenalinu a) u prisustvu DOLE, b) bez prisustva DOLE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na A, \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,01$

*A<sub>10</sub>μM - 10 μM adrenalin*

*DOLE 0,5 mg/mL - suvi ekstrakt lista masline*

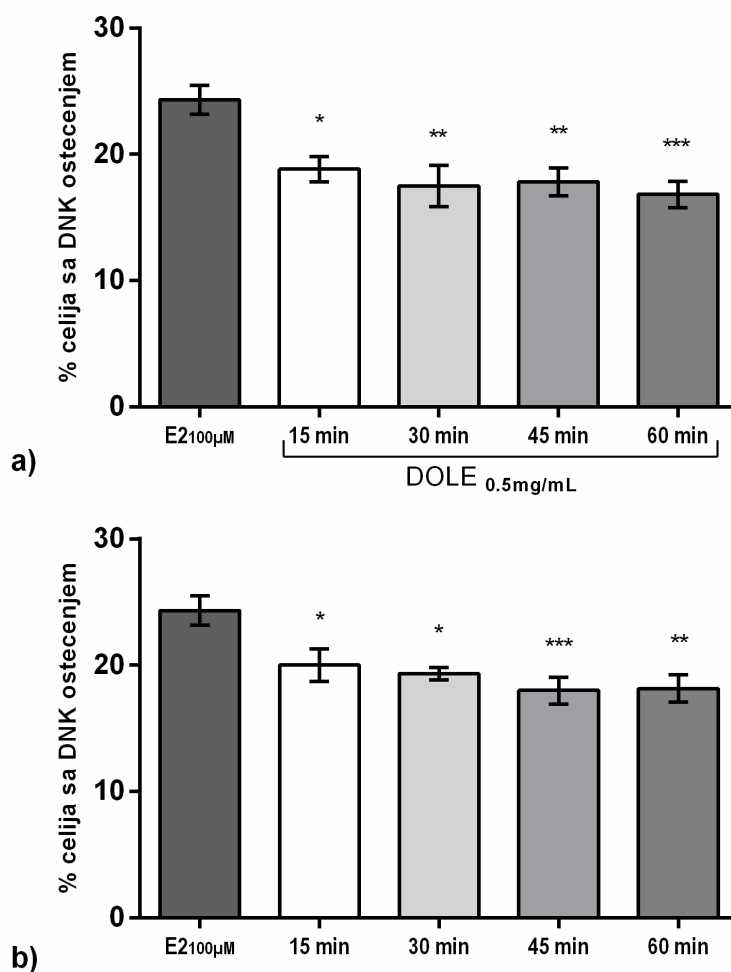
Poredeći rezultate reparacije oštećenja DNK u ćelijama izloženim adrenalinu, primetno je da su u uzorcima koji su inkubirani s DOLE nakon tretmana s hormonom došlo do statistički značajnog smanjenja vrednosti u svim vremenskim intervalima. Kod ćelija koje nakon tretmana s adrenalinom nisu inkubirane s DOLE, smanjenje procenta ćelija s oštećenjima DNK zabeleženo 30, 45 i 60 min nakon tretmana s hormonom. Statistička značajnost između rezultata ova dva eksperimentalna tretmana nije zabeležena.

#### **4.1.4.3. Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana estradiolom**

Na grafikonu 17a je prikazana sposobnost DOLE da utiče na smanjenje oštećenja DNK izazvanih estradiolom u vremenskim intervalima 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s hormonom. Tretman estradiolom (100  $\mu$ M) je izazvao oštećenja DNK u 24,33% ćelija (zbir kometa klasa B+C+D+E). Uočljivo je da je DOLE značajno smanjio ( $p<0,0001$ ) oštećenja DNK uzrokovanih E2 u svim vremenskim intervalima. Procenat oštećenih ćelija koje su inkubirane s DOLE nakon tretmana s hormonom je iznosio 18,83% posle 15 min, 17,5% posle 30 min, 17,83% posle 45 min i 16,83% posle 60 min inkubacije sa suvim ekstraktom lista masline.

Sposobnost ćelija da isprave oštećenja DNK izazvana estradiolom 15, 30, 45 i 60 min nakon tretiranja hormonom prikazana je na grafikonu 17b. Uočljivo je da su vrednosti statistički značajno niže ( $p<0,0001$ ) u odnosu na procenat oštećenja DNK izazvanih E2 (24,33%) u svim merenim vremenskim intervalima nakon tretmana. Procenat oštećenih ćelija je iznosio 20% posle 15 min, 19,33% posle 30 min, 18% posle 45 min i 18,17% posle 60 min od tretmana.

Poredeći rezultate reparacije oštećenja DNK u ćelijama izloženim estradiolu, primetno je da su u uzorcima koji su inkubirani s DOLE nakon tretmana s hormonom dobijene vrednosti niže u svim vremenskim intervalima nego kod ćelija koje nisu. Statistička značajnost između rezultata ova dva eksperimenta nije registrovana.



Grafikon 17. Vremenska dinamika reparacije oštećenja DNK u ćelijama 15, 30, 45 i 60 min nakon izlaganja estradiolu a) u prisustvu DOLE, b) bez prisustva DOLE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na E2, \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,01$

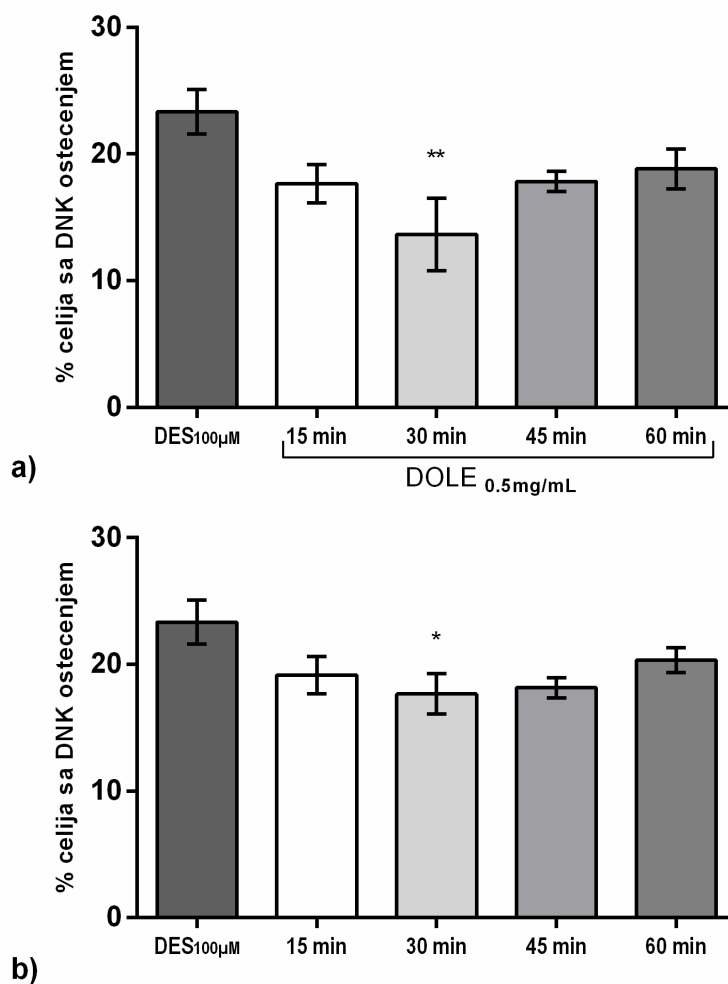
*E2<sub>100</sub>μM - estradiol*

*DOLE 0,5 mg/mL - suvi ekstrakt lista masline*

#### 4.1.4.4. Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana DES-om

Sposobnost DOLE da utiče na smanjenje DNK oštećenja izazvanih DES-om inkubacijom u vremenskim intervalima 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana je prikazana na grafikonu 18a. Tretman s DES (100  $\mu$ M) je izazvao oštećenja DNK u 23,33% ćelija (zbir kometa klasa B+C+D+E). Uočljivo je da je inkubacija s DOLE u trajanju od 30 min

statistički značajno smanjila ( $p < 0,001$ ) oštećenja DNK uzrokovanih DES-om. Procenat oštećenih ćelija koje su inkubirane s DOLE nakon tretmana s hormonom je bio 17,17% posle 15 min, 13,67% posle 30 min, 17,83% posle 45 min i 18,83% posle 60 min inkubacije.



Grafikon 18. Vremenska dinamika reparacije oštećenja DNK u ćelijama 15, 30, 45 i 60 min nakon izlaganja dietilstilbestrolu a) u prisustvu DOLE, b) bez prisustva DOLE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na DES, \*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,01$

*DES<sub>100μM</sub>* – 100  $\mu$ M dietilstilbestrol

*DOLE 0,5 mg/mL* - suvi ekstrakt lista masline

Sposobnost ćelija da isprave oštećenja DNK izazvana DES-om 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana hormonom prikazani su na grafikonu 18b. Procenat oštećenih ćelija je iznosio

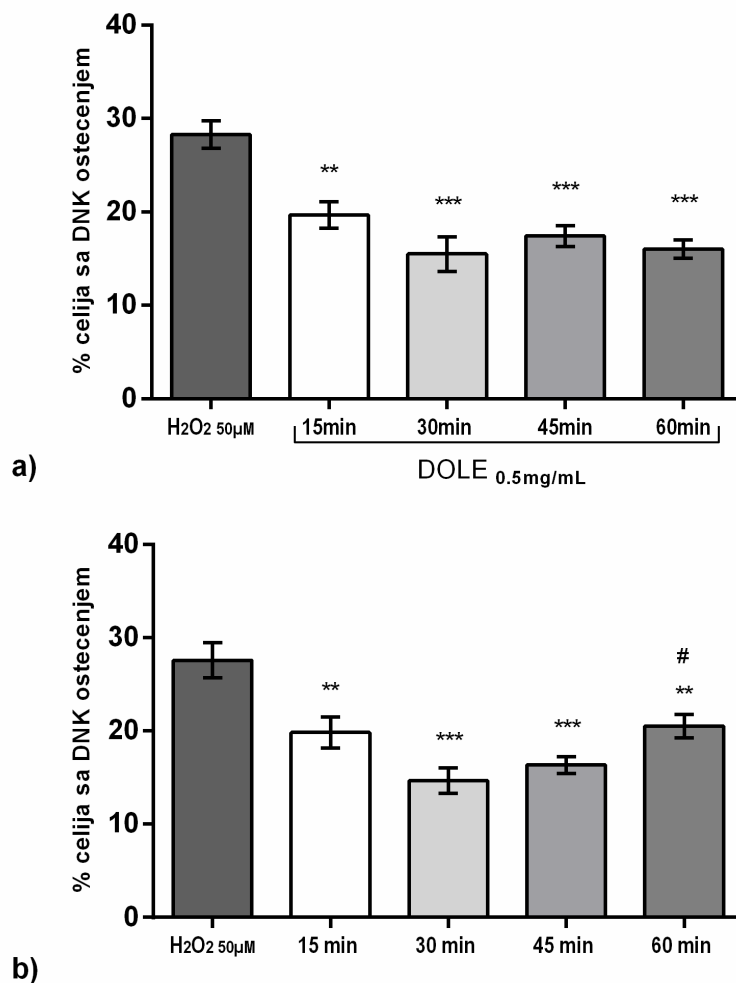
19,17% nakon 15 min, 17,67% nakon 30 min, 18,17% nakon 45 min i 20,33% nakon 60 min od tretmana s DES. Uočljivo je da su vrednosti statistički značajno niže ( $p < 0,01$ ) u odnosu na procenat oštećenja DNK izazvanih DES-om (17,67%) samo 30 min nakon tretmana s hormonom.

Poredeći rezultate reparacije oštećenja DNK u ćelijama izloženim DES-u, primetno je da su u uzorcima koji su inkubirani s DOLE nakon tretmana s hormonom dobijene vrednosti niže u svim vremenskim intervalima nego kod ćelija koje nisu. Statistička značajnost između rezultata ova dva eksperimenta nije registrovana. Takođe je uočljivo da je trend zastupljenosti oštećenja DNK isti u oba eksperimenta, tj. nakon tretmana s DES-om, kod ćelija inkubiranih s DOLE i kod ćelija koje nisu, najmanji procenat ćelija sa oštećenjima DNK molekula je zabeležen 30 min nakon tretmana s hormonom.

#### **4.1.4.5. Efekat DOLE na kinetiku reparacije oštećene DNK nakon tretmana s $H_2O_2$**

Na grafikonu 19a je prikazana sposobnost DOLE da utiče na smanjenje DNK oštećenja izazvanih  $H_2O_2$  u vremenskim intervalima 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s oksidansom. Tretman sa  $H_2O_2$  (50  $\mu$ M) je doveo do DNK oštećenja u 27,58% tretiranih ćelija (zbir kometa klasa B+C+D+E). DOLE je značajno smanjio ( $p < 0,0001$ ) oštećenja DNK uzrokovanih sa  $H_2O_2$  u svim vremenskim intervalima inkubacije - 15 min (19,67%), 30 min (15,5%), 45 min (17,42%) i 60 min (16%).

Sposobnost ćelija da isprave oštećenja DNK izazvanih s  $H_2O_2$  15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana su prikazani na grafikonu 19b. Uočljivo je da su vrednosti kojim su kvantifikovana oštećenja statistički značajno niže u svim merenim vremenskim intervalima nakon tretmana oksidansom ( $p < 0,0001$ ). Procenat oštećenih ćelija je iznosio 19,83% nakon 15 min, 14,67% nakon 30 min, 16,33% nakon 45 min i 20,5% nakon 60 min od tretmana sa  $H_2O_2$ . Utvrđen je i statistički značajan porast procenta oštećenih ćelija ( $p < 0,01$ ) posle 60 minuta u odnosu na 30 min od tretmana s  $H_2O_2$ .



Grafikon 19. Vremenska dinamika reparacije oštećenja DNK u ćelijama 15, 30, 45 i 60 min nakon izlaganja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a) u prisustvu DOLE, b) bez prisustva DOLE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. značajna razlika u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ ; značajna razlika u odnosu na 30 min, #  $p < 0,01$

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 $\mu$ M - 50  $\mu$ M vodonik peroksid*

*DOLE 0,5 mg/mL - suvi ekstrakt lista masline*

Poredeći rezultate reparacije oštećenja DNK u ćelijama izloženim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, primetno je da su u uzorcima koji su inkubirani s DOLE nakon tretmana s oksidansom dobijene vrednosti niže u svim vremenskim intervalima nego kod ćelija koje nisu. Međutim, analiza dobijenih rezultata ova dva eksperimenta nije pokazala statistički značajne razlike.



## 5. DISKUSIJA

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita antigenotoksični potencijal suvog ekstrakta lista masline u leukocitima periferne krvi čoveka *in vitro* u prisustvu hormona tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola. Ispitivanje je obavljeno primenom alkalnog komet testa, osetljive i brze metode za određivanje i analizu primarnih oštećenja DNK i kapaciteta reparacije u pojedinačnim ćelijama. Ispitan je genotoksični potencijal hormona tj. njihova sposobnost da izazovu oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi. Nakon toga, ispitan je antigenotoksični potencijal DOLE pomoću dva eksperimentalna dizajna. Evaluiran je potencijal DOLE da u pretretmanu i posttretmanu izvrši atenuaciju oštećenja DNK izazvanih hormonima. Potom je praćena dinamika reparacije oštećenja DNK u ćelijama koje su inkubirane s DOLE u određenim vremenskim intervalima (15-60 min) nakon tretmana hormonima.

### 5.1. GENOTOKSIČNOST HORMONA

Oksidativni stres u ćelijama nastaje kada stvaranje slobodnih radikala prevazilazi mehanizme njihove antioksidativne zaštite. Povećan oksidativni stres dovodi do oštećenja proteina, membranskih lipida i DNK. Veliki broj studija je posebno fokusiran na supstance koje izazivaju oksidativna oštećenja DNK molekula. Hormoni su organska jedinjenja različite hemijske prirode, koji čine produkte endokrinog sistema, i predstavljaju hemijske glasnike u organizmu. Oni prenose poruke između ćelija i organa i deluju u malim količinama. Za normalno funkcionisanje organizma je potrebno da su hormoni u ravnoteži, mada su ponekad nivoi hormona suviše visoki ili niski. Hormonska neravnoteža se može pojaviti bilo kada tokom života, što može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme. Mnogi hormoni i njihovi strukturni i funkcionalni analozi se koriste kao lekovi. Hormoni koji se najčešće upotrebljavaju u terapiji su estrogeni, progestogeni i tiroksin. "Farmakološka doza" ili "suprafiziološka doza" hormona se odnosi na količinu hormona daleko veću nego što se u normalnim fiziološkim uslovima javlja u zdravom organizmu. Efekti farmakoloških doza hormona mogu se razlikovati od odgovora na količine hormona koji se sintetišu u organizmu, i mogu biti terapijski korisni, ali sa potencijalno neželjenim efektima.

### 5.1.1. Genotoksičnost tiroksina

Rezultati prikazani u ovoj studiji su pokazali da kod ćelija podvrgnutih različitim koncentracijama tiroksina (50  $\mu\text{M}$  i 150  $\mu\text{M}$ ) dolazi do doza-zavisnog značajnog porasta procenta ćelija sa oštećenjima DNK. Na osnovu ovih rezultata, u daljim ispitivanjima u ovoj studiji je korišćena koncentracija tiroksina od 50  $\mu\text{M}$ , obzirom da je ona bila najmanja koncentracija koja je izazvala statistički značajno povećanje oštećenja DNK u poređenju s netretiranim ćelijama, pri čemu je ispunjen kriterijum iz testa vijabilnosti ćelija. Ovi podaci su potvrdili da  $T_4$  može da izazove oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom procene genotoksičnog efekta tiroksina primenom komet testa u *in vitro* uslovima, u kojoj je pokazano da je  $T_4$  u koncentraciji od 80  $\mu\text{M}$  izazvao povećan stepen oštećenja DNK u ćelijama ljudske sperme (Dobrzyńska i sar., 2004). Već je dokumentovano da povećane količine slobodnih tireoidnih hormona izazivaju hipermetaboličko stanje *in vivo* kod pacova, kod kojih su uočeni niski antioksidativni kapacitet i visoka podložnost oksidativnom stresu sa viškom produkcije slobodnih radikala (Venditti i sar., 1997). Takođe, višak  $T_4$  utiče na antioksidativni odbrambeni sistem tretiranih pacova, što rezultuje oksidativnim stresom u jetri i drugim organima (Chandra i sar., 2010).

Iako naši rezultati pokazuju da je  $T_4$  ispoljio genotoksični efekat, zaključci pojedinih studija su bili da tireoidni hormoni ne dovode do oštećenja DNK molekula (Venditti i Di Meo, 2006, Đelić i sar., 2007a). Činjenica da tireoidni hormoni utiču na više aspekata oksidativnog stresa može donekle razjasniti nedoslednost u literaturi o njihovom efektu (Villanueva i sar., 2013), kao i neslaganja u rezultatima vezanim za genotoksičnu aktivnost ovih hormona. Dok se oštećenje proteina uočava i posle kratke izloženosti tiroksinu, oksidativna DNK oštećenja u jetri i srcu miševa nisu konstatovana čak ni posle duže izloženosti (Venditti i Di Meo, 2006). Dostupne studije genotoksičnosti i hipertireoidnog stanja kod ljudi (Al Faisal i sar., 2014; Mihara i sar., 1999; Thakkar i Jain, 2010), kao i citogenetička analiza efekata tiroksina na humane limfocite pune krvi (Đelić i sar., 2006) dale su dvosmislene rezultate. Postojalo je povećanje učestalosti SCE pri relativno visokim dozama tiroksina, ali su rezultati mikronukleus testa bili negativni, što je interpretirano kao odsustvo genotoksičnog efekta (Đelić i sar., 2006). Istraživanja Venditti i Di Meo (2006) su pokazala da nakon tretmana tiroksinom nije povećan nivo jednog od glavnih proizvoda oksidacije DNK, 8-oxo-dG. Procena mogućih klastogenih efekata tiroksina na kulturama limfocita pune krvi je pokazala da nema statistički značajnog povećanja učestalosti strukturnih hromozomskih aberacija kao, i da je tiroksin samo pri najvišoj eksperimentalnoj

koncentraciji bio sposoban da značajno smanji mitotski indeks (Đelić i sar., 2007a,b). Mihara i sar. (1999) su uočili povećani nastanak ROS, DNK oštećenja, kao i povećani broj ćelija u apoptozi, prilikom kultivacije ćelija periferne krvi zdravih dobrovoljaca s T<sub>4</sub>. Isti rezultati su dobijeni i kod pacijenata sa Grejvsovom bolešću, što sugerise da tireoidni hormoni imaju potencijal da indukuju oštećenja DNK i apoptotičku ćelijsku smrt u limfocitima *in vivo* i *in vitro*. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima koje su dobili Zambrano i sar. (2014), jer je u jetri i bubrezima pacova nakon trosatnog i višednevnog tretmana s T<sub>3</sub>, zabeležen povećan broj dvolančanih prekida i oksidovanih baza jedarne DNK. Iako su studije procene oksidativnog stresa izazvanog tireoidnim hormonima korišćenjem komet testa u *in vitro* uslovima retke, postoje rezultati koji pokazuju da su T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub> izazvali povećan nivo oštećenja DNK u leukocitima (Đelić i Anderson, 2003; Đelić i sar., 2007a) i ćelijama ljudske sperme *in vitro* (Dobrzyńska i sar., 2004).

Kao što je poznato, efekat TH na nastanak ROS na ćelijskom nivou varira među tkivima, u zavisnosti od njihove specifične podložnosti (Asayama i sar., 1987). Metabolički efekti TH i njihovih derivata su direktno povezani s nastankom ROS i oksidativnog stresa na različitim nivoima. TH povećavaju nivo ROS ubrzavanjem bazalnog metabolizma, stimulisanjem sinteze komponenti respiratornog lanca i uticajem na ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u nastanak i eliminaciju ROS (Fernandez i sar., 1985; Ueta i sar., 1995). Metabolička oksidacija steroidnih, ali i nesteroidnih hormona koji poseduju fenolnu grupu, u koje spadaju i TH, predstavlja uobičajeni mehanizam nastanka ROS i njihovog genotoksičnog dejstva (Đelić i sar., 2008).

### **5.1.2. Genotoksičnost adrenalina**

Rezultati ove studije su pokazali da je adrenalin u različitim koncentracijama (10 µM, 50 µM i 150 µM) može da izazove doza-zavisna primarna oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi. Na osnovu ovih rezultata, u daljim eksperimentima u ovoj studiji je korišćena koncentracija adrenalina od 10 µM, obzirom da je ona bila najmanja koncentracija koja je izazvala statistički značajno povećanje oštećenja DNK u poređenju s netretiranim ćelijama, pri čemu je očuvana njihova vijabilnost. Ovi podaci su potvrdili da adrenalin može da izazove oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi, čime je pokazano njegovo genotoksično dejstvo. Naši nalazi su u saglasnosti s nalazima koji pokazuju da je adrenalin sposoban da dovede do oštećenja molekula DNK humanih limfocita (Đelić i sar., 2015; Genova, 2006; Radaković, 2014) i prekanceroznih 3T3 ćelija *in vitro* (Flint i sar., 2007).

Takođe, fluorescentna analiza kondenzovane DNK je pokazala da je adrenalin indukovao jednolančane prekide DNK u humanim leukocitima (Crespo i Bicho, 1995). Slično tome, adrenalin i noradrenalin indukovali su jednolančane prekide u plazmidnoj DNK u prisustvu ADP-Fe<sup>3+</sup> (Miura i sar., 2000).

Hemijska struktura kateholamina čini ova jedinjenja pogodnim za uključivanje u redoks cikluse. Adrenalin u svojoj strukturi poseduje kateholni prsten koji, zbog nestabilne prirode, može lako da oksiduje do semihinona i hinona. Redoks ciklusom nastaju ROS koji mogu da oštete DNK (Moldeus i sar., 1983; McGregor i sar., 1988). Semihinoni i hinoni, kao produkti redoks ciklusa adrenalina, su zabeleženi u srcu, jetri, skeletnim mišićima i krvi (Dhalla i sar., 2001). Pored toga, povećana oštećenja DNK su zabeležena kod srčanih bolesnika, kod kojih su koncentracije adrenalina u plazmi visoke (Raymondos i sar., 2000), kao i kod osoba koje boluju od feohromocitoma, kateholamin sekretujućeg tumora (Hegedus, 2000). S obzirom da ROS imaju sposobnost da uzrokuju oštećenje DNK i dovedu do promene ugenomu, kateholamini ispunjavaju uslov da budu uključeni u sve korake kancerogeneze (Burcham, 1998). McGregor i sar. (1988) su ispitivanjem mutagenih efekata kateholamina istakli značaj prisustva kateholne grupe u ispoljavanju njihovih štetnih efekata. Iako se fenolne grupe, koje sadrže hidroksilnu grupu, nisu pokazale kao mutagene, dodatak druge hidroksilne grupe koja stvara katehol, bio je dovoljan za ispoljavanje mutagenog efekta. Uvidom u literaturne podatke o značaju slobodnih radikala u oštećenju DNK pod uticajem kateholamina, očigledno je da nastanak ROS igra važnu ulogu u ispoljavanju genotoksičnih efekata adrenalina (Moldeus i sar., 1983; McGregor i sar., 1988).

### **5.1.3. Genotoksičnost estradiola**

Rezultati prikazani u ovoj studiji su potvrdili da je estradiol u različitim koncentracijama (100 µM i 210 µM) izazvao statistički značajno povećanje količine oštećenja DNK molekula u leukocitima periferne krvi, čime je ispoljio genotoksični efekat. Na osnovu ovih rezultata, u daljim eksperimentima u ovoj studiji je korišćena koncentracija estradiola od 100 µM, obzirom da je ona bila najmanja koncentracija koja je dovela do statistički značajnog povećanja oštećenja DNK u poređenju s netretiranim ćelijama, pri čemu je očuvana njihova vijabilnost. Naši nalazi su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da E2 u koncentraciji od 100 µM dovodi do značajnih oštećenja DNK molekula limfocita i ćelija sperme čoveka (Anderson i sar., 2003; Cemeli i sar., 2004).

Primarni estrogene podležu aromatičnoj hidroksilaciji pri čemu nastaju katehol estrogene. Katehol estrogene se aktiviraju do semihinona i hinona, što omogućava njihovo uključivanje u redoks cikluse, stvarajući uslove oksidativnog stresa (Cavalieri i sar., 2000). Semihinoni i hinoni mogu direktno dovesti do oštećenja DNK ili mogu ući u oksidaciju/redukciju s molekularnim kiseonikom, stvarajući ROS (Anderson i sar., 2003; Rajapakse i sar., 2005). Estrogene hormoni uglavnom ispoljavaju genotoksični efekat stvaranjem ROS, dovodeći do oštećenja DNK (Anderson i sar., 2003; Cemeli i sar., 2004). Zabeleženo je nekoliko tipova DNK oštećenja koja su izazvali steroidni i nesteroidni metaboliti estrogene (Yagi i sar., 2001; Rajapakse i sar., 2005). Estrogenima izazvana oštećenja DNK su: nukleotidi kovalentno vezani za reaktivne derivate samih hormona, endogeni DNK adukti i kovalentna oštećenja DNK uzrokovana slobodnim radikalima (Đelić i Đelić, 2002).

#### **5.1.4. Genotoksičnost dietilstilbestrola**

Rezultati ove studije pokazuju da je DES u različitim koncentracijama (100  $\mu\text{M}$ , 140  $\mu\text{M}$  i 210  $\mu\text{M}$ ) izazvao statistički značajno povećanje količine oštećenja DNK molekula u leukocitima periferne krvi. Na osnovu ovih rezultata, u daljim ispitivanjima u ovoj studiji je korišćena koncentracija DES od 100  $\mu\text{M}$ , kao najmanja koncentracija koja je izazvala statistički značajno povećan stepen oštećenja DNK u poređenju s netretiranim ćelijama, pri čemu je ispunjen kriterijum iz testa vijabilnosti ćelija. Ovi podaci su potvrdili da DES može da izazove oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi, čime je ispoljio genotoksični efekat. To je u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da DES u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  dovodi do značajnih oštećenja DNK molekula ćelija sperme i limfocita čoveka *in vitro* (Anderson i sar., 2003; Cemeli i sar., 2004).

U redoks ciklusima DES-a dolazi do formiranja semihinona i hinona, koji direktno izazivaju oštećenja DNK ili ulaze u oksidaciju/redukciju s molekularnim kiseonikom, stvarajući ROS (Anderson i sar., 2003; Rajapakse i sar., 2005), što predstavlja osnovni mehanizam ispoljavanja genotoksičnih efekata DES-a (Anderson i sar., 2003; Cemeli i sar., 2004). Metabolička oksidacija DES-a u DES hinon, omogućava njegovo kovalentno vezivanje za DNK (Gladek i Liehr, 1989). Kovalentne DNK modifikacije se javljaju u mnogim ćelijama i tkivima, ali se vremenom njihova brojnost smanjuje, verovatno zbog reparacije, kao i zbog hemijske nestabilnosti nastalih DNK adukata (Gladek i Liehr, 1989).

### 5.1.5. Stepen oštećenja molekula DNK uzrokovanih dejstvom hormona

Ispitivanje genotoksičnog efekta tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola u ovoj studiji je obuhvatilo i analizu stepena oštećenja DNK kroz dve varijable distribucije – zastupljenost kometa s niskim i srednjim oštećenjem (klase B i C), kao i kometa s visokim i totalnim oštećenjem (klase D i E) u odnosu na ukupan procenat ćelija s oštećenjima DNK. Rezultati su pokazali da je kod tiroksina, estradiola i DES-a zastupljenost kometa s visokim i totalnim oštećenjem DNK (klase D i E) bila veća u odnosu na zastupljenost kometa s niskim i srednjim oštećenjem (klase B i C). Treba istaći da je poređenjem vrednosti dobijenih za T<sub>4</sub>, E2 i DES, s rezultatima za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uočeno da hormoni indukuju viši stepen DNK oštećenja od poznatog oksidansa. Adrenalin je jedini od četiri odabrana hormona kod koga je preovladao niži stepen oštećenja DNK u odnosu na ukupan procenat ćelija sa oštećenjima DNK, što je zabeleženo i u tretmanu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Rezultati pre i posttretmana antioksidansom kvercetinom u odnosu na oštećenja izazvana hormonima su pokazali da je kod tri testirana hormona (T<sub>4</sub>, E2 i DES) kvercetin doveo do značajnog smanjenja procenta ćelija s oštećenjima DNK samo u pretretmanu, dok u posttretmanu smanjenje oštećenja nije bilo statistički značajno. U tretmanu adrenalinom je kvercetin doveo do značajnog smanjenja procenta ćelija s oštećenjima DNK u oba eksperimentalna protokola, pri čemu je niža vrednost dobijena u posttretmanu. Treba naglasiti da su u ovom segmentu rezultati uzoraka tretiranih adrenalinom pokazali isti trend kao i uzorci tretirani s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Antioksidativni efekat kvercetina može biti ispoljen sinergističkim dejstvom mehanizama aktivacije enzima antioksidativne zaštite, uklanjanja slobodnih radikala i specifičnim vezivanjem za DNK molekul. Kvercetin poseduje zaštitni efekat od oštećenja DNK, delovanjem kao helator metala (Dhalla i sar., 2000) i povećanjem koncentracije enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema ćelija (Aherne i O'Brien, 2000; Kadrabova i sar., 2012). Međutim, njegova najizraženija osobina je uklanjanje različitih vrsta slobodnih radikala - superoksidnih anjona, peroksinitrita i hidroksilnih radikala (Cemeli i sar., 2004; Myhrstad i sar., 2002; Wilms i sar., 2005). Pored toga, poznato je da se kvercetin vezuje za molekul DNK putem interkalacije i vezivanjem za veliki žljeb, čime štiti DNK od delovanja mutagena (Kanakakis i sar., 2005; Janjua i sar., 2009).

## 5.2. UTICAJ EKSTRAKTA LISTA MASLINE NA GENOTOKSIČNI EFEKAT HORMONA I KINETIKU ISPOLJAVANJA OŠTEĆENJA DNK IZAZVANIH TESTIRANIM HORMONIMA

List masline i maslinovo ulje imaju sličan fenolni sastav, s tim što se fenoli u listu masline nalaze u znatno većoj koncentraciji nego u ulju (Silva i sar., 2006; El i Karakaya, 2009). Glavni sastojak ekstrakta lista masline je oleuropein, jedan od iridoidnih monoterpena. List masline sadrži i triterpene (oleanolna, ursolinska i maslinična kiselina), flavonoide (luteolin, apigenin i kvercetin), kafeinsku kiselinu i tanine (Dekanski i sar., 2009; Samet i sar., 2014). Vojcikovski i sar. (2007) su pokazali da je ekstrakt lista masline pokazao najveću antioksidativnu aktivnost/sposobnost sakupljanja slobodnih radikala među ispitivanim lekovitim biljkama. Antioksidativna aktivnost DOLE i njegovih fenola je ranije zabeležena u različitim *in vitro* sistemima (Vissers i sar., 2004; Baldioli i sar., 1996). Visoki antioksidativni potencijal standardizovanog DOLE i njegovih fenola je potvrđen *in vitro*, upotrebom DPPH testa (Dekanski i sar., 2011; Stupans i sar., 2002; Carrasco-Pancorbo i sar., 2005). Takođe, ispitivanje kapaciteta DOLE-a u ABTS i FRAP testu je pokazalo da njegova efikasnost raste s povećanjem koncentracije (Čabarkapa, 2016). Istraživanja su ukazala na snažan antioksidativni potencijal DOLE u *in vivo* sistemima - u stomaćnim ulkusima (Dekanski i sar., 2009a,b), kod globalne ishemije i reperfuzije mozga (Dekanski i sar., 2011), kao i kod spontano hipertenzivnih pacova (Dekanski i sar., 2014). Polifenolne komponente ekstrakta, kvercetin i oleuropein, imaju sposobnost da štite DNK od oksidativnog oštećenja uglavnom uklanjanjem peroksinitrita, superoksidnih anjona i hidroksilnih radikala (Cemeli i sar., 2004; Myhrstad i sar., 2002; Cumaoglu i sar., 2011). Pokazano je da zahvaljujući prisustvu polifenola sa kateholnom grupom (rutin, oleuropein, hidroksitirozol, verbaskozid, luteolin), DOLE ima kapacitet uklanjanja ROS (Benavente-García i sar., 2004; Turkez i sar., 2012). Iako su fenoli masline pokazali snažnu antioksidativnu aktivnost, kao i potencijal u sprečavanju oštećenja ćelija izazvana s ROS u različitim *in vitro* sistemima (Cemeli i sar., 2004; Cumaoglu i sar., 2011), malo je poznata njegova zaštitna uloga u odnosu na različite uzročnike oštećenja DNK molekula. Fabiani i sar. (2008) su pokazali da fenoli masline, bez obzira na to da li se koriste kao prečišćena jedinjenja ili u kompleksnim ekstraktima, u vrlo malim koncentracijama mogu sprečiti oštećenje DNK izazvano tretmanom s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i forbol miristat acetatom. Novija istraživanja su pokazala zaštitni efekat polifenola iz ekstrakta lista masline kod obolelih od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i raka (Boss i sar., 2016a).

Dosadašnja istraživanja su se, osim antioksidativnog, bavila i drugim svojstvima DOLE u različitim humanim i životinjskim *in vitro* i *in vivo* modelima. Već je registrovano da DOLE i njegove komponente sprečavaju ekspresiju proinflamatornih gena za sintezu molekula kao što su IL-6, IL-1 $\beta$  (Ryu i sar., 2015), IL-8 (Lockyer i sar., 2015; Boss i sar., 2016b), MCP-1, VCAM-1i TNF- $\alpha$  (Wang i sar., 2008). DOLE je takođe proučavan zbog svog zaštitnog potencijala u odnosu na cerebralnu ishemiju (Dekanski i sar., 2011), hipertenziju (Perrinjaquet-Moccetti i sar., 2008), dijabetes (Cumaoglu i sar., 2011), melanom (Miljković i sar., 2009), encefalomijelitis (Mijatović i sar., 2011) i bol (Esmacili-Mahani i sar., 2010). Salvini i sar. (2006) su detektovali smanjenje oksidativnog oštećenja DNK za 30% u limfocitima periferne krvi, tokom suplementacije devičanskim maslinovim uljem kod žena u postmenopauzi. Pokazano je da hidroksitirozol, jedan od sastojaka DOLE, sprečava smrt HepG2 ćelija izazvanih terc-butilhidroperoksidom (Goya i sar., 2007), da suzbija oksidaciju lipoproteina niske gustine (Aruoma i sar., 1998), i da štiti CaCo-2 ćelije (Manna i sar., 1997) i eritrocite (Manna i sar., 1999) od citotoksičnosti izazvane s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nekoliko studija je ukazalo na zaštitni efekat DOLE u odnosu na oksidativna DNK oštećenja indukovana s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fabiani i sar., 2008) i na genotoksičnost izazvanu forbol miristat acetatom i permetrinom (Anter i sar., 2011; Turkez i Togar, 2011). Međutim, potencijal DOLE da utiče na procenat oštećenja DNK molekula izazvana hormonima, kao i mogući mehanizmi njegovog antigenotoksičnog efekta do sada nisu testirani.

Poznato je da hrana sadrži prirodne sastojke koji mogu izazvati oštećenja DNK i promene u genomu (Ames i Gold, 2000). Iz tog razloga smo procenili mogući genotoksični potencijal DOLE u testiranim koncentracijama. Ispitivanje genotoksičnog efekta u ovoj studiji je pokazalo da u testiranim koncentracijama (0,125 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL), DOLE nije doveo do povećanja procenta ćelija s oštećenjima DNK. Takvi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama potencijalne genotoksičnosti različitih vrsta devičanskog maslinovog ulja u *Drosophila* testu za detekciju somatskih mutacija i rekombinacija (Kounatidis i sar., 2009). Mutageni efekat ekstrakta lista masline nije pokazan u bakterijskom testu reverznih mutacija (Clewell i sar., 2016). Ekstrakt lista masline nije pokazao genotoksičan potencijal u *in vitro* testu hromozomskih aberacija u kulturi limfocita kod ljudi, ni u *in vivo* mikronukleus testu na miševima (Clewell i sar., 2016).

Antigenotoksični potencijal DOLE je u ovoj studiji ispitan primenom dva eksperimentalna protokola, što je omogućilo da se bolje sagledaju mehanizmi uključeni u ovaj efekat. Rezultati ove disertacije pokazuju da DOLE u različitim koncentracijama ima potencijal za smanjivanje primarnih oštećenja DNK izazvanih hormonima tiroksinom,



adrenalinom, estradiolom i dietilstilbestrolom u leukocitima periferne krvi čoveka. DOLE je pokazao sposobnost da zaštiti DNK od oštećenja izazvanih korišćenim oksidansima, u pretretmanu i u posttretmanu. Sve testirane koncentracije DOLE su ispoljile statistički značajan antigenotoksični potencijal u odnosu na oštećenja izazvana testiranim hormonima u oba eksperimentalna protokola. Antigenotoksični efekat DOLE je moguće objasniti pomoću sledećih mehanizama. Prvi mehanizam je sposobnost DOLE da poveća antioksidativni kapacitet ćelija stimulisanjem sinteze antioksidativnih enzima i održavanjem njihove aktivnosti tokom oksidativnog stresa (Abo Ghanema i Sadek, 2012). Studija El-Damravija (2011) je pokazala da dodavanje ekstrakta lista masline ishrani zečevima starijeg uzrasta, dovodi do značajnog povećanja aktivnosti antioksidativnih odbrambenih enzima, GST i SOD, u krvnoj plazmi. Nekoliko drugih studija je pokazalo da su polifenoli, kao što je oleuropein, povećali ekspresiju gena SOD i CAT (Masella i sar., 2004). *In vitro* studije u kojima su korišćene humane ćelijske linije ukazuju da hidroksitirozol i oleuropein stimulišu ekspersiju gena za sintezu enzima antioksidativne zaštite (Parzonko i sar., 2013). Drugi mehanizam kojim DOLE ispoljava efikasnost je sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Pomenuta sposobnost ekstrakta se može pripisati njegovim fenolnim i flavonoidnim sastojcima koji poseduju hidroksilne grupe, koje omogućavaju hvatanje slobodnih radikala (Dekanski i sar., 2009a). Ekstrakt maslinovog lista predstavlja jak prirodni antioksidans, upravo zbog sinergije između flavonoida, oleuropeozida i supstituisanih fenola (Benavente-Garcia i sar., 2000). Pojedinačni i kombinovani fenoli iz DOLE su pokazali sposobnost hvatanja slobodnih radikala, pri čemu je efekat kombinovanih fenola bio značajno veći u odnosu na pojedinačne sastojke (Benavente-Garcia i sar., 2000; Lee i Lee, 2010). Treći mehanizam kojim DOLE može ispoljiti antigenotoksični efekat je stimulisanje mehanizama DNK reparacije. Neke studije su već navodile da tirozol, fenolna komponenta maslinovog ulja, povećava aktivnost reparacije DNK oštećenja (Fabiani i sar., 2008). Četvrti mehanizam je sposobnost nekih flavonoidnih komponenti DOLE da direktno interaguju sa molekulom DNK putem interkalacije ili vezivanjem za veliki žljeb DNK, štiteći ga od dejstva mutagena (Kanakis i sar., 2005). Naime, kvercetin i kampferol su pokazali sposobnost vezivanja za adeninske, guaninske i timinske baze, kao i za fosfatne grupe DNK molekula (Kanakis i sar., 2005). Za kvercetin i rutin je pokazano da su DNK interkalatori (Janjua i sar., 2009). Ova jedinjenja uspostavljaju reverzibilni, nekovalentni način interakcije sa DNK putem interkalacije (Janjua i sar., 2009).

### **5.2.1. Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat tiroksina**

Na osnovu rezultata naše studije, može se reći da DOLE u svim testiranim koncentracijama ima značajan potencijal za smanjenje oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi izazvanih tiroksinom u oba eksperimentalna protokola, pretretmanu i posttretmanu. Poređenjem efikasnosti ekstrakta u pre i posttretmanu, uočljivo je da DOLE smanjuje procenat ćelija s oštećenjima DNK u pretretmanu više nego u posttretmanu, ali statistički značajna razlika između ovih tretmana nije zabeležena. Rezultati dobijeni iz eksperimenata s antioksidansom kvercetinom i T<sub>4</sub> su u oba aspekta pokazali sličan trend kao DOLE i T<sub>4</sub>. Rezultati efikasnosti DOLE i kvercetina su u saglasnosti s nalazima Đelića i sar. (2007), gde je antioksidativni enzim katalaza smanjila oštećenja DNK izazvana s TH.

Ispitivanje kapaciteta ćelija da smanje oštećenja DNK prouzrokovana tiroksinom 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s hormonom, kod ćelija inkubiranih s DOLE je pokazalo da je došlo do statistički značajnog smanjenja procenta ćelija s oštećenjima DNK u svim vremenskim intervalima. U ćelijama bez inkubacije s DOLE nakon tretmana s tiroksinom, je takođe došlo do značajnog smanjenja procenta ćelija s oštećenjima DNK u svim testiranim vremenskim intervalima. Iako je nakon inkubacije s DOLE uočljivo izvesno smanjenje procenta ćelija sa oštećenjima izazvanim s tiroksinom u odnosu na ćelije bez dejstva DOLE, statistička značajnost ovih razlika nije zabeležena. Može se zaključiti da su mehanizmi ćelijske DNK reparacije bili efikasni u smanjenju oštećenja izazvanih ovim oksidansom, u oba eksperimentalna dizajna. Kod ćelija koje nisu inkubirane s DOLE, je došlo do statistički značajnog pada procenta oštećenih ćelija 60 min nakon tretmana tiroksinom u odnosu na procenat oštećenja merenih nakon 45 min od tretmana tiroksinom, što kod ćelija koje su inkubirane s DOLE nije registrovano. Na osnovu navedenih podataka se može zaključiti da stimulacija reparacije DNK nije mehanizam koji je značajno doprineo antigenotoksičnom efektu DOLE.

### **5.2.2. Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat adrenalina**

Rezultati ove studije su pokazali da DOLE pri svim korišćenim koncentracijama poseduje značajan potencijal za smanjivanje primarnih DNK oštećenja u ćelijama periferne krvi čoveka izazvanih adrenalinom u pretretmanu i posttretmanu. Naši rezultati su saglasni sa rezultatima Crespo i Bicho (1995), Miura i sar. (2000) i Radaković i sar. (2014) u kojima su superoksid dismutaza, katalaza i kvercetin smanjili nivo oštećenja DNK izazvanih

adrenalinom. Poređenjem efekta svih koncentracija ekstrakta u oba eksperimentalna protokola, primećuje se da je primena DOLE u posttretmanu dovela do većeg smanjenja procenta ćelija s oštećenjima DNK nego u pretretmanu, mada razlike nisu statističke značajne. Sličan efekat DOLE je pokazao u odnosu na smanjenja oštećenja izazvana s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Antioksidans kvercetin je značajno smanjio oštećenja DNK izazvana adrenalinom u oba eksperimentalna protokola. Adrenalin je jedini od četiri testirana hormona kod koga je i kvercetin doveo do većeg smanjenja procenta ćelija s oštećenjem DNK u posttretmanu, ali ni u ovom slučaju statistička značajnost dobijenih razlika vrednosti pre i posttretmana nije zabeležena.

Testiranje kapaciteta ćelija da u prisustvu DOLE smanje oštećenja DNK 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s adrenalinom je pokazalo značajno smanjen procenat ćelija sa oštećenjima DNK u svim vremenskim intervalima. Sa druge strane, u ćelijama bez inkubacije sa ekstraktom lista masline, statistički značajno smanjenja procenta oštećenja DNK je zabeleženo posle 30, 45 i 60 min. Statistički značajna razlika između ćelija inkubiranih sa i bez DOLE nije utvrđena, te se može pretpostaviti da stimulacija reparacije DNK nije mehanizam koji je značajno doprineo antigenotoksičnom efektu DOLE. Značajno smanjenje oštećenja pod dejstvom DOLE već nakon 15 min ukazuje na mogućnost da je DOLE ispoljio aktivnost stimulisanjem antioksidativnog sistema odbrane ćelija, kao i putem hvatanja slobodnih radikala. Procenat ćelija sa oštećenjem DNK nakon tretmana s adrenalinom je bio približno isti bez i sa inkubacijom s DOLE u svim vremenskim intervalima, i može se objasniti na nekoliko načina. U normalnim uslovima, katabolizam adrenalina uključuje oksidativnu deaminaciju, O-metilaciju i konjugaciju, dok pri povišenim koncentracijama adrenalina u organizmu ne dolazi do njegovog uobičajenog metabolisanja, već on podleže procesu autooksidacije. Autooksidacija predstavlja inicijalni korak u nastanku slobodnih radikala, povećanju koncentracije visoko reaktivnih intermedijera i posledično, nastanku oksidativnog stresa (Adameova i sar., 2009). Koncentracija adrenalina korišćena u našoj studiji (10 μM) je veća od maksimalne terapijske doze, na osnovu čega možemo pretpostaviti da je dovoljno visoka da uspostavlja redoks ciklus koji multiplicira proizvodnju ROS, dovodeći do formiranja hinona i adenohroma (Sirota, 2011). Hinonoidna jedinjenja povećavaju proizvodnju superoksidnih anjona, a posredno i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Đelić i Anderson, 2003; Genova i sar., 2006), koji u reakciji sa gvožđem formiraju visoko reaktivne hidroksilne radikale (Dhalla i sar., 2000). Povećana količina nastalih visoko reaktivnih intermedijera prevazilazi kapacitet mehanizama DNK reparacije (Imlay i Linn, 1988). Takođe, moguće je pretpostaviti i da se nakon dejstva adrenalina, pored jedno- i dvolančanih prekida, formiraju i

druge vrste primarnih DNK oštećenja, za čije ispravljanje je potrebno više vremena (Đelić, 2002; Collins i sar., 1995). Osim opisanih, verovatno je da postoje i drugi mehanizmi kojima adrenalin ispoljava genotoksični efekat. Flint i sar. (2007) su zaključili da hormoni stresa (adrenalin, noradrenalin i kortizol) indukuju oštećenje DNK vezivanjem za receptore, aktivirajući kaskadu signalnih puteva preko sekundarnih glasnika (Bassett, 2011). Sekundarni glasnici i aktivacija  $\beta$ -receptora dovode do fosforilacije ciljnih proteina (Tsujimoto i sar., 1989). Hara i sar. (2011) su konstatovali da adrenalin upravo signalnim putem preko  $\beta$ -adrenergičkih receptora dovodi do aktivacije i akumulacije oštećenja DNK. U prilog tome ide istraživanje u kome je propranolol, antagonist  $\beta$ -adrenergičkih receptora, blokirao genotoksične efekte noradrenalina i adrenalina (Flint i sar., 2007). Treba pomenuti da adrenalin, pored genotoksičnog efekta, može mehanizmom transdukcije signalnih puteva da podstakne kancerogenezu, s obzirom da mnoge ćelije kancera na svojoj površini poseduju  $\alpha$  i  $\beta$  adrenergičke receptore (Waldum i sar., 1998; Liu i sar., 2008; Yao i sar., 2009).

### **5.2.3. Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat estradiola**

Na osnovu rezultata ove studije je evidentno da su sve korišćene koncentracije ekstrakta pokazale pozitivni efekat u odnosu na genotoksičnost estradiola u oba eksperimentalna protokola. Ovi rezultati se poklapaju sa istraživanjem u kome je efekat estradiola smanjen katalazom i superoksid dismutazom, u kojima je navedeno da  $E_2$  dovodi do oštećenja DNK stvaranjem ROS kao glavnim mehanizmom njegove genotoksičnosti (Cemeli i sar., 2004). Poređenjem efekta svih koncentracija DOLE u pretretmanu i posttretmanu, primećuje se da je primena ekstrakta u pretretmanu dovela do smanjenja procenta ćelija s oštećenjima DNK više nego u posttretmanu, ali statistički značajna razlika između ovih vrednosti nije zabeležena. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim sa antioksidansom kvercetinom i  $E_2$  u ovoj studiji, mada je u eksperimentu s kvercetinom statistički značajno smanjenje procenta ćelija s oštećenjima DNK zabeleženo samo u pretretmanu. Specifičnost rezultata sa estradiolom je u tome da je testirana koncentracija kvercetina pokazala statistički značajno bolji efekat u odnosu na najmanju i najveću koncentraciju DOLE u pretretmanu u odnosu na estradiol. Takav rezultat ukazuje da kvercetin u smeši sa ostalim sastojcima u ekstraktu ima smanjen efekat uklanjanja slobodnih radikala, obzirom da je poznato da je sinergija između glavnih komponenti DOLE odgovorna za njegov ukupan efekat (Benavente-García i sar., 2000; Dekanski i sar., 2011).

Praćenjem kinetike ispoljavanja DNK oštećenja u ćelijama periferne krvi koje su inkubirane s DOLE nakon tretmana s E2 je pokazano da je došlo do statistički značajnog smanjenja procenta oštećenja DNK u svim vremenskim intervalima inkubacije. Slično, ćelije bez dodatne inkubacije s DOLE su pokazale značajan potencijal da smanje oštećenja DNK prouzrokovana dejstvom estradiola u vremenskim intervalima od 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s hormonom. Iako je nakon inkubacije s DOLE uočljivo izvesno smanjenje procenta ćelija sa oštećenjima izazvanim s E2 u odnosu na ćelije bez inkubacije s DOLE, statistička značajnost ovih razlika nije registrovana. Shodno tome, i ovde se pokazalo da stimulacija reparacije DNK nije mehanizam koji značajno doprinosi antigenotoksičnom efektu DOLE. Zabeleženo je da je procenat ćelija s oštećenjima DNK bio približno isti u svim vremenskim intervalima nakon tretmana s estradiolom, kao i u tretmanu s adrenalinom. Estradiol, slično adrenalinu, podleže oksidaciji do semihinona i hinona. Povećanje količine nastalih visoko reaktivnih intermedijera, prevazilazi kapacitet mehanizama DNK reparacije (Imlay i Linn, 1988). Osim ovoga, opravdano je pretpostaviti da estradiol osim jedno- i dvolančanih prekida, izaziva i druge vrste primarnih DNK oštećenja, za koje je potrebno više vremena da bi bili ispravljena (Đelić, 2002). Verovatno je da postoje i drugi mehanizmi kojima estradiol ispoljava genotoksični efekat. Već je navedeno da estradiol može svoje dejstvo u ćeliji ostvariti genomskim i negenomskim signalnim putevima (Segars i Driggers, 2002). Genomski signalni put predstavlja spor proces, za koji je potrebno do 24 h kako bi fiziološki efekat bio uočljiv. Estradiol može delovati i brzim negenomskim putem, koji uključuje aktivaciju GPER-a na plazma membrani. Različiti signalni putevi koji utiču na estrogene receptore uzrokuju različite tkivno specifične odgovore na estradiol (Barros i sar., 2006; Barros i Gustafsson, 2011).

#### **5.2.4. Uticaj ekstrakta lista masline na genotoksični efekat dietilstilbestrola**

Na osnovu naših rezultata, može se reći da je DOLE u svim testiranim koncentracijama imao značajan potencijal da smanji oštećenja DNK molekula u ćelijama periferne krvi čoveka izazvanih DES-om u oba eksperimentalna protokola. Naši rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima u kojima je efekat DES-a smanjen antioksidansima katalazom, superoksid dismutazom (Cemeli i sar., 2004) i vitaminom C (Shadab i sar., 2006), gde je navedeno da DES dovodi do oštećenja DNK molekula prvenstveno stvaranjem ROS. Poređenjem efikasnosti DOLE u pre i posttretmanu, uočljivo je da je s DOLE smanjen procenat ćelija s oštećenjima DNK izazvanih DES-om više u pretretmanu, u odnosu na

posttretman. Razlike između pretretmana i posttretmana nisu bile statistički značajne. Rezultati dobijeni s kvercetinom i DES-om se podudaraju s rezultatima dobijenim u eksperimentima s kvercetinom i E2, gde je kvercetin takođe bio značajno efikasniji u pretretmanu od DOLE.

Ispitivanje kapaciteta ćelija, koje su naknadno inkubirane s DOLE, da smanje oštećenja DNK u vremenskim intervalima 15, 30, 45 i 60 min nakon tretmana s DES-om je pokazalo značajno smanjenje procenta oštećenih ćelija samo 30 min nakon dejstva hormona. U ćelijama koje nisu dodatno inkubirane s DOLE trend je bio sličan, statistički značajno smanjenje procenta oštećenja DNK je detektovano isto 30 min nakon dejstva DES-a. Statistički značajna razlika između ćelija inkubiranih sa i bez DOLE nije utvrđena, te se može pretpostaviti da stimulacija reparacije DNK nije mehanizam koji je značajno doprineo antigenotoksičnom efektu DOLE. Saznanje da je DES analog estradiola, i da je vrlo snažan agonist oba estrogena receptora (Jordan, 2013), sa većim afinitetom vezivanja za estrogene receptore od estradiola (Kuiper i sar., 1997), može pružiti objašnjenje za slične rezultate naše studije koji su dobijeni u tretmanu ćelija s estradiolom i DES-om.

### **5.3. ZAKLJUČNA RAZMATRANJA**

Antigenotoksični efekti DOLE na oštećenja DNK izazvana testiranim hormonima mogli bi se objasniti na sledeće načine. Adrenergički receptori spadaju u superfamiliju GPCR transmembranskih receptora (Goodman i Gilman, 2011), dok kod ostala tri hormona receptori spadaju u superfamiliju steroidnih i tireoidnih jedarnih receptora (Zhang i Lazar, 2010). Prisutvo adrenergičkih receptora na membrani ćelije omogućava da efekti adrenalina nastaju brzo, ali traju kratko, obzirom da poluživot adrenalina u cirkulaciji iznosi nekoliko minuta (Goodman i Gilman, 2011). U našem istraživanju je pokazan niži stepen oštećenja DNK molekula u tretmanu s adrenalinom u odnosu na ostale hormone, što je u saglasnosti sa rezultatima da hormoni stresa na molekularnom nivou indukuju oštećenje DNK ali istovremeno sprečavaju ulazak ćelije u apoptozu (McGregor i sar., 1988). Naime, Mihara i sar. (1999) su pokazali da visoke koncentracije T<sub>4</sub> nakon trosatne kultivacije, stvaranjem ROS, indukuju oštećenja DNK i apoptozu humanih limfocita *in vivo* i *in vitro*. Iako su u našoj studiji ćelije u apoptozu isključene iz brojanja i analize, može se pretpostaviti da bi viši stepeni oštećenja DNK, zabeleženi kod tiroksina i oba estrogena, dužom inkubacijom verovatno rezultirali ćelijskom apoptozom. Sagledavajući kinetiku ispoljavanja oštećenja

DNK pod uticajem hormona, može se reći da je nakon tretmana adrenalinom, E2 i DES procenat ćelija sa oštećenjem bio približno isti u svim vremenskim intervalima. Kod T<sub>4</sub> je zabeležen drukčiji trend, gde je 60 min nakon tretmana došlo do značajnog smanjenja procenta ćelija sa oštećenjima DNK u odnosu na 45 min, što može biti posledica drukčijeg mehanizma degradacije tiroksina (Kannamkumarath i sar., 2004; Peeters i Viser, 2017) i bržeg smanjenja genotoksičnog efekta. Detaljno objašnjenje za navedene razlike bi trebalo potražiti u budućim *in vivo* ispitivanjima.

Antigenotoksični potencijal DOLE u odnosu na oštećenja DNK izazvana odabranim oksidansima, proizilazi iz sinergističkog delovanja povećanja antioksidativnog kapaciteta ćelija, uklanjanja slobodnih radikala i stimulacije DNK reparacije. Rezultati studije ukazuju na činjenicu da DOLE nije značajno uticao na stimulaciju kinetike reparacije oštećenja DNK nastalih usled dejstva odabranih hormona. Takođe je uočeno da su ćelijski mehanizmi reparacije DNK molekula bez dejstva DOLE bili efikasni u smanjenju procenta ćelija sa DNK oštećenjem izazvanim testiranim hormonima. Sa druge strane, niži procenat ćelija s oštećenjima DNK u pretretmanu kvercetinom i DOLE u odnosu na oštećenja izazvana s T<sub>4</sub>, E2 i DES, ukazuje da je DOLE verovatno povećao antioksidativni kapacitet ćelija, uklanjao slobodne radikale i interagovao s molekulom DNK putem interkalacije i vezivanjem za veliki žleb DNK, čime je ispoljio zaštitni efekat.

Poznato je da komponente DOLE dovode do blokade/smanjivanja aktivnosti  $\beta$ -adrenergičkih receptora (Somova i sar., 2004; Castaner i sar., 2012), čime se može objasniti drukčija distribucija oštećenja u tretmanu adrenalinom i DOLE u odnosu na oštećenja izazvana drugim hormonima. Značajno je istaći da polifenolna jedinjenja iz masline imaju sličnosti sa strukturom estrogena, tako da mogu da interaguju sa estrogenskim receptorima (Boss i sar., 2016b). Takođe, postoje podaci da je oleanolinska kiselina, iz lista masline, agonist tireoidnih receptora (Al-Qarawi i sar., 2002). Navedeni podaci, uz činjenicu da receptori T<sub>4</sub>, E2 i DES spadaju u istu superfamiliju receptora, mogli bi objasniti isti trend smanjenja oštećenja DNK u pretretmanu izazvanih ovim hormonima u prisustvu DOLE (Zhang i Lazar, 2010). Saznanje da oleanolinska kiselina predstavlja agonist tireoidnih receptora, pruža objašnjenje za razliku u kinetici ispoljavanja oštećenja DNK izazvanih tiroksinom u prisustvu DOLE i bez njega. Dodatna ispitivanja uticaja DOLE na ćelijske receptore bi bila od značaja za sagledavanje njegovog antigenotoksičnog efekta na ćelijskom nivou.

Naša studija je potvrdila sposobnost tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstibestrola da budu medijatori oštećenja DNK molekula, i pokazala da se ta oštećenja mogu smanjiti

delovanjem nutritivnih antioksidanasa. Na osnovu svega prikazanog, evidentan je zaštitni efekat DOLE u odnosu na oštećenja DNK izazvana sa četiri odabrana hormona. O'Brien i sar. (2006) su uočili da sastojci hrane mogu da deluju kao značajna bioaktivna jedinjenja i da biljni ekstrakti imaju zaštitnu ulogu. Pretpostavlja se da je DOLE modulirao stepen oštećenja DNK izazvanih hormonima, sprečavanjem stvaranja slobodnih radikala i/ili stimulisanjem komponenti antioksidativnog sistema odbrane ćelija. S obzirom da oksidativna oštećenja DNK igraju značajnu ulogu u mutagenezi, kancerogenezi, starenju i drugim bolestima, upotreba hrane bogate antioksidansima ili uzimanje suplemenata, kao što su biljni ekstrakti bogati polifenolima, predstavlja dobru strategiju za smanjenje oksidativnog stresa. Predstavljeni *in vitro* model na ćelijama periferne krvi čoveka, pružio je rezultate koji su korisni za dalju upotrebu DOLE u *in vivo* studijama, kao i u budućim kliničkim ispitivanjima koja bi pomogla u potpunom rasvetljavanju mehanizama kojima DOLE ispoljava svoj antigenotoksični potencijal.



## 6. ZAKLJUČCI

Celokupni rezultati eksperimentalnog *in vitro* ispitivanja su pokazali procenu antigenotoksičnog potencijala suvog ekstrakta lista masline na primarna oštećenja DNK izazvana hormonima tiroksinom, adrenalinom, estradiolom i dietilstilbestrolom u leukocitima periferne krvi čoveka primenom komet testa. Na osnovu analize dobijenih rezultata u okviru postavljenih ciljeva istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- tiroksin, adrenalin, estradiol i dietilstilbestrol su u većim koncentracijama doveli do značajnog povećanja primarnih oštećenja DNK u leukocitima periferne krvi čoveka, čime su ispoljili genotoksični efekat.
- antioksidans kvercetin je značajno smanjio količinu DNK oštećenja izazvanih odabranim hormonima, na osnovu čega je bilo moguće pretpostaviti da genotoksični efekti tiroksina, adrenalina, estradiola i dietilstilbestrola mogu biti modifikovani antioksidansima.
- suvi ekstrakt lista masline je pokazao sposobnost da smanji primarna oštećenja DNK izazvana hormonima tiroksinom, adrenalinom, estradiolom i dietilstilbestrolom u leukocitima periferne krvi čoveka. Sve testirane koncentracije DOLE su ispoljile značajan antigenotoksični potencijal u odnosu na oštećenja izazvana hormonima u oba eksperimentalna protokola, u pretretmanu i posttretmanu.
- stimulacija reparacije oštećenja DNK molekula nije glavni mehanizam kojim je suvi ekstrakt masline ispoljio antigenotoksični potencijal.

## 7. REFERENCE

- Abo Ghanema II, Sadek KM. (2012) Olive leaves extract restored the antioxidant perturbations in red blood cells hemolysate in streptozotocin induced diabetic rats. *WASET*. 64: 159–165.
- Adameova A, Abdellatif Y, Dhalla NS. (2009) Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 87: 493-514.
- Aherne SA, O'Brien NM. (2000) Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med* 29: 507-514.
- Ahmad ME, Shadab GGHA, Hoda A, Afzal M. (2000) Genotoxic effects of estradiol-17 on human lymphocyte chromosomes. *Mutat Res*. 466: 109–115.
- Al Faisal AHM, Al-Ramahi ITK, Hassan IARA. (2014) Micronucleus frequency among Iraqi thyroid disorder patients. *Comp Clin Pathol*. 23: 683–688.
- Al-Qarawi AA, Al-Damegh MA, ElMougy SA. (2002) Effect of freeze dried extract of *Olea europaea* on the pituitary-thyroid axis in rats. *Phytother Res*. 16(3): 286-287.
- Anderson D, Schmid TE, Baumgartner A, Cemeli-Carratala E, Brinkworth MH, Wood JM. (2003) Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the Comet assay). *Mutat Res*. 544: 173–178.
- Anderson D. (2001) Factors that contribute to biomarker responses in humans including a study in individuals taking Vitamin C supplementation. *Mutat Res*. 480–481: 337-347.
- Anderson D, Phillips BJ. (1999) Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 37: 1015-1025.

Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. (1994) The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat Res.* 307: 261–271.

Andreoli C, Rossi S, Leopardi P, Crebelli R. (1999) DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat Res.* 438: 37–45.

Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. (2002) Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *J Med Food.* 5: 1–7.

Anter J, Fernandez-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millan M, Alonso-Moraga A, Muñoz-Serrano A, Luque de Castro MD. (2011) A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutat Res.* 723(2): 165–170.

Aruoma OI, Deiana M, Jenner A, Halliwell B, Kaur H, Banni S, Corongiu FP, Dessi MA, Aeschbach R. (1998) Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem.* 46: 5181–5187.

Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. (1997) Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis.* 18: 1763–1766.

Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Megata Y, Kato K. (1987) Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology.* 121(6): 2112–2118.

Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, Pal B, Wu D, Simpson ER, Yasuda H, Smyth GK, Martin TJ, Lindeman GJ, Visvader JE. (2010) Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature.* 465(7299): 798–802.

- Axelrod J, Reisine TD. (1984) Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science*. 224: 42–49.
- Badouard C, Menezo Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J, Favier A. (2008) Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote*. 16: 9-13.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. (1996) Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73: 1589–1593.
- Banerjee SK, Banerjee S, Li SA, Li JJ. (1991) In: Li JJ, Li SA, Nandi S (eds) *Hormonal carcinogenesis*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 247– 250.
- Barros RP, Gustafsson JA. (2011) Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab*. 14(3): 289-299.
- Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA. (2006) Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med*. 12(9): 425-431.
- Barros RP, Machado UF, Warner M, Gustafsson JA. (2006) Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(5): 1605-1608.
- Bassett JD. (2011) Thyroid hormone action: genomic and non-genomic effects. Presented at Society for Endocrinology BES 2011, Birmingham, UK. *Endocrine Abstracts*. 25: S6.1.
- Beato M, Chavez S, Truss M (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*. 61(4): 240–251.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol*. 233: 229-240.
- Behonick GS, Novak MJ, Nealley EW, Baskin SI. (2001) Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (Aminochromes). *J Appl Toxicol*. 21(1): 15–22.
- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans*. 31: 1441-1444.

Bell DR. (2009). *Medical physiology: principles for clinical medicine* (3rd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 312.

Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. (2004) Radioprotective Effects In Vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray-Induced Chromosomal Damage: Comparative Study Versus Several Flavonoids and Sulfur-Containing Compounds. *Journal of Medicinal Food*. 5(3):125-135.

Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio JA. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*. 68(4): 457–462.

Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM. (2010) Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan J Med*. 5: 1–6.

Berkner PD, Starkman H, Person N. (1991) Acute thyroxine overdose; therapy with sodium ipodate: Evaluation of clinical and physiologic parameters. *J Emerg Med*. 9: 129-131.

Betteridge DJ. (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*. 49(2) (Suppl 1): 3-8.

Bindoli A, Rigobello MP, Deeb DJ. (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med*. 13: 391–405.

Bindoli A, Deeb DJ, Rigobello MP, Galzigna L. (1990) Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim Biophys Acta*. 26: 349–356.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*. 5(1): 9–19.

Boss A, Kao CHJ, Murray PM, Marlow G, Barnett MPG, Ferguson LR. (2016a) Human Intervention Study to Assess the Effects of Supplementation with Olive Leaf Extract on Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression. *Int J Mol Sci*. 17(12): 1-21.

Boss A, Bishop KS, Marlow G, Barnett MPG, Ferguson LR. (2016b) Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients*. 8(8): 513.

Brent GA. (2012) Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 122(9): 3035-3043.

Brent GA. (2010) Environmental exposures and autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 20(7): 755–761.

Briante R, Febbraio F, Nucci R. (2003) Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. *J Agric Food Chem.* 51: 6975–6981.

Brunelleschi S, Amoruso A, Bardelli C, Romani A, Ieri F, Franconi F. (2010) Chapter 117: Minor polar compounds in olive oil and NF- $\kappa$ B translocation. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (1st Edition). Preedy V. and Watson R. (eds.), Academic Press 1079-1086. pp 1520

Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC., eds. (2011) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* (12th ed.). New York: McGraw-Hill. pp. 2084

Burcham PC. (1998) Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis.* 13: 287-305.

Burn JH, Hutcheon DE, Parker RH. (1950) Adrenaline and noradrenaline in the suprarenal medulla after insulin. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy.* 5(3): 417–23.

Čabarkapa A, Dekanski D, Živković L, Milanović-Čabarkapa M, Bajić V, Topalović D, Giampieri F, Gasparri M, Battino M, Spremo-Potparević B. (2017) Unexpected effect of dry olive leaf extract on the level of DNA damage in lymphocytes of lead intoxicated workers, before and after CaNa<sub>2</sub>EDTA chelation therapy. *Food Chem Toxicol.* 106(B): 616-623.

Čabarkapa A, Živković L, Borozan S, Zlatković-Švenda M, Dekanski D, Jančić I, Radak-Perović M, Bajić V, Spremo-Potparević B. (2016) Dry Olive Leaf Extract in Combination with Methotrexate Reduces Cell Damage in Early Rheumatoid Arthritis Patients-A Pilot Study. *Phytotherapy Research.* 30(10):1615-1623.

Čabarkapa A. (2016) Uticaj etanolnog ekstrakta lista masline (*Olea europaea* L.) na genomsku nestabilnost, parametre oksidativnog stresa i inflamacije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 1–130.

Candeias LP, Patel KB, Stratford MRL, Wardman P. (1993) Free hydroxyl radicals are formed upon reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Letters*. 331: 151-153.

Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, Lercker G, Compagnone D, FernandezGutierrez A. (2005) Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem*. 53: 8918–8925.

Carrera-González MP, Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, Martínez-Martos JM. (2013) Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends Food Sci Technol*. 31: 92–99.

Castañer O, Covas MI, Khymenets O, Nyssonen K, Konstantinidou V, Zunft HF, de la Torre R, Muñoz-Aguayo D, Vila J, Fitó M. (2012) Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *Am J Clin Nutr*. 95(5): 1238-1244.

Cavalieri EL, Rogan EG. (2004) A unifying mechanism in the initiation of cancer and other diseases by catechol quinones. *Ann N Y Acad Sci*. 1028: 247–257.

Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. (2000) Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents—DNA Adducts and Mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 27: 75–93.

Cemeli E, Anderson A. (2011) Mechanistic Investigation of ROS-Induced DNA Damage by Oestrogenic Compounds in Lymphocytes and Sperm Using the Comet Assay. *Int J Mol Sci*. 12: 2783–2796.

Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. (2009) Antioxidants and the comet assay. *Mutat Res*. 681(1): 51–67.

Cemeli E, Schmid TE, Anderson D. (2004) Modulation by flavonoids of DNA damage induced by estrogen-like compounds. *Environ Mol Mutagen.* 44: 420–426.

Chandra AK, Sinha S, Choudhury SR. (2010) Thyroxine induced stress and its possible prevention by catechin. *Indian Journal of Experimental Biology.* 48(6): 559–565.

Chang YT, Chang WN, Tsai NW, Huang CC, Kung CT, Su YJ, Lin WC, Cheng BC, Su CM, Chiang YF, Lu CH. (2014) The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in alzheimer's disease: a systematic review. *BioMed Research International.* 2014: Article ID 182303, 14 pages.

Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. (2010) Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 31(2): 139–170.

Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 68: 307–312.

Cignarella A, Kratz M, Bolego C. (2010) Emerging role of estrogen in the control of cardiometabolic disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* 31(4):183-189.

Clayson DB, Mehta R, Iverson F. (1994) Oxidative DNA damage: the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutat Res.* 317: 25-42.

Clewell AE, Béres E, Vértesi A, Glávits R, Hirka G, Endres JR, Murbach TS, Szakonyiné IP. (2015) A Comprehensive Toxicological Safety Assessment of an Extract of *Olea Europaea* L. Leaves (Bonolive™). *International Journal of Toxicology.* 35(2): 208 – 221.

Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. (2003) Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis.* 24: 511-515.

Collins AR. (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. *BioEssays.* 21: 238-246.

Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M. (1998) Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J.* 12: 1397-1400.



Collins AR, Dušinská M, Gedik CM, Stětina R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect.* 104(suppl. 3): 465–469.

Cömert ED, Gökmen V. (2018) Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International.* 105: 76-93.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17(10): 1195–1214.

Coss CC, Jones A, Parke DN, Narayanan R, Barrett CM, Kearbey JD, Veverka KA, Miller DD, Morton RA, Steiner MS, Dalton JT. (2012) Preclinical characterization of a novel diphenyl benzamide selective ER $\alpha$  agonist for hormone therapy in prostate cancer. *Endocrinology.* 153(3): 1070–1081.

Couse JF, Dixon D, Yates M, Moore AB, Ma L, Maas R, Korach KS. (2001) Estrogen receptor-alpha knockout mice exhibit resistance to the developmental effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on the female reproductive tract. *Dev Biol.* 238: 224–238.

Crespo ME, Bicho MP. (1995) Membrane-Mediated Effects of Catecholamines on the DNA of Human Leukocytes: The Role of Reactive Oxygen Species abstract. *Biol Signals.* 4: 78-85.

Cui J, Shen Y, Li R. (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 19(3): 197- 209.

Cumaoglu A, Rackova L, Stefek M, Kartal M, Maechler P, Karasu C. (2011) Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting bcells. *Acta Biochim Pol.* 58: 45–50.

da Rosa Araujo AS, de Miranda MF, de Oliveira UO, Fernandes T, Llesuy S, Rios Kucharski LC, Khaper N, Belló-Klein A. (2010) Increased resistance to hydrogen peroxide-induced cardiac contracture is associated with decreased myocardial oxidative stress in hypothyroid rats. *Cell Biochemistry and Function.* 28(1): 38–44.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006) Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem.* 52(4): 601-623.

Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. (2005) Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 24: 55-99.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 9: 169–176.

Daradka HM, Khabour OF, Alotaibi MH. (2018) Potent antioxidative DNA damage of selected Saudi medicinal plants in cultured human lymphocytes. *Pak J Pharm Sci.* 31(4)(Suppl): 1511-1517.

de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. (1999) Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 57: 445–449.

Dekanski D, Mihailović-Stanojević N, Grujić Milanović J, Jovović Dj, Miloradović Z (2014) Effects of high dose olive leaf extract on haemodynamic and oxidative stress parameters in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Serb Chem Soc.* 79(9): 1085–1097.

Dekanski D, Selaković V, Piperski V, Radulović Ž, Korenić A, Radenović L. (2011) Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomedicine.* 18: 1137–1143.

Dekanski D, Ristić S, Mitrović DM. (2009a) Antioxidant effect of dry olive (*Olea europaea* L.) leaf extract on ethanol-induced gastric lesions in rats. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism.* 2(3): 205–211.

Dekanski D, Janićijević-Hudomal S, Ristić S, Radonjić NV, Petronijević ND, Piperski V, Mitrović DM. (2009b) Attenuation of cold restraint stress-induced gastric lesions by an olive leaf extract. *General Physiology and Biophysics.* 28: 135–142.

Dekanski D, Janićijević-Hudomal S, Tadić V, Marković G, Arsić I, Mitrović D. (2009c) Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *J Serb Chem Soc.* 74(4): 367–377.

Đelić N, Radaković M, Spremo-Potparević B, Živković L, Bajić V, Stevanović J, Stanimirović Z. (2015) Evaluation of cytogenetic and DNA damage in human lymphocytes treated with adrenaline in vitro. *Toxicol in Vitro*. 29: 27–33.

Đelić N, Spremo-Potparević B, Živković L. (2008) Molecular mechanisms of mutagenic effects of hormones. *Recent Trends in Toxicology*. 1–22.

Đelić N, Đelić D, Spremo-Potparević B, Živković L, Marković B, Lozance O, Blagojević M. (2007a) Lack of clastogenic effects of L-thyroxine in whole-blood cultured human lymphocytes. *Genet Molec Bio*. 30(4): 1144–1149.

Đelić N, Nešić I, Stanimirović Z, Jovanović S. (2007b) Evaluation of the genotoxic effects of thyroxine using in vivo cytogenetic test on Swiss albino mice. *Acta Veter (Beograd)*. 57(5–6): 487–495.

Đelić N, Spremo Potparević B, Bajić V, Đelić D. (2006a) Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine in vitro. *Mutat Res*. 604: 1–7.

Đelić N, Spremo-Potparević B, Marković B, Živković L, Đelić D (2006b) Cell cycle kinetics and cytogenetic changes in human lymphocytes exposed to oestradiol in vitro. *Acta Vet Beograd*. 56: 37–48.

Đelić N, Anderson D. (2003a) The effect of the antioxidant catalase on oestrogens, triiodothyronine, and noradrenaline in the comet assay. *Teratog Carcin Mut. Supplement 2*: 69–81.

Đelić N, Đelić D, Spremo-Potparević B, Marković B, Živković L. (2003b) Cytogenetic analysis of the effects of epinephrine on cultured human lymphocytes. *Acta Veter (Beograd)*. 53(2-3): 113–120.

Đelić N. (2001a) Mechanisms of genotoxic effects of hormones. *Genetika*. 34(2–3): 59–71.

Đelić N. (2001b) Analysis of sister-chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes treated with insulin. *Folia Biologica*. 47: 28–31.

- Đelić N. (1997) Citogenetički efekti estradiola, tiroksina, insulina i adrenalina na humane limfocite in vitro. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1–179.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 18: 655–673.
- Dhillon VS, Dhillon IK. (1995) Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutat Res.* 345: 87–95.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol. Med.* 32: 1102-1115.
- Dizdaroglu M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 275(3-6): 331–342.
- Dobrzyńska MM, Baumgartner A, Anderson D. (2004) Antioxidants modulate thyroid hormone- and noradrenaline-induced DNA damage in human sperm. *Mutagenesis.* 19(4): 325–330.
- Dut R, Dizdar EA, Birben E, Sackesen C, Soyer OU, Besler T, Kalayci O. (2008) Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma. *Allergy.* 63: 1605–1609.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. (1996) Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 56: 1291-1295.
- Eckert I, Stopper H. (1996) Genotoxic effects induced by beta-oestradiol in vitro. *Toxicol in Vitro.* 10(5): 637-642.
- El SN, Karakaya S. (2009) Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews.* 67(11): 632–638.
- El-Damrawy SZ. (2011) Alleviate the oxidative stress in aged rabbit bucks by using olive leave extract. *Egypt Poult Sci.* 31: 737–744.

Erkoç, Ş., Erkoç F, Keskin N. (2003) Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *Journal of Molecular Structure: Theochem.* 631(1): 141-146.

Esmaili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmailpour K, Abbasnejad M, Rasouljan B, Sheibani V, Kaeidi A, Hajjalizadeh Z. (2010) Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 132: 200-205.

Evans MD, Cooke MS. (2004) Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays.* 26(5): 533-542.

Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. (2008) Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr.* 138(8): 1411–1416.

Feldberg W, Minz B, Tsudzimura H. (1934) The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *The Journal of Physiology.* 81(3): 286–304.

Fernandez V, Llesuy S, Solari L, Kipreos K, Videla LA, Boveris A. (1988) Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Radical Research Communications.* 5(2): 77–84.

Fernandez V, Barrientos X, Kipreos K. (1985) Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. *Endocrinology.* 117(2): 496–501.

Finkel T, Holbrook NJ. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408(6809): 239-247.

Flint MS, Baum A, Chambers WH, Jenkins FJ. (2007) Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology.* 32(5): 470–479.

Freestone PPE, Sandrini SM, Haigh RD, Lyte M. (2008) Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in Microbiology*. 16(2): 55–64.

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P. (2015) Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 23(14): 1144–1170.

Fučić A, Stojković R, Katić J, Markovic D, Ferencić Z, Koršić M, Jazbec AM, Gamulin M. (2009) Animal model for age- and sex-related genotoxicity of diethylstilbestrol. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 42(11): 1090-1096.

Gagne F. (2014) Oxidative Stress. In: *Biochemical Ecotoxicology*. Editor(s): François Gagné, Academic Press, 103-115.

Ganong WF. (1995) *Review of Medical Physiology*. Appleton and Lange, Sherwood, pp. 306.

Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. (2003) The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis*. 18(3): 265–271.

Gedik CM, Collins A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J*. 19: 82-84.

Gedik CM, Boyle SP, Wood SG, Vaughan NJ, Collins AR. (2002) Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*. 23(9): 1441–1446.

Genova ML, Abd-Elsalam NM, Mahdy ESME, Bernacchia A, Lucarini M, Pedulli GF, Lenaz G. (2006) Redox cycling of adrenaline and adrenochrome catalysed by mitochondrial Complex I. *Arch Biochem Biophys*. 447: 167–173.

Gharsalli T. (2016) Comet Assay on Toxicogenetics; Several Studies in Recent Years on Several Genotoxicological Agents. *J Environ Anal Toxicol*. 6:418.

Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. (1995) Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med.* 122: 778–788.

Gladek A, Liehr JG. (1989) Mechanism of genotoxicity of diethylstilbestrol in vivo. *J Biol Chem.* 264(28):16847-16852.

Glatt HR, Metzler M, Oesch F. (1979) DES and 11 derivatives: a mutagenicity study with *S. typhimurium*. *Mutat Res.* 67: 113-120.

Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Gerotheranassis IP. (2009) Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol Nutr Food Res.* 53: 600–608.

Goya L, Mateos R, Bravo L. (2007) Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr.* 46: 70–78.

Halliwell B, Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142: 231–255.

Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18: 685-716.

Halliwell B, Gutteridge JMC, (Ur). *Free radicals in biology and medicine.* 3rd Ed. New York: Oxford University Press; 1999. p. 936.

Halliwell B, Aesebach R, Loliger J, Aruoma O. (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxic.* 33: 401-617.

Halliwell B, Cross CE. (1994) Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 102(Suppl): 5-12.

Hall JE, Arthur C. (2016) *Guyton Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* 13<sup>th</sup> edition

Han X, Liehr JG. (1994a) DNA single strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens. Hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis*. 15: 977–1000.

Han X, Liehr JG. (1994b) Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis*. 16: 2571–2574.

Han X, Liehr JG. (1994c) 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis. *Cancer Res*. 54: 5515–5517.

Handgraaf S, Riant E, Fabre A, Waget A, Burcelin R, Liere P, Krust A, Chambon P, Arnal JF, Gourdy P. (2013) Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ER $\alpha$  activation function-2 (ER $\alpha$ AF-2), whereas ER $\alpha$ AF-1 is dispensable. *Diabetes*. 62(12): 4098-4108.

Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, Rajagopal S, Strachan RT, Grant W, Towers AJ, Williams B, Lam CM, Xiao K, Shenoy SK, Gregory SG, Ahn S, Duckett DR, Lefkowitz RJ. (2011) A stress response pathway regulates DNA damage through  $\beta$ 2-adrenoreceptors and  $\beta$ -arrestin-1. *Nature*. 477(7364): 349-353.

Hartwig A, Dally H, Schlepegrell R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol. Lett*. 88: 85–90.

Hashimoto T, Ibi M, Matsuno K, Tanigawa T, Yoshikawa T, Yabe Nishimura C. (2004) An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic Biol Med*. 36: 555–564.

Hassen I, Casabianca H, Hosni K. (2015) Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *J Funct Foods*. 18: 926–940.



Health Council of the Netherlands. -Estradiol. Evaluation of the carcinogenicity and genotoxicity. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2013; publication no. 2013/23.

Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. (2014) Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet.* 15(9): 585-598.

Hemnani T, Parihar MS. (1998) Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol.* 42(4): 440-452.

Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis.* 13: 89–94.

Henley DV, Korach KS. (2010) Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling. *Hormones.* 9(3): 191–205.

Herington AC. (1986) Effect of disulfide bond reducing agents on the specific-binding of growth hormone to microsomal membrane preparation from rabbit liver. *Biochem Pharmacol.* 35: 1359-1364.

Hernandez LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. (2009) Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res.* 682: 94–109.

Hertog MGL, de Vries A, Ocke MC, Schouten A, Bueno de Mesquita HB, Verhagen H. (1997) Oxidative DNA damage in humans: comparison between high and low habitual fruit and vegetable consumption. *Biomarkers.* 2: 259-262.

Herzog R, Leuschner J. (1995) Evaluation of the mutagenicity of medroxyprogesterone acetate in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung.* 45(I): 311–314.

Hewitt SC, Korach KS. (2002) Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 3(3): 193-200.

Hill A, Wolff S. (1983) Sister chromatid exchanges and cell division delay induced by DES, estradiol and estriol in human lymphocytes. *Cancer Res.* 43: 4114-4118.

Hwang O. (2013) Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol.* 22: 11–17.

Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Yamamoto R, Taniguchi H. (1993) Enhancement by thyroxine of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Br J Cancer.* 68: 515–518.

Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Okuda S, Taniguchi H. (1992) Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *Int J Cancer.* 50: 974–976.

Japon-Lujan R, Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD. (2006) Dynamic ultrasound assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *J Chromatogr A.* 1108: 76–82.

Ježdimirović BM. (2005) *Veterinarska Farmakologija, III prerađeno i dopunjeno izdanje.* A. D. štamparija “KULTURA”, Bački Petrovac, 189-190.

Joosten HFP, van Acker FAA, van den Dobbelen DJ, Horbach GJM, Kraijnc EI. (2004) Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicol Lett.* 151: 113–134.

Jordan VC (2013). *Estrogen Action, Selective Estrogen Receptor Modulators, and Women's Health: Progress and Promise.* World Scientific. p. 143.

Kadrabova J, Krajcovicova-Kudlackova M, Madaric A, Valachovicova V, Mislanova C, Korenovska M. (2012) Protective properties of complex of quercetin, selenium, catechins and curcumin against DNA damage. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science.* 1(3): 179-184.

Kallaur AP, Reiche EMV, Oliveira SR, Simao ANC. (2017) Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol.* 54(1): 31-44.

Kansagra SM, McCudden CR, Willis MS. (2010) The Challenges and Complexities of Thyroid Hormone Replacement. *Laboratory Medicine.* 41(6): 338–348.

Kapiszewska M, Sołtys E, Visioli F, Cierniak A, Zajac G. (2005) The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *J Physiol Pharmacol.* 56: 183–197.

Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. (1999) Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension.* 33: 1353–1358.

Khurana (2008). *Essentials of Medical Physiology.* Elsevier India. p. 460.

Kisić-Božović B, Mirić D, Dragojević M, Dragojević I. (2006) Reactive oxygen species. *Praxis medica.* 34(1-2): 73-78.

Kiskinis E, Suter W, Hartmann A. (2002) High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis.* 17: 37-43.

Kitahama K, Pearson J, Denoroy L, Kopp N, Ulrich J, Maeda T, Jouvet M. (1985) Adrenergic neurons in human brain demonstrated by immunohistochemistry with antibodies to phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT): discovery of a new group in the nucleus tractus solitarius. *Neurosci Lett.* 53(3): 303–308.

Klabunde R. (2012) Adrenergic and Cholinergic Receptors in Blood Vessels. In: *Cardiovascular Physiology Concepts, Second Edition.* Lippincott Williams & Wilkins, pp. 256.

Klebanoff SJ. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology,* 77(5): 598-625.

Koppenol WH (2001) The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Report.* 6(4): 229–234.

Kounatidis I, Papoti VT, Nenadis N, Franzios G, Oikonomou M, Partheniou F, Tsimidou M, Mavragani-Tsipidou P. (2009) Evaluation of potential genotoxicity of virgin olive oil (VOO) using the Drosophilawing-spot test. *J Agric Food Chem.* 57: 7785-7789.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138(3): 863–870.

Lakhanpal P, Rai DK. (2007) Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update* 2(2): 22-37.

Lazarova M, Slamenova D. (2004) Genotoxic effects of a complex mixture adsorbed onto ambient air particles on human cells in vitro: the effects of vitamins E and C. *Mutat Res*. 557: 167-175.

Lee HR, Kim TH, Choi KC. (2012) Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res*. 28(2): 71-76.

Lee OH, Lee BY. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*. 101(10): 3751–3754.

Lee-Huang S, Zhang L, Lin Huang P, Chang YT, Huang PL. (2003) Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Commun*. 307(4): 1029–1037.

Levay G, Ye Q, Bodell WJ. (1997) Formation of DNA adducts and oxidative base damage by copper-mediated oxidation of dopamine and 6-hydroxydopamine. *Exp Neurol*. 146: 570–574.

Li Y, Trush MA, Yager JD. (1994) DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis*. 15(7): 1421–1427.

Lieberman M, Marks A, Peet A. (2013). *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach* (4th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. p. 175.

Liehr JG. (2001) Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Hum Reprod Update*. 7(3): 273–281.

Liehr, JG. (2000) Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen? *Endocrine Reviews*. 21(1): 40–54.

Liehr JG, Roy D. (1990) Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med*. 8:415–423.

Liehr JG, DaGue BB, Ballatore AM. (1985) Reactivity of 4', 4''-diethylstilbestrol quinone, a metabolic intermediate of diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*. 6(6): 829–836.

Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. (2006) Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond)*. 111(2): 107-118.

Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, Jia Y. (2015) A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS ONE*. 10(10): e0138904.

Liu X, Wu WK, Yu L, Sung JJ, Srivastava G, Zhang ST, Cho CH. (2008) Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase /cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem*. 105(1): 53-60.

Lockyer S, Corona G, Yaqoob P, Spencer JP, Rowland I. (2015) Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Brit J Nutr*. 114: 75-83.

Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. (2001) Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys*. 35(2): 141-170.

M'bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK. (2007) Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol*. 81: 89–99.

Manna C, Galletti P, Cucciola V, Montedoro GF, Zappia V. (1999) Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem.* 10: 159–165.

Manna C, Galletti P, Cucciola V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. (1997) The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)- ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr.* 127: 286–292.

Marselos M, Tomatis L. (1992) Diethylstilboestrol: I, Pharmacology, Toxicology and carcinogenicity in humans. *Eur J Cancer.* 28A: 1182–1189.

Martín-Vertedor D, Garrido M, Pariente JA, Espino J, Delgado-Adamez J. (2016) Bioavailability of bioactive molecules from olive leaf extracts and its functional value. *Phytoter Res.* 30(7): 1172-1179.

Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B, Giovannini C. (2004) Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr.* 134: 785–791.

McGregor D, Raich CG, Brown A, Edwards I, Reynolds D, West K, Willington S. (1988) Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. *Environ Mol Mutagen.* 11: 523–44.

Mei S, Yao Q, Wu C, Xu G. (2005) Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches-capillary electrophoresis and GC/MS: an assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827: 83-87.

Metzler M, Kulling S, Pfeiffer E, Jacobs E. (1998) Genotoxicity of estrogens. *Z Lebensm Unters Forsch.* 206(6): 367-373.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews.* 52(4): 673-751.

Mihara S, Suzuki N, Wakisakas S, Suzuki S, Sekita N, Yamamoto S, Saito N, Hoshino T, Sakane T. (1999) Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 4: 1378–1385.

Mijatović S, Timotijević G, Miljković Đ, Radović J, Maksimović-Ivanić D, Dekanski D, Stošić-Grujičić SD (2011) Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *Int J Cancer.* 128: 1955–1965.

Mikkelsen RB, Wardman P. (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene.* 22: 5734–5754.

Miljković D, Dekanski D, Miljković Z, Momčilović M. (2009) Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Nutr.* 28: 346–350.

Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y, Zhao K. (2000) DNA damage induced by catechol derivatives. *Chem Biol Interact.* 126(2): 125–136.

Mladenović MJ. (2015) Efekti kvercetina i epikatehina na oksidativno-antioksidativni status pacova tretiranih bakar (II)-jonom. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 1-155.

Mobley JA, Bhat AS, Brueggemeier RW. (1999) Measurement of oxidative DNA damage by catechol estrogens and analogues in vitro. *Chem Res Toxicol.* 12: 270–277.

Moldeus P, Nordenskjold M, Bolcsfoldi G, Eiche A, Haglund U, Lambert B. (1983) Genetic toxicity of dopamine. *Mutation Research.* 124(1): 9–24.

Molina PE. (2004) *Endocrine physiology.* The McGraw-Hill Companies Inc, 298.

Montano MM, Krishnamurthy N, Sripathy S. (2012) Targeting the genotoxic effects of estrogens. *Drug Discov Today Dis Mech.* 9(1-2): e29–e33.

Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T, Hayashi M. (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. *Mammalian Mutagenicity Study Group. Mutat Res.* 389(1): 3-122.

Murphy E. (2011) Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res.* 109(6): 687-696.

Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. (2002) Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med.* 32: 386-393.

Narayana KR, Sripal RM, Chaluvadi MR, Krishna DR. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.* 33(1): 2-16.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=448537, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/448537> (accessed Jan. 6, 2019).

National Toxicology Program (U.S.), United States. Public Health Service 1985 Fourth Annual Report on Carcinogens: Summary 1985. pp. 333.

Neave N. (2008) *Hormones and behaviour: a psychological approach.* Cambridge: Cambridge Univ. Press. ISBN 978-0521692014.

Nelson LR, Bulun SE. (2001) Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 45(3 Suppl): S116-124.

Nilsson BO, Olde B, Leeb-Lundberg LM. (2011) G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. *Br J Pharmacol.* 163(6): 1131-1139.

Nimse SB, Pal D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5: 27986–28006.

Nutter LM, Wu YY, Ngo EO, Sierra EE, Gutierrez PL, Abul-Hajj YJ. (1994) An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol.* 7: 23–28.

Nutter LM, Ngo EO, Abul-Hajj YY. (1991) Characterization of DNA damage induced by 3,4-estrone-o-quinone in human cells. *J Biol Chem.* 226: 16380–16386.



O'Brien NM, Carpenter R, O'Grady MN, Kerry JPJ. (2006) Modulatory effects of resveratrol, citroflavan-3-ol, and plant-derived extracts on oxidative stress in U937 cells. *Med Food*. 9: 187–195.

Oh JH, Choi MS, Park HJ, Park SM, Lee EH, Kang SJ, Choi JS, Yoon S. (2010) Gene expression profiles of TM4 mouse Sertoli cells after 1,3-dinitrobenzene exposure and analysis of genes related to tight junction signaling pathways. *Bio Chip J*. 4(4): 313–321.

Okamoto T, Adachi K, Muraishi A, Seki Y, Hidaka T, Toshima H. (1996) Induction of DNA breaks in cardiac myoblast cells by norepinephrine. *Biochem Mol Biol Int*. 38(4): 821–827.

Özcan MM, Matthäus B. (2017) A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Eur Food Res Technol*. 243: 89-99.

Parihar MS, Dubey AK, Javeri T, Prakash P. (1996) Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *J Therm Biol*. 21(5): 323-330.

Parihar MS, Dubey AK. (1995) Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female fresh water catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comp biochem Physiol*. 112C: 309-313.

Parzonko A, Czerwińska ME, Kiss AK, Naruszewicz M. (2013) Oleuropein and oleacein may restore biological functions of endothelial progenitor cells impaired by angiotensin II via activation of Nrf2/heme oxygenase-1 pathway. *Phytomedicine*. 20: 1088–1094.

Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B, Aydogan C. (2008) Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*. 22(9): 1239-1242.

Pflaum M, Will O, Epe B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*. 18: 2225 –2231.

Prise KM, Davies S, Michael BD. (1993) Evidence for Induction of DNA Double-Strand Breaks at Paired Radical Sites. *Radiat Res.* 134(1): 102-106.

Pylkkänen L, Jahnukainen K, Parvinen M, Santti R. (1991) Testicular toxicity and mutagenicity of steroidal and non-steroidal estrogens in the male mouse. *Mutat Res.* 261(3): 181-191.

Radaković M, Đelić N, Stevanović J, Anđelković M, Kolarević S, Dačić S, Stanimirović Z. (2014) The investigation of DNA damage induced by adrenaline in human lymphocytes in vitro. *Acta Veter.* 64(3): 281–92.

Radaković M, Djelić N, Stanimirović Z, Plečas-Solarović B, Spremo-Potarević B, Živković L, Bajić V. (2011) Evaluation of the effects of ephedrine on human lymphocytes in the comet assay. *Acta Veterinaria (Beograd).* 61: 363-371.

Rajapakse N, Butterworth M, Kortenkamp A. (2005) Detection of DNA Strand Breaks and Oxidized DNA Bases at the Single-Cell Level Resulting From Exposure to Estradiol and Hydroxylated Metabolites. *Environ Mol Mutagen.* 45: 397–404.

Ravina E. (2011). *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs.* John Wiley & Sons. p. 177.

Raymondos K, Panning B, Leuwer M, Brechelt G, Korte T, Niehaus M, Tebbenjohanns J, Piepenbrock S. (2000) Absorption and hemodynamic effects of airway administration of adrenaline in patients with severe cardiac disease. *Annals of Internal Medicine.* 132(10): 800–803.

Reiter RJ. (1997) Oxidative processes and antioxidative defense Mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20(7): 933-956.

Richter C. (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys lipids.* 44: 175-179.

Rosier JA, Van Peteghem CH. (1989) Peroxidative in vitro metabolism of diethylstilbestrol induces formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Carcinogenesis*. 10: 405–406.

Roy D, Colerangle JB, Singh KP. (1998) Is exposure to environmental or industrial endocrine disrupting estrogen-like chemicals able to cause genomic instability? *Front Biosci*. 3: d913-d921.

Roy D, Liehr JG. (1992) Target organ-specific inactivation of drug metabolizing enzymes in kidney of hamsters treated with estradiol. *Mol Cell Biochem*. 110: 31–39.

Rüdiger HW, Haenisch F, Metzler M., Oesch F, Glatt HR. (1979) Metabolites of diethylstilboestrol induce sister chromatid exchange in human cultured fibroblasts. *Nature*. 281(5730): 392-394.

Ruhs S, Nolze A, Hübschmann R, Grossmann C. (2017) 30 years of the mineralocorticoid receptor: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *J Endocrin*. 234(1): T107–T124.

Ryu SJ, Choi HS, Yoon KY, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. (2015) Oleuropein suppresses LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cell and zebrafish. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63: 2098-2105.

Sabatini L, Barbieri A, Tosi M, Roda A, Violante FS. (2005) A method for routine quantitation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on solid-phase extraction and micro-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 19: 147-152.

Sabry OMM. (2014) Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. *Journal of Natural Sciences Research*. 4(19): 1-9.

Saeter G, Seglen PO. (1990) Cell biology of hepatocarcinogenesis. *Crit Rev Oncog*. 1(4): 437-466.

Sahoo DK, Roy A, Chainy GBN. (2008) Protective effects of vitamin E and curcumin on l-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*. 176(2-3): 121–128.

Salmon TB, Evert BA, Song B, Doetsch PW. (2004) Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 32(12): 3712-3723.

Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Sapeva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Galli C, Romani A, Mulinacci N, Bortolomeazzi R, Dolaro P, Palli D. (2006) Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr*. 95: 742–751.

Samet I, Han J, Jlaiel L, Sayadi S, Isoda H. (2014) Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. *Oxid Med Cell Long*. 2014: Article ID 927619, 16 pages.

Schuler M, Huber K, Zankl H, Metzler M. (1996) In: Li JJ, Li SA, Gustafsson JA, Nandi S, Sekely LI (eds) *Hormonal carcinogenesis II*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 458 – 462.

Segars JH, Driggers PH. (2002) Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab*. 13(8): 349-354.

Shadab GGHA, Ahmad ME, Azfer MA. (2006) Anticlastogenic action of vitamin C against genotoxicity of estrogenic drug diethylstilbestrol (DES) in the human lymphocyte chromosomes. *J Environ Biol*. 27: 85–88.

Shelby MD, Tice RR, Witt KL. (1997) 17-beta-estradiol fails to induce micronuclei in the bone marrow cells of rodents. *Mutat Res*. 395(1): 89-90.

Shi H, Noguchi N, Niki E. (2001) Introducing natural antioxidants. In: *Antioxidants in food, Practical applications*. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England, pp. 147-158.

Silva S, Gomes L, Leitao F, Coelho AV, Boas LV. (2006) Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci Tech Int.* 12(5): 385–395.

Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids.* 69(8-9): 537-542.

Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, Kovacic A, Zhou J, Clyne CD. (2005) Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev.* 26(3): 322-330.

Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Taioli E, Farmer PB. (2007) The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 620(1–2): 83-92.

Singh NP. (2005) Apoptosis assessment by the DNA diffusion assay. *Meth Mol Med.* 111: 55–67.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 175: 184–191.

Sirota TV. (2011) A Novel Approach to Study the Reaction of Adrenaline Autooxidation: a Possibility for Polarographic Determination of Superoxide Dismutase Activity and Antioxidant Properties of Various Preparations. *Biochem (Mosc). Suppl Ser B: Biomed Chem* 5: 253–259.

Sneader W. (2005) *Drug Discovery: A History.* John Wiley & Sons. pp.196–197. ISBN 978-0-470-01552-0.

Somova LI, Shode FO, Mipando M. (2004) Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine.* 11: 121–129.

Spencer WA, Jeyabalan J, Kichambre S, Gupta RC. (2011) Oxidatively generated DNA damage after Cu(II) catalysis of dopamine and related catecholamine neurotransmitters and neurotoxins: Role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 50(1): 139-147.

St. Germain DL, Galton VA, Hernandez A. (2009) Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. *Endocrinology.* 150(3): 1097–1107.

Stack DE, Byun J, Gross ML, Rogan EG, Cavalieri EL. (1996) Molecular Characteristics of Catechol Estrogen Quinones in Reactions with Deoxyribonucleosides. *Chem Res Toxicol.* 9: 851– 859.

Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015 111:A3.B.1-3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.

Stupans I, Kirlik A, Tuck KL, Hyball PJ. (2002) Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *J Agric Food Chem.* 50: 2464–2469.

Sudhir K, Komesaroff PA. (1999) Clinical review 110: Cardiovascular actions of estrogens in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(10): 3411-3415.

Talhaoui N, Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res Int.* 77: 92–108.

Tanabe Y, Yano T, Nakamura T. (1983) Steroid hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic ducks. *Gen Comp Endocrinol.* 49(1): 144-153.

Tapiero H, Nguyen Ba G, Tew KD. (2002) Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother.* 56: 36-44.

Thakkar NV, Jain SM. (2010) A comparative study of DNA damage in patients suffering from Diabetes and thyroid dysfunction and complications. *Clin Pharmacol Adv Appl.* 2: 199–205.

Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. (2009) Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Report*. 14(3): 102-108.

Thomas RD, Roy D. (2001) Base sequence-specific attack of stilbene estrogen metabolite(s) on the mitochondrial DNA: implications in the induction of instability in the mitochondrial genome in the kidney of Syrian hamsters. *Int J Mol Med*. 7: 389-395.

Thorstensen K, Romslo I. (1984) Uptake of iron from transferrin by isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 804: 200-208.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 35(3): 206-221.

Tseng YCL, Latham KR. (1984) Iodothyronines: Oxidative deiodination by hemoglobin and inhibition of lipid peroxidation. *Lipids*. 19(2): 96-102.

Tsujimoto G, Tsujimoto A, Suzuki E, Hashimoto K. (1989) Glycogen phosphorylase activation by two different alfa1-adrenergic receptor subtypes: metoxamine selectivity stimulates a putative alfa1-adrenergic receptor subtypes (alfa1) that couples with Ca<sup>2+</sup> influx. *Mol Pharmacol*. 36: 166-176.

Tsutsui T, Tamura Y, Hagiwara M, Miyachi T, Hikiba H, Kubo C, Barrett JC. (2000) Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis*. 21: 735-740.

Tsutsui T, Taguchi S, Tanaka Y, Barrett JC. (1997) 17beta-estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer*. 70(2): 188-193.

Tsutsui T, Degen GH, Schiffmann D, Wong A, Maizumi H, Mclachlan JA, Barrett JC. (1984) Dependence on exogenous metabolic activation for induction of unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells by diethylstilbestrol and related compounds. *Cancer Res*. 44(1): 184-189.

Tsutsui T, Maizumi H, Mclachlan JA, Barrett JC. (1983) Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res.* 43(8): 3814-3821.

Turkez H, Togar B. (2011) Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes. *J Toxicol Sci.* 36(5): 531-537.

Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, Lightman SL. (1995) Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology.* 136(10): 4182-4187.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. (2013) Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 10(9): 3886-3907.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39(1): 44-84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160: 1-40.

Varagic VM, Milošević MP. (2003) *Farmakologija* (18.izd.), Beograd, Elit-Medica, 250-252.

Vasto S, Barera A, Rizzo C, di Carlo M, Caruso C, Panotopoulos G. (2014a) Mediterranean diet and longevity: an example of nutraceuticals? *Current Vascular Pharmacology.* 12(5): 735-738.

Vasto S, Buscemi S, Barera A, di Carlo M, Accardi G, Caruso C. (2014b) Mediterranean diet and healthy ageing: a sicilian perspective. *Gerontology.* 60(6): 508-518.

Venditti P, di Meo S. (2006) Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 63(4): 414-434.

Venditti P, Balestrieri M, di Meo S, de Leo T. (1997) Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues.



Journal of Endocrinology. 155(1): 151–157.

Villanueva I, Alva-Sánchez C, Pacheco-Rosado J. (2013) The role of thyroid hormones as inducers of oxidative stress and neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: article ID 218145, 15 pages.

Visioli F, Poli A, Galli C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*. 22: 65–75.

Vissers MN, Zock PL, Katan MB. (2004) Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr*. 58: 955–965.

Vliet AVD, Bast A. (1992) Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *Chem Biol Interactions*. 85: 95-116.

von Bohlen und Halbach O, Dermietzel R. (2006) Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 402.

Von Sonntag C. The chemical basis of Radiation Biology London, Taylor and Francis, 1987.

Waldum H L, Brenna E, Sandvik AK, Syversen U, Falkmer S. (1998) Hormones and carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer*. 5(1): 45-48.

Wang L, Geng C, Jiang L, Gong D, Liu D, Yoshimura H, Zhong L. (2008) The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. *Eur J Nutr*. 47: 235-243.

Wang MY, Liehr JG. (1995) Induction by estrogens of lipid peroxidation and lipid peroxide-derived malonaldehyde-DNA adducts in male Syrian hamsters: role of lipid peroxidation in estrogeninduced kidney carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 16: 1941–1945.

Wass JAH, Stewart PM., eds. (2011). Oxford Textbook of Endocrinology and diabetes (2nd ed.). Oxford: Oxford University Press. p. 18. ISBN 978-0-19-923529-2

Wermuth CG, Aldous D, Raboisson P, Rognan D (2015) *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier Science. p. 244–245.

Williams GR. (2008) Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol.* 20(6):784–794.

Willner C. (2004) An overview of the pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Altern Ther Health Med.* 10(4): 26-34.

Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. (2005) Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res.* 582: 155–162.

Winter ML, Liehr JG. (1991) Free radical-induced carbonyl content in protein of estrogen-treated hamsters assayed by sodium boro- [3 H]-hydride reduction. *J Biol Chem.* 266: 14446–14450.

Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. (1995) DNA damage and cancer: Measurement and mechanism. *Cancer Letters.* 93: 113-120.

Wojcikowski K, Stevenson LM, Leach DN, Wohlmuth H, Gove G. (2007) Antioxidant capacity of 55 medicinal herbs traditionally used to treat the urinary system: a comparison using a sequential three solvent extraction process. *J Altern Complement Med.* 13(1): 103-109.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. (2004) Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 339: 1-9.

Yagi E, Barrett JC, Tsutsui T. (2001) The ability of four catechol estrogens of 17beta-estradiol and estrone to induce DNA adducts in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Carcinogenesis.* 22: 1505–1510.

Yao H, Duan Z, Wang M, Awonuga AO, Rappolee D, Xie Y. (2009) Adrenaline induces chemoresistance in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 190(2): 81-87.

Yared E, McMillan TJ, Martin FL. (2002) Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. *Mutagenesis*. 17(4): 345–352.

Zhang J, Lazar MA. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*. 62: 439-466.

Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. (2008) Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med*. 38: 401–423.

## **BIOGRAFIJA KANDIDATA**

Dijana B. Topalović je rođena 6.8.1975. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu (Zemunsku gimnaziju). Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, je završila 2004. godine, sa prosekom 8,28. 2012. godine upisala je doktorske akademske studije na istom fakultetu, smer Biologija, modul Genetika. Od 2004. do 2006. godine je bila angažovana kao saradnik na projektu na Katedri za ekologiju i geografiju biljaka Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 2006. do 2012. godine je bila angažovana kao saradnik u nastavi na Katedri za fiziologiju i Katedri za botaniku Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na predmetima Biologija sa humanom genetikom, Fiziologija i Botanika. Od 2012. godine je zaposlena na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta.

Dijana B. Topalović je od 2003. godine bila učesnik nekoliko nacionalnih i međunarodnih projekata. Od 2013. godine je angažovana kao istraživač na projektu "Aberacije ćelijskog ciklusa i uticaj oksidativnog stresa na neurodegenerativne procese i malignu transformaciju ćelije" (OI 173034). Od 2016. godine je učestvovala u realizaciji bilateralnog projekta sa Republikom Slovenijom. Učesnik je na dve COST akcije (CA15132, CA17140).

Do sada je objavila 32 publikacije u međunarodnim i nacionalnim časopisima, poglavlja u monografijama nacionalnog značaja i saopštenja sa međunarodnih i nacionalnih skupova štampanih u izvodu. Autor je 4 i koautor 9 radova, od kojih su 2 rada kategorije M21a, 4 rada kategorije M21, 2 rada kategorije M22, 3 rada kategorije M23, 1 rad kategorije M51 i 1 rad kategorije M52. Recenzent je u međunarodnim časopisima Journal of Medicinal Plant Research i Journal of Food Process Engineering. Tečno govori engleski i slovenački, a služi se nemačkim jezikom.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Дијана Топаловић

Број индекса Б3023/2012

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Процена антигенотоксичног потенцијала етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви *in vitro* код човека**

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

Потпис аутора

У Београду, 22.4.2019.

Дијана Топаловић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Дијана Топаловић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3023/2012 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија, модул: Генетика \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Процена антигенотоксичног потенцијала етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви *in vitro* код човека \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Лада Живковић \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ др Марија Веселиновић Савић \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, \_\_\_\_\_ 22.4.2019. \_\_\_\_\_

Дијана Топаловић

## Изјава о коришћењу

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

Процена антигенотоксичног потенцијала етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви *in vitro* код човека

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_ 22.4.2019. \_\_\_\_\_

Дјана Торадић



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 прерада.** 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 прерада.** 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.