

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**BIOLOŠKI FAKULTET**

**Ivana A. Pašić**

**Antitumorska aktivnost ekstrakata i izolovanih  
jedinjenja iz biljne vrste *Cotinus coggygria* Scop.**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2026.**



**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF BIOLOGY**

**Ivana A. Pašić**

**Antitumor activity of extracts and compounds  
isolated from the heartwood of *Cotinus coggygria*  
Scop.**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2026.**



## **Mentori**

dr Ivana Matić, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Laboratorija za radiobiologiju i eksperimentalnu onkologiju

dr Miloš Brkušanin, docent i viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

## **Članovi Komisije:**

1. dr Jovan Pešović, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd
2. dr Miroslav Novaković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd
3. dr Tatjana Stanojković, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd
4. dr sc. med. Irina Besu, viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd
5. dr Goran Brajušković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

Datum odbrane doktorske disertacije:

## **Izjava zahvalnosti**

*„One must imagine Sisyphus happy.“ Albert Camus*

*„I ništa ne bi bilo kao što jeste  
da je moglo biti kao što nije.“ Matija Bećković*

***Terezi i Roki Ivanoviću***

*„Hiljadu nečijih srećnih časaka biće kao ovaj, ali ovaj nikada više.*

*Hiljadu tuđih ljubavi biće kao ova, ali ova nikada više.*

*Nikada: jedina konačnost.*

*Ceo svet i cela vasiona.*

*Nikog drugog osim nas nema.“ Meša Selimović*

## Podaci o doktorskoj disertaciji

### Antitumorska aktivnost ekstrakata i izolovanih jedinjenja iz biljne vrste *Cotinus coggygia* Scop.

Ivana A. Pašić

**Sažetak:** Cilj doktorske disertacije bio je da se odrede intenzitet, selektivnost i molekularni mehanizmi antitumorskog dejstva tri ekstrakta drvenastog dela ruja: etanolnog (EE), dihlormetanskog (MME) i vodenog (VE), kao i dvanaest jedinjenja izolovanih iz EE, na panelu humanih malignih i neizmenjenih ćelijskih linija *in vitro*. Sva tri ekstrakta ispoljila su koncentraciono-zavisnu citotoksičnost prema svim ispitivanim malignim linijama, sa najizraženijim dejstvom prema leukemijskim ćelijama: EE je prema HL-60 imao  $IC_{50} 31,04 \pm 4,30 \mu\text{g/ml}$  i prema K562  $34,84 \pm 4,24 \mu\text{g/ml}$ . Halkon butein bio je najpotentnije izolovano jedinjenje ( $IC_{50} 8,66 \pm 1,10 \mu\text{M}$  prema HeLa i  $13,91 \pm 2,61 \mu\text{M}$  prema K562), sa koeficijentom selektivnosti 9,91 prema MRC-5 ćelijama. Sekvenciranjem ukupne iRNK K562 ćelija tretiranih netoksičnim koncentracijama utvrđeno je 809 diferencijalno eksprimiranih gena nakon tretmana buteinom, 439 butinom i 299 sulfuretinom ( $FDR < 0,05$ ), sa 134 gena zajednička za sva tri tretmana. Kod malignih MDA-MB-231 ćelija butin, EE i VE doveli su do statistički značajnog smanjenja preživljavanja u odnosu na kontrolu izloženu samo zračenju, što ukazuje na radiosenzitizirajući potencijal. Rezultati ove disertacije pokazuju da srž drvenastog dela vrste *C. coggygia* predstavlja bogat izvor bioaktivnih flavonoida sa *in vitro* antitumorskim dejstvom koje se ostvaruje kroz indukciju apoptoze, poremećaj propagacije ćelija kroz ćelijski ciklus, inhibiciju migracije i reprogramiranje metaboličkih i redoks puteva malignih ćelija, pri čemu se butein, butin i sulfuretin izdvajaju kao nosioci aktivnosti, a leukemijske maligne ćelijske linije kao najosetljiviji model.

**Ključne reči:** antitumorska aktivnost, ekstrakti, jedinjenja, ruj, apoptoza, ćelijski ciklus, GSEA, HeLa, K562, ćelijska kultura.

**Naučna oblast:** biologija

**Uža naučna oblast:** biohemija i molekularna biologija

# **Antitumor activity of extracts and compounds isolated from the heartwood of *Cotinus coggygia* Scop.**

Ivana A. Pašić

**Abstract:** The aim of this doctoral dissertation was to determine the intensity, selectivity, and molecular mechanisms of the antitumor activity of three extracts from the heartwood of *Cotinus coggygia*: ethanol extract (EE), dichloromethane extract (MME), and aqueous extract (VE), as well as twelve compounds isolated from EE, using a panel of human malignant and normal cell lines *in vitro*. All three extracts exhibited concentration-dependent cytotoxicity against all malignant cell lines tested, with the most pronounced activity against leukemia cells: EE showed an IC<sub>50</sub> of 31.04 ± 4.30 µg/ml against HL-60 and 34.84 ± 4.24 µg/ml against K562. The chalcone butein was the most potent isolated compound (IC<sub>50</sub> 8.66 ± 1.10 µM against HeLa and 13.91 ± 2.61 µM against K562), with a selectivity index of 9.91 toward MRC-5 cells. RNA sequencing of K562 cells treated with non-toxic concentrations identified 809 differentially expressed genes following butein treatment, 439 following butin treatment, and 299 following sulfuretin treatment (FDR < 0.05), with 134 genes shared among all three treatments. In malignant MDA-MB-231 cells, butin, EE, and VE significantly reduced survival compared with the control exposed to radiation alone, indicating their radiosensitizing potential. The results of this dissertation demonstrate that the heartwood of *C. coggygia* represents a rich source of bioactive flavonoids with *in vitro* antitumor activity mediated through the induction of apoptosis, disruption of cell-cycle progression, inhibition of migration, and reprogramming of metabolic and redox pathways in malignant cells, with butein, butin, and sulfuretin emerging as the main contributors to the observed activity, and leukemia cell lines as the most sensitive models.

**Keywords:** antitumor activity, extracts, compounds, smoke tree, apoptosis, cell cycle, GSEA, HeLa, K562, cell culture.

**Scientific field:** biology

**Scientific subfield:** biochemistry and molecular biology

## Skraćenice

8-OHdG - 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, marker oksidativnog oštećenja DNK

AIFM1 - faktor indukcije apoptoze povezan sa mitohondrijama 1 (engl. Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1)

AKR1C1 - aldo-keto reduktaza, familija 1, član C1 (engl. Aldo-Keto Reductase family 1 member C1)

AKT - v. PKB

APAF1 - apoptotski proteaza-aktivirajući faktor 1 (engl. Apoptotic Protease Activating Factor 1)

ARE - elementi antioksidativnog odgovora (engl. Antioxidant Response Elements)

ATCC - Američka kolekcija tipskih kultura (engl. American Type Culture Collection)

ATP - adenozin-trifosfat (engl. Adenosine Triphosphate)

BAD - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Associated agonist of cell Death)

BAK1 - proapoptotski efektorski protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Antagonist/Killer 1)

BAX - proapoptotski efektorski protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Associated X)

BB - pufer za vezivanje (engl. Binding Buffer)

BBC3 (PUMA) - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Binding Component 3)

BCL2 (Bcl-2) - antiapoptotski protein (engl. B-cell lymphoma 2)

BCL2A1 (A1/Bfl-1) - antiapoptotski protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Related Protein A1)

BCL2L1 (Bcl-xL) - antiapoptotski protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Like 1)

BCL2L11 (BIM) - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Like 11)

BCL2L2 (Bcl-w) - antiapoptotski protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Like 2)

BEOU - oznaka herbarske zbirke Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ Univerziteta u Beogradu

BET - familija proteina sa bromodomenom (engl. Bromodomain and Extra, Terminal)

BH3 - treći homologni domen proteina Bcl-2 familije (engl. Bcl-2 Homology domain 3)

BHT - butilovani hidroksitoluen (engl. Butylated Hydroxytoluene)

BID - proapoptotski „BH3-only“ protein (engl. BH3-Interacting domain Death agonist)

BIK - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. BCL2 Interacting Killer)

BMF - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. Bcl-2 Modifying Factor)

CAK - CDK-aktivirajući kinazni kompleks koji čine CDK7, ciklin H i MAT1 (engl. CDK-Activating Kinase)

CAT - katalaza (engl. Catalase)

CC - kolonska hromatografija (engl. Column Chromatography)

CCNA2 - ciklin A2 (engl. Cyclin A2)

CCNB1 - ciklin B1 (engl. Cyclin B1)

CCND1 - ciklin D1 (engl. Cyclin D1)

CCNE1 - ciklin E1 (engl. Cyclin E1)

CCNH - ciklin H (engl. Cyclin H)

CDC25 - fosfataze ćelijskog ciklusa 25, aktivatori CDK (engl. Cell Division Cycle 25)

CDC45 - protein neophodan za inicijaciju replikacije DNK (engl. Cell Division Cycle 45)

CDK - ciklin-zavisna kinaza (engl. Cyclin-Dependent Kinase); CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 - ciklin-zavisne kinaze 1, 2, 4, 6 i 7

cDNK (cDNA) - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

ChIP - hromatinska imunoprecipitacija (engl. Chromatin Immunoprecipitation)

CKI - inhibitor ciklin-zavisnih kinaza (engl. Cyclin-dependent Kinase Inhibitor)

COSY - korelaciona NMR spektroskopija (engl. Correlation Spectroscopy)

COX-2 - ciklooksigenaza-2 (engl. Cyclooxygenase-2)

CTGF (CCN2) - faktor rasta vezivnog tkiva (engl. Connective Tissue Growth Factor)

DAD - detektor sa nizom dioda (engl. Diode Array Detector)

dATP - deoksiadenozin-trifosfat

DCF - 2',7'-dihlorofluorescein

DCFH-DA - 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat

ddCt - metoda uporednog delta-delta Ct za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije

DED - efektorski domen smrti (engl. Death Effector Domain)

DEG - diferencijalno eksprimirani geni (engl. Differentially Expressed Genes)

DGE - analiza diferencijalne genske ekspresije (engl. Differential Gene Expression analysis)

DISC - signalni kompleks koji indukuje ćelijsku smrt (engl. Death-Inducing Signaling Complex)

DMSO - dimetil-sulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (stabilni radikal)

DR4, DR5 - receptori smrti 4 i 5 (engl. Death Receptor 4/5)

E2F - familija transkripcionih faktora E2F (engl. E2F Transcription Factor)

EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina (engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid)

EE - etanolni ekstrakt srži drvenastog dela ruja

EGCG - epigalokatehin-3-galat

ERK1/2 - ekstraćelijskim signalom regulisane kinaze 1 i 2 (engl. Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2)

FADD - adaptorski protein sa domenom smrti povezan sa Fas receptorom (engl. Fas-Associated protein with Death Domain)

FAP - fibroblast-aktivirajući protein  $\alpha$  (engl. Fibroblast Activation Protein  $\alpha$ )

Fas (CD95/APO-1) - receptor smrti iz superfamilije TNF receptora

FBS - fetalni goveđi serum (engl. Fetal Bovine Serum)

FCS - fetalni teleći serum (engl. Fetal Calf Serum)

FDA - Američka agencija za hranu i lekove (engl. U.S. Food and Drug Administration)

FDR - stopa lažnih otkrića (engl. False Discovery Rate)

FITC - fluorescein-izotiocijanat (engl. Fluorescein Isothiocyanate)

FL1, FL2 - fluorescentni kanali protočnog citometra (FL2-A - površina signala; FL2-W - širina signala)

FLIP (c-FLIP) - ćelijski inhibitorski protein FLICE (engl. cellular FLICE-Inhibitory Protein)

FRAP - esej redukcije jona gvožđa, mera antioksidativne moći (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

FSC - prednje rasejanje svetlosti u protočnoj citometriji (engl. Forward Scatter)

FTL - laki lanac feritina (engl. Ferritin Light Chain)

GAE - ekvivalenti galne kiseline (engl. Gallic Acid Equivalents)

GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

GCLC - katalitička podjedinica glutamat-cistein ligaze (engl. Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit)

GCLM - modifikatorska podjedinica glutamat-cistein ligaze (engl. Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit)

GLI - transkripcioni faktori GLI1/GLI2/GLI3 (engl. Glioma-associated oncogene homolog)

GPCR - receptori spregnuti sa G-proteinima (engl. G Protein-Coupled Receptors)

GPx - glutation peroksidaza (engl. Glutathione Peroxidase)

GSEA - analiza obogaćenja genskih skupova (engl. Gene Set Enrichment Analysis)

HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (pufer)

HMBC - NMR tehnika heteronuklearne korelacije preko više veza (engl. Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HPLC - tečna hromatografija visokih performansi (engl. High Performance Liquid Chromatography)

HPLC-DAD - tečna hromatografija visokih performansi sa detektorom sa nizom dioda (engl. High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection)

HPV - humani papiloma virus (engl. Human Papillomavirus)

HRK - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. Harakiri)

HSQC - NMR tehnika heteronuklearne korelacije preko jedne veze (engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence)

hTERT - humana telomerazna reverzna transkriptaza (engl. human Telomerase Reverse Transcriptase)

IAP - proteini inhibitori apoptoze (engl. Inhibitor of Apoptosis Proteins)

IBD - inflamatorna bolest creva (engl. Inflammatory Bowel Disease)

IC<sub>50</sub> - koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta/vijabilnosti (engl. half-maximal Inhibitory Concentration)

ICI - inhibitori kontrolnih tačaka imuniteta (engl. Immune Checkpoint Inhibitors)

INN - internacionalni nezaštićeni naziv leka (engl. International Nonproprietary Name)

IRE1 $\alpha$  - senzor stresa endoplazmatičnog retikuluma u UPR odgovoru (engl. Inositol-Requiring Enzyme 1 $\alpha$ )

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina (engl. messenger RNA, mRNA)

iRNK-seq (mRNA-seq) - sekvenciranje informacione RNK

JAK1 - Janus kinaza 1 (engl. Janus Kinase 1)

JNK - c-Jun N-terminalna kinaza (engl. c-Jun N-terminal Kinase)

kalcein-AM - kalcein-acetoksimetil ester, fluorescentna boja za procenu vijabilnosti ćelija

KEAP1 - protein senzor za slobodne radikale i elektrofile, negativni regulator NRF2 (engl. Kelch-like ECH-Associated Protein 1)

KEGG - baza podataka gena i genoma (engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

KS - koeficijent selektivnosti

LMPA - agarozna sa niskom tačkom topljenja (engl. Low Melting Point Agarose)

logFC - logaritam količnika promene ekspresije (engl. Log Fold Change)

LRRC4B - protein koji sadrži leucinom bogate ponavljajuće motive 4B (engl. Leucine Rich Repeat Containing 4B)

MAPK - mitogen-aktivirane protein kinaze (engl. Mitogen-Activated Protein Kinases)

MAT1 - podjedinica CAK kompleksa (engl. Ménage à trois 1; gen MNAT1)

MCL1 - antiapoptotski protein Bcl-2 familije (engl. Myeloid Cell Leukemia sequence 1)

MCM - helikaze kompleksa održavanja minihromozoma, MCM2-7 (engl. Mini-Chromosome Maintenance)

MDM2 - negativni regulator proteina p53 (engl. Murine Double Minute 2)

MeCN - acetonitril

MeOH - metanol

MME - dihlormetanski (1:1) ekstrakt srži drvenastog dela ruja

MMP2, MMP9 - matriksne metaloproteinaze 2 i 9 (engl. Matrix Metalloproteinases 2/9)

MPF - faktor sazrevanja (engl. Maturation-Promoting Factor)

mTOR - kinaza, centralni regulator ćelijskog rasta i metabolizma (engl. mechanistic Target Of Rapamycin)

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (kolorimetrijski esej vijabilnosti ćelija)

NAD(P)H - nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat), redukovani oblik

NES - normalizovani skor obogaćenja (engl. Normalized Enrichment Score)

NFE2L2 - v. NRF2

NF-κB - nuklearni faktor kapa B (engl. Nuclear Factor kappa B)

NGF - nervni faktor rasta (engl. Nerve Growth Factor)

NMR - nuklearna magnetna rezonanca (engl. Nuclear Magnetic Resonance)

NO - azot-monoksid (engl. Nitric Oxide)

NOESY - NMR spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta (engl. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

NQO1 - NAD(P)H:hinon dehidrogenaza 1 (engl. NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1)

NRF2 (NFE2L2) - transkripcioni faktor antioksidativnog odgovora (engl. Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2)

NTRK1 (TRKA) - neurotrofni receptor tirozin-kinaza 1 (engl. Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1)

OSGIN1 - inhibitor rasta inducibilan oksidativnim stresom 1 (engl. Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor 1)

OXPHOS - oksidativna fosforilacija (engl. Oxidative Phosphorylation)

PARP - poli(ADP-riboza) polimeraza (engl. Poly(ADP-Ribose) Polymerase)

P-ADJUST - prilagođena p-vrednost (engl. adjusted p-value)

PBS - fosfatni puferisani fiziološki rastvor (engl. Phosphate-Buffered Saline)

PCA - analiza glavnih komponenti (engl. Principal Component Analysis)

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction)

PE150 - sekvenciranje uparenih krajeva sa dužinom očitavanja od 150 baznih parova (engl. Paired-End 150)

PI - propidijum-jodid (engl. Propidium Iodide)

PI3K - fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. Phosphoinositide 3-Kinase)

PKB (AKT) - protein kinaza B (engl. Protein Kinase B)

PKLR - piruvat-kinaza L/R (engl. Pyruvate Kinase L/R)

PMAIP1 (NOXA) - proapoptotski „BH3-only“ protein Bcl-2 familije (engl. Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1)

pRB (RB1) - retinoblastoma protein (engl. Retinoblastoma protein)

PVCA - analiza glavnih komponenti varijanse (engl. Principal Variance Component Analysis)

R<sub>f</sub> - retencioni faktor u tankoslojnoj hromatografiji (engl. Retention factor)

RNK - ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne azotne vrste (engl. Reactive Nitrogen Species)

ROS - reaktivne kiseonične vrste (engl. Reactive Oxygen Species)

RPMI 1640 - hranljivi medijum za gajenje ćelija (engl. Roswell Park Memorial Institute 1640)

RQ - relativna kvantifikacija genske ekspresije (engl. Relative Quantification)

RT-qPCR - kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu uz reverznu transkripciju (engl. Reverse Transcription quantitative PCR)

SC<sub>50</sub> - koncentracija koja neutrališe 50% slobodnih radikala (engl. 50% Scavenging Concentration)

SCLC - sitnoćelijski karcinom pluća (engl. Small Cell Lung Cancer)

SDS - natrijum-dodecil-sulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)

SLCO2B1 (OATP2B1) - organski anjonski transporter, član 2B1 familije nosača rastvorenih supstanci (engl. Solute Carrier Organic anion transporter family member 2B1)

SMAC/DIABLO - sekundarni mitohondrijski aktivator kaspaza (engl. Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP-Binding protein with Low pI)

SOD - superoksid dismutaza (engl. Superoxide Dismutase)

SPTA1 - alfa-spektrin, eritrocitni 1 (engl. Spectrin Alpha, Erythrocytic 1)

SREBP (SREBF) - protein koji vezuje sterol-regulatorne elemente (engl. Sterol Regulatory Element-Binding Protein)

SSC - bočno rasejanje svetlosti u protočnoj citometriji (engl. Side Scatter)

STAT3 - prenosilac signala i aktivator transkripcije 3 (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

subG1 - frakcija ćelija sa sadržajem DNK manjim od G1 faze (fragmentisana DNK; pokazatelj apoptoze)

TBARS - supstance reaktivne sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

TCA - ciklus trikarboksilnih kiselina, Krebsov ciklus (engl. Tricarboxylic Acid cycle)

TE - Tris-EDTA pufer

TLC - tankoslojna hromatografija (engl. Thin-Layer Chromatography)

TNF - faktor nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor)

TNFR1 - receptor 1 za faktor nekroze tumora (engl. TNF Receptor 1)

TP53 - gen koji kodira tumor-supresorski protein p53 (engl. Tumor Protein p53)

TPA - 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat

TRAIL - ligand srodan TNF-u koji indukuje apoptozu (engl. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)

t-SNE - metoda nelinearne redukcije dimenzionalnosti (engl. t-distributed Stochastic Neighbor Embedding)

UAE - ultrazvučna ekstrakcija (engl. Ultrasound-Assisted Extraction)

UPR - odgovor na nepravilno savijene proteine (engl. Unfolded Protein Response)

UV - ultraljubičasto zračenje (engl. Ultraviolet)

VE - vodeni ekstrakt srži drvenastog dela ruja

VEGFA - vaskularni endotelni faktor rasta A (engl. Vascular Endothelial Growth Factor A)

VGF - VGF faktor rasta inducibilan nervnim faktorom rasta (engl. VGF Nerve Growth Factor Inducible)

WEE1 - kinaza kontrolne tačke G2 (engl. WEE1 G2 Checkpoint Kinase)

XBP1 - protein koji vezuje X-box element 1 (engl. X-Box Binding Protein 1)

Z-DEVD-FMK - specifični inhibitor kaspaze-3

Z-IETD-FMK - specifični inhibitor kaspaze-8

Z-LEHD-FMK - specifični inhibitor kaspaze-9

Oznake korišćenih ćelijskih linija

A375 - ćelijska linija humanog malignog melanoma

DU 145 - ćelijska linija humanog karcinoma prostate

HaCaT - besmrtna ćelijska linija humanih keratinocita (neizmenjena ćelijska linija)

HCT116 - ćelijska linija humanog karcinoma debelog creva

HeLa - ćelijska linija humanog adenokarcinoma grlića materice

HepG2 - ćelijska linija humanog hepatocelularnog karcinoma

HL-60 - ćelijska linija humane akutne promijelocitne leukemije

K562 - ćelijska linija humane hronične mijeloidne leukemije

MCF-7 - ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke

MDA-MB-231 - ćelijska linija humanog trostruko negativnog adenokarcinoma dojke

MRC-5 - ćelijska linija neizmenjenih humanih fibroblasta pluća (netumorska ćelijska linija)

PC-3 - ćelijska linija humanog adenokarcinoma prostate

SiHa - ćelijska linija humanog skvamoznog karcinoma grlića materice

V79-4 - ćelijska linija fibroblasta pluća kineskog hrčka

|        |                                                                                                             |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1      | Uvod .....                                                                                                  | 1  |
| 1.1    | Familija <i>Anacardiaceae</i> .....                                                                         | 1  |
| 1.2    | Rod <i>Cotinus</i> Mill.....                                                                                | 1  |
| 1.3    | Botaničke i morfološke karakteristike i rasprostranjenost vrste <i>C. coggygia</i> .....                    | 2  |
| 1.4    | Hemijski sastav .....                                                                                       | 2  |
| 1.5    | Primena ruja u tradicionalnoj medicini.....                                                                 | 3  |
| 1.6    | Biološka aktivnost ekstrakata biljne vrste <i>C. coggygia</i> Scop.....                                     | 4  |
| 1.7    | Genotoksični efekti ruja .....                                                                              | 10 |
| 1.8    | Antioksidativno dejstvo ekstrakata i jedinjenja ruja .....                                                  | 12 |
| 1.9    | Ćelijske linije kao eksperimentalni modeli u onkološkim istraživanjima .....                                | 13 |
| 1.10   | Molekularni mehanizmi antitumorskog dejstva.....                                                            | 14 |
| 1.10.1 | Apoptotski signalni putevi i molekuli .....                                                                 | 14 |
| 1.10.2 | Unutrašnji (mitohondrijski) put aktivacije apoptoze .....                                                   | 15 |
| 1.10.3 | Spoljašnji apoptotski mehanizmi (signalni putevi receptora smrti ćelije) .....                              | 16 |
| 1.10.4 | Signalni putevi antitumorskog delovanja.....                                                                | 17 |
| 1.10.5 | Regulatori ćelijskog ciklusa .....                                                                          | 19 |
| 1.10.6 | Oksidativni stres i NRF2 signalni put .....                                                                 | 21 |
| 1.11   | Savremeni pristupi u antitumorskoj terapiji i prirodni izvori bioaktivnih molekula .....                    | 23 |
| 1.11.1 | Značaj ispitivanja biljnih vrsta i biljnih jedinjenja za razvoj novih antitumorskih lekova<br>23            |    |
| 1.12   | Hipoteze istraživanja u okviru doktorske disertacije .....                                                  | 24 |
| 1.13   | Ciljevi istraživanja u okviru doktorske disertacije.....                                                    | 25 |
| 2      | Materijal i metode.....                                                                                     | 26 |
| 2.1    | Biljni materijal .....                                                                                      | 26 |
| 2.2    | Dobijanje ekstrakata iz biljnog materijala ruja .....                                                       | 26 |
| 2.3    | Izolovanje i identifikacija jedinjenja 1-12 .....                                                           | 26 |
| 2.4    | Reagensi i uslovi kultivacije u ćelijskoj kulturi .....                                                     | 27 |
| 2.5    | <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata kolorimetrijskom metodom MTT .....           | 28 |
| 2.6    | <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata na 3D ćelijskim modelima (3D sferoidi)<br>29 |    |
| 2.7    | Analiza faza ćelijskog ciklusa.....                                                                         | 30 |
| 2.8    | Određivanje ciljnih kaspaza .....                                                                           | 31 |
| 2.9    | Aneksin V-FITC/propidijum-jodid esej.....                                                                   | 31 |

|        |                                                                                                                           |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.10   | Analiza genske ekspresije .....                                                                                           | 32 |
| 2.11   | Ispitivanje uticaja ekstrakata na migraciju ćelija - <i>in vitro scratch</i> esej .....                                   | 33 |
| 2.12   | Merenje unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta .....                                                                | 33 |
| 2.13   | Statistička analiza za <i>in vitro</i> eseje u ćelijskoj kulturi .....                                                    | 34 |
| 2.14   | Izolacija ukupne RNK iz K562 ćelija za potrebe sekvenciranja.....                                                         | 34 |
| 2.15   | Sekvenciranje ukupne RNK iz K562 ćelija .....                                                                             | 34 |
| 2.16   | Bioinformatička analiza podataka dobijenih sekvenciranjem .....                                                           | 35 |
| 2.17   | Procena genotoksičnosti jedinjenja i ekstrakata ruja alkalnim komet esejom .....                                          | 35 |
| 2.18   | Procena radiomodulatornog efekta jedinjenja i ekstrakata ruja u kombinaciji sa zračenjem .                                | 36 |
| 2.18.1 | Merenje preživljavanja ćelija kolorimetrijskom metodom MTT.....                                                           | 36 |
| 2.18.2 | Analiza faza ćelijskog ciklusa u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy .....                                            | 37 |
| 2.18.3 | Aneksin V-FITC/propidijum-jodid esej u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy ....                                       | 37 |
| 2.18.4 | Procena genotoksičnosti jedinjenja i ekstrakata ruja alkalnim komet esejom u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy..... | 38 |
| 3      | Rezultati.....                                                                                                            | 39 |
| 3.1    | Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz srži drveta ruja .....                                                                | 39 |
| 3.2    | Hemijska kompozicija ekstrakata ruja .....                                                                                | 40 |
| 3.3    | Određivanje intenziteta citotoksičnog dejstva kolorimetrijskim MTT esejom.....                                            | 40 |
| 3.4    | 3D modeli: citotoksično dejstvo .....                                                                                     | 47 |
| 3.4.1  | Promena površine sferoida na ćelijskim modelima HeLa i MDA-MB-231 ćelija .....                                            | 47 |
| 3.4.2  | Bojenje kalceinom sferoida na ćelijskom modelu HeLa ćelija.....                                                           | 49 |
| 3.4.3  | Bojenje kalceinom sferoida na ćelijskom modelu MDA-MB-231 ćelija .....                                                    | 56 |
| 3.5    | Mehanizmi citotoksičnog dejstva ruja na HeLa ćelijskoj liniji.....                                                        | 63 |
| 3.6    | Mehanizmi citotoksičnog dejstva ruja na K562 ćelijskoj liniji.....                                                        | 68 |
| 3.7    | <i>In vitro</i> antiinvazivno dejstvo ruja .....                                                                          | 73 |
| 3.7.1  | Efekti na nivou genske ekspresije.....                                                                                    | 73 |
| 3.7.2  | Efekti na nivou migracije HeLa ćelijske linije.....                                                                       | 75 |
| 3.8    | Antioksidativni efekat ruja.....                                                                                          | 76 |
| 3.9    | Provera kvaliteta analize iRNK-seq eksperimenata.....                                                                     | 78 |
| 3.10   | Diferencijalno eksprimirani geni .....                                                                                    | 79 |
| 3.11   | Analiza obogaćenja puteva na osnovu Reactome baze.....                                                                    | 80 |
| 3.12   | Klaster analiza puteva .....                                                                                              | 82 |

|        |                                                                                                                               |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.13   | Potvrda rezultata RNK sekvenciranja metodom qPCR .....                                                                        | 83  |
| 3.14   | Genotoksični efekat ekstrakata i jedinjenja ruja .....                                                                        | 86  |
| 3.15   | Ispitivanje radiomodulatornog efekta jedinjenja i ekstrakata ruja .....                                                       | 87  |
| 3.15.1 | Određivanje preživljavanja ćelija u kombinaciji ekstrakata, jedinjenja i zračenja<br>kolorimetrijskom metodom MTT .....       | 87  |
| 3.15.2 | Ispitivanje promena u fazama ćelijskog ciklusa u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2<br>Gy .....                             | 89  |
| 3.15.3 | Ispitivanje stepena apoptoze u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy .....                                                  | 92  |
| 3.15.4 | Procena genotoksičnosti jedinjenja i ekstrakata ruja alkalnim komet testom u<br>kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy ..... | 93  |
| 4      | Diskusija .....                                                                                                               | 94  |
| 5      | Zaključci .....                                                                                                               | 112 |
| 6      | Literatura .....                                                                                                              | 113 |
| 7      | Prilozi 1-92 .....                                                                                                            | 135 |
| 8      | Biografija autora .....                                                                                                       | 184 |
| 9      | Izjava o korišćenju .....                                                                                                     | 185 |
| 10     | Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada .....                                                    | 187 |
| 11     | Izjava o autorstvu .....                                                                                                      | 188 |

## 1 Uvod

### 1.1 Familija *Anacardiaceae*

Familija *Anacardiaceae*, kojoj pripada *Cotinus coggygria* (rujevina, ruj), dobila je latinski naziv po grčkoj reči koja znači „oblika srca“, a odnosi se na uvećanu cvetnu dršku u plodu tipa pseudokarpa kod indijskog oraha (*Anacardium occidentale*) (Simpson, 2010; Yi et al., 2008). Vrste iz ove familije su drveće, žbunovi, odrvenele liane, retko zeljaste trajnice, uglavnom sa naizmeničnim, opadajućim ili večnozelenim listovima i plodom najčešće tipa koštunice (Mala flora Hrvatske, n.d.; Simpson, 2010; Yi et al., 2008). Listovi su bez zalistaka (Mala flora Hrvatske, n.d.; Simpson, 2010; Yi et al., 2008), dok su cvetovi sa braktejama, na cvetnim drškama, dvopolni i muški, dvopolni i ženski (na istoj biljci) ili svi dvopolni (Mala flora Hrvatske, n.d.; Simpson, 2010; Yi et al., 2008). Cvet je sa 3 do 7 čašičnih i kruničnih listića, osim kada je tipa perigona, pa ima samo jedan od dva pomenuta elementa (Mala flora Hrvatske, n.d.; Simpson, 2010; Yi et al., 2008). Prašnika je koliko i kruničnih listića ili duplo, slobodni su, plodnica je sinkarpna i nadcvetna. Seme je bez ili sa malom količinom endosperma (Mala flora Hrvatske, n.d.; Simpson, 2010; Yi et al., 2008). Familija *Anacardiaceae* obuhvata približno 60 do 74 roda, sa oko 400 do 600 vrsta (Simpson, 2019). Ova familija pokazuje veoma veliki diverzitet vrsta, uključujući žbunaste biljke, drvenaste forme, lozice, a povremeno i višegodišnje biljke (Simpson, 2019). Ovu familiju karakteriše i prisustvo smolastog ili mlečnog soka, koji nekada može biti otrovan kao kod vrste *Metopium brownei*, čiji sok sadrži urušiol (opisan kao uljana ili smolasta mešavina organskih humanih iritanata) sa pentadecilkateholima kao senzibilišućim i iritirajućim jedinjenjima, kada dođu u kontakt sa ljudskom kožom ili sluzokožom (Rivero-Cruz et al., 1997). Urušiol se može naći i kod drugih vrsta (na primer u okviru roda *Toxicodendron*), posebno u nezrelom plodu poput manga ili pistaća (Rivero-Cruz et al., 1997). Iako je otrovan i iritantan, urušiol je samo jedna od grupa organskih jedinjenja u okviru familije *Anacardiaceae* sa bogatim spektrom bioloških aktivnosti (Kim et al., 2013b; Wang et al., 2025). Pokazuje antimikrobno dejstvo, u vidu antimikrobnih omotača, kao i citostatično i proapoptotsko delovanje (Kim et al., 2013b; Wang et al., 2025).

### 1.2 Rod *Cotinus* Mill.

Rod *Cotinus* Mill. pripada familiji *Anacardiaceae* (kojoj pripadaju i mango, indijski orah i biljke iz roda *Rhus*) (UA Campus Arboretum, n.d.). *C. coggygria* Scop. jedna je od vrsta koje pripadaju rodu *Cotinus*, familija *Anacardiaceae* (Simpson, 2019). Line je u rodu *Rhus* opisao oko 17 vrsta, međutim, ova vrsta pripada rodu *Cotinus*, u okviru kojeg se, prema APG5 (APG5, 2020/2021), najnovijoj konsenzusnoj klasifikaciji cvetnica (*Angiospermae*), prepoznaje do 7 vrsta (*C. carranzae* Rzed. & Calderón, *Cotinus chiangii* (D.A.Young) Rzed. & Calderón, *C. coggygria* Scop., *Cotinus kanaka* (R.N.De) D.Chandra, *Cotinus nanus* W.W.Sm., *Cotinus obovatus* Raf., *Cotinus szechuanensis* Pénzes).

*C. coggygria* je vrsta prirodno rasprostranjena u južnoj i srednjoj Evropi, severnoj Africi i delovima Azije, od Kavkaza i zapadne Azije do Himalaja i Kine (Antal et al., 2021; Ferrer-Gallego, 2016). Sinonim i raniji Lineov naziv za vrstu je *Rhus cotinus* L. Zvanični naziv biljke, koji se danas češće koristi, dao je prirodnjak Đovani Antonio Skopoli 1772. godine u publikaciji *Flora carniolica* (drugo izdanje) (Scopoli, 1772).

### 1.3 Botaničke i morfološke karakteristike i rasprostranjenost vrste *C. coggygia*

Ruj ili rujevina poznat je i kao „dimno drvo“ ili „evropsko dimno drvo“ (Antal et al., 2021; Ferrer-Gallego, 2016). Ruj je listopadni žbun koji raste od pet do sedam metara, vrlo retko formirajući pravi drvenasti habitus. *C. coggygia* Scop. pripada kserotermnoj flori i u Republici Srbiji je rasprostranjena pretežno na suvim, toplim i sunčanim terenima, posebno na krečnjačkim staništima. Ova vrsta najčešće se sreće u šibljacima, na kamenjarima, liticama i u svetlim termofilnim šumskim zajednicama, gde ima značajnu ekološku ulogu u sastavu vegetacije toplijih područja (Plants of the World Online, n.d.).

Ruj karakterišu krupne metličaste cvasti sa pentamernim, bleđožutim ili zelenkastim, hermafroditnim ili abortivnim cvetovima (koji daju karakteristični perasti izgled purpurnom cveću), sa prostim ovalnim ili obrnuto jajolikim golim i glatkim listovima (dugim 3-8 cm) naizmeničnog rasporeda (Fitter, 1977; Mala flora Hrvatske, n.d.). Abortirani cvetovi okružuju maleni koštuničav plod (2-3 mm) koji se razvija iz fertilnih cvetova (Fitter, 1977; Mala flora Hrvatske, n.d.). Ruj se koristio kao deo dekorativne dendroflore evropskih vrtova po zapisima iz XVI veka, a u Ameriku je donesen u periodu između XVII i XIX veka, iz Kine (Mehdiyeva et al., 2024). Ruj je dobio ime zbog neobičnog cveća, koje podseća na perje, a iz daljine na dimnu izmaglicu, a ima i raznobojno lišće, posebno dekorativno u jesen, crvene, narandžaste, roze i žute boje, a kod nekih kultivisanih varijeteta upadljive tamnobordo do ljubičaste boje (UA Campus Arboretum, n.d.).

### 1.4 Hemijski sastav

Familiju *Anacardiaceae* karakterišu brojni i hemijski raznovrsni sekundarni metaboliti (Cunha & David, 2024; Guerra et al., 2025). Tako je na primer česta anakardična kiselina, a porodicu karakteriše i veliki diverzitet flavonoida i terpenoida (Cunha & David, 2024; Guerra et al., 2025). Osim pomenutih jedinjenja, javljaju se i  $\beta$ -D-glukopiranozidi, šikiminska kiselina, oleanolni aldehid i sitosteroli za koje se pretpostavlja da su, bar delimično, odgovorni za antimikotično dejstvo biljaka iz porodice na neke vrste iz roda *Candida* (Cunha & David, 2024; Guerra et al., 2025). Oko četvrtina svih poznatih rodova sadrži toksične fenole (Cunha & David, 2024; Guerra et al., 2025). Familiju *Anacardiaceae* povezuju specifične klase sekundarnih metabolita, prvenstveno fenolni lipidi poput anakardične kiseline, urušiola, kardanola i nekih flavonoida, terpena i tanina, ali sa većom raznovrsnošću među rodovima (Cunha & David, 2024). Hemotaksonomski fenolni lipidi se mogu smatrati markerom ove porodice; oni doprinose antioksidativnom i antimikrobnom potencijalu, kao i potencijalu za izazivanje iritacije (Cunha & David, 2024).

Hemotaksonomska raznovrsnost među rodovima i/ili vrstama nije zavisna samo od genotipa već i od dela biljke ili uslova životne sredine, npr. edafoklimatskih faktora (Cunha & David, 2024). Efekti klimatskih promena nisu zanemarljivi u pogledu biohemijske adaptacije lekovitih biljaka (Jangpangi et al., 2025). Osim što utiču na areal rasprostranjenosti, klimatske promene modulišu nivoe i stopu biosinteze biološki aktivnih materija (Jangpangi et al., 2025). Tako etarsko ulje kod rodova *Pistacia/Schinus* sadrži visoke koncentracije monoterpena ( $\alpha$ -pinen, limonen), rod *Mangifera* je specifičan po mangiferinu, dok rod *Semecarpus* odlikuju specifični biflavonoidi. Jestive vrste su bogatije fenolnim komponentama, dok se kod manje jestivih ili otrovnih vrsta sintetišu toksični kateholi (organska

jedinjenja sa benzenovim prstenom koji imaju snažnu redukujuću i helirajuću aktivnost) (Cunha & David, 2024).

Kao rod, *Rhus* nije dovoljno fitohemijski izučen da bi se moglo sa sigurnošću istaći da postoje metaboliti specifični za vrstu, ali postoje sekundarni metaboliti koji su učestali kod raznih vrsta, prvenstveno derivati galne kiseline i hidrolizibilni tanini, derivati kvercetina, miricetina i biflavonoidi (flavonoidna grupa jedinjenja) i terpenoidi i urušiololi (Opiyo et al., 2021; Sánchez-Viesca & Gómez, 2021). Ovakav spektar sekundarnih metabolita je i očekivan za pripadnike familije *Anacardiaceae* (Opiyo et al., 2021). Interspecijske razlike su većinom u pogledu koncentracije određenih klasa jedinjenja, ili derivata nekog jedinjenja, pa je tako npr. *Rhus coriaria* jedna od vrsta u rodu sa najvišom koncentracijom hidrolizibilnih tanina i etarskih ulja (sa  $\beta$ -kariofilenom,  $\alpha$ -pinenom, cembrenom) (Zannou et al., 2025), dok *Rhus typhina* sadrži visoke koncentracije proantocijanidina i antocijanina koji doprinose specifičnoj crvenoj pigmentaciji vrste (Zannou et al., 2025). Toksičnim/iritirajućim jedinjenjima i urušiolom, alkenil i alkil fenolima obiluju vrste iz *R. verniciflua*, *R. toxicodendron* grupe, a specifičnom obradom ove komponente mogu se ukloniti ili transformisati (Lee et al., 2018). Dok je većina delova biljke *C. coggryria* Scop. bezbedna za rukovanje, biljni sok iz drveta sadrži manju količinu urušiola.

Ruj sadrži niz biološki aktivnih jedinjenja, poput miricetina, galne kiseline i sulfuretina/disulfuretina, inače karakterističnih za porodicu kojoj pripada (Matić et al., 2013b). Sadrži i flavonoide fustin i fisetin, jedne od dominantnih komponenti tzv. mladog fustika, koji se dobija iz drveta/srži biljke i koji se koristio od drevnih vremena kao pigment za tkaninu iz žutog spektra boja (Valianou et al., 2009).

Etarsko ulje, koje se tipično dobija frakcionom destilacijom mladih grančica i listova, bogato je limonenom i  $\beta$ -cimenom, ali i  $\alpha$ -pinenom, karakterističnim jedinjenjima očekivanim u okviru *Anacardiaceae* rodova i vrsta (Demirci et al., 2003; Fraternali & Ricci, 2014). Etarska ulja su raznovrsnog hemijskog sastava, ali često dominiraju mircen, limonen i  $\beta$ -pinen (Cunha & David, 2024; Guerra et al., 2025).

## 1.5 Primena ruja u tradicionalnoj medicini

Samo drvo (srž) vrste je nekada bilo izvor žućkastog flavonoidnog pigmenta (fisetina), dok su se listovi koristili za dobijanje tamnog pigmenta poreklom od antocijanina (ljubičaste do crne boje, posebno kod kultivara 'Royal Purple'), čiji se prinos može povećati dejstvom UV zračenja (Oren-Shamir & Levi-Nissim, 1997; Valianou et al., 2009). Danas je takva praksa dobijanja pigmenata iz ove biljke većinom napuštena u korist sintetičkih boja (Oren-Shamir & Levi-Nissim, 1997; Valianou et al., 2009).

Listovi ruja koriste se u turskoj narodnoj medicini u vidu infuzija zbog svog poznatog antiinflamatornog, citotoksičnog, antioksidativnog, hepatoprotektivnog, antiseptičnog, antihemoragičnog, antivirusnog i antimikrobnog dejstva potvrđenog i *in vitro* i *in vivo* (Matić et al., 2016). Pored toga, pokazali su značajnu efikasnost u zarastanju rana i ubrzanom oporavku tkiva (Rahman et al., 2022). *C. coggryria* predstavlja jednu od lekovitih biljaka priznatih u bugarskoj fitoterapiji, naročito kao antidiuretik (Ivanova et al., 2005). Takođe, listovi se koriste u lečenju gastričnih i duodenalnih ulkusa (Ivanova et al., 2005). Tradicionalna kineska medicina navodi da su ekstrakti listova *C. coggryria*, samostalno ili u kombinaciji sa drugim ekstraktima i jedinjenjima, veoma efikasni u prevenciji i ublažavanju simptoma hemoroida (Seiberg et al., 2010). Sirup od ruja štiti jetru od hemijskih

oštećenja, povećava protok žuči i stimulira imunski odgovor (Shen et al., 1991). Matić i saradnici (Matić et al., 2016) su potvrdili da ekstrakti lista ruja mogu efikasno da podstaknu rast kose kada se primenjuju lokalno ili *in vivo*. U lokalnoj narodnoj medicini jugozapadne Rumunije koriste se različiti delovi dimnog drveta: mladi izdanci i listovi kuvani u vodi predstavljaju lek protiv upale grla, stomatitisa, gingivitisa i gastritisa. Posebno se pominju pločice drveta ekstrahirane u jazavičjoj masti (*Meles*), koje su korišćene kao sastojci masti namenjenih lečenju sporo zarastajućih rana (Antal et al., 2021). Enciklopedija rumunske etnobotanike ukazuje na upotrebu biljke i kao boje i kao leka, prvenstveno za lečenje rana i faringitisa (Enciclopedie de etnobotanică românească, n.d.). Ostale primene uključuju snižavanje temperature (Huang, 1998; Redžić, 2007), lečenje srčanih bolesti, hipertenzije, bolesti urinarnog sistema, kašlja, astme, hemoroida, dijabetesa, utrnutosti ruke (Kültür, 2007) i bolesti jetre (Shen et al., 1991). Pored toga, preparati na bazi ruja koriste se u tretmanu kožnih oboljenja (Thapa et al., 2020). U narodnoj medicini koristi se i za zarastanje rana, probleme sa potpornim tkivima zuba, očne bolesti, urinarne infekcije, jačanje imuniteta i kao lokalni antipiretik (Matić et al., 2016). Opsežna istraživanja vršena su na biljkama u cilju potvrđivanja tradicionalnih saznanja ili otkrivanja novih terapijskih primena. Učinkovitost ruja i njegovih jedinjenja potvrđuje i patent topikalnog sredstva za tretman hemoroida podnet od strane firme Johnson & Johnson (Seiberg et al., 2007) kao i patent za oralno sredstvo za poboljšanje elastičnosti i integriteta kože, mukoze urogenitalnog trakta, zida krvnih sudova i snižavanje nivoa triglicerida i mokraćne kiseline (Seiberg et al., 2010).

## 1.6 Biološka aktivnost ekstrakata biljne vrste *C. coggyria* Scop.

Najznačajnija biološka i farmakološka svojstva ruja i njegovih etarskih ulja i ekstrakata uključuju antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antitumorska, antigenotoksična, hepatoprotektivna i antiinflamatorna dejstva (Matić et al., 2016). Glavne grupe biološki aktivnih jedinjenja u etil-acetatnim i metanolnim ekstraktima različitih delova biljke jesu polifenoli, flavonoidi i tanini, koji su u prethodnim studijama pokazali citotoksične efekte (Matić et al., 2016). Dejstvo ekstrakta ruja, u dietil-etru, na inhibitorni efekat rasta malignih ćelija je moguće povećati u kompleksu sa ciklodekstrinom, koji, kako pokazuje studija iz 2016. godine, povećava biodostupnost, a time i efekat buteina i sulfuretina na humani karcinom grlića materice HeLa, humani epitelni karcinom jajnika A2780, humani adenokarcinom dojke (estrogen-receptor pozitivan) MCF-7 i humani adenokarcinom dojke (trostruko negativan tip) MDA-MB-231 ćelijske linije (Antal et al., 2016). Dietil-etarska frakcija metanolnog ekstrakta je kompleksirana metodom mešenja (engl. *kneading*) sa dve vrste ciklodekstrina u odnosu 1:2 (Antal et al., 2016). Termalna analiza i infracrvena spektroskopija pokazale su da je inkapsulacija ovakvog ekstrakta ruja u dve forme ciklodekstrina (ekstrakt je bio „zarobljen“ u šupljini opne ciklodekstrina) bila uspešna, te da su dobijene čestice bile adekvatno male (Antal et al., 2016). Istraživanje je pokazalo da ovakva formulacija povećava rastvorljivost i biodostupnost jedinjenja u ekstraktu i da je inhibitorno dejstvo na rast izmenjenih ćelija specifično, prvenstveno na ćelije raka grlića materice i jajnika (Antal et al., 2016). Uzimajući to u obzir, autori predlažu dalje *in vivo* studije (Antal et al., 2016).

Citotoksično dejstvo na maligno transformisane ćelije grlića materice HeLa pokazao je ekstrakt mladih grana i listova u mešavini hloroforma, etil-acetata i vode, kako su opisali Marčetić i saradnici (Marčetić et al., 2013). Citostatično i proapoptotsko dejstvo vodenih i metanolnih rastvora (metanolni sa naglašenijim dejstvom) na pet vrsta izmenjenih ćelija poreklom iz gastrointestinalnog trakta opisali su Stojković i saradnici (Stojković et al., 2025). Citotoksične koncentracije kretale su se u rasponu od 3,125 do 400 µg/ml (Stojković et al., 2025). Citotoksična aktivnost etanolnog (70%) ekstrakta ove biljke opisana je i na linijama humanog glioblastoma i izmenjenim HepG2, MCF-7, A549, HCT116 linijama,

pri čemu je najveća citotoksičnost postignuta ako je ekstrakt zagrevan na 60 °C u trajanju od 60 minuta (1:5 w/v herba:etanol) (Sukhikh et al., 2021).

Tradicionalnu upotrebu preparata od ruja u etnofarmaciji (Demirci et al., 2003; Redžić, 2007; Tzakou et al., 2005) opravdavaju istraživanja koja pokazuju da ekstrakti ruja poseduju citotoksično i proapoptotsko dejstvo (Marčetić et al., 2013; Stojković et al., 2025). U istraživanju Gospodinove i saradnika, antiproliferativni efekat vodeno-etanolnog ekstrakta listova *C. coggygia* ispitivan je na četiri humane ginekološke maligne ćelijske linije: adenokarcinom dojke - MCF-7, adenokarcinom dojke - T47D, adenokarcinom grlića materice HeLa i epitelni karcinom jajnika A2780 (Gospodinova et al., 2017). Dobijeni rezultati su pokazali da je ekstrakt biljke inhibirao rast svih testiranih malignih ćelijskih linija, pri čemu je najizraženiji citostatični efekat primećen na A2780 ćelijama, sa IC<sub>50</sub> (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta, engl. half-maximal Inhibitory Concentration) od 30,8 µg/ml (Gospodinova et al., 2021). Pored toga, ekstrakt je izazvao značajno slabije smanjenje proliferacije neizmenjene epitelne ćelijske linije dojke MCF10A u poređenju sa testiranim malignim ćelijama, što ukazuje na antiproliferativnu selektivnost ekstrakta (Gospodinova et al., 2021).

U brojnim istraživanjima je pokazano antioksidativno dejstvo ekstrakata ruja. Antioksidativno dejstvo podrazumeva sposobnost molekula, enzima ili kompleksnih bioloških sistema da spreče, smanje ili neutrališu oksidativna oštećenja izazvana reaktivnim kiseoničnim i azotnim vrstama (ROS i RNS). Antioksidativno dejstvo u malignim ćelijama ima dvoznačnu i kontekstualno zavisnu ulogu (Chen et al., 2021). Sa druge strane, u određenim uslovima, modulacija redoks ravnoteže može poremetiti signalne puteve neophodne za opstanak malignih ćelija, dovodeći do inhibicije proliferacije, zastoja ćelijskog ciklusa ili indukcije apoptoze (Chen et al., 2021). Neki primeri su prikazani u Tabeli 1. Antimikrobno dejstvo ekstrakata ruja je dokumentovano u više studija. Metanolno-vodeni ekstrakt listova *C. coggygia* pokazao je značajnu aktivnost protiv bakterije *Vibrio anguillarum* u *in vivo* modelu kod riba (Bilen et al., 2013). Pored toga, ekstrakt u smeši dimetil-sulfoksida (DMSO) i vode (do 5% DMSO), dobijen iz listova ruja nakon maceracije i vakuumskog uparavanja ekstrakta u 95% etanolu, ispoljio je antivirusno i virustatičko dejstvo protiv mozaičnog virusa duvana (engl. Tobacco mosaic virus) (Jing et al., 2012). Ekstrakti i drveta i listova ruja su pokazali dejstvo na smanjenje ukupnih triglicerida i drugih lipidnih frakcija (Ivanova et al., 2005; Rahman et al., 2022), što upućuje na modulaciju metabolizma, koju dodatno potkrepljuje činjenica da su neki ekstrakti ruja pokazali i antihiperглиkemijsko dejstvo (Rahman et al., 2022) i inhibitorno dejstvo na  $\alpha$ -amilazu (u etil-acetatom i n-heksanom ekstrahovanim uzorcima), posebno ako je biljni materijal (lišće) prethodno bio podvrgnut fermentaciji (Stojiljković et al., 2025). Matić i saradnici su opisali da je metanolni ekstrakt izdanka ruja pokazao hepatoprotektivno dejstvo kod pacova, pri tretmanu jetre pirogalolom, koji se smatra mutagenom, snižavajući hepatične transaminaze i ukupni bilirubin i smanjujući učestalost oštećenja DNK u hepatocitima detektovanih komet esejom, pokazujući time antigenotoksično delovanje (Matić et al., 2013b). Ovi protektivni i antioksidativni efekti su bili najizraženiji kada je 12 sati pre tretmana pirogalolom miševima davan ispitivani ekstrakt ruja (Matić et al., 2013b). Takođe, Antal i saradnici ističu i antiacetilholinesteraznu aktivnost, testiranu *in vitro* (Elmanova proba) i *in vivo* (merjenjem količine acetilholinesteraze u mozgu pacova) (Antal et al., 2010). Ekstrakti različitih delova ove biljke pokazuju raznovrsne biološke aktivnosti, prvenstveno antimikrobnu, uključujući i antifungalnu, antigenotoksičnu, antitumorsku, protivupalnu i hepatoprotektivnu (Matić et al., 2013b). Različiti rastvarači utiču na to koje će se klase sekundarnih metabolita ekstrahovati i u kojoj meri, pa samim tim i na biološke aktivnosti ekstrakata koje će biti ispoljene (Lee et al., 2025). Polarni rastvarači, kao što su etanol, metanol i voda, dobro ekstrahuju polarna jedinjenja, poput fenolnih jedinjenja, uključujući flavonoide, koji su specifična podgrupa fenola, kao i fenolne i flavonoidne glikozide, dok, na primer, nepolarni organski rastvarači, poput heksana i drugih, bolje ekstrahuju molekule masnih kiselina i steroidna jedinjenja (Abubakar & Haque, 2020; Dirar et al., 2019; Lee et al., 2025). Metod ekstrakcije može uključivati različite pristupe poput ultrazvučne

ekstrakcije, superkritične ekstrakcije, mikrotalasno-potpomognute ekstrakcije i sličnih metoda, koje dodatno pomažu ekstrakciju ciljanih grupa jedinjenja, a možda umanjuju prinos nekih drugih grupa jedinjenja (Abubakar & Haque, 2020; Dirar et al., 2019). Tako su i istraživanja biološke aktivnosti ruja rađena na različitim vrstama ekstrakata, kako po sastavu rastvarača, tako i po načinu ekstrakcije (Antal et al., 2010).

Antitumorski mehanizmi dejstva ekstrakata ruja i njegovih pojedinačnih konstituenata nisu dovoljno opisani u literaturi i postoji potreba za dodatnim istraživanjima mehanizma njihovog antitumorskog delovanja (Antal et al., 2021). Jedan aspekt antitumorskog dejstva ruja zasniva se i na antiinflamatornom dejstvu, jer je poznato da dugotrajna sistemska inflamacija igra ulogu u svim stadijumima neoplastične transformacije, podstičući formiranje inflamatorne tumorske mikrosredine (Nishida & Andoh, 2025). Oko 15-20% vrsta malignih oboljenja su ona kojima prethodi pojava hronične inflamacije indukovane autoimunskim stanjima ili infekcijom (Greten & Grivennikov, 2019). Primeri su pojave izmenjenih ćelija kod inflamatorne bolesti creva, gastritisa usled infekcije bakterijskom vrstom *Helicobacter pylori* ili infekcije bešike izazvane šistozomom (Greten & Grivennikov, 2019). U takvim okolnostima i samo ciljano antimikrobno dejstvo i protivupalno dejstvo ruja može rezultirati prevencijom pojave gastrointestinalnih karcinoma, kao što su predložili Stojković i saradnici (Stojković et al., 2025). Oni su izneli hipotezu da bi citotoksični efekat ekstrakata ruja na odabrane linije maligno transformisanih gastrointestinalnih ćelija mogao biti povezan sa inhibitornim efektom istih na oslobađanje proinflamatornih citokina od strane CD4<sup>+</sup> T ćelija (Stojković et al., 2025).

Osim metoda i tehnologija ekstrakcije, koji utiču na kvalitativni i kvantitativni sastav jedinjenja u ekstraktima ruja, i neki spoljašnji faktori ili predtretmani polaznog biljnog materijala mogu značajno uticati na hemijski sastav i intenzitet biološke aktivnosti ekstrakata (Antal et al., 2021; Stojiljković et al., 2025; Stojković et al., 2025). Prirodna fermentacija listova pod dejstvom bakterija iz roda *Lactobacillus*, laktofermentacija, može značajno da poveća prinos terpenoida, ali i da smanji neka druga bioaktivna jedinjenja, kao i da poveća antimikrobnu aktivnost uzoraka ekstrahovanih u heksanu i etil-acetatu (Stojiljković et al., 2025). Značajna interpopulaciona varijacija u akumulaciji elemenata (Ca, Fe, Co, Zn), markerima oksidativnog stresa, morfometrijskim osobinama, kao i u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu etarskih ulja i fenolnih jedinjenja *C. coggygria* opisana je od strane Stojković i saradnika (Stojković et al., 2025) i kao dominantan faktor varijabilnosti autori napominju edafske uslove, odnosno tip zemljišta. Analiza fenolnih jedinjenja ukazala je na razlike specifične za lokalitet ruja, pri čemu su biljke sa termofilnih staništa pokazale najveće koncentracije galne kiseline, katehina i rutina (Stojković et al., 2025). Prinos i sastav etarskog ulja takođe su varirali; listovi poreklom sa staništa zasićenog metalima imali su najveći sadržaj monoterpenskih ugljovodonika, dok su uzorci kore sa termofilnih staništa pokazali povišen nivo seskviterpena (Stojković et al., 2025). Prilikom dobijanja ekstrakata ruja za istraživačke svrhe, korisno je voditi računa o optimalnim vidovima predtretmana, kao i o selekciji populacija za uzorkovanje, a u cilju optimizacije ekstrakcije i visokog stepena ciljanih bioloških aktivnosti (Stojković et al., 2025).

**Tabela 1 Primeri bioloških aktivnosti ekstrakata dobijenih iz ruja**

| <b>Rastvarač/način ekstrakcije</b>                                                                                                           | <b>Deo biljke</b>                                     | <b>Biološka aktivnost</b>                                                                        | <b>Referenca</b>        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Metanolno-vodeni rastvor (80%), maceracija</b>                                                                                            | Listovi                                               | Antihiperglikemijsko dejstvo, antihiperlipidemijsko, antioksidativno                             | (Rahman et al., 2022)   |
| <b>Metanol, Sokslet ekstrakcija</b>                                                                                                          | Izdanak/grančice                                      | Antioksidativno-dejstvo, antigenetoksično, hepatoprotektivno                                     | (Matić et al., 2013)    |
| <b>Etanolno-vodeni rastvor (40%), maceracija</b>                                                                                             | Drvo                                                  | Hipolipidemijsko (sniženi serumski trigliceridi)                                                 | (Ivanova et al., 2013)  |
| <b>Metanolno-vodeni rastvor (40%), perkolacija</b>                                                                                           | Listovi                                               | Antibakterijsko (na <i>Vibrio anguillarum</i> )                                                  | (Bilen et al., 2013)    |
| <b>Hlorofomno-etil-acetatno-vodeni rastvor, maceracija i vakum uparavanje</b>                                                                | Mlade grane i listovi                                 | Antimikrobno, Antioksidantno, Antiinflamatorno/Protivupalno i citotoksično (na HeLa ćel. liniju) | (Marčetić et al., 2012) |
| <b>DMSO*-vodeni rastvor (do 5% DMSO), nakon maceracije i vakum uparavanja u 95% etanolu</b>                                                  | Listovi                                               | Antiviralno/virostatično (na Mozaični virus duvana)                                              | (Jing et al., 2012)     |
| <b>Heksan i anhidrindni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*, Hidrodestilacija po Klevendžeru</b>                                                   | Etarsko ulje, od herbe (nadzemni delovi)              | Antioksidantno, Antiefedantno, Protivupalno Helirajuće,                                          | (Thapa et al., 2020)    |
| <b>Voda, etanolno-vodeni rastvor (40%), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Hidrodestilacija po Klevendžeru, i maceracija u etanolnom rastvoru</b> | Etarsko ulje, Herba - Grane i nadzemni delovi biljke, | Antioksidantno                                                                                   | (Shaboyan et al., 2021) |

Flavonoidi su biljni polifenoli sa osnovnim C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> skeletom koji se dele na više podgrupa (npr. flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanoli/katchini, halkoni i antocijanini) i važni su kao pigmenti i zaštitni sekundarni metaboliti sa izraženim antioksidativnim i drugim biološkim efektima (Chen et al., 2023). Tanini su veći polimerni polifenolni molekuli poznati po adstringenciji i sposobnosti vezivanja proteina, najčešće podeljeni na hidrolizibilne (galo- i elagitanine) i kondenzovane tanine (proantocijanidine), dok su fenolne kiseline (fenolkarboksilne kiseline) uglavnom podeljene na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline i značajne su zbog antioksidativnih/bioloških aktivnosti (Smeriglio et al., 2017).

Flavonoidni halkan butein jedno je od veoma važnih bioaktivnih jedinjenja identifikovanih u ekstraktima *C. cogglygria* Scop. (Padmavathi et al., 2015, 2017). U naučnim istraživanjima je pokazano antioksidativno, protivupalno, antihipertenzivno i antitumorsko dejstvo buteina (Padmavathi et al., 2015, 2017). Butein ispoljava antitumorsko dejstvo posredstvom mnogobrojnih mehanizama, deluje na više ciljnih molekula i signalnih puteva koji su kandidati za antitumorske terapije poput ERK1/2, MMP-9, NF-κB, JNK, STAT3, mTOR, COX-2 (uglavnom negativno regulišući njihovo eksprimiranje), p38 (tako što aktivira) i mnogih drugih (Padmavathi et al., 2015, 2017). Pored toga, butein povećanom aktivnošću apoptotskih proteina, kao što su kaspaza-3, kaspaza-8 i kaspaza-9, dovodi do povećanja nivoa ROS, deregulacije PI3K/Akt/mTOR signalnog puta, smanjenja preživljavanja ćelija, zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi, inhibicije migracije i invazije ćelija adenokarcinoma grlića materice HeLa, kao i supresije rasta tumora kod miševa sa HeLa ćelijskim ksenografima (Bai et al., 2015; Ramanathan et al., 1992). Na sličan način, pokazano je da butein indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi i apoptozu kod HepG2 i Hep3B ćelija. Zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M je bilo povezano sa generisanjem ROS i aktivacijom JNK signalnog puta (Moon et al., 2009). Osim zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 i G2/M fazi, kod karcinoma prostate DU 145 i PC-3 butein je takođe uticao na nivo ROS, ali i izazivao apoptozu i nekrozu, ali u tom slučaju akumulacijom ROS i izazivanjem mitohondrijske nestabilnosti u maligno transformisanim ćelijama kod 2D kultura i 3D sferoida, što su proučavali Lee i saradnici (Lee et al., 2025). Lee i saradnici dodaju da ćelijske linije adenokarcinoma prostate PC-3 i karcinoma prostate DU 145 pokazuju različitu osetljivost na tretman buteinom. Dok su PC-3 ćelije agresivan i metastatski model uznapredovalog adenokarcinoma prostate, poznato je da DU 145 ćelije imaju nešto drugačije karakteristike rasta i odgovore u signalnim putevima. Butein takođe smanjuje ekspresiju *c-Myc* na transkripcionom nivou i negativno reguliše aktivnost vezivanja za DNK, bez obzira na tip ćelije, kod ćelija leukemije. Aktivnosti vezivanja *c-Myc* za hTERT osnovni promotor bile su smanjene u ćelijama tretiranim buteinom, što je potvrđeno analizom hromatinske imunoprecipitacije (ChIP esej) (Moon et al., 2009). Suprimiranjem angiogeneze, preko inhibitornog i supresivnog dejstva na NF-κB, pokazuje i protivupalni i antiinvazivni/antiproliferativni efekat (Jayasooriya et al., 2018). Buteinom izazvana apoptoza posredovana je aktivacijom kaspaze-3, što se dovodi u vezu sa izmenjenom ekspresijom Bcl-2 i Bax proteina (Jayasooriya et al., 2018). Butein je istraživao i kao sinergist konvencionalne citotoksične terapije (Zhang et al., 2015). Tako je pokazano da butein može učiniti HeLa ćelije osetljivijim na tretman cisplatinom, a predloženi mehanizam se zasniva na modulatornom dejstvu na protein kinazu B (PKB/AKT) i ERK1/2/p38 i MAPK signalne puteve (Zhang et al., 2015). Butein je sekundarni metabolit *C. cogglygria* sa najjačim antitumorskim efektima, o čemu postoje brojni navodi u literaturi za različite tipove malignih ćelijskih linija, uključujući rak dojke, pluća, debelog creva, jetre, pankreasa, grlića materice, jajnika, prostate, kao i melanom i leukemiju, kako je sveobuhvatno prikazano u revijskom radu Padmavathi i saradnika (Padmavathi et al., 2015, 2017). Studija Lu i saradnika istraživala je mehanizam dejstva buteina i njegove potencijalne genske mete kod kolorektalnog karcinoma primenom mrežne farmakologije i podataka sekvenciranja RNK iz pojedinačnih ćelija, ukazujući na potrebu za sveobuhvatnom evaluacijom njegovih molekularnih meta u različitim tipovima

karcinoma koristeći omiks pristupe i bioinformatičke analize kako bi se u potpunosti procenio njegov terapijski potencijal (Lu et al., 2024).

Sulfuretin je jedan od najznačajnijih sekundarnih metabolita biljne vrste *C. coggygia* Scop., auronski je flavonoid, koji poseduje značajan antitumorski potencijal, sa delimično proučenim molekularnim mehanizmima dejstva (Pašić et al., 2025). U ekstraktima drveta (srži) procenat sulfuretina može varirati (0,38-0,69% do 14,4%) (Antal et al., 2021; Pašić et al., 2025). Jedan od predloženih mehanizama je i pozitivna regulacija eksprimiranja miRNA-30C (antionkogena mikroRNK) u humanim ćelijama adenokarcinoma prostate PC-3 nakon tretmana sulfuretinom. Povećana koncentracija ove mikroRNK nadalje dovodi do selektivne direktne inhibicije ciklina D2 i indirektno inhibicije ciklina D1, ali ne i D3, što potom izaziva zastoj u ćelijskom ciklusu i/ili apoptozu (Poudel et al., 2013). Sulfuretin ima potencijal i u antitumorskoj aktivnosti i u kasnijim fazama maligne transformacije, u MCF-7 ćelijama i može donekle uticati na regulaciju invazije ćelija (Kim et al., 2013a). Tako Kim i saradnici opisuju u svojoj studiji da sulfuretin može inhibirati hiperekspresiju matriksne metaloproteinaze-9 (*MMP9*), preko supresije NF- $\kappa$ B (Kim et al., 2013a). U ovom istraživanju dejstvo sulfuretina je smanjilo invazivni potencijal delujući suprotno u odnosu na dejstvo 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetata (TPA), koji povećava ekspresiju *MMP9* preko NF- $\kappa$ B signalnog puta (Kim et al., 2013a). Flavonoid sulfuretin jedan je od najzastupljenijih sastojaka identifikovanih u ispitivanom etanolnom ekstraktu *C. coggygia* (Novaković et al., 2007). U literaturi su navedena brojna farmakološka dejstva sulfuretina: snažno antitumorsko, antioksidativno, antiinflamatorno, hepatoprotektivno, neuroprotektivno, antidijabetsko i antimikrobno (Shen et al., 1991). Da bi se u potpunosti procenio njegov terapijski potencijal, neophodno je identifikovati molekularne mehanizme i moguće ciljne biomolekule ovog aurna.

U literaturi je pronađeno da je kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom fisetin (prisutan u značajnim količinama u ruju), u dozi od 100 mg/dan, stabilizovao inflamatorno stanje smanjujući koncentraciju IL-8 u plazmi (Farsad-Naeimi et al., 2018; Li et al., 2020). Istraživanja koja su vršili Li i saradnici pokazala su da, u slučaju oralnog karcinoma skvamoznih ćelija, fisetin ostvaruje antiproliferativno i proapoptotsko dejstvo, inhibirajući i migracioni potencijal malignih ćelija, smanjujući ekspresiju PAK4 (p21-aktivirane kinaze 4) (Li et al., 2020). Fisetin može inhibirati aktivaciju ekstraćelijskim signalom regulisane protein kinaze (ERK1/2), rezultirajući smanjenom proliferacijom i indukcijom apoptoze kod ćelija karcinoma želuca (Yan et al., 2018). ERK1/2 je ključna serin/treonin protein kinaza u nizu ćelijskih procesa uključujući i proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, zaustavljanje ćelijskog ciklusa (stimulišući nakupljanje ciklin-zavisnih kinaza) i deo je MAPK signalnog puta. Disregulacija je česta pojava kod patoloških stanja i prethodi nastanku hronične inflamacije, i u nekim stadijumima karcinogeneze (Meloche & Pouyssegur, 2007).

Još jedno bioaktivno jedinjenje karakteristično za ruj, posebno listove i izdanke biljke, je elaginska kiselina (Bradic et al., 2025; Matić et al., 2016). Ovo heterociklično organsko jedinjenje, koje nastaje hidrolizom elagitanina (jedne vrste hidrolizibilnih tanina) i/ili dimerizacijom galne kiseline, pokazuje širok spektar dobro proučenih bioloških aktivnosti, uključujući snažno antioksidativno dejstvo, protivupalno, antidijabetsko, antimikrobno i antitumorsko dejstvo između ostalih (Matić et al., 2016). Kako se radi o termostabilnom molekulu (tačka topljenja 350 °C), naći će se i u termički obrađenim ekstraktima, uz neophodno korišćenje organskih rastvarača budući da je slabo hidrosolubilna (Matić et al., 2016; Raya-Morquero et al., 2025). U radu Mandal i saradnika uočeno je da tretman elaginskom kiselinom smanjuje fenotipe nalik na matične ćelije u malignim ćelijama, čime se smanjuje preživljavanje ćelija i potencijal samoobnavljanja (engl. self-renewal) kod ćelija jajnika i plućnih ćelija sa fenotipom nalik na matične ćelije (Mandal et al., 2024). Iako je snažan antioksidans, pokazano je da njena primena povećava osetljivost ćelija sličnih malignim matičnim ćelijama iz modela karcinoma pluća A549 i karcinoma jajnika SKOV3 na cisplatinu, uz povećanje akumulacije oštećenja DNK i smanjenje

efikasnosti popravke DNK (Mandal et al., 2024). Utičući na transport elektrona i mitohondrijsku dinamiku, preko podsticanja produkcije ROS u malignim matičnim ćelijama, utiče na nivo dinamin-vezanog proteina Drp1 (GTP-aze neophodne za podelu mitohondrije) i mitofuzina 2 (Mfn2, neophodnog za mitohondrijsku fuziju) i na nakupljanje oštećenja DNK koje onda izaziva apoptozu (Mandal et al., 2024).

Galna kiselina, fenolna kiselina karakteristična za rod *Cotinus* (Matić et al., 2016), je po dosadašnjim literaturnim podacima pokazala antitumorsko delovanje. Kod HeLa ćelija, galna kiselina pozitivno reguliše proapoptotske proteine poput Bax, a negativno reguliše antiapoptotske proteine poput Bcl-2, što dovodi i do povećanja nivoa i aktivnosti kaspaze-8 i kaspaze-9, i broja ćelija koje podležu apoptozi (Abdullah et al., 2023). Galna kiselina u ćelijama karcinoma debelog creva HCT116 podstiče nestabilnost mitohondrijske membrane, podstiče aktivnost kaspaze-3 i kaspaze-9 i moduliše aktivnost preko 700 gena, od kojih su mnogi vezani za  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisne kanale (koji imaju značajnu ulogu u regulaciji Bcl metabolizma) i povećava aktivnost tumor-supresora p53, što je potvrđeno istraživanjem koje su vršili Yang i saradnici (Yang et al., 2018a; Yang et al., 2018b).

Miricetin, koji se može naći kao najzastupljenije jedinjenje u nekim metanolnim ekstraktima ruja (Matić et al., 2013b), pokazuje antitumorsko dejstvo. Na molekularnom nivou, flavonoid cilja PKB, FYN proto-onkogen, tirozin-kinazu iz Src familije *Fyn* (engl. *FYN proto-oncogene*, *Src family tyrosine kinase*), kinazu kinaze mitogenom aktivirane proteinske kinaze 1 *MEK1* (engl. *Mitogen-activated protein kinase kinase 1*) kao i elemente signalnog puta *JAK1-STAT3* (engl. *JAK1-STAT3 signaling pathway*). Kod hepatokarcinoma HepG2, pokazuje dejstvo na prekomerno eksprimiranu ciklin-zavisnu kinazu 1 (*CDK1*). Posедуje potencijal inhibicije fosforilacije *ERK1/2*. Utičući na razne mete u mitohondriji, može selektivno podsticati apoptozu (Devi et al., 2015).

U nekim studijama je opisano izolovanje i određivanje strukture novih jedinjenja ili izomera poznatih molekula koji su fitokonstituenti ove biljke. Tako su na primer nova jedinjenja bila dimer butina (3',4',7-trihidroksiflavanona) (Antal et al., 2021), jedan auronski epoksid i dva auronolignana, kotinignana A i B (Novaković et al., 2019, 2023), a poznati, ali prvi put u ruju otkriveni sekundarni metaboliti: 3-O-metilepifustin, epitaksifolin, sulfuretin auronol (Pašić et al., 2025).

## 1.7 Genotoksični efekti ruja

Ciljana genotoksičnost ekstrakata ruja prema malignim ćelijama nije dovoljno proučena (Antal et al., 2021). Gospodinova i saradnici pokazali su da, u slučaju ćelija karcinoma dojke MCF-7, tretman ekstraktom lišća ruja, u dozi od 40,6  $\mu\text{g/ml}$  i nakon 24 sata, pokazuje genotoksične efekte uporedive sa bleomicinom koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Alkalni komet esej pokazao je migraciju značajnog dela DNK od glave komete ka repu, što znači povećanje oštećenja DNK u ispitivanom uzorku (Gospodinova et al., 2020). Takav genotoksični efekat nije bio zavisn od koncentracije, budući da se sa povećanjem doze na 100  $\mu\text{g/ml}$  efekat značajno smanjio, te su rezultati dvosmisleni (Gospodinova et al., 2020).

Matić i saradnici ispitivali su genotoksični efekat metanolnog ekstrakta izdanaka ruja na neizmenjene ćelije jetre i koštane srži *in vivo* (Matić et al., 2011). Praćena je učestalost polno vezanih letalnih mutacija u gametima drozofila i pokazano je da je učestalost značajno veća u tretiranoj nego u kontrolnoj grupi (Stanić et al., 2011). Istim istraživanjem je uz pomoć alkalnog komet eseja pokazano da je eventualna genotoksičnost na hepatocyte albino pacova zavisna od doze (Stanić et al., 2011). Tako su

doze od 1000 i 2000 mg/kg telesne mase pacova izazvale genotoksični efekat, dok doza od 500 mg/kg nije, te je stepen genotoksičnosti blago opadao nakon 72 sata od tretmana (Stanić et al., 2011). Kada je reč o povećanju mutacija u germinativnim ćelijama drozofila nakon tretmana alkoholnim (metanolnim) ekstraktom izdanaka ruja, pokazano je da ovakav genotoksični efekat zavisi od koncentracije (Stanić et al., 2011). Naime, 5% ekstrakt je u jednom istraživanju izazivao polno vezane letalne mutacije, dok je 2% ekstrakt pokazao zaštitno dejstvo na genotoksičnost izazvanu etil-metansulfonatom u spermatozoidima i spermatidama drozofila, što upućuje na antigenotoksični potencijal, u adekvatnoj dozi (Stanić et al., 2011).

Kod pacova izloženih pirogalolu, metanolni ekstrakt stabala ruja pokazao je hepatoprotektivno dejstvo, između ostalog, smanjujući učestalost oštećenja DNK u hepatocitima, a primenjivana je doza ekstrakta koja i sama nije genotoksična (500 mg/kg telesne mase, dok su doze od 1000 i 2000 mg/kg okarakterisane u studiji kao blago genotoksične) (Matić et al., 2013b). Miricetin, flavonoid prisutan u ovom ekstraktu, i sam je pokazao slično delovanje i autori istraživanja pretpostavljaju da je upravo on odgovoran za ovakvo hepatoprotektivno i antigenotoksično dejstvo zahvaljujući modulaciji aktivnosti PKB i ekspresije signalnog transduktora i aktivatora transkripcije 3 (STAT3, engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) proteina (Matić et al., 2013b).

Istraživanja potvrđuju prepoznati obrazac u farmakognosijskim istraživanjima gde je balans između genotoksičnog i antigenotoksičnog dejstva biljaka kompleksna pojava koja većinom zavisi od koncentracije i konteksta (Al-Naqeb et al., 2024). Genotoksični efekti često prate nelinearnu dozno-odgovornu relaciju. Pri niskim koncentracijama, jedinjenje može aktivirati adaptivne i zaštitne mehanizme ćelije, uključujući antioksidativne puteve i mehanizme popravke DNK, bez izazivanja merljivog oštećenja genetskog materijala. Nasuprot tome, pri višim koncentracijama dolazi do zasićenja ili inhibicije DNK-reparacionih sistema, povećanog oksidativnog stresa i direktnih ili indirektnih lezija DNK, što rezultira pojavom genotoksičnih promena. Genotoksičnost zavisi od tipa ćelije, njenog metaboličkog statusa i kapaciteta za biotransformaciju. Određena jedinjenja nisu primarno genotoksična, ali postaju takva nakon metaboličke aktivacije, dok u drugim ćelijskim sistemima mogu ostati biološki inertna. Takođe, razlike u proliferativnom statusu ćelija, nivou antioksidativne zaštite i efikasnosti DNK reparacije značajno utiču na krajnji genotoksični ishod. Zaključno, procena genotoksičnosti zahteva pažljivo razmatranje primenjene koncentracije i eksperimentalnog modela, jer isti molekul može delovati kao bezbedan ili čak protektivan u jednom kontekstu, a potencijalno genotoksičan u drugom. Ovakav pristup je naročito važan u evaluaciji prirodnih jedinjenja i biljnih ekstrakata, gde složeni sastav i dozna zavisnost dodatno utiču na biološki odgovor (Araldi et al., 2015).

U okviru istraživanja vrste *C. coggygia* iz Srbije, koje su vršili Milosavljević i saradnici, iz ekstrakta srži drvenastog dela dobijenog mešavinom metilen-hlorida i metanola izolovano je 10 poznatih flavonoida (Milosavljevic et al., 2021). Njihov *in vitro* zaštitni efekat protiv hromozomskih aberacija ispitivan je na perifernim humanim limfocitima, primenom citokinezno-blokiranog mikronukleus testa. Sva ispitana jedinjenja (pri minimalnoj dozi od 1 µg/ml) pokazala su povoljan efekat smanjujući oštećenje DNK u opsegu od 24,2% do 54,5%, i to bolje od kontrolnog radioprotektora amifostina (Milosavljevic et al., 2021).

## 1.8 Antioksidativno dejstvo ekstrakata i jedinjenja ruja

Za održavanje homeostaze organizma neophodan je balans prooksidativnog i antioksidativnog dejstva (Birben et al., 2012). Dejstvo slobodnih radikala, posebno ROS, važno je između ostalog za imunski odgovor (fagocitoza), dejstvo radioterapije, dok RNS, poput azot-monoksida NO (engl. nitric oxide), imaju širok spektar uloga u signalnim putevima omogućavajući razne procese od vazodilatacije do neurotransmisije kod čoveka (Andrabi et al., 2023; Birben et al., 2012; Hancock et al., 2001). ROS takođe imaju signalnu ulogu u kaskadama signala vezanih za indukciju programirane ćelijske smrti ili nekroze, podstiču ili inhibiraju aktivaciju gena ili započinju signalne kaskade vezane za aktivnost MAPK (Andrabi et al., 2023; Birben et al., 2012; Hancock et al., 2001). Ipak, ovakvi pozitivni molekularni efekti ROS i RNS visoko su zavisni od koncentracije i lokalizacije (Birben et al., 2012; Hancock et al., 2001). U većoj koncentraciji često imaju oprečno dejstvo, poput NO koji podstiče rast tumora ili ROS koji doprinose nastanku tumor promovišuće mikrosredine, oštećuju DNK i učestvuju u signalnim putevima koji doprinose karcinogenezi (često kao posledica hroničnog oksidativnog stresa i produženog dejstva ROS u niskim do umerenim koncentracijama) (Andrabi et al., 2023; Attique et al., 2025). Zavisno od koncentracije, ROS mogu da utiču ili stimulišuće ili inhibitorno na neoplastičnu transformaciju, uzimajući u obzir da se citotoksična jedinjenja često oslanjaju na prooksidativno oštećenje malignih ćelija (Hayes et al., 2020).

Veća koncentracija ROS i RNS, kao i njihova štetna dejstva, ne mogu biti prevaziđeni urođenim sistemima antioksidativne zaštite, poput enzima katalaze CAT (engl. *Catalase*), glutation peroksidaze GPx (engl. *Glutathione Peroxidases*) i superoksid dismutaze SOD (engl. *Superoxide Dismutases*), kada se ćelija nađe u stanju stresa (Birben et al., 2012; Hancock et al., 2001). Ćelijski odgovor na stres predstavlja reakciju ćelija na molekularnom nivou usmerenu na suprotstavljanje različitim stresorima iz okruženja. Ovi stresori mogu poticati iz same ćelije ili iz spoljašnje sredine. Međutim, kada intenzitet ovih stresora prevaziđe sposobnost ćelije da se sa njima izbori, dolazi do programirane ćelijske smrti i ćelijske senescencije (Pizzino et al., 2017; Stojanovic et al., 2025). Oksidativni stres se dovodi u vezu sa patogeneom bolesti vezanih za starenje, i sve se više istražuju egzogeni antioksidanti poput vitamina C, E, selen, a posebno flavonoidi i polifenoli biljaka (Pizzino et al., 2017). Ovakvi molekuli sprečavaju ili poništavaju dejstvo slobodnih radikala tako što predaju svoje valentne elektrone, umesto da ih ROS i RNS preuzimaju od bioloških strukturnih molekula i time iste nepovratno oštećuju (Birben et al., 2012; Hancock et al., 2001; Pizzino et al., 2017). Ovi molekuli mogu da inhibiraju transport elektrona, da zaustave peroksidaciju lipida, kao i da podstiču aktivnost urođenih endogenih antioksidanata i dr. (Hancock et al., 2001). U velikom višku ili kompleksirani sa nekim drugim jedinjenjima, antioksidativni molekuli (npr. fenoli sa tranzitnim metalnim jonima) mogu da deluju prooksidativno (Pizzino et al., 2017).

Ekstrakti ruja su i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost. Tako su na primer Rahman i saradnici pokazali da bez obzira na rastvarač (voda, metanol, n-heksan, etil-acetat i hloroform) ekstrakti ruja u koncentraciji od 1 mg/ml (w:v) inhibiraju preko 50% molekula sintetičkog difenilpikrilhidrazil - DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) radikala (Rahman et al., 2022). U istoj studiji, ovi uzorci su pokazali nešto lošije inhibitorno dejstvo na vodonik-peroksid  $H_2O_2$  (engl. *hydrogen peroxide*) (Rahman et al., 2022).

Ekstrakti mladih grana i listova ruja u etil-acetatu pokazali su snažnije antioksidativno dejstvo u odnosu na one ekstrahovane u vodi, acetonu ili hloroformu, u slučajevima DPPH proba i proba lipidne peroksidacije supstanci reaktivnih sa tiobarbiturnom kiselinom TBARS (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) (Marčetić et al., 2013). Koncentracija ekstrakata u DPPH testu neophodna da se

eliminise najmanje 50% stabilnih DPPH molekula kretala se u rasponu 1,7-25,0  $\mu\text{g/ml}$  (Marčetić et al., 2013). Najsnažnije antioksidativno dejstvo ekstrakta izdanaka ruja u etil-acetatu od 1,7  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{SC}_{50}$ , koncentracija koja neutralise 50% slobodnih radikala, engl. 50% Scavenging Concentration) u DPPH testu opisali su i Simić i saradnici (Simić et al., 2008). U istoj studiji opisan je i redukujući potencijal ekstrakata u FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) probi, gde je opet najsnažnije delovao etil-acetatni ekstrakt (5,0 mM  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  ekstrakta) (Simić et al., 2008). Ovaj ekstrakt je takođe pokazao i najnižu  $\text{IC}_{50}$  u probi inhibicije lipidne peroksidacije (lipozomalno) (Simić et al., 2008). Još jedna studija je pokazala da etil-acetatna frakcija ekstrakta (inicijalno metanol) biljke ruj pokazuje najsnažniju antioksidativnu aktivnost ( $\text{IC}_{50}$  kod DPPH probe 15,58  $\mu\text{g/ml}$ ), veliki redukcionni potencijal i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (61,41%) (Abbasi et al., 2012). Metanolni ekstrakti cvetova i listova ruja takođe su pokazali antioksidativno dejstvo u *in vitro* DPPH testu, ali i testu inhibicije lipidne peroksidacije, sa  $\text{IC}_{50}$  od 3,8 i 2,6  $\mu\text{g/ml}$  (DPPH proba) i 31,9 i 35,8  $\mu\text{g/ml}$  (lipidna peroksidacija), redom (Šavikin et al., 2009). Ekstrakti ruja, osim direktnog uticaja na ROS i RNS, mogu da podstiču i urođene antioksidativne sisteme, da utiču na povećanje oksidovane forme glutationa, da utiču na povećanje koncentracije glutationa u tretiranoj pljuvački dobrovoljaca, ali i da smanje aktivnost SOD u istoj (Sukhikh et al., 2021; Yarat et al., 2013). Matić i saradnici su proučavali *in vivo* zaštitno dejstvo ruja od oksidativnog stresa (Matić et al., 2013b). Kod Wistar pacova tretiranih pirogololom primećena je povećana koncentracija TBARS u serumu (Matić et al., 2013b). Primena metanolnog ekstrakta grančica/izdanaka ruja 1, 2 ili 12 sati pre tretmana pirogololom ublažila je rast TBARS u serumu (Matić et al., 2013b). Takođe, nivoi aktivnosti SOD, glutation transferaze i CAT bili su u manjoj meri smanjeni usled dejstva pirogolola ako su pacovi prethodno tretirani ekstraktom ruja na isti način (Matić et al., 2013b). Autori su dokazali da ovakav ekstrakt ima i određenu helirajuću aktivnost, što doprinosi njegovom antioksidativnom potencijalu (Matić et al., 2013b).

Antioksidativna aktivnost etarskog ulja ruja je nedovoljno proučena (Antal et al., 2010; Thapa et al., 2020). Pokazano je da poseduje antioksidativni potencijal u DPPH testu ( $\text{IC}_{50} = 10,3 \mu\text{l}$ ), kao i antioksidativnu sposobnost heliranja metala ( $\text{IC}_{50} = 12,6 \mu\text{l}$ ) (Thapa et al., 2020). Autori su pokazali da je antioksidativna aktivnost etarskog ulja ruja iz Jermenije u DPPH testu snažnija, ako je isto dobijeno od listova biljke ( $\text{IC}_{50}$  2,37-2,64 g/l), nego kada je dobijeno iz grana (13,85-13,95 g/l). Etarsko ulje nadzemnih delova iz Indije pokazalo je  $\text{IC}_{50}$  od 720  $\mu\text{g/ml}$  u DPPH testu i  $\text{IC}_{50}$  od 1480  $\mu\text{g/ml}$  u probi lipidne peroksidacije (Joshi & Mathela, 2014).

Ekstrakti ruja su ispoljili snažno antioksidativno dejstvo *in vitro* i *in vivo*, gde je dejstvo *in vivo* bilo jednako ili snažnije od sintetičkih antioksidanata (cisteina, BHT [butilovanog hidroksitoluena] i sl.), pri čemu ono zavisi od porekla biljke i edafoklimatskih faktora, načina ekstrakcije, rastvarača ili tipa predtretmana biljnog materijala pre ekstrakcije (Antal et al., 2010; Matić et al., 2016).

## 1.9 Čelijske linije kao eksperimentalni modeli u onkološkim istraživanjima

Čelijske linije predstavljaju jedan od najčešće korišćenih *in vitro* model-sistema u onkološkim istraživanjima jer omogućavaju ispitivanje bioloških efekata različitih tretmana u strogo kontrolisanim uslovima, uz dobru reproducibilnost i mogućnost detaljnog uvida u čelijske i molekularne mehanizme. Njihova primena obuhvata analizu proliferacije, preživljavanja i tipova čelijske smrti, promene čelijskog ciklusa, kao i odgovor na terapijske agense i stresore. Istovremeno, čelijske linije predstavljaju pojednostavljen model u odnosu na tumor *in vivo*, budući da ne odražavaju u potpunosti heterogenost tumora i kompleksne interakcije sa mikrokruženjem, te se dobijeni rezultati uobičajeno tumače u okviru

ograničenja ovakvog eksperimentalnog sistema. U cilju obezbeđivanja pouzdanosti i reproducibilnosti, poseban značaj ima standardizacija uslova kultivacije. U ovom istraživanju, u svrhu detaljnije karakterizacije procesa i mehanizama antitumorskog dejstva, korišćene su tri dobro karakterisane ćelijske linije iz ATCC (engl. American Type Culture Collection) kolekcije (HeLa, MDA-MB-231 i K562), koje predstavljaju relevantne modele za proučavanje različitih tipova maligniteta i omogućavaju sagledavanje efekata tretmana u kontekstu epitelnih solidnih tumora i hematoloških maligniteta (ATCC, n.d.).

HeLa (ATCC CCL-2) je epitelna, adherentna humana ćelijska linija poreklom iz karcinoma grlića materice, izolovana 1951. godine i istorijski prepoznata kao prva imortalizovana humana ćelijska linija u kulturi. ATCC navodi da HeLa pokazuje izraženu aneuploidiju, da su ćelije keratin-pozitivne i da je prisustvo humanog papiloma virusa, HPV (posebno se pominju HPV-18 sekvence) česta karakteristika ove linije, uz izveštaje o niskoj ekspresiji p53 i očuvanim nivoima pRB. Zbog robusnog rasta i dobro opisane biologije, HeLa se rutinski koristi za istraživanja povezana sa proliferacijom, oštećenjem DNK, kontrolom ćelijskog ciklusa i farmakološkim odgovorima. Ekspresija tumorskog proteina p53 (kodiranog genom *TP53*) može biti smanjena usled funkcionalne inaktivacije proteina, između ostalog i HPV E6-posredovane degradacije. Stoga, ćelije mogu ispoljavati funkcionalni fenotip deficijencije proteina p53 i u odsustvu mutacija u sekvenci gena *TP53* (ATCC, n.d.).

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) je adherentna ćelijska linija poreklom iz metastatskog adenokarcinoma dojke, često korišćena kao model trostruko negativnog fenotipa i agresivnijeg ponašanja tumora sa mutiranim *TP53* genom (homozigot za mutaciju p.Arg280Lys [R280K]) (ATCC, n.d.).

K562 (ATCC CCL-243) je humana ćelijska linija u suspenziji (limfoblastne morfologije) dobijena od pacijentkinje sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u terminalnoj blastnoj krizi, pri čemu ATCC navodi da je originalno uspostavljena iz pleuralnog izliva i da pokazuje visok stepen nediferenciranosti uz sposobnost spontanog diferenciranja ka više hematopoetskih linija. K562 se široko koristi kao model za mehanizme leukemijske signalizacije i mehanizme terapijskog odgovora i ima mutirani *TP53* (homozigot za mutaciju p.Gln136fs\*13 (c.406\_407insC)) (ATCC, n.d.).

Status p53 u odabranim ćelijskim linijama predstavlja važan faktor pri interpretaciji odgovora na tretmane koji indukuju oštećenje DNK i oksidativni stres, budući da p53 koordinira aktivaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, popravku oštećenja DNK i pokretanje programirane ćelijske smrti. U linijama sa nemutiranim (funkcionalno očuvanim) p53 očekuje se izraženija aktivacija p53-zavisnog zastoja ciklusa i apoptoze nakon stresnog stimulusa, dok prisustvo mutiranog ili funkcionalno inaktivisanog p53 može preusmeriti ćelijski odgovor ka alternativnim mehanizmima preživljavanja i smrti, uz drugačiju dinamiku promena u ćelijskom ciklusu. Stoga se p53 status uzima kao važna biološka determinanta koja može objasniti razlike u osetljivosti ćelija na tretman, proliferaciji i ishodima ćelijske smrti između ispitivanih model-sistema (ATCC, n.d.).

## **1.10 Molekularni mehanizmi antitumorskog dejstva**

### **1.10.1 Apoptotski signalni putevi i molekuli**

Apoptoza je evolutivno visoko konzervisani tip programirane ćelijske smrti i neophodan je proces u višćelijskim organizmima, koji doprinosi adekvatnom odvijanju niza fizioloških funkcija, od embriogeneze, preko održavanja tkivne homeostaze, do prevencije pojave maligne transformacije i neurodegenerativnih bolesti (Ahmed & Tait, 2025). Upravo neregulisana apoptoza važan je aspekt

patogeneze kod malignih bolesti, autoimunskih bolesti i neurodegenerativnih bolesti (Ahmed & Tait, 2025; Singh et al., 2019).

Za adekvatnu regulaciju apoptoze od esencijalnog značaja je, između ostalog, balansirana aktivnost proapoptotskih (podstiču apoptozu) i antiapoptotskih (inhibiraju apoptozu) članova Bcl-2 familije proteina (Singh et al., 2019).

Antiapoptotski članovi:

1. *BCL2* (*Bcl-2*)
2. *BCL2L1* (*Bcl-xL*)
3. *MCL1*
4. *BCL2L2* (*Bcl-w*)
5. *BCL2A1* (*A1/Bfl-1*)

Proapoptotski članovi:

1. Efektori (izvršioци permeabilizacije mitohondrija):

*BAX*

*BAK1* (*Bak*)

2. BH3-only (senzori/aktivatori): *BID*, *BIM* (*BCL2L11*), *PUMA* (*BBC3*), *NOXA* (*PMAIP1*), *BAD*, *BIK*, *BMF* i *HRK*.

Razlikuju se dve vrste apoptotskih mehanizama: mitohondrijski (unutrašnji) i spoljašnji (egzogeni, začeti van mitohondrije) mehanizmi (Ahmed & Tait, 2025). Kaspaze, vrsta proteaza, specifični su enzimi odgovorni za inicijaciju apoptoze, posledično razlaganje istrošenih ćelija i sprečavanje neadekvatnog imunskog odgovora usled ovakve pojave (Ahmed & Tait, 2025; Singh et al., 2019). Samim tim, pozitivna regulacija apoptoze, u smislu ciljane indukcije, jedan je od modaliteta antitumorske terapije koja se aktivno istražuje već 30 godina (Tian et al., 2024). Mnogi mali i veliki molekuli koji utiču na unutrašnje (npr. venetoklaks) i spoljašnje apoptotske (npr. eftozanermin alfa, analozi TRAIL-a) mehanizme su već istraživani u ovom smeru (Tian et al., 2024), kao i oni koji ciljaju i p53 signalne puteve (npr. inhibitori MDM2, engl. Murine Double Minute 2), i signalne puteve integrisanog odgovora na stres, koji pokazuju povezanost sa apoptotskim signalnim putevima (Tian et al., 2024).

### 1.10.2 Unutrašnji (mitohondrijski) put aktivacije apoptoze

Unutrašnji apoptotski signalni putevi započinju unutar ćelije i primarno zavise od aktivnosti dve grupe proteina, *BAX* i *BAK1*, koji permeabilizuju spoljašnju membranu mitohondrija (Tian et al., 2024). Nakon aktivacije ovi proteini prolaze konformacione promene i oligomerizaciju, permeabilizuju spoljašnju membranu mitohondrije stvarajući pore, nakon čega omogućavaju efluks citohroma c i sekundarnog mitohondrijskog aktivatora kaspaza, SMAC proteina (engl. *Second mitochondria-derived activator of caspases*) iz mitohondrije u citosol (Tian et al., 2024). SMAC, poznat i pod akronimom DIABLO (engl. *Direct IAP-binding protein with low pI*), ima ulogu u smanjenju aktivnosti proteina inhibitora apoptoze IAP (engl. *Inhibitor of Apoptosis*), kao i podsticanju aktivnosti

inicijatorske kaspaze 9 i efektorskih kaspaza (kaspaza 3, kaspaza 6, kaspaza 7), čije aktivnosti vode ćelijskoj smrti (Springs et al., 2002). Citohrom c, sa druge strane, zajedno sa dATP (deoksiadenozin-trifosfatom), APAF1 i prokaspazom 9 formira apoptozom (Tian et al., 2024). Unutar samog apoptozoma, prokaspaza 9 se prevodi u kaspazu 9, koja onda kao inicijatorska kaspaza aktivira izvršne kaspaze 3, 6 i 7, nepovratno izazivajući apoptozu ćelije (Tian et al., 2024). Postoji i proapoptotski put vezan za mitohondrije, a nezavisan od aktivnosti kaspaza. Vezan je za faktor indukcije apoptoze povezan sa mitohondrijama 1 ili AIFM1 (engl. *Apoptosis inducing factor mitochondria associated 1*), filogenetski konzervisani flavoprotein, lociran u intermembranskom prostoru mitohondrije (Candé et al., 2002). Ovakav signalni put je obično aktiviran kada su aktivnosti kaspaza iz nekog razloga blokirane, a nakon permeabilizacije spoljašnje membrane mitohondrije AIFM1 se translocira iz mitohondrije u jedro (Candé et al., 2002). U jedru se elektrostatičkim interakcijama vezuje za DNK, podstiče kaspaza-nezavisnu kondenzaciju hromatina, a time i apoptotski odgovor (Candé et al., 2002).

### 1.10.3 Spoljašnji apoptotski mehanizmi (signalni putevi receptora smrti ćelije)

Spoljašnji put ćelijske smrti započinje na površini ćelije, gde se specifični receptori prepoznaju kao „receptori smrti“ zbog svoje sposobnosti da nakon vezivanja odgovarajućih liganada aktiviraju intraćelijske signalne kaskade koje vode ka apoptozi (Galluzzi et al., 2018). Ovi receptori pripadaju superfamiliji receptora za faktor nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor, TNF) i karakteriše ih prisustvo citoplazmatskog domena smrti, koji omogućava regrutovanje adaptorskih proteina i formiranje signalnih kompleksa neophodnih za pokretanje kaspazne aktivacije (Galluzzi et al., 2018). Pored TRAIL-sistema, među najznačajnijim receptorima ovog tipa ističu se Fas (CD95/APO-1) i TNF receptor 1 (TNFR1), koji posreduju u ćelijskom odgovoru na Fas ligand, odnosno TNF- $\alpha$ , i mogu usmeriti ćeliju ka programiranoj smrti ili, u zavisnosti od konteksta, ka alternativnim signalnim ishodima poput preživljavanja i inflamatornog odgovora (Galluzzi et al., 2018). Na taj način, receptori ćelijske smrti na membrani predstavljaju ključnu tačku integracije spoljašnjih signala i unutrašnjih mehanizama kontrole sudbine ćelije, što je od posebnog značaja u razumevanju tumorske biologije i terapijskog odgovora (Galluzzi et al., 2018).

Za spoljašnji mehanizam indukcije apoptoze ključan je ligand poznat pod akronimom TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) koji takođe ima važnu ulogu u imunskom nadzoru (Pimentel et al., 2023). Ovaj ligand, koji postoji u formi transmembranskog proteina, favorizuje apoptotski odgovor u maligno transformisanim ćelijama (Pimentel et al., 2023).

Po vezivanju liganda TRAIL, njegovi receptori smrti DR4 i DR5 (engl. *Death Receptor*) se trimerizuju i premošćuju ćelijsku membranu, što onda aktivira adaptorski protein FADD (engl. *Fas-Associated protein with Death Domain*) koji poseduje efektorski domen smrti (engl. *death effector domain* ili DED) (Tian et al., 2024). Prokaspaze 8 i 10, koje takođe poseduju svoje DED, vezuju se za DED kod FADD, pod uslovom da nema kompeticije od strane ćelijskog proteina inhibitora FLICE (c-FLIP, engl. *cellular FLICE-inhibitory protein*) koji se takođe može vezati za DED FADD koji cilja prokaspaza 8 (Tian et al., 2024). Kada se prokaspaze 8 i 10 uspešno vežu za DED kod FADD, formiraju signalni kompleks koji indukuje smrt DISC (engl. *Death-Inducing Signaling Complex*), gde se one i aktiviraju, i onda cepaju i aktiviraju izvršne kaspaze (Tian et al., 2024).

Unutrašnji i spoljašnji apoptotski put su povezani amplifikacionim mehanizmom, a ovakva „dvostruka“ aktivacija je i neophodna da se izazove apoptoza u nekim ćelijama, koje se onda i označavaju kao „ćelije tipa II“ (Mustafa et al., 2024). Ovu vezu omogućava kaspaza 8 (iz spoljašnjeg

puta), koja cepa proapoptotski protein *BID* (engl. *BH3-interacting domain death agonist*) u „skraćeni/okrnjeni“ BID (tBID, engl. truncated BID), koji se translocira do mitohondrije i aktivira proteine unutrašnjeg puta (Mustafa et al., 2024).

Iako je apoptoza u velikoj meri organizovana nekom od četrnaest (do sada) izolovanih cistein proteaza, odnosno kaspaza, smatra se da izvršne kaspaze najviše doprinose izvršenju karakterističnih morfoloških i biohemijskih promena apoptotske ćelije, prvenstveno kada je reč o spoljašnjim mehanizmima, ali čini se da ni tu one nemaju jednaku ulogu (Slee et al., 2001). Tako su Slee i saradnici pronašli da je kaspaza 3 primarna izvršna kaspaza za cepanje 13 od 14 ispitivanih supstrata (Slee et al., 2001). Dakle, iako su kaspaze 6 i 7 neophodne za nizvodnu apoptotsku signalizaciju, nedostatak bilo koje od njih je imao minimalan efekat na istraživane supstrate, što ukazuje na potrebu preciznije definicije njihove uloge u izvršnoj fazi apoptoze (Lakhani et al., 2006; Slee et al., 2001). U nekoj meri, bar u pogledu nekih supstrata, uloge ovih kaspaza su rasvetljene i međuzavisne, jer kaspaze 3 i 7 često funkcionišu komplementarno (mada se kaspaza 7 može smatrati redundantnom u odnosu na kaspazu 3) i vrše proteolizu sličnih supstrata. Kaspaza 3 ima i mehanizam povratne sprege sa mitohondrijskim signalnim putevima, dok kaspaza 6 uglavnom ima ulogu u proteolizi nuklearnih proteina lamina, što izaziva propadanje, odnosno urušavanje jedra (Lakhani et al., 2006; Qi et al., 2023). Osim u apoptotskim putevima, kaspaza 6 pokazuje ulogu i u regulaciji piroptoze preko regulacije gasdermina D i medijacije antitumorskog imuniteta, omogućujući time i unakrsnu signalizaciju između apoptotskih i piroptotskih puteva (Qi et al., 2023). Nizvodno oba puta konvergiraju putem aktiviranja kaspaza 3 i 7 (zahvaljujući dejstvu kaspaze 9 iz unutrašnjeg, i kaspaze 8 iz spoljašnjeg mehanizma) (Roy & Nicholson, 2000).

#### 1.10.4 Signalni putevi antitumorskog delovanja

Neoplastična transformacija predstavlja proces narušavanja tkivne homeostaze, koji vodi ka nekontrolisanoj proliferaciji ćelija uz istovremenu inhibiciju programirane ćelijske smrti (Hanahan, 2022). Tumor se definiše kao abnormalna masa tkiva nastala kao posledica takvog nekontrolisanog rasta ćelija (Brajušković, 2005; Hanahan, 2022). U skladu sa kliničkim tokom bolesti, tumori se razvrstavaju na benigne (dobroćudne) i maligne (zloćudne) (Brajušković, 2005). Zajednički termin za benigne i maligne tumore jeste neoplazma, izveden iz starogrčkih reči *neo* (novo) i *plasia* (rast) (Brajušković, 2005). U savremenoj onkobiologiji, jedna od najčešće korišćenih koncepcija za opis osnovnih osobina tumora jeste okvir Obeležja raka (engl. *Hallmarks of Cancer*), koji je u najnovijem izdanju proširen i sistematizovan (Hanahan, 2022).

Među ključnim obeležjima maligno transformisanih ćelija izdvajaju se: održavanje proliferativnih signala, izbegavanje supresora rasta, otpornost na ćelijsku smrt, omogućavanje tzv. replikativne besmrtnosti, indukovanje stvaranja nove vaskulature ili pristup vaskulaturi, aktivacija invazije i metastaziranja, metaboličko preprogramiranje, kao i izbegavanje imunske eliminacije (Hanahan, 2022). Pored ovih sposobnosti, ističu se i tzv. omogućavajuće karakteristike koje podstiču nastanak i progresiju tumora, pre svega genomska nestabilnost i mutacije, kao i tumor-promovišuća inflamacija (Hanahan, 2022). Najnovije proširenje koncepta dodatno naglašava ulogu „novih dimenzija“ tumorske biologije, uključujući fenotipsku plastičnost, nemutaciono (epigenetičko) reprogramiranje, uticaj mikrobioma, kao i doprinos senescentnih ćelija u tumorskom mikrookruženju, čime se pruža sveobuhvatniji okvir za razumevanje heterogenosti tumora i terapijskog odgovora. Iako specijalizovani

mehanizmi mogu imati značajnu ulogu, glavna obeležja tumora u ovoj doktorskoj disertaciji ograničili smo na parametre koji su široko zastupljeni u celokupnom spektru humanih karcinoma (Hanahan, 2022).

Proučavanje mehanizama maligne transformacije i ćelijskih signala koji taj proces podstiču i održavaju dovelo je do identifikacije potencijalnih ciljnih molekula na koje deluju antitumorski molekuli (Hermanowicz et al., 2020; Li et al., 2024). Signalni putevi poput PI3K/Akt, Ras/MAPK/ERK, Wnt/ $\beta$ -katenin, JAK-STAT, između ostalih, imaju ključnu ulogu u regulaciji ćelijskih mehanizama neophodnih za inicijaciju, progresiju i evoluciju maligne transformacije, u oba smera (inhibitorno i podstičuće), regulišući proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu, angiogenezu, ćelijsku migraciju, invaziju, upalne procese i imunski odgovor (Hermanowicz et al., 2020). Kod nekih vrsta malignih oboljenja, poput tumora kolorektuma, često je neophodno u procesu patogeneze uzeti u obzir i genetičke, epigenetičke i sredinske faktore, posebno ulogu imunskog sistema i individualnog mikrobioma, pored signalnih puteva (Li et al., 2024). Kako je znanje o mehanizmima karcinogeneze napredovalo, okvir je proširen (2011) uključivanjem izbegavanja imunskog uništenja i reprogramiranja energetskeg metabolizma, uz naglašavanje da je sticanje ovih sposobnosti olakšano promovišućim procesima poput genomske nestabilnosti/mutacija i tumor-promovišuće inflamacije, kao i značajem tumorskog mikrookruženja u podršci tumorskom rastu i progresiji. U najnovijoj nadogradnji (2022), Hanahan dodatno definiše koncept i tretira imunsko izbegavanje i metaboličko reprogramiranje kao osnovne odlike, dok angiogenezu šire sagledava kroz sposobnost tumora da indukuje ili „pristupa“ vaskulaturi. Sve se više upotrebljavaju tehnologije veštačke inteligencije u cilju pronalaska potencijalnih terapeutika među raznim molekulima koji još nemaju namenu, ali i onima koji su imali drugačiju namenu, jer ovi algoritmi mogu donekle predvideti odgovor ćelije na iste, i time štede vreme i novac u istraživanju (Li et al., 2024). Ovakva upotreba sistema je ipak ograničena raznim faktorima, npr. nemogućnošću predviđanja mogućnosti rezistencije na ciljanu onkološku terapiju, kao i sveobuhvatnim, a ne individualizovanim pristupom, itd. (Li et al., 2024).

Nekontrolisana ćelijska proliferacija i izbegavanje programirane ćelijske smrti predstavljaju osnovna biološka obeležja malignih ćelija. Zbog toga su modulacija ćelijskog ciklusa i indukcija apoptoze centralni mehanizmi delovanja većine savremenih antitumorskih terapija, kao i ključni kriterijumi u proceni efikasnosti novih antitumorskih agenasa (Brajušković, 2005). Unutrašnji mitohondrijski faktori i potencijalne onkomete poput proteina BAX porodice sastavni su deo apoptotskog odgovora tako što permeabilizuju membranu i omogućavaju egzocitozu citohroma c koji je proapoptotski faktor. Ako je BAX nedovoljno aktivan, izmenjena ćelija je obično manje hemio- i radiosenzitivna, a nasuprot njoj, molekuli koji aktiviraju BAX su identifikovani kao potencijalni terapeutici. Ovde je potrebno jasno razlikovati glavne puteve izvršenja apoptoze, odnosno unutrašnji i spoljašnji put apoptoze, od signalnih puteva koji mogu regulisati ili modulisati oba mehanizma (Zhang et al., 2024).

Od ključnog značaja su i signalni putevi vezani za ciklin-zavisne kinaze CDK (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*), kao regulatori ćelijskog ciklusa, koji su povišeno ekspimirani ili u povišenoj količini sintetisani kod različitih malignih tumora (Zhou et al., 2016). Inhibitori CDK (CKI; engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*) pokazali su se kao uspešni u terapiji specifičnih tipova raka, i određeni broj je u fazi kliničkih studija poput inhibitora CDK4 i CDK6, palbocikliba, ribocikliba i abemacicliba (Abdel-Magid, 2021).

Reinžinjering metaboličkih signalnih puteva je jedna od odlika ćelija raka, sa povećanom produkcijom intermedijera biosintetičkih puteva u cilju obezbeđivanja energije za brzo proliferišuće ćelije (You et al., 2023). Značajnu ulogu u ovakvim procesima izmenjenih ćelija, posebno u smislu regulisanja metabolizma glukoze, imaju receptori GPCR (engl. *G protein-coupled receptor(s)*), poput GPR31 ili SUCNR1, upareni sa G proteinom (You et al., 2023). Tako su Gospodinova i saradnici

proučavali antitumorske mehanizme vođeno-alkoholnog ekstrakta listova ruja na humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7 (Gospodinova et al., 2017). Ovi naučnici su primetili i opisali sposobnost ekstrakta dobijenog na ovaj naćin da zaustavi ćelijski ciklus u S fazi i izazove apoptozu nakon 24 sata od tretmana, da poseduje DNK destabilizujuće dejstvo upoređivo sa bleomicinom, prema alkalnom komet genotoksićnom testu, kao i da u određenoj meri smanjuje ekspresiju gena za DNK-metiltransferaze *DNMT1*, *DNMT3a* kao i transkripcioni koaktivator p300 (engl. *E1A-binding protein p300*) za jednu vrstu histon-acetiltransferaze (Gospodinova et al., 2020). Ovi poslednji efekti upućuju na potencijal ekstrakta ruja da moduliše i epigenetićke modifikacije vezane za neoplastićnu transformaciju, posebno metilaciju citozina na C-5 poziciji u promotoru tumor supresorskih gena, kao jednu od najbolje proućenih epigenetićkih modifikacija u procesu maligne transformacije (Gospodinova et al., 2020; Kasai et al., 2013; van Bemmelen et al., 2009).

### 1.10.5 Regulatori ćelijskog ciklusa

CDK su molekuli regulatori dinamike ćelijskog ciklusa koji sami po sebi ne poseduju enzimsku aktivnost, već za to zavise od prisustva manje podjedinice ciklina (engl. *CCN - Cyclins*) na kom se nalazi domen enzimske aktivnosti (Malumbres, 2014). Kod sisara, CDK imaju ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i modulaciji transkripcionog odgovora, na osnovu ćega se i dele u dve velike grupe, jednu vezanu za regulaciju ćelijskog ciklusa CDK1, CDK4 i CDK5 i drugu koja moduliše transkripciju, CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 i CDK20. Obe grupe molekula su neregulisane u patogenezi raznih bolesti, posebno kod neoplastićnih promena (Malumbres, 2014; Zhou et al., 2016). Neophodni za prelazak iz G1 u S fazu ćelijske deobe su kompleksi: CDK4/6 i ciklina D1 CCND1 (inicira ranu G1/S tranziciju) i CDK2 i ciklina E1 CCNE1 (podstiće ulazak u kasniju S fazu), što postižu enzimskom aktivnošću koja rezultira fosforilacijom ciljanih proteina (npr. *retinoblastoma 1* proteina RB1) (Zhang et al., 2022b). Samim tim, ciljana inhibicija CDK i ciklina E obećava kao terapija (Pandey et al., 2020; Zhang et al., 2022b). Pokazano je, na modelu hormon-pozitivnog raka dojke (ksenograft na miševima), da je moguće prevazići rezistenciju na palbociklib inhibicijom CDK2 i CCNE1 uz istovremenu administraciju ovog inhibitora (Pandey et al., 2020).

Retinoblastoma protein je jedan od neophodnih faktora kontrole ćelijskog ciklusa, kao represor transkripcionih faktora iz E2F (engl. *E2F transcription factor*) porodice koji „koći“ prelazak ćelija iz G1 u S fazu ciklusa (Dick & Rubin, 2013). Tokom G1 faze ćelijskog ciklusa, RB je nefosforilisan (ili fosforilisan u maloj meri). Kao takav vezan je za E2F i sprećava transkripciju i podstiće enzimski posredovanu regulaciju E2F kompleksa (Dick & Rubin, 2013). Time je transkripcija gena „ciljanih“ E2F faktorima iskljućena sve dok CDK ne fosforilišu RB u dovoljnoj meri da on više ne moće ostati vezan za E2F (Dick & Rubin, 2013). Ovim se transkribuju E2F faktorima ciljani geni neophodni za prelazak ćelijskog ciklusa u S fazu (Dick & Rubin, 2013). Ipak, novija istraćivanja pokazuju da to nije jedini antitumorski efekat RB proteina, te da postoji i niz drugih potencijalnih mehanizama (za sada potvrćdenih u hipofizi) nezavisnih od E2F, kao npr. RB-SKP2-p27 regulatorni put koji moće imati za rezultat i apoptozu ciljanih ćelija (Gupta et al., 2022).

Inhibitori CDK p18, p19 i p21 deluju tumor supresivno tako što ili zaustavljaju ćelijski ciklus (na prelasku iz G1 u S fazu) ili tako što deluju proapoptotski (Komata et al., 2003). Na primer, p18 i p19 CKI (deo grupe koju kodira INK4 familija gena; engl. *Inhibitor of CDK4*) se specifićno vezuju za CDK4/6 sprećavajući time formiranje aktivnog kompleksa sa ciklinom D, ćime se sprećava napredovanje ćelijskog ciklusa u S fazu (Besson et al., 2008). CKI p21 je manje specifićan od prethodna dva, on se

vezuje za nekoliko kompleksa CDK1/2/4/6 (šireg je spektra delovanja), inaktivira ih ciklinima, a inaktivirajući *CDK2* sprečava i fosforilaciju RB proteina (Abbas & Dutta, 2009). U sprezi sa *p53*, *p21* može učestvovati u mehanizmima popravke DNK, a dodatno inhibira i nuklearni antigen proliferišućih ćelija (PCNA), ali se ipak paradoksalno pod određenim okolnostima u ćeliji može ponašati i kao onkogen (Abbas & Dutta, 2009). Još jedan CKI *p27* (inhibitor ciklin kinaze iz iste grupe kao *p21*; engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor p27*) zaustavlja ćelijski ciklus vezujući se za komplekse ciklin *E-CDK2* i ciklin *D-CDK4/6*, a pokazao se efikasnim i u indukciji autofagije kod ćelijskih linija glioma (Komata et al., 2003).

Za prelazak u S fazu ćelijskog ciklusa neophodan je ciklin A2 (*CCNA2*) koji formira kompleks sa *CDK2* fosforilišući ključne proteine za funkcionisanje mašinerije za replikaciju DNK poput *CDC45* (engl. *Cell Division Cycle 45*) i delova *MCM* helikaze (*MCM2-7*; engl. *Mini-Chromosome Maintenance helicases*), neophodnih kako za inicijaciju tako i za završetak replikacije DNK, ali i prevenciju ponovne replikacije DNK (osiguravajući da se time ista udvoji samo jednom po ćelijskom ciklusu) (Pellarin et al., 2025). Molekularne doking analize pokazale su da, makar u slučaju HeLa ćelija, 6-metoksiflavon može zaustaviti ciklus u S fazi preko ove kontrolne tačke, dakle preko *CCNA2/CDK2/p21* signalnog puta (Zhang et al., 2022a).

Kontrolna tačka ćelijskog ciklusa G2/M osigurava početak mitoze samo ako je DNK kompletno udvojena i neoštećena. U toku G2 faze ćelijskog ciklusa specifične kinaze *WEE1* kinaza kontrolne tačke G2 (*WEE*; engl. *WEE1 G2 Checkpoint Kinase*) i membranski tirozin/treonin-specifični CDK-inhibitor (*MYT1*; engl. *Membrane-associated Tyrosine- and Threonine-specific cdc2-inhibitory kinase*) fosforilišu *CDK1*, što je čini neaktivnom. Međutim, ako fosfataza ćelijskog ciklusa 25 (engl. *CDC25 - Cell Division Cycle 25 phosphatase*) ukloni ove fosfate, *CDK1* se aktivira i ćelija ulazi u M fazu (Schmidt et al., 2017). Ova kontrolna tačka posebno je važna za maligne ćelije, koje imaju defektivne mehanizme kontrole u G1 tački, pa zavise od G2/M kontrolne tačke značajno više nego neizmenjene ćelije, što otvara potencijal za selektivnu terapiju putem CKI (Schmidt et al., 2017). Kompleks *CDK1* i *CCNB* (engl. *Cyclin B*) je glavni faktor progresije ćelijskog ciklusa kroz ovu kontrolnu tačku i aktivnost kompleksa ograničena je finim balansom između aktivnosti *WEE* porodice kinaza i pomenutih *CDC25* fosfataza (Schmidt et al., 2017). *CCNA-CDK1* u ovoj kontrolnoj tački ima ulogu posredne aktivacije *CCNB-CDK1*, kada nivo *CCNA-CDK1* kompleksa raste u G2 fazi, podstiče vezivanje *CCNB* za *CDK1* što za posledicu ima nastanak maturacija-promovišućeg-faktora MPF (engl. *Maturation-Promoting Factor*) (Suski et al., 2021). Za aktivnost *CCNB-CDK1* neophodno je i dejstvo *CDK7*, koja zajedno sa ciklinom H i MAT1 (engl. *Ménage à trois 1*) formira CDK-aktivirajuću kinazu (engl. *CAK-CDK-activating kinase*) kompleks koji fosforiliše i pozitivno reguliše *CDK2* i *CDK1* neophodne za aktivaciju *CCNB-CDK1*, a time i MPF (Fisher, 2005). Takođe, *CDK7* fosforiliše RNK polimerazu II (na C kraju, Ser-5) inicirajući transkripciju gena (poput *MYC*) koji su, između ostalog, neophodni za mitozu (Fisher, 2005). Samim tim i inhibicija *CDK7* dovodi do zaustavljanja aktivnosti RNK polimeraze II, što za posledicu ima zastoj ciklusa u G2/M i ponekad posledičnu apoptozu (Fisher, 2005).

Neki CDK inhibitori, tzv. inhibitori CDK prve generacije (sinonim: pan-inhibitori CDK) su već odobreni od Američke agencije za hranu i lekove (engl. FDA - U.S. Food and Drug Administration) poput flavopiridola (alvocidib, engl. INN - International Nonproprietary Name) i roskovitina (seliciclib), koji inhibiraju *CDK4/6*, ali su neselektivnog delovanja i visoke toksičnosti što predstavlja ograničenje u njihovoj upotrebi (Zhang et al., 2021). Uglavnom se koriste za terapiju HR+/HER2+ karcinoma dojke (Hao et al., 2025). Za sada, poznato je oko četrdeset pan-inhibitora CDK, koji su u raznim fazama pretkliničkih i kliničkih istraživanja, kao i nekoliko inhibitora CDK druge generacije poput dinacikliba i ronicikliba, koji pokazuju obećavajuće snažan antitumorski efekat i značajno višu selektivnost (Zhang et al., 2021). Inhibitori CDK deluju tako što zaustavljaju ćelijski ciklus u određenim kontrolnim tačkama,

ali su često neselektivni ili nedovoljno efikasni sami po sebi, pa se smatra da buduće perspektive leže u kombinovanim terapijama (sa drugim antitumorskim molekulima, bilo da su inhibitori kinaza ili ne) i dvostruko efikasnim CDK inhibitorima, koji osim zaustavljanja ćelijskog ciklusa inhibicijom CDK imaju i neke druge, često nevezane onkomete na koje deluju drugačijim mehanizmom (Zhang et al., 2021). Tako na primer, novije prekliničke studije pokazuju da *CDK7* inhibitori u kombinaciji sa *BET* inhibitorima (engl. *Bromodomain and Extra-Terminal*), *BCL* inhibitorima i hormonskom terapijom imaju znatno veću efikasnost u model sistemima, a bar četiri vrste ovakvih *CDK7* inhibitora se već nalaze u fazi 1 i 2 kliničkih studija (Sava et al., 2020). Takođe, značajni pomaci primećeni su u terapiji pacijenata sa sitnoćelijskim karcinomom pluća, kada se u kombinaciji sa hemioterapijom i imunoterapijom (ICI - inhibitorima kontrolnih tačaka imuniteta) koristio trilaciklib (*CDK4/6* inhibitor) (Lai et al., 2020). Za sada, izazovi u smislu značajnog stepena razvijanja rezistencije i male do nedovoljne selektivnosti ostaju kao problemi koje buduća istraživanja nastoje da reše (Sava et al., 2020).

### 1.10.6 Oksidativni stres i NRF2 signalni put

U kontekstu istraživanja novih antitumorskih ekstrakata/jedinjenja prirodnog porekla, naročito su značajna jedinjenja koja ciljaju ključne ćelijske puteve odgovorne za preživljavanje maligno izmenjenih ćelija. Jedan od centralnih regulatora ovih puteva je transkripcioni faktor NRF2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), koji pokazuje paradoksalnu i kontekst-zavisnu ulogu u malignoj transformaciji. NRF2 se smatra regulatorom ključnih endogenih mehanizama antioksidativne zaštite (Sandberg et al., 2014). Pod normalnim fiziološkim uslovima (odsustvo stresora), nalazi se u citoplazmi, inhibiran od strane Keap1 (proteina senzora za slobodne radikale/ROS i elektrofile) (Sandberg et al., 2014). U fiziološkim uslovima, *NRF2* predstavlja primarni odbrambeni mehanizam ćelije, koordinirajući ekspresiju gena uključenih u odgovor na oksidativni stres i detoksikaciju, čime štiti normalne ćelije od oštećenja koja mogu dovesti do malignih transformacija (Sandberg et al., 2014). Pod uslovima stresa, prvenstveno oksidativnog, *Keap1* se odvaja od *NRF2*, zatim se *NRF2* vezuje za tzv. elemente antioksidativnog odgovora ili ARE (engl. *antioxidant response elements*) i pozitivno reguliše transkripciju gena koji kodiraju antioksidativne enzime (Ngo & Duennwald, 2022; Sandberg et al., 2014). Osim toga, *NRF2* ima ulogu u zaštiti mitohondrije regulišući mitogenezu, mitofagiju i balans kalcijuma (Esteras & Abramov, 2022), ali i u promociji detoksifikacionih enzima (faze I i II) koji promovišu metabolizam i transport lekova, ksenobiotika i drugih stranih supstanci (Hodges & Minich, 2015). Ipak, neregulisana aktivnost *NRF2* vodi neadekvatnom balansu između antioksidanasa i prooksidanasa (ROS, slobodni radikali). Preterano aktivan *NRF2* je obeležje mnogih vrsta malignih tumora (Ngo & Duennwald, 2022). Takođe, ćelijske linije nekih malignih tumora mogu na neki način da iskoriste aktivnost NRF2 antioksidativnih puteva da steknu hemioprotektivna/hemiorezistentna svojstva i čak podstaknu dalju tumorogenezu (Ngo & Duennwald, 2022). Zbog ove uloge u tumorskoj otpornosti, farmakološka modulacija NRF2 signalizacije, naročito selektivna inhibicija njegove prekomerne aktivacije u malignim ćelijama, predstavlja jedan od perspektivnijih pristupa u razvoju novih adjuvantnih terapija i senzitizera.

Mnogi antioksidativni enzimi koje reguliše NRF2-ARE signalni put prepoznati su i po ulozi u neoplastičnoj transformaciji ili metabolizmu hemioterapeutika kao što je to slučaj sa NAD(P)H kinon-dehidrogenazom (engl. *NAD(P)H quinone dehydrogenase*), koja vrši redukciju kinona (donirajući po  $2e^-$ ) u manje toksične hidrokinone (Khan et al., 2024). Nivoi *NQO1* (engl. *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1*) su transkripciono regulisani od strane *NRF2*, koji se veže za neke od 6 ARE elemenata na *NQO1* promoteru, a rezultira značajno povećanom koncentracijom *NQO1* (i do 200 puta) u

izmenjenim ili stresorima opterećenim tkivima u poređenju sa normalnim tkivima (Khan et al., 2024). *NRF2* je regulator i aktivnosti SOD, GPx i CAT, a podstiče i transkripciju gena koji kodiraju sintezu glutationa: katalitička podjedinica glutamat-cistein ligaze (engl. *GCLC-Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit*) i modulatorna podjedinica glutamat-cistein ligaze (engl. *GCLM - Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit*), doprinoseći time antioksidativnoj zaštiti zdravih neizmenjenih ćelija, a nekada i malignih ćelija (Ngo & Duennwald, 2022).

Povećana aktivnost *NRF2* u izmenjenim ćelijama može im omogućiti i otpornost na ferroptozu (vrstu programirane ćelijske smrti koja zavisi od  $\text{Fe}^{2+}$  indukovane lipidne peroksidacije) (Tang & Kang, 2024). Ipak, maligne ćelije su adaptivne u pogledu povećanog oksidativnog stresa, pa mogu da povećaju produkciju NADPH (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), putem pentoza-fosfatnog puta, posebno u stadijumu inicijacije, zatim mogu da modifikuju metabolizam sumpornih jedinjenja i metabolizam glutamina i folata (Hayes et al., 2020). Maligne ćelije, usled ubrzane proliferacije, postaju energetski zahtevnije od normalnih ćelija, pa pribavljaju ATP (engl. *Adenosine Triphosphate*) drugačije, odnosno čak i u prisustvu  $\text{O}_2$  mogu da fermentišu glukozu do laktata, dobijajući piruvat i neke intermedijere (Schiliro & Firestein, 2021; Zhao & Li, 2021). Ova manje efikasna, ali daleko brža strategija dobijanja ATP, u odnosu na oksidativnu fosforilaciju, prepoznata je kao jedno od obeležja malignih ćelija i poznata je pod nazivima aerobna glikoliza ili Warburgov efekat (Schiliro & Firestein, 2021; Zhao & Li, 2021). Tako se i stepen rasta proizvodnje ATP kod malignih ćelija dovodi u vezu sa agresivnošću samog malignog tumora i lošijom kliničkom prognozom (Schiliro & Firestein, 2021; Zhao & Li, 2021). Upravo razumevanje ovih metaboličkih adaptacija otvara priliku terapijske intervencije u vidu uvođenja sintetičkih metabolita i intermedijera u maligne ćelije (Zhao & Li, 2021).

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste proširivanje postojećih saznanja u naučnoj literaturi o efektima ekstrakata (etanolnog, EE; vodenog, VE; i dihlormetanskog, MME) i odabranih, detaljno okarakterisanih bioaktivnih jedinjenja (butin, butein i sulfuretin) biljke *C. coggryia* na potencijalni radiosenzitizujući efekat. Istraživanje je usmereno na ispitivanje uticaja ovih ekstrakata i jedinjenja na osetljivost humanih malignih ćelija adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 na dejstvo jonizujućeg zračenja u dozi od 2 Gy, koliko iznosi terapijska frakcija kod lečenja radioterapijom (Smith et al., 2011). Cilj je da se utvrdi da li i na koji način ispitivani ekstrakti i jedinjenja, u kombinaciji sa zračenjem, povećavaju osetljivost malignih ćelija u poređenju sa ćelijama izloženim samo zračenju, odnosno da li doprinose smanjenju proliferacije i preživljavanja tumorskih ćelija kroz specifične ćelijske i molekularne mehanizme. Nadalje, istraživanje obuhvata i ispitivanje efekata radioprotekcije na humanim normalnim, neizmenjenim ćelijama plućnih fibroblasta. U tom kontekstu analizira se da li ekstrakti i ispitivana jedinjenja ruja, u kombinaciji sa jonizujućim zračenjem od 2 Gy, doprinose povećanom preživljavanju normalnih ćelija u odnosu na ćelije tretirane isključivo zračenjem. Poseban akcenat stavljen je na ispitivanje potencijalne modulacije signalnih puteva uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, apoptotskih procesa, kao i drugih signalnih mehanizama odgovornih za proliferaciju i preživljavanje neizmenjenih ćelija. Prema našem najboljem saznanju, u trenutku podnošenja doktorske disertacije ne postoje literaturni podaci koji ukazuju na potencijalnu ulogu ekstrakata (EE, VE i MME) i jedinjenja ruja u kombinaciji sa jonizujućim zračenjem od 2 Gy na malignu ili neizmenjenu humanu ćelijsku liniju *in vitro*. Istraživanje je usmereno na procenu da li ispitivani ekstrakti i jedinjenja indukuju oštećenja DNK, hromozomske aberacije ili druge oblike genomske nestabilnosti u humanim malignim i normalnim ćelijama, kao i na razlikovanje ciljanog antitumorskog efekta od nespecifične genotoksičnosti. Poseban fokus istraživanja predstavlja analiza genotoksičnih efekata u uslovima kombinovanog tretmana sa jonizujućim zračenjem u dozi od 2 Gy, radi utvrđivanja uloge ekstrakata i ispitivanih jedinjenja ruja u modulaciji odgovora ćelija na oštećenja DNK. Ispituje se da li navedene supstance pojačavaju genotoksični odgovor i osetljivost tumorskih ćelija, doprinoseći radiosenzitizaciji,

odnosno da li istovremeno ispoljavaju odsustvo genotoksičnosti ili zaštitni efekat u normalnim, neizmenjenim ćelijama.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije obuhvata *in vitro* ispitivanje antitumorskog i genotoksičnog potencijala ekstrakata i odabranih bioaktivnih biljnih jedinjenja izolovanih iz *C. coggygia*, u cilju proširivanja saznanja o njihovom mehanizmu delovanja na humane normalne ćelije plućnih fibroblasta MRC-5. Istraživanje je usmereno na procenu da li ispitivani ekstrakti (EE, VE i MME) i jedinjenja (butin, butein i sulfuretin) ostvaruju antitumorski efekat putem ciljane modulacije ćelijskih procesa, kao što su regulacija ćelijskog ciklusa, indukcija apoptoze i inhibicija proliferacije, ili da li njihovo delovanje uključuje nespecifična genotoksična oštećenja DNK.

U okviru istraživanja analizira se genotoksični potencijal ispitivanih supstanci kroz procenu indukcije DNK oštećenja, hromozomskih promena i genomske nestabilnosti u humanim malignim ćelijama, kao i u humanim normalnim, neizmenjenim ćelijama, sa ciljem procene njihove selektivnosti i bezbednosnog profila. Posebna pažnja posvećena je razlikovanju antitumorskog efekta koji je posledica regulisanih bioloških mehanizama od efekta izazvanog nespecifičnom DNK toksičnošću. Na ovaj način, predmet istraživanja obuhvata integrisanu procenu antitumorskog dejstva, genotoksičnosti i mehanizama delovanja ekstrakata i biljnih jedinjenja *C. coggygia*, kao osnove za njihovu dalju eksperimentalnu validaciju i potencijalnu primenu u antitumorskoj terapiji.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje antitumorskog dejstva *in vitro* ekstrakata i jedinjenja izolovanih iz biljne vrste ruj, koji bi mogli da ispolje značajan antitumorski potencijal i veću selektivnost u svom dejstvu prema malignim ćelijama, odnosno manju toksičnost prema neizmenjenim ćelijama. Biljni ekstrakti i jedinjenja koja su detaljno okarakterisana *in vitro* u svom dejstvu prema malignim ćelijama i imaju visoku selektivnost u antitumorskom dejstvu, imaju potencijal da se dalje ispituju u *in vivo* testiranjima kao hemiopreventivni agensi i/ili komplementarni antitumorski agensi. Od drvenastog dela biljke ruj, pripremljena su tri ekstrakta: etanolni, vodeni i dihlormetanski ekstrakt, što je novina u istraživanju jer do sada ne postoje literaturni podaci o efektima ekstrakata dobijenih iz drvenastog dela biljke ruj na maligne ćelije. VE predstavlja ekstrakt dobijen kao čaj, EE predstavlja ekstrakt dobijen kao tinktura, a MME je ekstrakt širokog opsega polarnosti, pa je on izabran za ispitivanje, jer su vodeni i etanolni ekstrakti mnogo polarniji. Iz EE ruja izolovano je dvanaest glavnih jedinjenja: sulfuretin, fustin, eriodiktiol, taksifolin, epitaksifolin, butin, butein, fisetin, sulfuretin auronol, 3-O-metilepifustin, 3-O-metilfustin i sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukozid. Tri izolovana jedinjenja, 3-O-metilepifustin, epitaksifolin i sulfuretin auronol, prvi put su pronađena u biljci ruj, a kotinignan A je prvi ikad izolovan auronolignan.

## **1.11 Savremeni pristupi u antitumorskoj terapiji i prirodni izvori bioaktivnih molekula**

### **1.11.1 Značaj ispitivanja biljnih vrsta i biljnih jedinjenja za razvoj novih antitumorskih lekova**

Savremena istraživanja prirodnih proizvoda, naročito proizvoda biljnog porekla, sve se intenzivnije usmeravaju ka identifikaciji novih bioaktivnih molekula primenom savremenih analitičkih tehnika, kao što su rendgenska kristalografija i 1D i 2D nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Uporedo s tim, važnu ulogu ima i optimizacija procesa izolovanja aktivnih komponenti korišćenjem modernih ekstrakcionih pristupa, uključujući naprednu ultrazvučnu ekstrakciju i superkritičnu fluidnu ekstrakciju, kao i procesa razdvajanja i prečišćavanja koji uključuju različite hromatografske tehnike. Savremena istraživanja obuhvataju i kombinovanje prirodnih

jedinjenja sa postojećim farmaceuticima u cilju ispitivanja potencijalnih sinergističkih efekata, modulacije farmakokinetičkih svojstava i poboljšanja biodostupnosti, kao i stabilizacije inherentno nestabilnih ili isparljivih molekula putem tehnika poput nanopartikulacije, nanoemulzifikacije ili lipozomalne enkapsulacije. Posebna pažnja usmerena je na razvoj ekonomsko održivih, energetski efikasnih i industrijski skalabilnih metoda ekstrakcije, zasnovanih na principima zelene hemije, uključujući primenu ekološki prihvatljivih rastvarača i tehnologija koje doprinose cirkularnoj i održivoj ekonomiji. Dodatno, savremeni pristupi uključuju primenu molekularnog dokinga i drugih *in silico* metoda, koje se u sve većoj meri oslanjaju na napredne kompjuterske sisteme i veštačku inteligenciju, čime se omogućava ubrzano i preciznije predviđanje interakcija između prirodnih jedinjenja i bioloških „meta“ (Alfaro-Almaguer et al., 2022; Rakha et al., 2024; Sosa-Hernández et al., 2018). Potragu za novim jedinjenjima i kandidatima za lekove značajno skraćuju tzv. omiks-tehnike i metode, zasnovane na metodama genomike, proteomike, metabolomike i transkriptomike. U okviru istraživanja doktorske disertacije, određene grupe sekundarnih metabolita izdvajaju se zbog svoje pouzdane i višestruke biološke aktivnosti, poput flavonoida, koji se sve češće razmatraju u kontekstu tretmana neuroloških i neuropsihijatrijskih stanja, ili pentacikličnih triterpena, prepoznatih po izraženom antimikrobnom i citotoksičnom potencijalu.

Ispitivanje selektivnosti antitumorskog dejstva ekstrakata i jedinjenja ruja posebno je značajno ako se uzme u obzir da su zlatni standard u lečenju maligniteta hemioterapeutici niske selektivnosti, a sa značajnom toksičnošću i učestalim nuspojavama (Karpuz et al., 2018; Siegel et al., 2023). Potreba za selektivnim jedinjenjima podstiče istraživanja u oblasti prirodnih proizvoda, najčešće biljaka, jer su jedinjenja izolovana iz njih, kao i njihove sinergističke smeše u vidu ekstrakata, pokazala selektivna antitumorska dejstva (Sosa-Hernández et al., 2018). Antitumorska dejstva su često zasnovana na indukciji oštećenja DNK i apoptoze u transformisanim ćelijama, ali to nisu jedini biološki mehanizmi delovanja (Jiménez-González et al., 2023; Nobili et al., 2009). U ovakvim istraživanjima se često akcenat stavlja i na rasvetljavanje biomehanizma delovanja, u cilju eventualne buduće ciljane primene u kliničkoj praksi (Jiménez-González et al., 2023; Khan et al., 2019b; Nobili et al., 2009). Uobičajeno je da se nakon proba i skrininga *in vitro* na kulturama malignih ćelija, uključujući i 2D i 3D modele (sferoide) i organoide, ispituju efekti izolovanih jedinjenja ili biljnih ekstrakata *in vivo*, na model organizmima (Kitaeva et al., 2020). Između ostalih, alkaloidna i flavonoidna jedinjenja biljnog porekla se posebno ističu antitumorskom aktivnošću u odnosu na druge sekundarne metabolite (Jiménez-González et al., 2023; Khan et al., 2019b; Nobili et al., 2009).

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije usmereno je na ispitivanje potencijala derivata biljaka da modulišu odgovor malignih ćelija na dejstvo jonizujućeg zračenja u uslovima koji odražavaju klinički relevantnu radioterapiju, odnosno frakcionisanu radioterapiju. Polazeći od činjenice da biljni derivati sadrže širok spektar biološki aktivnih komponenti, posebna pažnja je posvećena njihovoj sposobnosti da utiču na ključne procese uključene u tumorsku progresiju i terapijski odgovor, kao što su proliferacija, preživljavanje, regulacija ćelijskog ciklusa i aktivacija mehanizama ćelijske smrti.

## 1.12 Hipoteze istraživanja u okviru doktorske disertacije

Na osnovu literaturnih saznanja postavljene su sledeće radne hipoteze istraživanja:

1. Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz biljke ruj imaju selektivni citotoksični efekat prema malignim ćelijama u odnosu na neizmenjene ćelije i selektivnost prema određenom tipu malignog tumora.

2. Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz biljke ruj ostvaruju svoje citotoksično dejstvo aktivacijom apoptotske ćelijske smrti malignih ćelija.
3. Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz biljke ruj ostvaruju antioksidativno dejstvo u neizmenjenim humanim ćelijama.
4. Ekstrakti i jedinjenja ruja ne pokazuju genotoksičnost na neizmenjenim humanim ćelijama.
5. Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz ruja ispoljavaju antiinvazivni efekat na malignim ćelijama *in vitro*.
6. Ekstrakti i jedinjenja ruja ispoljavaju radiomodulatorno dejstvo.

### 1.13 Ciljevi istraživanja u okviru doktorske disertacije

Kako bi se proverile radne hipoteze, postavljen je osnovni cilj istraživanja u okviru doktorske disertacije. Osnovni cilj istraživanja je da se ispituju mehanizmi antitumorskog dejstva ekstrakata i jedinjenja biljne vrste ruj, *C. coggygia* Scop. On će biti ostvaren kroz sledeće specifične ciljeve:

1. Ispitati intenzitet citotoksičnog dejstva tri ekstrakta srži drvenastog dela biljke ruj (dihlormetanski, etanolni i vodeni ekstrakt) i dvanaest izolovanih jedinjenja (sulfuretin, fustin, eriodiktiol, taksifolin, butin, butein, fisetin, kotinignan A, sulfuretin auronol, 3-O-metilepifustin, 3-O-metilfustin i sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukozid) prema nizu humanih malignih ćelijskih linija: adenokarcinom grlića materice HeLa, maligni melanom A375, hronična mijeloidna leukemija K562, akutna promijelocitna leukemija HL-60, adenokarcinom prostate PC-3, karcinom prostate DU 145, adenokarcinom dojke MDA-MB-231, prema neizmenjenim humanim fibroblastima pluća MRC-5 i keratinocitima HaCaT, kao i prema 3D modelima (višećelijskim tumorskim sferoidima) HeLa i MDA-MB-231 malignih ćelija.
2. Ispitati mehanizme citotoksičnog dejstva tri ekstrakta i odabranih jedinjenja koja ispoljavaju najveću citotoksičnost, na dve maligne ćelijske linije: adenokarcinom grlića materice HeLa i hronična mijeloidna leukemija K562, određivanjem efekta na raspodelu ćelija u fazama ćelijskog ciklusa i utvrđivanjem tipa ćelijske smrti.
3. Ispitati *in vitro* antiinvazivno dejstvo tri ekstrakta i odabranih jedinjenja koja ispoljavaju najveću citotoksičnost na humanim malignim HeLa ćelijama određivanjem efekta na migraciju ćelija *in vitro* i određivanjem ekspresije gena koji kodiraju matriksnu metaloproteinazu 2 (*MMP2*), *MMP9* i vaskularni endotelni faktor rasta A (*VEGFA*).
4. Ispitati efekat odabranog jedinjenja ruja na različite signalne puteve u humanim malignim ćelijama hronične mijeloidne leukemije K562 u cilju razjašnjavanja mehanizama antitumorskog dejstva jedinjenja određivanjem diferencijalno eksprimiranih gena u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije.
5. Ispitati genotoksični i antioksidativni efekat tri ekstrakta i odabranih jedinjenja koja ispoljavaju najveću citotoksičnu aktivnost na neizmenjenim humanim fibroblastima pluća MRC-5.
6. Ispitati efekat ekstrakata i jedinjenja ruja na osetljivost humanih malignih ćelija adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i neizmenjenih humanih fibroblasta pluća MRC-5 na zračenje, a zatim i ispiti mehanizme radiomodulatornog dejstva ekstrakata i jedinjenja ruja koji pokazuju radiomodulatorni efekat određivanjem distribucije ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa, stepena apoptoze i intenziteta oštećenja DNK u ćelijama.

## 2 Materijal i metode

### 2.1 Biljni materijal

Biljni materijal prikupljen je na području Deliblatske peščare, u Vojvodini, Srbija. Materijal je prikupljen u toku juna 2018. godine. Nakon prikupljanja, materijal je determinisan od strane prof. dr Milana Veljića, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Nakon determinacije, dodeljen mu je i herbarski broj (broj vaučera BEOU 17422), čime je uzorak postao sastavni deo herbarske zbirke Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ u Beogradu, Srbija. Za potrebe istraživanja korišćen je nadzemni deo biljke, konkretno drvenasti deo. Nakon prikupljanja, uzorak je sušen na sobnoj temperaturi (24-25 °C) u zatamnjenoj prostoriji. Nakon sušenja uzorak je izmleven kako bi se od njega dobio prah. Dobijeni prah ekstrahovan je etanolom primenom ultrazvučne ekstrakcije (engl. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE) u ultrazvučnom kupatilu.

### 2.2 Dobijanje ekstrakata iz biljnog materijala ruja

Za potrebe izolovanja korišćeno je 200 g biljnog praha i 3 l 96% etil-alkohola u vremenskom intervalu od jednog sata. Nakon ekstrakcije dobijeno je 18,0 g sirovog ekstrakta, koji je podvrgnut procesu frakcionisanja pomoću kolonske gravitacione hromatografije na silika-gelu. Deo EE je odvojen za ispitivanje biološke aktivnosti, dok je ostatak korišćen za izolovanje. Ekstrakt na bazi dihlormetana (MME) u odnosu 1:1 pripremljen je trostrukom ekstrakcijom, na isti način kao etanolni, primenom 20 g praškaste mase, koja je ekstrahovana tri puta sa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (dihlormetan/metanol, 1:1). Nakon ekstrakcije, dobijeni ekstrakti su profiltrirani i upareni na rotacionom evaporatoru. Po uparivanju, odmeren je prinos od 8,6%. VE pripremljen je u obliku čaja, primenom 20 g praškaste mase, koja je prokuvana u 300 ml destilovane vode u periodu od 15 min, a ekstrakt je nakon toga profiltriran i uparen. Dobijeni prinos iznosio je 6,4%. Za potrebe eksperimenata, na ovaj način pripremljeni ekstrakti rastvoreni su u DMSO u koncentraciji od 20 mg/ml i čuvani su na -20 °C do dalje upotrebe.

### 2.3 Izolovanje i identifikacija jedinjenja 1-12

Slično ranijem radu Novakovića i saradnika, sirovi EE (10,0 g) je bio hromatografisan na Si gel CC (kolonska hromatografija, engl. *Column Chromatography*) koloni (750 × 45 mm), sa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (gradijent eluiranja od 95/5 do 60/40) i dobijeno je 250 frakcija (Novaković et al., 2019). Kolonska hromatografija je praćena sa TLC (tankoslojna hromatografija, engl. *Thin-Layer Chromatography*), a kombinovane su frakcije sa sličnim R<sub>f</sub> (retencioni faktor, engl. *Retention factor*) vrednostima: 1-10, 11-18, 19-25, 26-30, 30-38, 39-41, 42-50, 51-60, 61-70, 71-82, 83-96, 97-111, 112-130, 131-152, 153-180. Spojene frakcije 1-10, 30-38 i 61-70 su korišćene za izolovanje jedinjenja semipreparativnom reverzno-faznom HPLC (tečna hromatografija visokih performansi, engl. *High Performance Liquid Chromatography*). Sva izolovana jedinjenja su identifikovana korišćenjem <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*), NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), HSQC (engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) i HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) NMR spektara i poređenjem njihovih spektralnih podataka sa onima iz literature. Butin (1) (Antal et al.,

2010; Novaković et al., 2019; Valianou et al., 2009), 3-O-metilfustin (3) (da Costa et al., 2014; Novaković et al., 2019), 3-O-metilepifustin (6), eriodiktiol (4) (Antal et al., 2010; Novaković et al., 2019) i butein (11) (Antal et al., 2010; Novaković et al., 2019; Valianou et al., 2009) izolovani su iz kombinovanih frakcija 1-10 semipreparativnom HPLC korišćenjem sledeće metode: 0-20 min, 20-37% B; 20-21 min, 37-50% B; 21-22 min, 50% B; i 23-30 min, 50-100% B. Rastvarač A je bio 0,2% HCOOH, rastvarač B je bio MeCN (acetonitril), temperatura je bila 40 °C, brzina protoka je bila 4 ml/min, a talasne dužine detekcije bile su 254 i 280 nm. Fustin (2) (Antal et al., 2010; da Costa et al., 2014; Novaković et al., 2019; Valianou et al., 2009), taksifolin (5) (Antal et al., 2010; da Costa et al., 2014; Novaković et al., 2019; Valianou et al., 2009), epitaksifolin (7), fisetin (8) (da Costa et al., 2014; Novaković et al., 2019; Valianou et al., 2009) i sulfuretin (10) (Antal et al., 2010; da Costa et al., 2014; Novaković et al., 2019; Valianou et al., 2009; Westenburg et al., 2000) izolovani su iz frakcija 30-38 pomoću semipreparativne HPLC, drugom metodom: 0-20 min, 25-40% B; 20-24 min, 40-100% B, gde je rastvarač A bio 0,2% HCOOH, rastvarač B je bio MeCN, temperatura je bila 40 °C, brzina protoka je bila 4 ml/min i talasne dužine detekcije bile su 254 i 280 nm. Za odvajanje taksifolina i epitaksifolina bila je neophodna druga HPLC metoda pošto su se njihovi pikovi delimično preklapali primenom prve metode. Njihovo razdvajanje je bilo izvedeno korišćenjem sledeće HPLC metode: 0-20 min, 5-30% B; 20-21 min, 30-100% B, gde je rastvarač B bio MeCN, a rastvarač A 0,2% HCOOH. Temperatura je bila 40 °C, brzina protoka je bila 4 ml/min i talasne dužine detekcije bile su 254 i 280 nm. Fustin (2), taksifolin (5), fisetin (8), sulfuretin (10) i sulfuretin auronol (2-benzil-2,6,3',4'-tetrahidroksikumaran-3-on, 12) izolovani su iz frakcija 61-70 korišćenjem sledeće HPLC metode: 0-20 min, 25-40% B; 20-24 min, 40-100% B, gde je rastvarač B bio MeCN, a rastvarač A 0,2% HCOOH. Temperatura je bila 40 °C, brzina protoka je bila 4 ml/min i talasne dužine detekcije su bile 254 i 280 nm. Izolovano je jedinjenje sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukozid (9) iz ove frakcije kao talog u čistom MeOH, pošto je bio slabo rastvorljiv u MeOH i potpuno rastvorljiv u smeši dihlormetana i metanola.

## 2.4 Reagensi i uslovi kultivacije u ćelijskoj kulturi

Reagensi korišćeni za pripremu i održavanje ćelijskih kultura bili su proizvođača Sigma-Aldrich, osim ukoliko nije drugačije navedeno. Za rad u ćelijskoj kulturi korišćene su Thermo Scientific™ Biolite™ ploče sa 6, 24 ili 96 sudića, kao i flaskovi površine 25 cm<sup>2</sup>. Potpuni hranljivi medijum pripreman je korišćenjem RPMI 1640 medijuma, dopunjenog sa 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS), koji je prethodno termički inaktivisan tokom 30 minuta na 56 °C. U medijum su dodati L-glutamin u finalnoj koncentraciji od 3 mM, penicilin u koncentraciji od 100 IU/ml, streptomycin u koncentraciji od 100 µg/ml i HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonska kiselina) u koncentraciji od 25 mM, kako bi se obezbedili optimalni uslovi za rast i održavanje ćelija u kulturi. Antibiotici penicilin i streptomycin su od proizvođača Sigma-Aldrich, Misuri, SAD. Ćelije su ispirane fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) i odvajane primenom rastvora tripsina (0,25%) i EDTA (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*). Tripsinizacija je neutralisana dodatkom kompletnog RPMI medijuma, nakon čega su ćelije sakupljane centrifugiranjem pri 1500 rpm tokom 10 minuta. Ćelijski talog je resuspendovan u svežem kompletnom RPMI medijumu i blago pipetiran radi dobijanja homogene suspenzije pojedinačnih ćelija. Broj ćelija određivan je korišćenjem hemocitometra.

Sve ćelijske linije gajene su u inkubatoru na temperaturi od 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i visokim stepenom zasićenja vodenom parom. Ćelije su održavane u potpunom hranljivom medijumu, uz redovno vizuelno praćenje morfologije, gustine rasta i opšteg stanja kulture svetlosnim mikroskopom.

Ovi uslovi obezbeđuju optimalno održavanje ćelijske vijabilnosti, proliferacije i metaboličke aktivnosti tokom trajanja eksperimenta.

## 2.5 *In vitro* ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata kolorimetrijskom metodom MTT

Citotoksično dejstvo ekstrakata i jedinjenja izolovanih iz biljne vrste ruž ispitivano je na sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom grlića materice), K562 (hronična mijeloidna leukemija), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), HL-60 (akutna promijelocitna leukemija), A375 (maligni melanom), PC-3 (adenokarcinom prostate) i DU 145 (karcinom prostate). Pored malignih ćelijskih linija, u ispitivanje su uključene i dve neizmenjene humane ćelijske linije: HaCaT (humani keratinociti) i MRC-5 (fetalni humani plućni fibroblasti). Sve navedene ćelijske linije, osim HaCaT ćelija, nabavljene su iz kolekcije ATCC (Manassas, VA, SAD). HaCaT ćelije su dobijene na poklon od kolega sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Ćelijske linije HeLa, MDA-MB-231, PC-3, DU 145, A375, HaCaT i MRC-5 su adherentne ćelijske linije i održavane su u kulturi u vidu ćelijskog monosloja. Ćelijske linije K562 i HL-60 rastu u suspenziji i nisu adherentne u odnosu na podlogu. Sve ćelijske linije održavane su u potpunom hranljivom medijumu, pri standardnim uslovima ćelijske kulture, na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>.

Citotoksična aktivnost tri ekstrakta i dvanaest izolovanih jedinjenja označenih brojevima 1-6 i 8-13 ispitivana je na panelu od sedam humanih malignih i dve normalne humane ćelijske linije. Efekat ispitivanih agenasa procenjivan je nakon 72 sata inkubacije sa tretmanima. Ćelije su zasejavane u sterilne mikrotitarske ploče sa 96 sudića, u zapremini od 100 µl po sudiću. Broj zasejanih ćelija prilagođen je tipu ćelijske linije i njenoj brzini rasta, pa je po sudiću zasejavano: 2 000 HeLa ćelija, 3 000 A375 ćelija, 5 000 MDA-MB-231, DU 145, PC-3 i K562 ćelija, kao i 7 000 HL-60 ćelija. Kod adherentnih ćelijskih linija, nakon zasejavanja je usledila inicijalna inkubacija od 24 sata, kako bi ćelijama bilo omogućeno prijanjanje za podlogu, stabilizacija i nastavak osnovnih ćelijskih procesa. Nakon ovog perioda, u svaki sudić je dodavano po 50 µl rastvora ispitivanih ekstrakata ili jedinjenja u odgovarajućim definisanim serijskim koncentracijama. Kod ćelijskih linija koje rastu u suspenziji, K562 i HL-60, ćelije su zasejavane dva sata pre dodavanja 50 µl rastvora ispitivanih ekstrakata ili jedinjenja u odgovarajućim definisanim serijskim koncentracijama, kako bi se omogućila ravnomerna distribucija ćelija u sudićima pre izlaganja ispitivanim agensima.

Štok rastvori ekstrakata i jedinjenja pripremani su u DMSO u koncentraciji od 20 mg/ml ili 20 mM. Finalne koncentracije ekstrakata u eksperimentu iznosile su 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml i 200 µg/ml. Finalne koncentracije jedinjenja u eksperimentu iznosile su 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM i 200 µM. Kod ćelijskih linija kod kojih koncentracija od 200 µg/ml nije pokazala citotoksični efekat, ispitivana je i dodatna, viša koncentracija od 400 µg/ml. Nakon dodavanja tretmana, ćelije su inkubirane naredna 72 sata pod istim standardnim uslovima temperature, vlažnosti i koncentracije CO<sub>2</sub>.

Kao pozitivna kontrola korišćena je cisplatina, citostatik sa dobro poznatim i u literaturi opisanim citotoksičnim dejstvom. Kontrolne ćelije su gajene u istim uslovima, ali bez dodatka ispitivanih ekstrakata ili jedinjenja. Svaka kombinacija ćelijske linije i tretmana rađena je u triplicatu, eksperimenti su ponovljeni najmanje tri do šest puta nezavisno, u cilju dobijanja pouzdanih i reproducibilnih rezultata.

Citotoksično dejstvo ispitivanih agenasa može se ispoljiti direktno, indukcijom ćelijske smrti putem apoptoze i/ili nekroze, ili indirektno, kroz antiproliferativni efekat, pri čemu ćelije ostaju vitalne, ali su njihov rast i deoba usporeni ili inhibirani (Matić et al., 2013a). Direktna citotoksičnost procenjuje se na osnovu smanjenja ćelijskog preživljavanja, odnosno povećanja broja mrtvih ćelija, dok se antiproliferativni efekat određuje praćenjem inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolni uzorak (Gligorijević et al., 2012; Matić, 2013). Jedan od ključnih parametara za procenu aktivnosti ispitivanih supstanci jeste  $IC_{50}$  vrednost, koja predstavlja koncentraciju ispitivanog agensa potrebnu da se preživljavanje, odnosno rast tretiranih ćelija, smanji za 50% u odnosu na netretiranu kontrolu (Gligorijević et al., 2012; Matić et al., 2013a).

U ovom delu doktorske disertacije ćelijsko preživljavanje određivano je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) kolorimetrijskim testom. Ova metoda zasniva se na sposobnosti metabolički aktivnih, odnosno živih ćelija, da redukuju žutu tetrazolijumsku so MTT u nerastvorne ljubičaste kristale formazana (Matić et al., 2013a). Nakon završene inkubacije sa MTT reagensom u trajanju od 4 sata, formirani kristali formazana rastvarani su dodatkom SDS-a (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*), čime se dobija obojeni rastvor čija se apsorbancu meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 570 nm (Matić et al., 2013a). Intenzitet izmerene apsorbance proporcionalan je broju metabolički aktivnih, odnosno živih/vijabilnih ćelija u uzorku (Gligorijević et al., 2012; Matić et al., 2013a). Procenat preživljavanja ćelija izračunavan je prema formuli:

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

gde *Au* predstavlja apsorbancu tretiranih ćelija, dok *Ak* predstavlja apsorbancu kontrolnih, netretiranih ćelija. Dobijene vrednosti korišćene su za procenu citotoksične i/ili antiproliferativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i jedinjenja, kao i za određivanje  $IC_{50}$  vrednosti (Gligorijević et al., 2012; Matić et al., 2013a).

## 2.6 *In vitro* ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata na 3D ćelijskim modelima (3D sferoidi)

Humane ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa i humane ćelije trostruko negativnog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 gajene su u standardnim uslovima na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>.

Trodimenzijski sferoidi formirani su korišćenjem mikrotitarskih ploča sa 96 sudića sa okruglim dnom i ultraniskom adhezijom, posebno dizajniranih za 3D ćelijske kulture (Sphera™ ploče). Sferoidi su 3D ćelijske strukture, odnosno ćelije nisu rasle kao ravan sloj na dnu ploče, već su se agregirale u loptaste formacije koje bolje oponašaju uslove u tkivu ili tumoru. Ćelije HeLa i MDA-MB-231 su zasejane u gustini od 1 000 ćelija po sudiću za HeLa ćelijsku liniju i 2 000 za MDA-MB-231, u konačnoj zapremini od 100 µl kompletnog RPMI medijuma po sudiću. Ploče su pažljivo prenete u inkubator kako bi se omogućila spontana agregacija ćelija i formiranje sferoida, bez narušavanja njihove strukture. Tokom narednih 48 sati ćelije nisu tretirane, već su ostavljene da spontano agregiraju u okviru sistema, pri čemu je svakodnevno dodavan svež medijum. Nakon 48 sati od zasejavanja ćelije su tretirane, a pre tretmana ćelije su slikane, uz korišćenje fazno-kontrastnog invertnog mikroskopa na uvećanju 4×. Slike ćelija su pravljene u vremenskim tačkama 0 sati (neposredno pre tretmana), 24 sata i 72 sata nakon tretmana, uz korišćenje identičnog uvećanja fazno-kontrastnog invertnog mikroskopa i istih parametara podešavanja za sve vremenske tačke i analizirane u verziji ImageJ softvera

(<https://ij.imjoy.io/>) koja je dostupna za internet pretraživač i besplatna za sve korisnike. Morfologija sferoida i stepen kompaktnosti procenjavani su kvalitativno.

Vijabilnost ćelija nakon 72 sata unutar 3D sferoida procenjivana je primenom kalceinskog bojenja. Kada se sferoidi oboje kalceinom ( $5 \mu\text{mol/l}$ ), žive ćelije počinju da fluoresciraju zeleno, dok mrtve ćelije ne daju signal (Gligorijević, 2012). Sferoidi su inkubirani sa kalcein bojom razblaženom u PBS puferu, u skladu sa uputstvom proizvođača. Kalcein acetoksimetil ester je nefluorescentna boja koja lako prolazi kroz membranu živih ćelija. Kada uđe u ćeliju, intraćelijske esterase je prevode u kalcein, koji je fluorescentan i ostaje zarobljen unutar ćelije. Zato se ćelije koje imaju očuvan integritet membrane i metaboličku aktivnost vide kao fluorescentne ćelije i daju signal, odnosno žive ćelije. Nakon inkubacije sa rastvorom boje u trajanju od 45 minuta na  $37^\circ\text{C}$ , sferoidi su blago ispirani PBS puferom radi uklanjanja viška boje i odmah potom na fluorimetru Thermo Scientific Fluoroskan™ FL je očitana fluorescencija. Vijabilne ćelije identifikovane su na osnovu intraćelijske fluorescencije kalceina. Ćelije su tokom celog eksperimenta gajene u standardnim uslovima za humane ćelijske linije u kulturi. Tokom prva 72 sata nije vršena zamena medijuma kako bi se izbeglo narušavanje formiranja i kompaktnosti sferoida.

## 2.7 Analiza faza ćelijskog ciklusa

Uticaj ekstrakata i izolovanih jedinjenja ruja na raspodelu HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ispitivan je metodom protočne citometrije (Gligorijević et al., 2012; Matić, 2013; Ormerod, 2000). Ćelije su tretirane ekstraktima (EE, VE i MME) i jedinjenjima (butin, butein i sulfuretin) u koncentracijama  $\text{IC}_{50}$  i  $2 \times \text{IC}_{50}$ , tokom 24 sata i 48 sati inkubacije, kako bi se pratio odgovor HeLa i K562 ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i dužine trajanja tretmana. HeLa i K562 ćelije su zasejane u ploče sa šest sudića u 2 ml kompletnog RPMI medijuma. Gustine su iznosile 200 000 ćelija po sudiću za HeLa i 250 000 ćelija po sudiću za K562 ćelije. Pre tretmana, HeLa ćelije su nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru pripremljene uklanjanjem medijuma kako bi se dodavanjem tretmana dodao svež medijum. Kod K562 ćelija, medijum je ostao, s obzirom na to da se radi o ćelijama u suspenziji, a tretman je dodat nakon 2 sata inkubacije ćelija u inkubatoru pri standardnim uslovima. U kontrolnim uzorcima HeLa ćelija medijum je zamenjen svežim kompletnim hranljivim medijumom, dok je kod K562 linije dodat 1 ml svežeg medijuma u suspenziju.

Tretman se sastojao od dodavanja ekstrakata ili jedinjenja u koncentracijama  $\text{IC}_{50}$  i  $2 \times \text{IC}_{50}$  u kompletnom hranljivom medijumu, koje su određene MTT testom nakon 72 sata inkubacije. Nakon 24 sata ili 48 sati inkubacije, HeLa ćelije su tripsinizirane i ispirane PBS-om, dok je kod K562 ćelija ovaj korak izostavljen. Svi uzorci su zatim ispirani hladnim PBS-om i fiksirani dodavanjem hladnog PBS-a i 2 ml etanola na hladnom uz vorteksovanje, i čuvani najmanje jednu nedelju na  $-20^\circ\text{C}$  pre analize.

Na dan analize, uzorci su centrifugirani, isprani i inkubirani u 500  $\mu\text{l}$  PBS-a sa RNKazom A (200  $\mu\text{g/ml}$ ) i propidijum-jodidom (engl. *Propidium iodide*, PI) (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Pripremljeni uzorci su analizirani na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD), sa detekcijom 10 000 događaja po uzorku, a podaci su obrađeni softverom BD CellQuestPro™ (Becton Dickinson, CA, SAD). Fluorescencija PI, ekscitovana argon-jonskim laserom na 488 nm, detektovana je na FL2 kanalu.

Na osnovu DNK histograma (broj događaja u odnosu na FL2-A) izračunat je procenat HeLa ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa subG1, G1, S i G2/M. Paralelna analiza FL2-A u odnosu na FL2-W omogućila je selekciju pojedinačnih ćelija, čime su iz analize isključeni ćelijski agregati i debris.

## 2.8 Određivanje ciljnih kaspaza

Za ispitivanje moguće aktivacije kaspaze-3, kaspaze-8 i kaspaze-9, kao i za utvrđivanje tipa ćelijske smrti izazvane ispitivanim ekstraktima (EE, VE i MME) i jedinjenjima (butin, butein i sulfuretin), korišćeni su specifični peptidni inhibitori kaspaza koji mogu da permeabilizuju, odnosno da prođu kroz ćelijsku membranu: Z-DEVD-FMK, inhibitor kaspaze-3; Z-IETD-FMK, inhibitor kaspaze-8; i Z-LEHD-FMK, inhibitor kaspaze-9 (R&D Systems) (Matić, 2013).

HeLa ćelije su zasejane u ploče sa šest sudića, u 2 ml kompletnog RPMI medijuma po sudiću. Gustina zasejavanja iznosila je 200 000 ćelija po sudiću. Nakon 24 sata inkubacije, čime je adherentnim HeLa ćelijama omogućeno prijanjanje za podlogu, ćelije su predtretirane odgovarajućim inhibitorom kaspaza, Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK ili Z-LEHD-FMK, u koncentraciji od 40  $\mu$ M. Inhibitori su dodavani 2 sata pre tretmana ekstraktima i jedinjenjima ruja. Nakon predtretmana inhibitorima, ćelije su tretirane ispitivanim ekstraktima, EE, VE i MME, kao i jedinjenjima butin, butein i sulfuretin, u koncentraciji koja je odgovarala vrednosti  $2 \times IC_{50}$ . Nakon 24 sata tretmana, ćelije su sakupljene tripsinizacijom, a zatim dva puta isprane hladnim PBS puferom, kako bi se uklonili eventualni ostaci RPMI medijuma.

K562 ćelije su zasejane u ploče sa šest sudića, u 2 ml kompletnog RPMI medijuma po sudiću. Gustina zasejavanja iznosila je 250 000 ćelija po sudiću. Nakon 2 sata inkubacije, što je omogućilo ravnomernu distribuciju ćelija u suspenziji, ćelije su predtretirane odgovarajućim inhibitorom kaspaza, Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK ili Z-LEHD-FMK, u koncentraciji od 40  $\mu$ M. Inhibitori su dodavani 2 sata pre tretmana ekstraktima i jedinjenjima ruja. Nakon predtretmana inhibitorima, ćelije su tretirane ispitivanim ekstraktima, EE, VE i MME, kao i jedinjenjima butin, butein i sulfuretin, u koncentraciji koja je odgovarala vrednosti  $2 \times IC_{50}$ . Nakon 24 sata tretmana, ćelije su sakupljene centrifugiranjem, a zatim dva puta ispirane hladnim PBS puferom, kako bi se uklonili eventualni ostaci kompletnog medijuma.

Pripremljeni ćelijski uzorci, prethodno predtretirani odgovarajućim inhibitorima kaspaza i ispitivanim ekstraktima ili jedinjenjima, analizirani su na protočnom citometru, sa detekcijom 10 000 događaja po uzorku. Fluorescencija PI, ekscitovana argon-jonskim laserom na 488 nm, detektovana je na FL2 kanalu. Na osnovu DNK histograma, odnosno prikaza broja događaja u odnosu na FL2-A signal, izračunat je procenat ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, koja ukazuje na prisustvo ćelija sa fragmentisanom DNK i koristi se kao pokazatelj apoptotske ćelijske smrti. Efekat inhibitora kaspaza procenjivan je poređenjem procenta ćelija u subG1 proporciji između uzoraka tretiranih samo ekstraktima ili jedinjenjima i uzoraka koji su prethodno inkubirani sa specifičnim inhibitorima kaspaze-3, kaspaze-8 ili kaspaze-9. Pad udela ćelija u subG1 proporciji, nakon predtretmana odgovarajućim inhibitorom, ukazivao je na moguću uključenost određene kaspaze u ćelijsku smrt izazvanu ispitivanim tretmanom. Paralelna analiza FL2-A u odnosu na FL2-W omogućila je selekciju pojedinačnih ćelija, čime su iz dalje analize isključeni ćelijski agregati i debrisi.

## 2.9 Aneksin V-FITC/propidijum-jodid esej

Apoptoza je analizirana protočnom citometrijom primenom aneksin V-FITC (aneksin V obeležen fluorescein-izotiocijanatom, engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)/PI esej, prema principu detekcije eksternalizacije fosfatidilserina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane (Matić, 2013).

HeLa ćelije su zasejane u ploče sa šest sudića, u 2 ml kompletnog RPMI medijuma po sudiću. Gustina ćelija je iznosila 200 000 ćelija po sudiću. Nakon 24 sata inkubacije, budući da je reč o adherentnoj ćelijskoj liniji, ćelije su tretirane ispitivanim ekstraktima i jedinjenjima ruja u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$ . Apoptoza je određivana nakon 24 sata inkubacije sa tretmanima, korišćenjem aneksin V-FITC/PI eseja, prema uputstvu proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD). Nakon tretmana, ćelije su tripsinizirane, dvaput isprane hladnim PBS puferom kako bi se uklonili eventualni ostaci kompletnog medijuma, a potom resuspendovane u puferu za vezivanje (engl. *Binding Buffer*, BB), pripremljenom prema uputstvu proizvođača.

K562 ćelije su zasejane u mikrotitrarske ploče sa šest sudića, u 2 ml kompletnog RPMI medijuma po sudiću. Gustina ćelija je iznosila 250 000 ćelija po sudiću. Nakon 2 sata inkubacije, ćelije su tretirane ispitivanim ekstraktima i jedinjenjima ruja u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$ . Apoptoza je određivana nakon 24 sata inkubacije ćelija sa ispitivanim tretmanima, korišćenjem aneksin V-FITC/PI eseja, prema uputstvu proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD). Pošto je reč o ćelijskoj liniji koja raste u suspenziji, ćelije nisu tripsinizirane, već su sakupljene i dvaput isprane hladnim PBS puferom kako bi se uklonili ostaci kompletnog medijuma i tretmana, i resuspendovane u BB, pripremljenom prema uputstvu proizvođača.

Nakon pripreme uzoraka, ćelije su obojene aneksin V-FITC konjugatom i PI, a zatim analizirane na protočnom citometru. Na osnovu intenziteta FITC fluorescencije, koji odgovara vezivanju aneksina V za fosfatidilserin, i PI signala, koji ukazuje na narušenu propustljivost ćelijske membrane, određivan je procenat vijabilnih, rano apoptotskih, kasno apoptotskih/sekundarno nekrotičnih i nekrotičnih, mrtvih ćelija. Vijabilne ćelije bile su negativne i na aneksin V-FITC i na PI. Rano apoptotske ćelije bile su aneksin V-FITC pozitivne i PI negativne, dok su ćelije u kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi bile pozitivne na oba markera. Ćelije pozitivne samo na PI klasifikovane su kao nekrotične. Pre kvantifikacije ćelijskih subpopulacija, analizom FSC (prednje rasejanje svetlosti, engl. *Forward Scatter*) i SSC (bočno rasejanje svetlosti, engl. *Side Scatter*) parametara izdvojena je glavna ćelijska populacija, dok su debris i nespecifični događaji isključeni iz dalje analize.

## 2.10 Analiza genske ekspresije

HeLa ćelije su zasejane u flaskove površine  $25 \text{ cm}^2$  u gustini od  $1 \times 10^6$  ćelija po flasku. Nakon 24 sata inkubacije, ćelije su tretirane subtoksičnim  $IC_{50}/4$  koncentracijama odgovarajućih ekstrakata (EE, VE i MME) ili jedinjenja (butin, butein i sulfuretin). Nakon 24 sata inkubacije ćelija sa odgovarajućim tretmanom, ćelije su prikupljene tripsinizacijom, isprane hladnim PBS-om i uskladištene na  $-80^\circ \text{C}$  do daljih koraka u izolaciji RNK molekula (Stanojković et al., 2018).

Ukupna RNK izolovana je iz netretiranih i tretiranih ćelija korišćenjem TriReagent-a, u kombinaciji sa hloroformom, izopropanolom i 70% etanolom bez nukleaza. Koncentracija RNK i odnos A260/280 određeni su pomoću BiospecNano uređaja (Shimadzu, Japan). Reverzna transkripcija izvršena je pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription eseja, dok je amplifikacija za RT-qPCR (kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu uz reverznu transkripciju, engl. *Reverse Transcription quantitative PCR*) sprovedena korišćenjem No UNG  $2 \times$  TaqMan Universal Master Mix-a.

Ciljani geni za amplifikaciju bili su *MMP2* (Hs01548727\_m1), *MMP9* (Hs00957562\_m1) i *VEGFA* (Hs00900055\_m1), dok je *GAPDH* (Hs02758991\_g1) korišćen kao referentni gen. Amplifikacija gena *FTL* (Hs00830226\_gH), *ST3GAL4* (Hs00920871\_m1), i *SQSTM1*

(Hs01060665\_m1) je urađena sa *ACTB* (Hs99999903\_m1) kao endogenom kontrolom. Kvantifikacija ekspresije gena izvršena je na QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System uređaju (Applied Biosystems™). Analiza podataka sprovedena je metodom uporednog delta-delta Ct (ddCt), sa netretiranim uzorkom kao kontrolom. Rezultati su izraženi u relativnim jedinicama ekspresije (RQ).

## 2.11 Ispitivanje uticaja ekstrakata na migraciju ćelija - *in vitro scratch* esej

HeLa ćelije su zasejane u ploče sa 24 sudića, u gustini od 70 000 ćelija po sudiću, i inkubirane u trajanju od 24 sata, odnosno dok konfluentnost ćelijskog monosloja nije potvrđena svetlosnim mikroskopom, kvalitativno. Nakon dostizanja konfluentnosti ćelijskog monosloja, u ćelijama je napravljen zarez, odnosno *scratch*, po kome je ova metoda i dobila ime. Zarez je napravljen pomoću pipetnog vrha od 200  $\mu$ l, pri čemu je pipeta držana pod uglom od 90° u odnosu na površinu sudića. Pipetni vrh je povlačen od vrha ka dnu sudića, kako bi širina ogrebotine bila što ujednačenija (Gligorijević, 2012; Matić, 2013).

Nakon pravljenja ogrebotine, ćelije su lagano isprane PBS puferom, kako ne bi došlo do narušavanja monosloja ćelija. U kontrolne sudiće dodat je svež medijum, dok su u preostale sudiće dodate IC<sub>50</sub>/2 koncentracije odgovarajućih ekstrakata (EE, VE i MME) i jedinjenja (butin, butein i sulfuretin). Ćelije su fotografisane primenom invertnog fazno-kontrastnog mikroskopa (Olympus) u vremenskim tačkama nakon 0, 24 i 48 sati. Kvantitativna analiza slike zareza sprovedena je korišćenjem ImageJ.js verzije za pretraživač (<https://ij.imjoy.io/>), koja je besplatno dostupna.

## 2.12 Merenje unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta

Protočnom citometrijom određen je nivo unutarćelijskih ROS u kontrolnim, netretiranim humanim fibroblastima pluća MRC-5, kao i u MRC-5 ćelijama tretiranim ekstraktima (EE, VE i MME) i jedinjenjima (butin, butein i sulfuretin) ruja. Nakon zasejavanja i 24 sata inkubacije pri standardnim uslovima, ćelije su tretirane netoksičnim koncentracijama ekstrakata i jedinjenja, koje su odgovarale vrednosti IC<sub>50</sub>/4. Netoksičnost primenjenih koncentracija dodatno je potvrđena svetlosnim mikroskopom, kvalitativno. Za merenje nivoa ROS-a korišćen je ćelijski permeabilni fluorescentni indikator 30  $\mu$ M 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA). Ovaj indikator ulazi u ćelije, gde ćelijske esterase uklanjaju acetil grupe, nakon čega ROS oksiduju nastalu supstancu u fluorescentni 2',7'-dihlorofluorescein (DCF). Fluorescencija DCF-a detektovana je na FL1 kanalu, odnosno na 535 nm protočnom citometrijom (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

MRC-5 ćelije su zasejane u ploče sa šest sudića, u gustini od 250 000 ćelija po sudiću. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru, ćelije su tretirane netoksičnim koncentracijama ekstrakata i jedinjenja. Sledećeg dana, nakon 24 sata inkubacije sa ispitivanim ekstraktima i jedinjenjima, ćelije su sakupljene, isprane PBS-om, obojene sa 30  $\mu$ M DCFH-DA i analizirane protočnim citometrom. Za svaki analizirani uzorak prikupljeno je 20 000 događaja, u cilju dobijanja tačnih, pouzdanih i reproducibilnih rezultata.

Za dalju procenu potencijalnog antioksidativnog dejstva ekstrakata (EE, VE i MME) i jedinjenja (butin, butein i sulfuretin) ruja, ispitivan je njihov uticaj na nivo ROS-a u MRC-5 ćelijama nakon kratkotrajnog izlaganja vodonik-peroksidu. MRC-5 ćelije su zasejane u ploče sa šest sudića, u gustini od

250 000 ćelija po sudiću. Nakon 24 sata inkubacije u inkubatoru, ćelije su tretirane netoksičnim koncentracijama ekstrakata i jedinjenja, koje su odgovarale vrednosti  $IC_{50}/4$ . Sledećeg dana, nakon 24 sata inkubacije sa ispitivanim ekstraktima i jedinjenjima, ćelije su kratkotrajno, u trajanju od 15 minuta, izložene 5 mM rastvoru vodonik-peroksida. Nakon izlaganja vodonik-peroksidu, ćelije su detaljno isprane PBS-om kako bi se uklonili eventualni ostaci vodonik-peroksida. Zatim su sakupljene, ponovo isprane PBS-om, obojene sa 30  $\mu$ M DCFH-DA i analizirane protočnim citometrom. Za svaki analizirani uzorak prikupljeno je 20 000 događaja, u cilju dobijanja tačnih, pouzdanih i reproducibilnih rezultata. Na ovaj način procenjujvana je sposobnost ispitivanih ekstrakata i jedinjenja da smanje stvaranje unutarćelijskih ROS indukovano kratkim izlaganjem vodonik-peroksidu, što dalje rezultira ublaženim oksidativnim stresom.

### 2.13 Statistička analiza za *in vitro* eseje u ćelijskoj kulturi

Statističke analize su izvedene na podacima dobijenim u biološkom triplikatu i tehničkom duplikatu (ili triplikatu), osim ako nije drugačije naznačeno. Ukoliko je negde prikazan samo jedan biološki ponovak, označen je kao reprezentativni eksperiment. Normalnost distribucije podataka za svaki eksperiment (biološki replikati sa kontrolnim i tretiranim uzorcima) je procenjujvana Shapiro-Wilk ili Kolmogorov-Smirnov testom, uz vizuelnu potvrdu preko Q-Q grafikona (engl. *Q-Q plot*). Podaci su smatrani normalno distribuiranim ako je  $p > 0,05$ , dok je  $p \leq 0,05$  ukazivalo na odstupanje od normalnosti. Homogenost varijanse između grupa procenjena je Leveneovim testom. Za grupe sa jednakim varijansama korišćen je standardni Studentov t-test, dok je za nejednake varijanse primenjen t-test sa Welchovom korekcijom. Ako normalnost nije bila potvrđena, primenjen je neparametrijski Mann-Whitney test za poređenje medijana između dve grupe. Nivo statističke značajnosti postavljen je na 0,05. U grafičkim prikazima, značajnost je označena zvezdicama: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 2.14 Izolacija ukupne RNK iz K562 ćelija za potrebe sekvenciranja

Ćelijska linija u suspenziji K562 je za potrebe ovog eksperimenta zasejana u flaskove od 25 cm<sup>2</sup> u gustini od  $1,5 \times 10^6$  ćelija po flasku. Nakon toga, ćelije su tretirane jedinjenjima (butin, butein i sulfuretin) u netoksičnim koncentracijama  $IC_{50}/4$ . Ove koncentracije su potvrđene kao netoksične za navedenu gustinu ćelija, što je provereno vizuelnom inspekcijom svetlosnim mikroskopom, uz dodatnu potvrdu metodom tripan-plavog bojenja, kvalitativno. Za izolaciju ukupne RNK iz ćelija korišćen je Qiagen RNeasyMini kit, u skladu sa uputstvima proizvođača. RNK je zatim čuvana na -80 °C.

### 2.15 Sekvenciranje ukupne RNK iz K562 ćelija

Tri nezavisna eksperimenta/biološka replikata bila su predmet sekvenciranja informacione RNK koristeći NovaSeq X Plus seriju sekvencatora kompanije Illumina (PE150, sekvenciranje uparenih krajeva dužine 150 baznih parova, engl. *Paired-End 150*), uz korišćenje usluga komercijalnog sekvenciranja koje

je obezbedila kompanija Novogene. Svi uzorci su prošli kontrolu kvaliteta i integriteta izolovane RNK. Kontrolu kvaliteta i integriteta obavila je kompanija Novogene Co., Ltd. (Peking, Kina).

## 2.16 Bioinformatička analiza podataka dobijenih sekvenciranjem

Očitavanja su mapirana na referentni ljudski genom hg38. Nakon eliminacije niskokvalitetnih očitavanja, poravnanje sekvenci je izvršeno korišćenjem HISAT2 algoritma (Kim et al., 2019a). Paket EdgeR (Chen et al., 2025) korišćen je za filtriranje gena sa niskom ekspresijom, dok je normalizacija podataka sprovedena funkcijom voom (Law et al., 2014) iz paketa limma (Ritchie et al., 2015). Paket limma je takođe korišćen za analizu diferencijalne genske ekspresije (engl. *Differential Gene Expression*, DGE), poređenjem tretiranih ćelija sa netretiranim kontrolama. Normalizacija serija (engl. *batch normalization*) za potrebe vizuelizacije urađena je pomoću funkcije *removeBatchEffect* (paket limma), dok je u analizi diferencijalne ekspresije uticaj serije (engl. *batch* efekat) kontrolisan uključivanjem serija kao eksperimentalnog faktora u dizajn matricu. Paket ReactomePA korišćen je za analizu puteva primenom GSEA (engl. *Gene Set Enrichment Analysis*) nad putevima iz Reactome baze podataka (Milacic et al., 2024), sa ciljem ispitivanja opštih bioloških procesa. Klasterizacija puteva izvedena je na osnovu najvišeg nivoa u hijerarhiji Reactome puteva. Za uvid u specifične signalne puteve i tačne gene uključene u signalnu transdukciju, GSEA nad KEGG (engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) putevima (Kanehisa & Goto, 2000) sprovedena je korišćenjem paketa gage (Luo et al., 2009) i fgsea (Korotkevich et al., 2016) u R okruženju.

## 2.17 Procena genotoksičnosti jedinjenja i ekstrakata ruja alkalnim komet esejom

Ćelije MRC-5, neizmenjeni humani plućni fibroblasti, su zasejane u mikrotitarske ploče sa šest sudića po 200 000 ćelija po sudiću u kompletnom RPMI medijumu i inkubirane 24 sata na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>, odnosno u standardnim uslovima. Nakon toga, ćelije su tretirane netoksičnim koncentracijama ispitivanih ekstrakata i jedinjenja ruja (EE, VE, MME, butin, butein i sulfuretin), definisanim kao IC<sub>50</sub>/4. Ove koncentracije su potvrđene kao netoksične za navedenu gustinu ćelija, što je provereno vizuelnom inspekcijom svetlosnim mikroskopom, uz dodatnu potvrdu metodom tripan-plavog bojenja, kvalitativno. Nakon tretmana, ćelije su sakupljene tripsinizacijom, isprane hladnim PBS puferom i postepeno zaleđene u 500 µl smeše za zamrzavanje (RPMI, 20% FBS, 10% DMSO). Postupak sporog zamrzavanja obuhvatao je početno zamrzavanje uzoraka na -20 °C tokom 24 sata, u stiroporskim kutijama koje omogućavaju postepeno i, donekle, kontrolisano zamrzavanje, nakon čega su uzorci prebačeni na -80 °C do analize.

Na dan izvođenja komet eseja, ćelije su postepeno odleđivane na ledu i centrifugirane na 4 °C, pri 2000 rpm, u trajanju od 10 minuta. Za izradu gelova korišćena su pokrovna stakla dimenzija 20 × 20 mm postavljena na prethodno pripremljene slajdove obložene agarozom. Uzorak koji je sadržao 10 000 ćelija u 30 µl PBS-a je pomešan sa 70 µl 1% agaroze koja ima nisku tačku topljenja (engl. *Low Melting Point Agarose*, LMPA) i smeša je stavljena na predmetno staklo. LMPA je zagrejana na 37 °C u vodenom kupatilu, a zatim je homogenizovana smeša LMPA i ćelija ohlađena na hladnom stalku (~5 min) kako bi agarozni sloj očvrstnuo, ali ne i skroz zaleđio. Zatim je predmetno staklo sa uzorkom prebačeno na 4 °C. Predmetna stakla su potom potopljena u rastvor za liziranje (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, sa 1% Triton X-100) i inkubirana su na 4 °C tokom najmanje 1 sata. Uzorci su zatim prebačeni u

alkalni pufer za denaturaciju DNK (0,3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) i inkubirani 20 min na 4 °C, a elektroforeza je izvršena horizontalno pri 25 V i ~300 mA tokom 30 min (sistem za elektroforezu COMET-20, AlphaMetrix Biotech, Nemačka). Neutralizacija je sprovedena pranjem u hladnom PBS-u u trajanju od 10 min i dvostruko filtriranoj vodi (10 min), 70% etanolu (5 min) i 100% etanolu (5 min). Za vizualizaciju DNK korišćena je SYBR<sup>TM</sup> Gold boja (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) razblažena 1:10 000 u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5-8), uz inkubaciju od 30 min, nakon čega su slajdovi sušeni u mraku 24 sata. Oštećenje DNK analizirano je fluorescentnom mikroskopijom, a kvantifikacija je vršena softverom COMET Assay IV (Perceptive instruments). Za svaki uzorak analizirano je 50 nasumičnih kometa, iz kojih je izračunata srednja vrednost procentualnog oštećenja DNK u repu u odnosu na glavu komete i standardna devijacija. Podešavanja mikroskopa uključivala su fluorescentni režim, odgovarajući filter set za SYBR Gold i uvećanje 20×, uz ekspoziciju prilagođenu tako da se izbegne saturacija signala.

## **2.18 Procena radiomodulatornog efekta jedinjenja i ekstrakata ruja u kombinaciji sa zračenjem**

### **2.18.1 Merenje preživljavanja ćelija kolorimetrijskom metodom MTT**

Humane ćelije trostruko negativnog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i humani fibroblasti pluća MRC-5 gajeni su u standardnim uslovima, na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Ćelije su održavane u odgovarajućem kompletnom hranljivom medijumu, sa 10% FBS i 1% penicilina/streptomicina. Ćelije su ispirane PBS-om i odvajane primenom tripsin-EDTA rastvora. Nakon neutralizacije tripsina kompletnim medijumom, ćelije su sakupljene centrifugiranjem pri 1500 rpm, 5 minuta. Ćelijski talog je resuspendovan u svežem kompletnom medijumu, a koncentracija ćelija određena je pomoću hemocitometra. Ćelije su zasejane u mikrotitarske ploče sa 24 sudića, u gustini od 40 000 ćelija po sudiću, u odgovarajućoj zapremini kompletnog medijuma. Nakon zasejavanja, ploče su inkubirane tokom 24 sata, kako bi se omogućilo prijanjanje ćelija. Dvadeset četiri časa nakon zasejavanja, ćelije su predtretirane netoksičnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja i biljnih ekstrakata, razblaženih u kompletnom medijumu. Ćelije su inkubirane sa predtretmanom u trajanju od 24 sata, pod standardnim uslovima kulture.

Neposredno nakon dodavanja ispitivanih ekstrakata i jedinjenja, ćelije su prenete u prostoriju za zračenje i izložene zračenju u dozi od 2 Gy. Zračenje je sprovedeno pomoću medicinskog linearnog akceleratora Elekta (Elekta AB, Štokholm, Švedska), pri čemu je X-zračenje generisano energijom od 6 MeV. Ćelije su ozračene na sobnoj temperaturi, dok su kontrolne ćelije bile podvrgnute istim eksperimentalnim uslovima, ali bez izlaganja zračenju. Nakon zračenja, ćelije su vraćene u inkubator i dalje gajene u istim uslovima do ukupno 72 sata od momenta zasejavanja. Vijabilnost ćelija kvantifikovana je MTT testom 72 sata nakon zasejavanja. U svaki sudić mikrotitarske ploče dodato je 40 µl MTT rastvora, nakon čega su ćelije inkubirane na 37 °C u trajanju od 3-4 sata, radi formiranja formazanskih kristala. Po završetku inkubacije, u svaki sudić je dodato 400 µl SDS rastvora, radi rastvaranja formazana. Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi ili inkubirane preko noći, u skladu sa standardnim protokolom. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini 570 nm. Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja MDA-MB-231 ćelija u odnosu na kontrolu 0 Gy i kontrolu 2 Gy, kao i procenat preživljavanja MRC-5 ćelija u odnosu na kontrolu 0 Gy i kontrolu 2 Gy. Dodatno, rezultati su normalizovani za obe ćelijske linije u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe, odnosno kontrolu bez zračenja (0 Gy) i kontrolu izloženu zračenju od 2 Gy.

### 2.18.2 Analiza faza ćelijskog ciklusa u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy

Uticaj predtretmana ekstraktima i izolovanim jedinjenjima, u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy, na raspodelu MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ispitivan je metodom protočne citometrije.

MDA-MB-231 ćelije su zasejane u mikrotitarske ploče sa šest sudića, u 2 ml kompletnog RPMI medijuma po sudiću. Gustina ćelija iznosila je 250 000 ćelija po sudiću za MDA-MB-231 ćelijsku liniju. Dvadeset četiri časa nakon zasejavanja, ćelije su predtretirane netoksičnim koncentracijama ispitivanih ekstrakata i izolovanih jedinjenja. U kontrolnim uzorcima medijum je zamenjen svežim kompletnim hranljivim medijumom.

Neposredno nakon dodavanja ispitivanih ekstrakata i jedinjenja, ćelije su prenete u prostoriju za zračenje i izložene zračenju u dozi od 2 Gy. Zračenje je sprovedeno pomoću medicinskog linearnog akceleratora Elekta (Elekta AB, Štokholm, Švedska), pri čemu je X-zračenje generisano energijom od 6 MeV. Ćelije su ozračene na sobnoj temperaturi, dok su kontrolne ćelije bile podvrgnute istim eksperimentalnim uslovima, ali bez izlaganja zračenju. Nakon zračenja, ćelije su inkubirane dodatnih 48 sati, nakon čega su pripremljene za dalju analizu. MDA-MB-231 ćelije su nakon inkubacije tripsinizirane i isprane PBS-om. Svi uzorci su potom fiksirani hladnim PBS-om i dodatkom 2 ml etanola, uz stalno vorteksovanje, i čuvani na -20 °C najmanje nedelju dana do citometrijske analize.

Na dan analize, uzorci su centrifugirani, isprani i inkubirani u 500 µl PBS-a sa RNKazom A (200 µg/ml) i PI (20 µg/ml). Pripremljeni ćelijski uzorci analizirani su na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD), sa detekcijom 10 000 događaja po uzorku. Fluorescencija PI, ekscitovana argon-jonskim laserom na 488 nm, detektovana je na FL2 kanalu. Podaci su obrađeni softverom CellQuestPro (Becton Dickinson, CA, SAD). Na osnovu DNK histograma, odnosno broja događaja u odnosu na FL2-A signal, izračunat je procenat ćelija u fazama subG1, G1, S i G2/M ćelijskog ciklusa. Paralelna analiza FL2-A u odnosu na FL2-W omogućila je selekciju pojedinačnih ćelija, čime su iz analize isključeni ćelijski agregati i debris.

### 2.18.3 Aneksin V-FITC/propidijum-jodid esej u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy

Ćelije MDA-MB-231 su zasejane u ploče sa šest sudića, u gustini od 250 000 ćelija po sudiću. Nakon 24 sata inkubacije u standardnim uslovima za humane ćelijske kulture, ćelije su predtretirane netoksičnim koncentracijama ispitivanih ekstrakata (EE, VE i MME) i jedinjenja (butin, butein i sulfuretin), a potom izložene zračenju u dozi od 2 Gy.

Neposredno nakon dodavanja ispitivanih ekstrakata i jedinjenja, ćelije su prenete u prostoriju za zračenje i izložene odgovarajućoj dozi zračenja. Zračenje je sprovedeno pomoću medicinskog linearnog akceleratora Elekta (Elekta AB, Štokholm, Švedska), pri čemu je X-zračenje generisano energijom od 6 MeV. Ćelije su ozračene dozom od 2 Gy na sobnoj temperaturi, dok su kontrolne ćelije bile podvrgnute istim eksperimentalnim uslovima, ali bez izlaganja zračenju. Nakon zračenja, ćelije su inkubirane dodatnih 24 sata, nakon čega su tripsinizirane, dvaput isprane hladnim PBS puferom kako bi se uklonili ostaci tripsina i tretmana, i resuspendovane u BB, pripremljenom prema uputstvu proizvođača.

Apoptoza ćelija određivana je protočnom citometrijom korišćenjem aneksin V-FITC eseja, u skladu sa uputstvom proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD). Analiza je zasnovana na detekciji eksternalizacije fosfatidilserina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane. Nakon pripreme uzoraka, ćelije su obojene aneksin V-FITC konjugatom i PI, zatim analizirane na protočnom citometru. Na osnovu intenziteta FITC fluorescencije, koji odgovara vezivanju aneksina V za fosfatidilserin, i PI signala, koji ukazuje na narušenu propustljivost ćelijske membrane, određivan je procenat vijabilnih, rano apoptotskih, kasno apoptotskih/sekundarno nekrotičnih i nekrotičnih ćelija. Vijabilne ćelije bile su negativne i na aneksin V-FITC i na PI. Rano apoptotske ćelije bile su aneksin V-FITC pozitivne i PI negativne, dok su ćelije u kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi bile pozitivne na oba markera. Ćelije pozitivne samo na PI klasifikovane su kao nekrotične. Pre kvantifikacije apoptotskih populacija, analizom FSC i SSC parametara izdvojena je glavna ćelijska populacija, dok su debris i nespecifični događaji isključeni iz dalje analize.

#### **2.18.4 Procena genotoksičnosti jedinjenja i ekstrakata ruja alkalnim komet esejom u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy**

Ćelijska linija MDA-MB-231, humana linija trostruko negativnog adenokarcinoma dojke, zasejana je u mikrotitarske ploče sa šest sudića, u gustini od 250 000 ćelija po sudiću, u kompletnom RPMI medijumu. Ćelije su inkubirane 24 sata na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, kako bi se adherentno vezale za podlogu. Nakon 24 sata inkubacije, ćelije su predtretirane netoksičnim koncentracijama ispitivanih ekstrakata i izolovanih jedinjenja ruja, definisanim kao IC<sub>50</sub>/4, koje su prethodno određene MTT testom nakon 24 sata inkubacije. Nakon predtretmana, ćelije su podvrgnute zračenju u dozi od 2 Gy.

Neposredno nakon dodavanja ispitivanih ekstrakata i jedinjenja, ćelije su prenete u prostoriju za zračenje i izložene odgovarajućoj dozi zračenja. Zračenje je sprovedeno pomoću medicinskog linearnog akceleratora Elekta (Elekta AB, Štokholm, Švedska), pri čemu je X-zračenje generisano energijom od 6 MeV. Ćelije su ozračene dozom od 2 Gy na sobnoj temperaturi, dok su kontrolne ćelije bile podvrgnute istim eksperimentalnim uslovima, ali bez izlaganja zračenju. Dvadeset četiri časa nakon zračenja, ćelije su sakupljene tripsinizacijom, isprane hladnim PBS puferom i postepeno zaleđene u 500 µl smeše za zamrzavanje (RPMI, 20% FBS, 10% DMSO). Postupak sporog zamrzavanja obuhvatao je početno zamrzavanje uzoraka na -20 °C tokom 24 sata, u stiroporskim kutijama koje omogućavaju postepeno i, donekle, kontrolisano zamrzavanje, nakon čega su uzorci prebačeni na -80 °C do analize.

Na dan izvođenja komet eseja, ćelije su postepeno odleđivane na ledu i centrifugirane na 4 °C, pri 2000 rpm, 10 minuta. Za izradu gelova korišćena su pokrovna stakla dimenzija 20 × 20 mm, postavljena na prethodno pripremljene slajdove obložene LMPA. Za svaki gel korišćeno je 10 000 ćelija po pokrovnom staklu. Ćelijska suspenzija zapremine 30 µl pomešana je sa 70 µl agaroze, prethodno zagrejane na 37 °C u vodenom kupatilu. Dobijena homogena smeša naneta je na slajdove i ohlađena na hladnom stalku približno 5 minuta, radi očvršćavanja agaroznog sloja. Pozitivna kontrola oštećenja DNK sprovedena je inkubacijom gelova sa 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ledu, u trajanju od 5 minuta. Nakon toga je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detaljno uklonjen ispiranjem u PBS-u najmanje dva puta. Gelovi su zatim potopljeni u lizirajući rastvor, sastava 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, sa 1% Triton X-100, i inkubirani 1 sat na 4 °C. Nakon lize, uzorci su prebačeni u alkalni pufer za denaturaciju DNK, sastava 0,3 M NaOH i 1 mM EDTA, i inkubirani 20 minuta na 4 °C. Elektroforeza je potom izvedena horizontalno, pri 25 V i približno 300 mA, tokom 30 minuta. Neutralizacija je izvršena pranjem u hladnom PBS-u tokom 10 minuta, a

zatim u dvostruko filtriranoj vodi tokom 10 minuta. Za vizualizaciju DNK korišćen je SYBR Gold, razblažen u odnosu 1:10 000 u TE puferu, uz inkubaciju od 40 minuta. Nakon bojenja, slajdovi su sušeni u mraku 24 sata. Oštećenje DNK analizirano je fluorescentnom mikroskopijom, a kvantifikacija je sprovedena pomoću softvera COMET Assay IV. Za svaki uzorak analizirano je 50 nasumično odabranih kometa. Na osnovu dobijenih vrednosti izračunata je srednja vrednost procentualnog oštećenja DNK u repu u odnosu na glavu komete, kao i standardna devijacija. Podešavanja mikroskopa uključivala su fluorescentni režim, odgovarajući filter set za SYBR Gold i uvećanje 20 $\times$ , uz ekspoziciju prilagođenu tako da se izbegne saturacija signala.

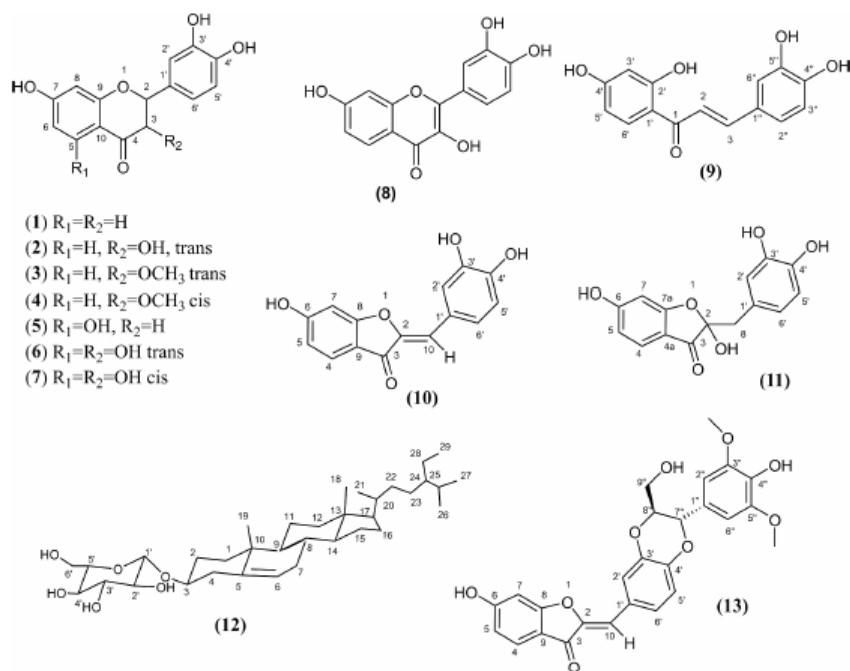
### 3 Rezultati

#### 3.1 Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz srži drveta ruja

Izolovana jedinjenja su prikazana na Slici 1. NMR spektri svih izolovanih jedinjenja dati su u Prilogu (Prilog 8-92), uključujući i NMR spektre jedinjenja 13, kotinignana A, koje nije izolovano u ovom radu, već dodato iz prethodnog istraživanja radi provere njegove citotoksične aktivnosti. Većina izolovanih jedinjenja bili su flavonoidi, izuzev jedinjenja 12, koje je triterpenski saharid. Strukturna karakteristika izolovanih flavonoida jeste prisustvo kateholske grupe u B prstenu kod svih jedinjenja, kao i 7-OH grupe u A prstenu (6-OH kod sulfuretina i sulfuretin auronola), što ukazuje na njihovo isto biosintetsko poreklo (Boucherle et al., 2017). Izolovana jedinjenja 1-12 već su poznata i njihovi NMR podaci bili su u saglasnosti sa literaturom, osim za 3-O-metilepifustin (6). Za ovo jedinjenje NMR podaci nisu pronađeni, te ovde po prvi put prikazujemo njegovu kompletnu NMR analizu. Jedinjenja 1-5, 8-11 i 13 već su bila poznata iz vrste *C. coggygia*. Većina njih, odnosno 2, 5, 8-12, predstavljaju poznate sekundarne metabolite srodnih vrsta roda *Rhus*, kao što je *Rhus verniciflua* (sin. *Toxicodendron vernicifluum*), dok su 3-O-metilepifustin (6), epitaksifolin (7) i sulfuretin auronol (12), izolovani u ovom radu, poznata jedinjenja, ali su po prvi put pronađena u *C. coggygia* (Hashida et al., 2014). Jedinjenje 3-O-metilepifustin (6) do sada je bilo opisano samo u jednom radu, kao jedinjenje vrste *Trachylobium verrucosum* (Gaertn.) Oliv. (Van der Merwe et al., 1972). Potpuni spektralni podaci, a pre svega NMR podaci, do sada nisu bili objavljeni, osim konstante kuplovanja između vicinalnih protona H-2 i H-3, koja je iznosila  $J_{2,3} = 2,0$  Hz (Van der Merwe et al., 1972). Stoga je ovo prvi put da je 3-O-metilepifustin potpuno hemijski okarakterisan i svi NMR spektri dati su u Prilogu. U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja 6 obrazac aromatičnih signala bio je isti, a hemijski pomaci veoma slični onima kod poznatog 3-O-metilfustina (3) (Prilog 8-92) (da Costa et al., 2014; Novaković et al., 2019). Glavna razlika uočena je u alifatičnom regionu; umesto dva dubleta protona H-2 i H-3 na  $\delta_{\text{H}}$  5,07 i 4,17, sa karakterističnom konstantom kuplovanja  $J_{2,3} = 10,4$  Hz za *trans* raspored, u  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja 6 uočena su dva dubleta pri  $\delta_{\text{H}}$  5,32 i 3,74, sa karakterističnom konstantom kuplovanja  $J_{2,3} = 1,2$  Hz, što ukazuje na *cis* raspored H-2/H-3. Jedinjenja 3 i 6 pokazala su veoma slične  $^{13}\text{C}$  NMR spektre, a svi ostali NMR podaci bili su u skladu sa strukturom 3-O-metilepifustina (6). Polarimetrijske analize pokazale su da je 3-O-metilepifustin (6) izolovan u ovom radu levorotatorni, odnosno (-) izomer;  $[\alpha]^{22}_{\text{D}}$  iznosilo je -3,0, slično kao kod fustina (2) ( $[\alpha]^{22}_{\text{D}} = -30,0$ ) i 3-O-metilfustina (3) ( $[\alpha]^{22}_{\text{D}} = -51,0$ ).

Epitaksifolin (7) je po prvi put pronađen u *C. coggygia*. Njegovi NMR podaci (Prilog 8-92) u skladu su sa literaturom (Kiehlmann & Slade, 2003). Zbog nedovoljne izolovane količine ovog jedinjenja, epitaksifolin nije ispitivan u pogledu citotoksične aktivnosti.

Sulfuretin auronol (12) je već poznat kao sastojak vrste *Rhus verniciflua* i brojnih drugih biljnih vrsta. *R. verniciflua* je taksonomski bliska vrsti *C. coggygia*, pošto je rod *Cotinus* ranije pripadao rodu *Rhus*, ali je kasnije iz njega izdvojen. Pored toga, *R. verniciflua* je hemijski veoma slična vrsti *C. coggygia*. Naši NMR podaci (Prilog 8-92) dobro se podudaraju sa literaturnim podacima (Hashida et al., 2014).



Slika 1 Izolovana jedinjenja iz ruja

### 3.2 Hemijska kompozicija ekstrakata ruja

Prema HPLC-DAD (HPLC sa detektorom sa nizom dioda, engl. *Diode Array Detector*) analizama EE, glavna jedinjenja bila su: fustin (22,1%  $\pm$  0,8%), sulfuretin (14,4%  $\pm$  0,4%), butin (9,3%  $\pm$  0,4%), fisetin (5,0%  $\pm$  0,4%), taksifolin (2,0%  $\pm$  0,3%) i butein (0,8%  $\pm$  0,3%).

U MME glavna jedinjenja bila su fustin (19,2%  $\pm$  0,8%), sulfuretin (12,4%  $\pm$  0,5%), butin (8,9%  $\pm$  0,5%), fisetin (5,3%  $\pm$  0,4%), taksifolin (1,8%  $\pm$  0,3%) i butein (1,1%  $\pm$  0,3%).

U VE vrste *C. coggygia* glavna jedinjenja bila su: fustin sa 24,8%  $\pm$  1,0%, butin sa 6,3%  $\pm$  0,5%, sulfuretin sa 3,4%  $\pm$  0,6% i taksifolin sa 1,7%  $\pm$  0,3%.

### 3.3 Određivanje intenziteta citotoksičnog dejstva kolorimetrijskim MTT esejom

EE, MME i VE srži drveta vrste *C. coggygia*, kao i 12 jedinjenja izolovanih iz EE, pokazali su koncentraciono-zavisnu citotoksičnost prema sedam humanih malignih ćelijskih linija: HeLa, MDA-MB-231, HL-60, K562, A375, PC-3 i DU 145. Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 2. EE, MME i VE ispoljili su citotoksičnu aktivnost prema svim ispitivanim malignim ćelijskim linijama, sa  $IC_{50}$  koncentracijama u opsegu od 31,04 do 168,59  $\mu\text{g/ml}$  za EE, od 33,74 do 160,92  $\mu\text{g/ml}$  za MME i od 51,05 do 184,72  $\mu\text{g/ml}$  za VE. Osetljivost malignih ćelijskih linija MDA-MB-231 i HeLa na dejstvo EE bila je gotovo identična. Od 12 izolovanih jedinjenja, butein (11) je ispoljio najjaču citotoksičnu aktivnost prema svim ispitivanim malignim ćelijskim linijama, sa  $IC_{50}$  vrednostima u rasponu od 8,66  $\mu\text{M}$  za HeLa ćelije do 90,52  $\mu\text{M}$  za DU 145 ćelije (Tabela 2). Značajno je da je citotoksičnost buteina (11) bila izražena i kod K562, MDA-MB-231 i A375 ćelija. Pored toga, uočena je visoka selektivnost citotoksičnog delovanja buteina (11) prema HeLa ćelijama u poređenju sa njegovom citotoksičnošću prema normalnim ćelijama MRC-5 i HaCaT, pri čemu je koeficijent selektivnosti iznosio 9,91 za MRC-5 i 4,21 za HaCaT (Tabela 3). Ćelije adenokarcinoma prostate PC-3 bile su osetljivije na citotoksično dejstvo buteina (11) u poređenju sa ćelijama karcinoma prostate DU 145, sa 1,86 puta nižom  $IC_{50}$  vrednošću. Butin (1) je pokazao snažan citotoksični efekat i selektivnost prema K562 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 19,67  $\mu\text{M}$ , kao i prema HL-60 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 28,76  $\mu\text{M}$ . Izražena citotoksičnost butina (1) uočena je i prema HeLa ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 44,48  $\mu\text{M}$ . Dva različita tipa karcinoma prostate, DU 145 i PC-3 ćelije, pokazala su uporediv nivo osetljivosti na butin (1). Slično tome, butin (1), fustin (2), 3-O-metilepifustin (6), taksifolin (5), sulfuretin (10) i kotinignan A (13) pokazali su najveći intenzitet citotoksičnosti upravo prema K562 ćelijskoj liniji, u odnosu na sve ostale ispitivane linije. Kotinignan A (13) pokazao je visoku citotoksičnu aktivnost prema K562 ćelijama, sa  $IC_{50}$  koncentracijom od 19,04  $\mu\text{M}$ . Pored toga, kotinignan A (13) ispoljio je umeren citotoksični efekat prema HeLa ćelijama, dok je niža citotoksičnost uočena prema ćelijama prostate PC-3 i DU 145, koje su pokazale sličnu osetljivost. Sulfuretin (10) je pokazao najveću citotoksičnost prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije, dok je njegov citotoksični efekat bio 12 puta slabiji prema DU 145 ćelijskoj liniji, koja je pokazala najmanju osetljivost. Osetljivost PC-3 ćelija na sulfuretin (10) bila je približno dva puta veća od one zabeležene kod DU 145 ćelija. Fisetin (8) je pokazao najjači citotoksični efekat prema ćelijama akutne promijelocitne leukemije HL-60 i adenokarcinoma dojke MDA-MB-231, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 42,79 i 45,05  $\mu\text{M}$ , koje su bile gotovo dva puta niže od  $IC_{50}$  vrednosti zabeležene za ćelije hronične mijeloidne leukemije K562. Pri koncentraciji od 400  $\mu\text{M}$ , fisetin nije pokazao citotoksičnost prema DU 145 ćelijama. Eriodiktiol (4) je pokazao najveću citotoksičnost prema MDA-MB-231 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 51,32  $\mu\text{M}$ , dok su DU 145 ćelije pokazale nisku osetljivost na eriodiktiol. Fustin (2) nije pokazao citotoksične efekte pri koncentraciji od 400  $\mu\text{M}$  prema HeLa, PC-3, HaCaT, MRC-5 i DU 145 ćelijama. Međutim, ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema K562, MDA-MB-231 i A375 ćelijama pri nižim koncentracijama (155,30  $\mu\text{M}$ , 178,59  $\mu\text{M}$  i 186,59  $\mu\text{M}$ , respektivno). Sulfuretin auronol (12) pokazao je citotoksičnu aktivnost samo prema leukemijskim ćelijama HL-60 i K562. Visok koeficijent selektivnosti uočen je za HL-60 ćelije u poređenju i sa MRC-5 i sa HaCaT ćelijama. Pri koncentraciji od 400  $\mu\text{M}$ , taksifolin (5) nije pokazao citotoksične efekte prema MRC-5 i DU 145 ćelijama. I MDA-MB-231 i K562 ćelije pokazale su sličan nivo osetljivosti na taksifolin. Citotoksična aktivnost ispitivanih jedinjenja prema normalnim humanim fibroblastima pluća MRC-5 kretala se u rasponu od 63,19 do 400  $\mu\text{M}$ , a za ekstrakte od 131,43 do 179,73  $\mu\text{g/ml}$ . Citotoksičnost ispitivanih jedinjenja prema normalnim humanim keratinocitima HaCaT takođe je određena i kretala se u rasponu od 36,47 do 400  $\mu\text{M}$ , dok je za ekstrakte iznosila od 122,43 do 123,71  $\mu\text{g/ml}$ . 3-O-Metilepifustin (6) pokazao je citotoksičnost prema MDA-MB-231 i A375 ćelijama, zajedno sa izraženim citotoksičnim efektom prema K562 ćelijama. Mehanizmi antitumorskog delovanja dalje su ispitivani za svaki od tri ekstrakta i za tri jedinjenja dobijena iz *C. coggygia*: butin (1) i butein (11), koji su pokazali najveći intenzitet citotoksične aktivnosti, i sulfuretin (10), koji je ispoljio ne samo izraženu citotoksičnu aktivnost, već je bio i jedno od najzastupljenijih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima.

**Tabela 2 Intenzitet citotoksičnog dejstva primenom kolorimetrijskog MTT esaja ekstrakata i jedinjenja ruja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Zvezdica (\*) označava da je rezultat dobijen u jednom nezavisnom eksperimentu, odnosno jednom biološkom replikatu, usled ograničene dostupnosti ispitivanog jedinjenja, dok dve zvezdice (\*\*) označavaju rezultate dobijene u dva nezavisna eksperimenta. Oznaka NA označava vrednosti koje nisu dostupne za datu ćelijsku liniju i/ili ispitivano jedinjenje usled ograničene dostupnosti jedinjenja.**

| IC <sub>50</sub> [µg/mL za ekstrakte i µM za jedinjenja] srednja vrednost ± standardna devijacija |               |                 |              |                 |               |               |               |               |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Jedinjenje/<br>Ekstrakt                                                                           | HeLa          | MDA-MB-231      | HL-60        | K562            | A375          | DU 145        | PC-3          | HaCaT         | MRC-5         |
| EE                                                                                                | 73.57 ± 3.16  | 72.54± 7.80     | 31.04±4.30   | 34.84± 4.24     | 67.95 ± 2.67  | 168.59± 9.43  | 96.65 ± 1.02  | 122.43± 0.56  | 139.85± 13.56 |
| VE                                                                                                | 75.48 ± 5.54  | 117.35± 7.26    | 51.05±7.51   | 89.72± 5.98     | 135.13± 3.38  | 184.72± 4.98  | 115.11± 6.39  | 125.67± 3.40  | 179.73± 15.37 |
| MME                                                                                               | 47.45 ± 3.23  | 67.50± 8.03     | 33.74±2.86   | 44.57± 5.91     | 72.45 ± 5.49  | 160.92± 16.03 | 83.53 ± 0.83  | 123.71± 6.76  | 131.43± 11.58 |
| (1) Butin                                                                                         | 44.48 ± 5.16  | 104.10±2.03     | 28.76±4.35   | 19.67± 2.49     | 89.09 ± 2.10  | 186.03± 24.19 | 195.57± 0.77  | 72.12 ± 2.19  | 101.31± 16.03 |
| (2) Fustin                                                                                        | >400          | 178.59± 19.68   | >200         | 155.30± 3.46    | 186.59± 11.66 | >400          | >400          | >400          | >400          |
| (3) 3-O-metilfustin                                                                               | NA            | 201.26± 1.80 ** | NA           | 74.38 ± 9.40 ** | 338.19 *      | NA            | NA            | NA            | NA            |
| (4) 3-O-metilepifustin                                                                            | NA            | 193.34 *        | NA           | 47.71 *         | 345.08 *      | NA            | NA            | NA            | NA            |
| (5) Eriodiktiol                                                                                   | 147.03± 17.45 | 51.32± 6.40     | 116.97±15.07 | 125.61± 8.11    | 137.92± 6.65  | 387.69± 15.95 | 283.98± 7.54  | 172.04± 6.81  | 154.93± 7.48  |
| (6) Taksifolin                                                                                    | 195.19 ± 2.84 | 174.12± 20.36   | 187.20±14.49 | 166.66± 10.90   | 190.52± 5.54  | >400          | 390.72± 16.07 | 391.40± 14.89 | >400          |
| (8) Fisetin                                                                                       | 60.47 ± 11.11 | 45.05± 7.60     | 42.79±3.07   | 90.78± 2.73     | 161.20 ± 5.91 | >400          | 159.74± 14.41 | 79.40 ± 6.03  | >400          |
| (9) Butein                                                                                        | 8.66 ± 1.10   | 22.36± 2.60     | 41.14±2.32   | 13.91± 2.61     | 39.14 ± 6.86  | 90.52 ± 4.74  | 48.61 ± 1.24  | 36.47 ± 3.46  | 85.78± 8.90   |
| (10) Sulfuretin                                                                                   | 78.76 ± 9.66  | 54.63± 5.71     | 36.24±4.69   | 21.94± 3.42     | 69.03 ± 9.91  | 265.50± 10.08 | 116.00± 5.94  | 126.09± 3.02  | 154.69± 10.24 |
| (11) Sulfuretin auronol                                                                           | >400          | >400            | 42.50±6.70   | 129.24± 5.42    | >400          | >400          | >400          | >400          | >400          |
| (12) 3-O-β-D-sitosterol glukozid                                                                  | >200 **       | 333.33 *        | NA           | >200 **         | >200 *        | >400 **       | >400 **       | 104.41*       | >400**        |
| (13) Kotinignan A                                                                                 | 54.73 ± 9.44  | NA              | NA           | 19.04± 3.79     | NA            | 75.04 ± 2.87  | 76.37± 14.58  | NA            | 63.19± 3.68   |
| (PK) Cisplatina                                                                                   | 1.37 ± 0.15   | 20.59 ± 0.52    | 1.6 ±0.30    | 9.70 ±0.70      | 2.30 ±0.48    | 6.72 ±0.05    | 5.75 ±0.16    | 2.86 ± 0.21   | 6.37 ± 0.20   |

Na osnovu rezultata MTT testa, dalja ispitivanja mehanizama antitumorskog dejstva usmerena su na tri ekstrakta ruja: EE, MME i VE, kao i na odabrana jedinjenja butin, butein i sulfuretin. Ovakav izbor zasnovan je na kombinaciji nekoliko stavki: izraženoj citotoksičnoj aktivnosti prema malignim ćelijskim linijama, razlici u osetljivosti između malignih i neizmenjenih normalnih ćelija, odnosno koeficijentu selektivnosti, kao i hemijskom sastavu ekstrakata određenom HPLC-DAD analizom.

MTT test je pokazao da sva tri ekstrakta ispoljavaju citotoksični efekat prema većem broju ispitivanih malignih ćelijskih linija, ali sa različitim intenzitetom delovanja. Najizraženija aktivnost ekstrakata uočena je prema hematološkim malignim linijama HL-60 i K562, gde su  $IC_{50}$  vrednosti bile niže u odnosu na većinu solidnih tumorskih linija. Posebno su EE i MME pokazali izražen efekat prema HL-60 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 31,04  $\mu\text{g/ml}$  i 33,74  $\mu\text{g/ml}$ , kao i prema K562 ćelijama, gde su  $IC_{50}$  vrednosti iznosile 34,84  $\mu\text{g/ml}$  i 44,57  $\mu\text{g/ml}$ . VE je takođe pokazao značajnu aktivnost, naročito prema HL-60 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 51,05  $\mu\text{g/ml}$ . Ovi rezultati ukazuju da ekstrakti *C. coggygria* ne deluju samo kao nespecifični citotoksični agensi, već da poseduju biološki relevantan antitumorski potencijal koji zavisi od tipa ćelijske linije. Važan razlog za uključivanje sva tri ekstrakta u dalja ispitivanja bio je i njihov različit hemijski profil. HPLC-DAD analizom utvrđeno je da ekstrakti sadrže slične glavne fenolne komponente, ali u različitim relativnim zastupljenostima. U EE dominantna jedinjenja bila su fustin, sulfuretin, butin, fisetin, taksifolin i butein. Sličan sastav zabeležen je i u MME, dok je VE sadržao najveći procenat fustina, ali niže količine sulfuretina i butina. Zbog toga je bilo značajno ispitati da li se razlike u citotoksičnom efektu ekstrakata mogu povezati sa prisustvom i međusobnim odnosom ovih bioaktivnih jedinjenja. Drugim rečima, ispitivanje ekstrakata omogućava procenu ukupnog biološkog efekta kompleksne smeše jedinjenja, dok analiza pojedinačnih molekula omogućava bolje razumevanje potencijalnih pojedinačnih nosilaca aktivnosti. Među izolovanim jedinjenjima, butein se izdvojio kao najpotentnije citotoksično jedinjenje. Njegove  $IC_{50}$  vrednosti bile su veoma niske u više malignih ćelijskih linija, naročito u HeLa ćelijama, gde je  $IC_{50}$  iznosio 8,66  $\mu\text{M}$ , zatim u K562 ćelijama 13,91  $\mu\text{M}$ , MDA-MB-231 ćelijama 22,36  $\mu\text{M}$  i A375 ćelijama 39,14  $\mu\text{M}$ . Ovakav profil ukazuje na širok antitumorski potencijal buteina i opravdava njegovo uključivanje u detaljnija ispitivanja mehanizama dejstva, uključujući analizu apoptoze, ćelijskog ciklusa, oksidativnog stresa ili ekspresije gena povezanih sa proliferacijom ćelija, propagacijom ćelija kroz ćelijski ciklus i ćelijskom smrću.

Butin je takođe pokazao izraženu citotoksičnu aktivnost, naročito prema K562 i HL-60 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 19,67  $\mu\text{M}$  i 28,76  $\mu\text{M}$ . Pored toga, butin je bio prisutan u svim ekstraktima u značajnim količinama, posebno u EE i MME ekstraktu. Zbog toga je njegovo dalje ispitivanje bilo opravdano ne samo zbog direktne citotoksične aktivnosti utvrđene MTT testom, već i zbog činjenice da može doprineti ukupnom efektu ekstrakata.

Sulfuretin je izabran za dalja ispitivanja zbog kombinacije izražene biološke aktivnosti i značajne zastupljenosti u ekstraktima. U EE i MME ekstraktu, sulfuretin je bio među najzastupljenijim jedinjenjima, sa udelom od 14,4% i 12,4%. MTT test je pokazao da sulfuretin ima najizraženiji efekat prema K562 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 21,94  $\mu\text{M}$ , kao i prema HL-60 ćelijama, gde je  $IC_{50}$  iznosio 36,24  $\mu\text{M}$ . Ovi rezultati ukazuju da sulfuretin može biti jedan od značajnih nosilaca pojedinačne citotoksične aktivnosti ekstrakata, naročito prema hematološkim malignitetima.

Dodatni argument za dalje mehanističko ispitivanje jeste poređenje efekata na maligne i neizmenjene normalne ćelijske linije. Kod većine ekstrakata i odabranih jedinjenja  $IC_{50}$  vrednosti za neizmenjene MRC-5 i HaCaT linije bile su više nego za pojedine tumorske linije, što ukazuje na potencijalno povoljniji selektivni profil. Na primer, EE je prema HL-60 ćelijama pokazao  $IC_{50}$  od 31,04  $\mu\text{g/ml}$ , dok je prema MRC-5 ćelijama  $IC_{50}$  iznosio 139,85  $\mu\text{g/ml}$ . Slično tome, sulfuretin je prema K562 ćelijama imao  $IC_{50}$  od 21,94  $\mu\text{M}$ , dok je prema MRC-5 ćelijama  $IC_{50}$  iznosio 154,69  $\mu\text{M}$ . Ovakve razlike ukazuju da ispitivana jedinjenja mogu ispoljavati izraženiji efekat na maligne ćelije u odnosu na neizmenjene normalne ćelije, što je važan preduslov za dalje ispitivanje antitumorskog potencijala.

Dobijeni rezultati ukazali su da EE, MME i VE, kao kompleksne smeše jedinjenja, kao i butin, butein i sulfuretin kao pojedinačne komponente, poseduju značajan citotoksični potencijal prema odabranim malignim ćelijskim linijama. Dalja ispitivanja mehanizama dejstva bila su neophodna kako

bi se utvrdilo da li smanjenje vijabilnosti ćelija predstavlja posledicu indukcije apoptoze, poremećaja u propagaciji ćelija kroz ćelijski ciklus, oksidativnog stresa, oštećenja DNK ili drugih molekularnih promena povezanih sa antitumorskim odgovorom. Na taj način, rezultati MTT testa predstavljali su osnovu za selekciju biološki najrelevantnijih ekstrakata i jedinjenja za dalja ispitivanja, dok je analiza njihovog mehanizma dejstva omogućila dublje razumevanje načina na koji jedinjenja *C. cogggria* ostvaruju antitumorski efekat.

Na osnovu rezultata MTT testa, može se uočiti da su ekstrakti dobijeni iz ruja pokazali različit stepen citotoksične aktivnosti prema ispitivanim malignim ćelijskim linijama. Među ekstraktima, najizraženiju aktivnost je u većini ćelijskih linija pokazao MME, zatim EE, dok je VE uglavnom ispoljio slabiju aktivnost. MME je pokazao najniže  $IC_{50}$  vrednosti među ekstraktima prema HeLa ćelijama (47,45  $\mu\text{g/ml}$ ), MDA-MB-231 ćelijama (67,50  $\mu\text{g/ml}$ ), DU 145 ćelijama (160,92  $\mu\text{g/ml}$ ) i PC-3 ćelijama (83,53  $\mu\text{g/ml}$ ), što ukazuje na izraženiji citotoksični i/ili antiproliferativni potencijal ovog ekstrakta u odnosu na EE i VE. Sa druge strane, EE je pokazao nešto izraženiju aktivnost prema HL-60 ćelijama (31,04  $\mu\text{g/ml}$ ) i K562 ćelijama (34,84  $\mu\text{g/ml}$ ), dok je aktivnost MME prema ovim linijama bila slična, ali nešto slabija, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 33,74  $\mu\text{g/ml}$  za HL-60 i 44,57  $\mu\text{g/ml}$  za K562. Ovi rezultati ukazuju da su leukemijske ćelijske linije HL-60 i K562 bile među najosetljivijim na dejstvo ekstrakata, naročito EE i MME. VE je generalno pokazao slabiju aktivnost u poređenju sa EE i MME. Njegove  $IC_{50}$  vrednosti bile su više za većinu malignih ćelijskih linija, naročito za A375 (135,13  $\mu\text{g/ml}$ ), DU 145 (184,72  $\mu\text{g/ml}$ ), MDA-MB-231 (117,35  $\mu\text{g/ml}$ ) i K562 ćelije (89,72  $\mu\text{g/ml}$ ). Ipak, VE je pokazao relativno izraženu aktivnost prema HL-60 ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 51,05  $\mu\text{g/ml}$ , što ukazuje da i VE sadrži komponente koje mogu doprineti citotoksičnom efektu, ali verovatno u manjoj meri ili u drugačijem odnosu nego u EE i MME ekstraktima.

Poređenjem citotoksične aktivnosti ekstrakata sa aktivnošću izolovanih jedinjenja može se zaključiti da ukupna aktivnost ekstrakata ne zavisi isključivo od procentualno najzastupljenijih jedinjenja, već i od individualne potentnosti svake pojedinačne komponente. Prema HPLC-DAD analizi, među glavnim komponentama EE nalazili su se fustin, sulfuretin, butin, fisetin, taksifolin i butein. Fustin je bio najzastupljenije jedinjenje u ekstraktu, ali je kao izolovano jedinjenje pokazao slabu citotoksičnu aktivnost. Njegove  $IC_{50}$  vrednosti bile su  $>400 \mu\text{M}$  za HeLa, DU 145, PC-3, HaCaT i MRC-5 ćelije,  $>200 \mu\text{M}$  za HL-60, dok je prema K562 ćelijama  $IC_{50}$  iznosio 155,30  $\mu\text{M}$ . Ovakav rezultat ukazuje da, iako je fustin količinski dominantna komponenta ekstrakta, on najverovatnije nije glavni nosilac izražene citotoksične aktivnosti ekstrakata.

***Tabela 3 Indeks selektivnosti prema normalnoj humanoj ćelijskoj liniji fibroblasta pluća MRC-5 (gore). Indeks selektivnosti prema normalnoj humanoj ćelijskoj liniji keratinocita HaCaT (dole).***

| IC <sub>50</sub> za MRC-5/IC <sub>50</sub> za malignu ćelijsku liniju |             |             |             |             |       |        |       |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|--------|-------|
| <i>Indeks selektivnosti</i>                                           | HeLa        | MDA-MB-231  | HL-60       | K562        | A375  | DU 145 | PC-3  |
| EE                                                                    | 1.90        | 1.93        | <b>4.51</b> | <b>4.01</b> | 2.06  | 0.83   | 1.45  |
| VE                                                                    | 2.38        | 1.53        | <b>3.52</b> | 2.00        | 1.33  | 0.97   | 1.56  |
| MME                                                                   | <b>2.77</b> | 1.95        | <b>3.90</b> | <b>2.95</b> | 1.81  | 0.82   | 1.57  |
| (1) butin                                                             | 2.28        | 0.97        | <b>3.52</b> | <b>5.15</b> | 1.14  | 0.54   | 0.52  |
| (2) fustin                                                            | >1          | >2.24       | >2          | >2.58       | >2.14 | >1     | >1    |
| (3) 3-O-metilfustin                                                   | NA          | NA          | NA          | NA          | NA    | NA     | NA    |
| (4) 3-O-metilepifustin                                                | NA          | NA          | NA          | NA          | NA    | NA     | NA    |
| (5) eriodiktiol                                                       | 1.05        | <b>3.02</b> | 1.32        | 1.23        | 1.12  | 0.40   | 0.55  |
| (6) taksifolin                                                        | >2.04       | >2.30       | >2.14       | >2.40       | >2.10 | >1     | >1.02 |
| (8) fisetin                                                           | >6.61       | >8.88       | >9.35       | >4.41       | >2.48 | >1     | >2.5  |
| (9) butein                                                            | <b>9.91</b> | <b>3.84</b> | <b>2.09</b> | <b>6.17</b> | 2.19  | 0.95   | 1.76  |
| (10) sulfuretin                                                       | 1.96        | <b>2.83</b> | <b>4.27</b> | <b>7.05</b> | 2.24  | 0.58   | 1.33  |
| (11) sulfuretin auronol                                               | >1          | >1          | >9.41       | >3.10       | >1    | >1     | >1    |
| (12) 3-O-β-D-sitosterol glukozid                                      | >2          | >1.2        | NA          | >2          | >2    | >1     | >1    |
| (13) kotinignan A                                                     | 1.15        | NA          | NA          | <b>3.32</b> | NA    | 0.84   | 0.83  |
| IC <sub>50</sub> za HaCaT/IC <sub>50</sub> za malignu ćelijsku liniju |             |             |             |             |       |        |       |
| <i>Indeks selektivnosti</i>                                           | HeLa        | MDA-MB-231  | HL-60       | K562        | A375  | DU 145 | PC-3  |
| EE                                                                    | 1.66        | 1.69        | 3.94        | 3.51        | 1.80  | 0.73   | 1.27  |
| VE                                                                    | 1.66        | 1.07        | 2.46        | 1.40        | 0.93  | 0.68   | 1.09  |
| MME                                                                   | 2.61        | 1.83        | 3.67        | 2.78        | 1.71  | 0.77   | 1.48  |
| (1) butin                                                             | 1.62        | 0.69        | 2.51        | 3.67        | 0.81  | 0.39   | 0.37  |
| (2) fustin                                                            | >1          | >2.24       | >2          | >2.58       | >2.14 | >1     | >1    |
| (3) 3-O-metilfustin                                                   | NA          | NA          | NA          | NA          | NA    | NA     | NA    |
| (4) 3-O-metilepifustin                                                | NA          | NA          | NA          | NA          | NA    | NA     | NA    |
| (5) eriodiktiol                                                       | 1.17        | 3.35        | 1.47        | 1.37        | 1.25  | 0.44   | 0.61  |
| (6) taksifolin                                                        | 2.01        | 2.25        | 2.09        | 2.35        | 2.05  | <0.98  | 1.00  |
| (8) fisetin                                                           | 1.31        | 1.76        | 1.86        | 0.88        | 0.49  | <0.20  | 0.50  |
| (9) butein                                                            | 4.21        | 1.63        | 0.89        | 2.62        | 0.93  | 0.40   | 0.75  |
| (10) sulfuretin                                                       | 1.60        | 2.31        | 3.47        | 5.75        | 1.83  | 0.48   | 1.09  |
| (11) sulfuretin auronol                                               | >1          | >1          | >9.41       | >3.10       | >1    | >1     | >1    |
| (12) 3-O-β-D-sitosterol glukozid                                      | <0.52       | <0.31       | NA          | <0.52       | <0.52 | <0.26  | 0.26  |
| (13) kotinignan A                                                     | NA          | NA          | NA          | NA          | NA    | NA     | NA    |

Slično tome, taksifolin je pokazao uglavnom slabiju aktivnost, sa visokim IC<sub>50</sub> vrednostima prema većini ćelijskih linija, uključujući HeLa (195,19 μM), MDA-MB-231 (174,12 μM), HL-60 (187,20 μM), K562 (166,66 μM), A375 (190,52 μM), PC-3 (390,72 μM), HaCaT (391,40 μM) i MRC-

5 ( $>400 \mu\text{M}$ ). Zbog toga se može pretpostaviti da taksifolin, iako prisutan u ekstraktima, verovatno ima manji doprinos ukupnoj citotoksičnoj aktivnosti.

Za razliku od fustina i taksifolina, butein je pokazao najizraženiju aktivnost među većinom izolovanih jedinjenja. Njegove  $\text{IC}_{50}$  vrednosti bile su veoma niske prema HeLa ćelijama ( $8,66 \mu\text{M}$ ), K562 ćelijama ( $13,91 \mu\text{M}$ ), MDA-MB-231 ćelijama ( $22,36 \mu\text{M}$ ), A375 ćelijama ( $39,14 \mu\text{M}$ ), HL-60 ćelijama ( $41,14 \mu\text{M}$ ), PC-3 ćelijama ( $48,61 \mu\text{M}$ ) i DU 145 ćelijama ( $90,52 \mu\text{M}$ ). Ovi rezultati ukazuju da je butein jedno od najpotentnijih izolovanih jedinjenja u ovoj studiji. Međutim, s obzirom na to da je u etanolnom ekstraktu zastupljen u relativno niskom procentu, njegov doprinos ukupnoj aktivnosti ekstrakta verovatno nije posledica količinske dominacije, već njegove visoke biološke potentnosti. Drugim rečima, i mala količina buteina može imati značajan doprinos citotoksičnom potencijalu ekstrakta.

Butin je takođe pokazao značajnu aktivnost, naročito prema leukemijskim ćelijskim linijama.  $\text{IC}_{50}$  vrednost butina prema K562 ćelijama iznosila je  $19,67 \mu\text{M}$ , a prema HL-60 ćelijama  $28,76 \mu\text{M}$ , što ukazuje na izraženu osetljivost ovih linija. Butin je pokazao i aktivnost prema HeLa ćelijama ( $44,48 \mu\text{M}$ ), dok je prema MDA-MB-231, A375, DU 145 i PC-3 ćelijama aktivnost bila slabija, sa  $\text{IC}_{50}$  vrednostima od  $104,10 \mu\text{M}$ ,  $89,09 \mu\text{M}$ ,  $186,03 \mu\text{M}$  i  $195,57 \mu\text{M}$ . Budući da je butin u ekstraktima prisutan u značajnijem procentu, njegovo prisustvo verovatno doprinosi aktivnosti ekstrakata, posebno prema HL-60 i K562 ćelijama.

Sulfuretin je, prema sastavu ekstrakata, jedna od značajnije zastupljenih komponenti i pokazao je relevantnu citotoksičnu aktivnost prema više malignih ćelijskih linija. Najizraženija aktivnost sulfuretina zabeležena je prema K562 ćelijama, sa  $\text{IC}_{50}$  vrednošću od  $21,94 \mu\text{M}$ , zatim prema HL-60 ćelijama ( $36,24 \mu\text{M}$ ), MDA-MB-231 ćelijama ( $54,63 \mu\text{M}$ ), A375 ćelijama ( $69,03 \mu\text{M}$ ) i HeLa ćelijama ( $78,76 \mu\text{M}$ ). Slabija aktivnost zabeležena je prema PC-3 ćelijama ( $116,00 \mu\text{M}$ ) i DU 145 ćelijama ( $265,50 \mu\text{M}$ ). S obzirom na relativno visok procenat sulfuretina u ekstraktima i njegovu aktivnost kao izolovanog jedinjenja, može se pretpostaviti da sulfuretin predstavlja jednu od važnih komponenti odgovornih za citotoksični efekat ekstrakata, naročito prema hematološkim malignim ćelijama.

Fisetin je pokazao umerenu do izraženu aktivnost prema pojedinim ćelijskim linijama, posebno prema MDA-MB-231 ćelijama ( $45,05 \mu\text{M}$ ), HL-60 ćelijama ( $42,79 \mu\text{M}$ ) i HeLa ćelijama ( $60,47 \mu\text{M}$ ). Njegova aktivnost prema K562 ćelijama bila je slabija u odnosu na butein, butin i sulfuretin, sa  $\text{IC}_{50}$  vrednošću od  $90,78 \mu\text{M}$ . Budući da je fisetin prisutan u ekstraktima u nižem procentu u odnosu na fustin, sulfuretin i butin, ali pokazuje relevantnu pojedinačnu aktivnost prema određenim ćelijskim linijama, moguće je da doprinosi ukupnom efektu ekstrakata, naročito prema MDA-MB-231, HL-60 i HeLa ćelijama. Eriodiktiol je pokazao najizraženiju aktivnost prema MDA-MB-231 ćelijama, sa  $\text{IC}_{50}$  vrednošću od  $51,32 \mu\text{M}$ , dok je prema ostalim linijama aktivnost bila slabija.  $\text{IC}_{50}$  vrednosti za HeLa, HL-60, K562 i A375 ćelije iznosile su  $147,03 \mu\text{M}$ ,  $116,97 \mu\text{M}$ ,  $125,61 \mu\text{M}$  i  $137,92 \mu\text{M}$ . Prema DU 145 i PC-3 ćelijama eriodiktiol je pokazao znatno slabiju aktivnost, sa  $\text{IC}_{50}$  vrednostima od  $387,69 \mu\text{M}$  i  $283,98 \mu\text{M}$ . Ovaj rezultat ukazuje da eriodiktiol može doprineti aktivnosti prema pojedinim ćelijskim linijama, ali nije među glavnim nosiocima citotoksičnog efekta.

Posebno je značajno da se aktivnost ekstrakata ne može objasniti samo prisustvom najzastupljenijeg jedinjenja, fustina, jer je fustin kao izolovano jedinjenje pokazao slabu aktivnost. Suprotno tome, jedinjenja koja su zastupljena u manjem procentu, kao što su butein i fisetin, pokazala su izraženiju pojedinačnu aktivnost. Ovo ukazuje da biološki efekat ekstrakta zavisi od kombinacije procentualne zastupljenosti i individualne aktivnosti jedinjenja. Na primer, sulfuretin i butin su istovremeno relativno zastupljeni u ekstraktima i pokazuju značajnu aktivnost prema pojedinim ćelijskim linijama, naročito HL-60 i K562, što ih verovatnim čini važnim nosiocima ukupnog citotoksičnog efekta. Sa druge strane, butein, iako manje zastupljen, pokazuje najjaču pojedinačnu aktivnost i može imati

značajan doprinos ukupnom citotoksičnom potencijalu zbog visoke potentnosti. Dobijeni rezultati takođe ukazuju na moguću ulogu sinergističkog ili aditivnog delovanja komponenti ekstrakta. Ekstrakti, naročito EE i MME, pokazali su izraženu aktivnost prema HL-60 i K562 ćelijama, što se može povezati sa prisustvom više aktivnih jedinjenja koja su pojedinačno pokazala dobru aktivnost prema ovim linijama, pre svega butina, sulfuretina i buteina. Kod K562 ćelija, IC<sub>50</sub> vrednosti buteina, butina i sulfuretina iznosile su 13,91 µM, 19,67 µM i 21,94 µM, dok su EE i MME pokazali IC<sub>50</sub> vrednosti od 34,84 µg/ml i 44,57 µg/ml. Kod HL-60 ćelija, butin, sulfuretin, fisetin i butein pokazali su IC<sub>50</sub> vrednosti od 28,76 µM, 36,24 µM, 42,79 µM i 41,14 µM, dok su EE i MME pokazali izraženu aktivnost sa IC<sub>50</sub> vrednostima od 31,04 µg/ml i 33,74 µg/ml. Ova podudarnost ukazuje da aktivnost ekstrakata prema leukemijskim ćelijskim linijama može biti posledica kombinovanog doprinosa ovih jedinjenja.

Nasuprot tome, slabija aktivnost ekstrakata prema DU 145 ćelijama može se povezati sa slabijom aktivnošću većine pojedinačnih jedinjenja prema ovoj ćelijskoj liniji. Na primer, IC<sub>50</sub> vrednosti butina, sulfuretina, eriodiktiola i taksifolina prema DU 145 ćelijama iznosile su 186,03 µM, 265,50 µM, 387,69 µM i >400 µM, dok su i ekstrakti pokazali više IC<sub>50</sub> vrednosti: 168,59 µg/ml za EE, 184,72 µg/ml za VE i 160,92 µg/ml za MME. Ovi rezultati ukazuju da je DU 145 ćelijska linija bila manje osetljiva na većinu ispitivanih ekstrakata i jedinjenja. Važno je naglasiti da su ekstrakti pokazali nižu toksičnost prema normalnim ćelijskim linijama HaCaT i MRC-5 u odnosu na najosetljivije maligne linije. IC<sub>50</sub> vrednosti EE prema HaCaT i MRC-5 ćelijama iznosile su 122,43 µg/ml i 139,85 µg/ml, dok su za MME iznosile 123,71 µg/ml i 131,43 µg/ml. Ove vrednosti su više u odnosu na IC<sub>50</sub> vrednosti istih ekstrakata prema HL-60 i K562 ćelijama, što ukazuje na određeni stepen selektivnijeg dejstva prema malignim ćelijama leukemije. Međutim, pojedina jedinjenja, naročito butein, pokazala su aktivnost i prema normalnim ćelijama, sa IC<sub>50</sub> vrednostima od 36,47 µM za HaCaT i 85,78 µM za MRC-5, što ukazuje da se njegova visoka potentnost ne odnosi isključivo na maligne ćelije.

Rezultati pokazuju da se citotoksična aktivnost ekstrakata ruja ne može pripisati samo najzastupljenijim jedinjenjima. Fustin, iako dominantno prisutan u ekstraktima, pokazao je slabu pojedinačnu aktivnost, dok su butein, butin, sulfuretin i fisetin pokazali znatno izraženiju aktivnost prema određenim malignim ćelijskim linijama. Najverovatniji doprinos ukupnom efektu ekstrakata potiče od kombinovanog delovanja više komponenti, pri čemu sulfuretin i butin doprinose zbog relativno visokog procentualnog udela i relevantne aktivnosti, dok butein doprinosi pre svega zbog izrazite pojedinačne potentnosti, uprkos nižoj zastupljenosti u ekstraktu. Ovakvi rezultati opravdavaju izbor butina, buteina i sulfuretina za dalja ispitivanja mehanizama antitumorskog dejstva.

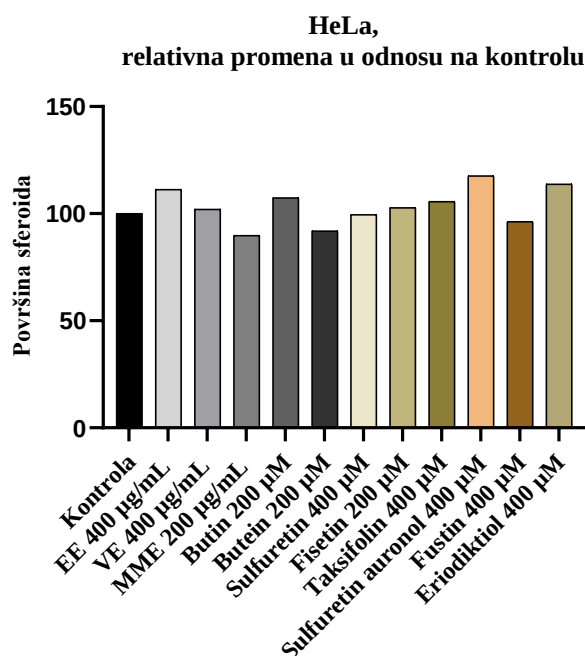
### **3.4 3D modeli: citotoksično dejstvo**

#### **3.4.1 Promena površine sferoida na ćelijskim modelima HeLa i MDA-MB-231 ćelija**

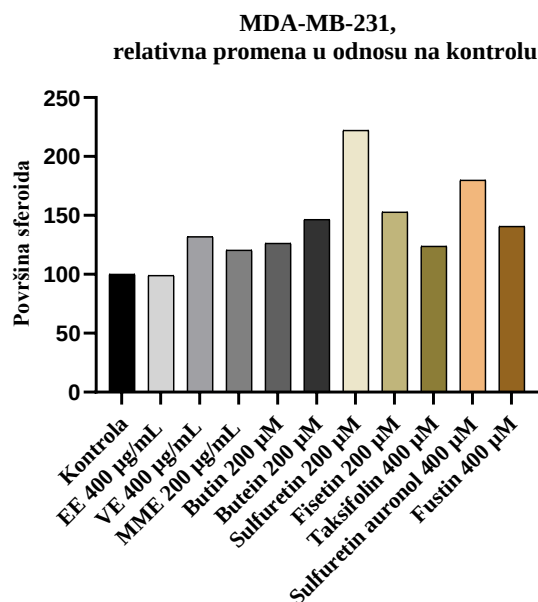
U poređenju sa kontrolom, ispitivani ekstrakti i jedinjenja pokazali su različite efekte (Slika 2), od minimalnih promena do veoma izraženog smanjenja merenog parametra površine sferoida. Parametar predstavlja odnos površine sferoida HeLa linije, merene pod svetlosnim mikroskopom nakon 72 h inkubacije sa ispitivanim ekstraktima i jedinjenjima, i površine sferoida pre tretmana. Vrednosti su izražene relativno u odnosu na kontrolu u trenutku 0 h, koja je definisana kao 100%. Nakon tretmana sa 200 µM buteina zabeleženo je smanjenje relativne vrednosti za 8,01% u odnosu na kontrolu, dok je nakon tretmana sa 200 µM butina registrovano povećanje od 7,38%. Tretman MME ekstraktom u koncentraciji od 200 µg/ml doveo je do smanjenja relativne vrednosti za 10,22%, dok je nakon tretmana sa 200 µM

fisetina zabeleženo povećanje od 2,79%. Nakon tretmana sa 400  $\mu$ M sulfuretina zabeleženo je minimalno smanjenje relativne vrednosti od 0,46%, dok je tretman sa 400  $\mu$ M taksifolina doveo do povećanja od 5,73%. Najizraženije povećanje među ispitivanim jedinjenjima zabeleženo je nakon tretmana sa 400  $\mu$ M sulfuretin auronola, koje je iznosilo 17,65%, dok je nakon tretmana sa 400  $\mu$ M eriodiktiola registrovano povećanje od 13,84%. Tretman EE ekstraktom u koncentraciji od 400  $\mu$ g/ml doveo je do povećanja relativne vrednosti za 11,25%, dok je nakon tretmana sa 400  $\mu$ M fustina zabeleženo smanjenje od 3,67%. Kod VE ekstrakta u koncentraciji od 400  $\mu$ g/ml registrovano je povećanje relativne vrednosti od 2,07%.

Ukupno posmatrano, u odnosu na kontrolu od 100%, smanjenje relativnih vrednosti na HeLa liniji zabeleženo je nakon tretmana buteinom, MME ekstraktom, sulfuretinom i fustinom, dok je kod tretmana butinom, fisetinom, taksifolinom, sulfuretin auronolom, eriodiktiolom, EE i VE registrovano povećanje relativnih vrednosti.



**Slika 2** Relativna promena u površini višćelijskog tumorskog sferoida nakon tretmana ekstraktima i izolovanim jedinjenjima iz *C. coggygia* nakon 72 h u odnosu na kontrolu 0 h, na malignoj ćelijskoj liniji HeLa. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment.



**Slika 3** Relativna promena u površini višćelijskog tumorskog sferoida nakon tretmana ekstraktima i izolovanim jedinjenjima iz *C. coggygria* nakon 72 h u odnosu na kontrolu 0 h, na malignoj ćelijskoj liniji MDA-MB-231. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment.

Na MDA-MB-231 liniji (Slika 3) vrednosti su izražene relativno u odnosu na kontrolu u trenutku 0 h, koja je definisana kao 100%. Nakon tretmana sa 200 µM buteina zabeleženo je povećanje relativne vrednosti za 46,63% u odnosu na kontrolu, dok je nakon tretmana sa 200 µM butina registrovano povećanje od 26,33%. Tretman MME ekstraktom u koncentraciji od 200 µg/ml doveo je do povećanja relativne vrednosti za 20,47%, dok je nakon tretmana sa 200 µM fisetina zabeleženo povećanje od 52,91%.

Najizraženije povećanje relativne vrednosti registrovano je nakon tretmana sa 200 µM sulfuretina, koje je iznosilo 122,24% u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana sa 400 µM taksifolina zabeleženo je povećanje od 23,76%, dok je tretman sa 400 µM sulfuretin auronola doveo do povećanja relativne vrednosti od 79,93%. Kod EE ekstrakta u koncentraciji od 400 µg/ml zabeleženo je blago smanjenje relativne vrednosti od 0,93% u odnosu na kontrolu. Tretman sa 400 µM fustina doveo je do povećanja od 40,68%, dok je nakon tretmana VE ekstraktom u koncentraciji od 400 µg/ml registrovano povećanje relativne vrednosti od 31,93%.

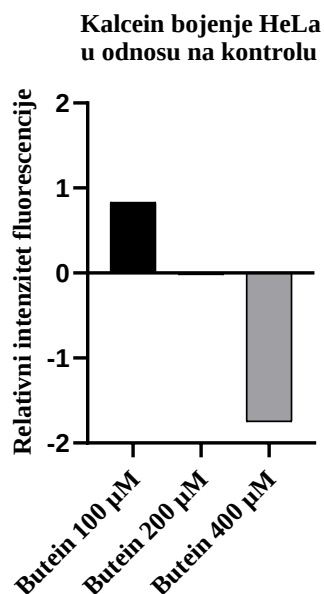
Ukupno posmatrano, u odnosu na kontrolu od 100%, kod svih ispitivanih tretmana na ćelijskoj liniji MDA-MB-231, osim EE ekstrakta, registrovano je povećanje relativnih vrednosti. Najizraženije povećanje zabeleženo je nakon tretmana sulfuretinom, zatim sulfuretin auronolom, fisetinom, buteinom i fustinom, dok su manja povećanja registrovana nakon tretmana butinom, VE, taksifolinom i MME ekstraktom. Kod EE ekstrakta registrovano je minimalno smanjenje relativne vrednosti u odnosu na kontrolu.

### 3.4.2 Bojenje kalceinom sferoida na ćelijskom modelu HeLa ćelija

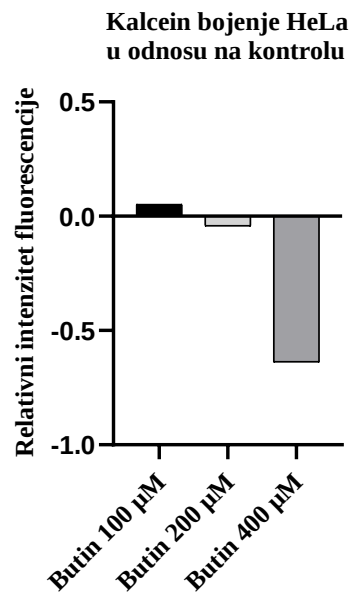
Kalcein bojenje 3D sferoida HeLa ćelijske linije (Slike 4-14) pokazalo je različite promene relativnog kalcein signala nakon tretmana različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja i ekstrakata. Rezultati su izraženi u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, čija je vrednost postavljena na 1 (100%). Za ekstrakte MME, EE i VE koncentracije su izražene u  $\mu\text{g/ml}$ , dok su koncentracije pojedinačnih jedinjenja izražene u  $\mu\text{M}$ . Dobijene vrednosti predstavljaju promenu kalcein signala u odnosu na kontrolu i ne predstavljaju direktno određivanje broja ćelija niti omogućavaju samostalnu procenu apsolutne vijabilnosti sferoida. Kod buteina, pri 100  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od 0,83, što odgovara približno 17% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila -0,02, odnosno signal je bio blizu nulte vrednosti, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  registrovana vrednost od -1,75, što ukazuje na izraženu negativnu promenu relativnog kalcein signala. Kod butina, pri 100  $\mu\text{M}$  relativni kalcein signal iznosio je 0,05, što odgovara približno 95% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,04, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost iznosila -0,64, uz izraženu negativnu promenu relativnog signala pri višoj koncentraciji. Kod ekstrakta MME, pri 100  $\mu\text{g/ml}$  relativni signal iznosio je 1,22, odnosno bio je za približno 22% viši u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{g/ml}$  vrednost je iznosila -0,37, dok je pri 400  $\mu\text{g/ml}$  registrovana vrednost od -2,25, što predstavlja jednu od najizraženijih negativnih promena relativnog kalcein signala među svim ispitivanim tretmanima. EE je pri 100  $\mu\text{g/ml}$  pokazao vrednost od 1,79, odnosno signal je bio za približno 79% viši u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{g/ml}$  registrovana je vrednost od -0,23, dok je pri 400  $\mu\text{g/ml}$  vrednost iznosila -1,00, uz izraženu negativnu promenu pri najvišoj koncentraciji. Kod VE, pri 100  $\mu\text{g/ml}$  relativni signal iznosio je 1,56, što odgovara približno 56% višem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{g/ml}$  vrednost je iznosila -0,61, dok je pri 400  $\mu\text{g/ml}$  registrovana vrednost od -1,02, uz izraženu negativnu promenu pri višoj koncentraciji. Kod sulfuretina, pri 100  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od 2,17, odnosno signal je bio za približno 117% viši u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,44, što odgovara približno 56% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -2,14, što ukazuje na veoma izraženu negativnu promenu relativnog kalcein signala. Fisetin je pri svim ispitivanim koncentracijama pokazao negativne vrednosti relativnog signala. Pri 100  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,31, pri 200  $\mu\text{M}$  vrednost od -0,37, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  zabeležena vrednost od -1,18, što ukazuje na izraženiju negativnu promenu pri najvišoj koncentraciji. Kod taksifolina, pri 200  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,46, odnosno bio je za približno 54% niži u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila 0,30, što odgovara približno 70% nižem signalu u odnosu na kontrolu, dok je pri 800  $\mu\text{M}$  registrovana vrednost od 0,20, odnosno približno 80% niži signal u odnosu na kontrolu. Za razliku od većine drugih tretmana, taksifolin ni pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji nije pokazao negativne vrednosti relativnog signala. Kod fustina, pri 200  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,21, što odgovara približno 79% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,57, uz izraženu negativnu promenu relativnog kalcein signala. Kod sulfuretin auronola promene su bile manje izražene. Pri 200  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,15, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost iznosila -0,01, odnosno bila je veoma bliska nultoj vrednosti. Kod eriodiktiola, pri 200  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,69, odnosno bio je za približno 31% niži u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila 0,67, što odgovara približno 33% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 800  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,46, ukazujući na izraženiju negativnu promenu pri najvišoj koncentraciji.

Posmatrano u celini, različiti tretmani pokazali su izražene razlike u promenama relativnog kalcein signala u 3D sferoidima HeLa ćelijske linije. Pri nižim koncentracijama pojedini ekstrakti i jedinjenja doveli su do povećanja signala u odnosu na kontrolu, pri čemu je najveći porast registrovan kod sulfuretina pri 100  $\mu\text{M}$ , gde je signal bio približno 117% viši u odnosu na kontrolu. Značajno povećanje signala zabeleženo je i kod EE i VE pri 100  $\mu\text{g/ml}$ , sa približno 79% i 56% višim vrednostima u odnosu na kontrolu, kao i kod MME pri istoj koncentraciji, gde je signal bio približno 22% viši.

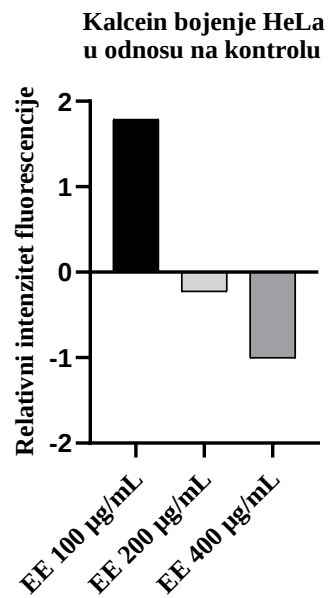
Sa povećanjem koncentracije kod većine tretmana dolazilo je do progresivnog smanjenja relativnog kalcein signala, pri čemu su najizraženije negativne promene registrovane kod MME pri 400  $\mu\text{g/ml}$  (-2,25), sulfuretina pri 400  $\mu\text{M}$  (-2,14), buteina pri 400  $\mu\text{M}$  (-1,75), fisetina pri 400  $\mu\text{M}$  (-1,18), VE pri 400  $\mu\text{g/ml}$  (-1,02) i EE pri 400  $\mu\text{g/ml}$  (-1,00). Nasuprot tome, taksifolin je pri svim ispitivanim koncentracijama zadržao pozitivne vrednosti relativnog signala, iako su one bile niže od kontrolnih. Kod tretmana pri kojima su registrovane negativne vrednosti relativnog signala, vrednosti su prikazane kao negativne promene u odnosu na kontrolu, bez pretvaranja u procenat smanjenja, jer takva transformacija ne bi imala odgovarajuće biološko značenje. Dobijeni rezultati ukazuju na različite obrasce promene kalcein signala između pojedinačnih jedinjenja i ekstrakata, pri čemu izraženije promene pri višim koncentracijama mogu ukazivati na koncentraciono zavisian odgovor 3D sferoida HeLa ćelijske linije.



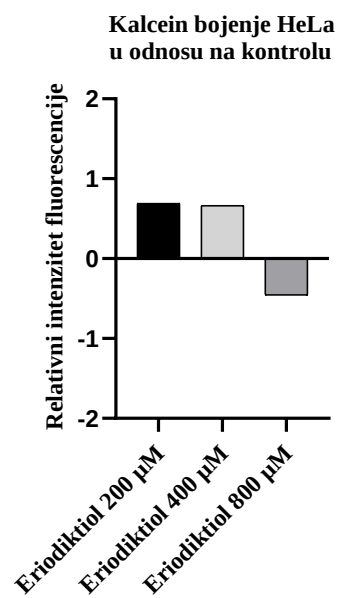
*Slika 4 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman buteinom. Eksperiment je raden u triplikatu.*



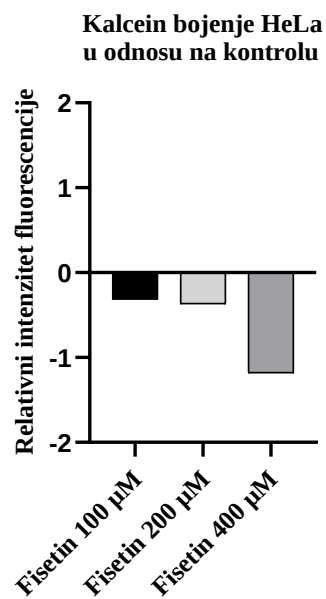
Slika 5 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman butinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.



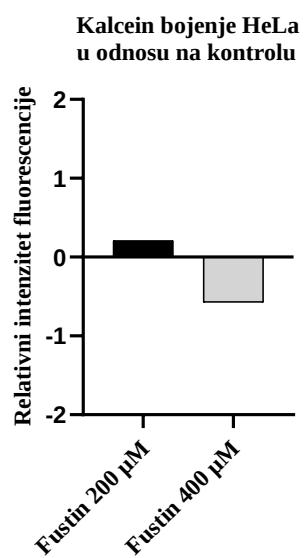
Slika 6 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman EE. Eksperiment je rađen u triplikatu.



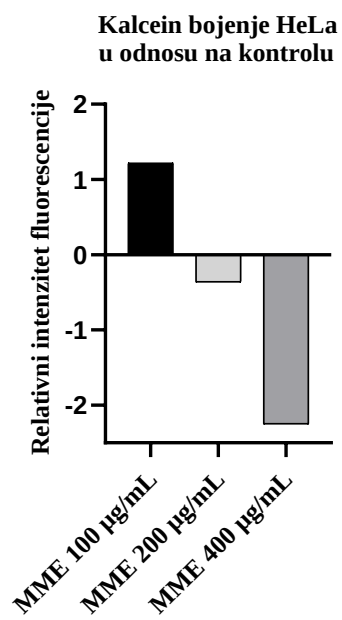
*Slika 7 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman eriodiktiolom. Eksperiment je raden u triplikatu.*



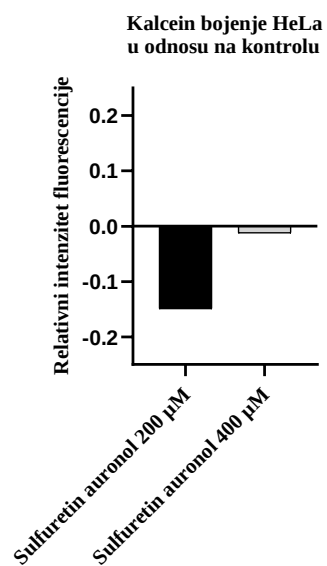
*Slika 8 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman fisetinom. Eksperiment je raden u triplikatu.*



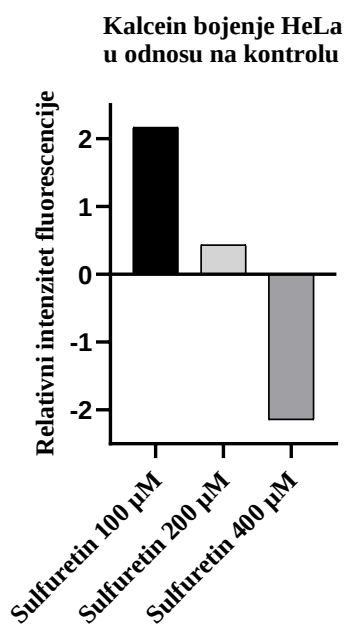
*Slika 9 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman fustinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



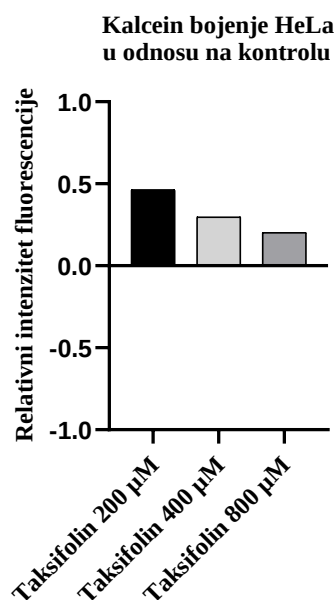
*Slika 10 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman MME. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



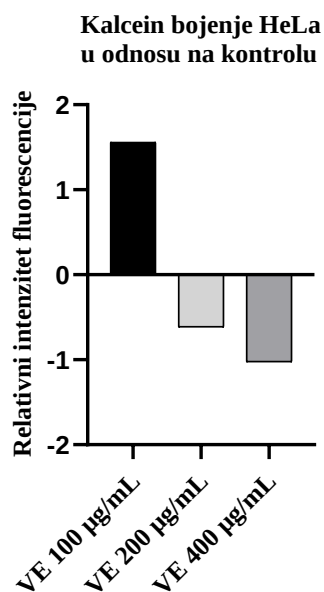
*Slika 11 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman sulfuretin auronolom. Eksperiment je rađen u triplicatu.*



*Slika 12 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman sulfuretinom. Eksperiment je rađen u triplicatu.*



*Slika 13 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman taksifolinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



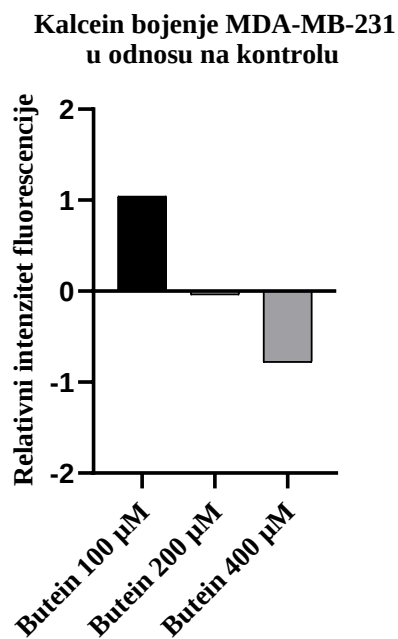
*Slika 14 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji HeLa za tretman VE. Eksperiment je rađen u triplikatu.*

### 3.4.3 Bojenje kalceinom sferoida na ćelijskom modelu MDA-MB-231 ćelija

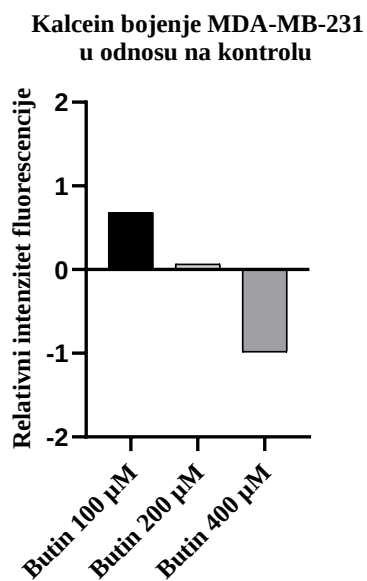
Kalcein bojenje 3D sferoida MDA-MB-231 ćelijske linije (Slike 15-25) pokazalo je različite promene relativnog kalcein signala nakon tretmana različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja i ekstrakata. Rezultati su izraženi u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, čija je vrednost postavljena na 1 (100%). Za ekstrakte MME, EE i VE koncentracije su izražene u µg/ml, dok su koncentracije

pojedinačnih jedinjenja izražene u  $\mu\text{M}$ . Dobijene vrednosti predstavljaju promenu kalcein signala u odnosu na kontrolu i ne predstavljaju direktno određivanje broja ćelija niti omogućavaju samostalnu procenu apsolutne vijabilnosti sferoida. Kod buteina, pri 100  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od 1,04, što odgovara približno 4% višem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila -0,04, odnosno signal je bio blizu nulte vrednosti, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  registrovana vrednost od -0,78, što ukazuje na izraženu negativnu promenu relativnog kalcein signala. Kod butina, pri 100  $\mu\text{M}$  relativni kalcein signal iznosio je 0,68, odnosno bio je za približno 32% niži u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila 0,06, što odgovara približno 94% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,98, uz izraženu negativnu promenu relativnog signala. Kod sulfuretina, pri 100  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila 1,18, odnosno signal je bio za približno 18% viši u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila -0,25, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  registrovana vrednost od -1,17, što ukazuje na izraženu negativnu promenu relativnog kalcein signala pri najvišoj koncentraciji. Fisetin je pri 100  $\mu\text{M}$  pokazao vrednost od 0,63, odnosno približno 37% niži signal u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila -0,16, dok je pri 400  $\mu\text{M}$  iznosila -0,63, uz sve izraženiju negativnu promenu relativnog signala sa povećanjem koncentracije. Kod taksifolina, pri 200  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,79, odnosno bio je za približno 21% niži u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila 0,36, što odgovara približno 64% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Pri 800  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od -0,81, uz izraženu negativnu promenu relativnog signala. Kod fustina, pri 200  $\mu\text{M}$  registrovana je vrednost od 0,37, odnosno signal je bio za približno 63% niži u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila -0,14, što ukazuje na negativnu promenu relativnog kalcein signala. Kod sulfuretin auronola promene su bile manje izražene. Pri 200  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,61, odnosno bio je za približno 39% niži u odnosu na kontrolu. Pri 400  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila 0,02, što odgovara približno 98% nižem signalu u odnosu na kontrolu. Kod eriodiktiola, pri 400  $\mu\text{M}$  relativni signal iznosio je 0,96, odnosno bio je za približno 4% niži u odnosu na kontrolu. Pri 800  $\mu\text{M}$  vrednost je iznosila -0,49, što ukazuje na izraženiju negativnu promenu relativnog kalcein signala pri višoj koncentraciji. Kod ekstrakta MME, pri 100  $\mu\text{g/ml}$  relativni signal iznosio je 0,76, odnosno bio je za približno 24% niži u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{g/ml}$  vrednost je iznosila -0,09, dok je pri 400  $\mu\text{g/ml}$  registrovana vrednost od -1,45, uz najizraženiju negativnu promenu relativnog signala. EE je pri 100  $\mu\text{g/ml}$  pokazao vrednost od 0,82, odnosno približno 18% niži signal u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{g/ml}$  vrednost je iznosila -0,21, dok je pri 400  $\mu\text{g/ml}$  registrovana vrednost od -0,83, uz izraženiju negativnu promenu pri višoj koncentraciji. VE je pri 100  $\mu\text{g/ml}$  pokazao relativni signal od 0,43, odnosno bio je za približno 57% niži u odnosu na kontrolu. Pri 200  $\mu\text{g/ml}$  vrednost je iznosila -0,12, dok je pri 400  $\mu\text{g/ml}$  registrovana vrednost od -0,68, uz izraženiju negativnu promenu relativnog signala.

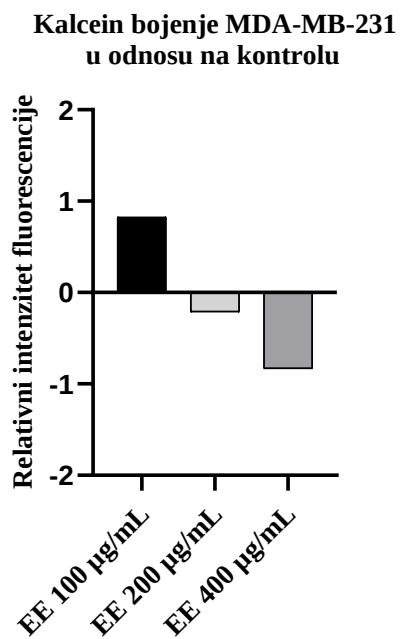
Posmatrano u celini, većina tretmana je pri nižim koncentracijama pokazala relativni kalcein signal niži od kontrolne vrednosti, dok je kod sulfuretina i buteina pri 100  $\mu\text{M}$  signal bio nešto viši od kontrole, za približno 18%, odnosno 4%. Sa povećanjem koncentracije kod većeg broja tretmana uočeno je progresivno smanjenje relativnog signala. Među pozitivnim vrednostima, najveće smanjenje u odnosu na kontrolu registrovano je kod sulfuretin auronola pri 400  $\mu\text{M}$ , gde je signal bio približno 98% niži, zatim kod butina pri 200  $\mu\text{M}$ , sa približno 94% nižim signalom, dok su kod taksifolina pri 400  $\mu\text{M}$  i fustina pri 200  $\mu\text{M}$  zabeležena smanjenja od približno 64%, odnosno 63%. Kod ekstrakata, VE je pri 100  $\mu\text{g/ml}$  pokazao približno 57% niži signal, dok su MME i EE pri istoj koncentraciji pokazali približno 24% i 18% niže vrednosti u odnosu na kontrolu. Kod tretmana pri kojima su registrovane negativne vrednosti relativnog signala, vrednosti su prikazane kao negativne promene u odnosu na kontrolu, bez pretvaranja u procenat smanjenja, jer takva transformacija ne bi imala odgovarajuće biološko značenje. Dobijeni rezultati stoga ukazuju na različite obrasce promene kalcein signala između pojedinačnih jedinjenja i ekstrakata, pri čemu izraženija promena pri višim koncentracijama može ukazivati na koncentraciono zavisnu promenu odgovora ćelija unutar 3D sferoida.



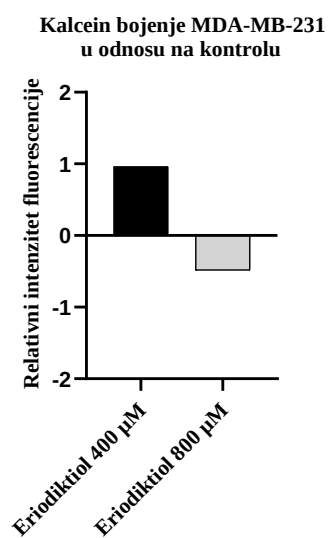
*Slika 15 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman buteinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



*Slika 16 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman butinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*

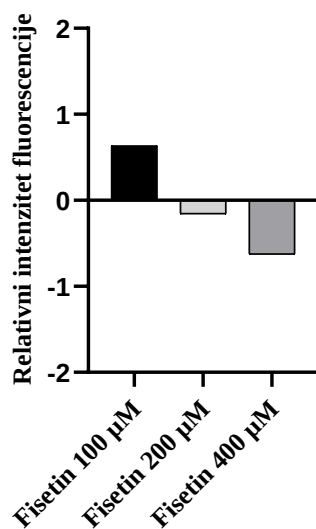


*Slika 17 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman EE. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



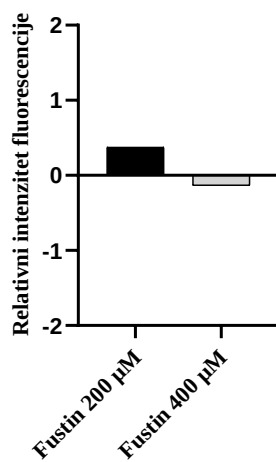
*Slika 18 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman eriodiktiolom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*

Kalcein bojenje MDA-MB-231  
u odnosu na kontrolu

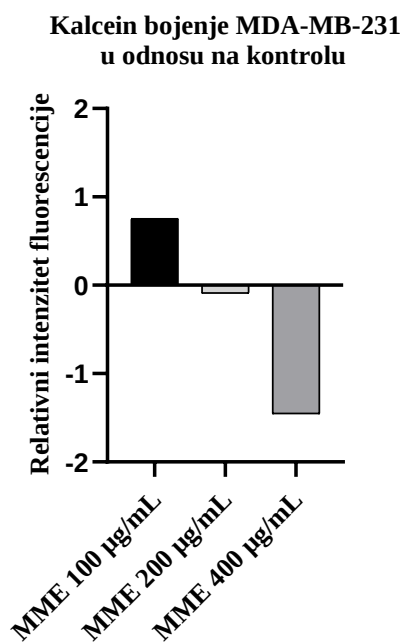


Slika 19 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman fisetinom. Eksperiment je raden u triplikatu.

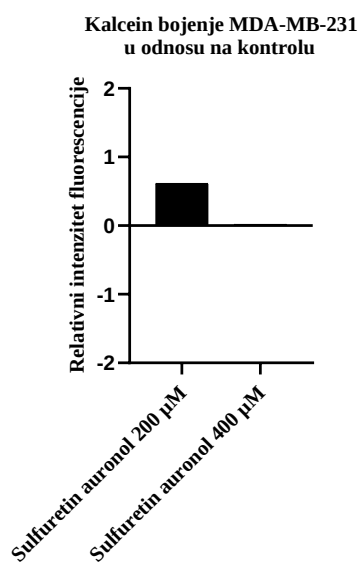
Kalcein bojenje MDA-MB-231  
u odnosu na kontrolu



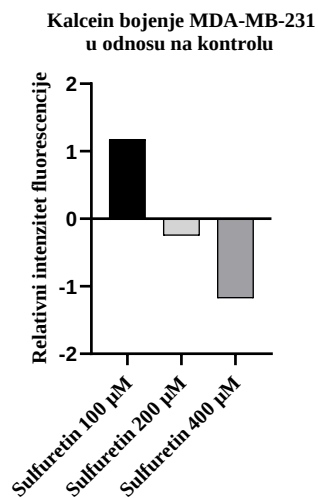
Slika 20 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman fustinom. Eksperiment je raden u triplikatu.



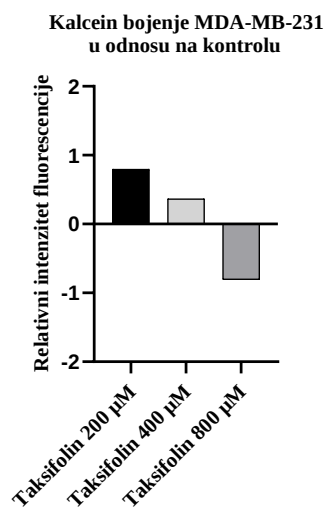
*Slika 21 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman MME. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



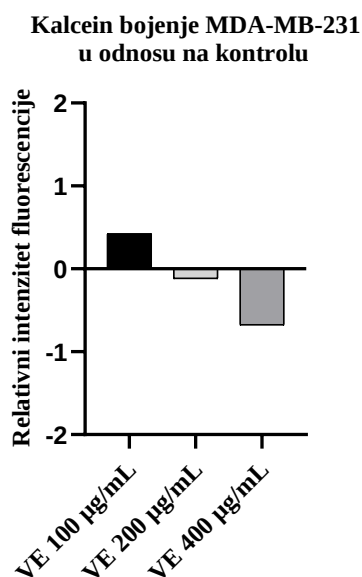
*Slika 22 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman sulfuretin auronolom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



*Slika 23 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman sulfuretinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



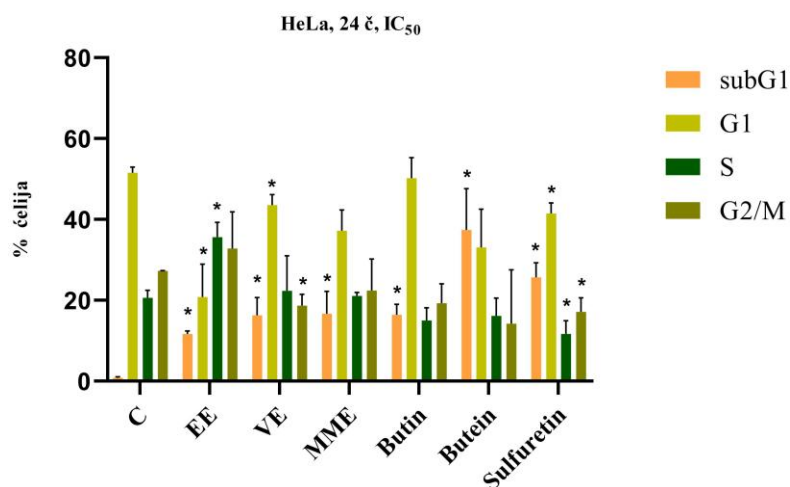
*Slika 24 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman taksifolinom. Eksperiment je rađen u triplikatu.*



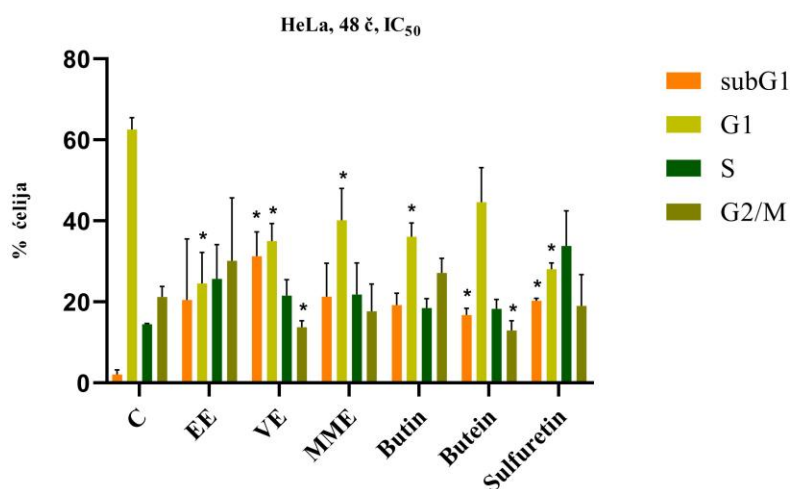
*Slika 25 Kalcein bojenje na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 za tretman VE. Eksperiment je rađen u triplikatu.*

### 3.5 Mehanizmi citotoksičnog dejstva ruja na HeLa ćelijskoj liniji

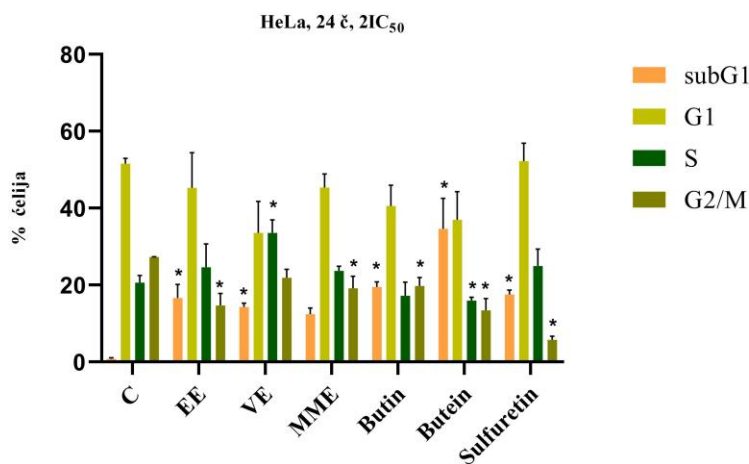
Uticaj ekstrakata i jedinjenja dobijenih iz *C. coggygia* na raspodelu faza ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama, nakon izlaganja koncentracijama  $IC_{50}$  i  $2 \times IC_{50}$  tokom 24 sata i 48 sati, najpre je ispitan (Slike 26-29). Testirani EE, VE, MME, butin, butein i sulfuretin izazvali su povećanje procenta HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, i nakon 24 sata i nakon 48 sati inkubacije, u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Najizraženije povećanje procenta subG1 ćelija nakon 24 sata uočeno je u ćelijama tretiranim buteinom u koncentraciji  $IC_{50}$  (37,40% u poređenju sa 0,84% u kontrolnom uzorku ćelija,  $p < 0,05$ ), a zatim u ćelijama tretiranim buteinom u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$  tokom istog perioda tretmana (34,66% prema 0,84%,  $p < 0,05$ ). Nakon 48 sati tretmana, eksperiment je pokazao da je porast procenta HeLa ćelija u subG1 fazi bio značajan u uzorku ćelija tretiranih VE ekstraktom u koncentraciji  $IC_{50}$  (31,27% u poređenju sa kontrolnim uzorkom, koji je imao 2,1% ćelija u subG1 fazi,  $p < 0,05$ ). MME i EE, primenjeni u koncentraciji  $IC_{50}$ , taj trend su blisko pratili, sa 21,29% i 20,47% ćelija u subG1 fazi nakon tretmana, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno. EE je izazvao značajno povećanje procenta HeLa ćelija u S fazi nakon 24 sata tretmana pri  $IC_{50}$  koncentraciji ( $p < 0,01$ ) i nakon 48 sati tretmana pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji ( $p < 0,05$ ). VE je izazvao značajno zaustavljanje ćelija u S fazi nakon 24 sata tretmana pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji ( $p < 0,05$ ) i nakon 48 sati tretmana pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji ( $p < 0,05$ ). Pored toga, MME i sulfuretin su doveli do povećanja procenta ćelija u S fazi nakon 48 sati inkubacije. Povećanje broja ćelija u S fazi bilo je statistički značajno pri tretmanu sulfuretinom u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$  ( $p < 0,01$ ). Nakon 48 sati tretmana, zabeleženo je povećanje udela HeLa ćelija u G2/M fazi pri izlaganju  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji buteina,  $IC_{50}$  i  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama butina,  $IC_{50}$  koncentraciji EE,  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji MME i  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji VE, u poređenju sa kontrolnim ćelijama; ovo povećanje bilo je statistički značajno u uzorcima ćelija tretiranih butinom u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$  ( $p < 0,05$ ).



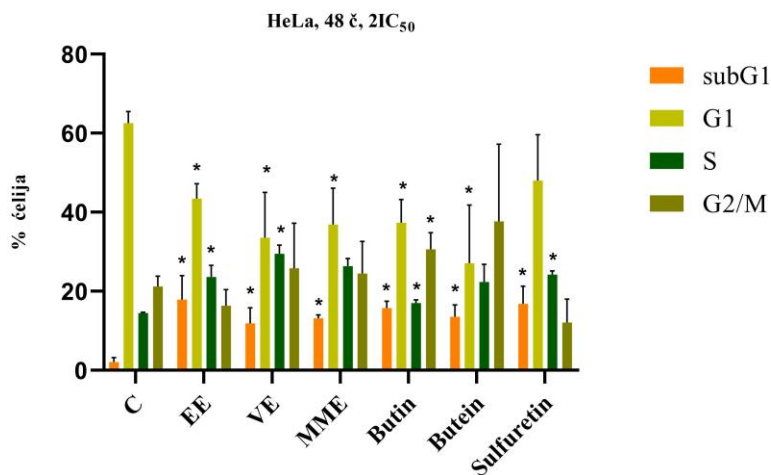
Slika 26 Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 24 h, IC<sub>50</sub> koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.



Slika 27 Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 48 h, IC<sub>50</sub> koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.



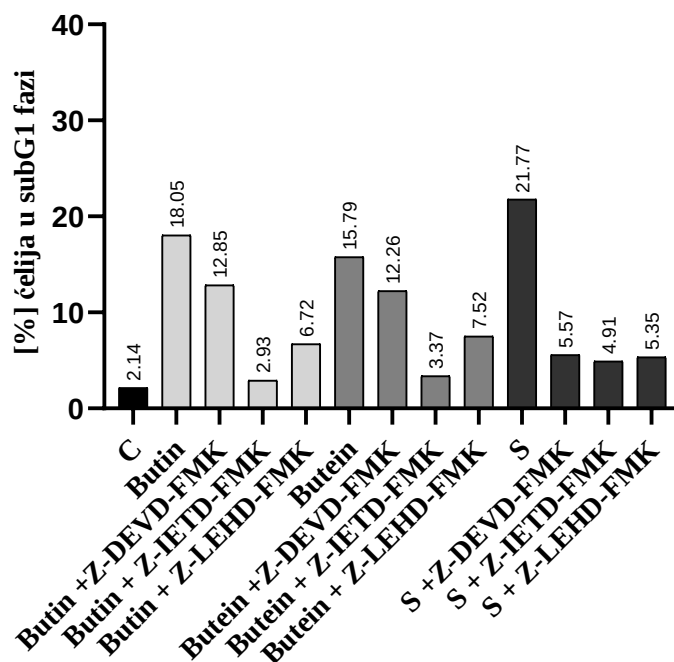
**Slika 28** Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 24 h,  $2 \times IC_{50}$  koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.



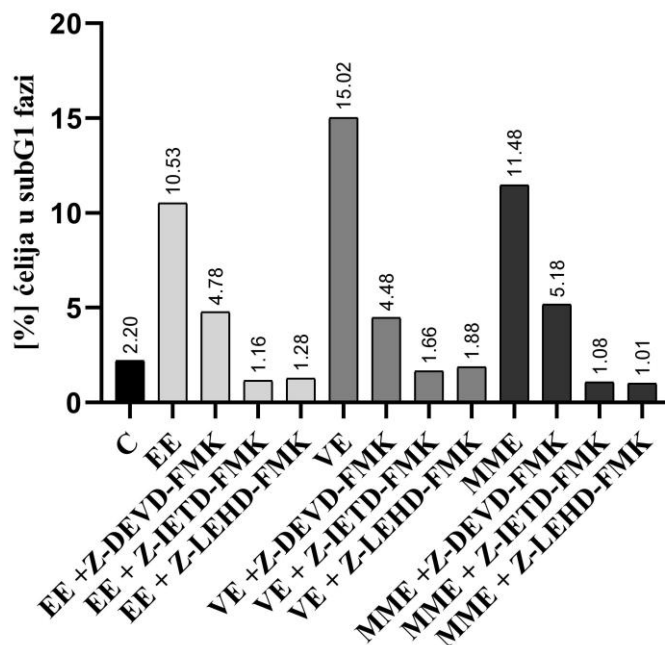
**Slika 29** Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 48 h,  $2 \times IC_{50}$  koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

Prethodna primena inhibitora kaspaze-3 na HeLa ćelije, pre izlaganja  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama EE, VE, MME, butina i sulfuretina, dovela je do smanjenja udela ćelija u subG1 fazi u poređenju sa ćelijama tretiranim samo ekstraktima ili jedinjenjem. Prethodna primena inhibitora kaspaze-3 na HeLa ćelije pre izlaganja  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama buteina dovela je do blagog smanjenja udela ćelija u subG1 fazi u odnosu na ćelije tretirane samo ovim jedinjenjem (12,26% prema 15,79%) (Slike 30-31). Najizraženije smanjenje procenta HeLa ćelija (4,48% prema 15,02%) uočeno je u uzorku tretiranom VE ekstraktom u kombinaciji sa inhibitorom kaspaze-3, u poređenju sa tretmanom samo VE ekstraktom. Primena inhibitora kaspaze-8 pre tretmana  $2 \times IC_{50}$  koncentracijom svakog od jedinjenja (butin, butein, sulfuretin) i svakog od ekstrakata (EE, MME, VE) dovela je do značajnog smanjenja procenta HeLa ćelija u subG1 fazi u poređenju sa ćelijama tretiranim samo odgovarajućim ekstraktom ili jedinjenjem. Najizraženiji pad procenta HeLa ćelija uočeno je u uzorcima tretiranim MME, EE i VE ekstraktima (1,08% prema 11,48%, 1,16% prema 10,53% i 1,66% prema 15,02%, redom) u kombinaciji sa

inhibitorom kaspaze-8, u odnosu na tretman samo odgovarajućim ekstraktom. U uzorku HeLa ćelija takođe je zabeleženo smanjenje procenta ćelija u subG1 fazi nakon predtretmana inhibitorom kaspaze-9 pre izlaganja svakom ekstraktu i jedinjenju, u poređenju sa ćelijama tretiranim samo odgovarajućim ekstraktom ili jedinjenjem. Najizraženije smanjenje uočeno je u ćelijama tretiranim inhibitorom kaspaze-9 zajedno sa MME, EE i VE ekstraktima (1,01% prema 11,48%, 1,28% prema 10,53% i 1,88% prema 15,02%). Ovi nalazi ukazuju da ekstrakti i jedinjenja dobijeni iz *C. coggygia* mogu pokrenuti apoptotsku ćelijsku smrt u HeLa ćelijama putem kaspaze-3, kaspaze-8 i kaspaze-9.

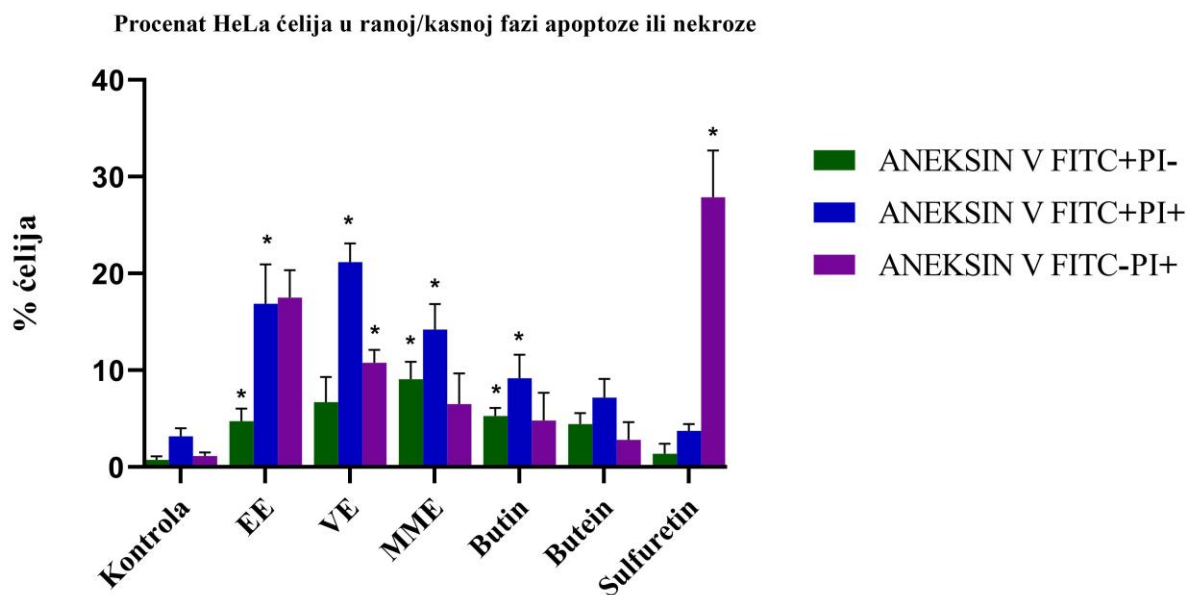


**Slika 30** Određivanje uticaja specifičnih inhibitora kaspaza, uključujući Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9), na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja sa  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama odgovarajućih jedinjenja izolovanih iz *C. coggygia*. Prikazan je reprezentativni eksperiment.



**Slika 31** *Određivanje uticaja specifičnih inhibitora kaspaza, uključujući Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9), na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja sa  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama odgovarajućih ekstrakata izolovanih iz *C. coggyria*. Prikazan je reprezentativni eksperiment.*

Izlaganje HeLa ćelija  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama sva tri ekstrakta, kao i butinu, buteinu i sulfuretinu, dovelo je do povećanja procenta rano i kasno apoptotskih ćelija u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 32). Posebno je tretman VE ekstraktom doveo do povećanja broja apoptotskih ćelija (27,90% u poređenju sa 3,91% u kontrolnoj grupi), uz značajno povećanje procenta ćelija u kasnoj fazi apoptoze ( $p < 0,01$ ). Slično tome, tretman MME ekstraktom izazvao je značajno povećanje udela rano i kasno apoptotskih HeLa ćelija (23,30% u poređenju sa 3,91% u kontroli), uz značajno povećan procenat ćelija u ranoj fazi apoptoze (9,09%,  $p < 0,05$ ) i kasnoj fazi apoptoze (14,21%,  $p < 0,05$ ). Ćelije izložene EE ekstraktu pokazale su povećanje broja mrtvih ćelija obojenih PI i neobojenih aneksin V-FITC-om (17,50% u poređenju sa 1,16% u kontroli), kao i povećanje broja ćelija koje prolaze kroz apoptozu, uz značajan udeo i u ranoj ( $p < 0,05$ ) i u kasnoj fazi ( $p < 0,05$ ) (21,63% u poređenju sa 3,91% u kontroli). Pored toga, tretman sulfuretinom značajno je povećao ( $p < 0,01$ ) udeo mrtvih ćelija obojenih samo PI (27,88% u poređenju sa 1,16% u kontroli). Butin je pokazao nešto jači efekat u odnosu na butein. Butin je značajno povećao procenat HeLa ćelija koje prolaze kroz apoptozu sa 3,91% u kontrolnoj grupi na 14,47% ( $p < 0,01$  za rano apoptotske ćelije i  $p < 0,05$  za kasno apoptotske ćelije), dok je butein povećao ovaj procenat sa 3,91% na 11,63%, ali to povećanje nije bilo statistički značajno u poređenju sa kontrolom.



**Slika 32** Procentat HeLa ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi ili nekrozi određen je dvostrukim bojenjem aneksin V-FITC-om i propidijum-jodidom nakon 24-časovnog tretmana sa odgovarajućim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygria*. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

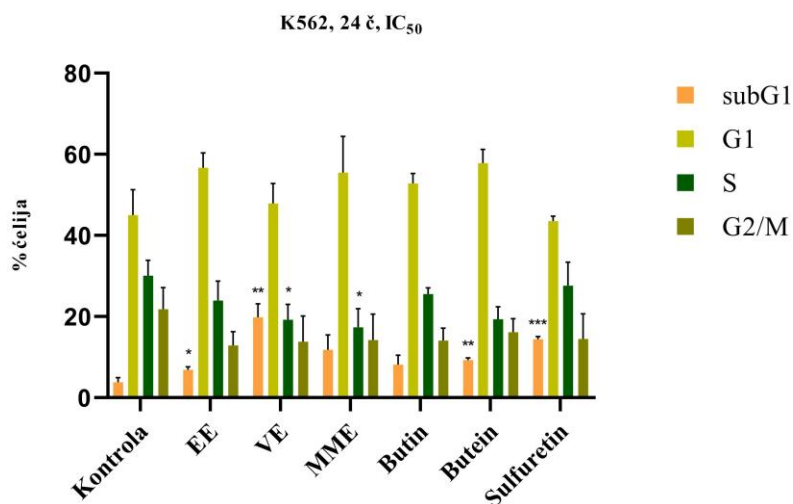
### 3.6 Mehanizmi citotoksičnog dejstva ruja na K562 ćelijskoj liniji

Uticaj ekstrakata i jedinjenja dobijenih iz *C. coggygria* na raspodelu faza ćelijskog ciklusa u K562 ćelijama, nakon izlaganja koncentracijama  $IC_{50}$  i  $2 \times IC_{50}$  tokom 24 sata i 48 sati, najpre je ispitan (Slike 33-36). Testirani EE, VE, MME, butin, butein i sulfuretin izazvali su povećanje procenta K562 ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji pri višoj koncentraciji i/ili dužem vremenu inkubacije. Nakon 24 sata tretmana pri  $IC_{50}$  koncentraciji, najizraženije povećanje procenta ćelija u subG1 fazi uočeno je u uzorcima tretiranim VE ekstraktom, zatim sulfuretinom, MME ekstraktom i buteinom, u poređenju sa kontrolnim ćelijama. VE je doveo do povećanja procenta K562 ćelija u subG1 fazi na približno 20% u odnosu na oko 3-4% u kontrolnom uzorku, a ovo povećanje bilo je statistički značajno. Sličan trend uočen je i nakon tretmana sulfuretinom, gde je procenat subG1 ćelija bio povećan na približno 14%, dok su MME i butein takođe povećali udeo ćelija u ovoj fazi, ali u manjem obimu.

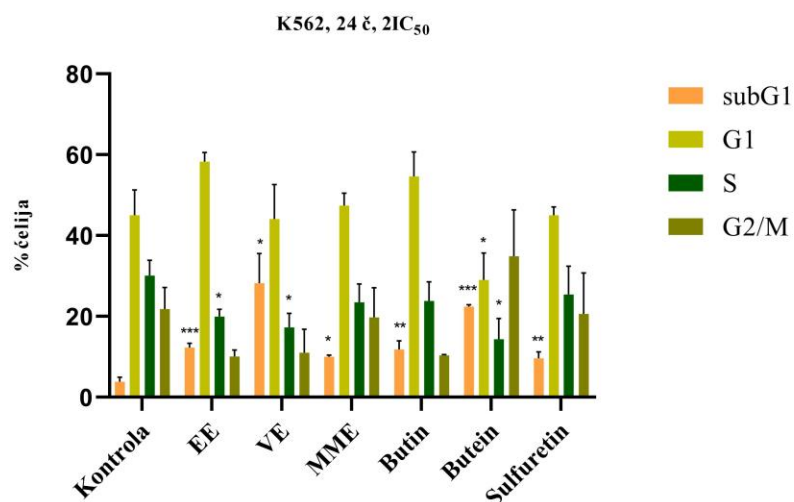
Pri izlaganju K562 ćelija  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama tokom 24 sata, povećanje subG1 populacije bilo je izraženije. Najveći porast uočen je nakon tretmana VE ekstraktom, gde je procenat ćelija u subG1 fazi dostigao približno 28%, u poređenju sa kontrolnim uzorkom koji je imao oko 4% ćelija u subG1 fazi. Butein je takođe izazvao izraženo povećanje subG1 populacije, na približno 22%, dok su EE, MME, butin i sulfuretin doveli do umerenijeg, ali statistički značajnog povećanja procenta ćelija u ovoj fazi. Ovi rezultati ukazuju da su K562 ćelije posebno osetljive na tretman VE ekstraktom i buteinom pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji tokom 24 sata.

Nakon 48 sati tretmana, porast procenta K562 ćelija u subG1 fazi ostao je izražen, posebno pri izlaganju  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama. Najizraženije povećanje zabeleženo je u ćelijama tretiranim VE ekstraktom u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$ , gde je subG1 populacija dostigla približno 42%, u poređenju sa oko 5% u kontrolnom uzorku. Butein je takođe doveo do izraženog povećanja procenta ćelija u subG1 fazi, na približno 28%, dok su MME i EE izazvali povećanje na oko 20% i 16%, redom. Pri  $IC_{50}$  koncentraciji nakon 48 sati, VE je takođe pokazao najizraženiji efekat na povećanje subG1 populacije, dok su MME, EE i butein doveli do umerenog povećanja procenta ćelija u ovoj fazi.

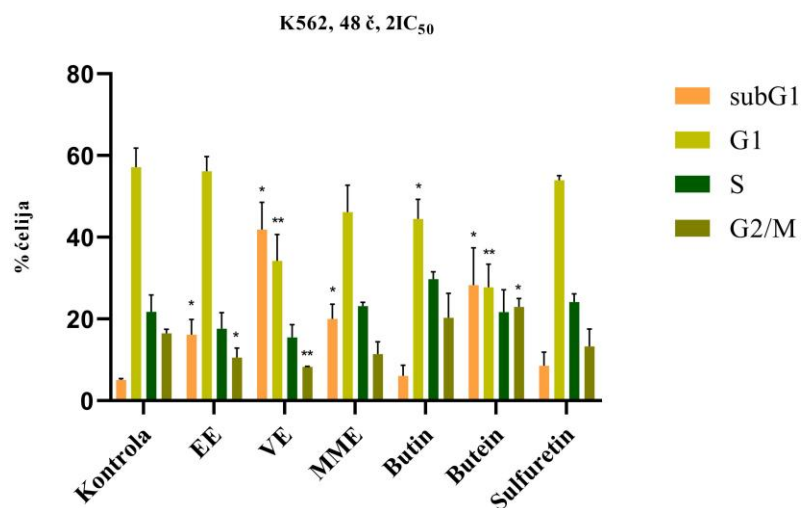
Pored promene u subG1 fazi, tretmani su uticali i na raspodelu K562 ćelija kroz ostale faze ćelijskog ciklusa. Nakon 24 sata tretmana, uočeno je smanjenje procenta ćelija u S fazi kod uzoraka tretiranih VE i MME ekstraktima, posebno pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji. Butein pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji takođe je doveo do smanjenja procenta ćelija u S fazi, uz istovremeno povećanje udela ćelija u G2/M fazi. Nakon 48 sati tretmana, butin je doveo do povećanja procenta ćelija u S fazi, naročito pri  $IC_{50}$  koncentraciji, dok je butein pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji smanjio udeo ćelija u G1 fazi i povećao zastupljenost subG1 i G2/M populacije. VE ekstrakt pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji nakon 48 sati izazvao je izrazito povećanje subG1 populacije, uz smanjenje procenta ćelija u G1, S i G2/M fazama, što ukazuje na izražen citotoksični efekat ovog ekstrakta u K562 ćelijama.



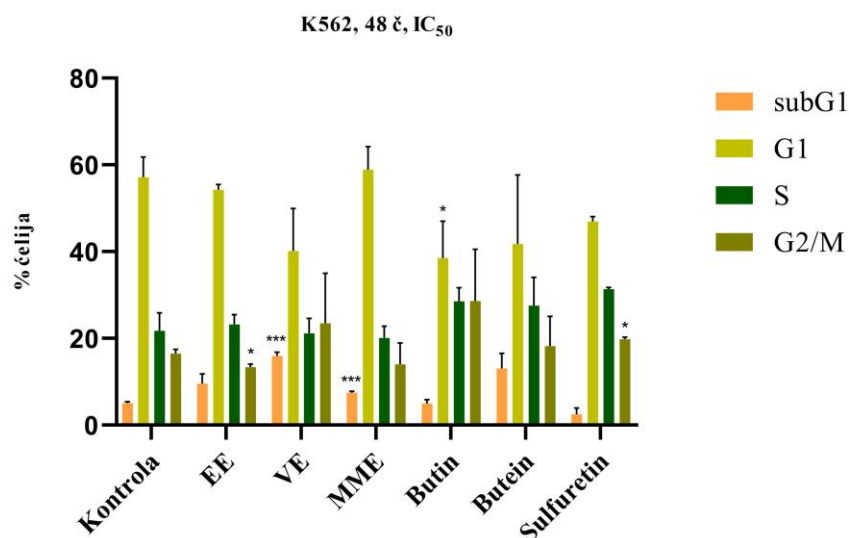
**Slika 33** Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u K562 ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 24 h,  $IC_{50}$  koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.



**Slika 34** Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u K562 ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 24 h, 2×IC<sub>50</sub> koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

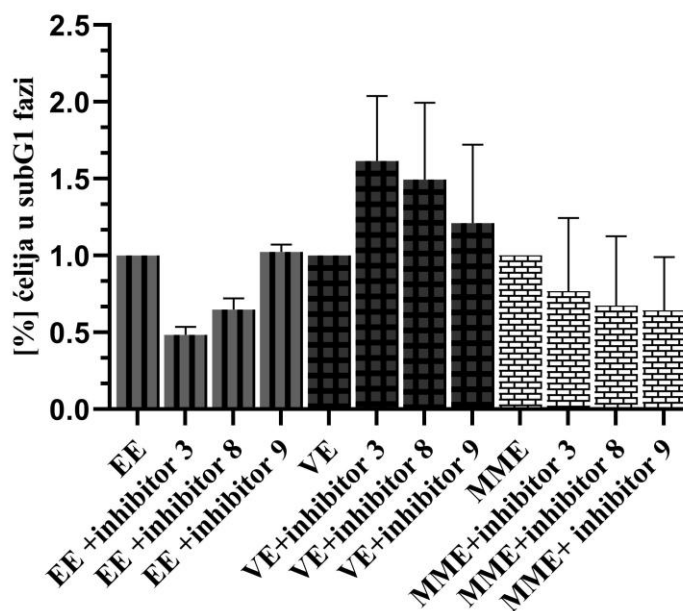


**Slika 35** Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u K562 ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 48 h, 2×IC<sub>50</sub> koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

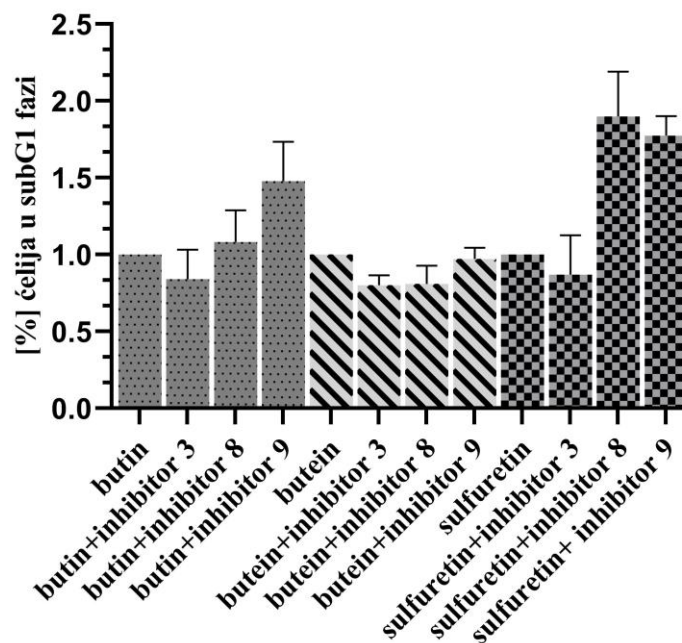


**Slika 36** Promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa u K562 ćelijama tretiranim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*, ispitane posle 48 h, IC<sub>50</sub> koncentracije. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

Prethodna primena inhibitora kaspaze-3, kaspaze-8 i kaspaze-9 na K562 ćelije, pre izlaganja 2×IC<sub>50</sub> koncentracijama jedinjenja i ekstrakata, pokazala je da samo MME ekstrakt dobijen iz srži drveta vrste *C. coggygia* može indukovati apoptozu u K562 ćelijama aktivacijom kaspaza-3, -8 i -9, dok je EE ekstrakt indukovao apoptozu putem aktivacije kaspaza-3 i -8, kao što je prikazano na Slikama 37 i 38.

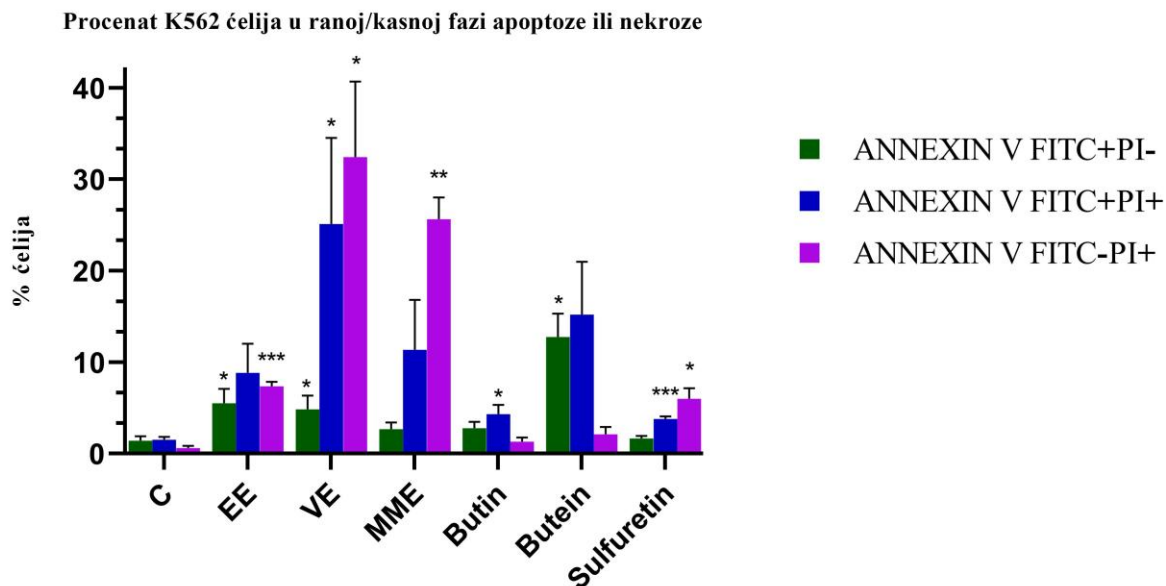


**Slika 37** Određivanje uticaja specifičnih inhibitora kaspaza, uključujući Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9), na procenat K562 ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja sa 2×IC<sub>50</sub> koncentracijama odgovarajućih jedinjenja izolovanih iz *C. coggygia*. Prikazana su dva reprezentativna eksperimenta.



**Slika 38** *Određivanje uticaja specifičnih inhibitora kaspaza, uključujući Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9), na procenat K562 ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja sa  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama odgovarajućih ekstrakata dobijenih iz *C. coggygia*. Prikazana su dva reprezentativna eksperimenta.*

Izlaganje K562 ćelija  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama ekstrakata EE, VE i MME, kao i butinu, buteinu i sulfuretinu, dovelo je do povećanja procenta rano i kasno apoptotskih ćelija i/ili nekrotičnih ćelija u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 39). Najizraženiji efekat uočen je nakon tretmana VE ekstraktom, koji je doveo do izrazitog povećanja ukupnog procenta ćelija koje prolaze kroz apoptozu, uz posebno izraženo povećanje kasno apoptotske populacije i populacije mrtvih/nekrotičnih ćelija. Ukupan procenat apoptotskih ćelija nakon tretmana VE ekstraktom bio je približno 30%, u poređenju sa oko 2-3% u kontrolnoj grupi, dok je procenat mrtvih/nekrotičnih ćelija, koje su bile obojene samo propidijum-jodidom, bio dodatno povećan na približno 32%. MME ekstrakt je takođe izazvao izražen efekat, sa povećanjem kasno apoptotskih ćelija na oko 11% i mrtvih/nekrotičnih ćelija na oko 25%, pri čemu je povećanje nekrotične populacije bilo statistički značajno. EE ekstrakt je doveo do povećanja ranih i kasnih apoptotskih ćelija, kao i mrtvih/nekrotičnih ćelija, u odnosu na kontrolni uzorak. Od pojedinačnih jedinjenja, butein je pokazao najizraženiji efekat na indukciju apoptoze u K562 ćelijama. Tretman buteinom povećao je procenat rano apoptotskih ćelija na približno 13% i kasno apoptotskih ćelija na oko 15%, u poređenju sa kontrolnim ćelijama, dok je procenat mrtvih/nekrotičnih ćelija ostao znatno niži. Butin je izazvao umereniji efekat, sa blagim povećanjem kasno apoptotske populacije, dok je sulfuretin doveo do povećanja procenta kasno apoptotskih i mrtvih/nekrotičnih ćelija, ali slabije u odnosu na VE i MME ekstrakte. Ovi rezultati ukazuju da tretirani ekstrakti i jedinjenja dobijeni iz *C. coggygia* mogu indukovati apoptotsku, regulisanu smrt K562 ćelija, pri čemu VE i MME ekstrakti pokazuju najizraženiji efekat, dok se od izolovanih jedinjenja butein izdvaja kao najaktivniji u indukciji apoptotskog odgovora.

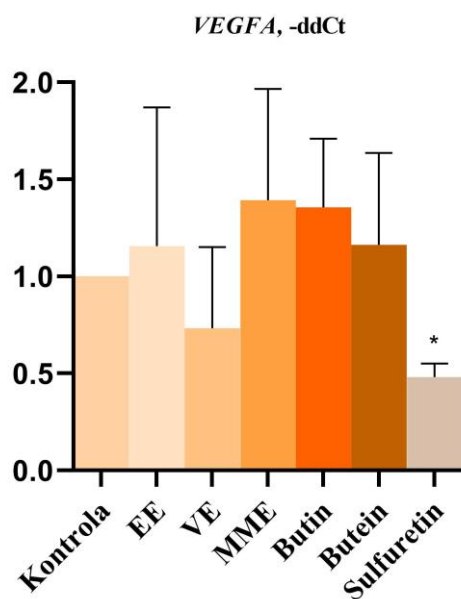


Slika 39 Procent K562 ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi ili nekrozi određen je dvostrukim bojenjem aneksin V-FITC-om i propidijum-jodidom nakon 24-časovnog tretmana sa odgovarajućim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

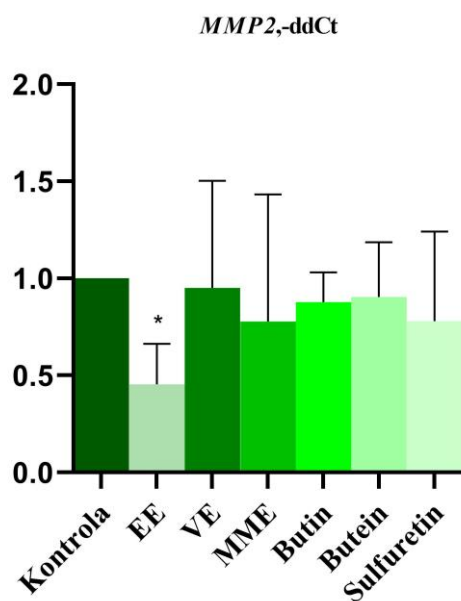
### 3.7 In vitro antiinvazivno dejstvo ruja

#### 3.7.1 Efekti na nivou genske ekspresije

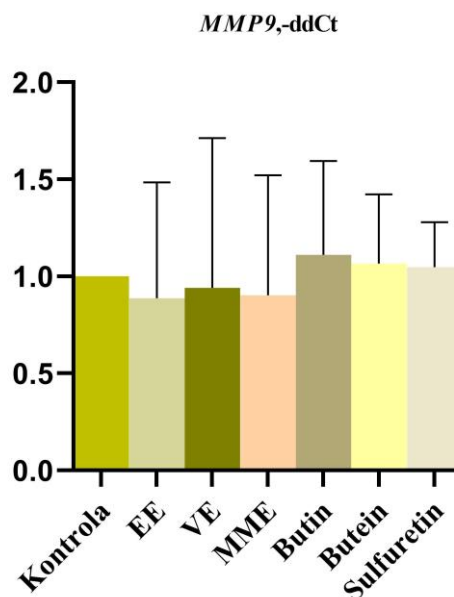
Cilj ovog dela istraživanja bio je da se ispituju efekti ekstrakata i jedinjenja vrste *C. coggygia* na nivoe ekspresije gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u HeLa ćelijama nakon 24 sata. Rezultati su pokazali da su nivoi *MMP2* bili smanjeni u HeLa ćelijama tretiranim svim ispitivanim jedinjenjima i ekstraktima, u poređenju sa kontrolnim ćelijama, pri čemu je značajno smanjenje zabeleženo nakon tretmana EE ( $p < 0,05$ ) (Slike 40-42). Nivoi ekspresije gena *MMP2* bili su samo blago smanjeni u HeLa ćelijama tretiranim VE, butinom i buteinom. Pored toga, tretman EE, MME i VE doveo je do sniženja nivoa ekspresije *MMP9* neznatno ispod vrednosti u kontrolnom uzorku u HeLa ćelijama. Međutim, tretman svim ispitivanim jedinjenjima doveo je do viših nivoa *MMP9* u odnosu na netretirane kontrolne ćelije. Nadalje, nakon tretmana VE i sulfuretinom, nivoi *VEGFA* bili su niži nego u kontroli. Nivoi ekspresije *VEGFA* bili su značajno smanjeni nakon tretmana sulfuretinom, pri čemu je vrednost  $p < 0,01$ .



*Slika 40 Nivoi VEGFA u HeLa ćelijama nakon tretmana ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz C. coggygia predstavljeni su RQ vrednostima. Uzorak u svakom nezavisnom eksperimentu je korišćen kao uzorak kalibratora (RQ uzorka kalibratora=1). P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.*



*Slika 41 Nivoi MMP2 u HeLa ćelijama nakon tretmana ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz C. coggygia predstavljeni su RQ vrednostima. Uzorak u svakom nezavisnom eksperimentu je korišćen kao uzorak kalibratora (RQ uzorka kalibratora=1). P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.*



*Slika 42 Nivoi MMP9 u HeLa ćelijama nakon tretmana ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz C. coggygria predstavljani su RQ vrednostima. Uzorak u svakom nezavisnom eksperimentu je korišćen kao uzorak kalibratora (RQ uzorka kalibratora=1). P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.*

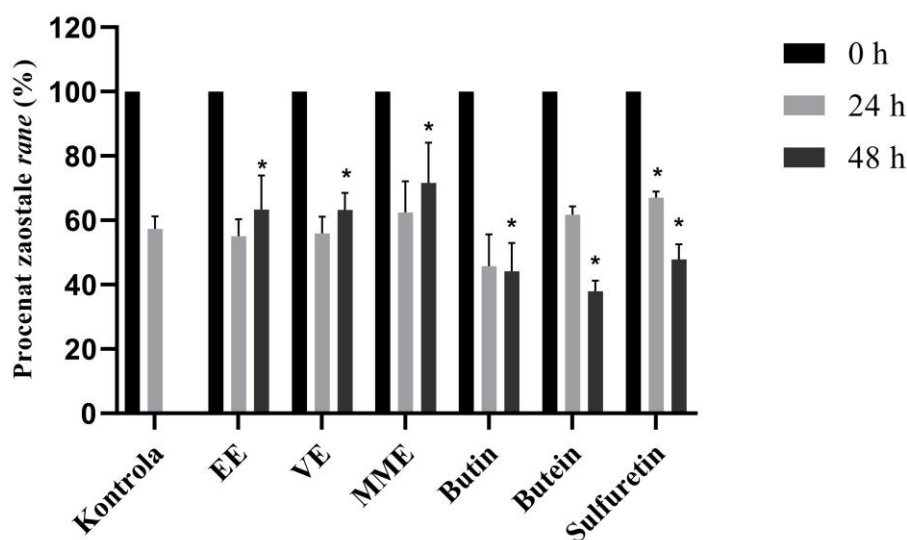
### 3.7.2 Efekti na nivou migracije HeLa ćelijske linije

MME ( $p < 0,05$ ), EE ( $p < 0,01$ ), VE ( $p < 0,01$ ), butin ( $p < 0,05$ ), butein ( $p < 0,01$ ) i sulfuretin ( $p < 0,01$ ) ispoljili su značajne antimigratorne efekte na HeLa ćelije nakon 48 sati inkubacije, kao što je prikazano na Slici 43. U kontrolnom uzorku HeLa ćelija došlo je do potpunog zatvaranja rane nakon 48 sati, što ukazuje na izraženu migratornu sposobnost netretiranih kontrolnih ćelija u uslovima ovog eksperimenta. Nasuprot tome, u uzorcima tretiranim ekstraktima i izolovanim jedinjenjima došlo je do zadržavanja značajno veće površine rane, što ukazuje na smanjenje migracije HeLa ćelija pod dejstvom ispitivanih tretmana.

Nakon 24 sata inkubacije, preostala površina rane u kontrolnom uzorku iznosila je 57,32%. Najizraženiji efekat u ovom vremenskom periodu pokazao je sulfuretin, kod koga je preostala površina rane iznosila 67,06%, zatim MME sa 62,49% i butein sa 61,75%. EE i VE su pokazali sličan efekat nakon 24 sata, sa vrednostima od 55,08% i 55,99%, dok je kod butina preostala površina rane iznosila 45,78%. Međutim, razlike između tretiranih i kontrolnih ćelija bile su izraženije nakon 48 sati inkubacije, kada je u kontrolnom uzorku došlo do potpunog zatvaranja rane.

Među ekstraktima, MME je pokazao najizraženiji inhibitorski efekat na migraciju HeLa ćelija nakon 48 sati izlaganja, pri čemu je preostala površina rane iznosila 71,64%. EE i VE su ispoljili veoma sličan antimigratorski efekat, sa preostalom površinom rane od 63,31% i 63,21%, redom. Ovi rezultati ukazuju da su sva tri ekstrakta značajno inhibirala migraciju HeLa ćelija, ali da je MME pokazao najjači efekat u odnosu na EE i VE.

Od izolovanih jedinjenja, sulfuretin i butin ispoljili su sličan supresivni efekat nakon 48 sati inkubacije, sa vrednostima preostale površine rane od 47,88% i 44,19%. Butein je pokazao donekle slabiji efekat u odnosu na butin i sulfuretin, pri čemu je preostala površina rane iznosila 37,91%. Iako je ovaj efekat bio slabiji u poređenju sa ekstraktima, posebno sa MME, rezultati pokazuju da su i pojedinačna jedinjenja značajno smanjila migraciju HeLa ćelija u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Ukupno posmatrano, dobijeni rezultati ukazuju da ekstrakti i jedinjenja izolovani iz *C. coggygia* mogu značajno inhibirati migraciju HeLa ćelija, pri čemu se MME izdvaja kao najefikasniji tretman u ovom eksperimentalnom modelu.

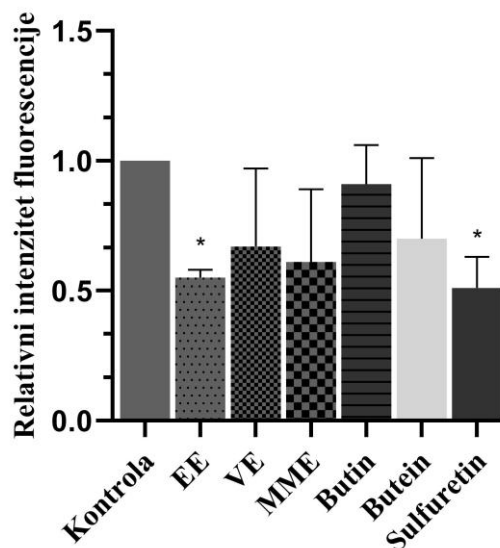


**Slika 43** Efekat ekstrakata i jedinjenja izolovanih iz *C. coggygia* na migraciju HeLa ćelija nakon 24 h i 48 h tretmana. *P* vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

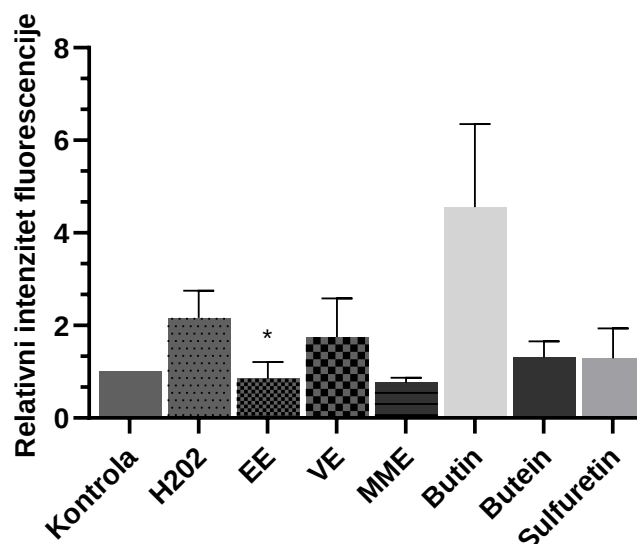
### 3.8 Antioksidativni efekat ruja

U cilju ispitivanja potencijalnih antioksidativnih svojstava, analizirani su efekti EE, MME i VE ekstrakata, kao i butina, buteina i sulfuretina, na koncentraciju intraćelijskih ROS u normalnim fibroblastima MRC-5 nakon 24 sata tretmana. Kao što je prikazano na Slici 44, smanjenje intraćelijskog nivoa ROS zabeleženo je u MRC-5 ćelijama tretiranim svim ekstraktima, buteinom i sulfuretinom nakon 24 sata inkubacije, u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama. Statistički značajno smanjenje nivoa intraćelijskih ROS ( $p < 0,01$ ) uočeno je u MRC-5 ćelijama tretiranim EE ekstraktom. Tretman MRC-5 ćelija sulfuretinom doveo je do značajnog smanjenja koncentracije intraćelijskih ROS za 50% u odnosu na kontrolne ćelije ( $p < 0,05$ ). Slično tome, izraženo smanjenje nivoa intraćelijskih ROS zabeleženo je i nakon inkubacije MRC-5 ćelija sa MME i VE ekstraktima, pri čemu je redukcija iznosila 39%, odnosno 33%. Tretman MRC-5 ćelija buteinom doveo je do smanjenja nivoa ROS za 30% u poređenju sa kontrolom. Nasuprot tome, tretman butinom pokazao je najmanji efekat na smanjenje koncentracije ROS, sa redukcijom od svega 9%. Radi ispitivanja *in vitro* antioksidativnih i citoprotektivnih efekata analiziranih ekstrakata i jedinjenja, sprovedeni su eksperimenti u kojima je vodonik-peroksid korišćen za indukciju povećanja intraćelijskog nivoa ROS.

Kratkotrajno izlaganje kontrolnih MRC-5 ćelija vodonik-peroksidu dovelo je do stvaranja ROS, pri čemu je nivo ROS bio 2,16 puta viši u odnosu na ćelije koje nisu bile izložene vodonik-peroksidu (Slika 45). U MRC-5 ćelijama prethodno tretiranim MME ekstraktom, a zatim izloženim vodonik-peroksidu, nivo intraćelijskih ROS bio je 2,81 puta niži u poređenju sa netretiranim ćelijama izloženim vodonik-peroksidu, što predstavlja najizraženije zabeleženo smanjenje nivoa ROS u ovom eksperimentalnom setu. Međutim, statistički značajno smanjenje nivoa ROS indukovanih vodonik-peroksidom postignuto je samo nakon tretmana EE ekstraktom ( $p < 0,05$ ) od svih ispitivanih ekstrakata. Koncentracija intraćelijskih ROS smanjena je 2,81 puta, 2,54 puta, 1,67 puta, 1,64 puta i 1,23 puta nakon tretmana MME, EE, sulfuretinom, buteinom i VE ekstraktom, navedenim redom. Nasuprot tome, tretman butinom doveo je do povećanja nivoa intraćelijskih ROS za 2,11 puta u odnosu na kontrolne ćelije tretirane isključivo vodonik-peroksidom. Sposobnost EE, MME i VE ekstrakata, kao i buteina i sulfuretina, da smanje nivo oksidativnog stresa u MRC-5 ćelijama nakon tretmana vodonik-peroksidom ukazuje na njihova izražena antioksidativna svojstva.



**Slika 44** Efekti 24-časovnog tretmana ekstraktima i jedinjenjima *C. coggygia* na nivo intraćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u MRC-5 ćelijama. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.



**Slika 45** Efekti ekstrakata i jedinjenja *C. coggygia* na nivoe intraćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) izazvanih vodonik-peroksidom u MRC-5 ćelijama. *P* vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

### 3.9 Provera kvaliteta analize iRNK-seq eksperimenata

Da bi se ispitali efekti ispitivanih supstanci na transkripcioni profil K562 ćelija, sproveden je eksperiment sekvenciranja informacione RNK (iRNK-seq). Principalna analiza komponenti varijanse (engl. Principal Variance Component Analysis, PVCA) korišćena je za procenu u kojoj meri ukupnu strukturisanu varijabilnost u iRNK-seq podacima određuju tehnički, a u kojoj meri biološki faktori. Na voom-normalizovanim podacima, razlike između eksperimenata (engl. batch-to-batch varijacije) predstavljale su dominantan izvor varijanse i činile su 51,9% ukupne varijabilnosti. Nasuprot tome, kontrast između netretiranih kontrola i svih tretiranih uzoraka zajedno objašnjavao je 14,9% varijanse. Pojedinačni tretmani imali su manje, specifične doprinose ukupnoj varijabilnosti: sulfuretin 7,6%, butein 4,2% i butin 2,8%, dok je preostalih 18,6% varijanse predstavljalo rezidualnu varijabilnost, odnosno šum (Prilog 1, A). Kako bi se detaljnije ispitalo na koji način tehnički efekti između eksperimenata i biološki efekti tretmana doprinose uočenoj strukturi podataka, sprovedene su nesupervizovane eksplorativne analize korišćenjem PCA (analiza glavnih komponenti, engl. Principal Component Analysis) i t-SNE (engl. t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) metoda, pre i nakon korekcije *batch* efekta. Pre korekcije *batch* efekta, i PCA i t-SNE analiza pokazale su izraženo grupisanje uzoraka koje je bilo prvenstveno određeno eksperimentalnim *batch*-om, pri čemu su se uzorci grupisali prema eksperimentu, ne prema primenjenom tretmanu (Prilog 3). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima PVCA analize, koja je pokazala da *batch* predstavlja dominantan izvor varijabilnosti u podacima.

Nakon uklanjanja varijanse povezane sa *batch* efektom primenom funkcije *removeBatchEffect*, PCA više nije pokazivala grupisanje uzoraka koje bi bilo povezano sa eksperimentalnim *batch*-om (Prilog 4, A). Umesto toga, kontrolni uzorci formirali su jasno izdvojenu grupu, dok se tretirani uzorci nisu razdvajali duž prve i druge glavne komponente (PC1 i PC2), što ukazuje da efekti pojedinačnih tretmana ne predstavljaju dominantan izvor globalne varijabilnosti. Pored toga, t-SNE analiza *batch*-

korigovanih podataka pokazala je prisustvo lokalnih grupa uzoraka povezanih sa tretmanom, nezavisno od pripadnosti eksperimentalnom *batch*-u (Prilog 4, B). Ovi rezultati ukazuju da biološka struktura povezana sa tretmanom, koja je prethodno bila maskirana dominantnim *batch* efektom, postaje uočljiva nakon uklanjanja varijanse povezane sa *batch*-om.

Nakon uklanjanja *batch* efekta, isključivo u svrhu vizuelizacije, grupisanje netretiranih i tretiranih uzoraka objašnjavalo je 21,1% varijanse, dok su pojedinačni tretmani doprinosili ukupnoj varijabilnosti sa 17,4% za sulfuretin, 9,7% za butin i 6,2% za butein. Preostalih 45,5% varijanse predstavljalo je rezidualnu varijabilnost (Prilog 1, B). Korekcija *batch* efekta je, dakle, uspešno uklonila tehničku varijabilnost i omogućila jasnije sagledavanje bioloških efekata izazvanih tretmanom, koji su prethodno bili maskirani tehničkim šumom. Korelaciona *heatmap* analiza sprovedena na *batch*-normalizovanim podacima dodatno je potvrdila da je normalizacijom, odnosno korekcijom *batch* efekta, očuvan najveći deo biološki relevantne informacije sadržane u eksperimentu (Prilog 1, C).

### 3.10 Diferencijalno eksprimirani geni

DGE analiza pokazala je najveći broj diferencijalno eksprimiranih gena (engl. Differentially Expressed Genes, DEG) nakon tretmana buteinom ( $n = 809$ ), manji broj DEG nakon tretmana butinom ( $n = 439$ ), dok je tretman sulfuretinom doveo do najmanjeg broja DEG ( $n = 299$ ). Pored toga, tretmani buteinom i butinom indukovali su veći broj povećano eksprimiranih gena u poređenju sa smanjeno eksprimiranim genima, dok je sulfuretin doveo do približno jednakog broja povećano i smanjeno eksprimiranih gena (Prilog 1, D).

Venov dijagram prikazan u Prilogu 2, A, pokazuje da su 134 DEG bila zajednička za sva tri tretmana, dok je 166 DEG bilo zajedničko za tretmane butinom i buteinom, a 51 DEG za tretmane sulfuretinom i buteinom. Samo 28 DEG bilo je zajedničko za butin i sulfuretin. Dodatno, Prilog 2, E-G prikazuje tri *volcano* grafikona koja odgovaraju tretmanima butinom, buteinom i sulfuretinom. DEG sa pragom statističke značajnosti (engl. False Discovery Rate, FDR)  $< 0,05$  i vrednostima logFC (engl. Log Fold Change) su navedeni u Prilogu 2, E-G.

Pet statistički najznačajnijih gena nakon tretmana butinom bilo je: *ferritin light chain (FTL)*, logFC = 0,67, FDR = 4,03733E-06), *VGF nerve growth factor inducible (VGF)*, logFC = 1,21, FDR = 4,92235E-06), *solute carrier organic anion transporter family member 2B1 (SLCO2B1)*, logFC = 1,11, FDR = 5,83737E-06), *NQO1* (logFC = 0,81, FDR = 9,9462E-06) i *pyruvate kinase L/R (PKLR)*, logFC = -0,89, FDR = 1,03864E-05).

Pet statistički najznačajnijih gena nakon tretmana buteinom bilo je: *FTL* (logFC = 0,92, FDR = 2,66443E-08), *VGF* (logFC = 1,77, FDR = 2,66443E-08), *NQO1* (logFC = 1,27, FDR = 2,66443E-08), *oxidative stress induced growth inhibitor 1 (OSGIN1)*, logFC = 1,87, FDR = 2,66443E-08) i *aldo-keto reductase family 1 member C1 (AKR1C1)*, logFC = 1,39, FDR = 2,66443E-08).

Pet statistički najznačajnijih gena nakon tretmana sulfuretinom bilo je: *VGF* (logFC = 0,99, FDR = 0,000155444), *NQO1* (logFC = 0,78, FDR = 0,000155444), *PKLR* (logFC = -0,83, FDR = 0,000155444), *leucine-rich repeat containing 4B (LRRC4B)*, logFC = 1,23, FDR = 0,000155444) i *spectrin alpha, erythrocytic 1 (SPTA1)*, logFC = -0,70, FDR = 0,000155444).

### 3.11 Analiza obogaćenja puteva na osnovu Reactome baze

GSEA analiza urađena je na osnovu Reactome baze podataka, kako bi se sagledali biološki putevi i procesi na koje utiču eksperimentalni tretmani butinom, buteinom i sulfuretinom, pri čemu su korišćene t-vrednosti dobijene iz DGE analize.

Reactome analiza obogaćenja puteva nakon tretmana butinom identifikovala je 215 statistički značajno obogaćenih puteva pri FDR-korigovanoj vrednosti  $p < 0,05$ , od kojih je 129 puteva bilo pozitivno obogaćeno (engl. Normalized Enrichment Score, NES;  $NES > 0$ ), dok je 86 puteva bilo negativno obogaćeno ( $NES < 0$ ). Ukupno posmatrano, rezultati ukazuju na izraženu i koordinisanu promenu koja uključuje supresiju obrade RNK, translacije i mitohondrijske bioenergetike i aktivaciju imunskih/sekretornih programa, signalnih puteva i odgovora adaptacije na ćelijski stres.

Najizraženije negativno obogaćeni programi ( $NES < 0$ ) odnosili su se na obradu RNK, translaciju i mitohondrijski metabolizam. Ti signali bili su pretežno povezani sa osnovnom mašinerijom genske ekspresije i energetskim metabolizmom. Posebno su se izdvojili putevi uključeni u obradu pre-iRNK i splajsovanje, uključujući *Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA* ( $NES = -2,68$ , prilagođena p-vrednost,  $p.adjust = 1,0 \times 10^{-20}$ ) i *mRNA Splicing / mRNA Splicing - Major Pathway* ( $NES$  približno -2,71,  $p.adjust$  približno  $10^{-17}$ ). Vodeći geni (engl. core enrichment genes) dela ovih puteva za splajsovanje uključivali su faktore splajsovanja kao što su *SRSF9*, *SRSF3*, *SRSF1*, *RBMX2* i *SNRNP200*.

Paralelno sa tim, putevi povezani sa translacijom bili su konzistentno negativno obogaćeni, uključujući *Eukaryotic Translation Initiation* ( $NES = -2,75$ ,  $p.adjust = 1,0 \times 10^{-13}$ ), *Cap-dependent Translation Initiation*, kao i dodatne ribozomske i translacione module, kao što su *Formation of a pool of free 40S subunits*, *Translation* i *Eukaryotic Translation Termination*. Vodeći geni u okviru translacione inicijacije bili su obogaćeni ribozomskim komponentama i inicijacionim faktorima, uključujući *RPL4*, *RPL19*, *RPS5*, *RPSA* i *EIF3M*, što podržava postojanje smanjenja kapaciteta sinteze proteina u širem kontekstu.

Treća jasno suprimirana osa odnosila se na mitohondrijsku respiraciju, oksidativnu fosforilaciju i centralni metabolizam ugljenika, uključujući *Respiratory electron transport, ATP synthesis...* ( $NES = -2,99$ ,  $p.adjust = 3,8 \times 10^{-18}$ ), *The TCA cycle and respiratory electron transport* ( $NES = -2,82$ ,  $p.adjust = 4,8 \times 10^{-17}$ ), kao i *Respiratory electron transport* kao zaseban put ( $NES = -2,86$ ,  $p.adjust = 1,9 \times 10^{-14}$ ). Vodeći geni u ovim putevima uključivali su osnovne komponente mitohondrijskog transportnog lanca elektrona i faktore uključene u njegovo sklapanje, kao što su članovi *NDUF* familije, *COX5B/COX20*, *ECSIT* i *CYTB*, što je u skladu sa koordinisanim smanjenjem ekspresionih potpisa povezanih sa oksidativnom fosforilacijom.

Među pozitivno obogaćenim putevima, najjači signali grupisali su se oko imunskih/sekretornih funkcija i hemostaze. Najznačajniji put bio je *Neutrophil degranulation* ( $NES = 2,08$ ,  $p.adjust = 1,8 \times 10^{-11}$ ), praćen putevima *Platelet activation, signaling and aggregation* ( $NES = 2,28$ ,  $p.adjust = 1,7 \times 10^{-10}$ ) i širim „krovnim“ putem *Hemostasis* ( $NES = 1,95$ ,  $p.adjust = 2,1 \times 10^{-9}$ ). Vodeći geni koji su doprinicali ovim transkripcionim potpisima uključivali su markere povezane sa imunskim odgovorom, vezikulama i proteazama, kao što su *FCGR2A*, *PLAU* i *CTSB* u okviru neutrofilne degranulacije, kao i signalne i ekstraćelijske komponente povezane sa trombocitima i hemostazom, uključujući *GP6*, *PIK3CG*, *PRKCB*, *SRC*, *FN1* i *SERPINE1*.

Pored ovih puteva, značajno je bilo obogaćeno i više signalnih kategorija, uključujući *Signaling by Receptor Tyrosine Kinases* ( $NES = 1,82$ ,  $p.adjust = 4,2 \times 10^{-7}$ ), kao i neurotrofinom povezane module

kao što su *Signaling by NTRK1 (TRKA)* (NES = 2,19, p.adjust =  $9,7 \times 10^{-7}$ ) i *NGF-stimulated transcription* (NES = 2,35, p.adjust =  $3,6 \times 10^{-6}$ ). Takođe, inflamatorna signalizacija dodatno je podržana obogaćenjem puta *Signaling by Interleukins* (NES = 1,81, p.adjust =  $4,4 \times 10^{-6}$ ), sa vodećim genima koji uključuju regulatore i odgovorne gene kao što su *SOCS1*, *NFKB2*, *IL10RA*, *JUN* i *SQSTM1*.

Značajno je da je tretman butinom bio povezan i sa obogaćenjem puteva adaptacije na ćelijski stres. Put *IRE1α activates chaperones* (NES = 2,14, p.adjust =  $6,3 \times 10^{-5}$ ) bio je značajno obogaćen, što je u skladu sa aktivacijom *IRE1α-XBP1* grane odgovora na nepravilno savijene proteine, odnosno UPR odgovora. Vodeći geni u ovom putu uključivali su *XBP1*, *EDEM1*, *DNAJC3* i *SYVN1*, što podržava uključivanje mehanizama proteostaze i kontrole kvaliteta proteina u endoplazmatskom retikulumu. Paralelno sa tim, značajno su bili obogaćeni i putevi odbrane od oksidativnog stresa, uključujući *KEAP1-NFE2L2 (NRF2) pathway* (NES = 1,98, p.adjust =  $1,5 \times 10^{-4}$ ), kao i srodne module povezane sa nuklearnim događajima *NRF2* i detoksikacijom. Vodeći geni u ovom klasteru uključivali su poznate antioksidativne i detoksikacione mete kao što su *NQO1*, *TXNRD1*, *GSR*, *GCLM*, *SRXN1* i *SLC7A11*, što snažno ukazuje na aktivaciju *NRF2*-posredovanog adaptivnog odgovora. Nekoliko puteva održavanja genomske stabilnosti takođe je dostiglo statističku značajnost, iako sa umerenijim veličinama efekta u poređenju sa dominantnim osama translacije i mitohondrijskog metabolizma. Na primer, značajni su bili putevi *Gap-filling DNA repair synthesis and ligation...* (NES = -1,81, p.adjust = 0,0086), *Mismatch Repair* (NES = -1,77, p.adjust = 0,044) i *Cell Cycle Checkpoints* (NES = -1,34, p.adjust = 0,032). *Transcriptional Regulation by TP53* takođe je bio statistički značajan (NES = -1,36, p.adjust = 0,0177), što je u skladu sa tretmanom povezanim remodelovanjem mreža uključenih u stresni odgovor i kontrolne tačke ćelijskog ciklusa.

Reactome GSEA analiza nakon tretmana buteinom identifikovala je 192 statistički značajno obogaćena puta pri FDR-korigovanoj vrednosti  $p < 0,05$ , od kojih je 99 bilo pozitivno, a 93 negativno obogaćeno. Profil obogaćenja ukazuje na koordinisano remodelovanje mitohondrijske bioenergetike, programa obrade RNK, kao i stresno-adaptivne i imuno/sekretorne signalizacije. Među najizraženije negativno obogaćenim procesima (NES < 0) nalazili su se putevi mitohondrijskog metabolizma, uključujući transport elektrona, oksidativnu fosforilaciju i ciklus trikarboksilnih kiselina (engl. Tricarboxylic Acid cycle, TCA) povezan sa respiratornim transportom elektrona (NES približno od -2,34 do -2,55; FDR do približno  $10^{-10}$ ). Snažno negativno obogaćenje *TCA/OXPHOS* (oksidativna fosforilacija, engl. Oxidative Phosphorylation) puteva ukazuje na metaboličko preusmeravanje visokog nivoa mitohondrijske respiracije, na koju se ćelije raka oslanjaju za preživljavanje i proliferaciju.

Paralelno sa tim, više puteva koji čine osnovu genske ekspresije bilo je značajno suprimirano, posebno *Processing of capped intron-containing pre-mRNA*, *mRNA splicing*, uključujući *Major spliceosome pathway*, kao i *mRNA transport/export to the cytoplasm* (NES približno od -1,9 do -2,1; FDR <  $10^{-5}$ - $10^{-9}$ ). Ovaj obrazac zajedno podržava postojanje smanjenja RNK sazrevanja, rukovanja RNK i ukupne spremnosti ćelije za sintezu makromolekula u širokom kontekstu. Dodatno, lipidna/metabolička regulacija bila je uključena kroz značajno negativno obogaćenje *SREBP*-posredovane transkripcione aktivacije i srodnih programa biosinteze holesterola i lipida, što ukazuje na smanjen potencijal za biogenezu lipida membrane potrebnu tokom brze ćelijske deobe.

Nasuprot tome, pozitivno obogaćeni putevi (NES > 0) bili su dominantno povezani sa programima adaptacije na stres. Butein je snažno aktivirao *KEAP1-NFE2L2 (NRF2)* osu i *NFE2L2* nuklearne događaje, sa FDR vrednostima koje su dostizale približno  $10^{-8}$ , što ukazuje na indukciju antioksidativnih i detoksikacionih odgovora. Takođe su bili značajno obogaćeni UPR putevi, uključujući *IRE1α*-posredovanu indukciju šaperona i *XBP1(S)*-zavisnu aktivaciju gena za šaperone, što je u skladu sa uključivanjem proteostaze i puteva povezanih sa stresom endoplazmatskog retikuluma.

Pored programa koji su aktivirani kao odgovor na stres, butein je indukovao i pozitivno obogaćenje urođenih imunskih/sekretornih modula, kao što je put *Neutrophil degranulation*, kao i procesa povezanih sa trombocitima i hemostazom, uključujući put *Platelet activation/degranulation* i *Hemostasis*. Ovi nalazi ukazuju na povećanu zastupljenost inflamatornih, sekretornih i ekstraćelijskih signalnih osobina u transkriptomskom odgovoru na butein. Ukupno, ovi rezultati ukazuju da butein pokreće transkripcijski program koji se odlikuje metaboličkim usporavanjem, odnosno smanjenjem mitohondrijskog *OXPPOS/TCA* potpisa, redukcijom obrade RNK i kapaciteta genske ekspresije, uz istovremenu aktivaciju *NRF2* i puteva povezanih sa UPR odgovorom. Ovakav obrazac je u skladu sa inhibicijom procesa koji podržavaju karakteristike ćelije raka, posebno održanu proliferativnu sposobnost i metaboličko reprogramiranje povezano sa malignim ćelijama.

Reactome GSEA analiza nakon tretmana sulfuretinom u K562 ćelijama identifikovala je 247 statistički značajno obogaćenih puteva pri FDR-korigovanoj vrednosti  $p < 0,05$ , pri čemu su dominirali pozitivno obogaćeni genski setovi (211 puteva;  $NES > 0$ ), dok je manji deo puteva bio negativno obogaćen (36 puteva;  $NES < 0$ ). Značajni putevi ukazuju da sulfuretin indukuje snažan stresni/inflamatorni potpis i potpis povezan sa prometom/obrtom proteina, dok istovremeno suprimira više programa koji podržavaju rast i metabolizam i koji su često povezani sa ključnim karakteristikama maligne ćelije.

Među negativno obogaćenim putevima, sulfuretin je značajno smanjio module kontrole biosinteze lipida regulisane preko *SREBP/SREBF*, uključujući *Activation of gene expression by SREBF (SREBP)* i *Regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP*. Ovaj obrazac je u skladu sa narušenom biogenezoj membrana i smanjenom dostupnošću lipidnih i holesterolskih gradivnih blokova koji su potrebni za brzu proliferaciju. Pored toga, nekoliko puteva direktno povezanih sa proliferativnom signalizacijom i progresijom ćelije kroz ćelijski ciklus bilo je negativno obogaćeno, uključujući *PI3K Cascade*, *FGFR1 signaling in disease* i *RB1/E2F*-povezane programe mitotske G1/S tranzicije. Ovi nalazi zajedno podržavaju slabljenje procesa povezanih sa održanom proliferativnom signalizacijom i stimulacijom ćelijskog ciklusa.

Nasuprot tome, najizraženije pozitivno obogaćeni putevi ukazivali su na aktivaciju stresno-adaptivnih i signalnih mreža. Sulfuretin je značajno obogatio *NRF2 (NFE2L2) Nuclear Events*, što je u skladu sa indukcijom antioksidativnih i detoksikacionih odgovora, kao i više sa proteazomom povezanih puteva, uključujući proteazomalnu degradaciju i procesiranje GLI transkripcijskih faktora (*GLI1/GLI2/GLI3*). Obogaćenje puteva degradacije GLI faktora u skladu je sa pojačanim prometom efektoru *Hedgehog* signalnog puta, što podržava supresiju tumor-promovišućih transkripcijskih izlaza u malignim ćelijama u kojima GLI aktivnost doprinosi preživljavanju i proliferaciji.

Ukupno posmatrano, ovi rezultati ukazuju da odgovor na sulfuretin karakteriše supresija *PI3K/FGFR* i ćelijsko-ciklusnih programa koji podržavaju rast, smanjenje *SREBP*-povezane biosinteze lipida i holesterola, kao i aktivacija *NRF2*-posredovanog odgovora na stres i proteazomom posredovanog prometa ključnih signalnih efektoru. Ovakve transkriptomске promene mogu doprineti supresiji rasta i inhibiciji tumor-promovišućih karakteristika K562 ćelija.

### 3.12 Klaster analiza puteva

Kako bi se značajno obogaćeni putevi grupisali u klastere na osnovu zajedničke biološke funkcije i kako bi se ispitao njihov širi biološki kontekst, putevi su raspoređeni u klastere prema najvišem nivou

putanje u hijerarhiji Reactome baze podataka. Primenom klaster analize puteva pokazano je da ispitivana jedinjenja (butin, butein i sulfuretin) ne deluju na iste biološke procese, kao što je prikazano u Prilozima 5-7.

Klaster analiza puteva pokazala je da tretman butinom uglavnom indukuje povećanu regulaciju puteva uključenih u signalnu transdukciju, sa više od 30 puteva, kao i puteva povezanih sa imunskim sistemom, ukupno 19 puteva. Sa druge strane, butin je doveo do smanjene regulacije puteva uključenih u metabolizam RNK, ukupno 14 puteva, kao i puteva povezanih sa regulacijom ćelijskog ciklusa, ukupno 11 puteva. Pored toga, smanjeno regulisani bili su i putevi povezani sa ekspresijom RNK i popravkom DNK. Tretman butinom je takođe povećao regulaciju puteva iz klastera bolesti, hemostaze, metabolizma, razvojne biologije, metabolizma proteina, klastera označenog kao „ostali“ putevi, vezikularnog transporta, ćelijsko-ćelijske komunikacije, ćelijskog odgovora na stimuluse, organizacije ekstraćelijskog matriksa i senzorne percepcije, kao što je prikazano u Prilogu 5. Ostali biološki procesi pokazali su mešoviti obrazac, odnosno prisustvo i povećano i smanjeno regulisanih puteva.

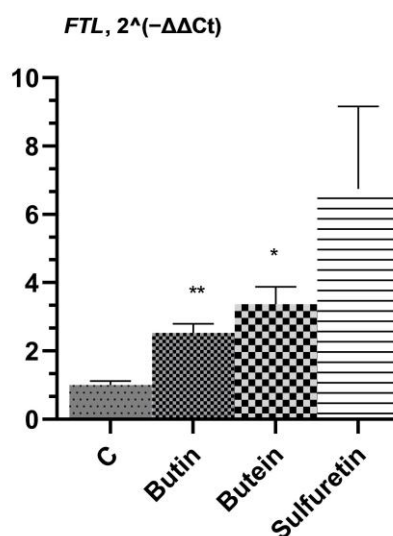
Slično butinu, tretman buteinom može se povezati sa povećanom regulacijom više od 20 puteva povezanih sa signalnom transdukcijom i imunskim sistemom, ali i sa povećanjem regulacije puteva uključenih u ćelijski odgovor na stimuluse, hemostazu, razvojnu biologiju i regulaciju procesa ekstraćelijskog matriksa. Najveći broj smanjeno regulisanih puteva bio je povezan sa klasterom bolesti, ukupno 18 puteva, metabolizmom RNK, ukupno 16 puteva, opštim metabolizmom, ukupno 15 puteva, kao i metabolizmom proteina i klasterom označenim kao „ostali“ putevi, ukupno 13 puteva. Ipak, u poređenju sa tretmanom butinom, nakon tretmana buteinom zabeležen je veći broj povećano regulisanih puteva. Putevi genske ekspresije, odnosno transkripcije, takođe su bili smanjeno regulisani, i to u većem broju nego nakon tretmana butinom. Pored toga, nakon tretmana buteinom manji broj puteva povezanih sa ćelijskim ciklusom bio je povećano ili smanjeno regulisan u poređenju sa tretmanom butinom, kao što je prikazano u Prilogu 6.

Najveći broj značajno povećano regulisanih puteva nakon tretmana sulfuretinom pronađen je u klasteru puteva ćelijskog ciklusa, ukupno 43 puta, što je suprotno efektu butina i buteina. Pored toga, značajan broj povećano regulisanih puteva pripadao je klasterima signalne transdukcije, ukupno 31 put, imunskog sistema, ukupno 24 puta, i metabolizma proteina, ukupno 22 puta, kao što je prikazano u Prilogu 7. Tretman sulfuretinom takođe je povećao regulaciju puteva povezanih sa ćelijskim odgovorom na stimuluse, genskom ekspresijom, odnosno transkripcijom, popravkom DNK, metabolizmom RNK, replikacijom DNK, programiranom ćelijskom smrću, autofagijom i hemostazom.

U poređenju sa butinom i buteinom, sulfuretin može imati znatno izraženiji uticaj na puteve ćelijskog ciklusa, imunskog sistema i metabolizma proteina, indukujući njihovu povećanu regulaciju. Dok i butin i butein povećavaju regulaciju puteva povezanih sa signalnom transdukcijom, sulfuretin istovremeno smanjuje regulaciju deset puteva i povećava regulaciju više od 30 puteva povezanih sa signalnom transdukcijom. Pored toga, sulfuretin može imati značajne efekte (u oba smera regulacije) na puteve povezane sa signalnom transdukcijom, razvojnom biologijom, klasterom „ostalih“ puteva, bolestima i metabolizmom, dok smanjuje uticaj na puteve povezane sa ćelijsko-ćelijskom komunikacijom.

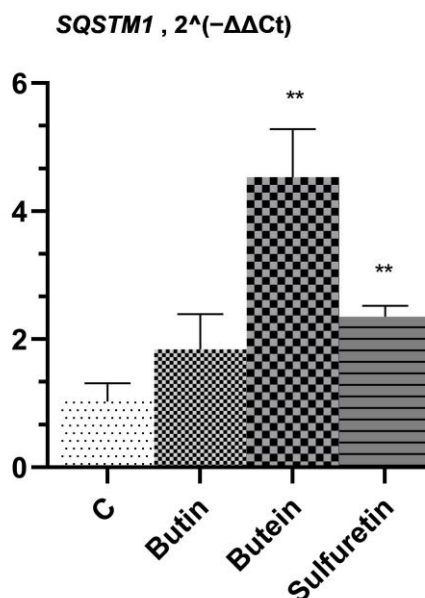
### **3.13 Potvrda rezultata RNK sekvenciranja metodom qPCR**

Nakon tretmana butinom, *FTL* identifikovan je kao vodeći gen jezgra obogaćenja u putu degranulacije neutrofila, koji je pokazao veoma značajno obogaćenje (NES = 2,08; prilagođena p-vrednost =  $1,8 \times 10^{-11}$ ). Nakon tretmana buteinom, *FTL* je predstavljao vodeći gen jezgra obogaćenja u putu uklanjanja putem receptora klase A (NES = 1,87; prilagođena p-vrednost = 0,02). Za tretman sulfuretinom, *FTL* je identifikovan kao vodeći gen jezgra obogaćenja u putu degranulacije neutrofila, koji je pokazao najznačajnije obogaćenje među svim putevima (NES = 2,18; prilagođena p-vrednost =  $7,64 \times 10^{-11}$ ). Geni jezgra obogaćenja predstavljaju podskup gena puta koji najviše doprinose signalu obogaćenja u GSEA analizi, odnosno gene koji se pojavljuju u delu rangirane liste gena koji određuje vodeće obogaćenje i koji usmeravaju uočenu vrednost obogaćenja (NES). Pored toga, *SQSTM1* (engl. *sequestosome 1*) identifikovan je kao gen jezgra obogaćenja u putu signalizacije interleukina (NES = 1,81; prilagođena p-vrednost =  $4,4 \times 10^{-6}$ ), što podržava njegovu uključenost u odgovore signalizacije posredovane citokinima. Nakon tretmana buteinom, *SQSTM1* je ponovo identifikovan kao vodeći gen jezgra obogaćenja u putu signalizacije interleukina-1 (NES = 1,84; prilagođena p-vrednost = 0,00326). *ST3GAL4* (engl. *ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4*) identifikovan je kao jedan od četiri vodeća gena jezgra obogaćenja u putu N-glikozilacije asparagina nakon tretmana butinom, buteinom i sulfuretinom, sa prilagođenim p-vrednostima od 0,0004, 0,0058 i 0,00054, redom. Za *FTL*, iRNK-seq analiza pokazala je pozitivne vrednosti logFC od 0,6736, 0,9152 i 0,4982 nakon tretmana butinom, buteinom i sulfuretinom, redom, što odgovara približno 1,59-, 1,89- i 1,41-strukom povećanju ekspresije gena u odnosu na netretiranu kontrolu. *FTL* se nalazio među 10 najviše diferencijalno eksprimiranih gena nakon sva tri tretmana, sa odgovarajućim FDR vrednostima od  $4,04 \times 10^{-6}$ ,  $2,66 \times 10^{-8}$  i  $2,14 \times 10^{-4}$ , redom. qPCR analiza pokazala je da su tretmani butinom, buteinom i sulfuretinom povećali ekspresiju *FTL* približno 2,53-, 3,37- i 6,75 puta, redom, u poređenju sa netretiranom kontrolom, kao što je prikazano na Slici 46. Uočene promene bile su statistički značajne za butin i butein, sa p-vrednostima od 0,0041 i 0,0118, redom. Tretman sulfuretinom takođe je pokazao izraženo povećanje ekspresije *FTL*; međutim, ova promena nije dostigla statističku značajnost. Ovi nalazi potvrđuju povećanu ekspresiju *FTL* uočenu u iRNK-seq skupu podataka. Iako se magnituda promena ekspresije razlikovala između dve metode, smer regulacije bio je konzistentan za sva tri jedinjenja, što podržava pouzdanost transkriptomskih nalaza.



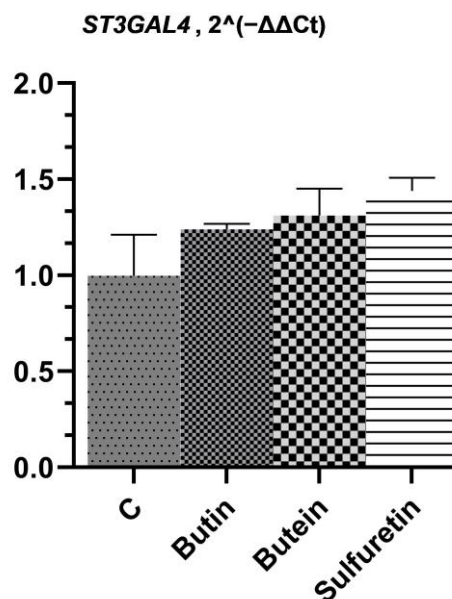
**Slika 46** Nivoi ekspresije gena *FTL* u kontrolnim K562 ćelijama i K562 ćelijama tretiranim tokom 24 h butinom, buteinom i sulfuretinom. Statistička značajnost određena je za vrednosti  $p < 0,05$  i označena je zvezdicom.

Za *SQSTM1*, vrednosti logFC dobijene iRNK-seq analizom iznosile su 0,45, 0,70 i 0,30 za butin, butein i sulfuretin, redom, na osnovu tri nezavisna eksperimenta bulk iRNK-seq, što odgovara približno 1,37-, 1,62- i 1,23-strukom povećanju ekspresije u odnosu na netretiranu kontrolu. Odgovarajuće FDR vrednosti iznosile su  $2,2 \times 10^{-4}$ ,  $1,78 \times 10^{-6}$  i 0,11, redom. Ove promene u ekspresiji potvrđene su korišćenjem TaqMan testova ekspresije gena, pri čemu je *ACTB* korišćen kao endogena kontrola. qPCR analiza pokazala je da su tretmani butinom, buteinom i sulfuretinom povećali ekspresiju *SQSTM1* približno 1,84-, 4,5- i 2,35 puta, redom, u poređenju sa netretiranom kontrolom, kao što je prikazano na Slici 47. Uočene promene bile su statistički značajne za butein i sulfuretin, sa p-vrednostima od 0,0081 i 0,0046, redom. Ovi nalazi potvrđuju povećanu ekspresiju *SQSTM1* uočenu u iRNK-seq skupu podataka.



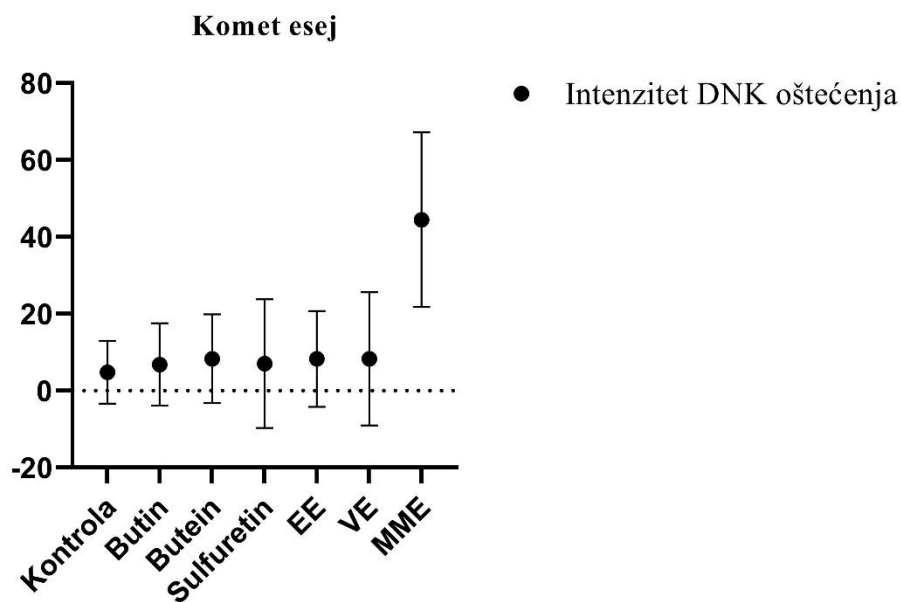
**Slika 47** Nivoi ekspresije gena *SQSTM1* u kontrolnim K562 ćelijama i K562 ćelijama tretiranim tokom 24 h butinom, buteinom i sulfuretinom. Statistička značajnost određena je za vrednosti  $p < 0,05$  i označena je zvezdicom.

Za *ST3GAL4*, iRNK-seq analiza pokazala je pozitivne vrednosti logFC od 0,48, 0,60 i 0,42 nakon tretmana butinom, buteinom i sulfuretinom, redom, što odgovara približno 1,39-, 1,52- i 1,34-strukom povećanju ekspresije gena u odnosu na netretiranu kontrolu. Odgovarajuće FDR vrednosti iznosile su 0,008, 0,002 i 0,040, što ukazuje na statistički značajnu povećanu ekspresiju u iRNK-seq skupu podataka. qPCR analiza pokazala je da su tretmani butinom, buteinom i sulfuretinom povećali ekspresiju *ST3GAL4* približno 1,24-, 1,31- i 1,44 puta, redom, u poređenju sa netretiranom kontrolom, kao što je prikazano na Slici 48. Iako su sva tri jedinjenja pokazala trend povećanja ekspresije *ST3GAL4*, nijedna od ovih promena nije dostigla statističku značajnost. Ipak, qPCR rezultati potvrdili su smer regulacije uočen u iRNK-seq skupu podataka. Iako se magnituda promena ekspresije razlikovala između dve metode, obe su konzistentno ukazale na povećanu ekspresiju *ST3GAL4* nakon tretmana butinom, buteinom i sulfuretinom, što podržava pouzdanost transkriptomskih nalaza.



**Slika 48** Nivoi ekspresije gena *ST3GAL4* u kontrolnim K562 ćelijama i K562 ćelijama tretiranim tokom 24 h butinom, buteinom i sulfuretinom. Statistička značajnost određena je za vrednosti  $p < 0,05$  i označena je zvezdicom.

### 3.14 Genotoksični efekat ekstrakata i jedinjenja ruja



**Slika 49** Genotoksični efekat ispitivanih jedinjenja i ekstrakata u MRC-5 ćelijama procenjen komet testom. Prikazane su vrednosti intenziteta repa (engl. tail intensity) u netretiranim ćelijama (kontrola) i ćelijama tretiranim butinom, buteinom, sulfuretinom, EE, VE i MME. Prikazani rezultati predstavljaju jedan reprezentativni eksperiment, u okviru kojeg je analizirano 50 pojedinačnih kometa.

Genotoksični potencijal ispitivanih jedinjenja i ekstrakata u MRC-5 normalnoj ćelijskoj liniji procenjen je primenom komet testa, pri čemu je kao parametar oštećenja DNK praćen intenzitet repa

(engl. tail intensity). Prikazani rezultati predstavljaju jedan reprezentativni eksperiment, u okviru kojeg je analizirano 50 pojedinačnih kometa. Za svaku kometu određena je vrednost parametra *tail intensity*, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost *tail intensity* sa standardnom devijacijom. U kontrolnim, netretiranim ćelijama, vrednost *tail intensity* iznosila je 4,76. Nakon tretmana butinom, buteinom i sulfuretinom, vrednosti ovog parametra iznosile su 6,81, 8,33 i 7,06, redom. Kod ćelija tretiranih EE i VE ekstraktima zabeležene su vrednosti od 8,25 i 8,27, redom. Najizraženije povećanje *tail intensity* u odnosu na kontrolu zabeleženo je nakon tretmana MME, pri čemu je vrednost iznosila 44,47. Zbirno, svi ispitivani tretmani pokazali su veće vrednosti *tail intensity* u odnosu na kontrolu, pri čemu je intenzitet povećanja varirao u zavisnosti od tretmana. Najizraženiji efekat uočen je nakon tretmana MME ekstraktom, dok su ostali tretmani pokazali umereno povećanje ovog parametra u odnosu na netretirane ćelije.

### 3.15 Ispitivanje radiomodulatornog efekta jedinjenja i ekstrakata ruja

#### 3.15.1 Određivanje preživljavanja ćelija u kombinaciji ekstrakata, jedinjenja i zračenja kolorimetrijskom metodom MTT

Na modelu MDA-MB-231 ćelijske linije adenokarcinoma dojke ispitivan je efekat (Tabele 6 i 7) kombinacije odabranih ekstrakata i jedinjenja sa zračenjem od 2 Gy, pri čemu su dobijene vrednosti apsorbance poređene sa kontrolom izloženom samo zračenju od 2 Gy, koja je definisana kao 100%. Najizraženije smanjenje apsorbance u odnosu na 2 Gy kontrolu zabeleženo je nakon tretmana butinom u kombinaciji sa 2 Gy, gde je srednja vrednost iznosila  $0,55 \pm 0,21$ , odnosno približno 55% vrednosti kontrole. Od ekstrakata, najveće smanjenje apsorbance pokazano je nakon tretmana EE + 2 Gy (57%), dok su VE + 2 Gy i MME + 2 Gy dale vrednosti od 63% i 69% kontrole, redom. Kod pojedinačnih jedinjenja, butein + 2 Gy, sulfuretin + 2 Gy, fisetin + 2 Gy i sulfuretin auronol + 2 Gy doveli su do smanjenja apsorbance na približno 70-74% vrednosti 2 Gy kontrole. Taksifolin, eriodiktiol i fustin pokazali su vrednosti bliže kontroli, pri čemu je fustin + 2 Gy imao najvišu apsorbancu (85% kontrole).

Na modelu neizmenjene MRC-5 ćelijske linije (Tabele 4 i 5) rezultati su takođe poređeni sa kontrolom tretiranom samo zračenjem od 2 Gy, definisanom kao 100%. Nijedan od ispitivanih tretmana nije doveo do izraženog povećanja apsorbance iznad vrednosti 2 Gy kontrole. Najviša vrednost zabeležena je kod tretmana fustin + 2 Gy (102% kontrole), što predstavlja samo blago povećanje u odnosu na kontrolu. Taksifolin + 2 Gy, butin + 2 Gy, fisetin + 2 Gy i eriodiktiol + 2 Gy pokazali su vrednosti od približno 78-81% kontrole. Izraženije smanjenje apsorbance uočeno je kod buteina, sulfuretina, MME i sulfuretin auronola, dok su najveće smanjenje pokazali EE + 2 Gy (46%) i VE + 2 Gy (54% kontrole). Dobijeni rezultati ukazuju da su u MDA-MB-231 ćelijama kombinovani tretmani sa 2 Gy doveli do smanjenja apsorbance u odnosu na samo zračenje, pri čemu su najizraženiji efekti uočeni za butin, EE i VE. U neizmenjenoj MRC-5 ćelijskoj liniji nijedan tretman nije pokazao jasno povećanje apsorbance iznad vrednosti 2 Gy kontrole, iako je kod fustina zabeležena vrednost približno jednaka kontroli. Na osnovu ovih rezultata, u MDA-MB-231 ćelijama izdvojeni su butin, EE i VE za dalju analizu potencijalnog radiosenzitizujućeg efekta, dok u neizmenjenoj MRC-5 ćelijskoj liniji nije uočen jasan efekat koji bi ukazivao na radioprotektivno dejstvo.

**Tabela 4 Preživljavanje MRC-5 ćelija u odnosu na kontrolu 2 Gy**

| Preživljavanje ćelija u odnosu na kontrolu 2 Gy | Srednja vrednost      | Standardna devijacija |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>MRC-5</b>                                    | <b>2 Gy + tretman</b> |                       |
| Butin + 2Gy                                     | 0.81                  | 0.05                  |
| Butein + 2Gy                                    | 0.71                  | 0.08                  |
| Sulfuretin + 2Gy                                | 0.68                  | 0.11                  |
| EE + 2Gy                                        | 0.46                  | 0.04                  |
| VE + 2Gy                                        | 0.54                  | 0.18                  |
| MME + 2Gy                                       | 0.68                  | 0.08                  |
| Fisetin + 2Gy                                   | 0.80                  | 0.04                  |
| Taksifolin + 2Gy                                | 0.81                  | 0.18                  |
| Eriodiktiol + 2Gy                               | 0.78                  | 0.08                  |
| Fustin + 2Gy                                    | 1.02                  | 0.06                  |
| Sulfuretin auronol + 2Gy                        | 0.68                  | 0.13                  |
| Kontrola 2 Gy                                   | 1.00                  | 0.00                  |

**Tabela 5 Preživljavanje MRC-5 ćelija u odnosu na kontrolu 0 Gy**

| Preživljavanje ćelija u odnosu na kontrolu 0 Gy | Srednja vrednost      | Standardna devijacija |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>MRC-5</b>                                    | <b>2 Gy + tretman</b> |                       |
| Butin + 2Gy                                     | 0.59                  | 0.15                  |
| Butein + 2Gy                                    | 0.53                  | 0.21                  |
| Sulfuretin + 2Gy                                | 0.52                  | 0.25                  |
| EE + 2Gy                                        | 0.33                  | 0.08                  |
| VE + 2Gy                                        | 0.42                  | 0.28                  |
| MME + 2Gy                                       | 0.50                  | 0.21                  |
| Fisetin + 2Gy                                   | 0.59                  | 0.20                  |
| Taksifolin + 2Gy                                | 0.62                  | 0.30                  |
| Eriodiktiol + 2Gy                               | 0.58                  | 0.24                  |
| Fustin + 2Gy                                    | 0.75                  | 0.25                  |
| Sulfuretin auronol + 2Gy                        | 0.52                  | 0.24                  |
| Kontrola 2 Gy                                   | 0.74                  | 0.24                  |

**Tabela 6 Preživljavanje MDA-MB-231 ćelija u odnosu na kontrolu 2 Gy**

| Preživljavanje ćelija u odnosu na kontrolu 2 Gy | Srednja vrednost      | Standardna devijacija |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>MDA-MB-231</b>                               | <b>2 Gy + tretman</b> |                       |
| Butin + 2Gy                                     | 0.55                  | 0.21                  |
| Butein + 2Gy                                    | 0.72                  | 0.30                  |
| Sulfuretin + 2Gy                                | 0.74                  | 0.20                  |
| EE + 2Gy                                        | 0.57                  | 0.09                  |
| VE + 2Gy                                        | 0.63                  | 0.11                  |
| MME + 2Gy                                       | 0.69                  | 0.08                  |
| Fisetin + 2Gy                                   | 0.70                  | 0.14                  |
| Taksifolin + 2Gy                                | 0.82                  | 0.10                  |
| Eriodiktiol + 2Gy                               | 0.83                  | 0.04                  |
| Fustin + 2Gy                                    | 0.85                  | 0.17                  |
| Sulfuretin auronol + 2Gy                        | 0.70                  | 0.04                  |
| Kontrola 2 Gy                                   | 1.00                  | 0.00                  |

**Tabela 7 Preživljavanje MDA-MB-231 ćelija u odnosu na kontrolu 0 Gy**

| Preživljavanje ćelija u odnosu na kontrolu 0 Gy | Srednja vrednost      | Standardna devijacija |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>MDA-MB-231</b>                               | <b>2 Gy + tretman</b> |                       |
| Butin + 2Gy                                     | 0.55                  | 0.14                  |
| Butein + 2Gy                                    | 0.72                  | 0.23                  |
| Sulfuretin + 2Gy                                | 0.75                  | 0.19                  |
| EE + 2Gy                                        | 0.57                  | 0.01                  |
| VE + 2Gy                                        | 0.63                  | 0.11                  |
| MME + 2Gy                                       | 0.70                  | 0.06                  |
| Fisetin + 2Gy                                   | 0.71                  | 0.17                  |
| Taksifolin + 2Gy                                | 0.83                  | 0.13                  |
| Eriodiktiol + 2Gy                               | 0.85                  | 0.15                  |
| Fustin + 2Gy                                    | 0.86                  | 0.14                  |
| Sulfuretin auronol + 2Gy                        | 0.72                  | 0.11                  |
| Kontrola 2 Gy                                   | 1.02                  | 0.15                  |

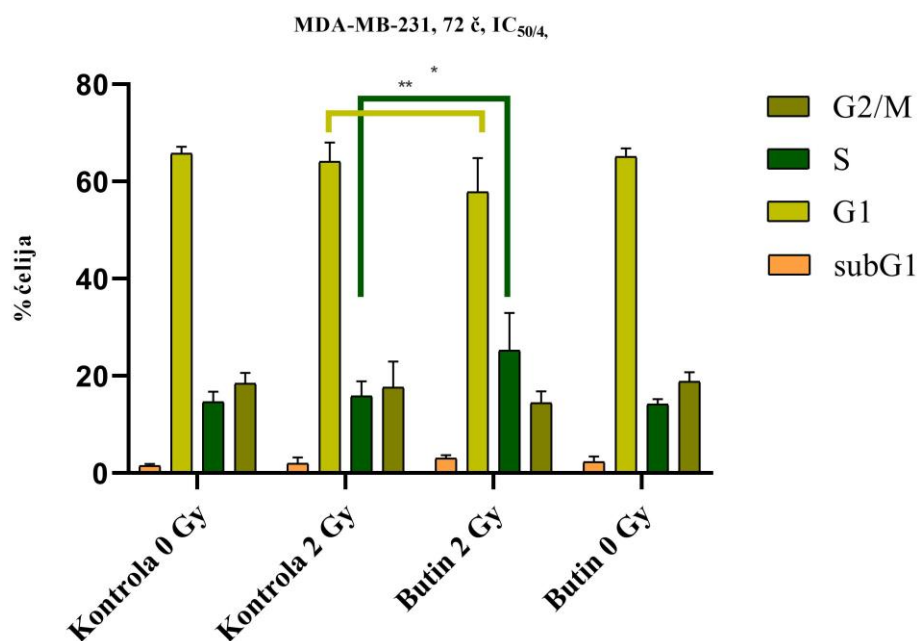
### 3.15.2 Ispitivanje promena u fazama ćelijskog ciklusa u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy

Nakon početnog skrininga potencijalnih radioprotektivnih i radiosenzitizujućih svojstava ispitivanih jedinjenja i ekstrakata iz ruja primenom MTT testa, za dalju analizu odabrani su tretmani na osnovu statističke značajnosti njihovog efekta na preživljavanje ćelija. U slučaju MDA-MB-231 ćelijske linije, u dalja ispitivanja uključeni su tretmani koji su u kombinaciji sa zračenjem od 2 Gy pokazali statistički značajno smanjenje preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu izloženu samo zračenju, odnosno potencijalni radiosenzitizujući efekat. Za MRC-5 ćelijsku liniju kriterijum za dalju analizu bio je statistički značajno povećanje preživljavanja nakon tretmana u kombinaciji sa zračenjem, što bi moglo ukazivati na potencijalni radioprotektivni efekat.

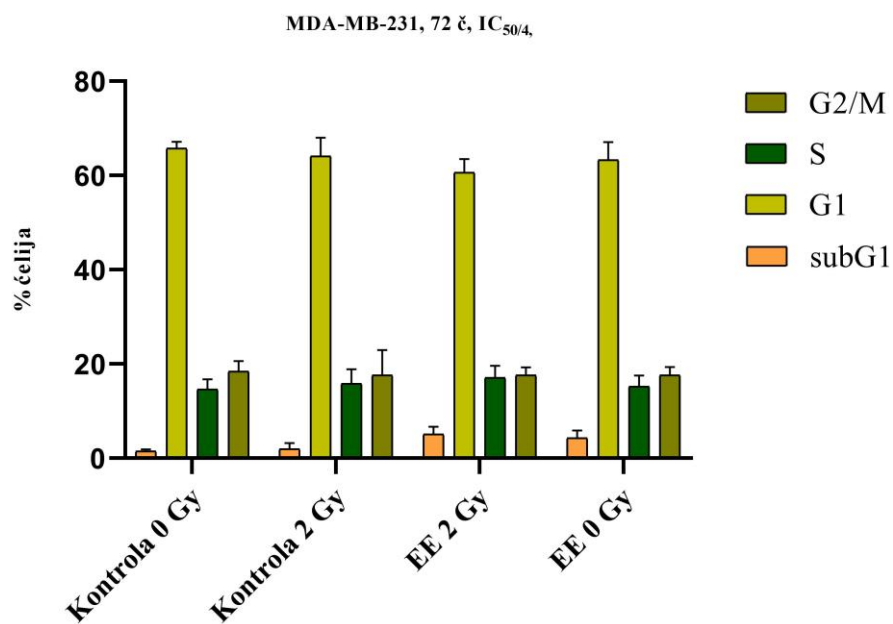
Međutim, nijedno od ispitivanih jedinjenja i ekstrakata u MRC-5 ćelijskoj liniji nije pokazalo statistički značajno povećanje preživljavanja u odnosu na zračenu kontrolu. Shodno tome, nijedan tretman nije ispunio kriterijum za potencijalni radioprotektivni efekat na ovoj ćelijskoj liniji. U skladu sa postavljenim kriterijumima za selekciju, u dalja ispitivanja uključeni su samo tretmani koji su u MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, u kombinaciji sa zračenjem od 2 Gy, pokazali statistički značajno smanjenje preživljavanja u odnosu na odgovarajuću zračenu kontrolu, odnosno tretmani sa potencijalnim radiosenzitizujućim svojstvima.

U nezračenoj kontroli, najveći procenat ćelija bio je zastupljen u G1 fazi (65,78%), dok je 14,64% ćelija bilo u S fazi, a 18,43% u G2/M fazi. SubG1 frakcija činila je 1,53% ukupne populacije, prikazano na Slikama 50-52. Nakon izlaganja zračenju od 2 Gy, raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa bila je slična kontroli, sa 64,10% ćelija u G1, 15,80% u S i 17,66% u G2/M fazi, dok je subG1 frakcija iznosila 1,97%. Ovi rezultati ukazuju da samo zračenje od 2 Gy nije izazvalo izraženu promenu raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Kod kombinovanog tretmana butinom + 2 Gy uočena je izraženija promena u odnosu na kontrolu 2 Gy. Udeo ćelija u G1 fazi smanjen je na 57,83%, dok je populacija u S fazi povećana na 25,25%. Istovremeno, G2/M populacija smanjena je na 14,46%, a subG1 frakcija povećana na 3,01%. U poređenju sa butinom bez zračenja, kod kog je 14,14% ćelija bilo u S fazi, kombinovani tretman doveo je do izražene akumulacije ćelija u S fazi, uz istovremeno smanjenje G1 i G2/M populacije. Kod tretmana EE + 2 Gy, G1 populacija iznosila je 60,60%, S populacija 17,13%, a G2/M populacija 17,66%. U odnosu na EE bez zračenja, uočeno je smanjenje G1 populacije i blago povećanje

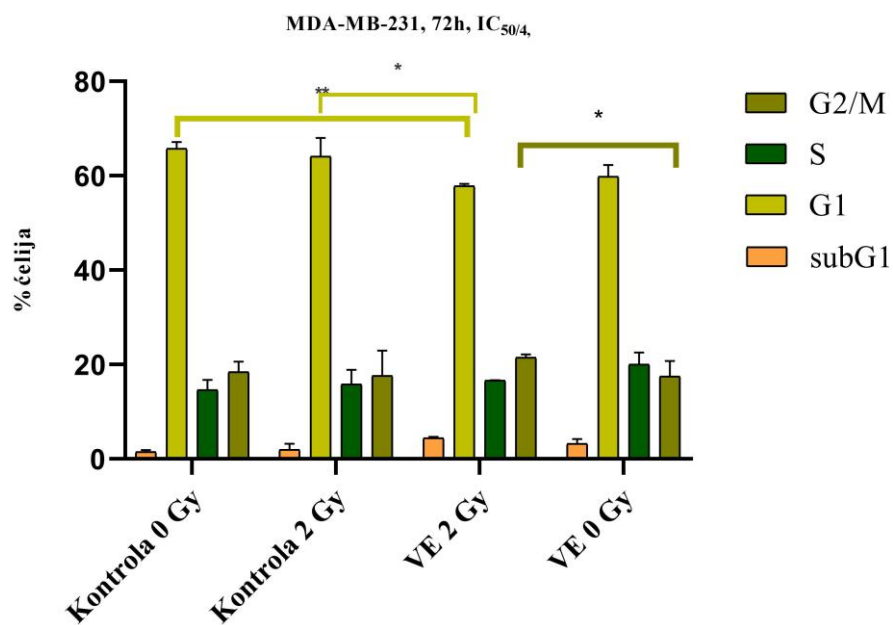
S populacije. Najizraženija promena odnosila se na subG1 frakciju, koja je povećana sa 4,32% kod EE na 5,11% nakon kombinovanja sa 2 Gy. Kod VE + 2 Gy tretmana, 57,85% ćelija nalazilo se u G1 fazi, 16,66% u S fazi, a 21,47% u G2/M fazi, dok je subG1 frakcija iznosila 4,46%. U poređenju sa VE bez zračenja, kombinovani tretman bio je praćen povećanjem G2/M populacije i smanjenjem S populacije. Istovremeno, subG1 frakcija povećana je sa 3,22% na 4,46%. Posmatrano zajedno, kombinovanje ispitivanih tretmana sa 2 Gy nije izazvalo jedinstven obrazac promene raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Butin + 2 Gy karakterisala je izražena akumulacija ćelija u S fazi, dok je kod VE + 2 Gy uočeno povećanje G2/M populacije. Zajednički nalaz za sva tri kombinovana tretmana bio je povećanje subG1 frakcije u odnosu na odgovarajuće tretmane bez zračenja, što može ukazivati na povećanje udela ćelija sa karakteristikama povezanim sa ćelijskom smrću. Ovi rezultati pokazuju da tretmani izdvojeni na osnovu MTT analize, pored uticaja na metaboličku aktivnost i preživljavanje ćelija, utiču i na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri čemu je obrazac odgovora zavisio od primenjenog tretmana. Kod butina je dominantna promena bila akumulacija ćelija u S fazi, a kod VE povećanje G2/M populacije. Ovakve razlike ukazuju na potencijalno različite mehanizme odgovora ćelija na kombinaciju ispitivanih tretmana i zračenja, što može biti dodatno povezano sa rezultatima analiza apoptoze i drugih mehanizama ćelijskog odgovora.



**Slika 50** Efekti ekstrakata i jedinjenja biljke *C. coggyria* na promene u ćelijskom ciklusu nakon tretmana sa dozom zračenja od 2 Gy. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.



Slika 51 Efekti ekstrakata i jedinjenja biljke *C. coggygria* na promene u ćelijskom ciklusu nakon tretmana sa dozom zračenja od 2 Gy. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

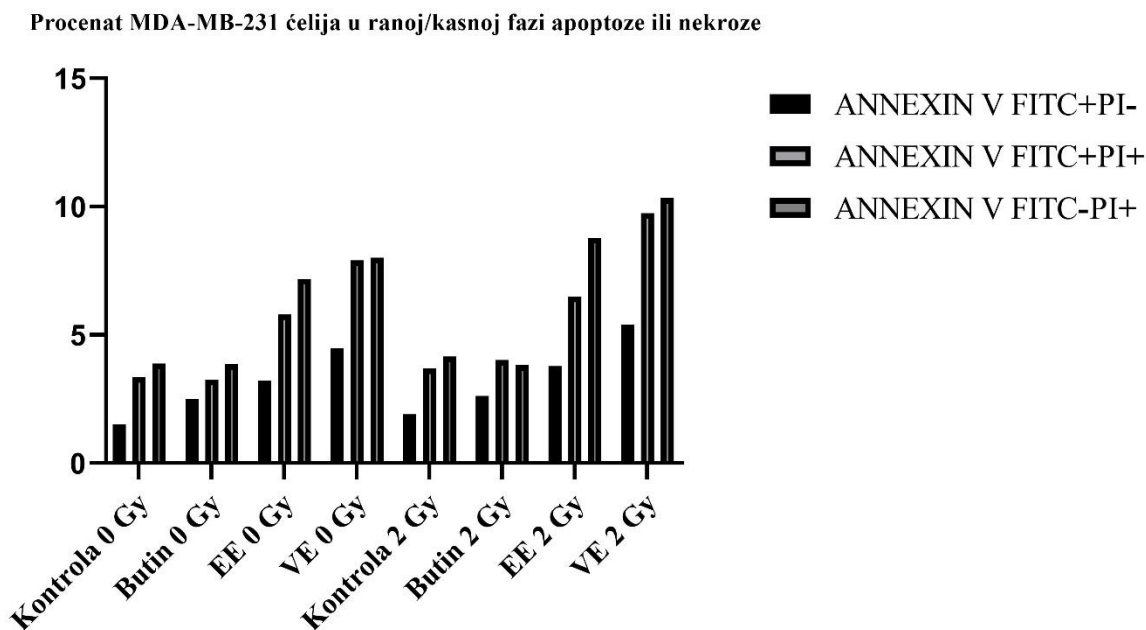


Slika 52 Efekti ekstrakata i jedinjenja biljke *C. coggygria* na promene u ćelijskom ciklusu nakon tretmana sa dozom zračenja od 2 Gy. P vrednost ispod 0,05 se smatra statistički značajnom, a zvezdica/zvezdice označavaju nivo statističke značajnosti.

### 3.15.3 Ispitivanje stepena apoptoze u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy

Nakon analize raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, aneksin V-FITC/PI test je korišćen za procenu tipa ćelijske smrti u odgovoru na ispitivane tretmane i njihovu kombinaciju sa zračenjem od 2 Gy. U interpretaciji su posebno značajne A+PI- ćelije, koje odgovaraju ranoj apoptozi, A+PI+ ćelije, koje predstavljaju kasnu apoptozu/sekundarnu nekrozu, i A-PI+ ćelije, koje ukazuju na nekrotične ćelije.

U nezračenoj kontroli, udeo ćelija u ranoj apoptozi iznosio je 1,50%, dok su kasna apoptoza/sekundarna nekroza i nekroza činile 3,36% i 3,88% ćelija. Nakon izlaganja 2 Gy zračenju, ove vrednosti su ostale slične, sa 1,91% ćelija u ranoj apoptozi, 3,69% u kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi i 4,16% u nekrotičnoj populaciji, što ukazuje na relativno blag apoptotski odgovor izazvan samim zračenjem. Kod butina bez zračenja, vrednosti za ranu apoptozu, kasnu apoptozu/sekundarnu nekrozu i nekrozu iznosile su 2,49%, 3,25% i 3,86%. Kombinovanje butina sa 2 Gy dovelo je do blagog povećanja rane apoptoze na 2,62% i kasne apoptoze/sekundarne nekroze na 4,02%, dok je nekrotična populacija ostala praktično nepromenjena (3,82%). Ovi rezultati ukazuju na relativno slab uticaj kombinacije butina i zračenja na indukciju ćelijske smrti. Kod VE bez zračenja, 4,47% ćelija nalazilo se u ranoj apoptozi, 7,90% u kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi i 8,01% u nekrotičnoj populaciji. Kombinacija VE sa 2 Gy dodatno je povećala sve tri populacije, na 5,41%, 9,74% i 10,33%, redom. Najizraženije povećanje zabeleženo je u nekrotičnoj populaciji, kao što je prikazano na Slici 53.



Slika 53 Procent MDA-MB-231 ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi ili nekrozi određen je dvostrukim bojenjem aneksin V-FITC-om i propidijum-jodidom nakon 24-časovnog tretmana sa odgovarajućim ekstraktima i jedinjenjima izolovanim iz *C. coggygia*. Prikazan je reprezentativni eksperiment.

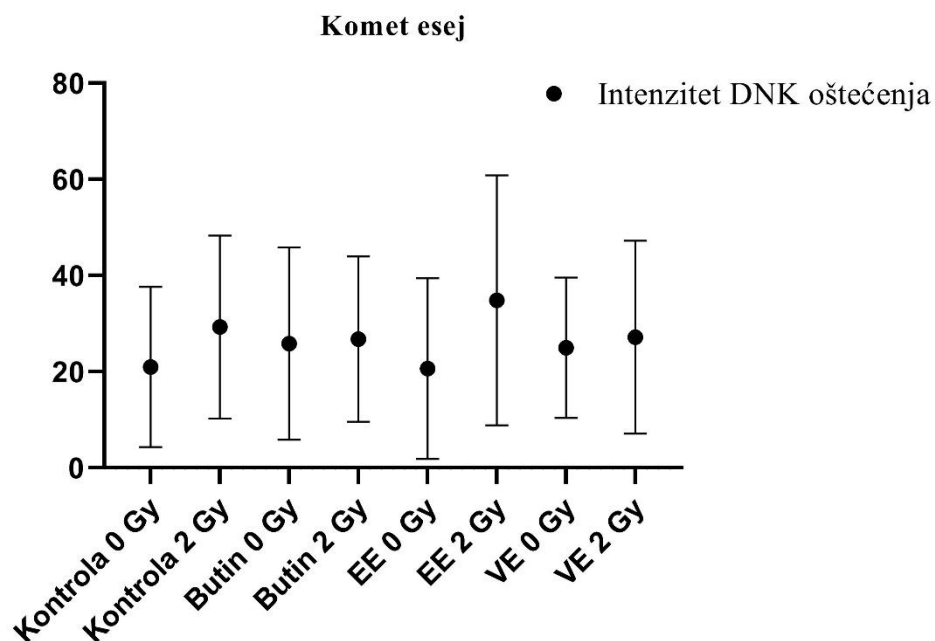
Posmatrano zajedno sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa, aneksin V-FITC/PI rezultati pokazuju da se odgovor ćelija razlikuje granično u zavisnosti od primenjenog tretmana. Butin + 2 Gy pokazao je relativno mali porast apoptotskih populacija, dok je VE + 2 Gy doveo do izraženijeg povećanja ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi/sekundarnoj nekrozi, kao i u nekrotičnoj populaciji. Ovi

rezultati izdvajaju VE kao tretman koji je u kombinaciji sa zračenjem izazvao najizraženiji odgovor povezan sa ćelijskom smrću, ali i to povećanje je niskog intenziteta.

#### **3.15.4 Procena genotoksičnosti jedinjenja i ekstrakata ruja alkalnim komet testom u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy**

U komet testu, intenzitet fluorescencije repa komete (engl. *tail intensity*) korišćen je kao pokazatelj oštećenja DNK, pri čemu veća vrednost ukazuje na veći stepen fragmentacije molekula DNK. Prikazani rezultati predstavljaju jedan reprezentativni eksperiment, u okviru kojeg je analizirano 50 pojedinačnih kometa. Za svaku kometu određena je vrednost parametra *tail intensity*, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost *tail intensity* sa standardnom devijacijom. U nezračenoj kontroli srednja vrednost iznosila je 20,98, dok je nakon izlaganja 2 Gy zračenju povećana na 29,28, što potvrđuje da je primenjeno zračenje izazvalo oštećenje DNK. Kod samostalnih tretmana bez zračenja, vrednosti su iznosile 25,80 za butin, 20,65 za EE i 24,97 za VE. U poređenju sa kontrolom 0 Gy, butin i VE su pokazali blago povećane vrednosti intenziteta fluorescencije repa, dok je vrednost nakon tretmana EE bila praktično na nivou kontrole. Kombinovanje tretmana sa 2 Gy zračenjem pokazalo je različite obrasce odgovora. Kod butina, vrednost se povećala sa 25,80 bez zračenja na 26,77 nakon kombinovanja sa 2 Gy, što je i dalje bilo niže od vrednosti dobijene nakon samog zračenja (29,28). Slično tome, kod VE je kombinovani tretman doveo do povećanja vrednosti sa 24,97 na 27,15, ali je i ova vrednost ostala niža od vrednosti nakon samog zračenja. Nasuprot tome, kombinacija EE + 2 Gy dovela je do povećanja intenziteta fluorescencije repa komete na 34,84, što je bilo više i u odnosu na kontrolu 2 Gy (29,28) i u odnosu na EE bez zračenja (20,65). Ovo predstavlja najizraženiji odgovor među ispitivanim kombinacijama.

Posmatrano u celini, rezultati komet testa ukazuju da butin i VE u kombinaciji sa 2 Gy nisu dodatno povećali oštećenje DNK u odnosu na samo zračenje, dok je EE + 2 Gy pokazao potencijalno pojačano oštećenje DNK u odnosu na samo zračenje. Stoga se među ispitivanim tretmanima upravo EE izdvaja kao tretman koji, u kombinaciji sa zračenjem, može imati aditivni ili potencijalno sinergistički efekat na oštećenje DNK. Ovaj nalaz je od posebnog značaja za procenu genotoksičnosti kombinovanih tretmana.



*Slika 54 Prikaz komet eseja na liniji MDA-MB-231 u kombinaciji sa zračenjem u dozi od 2 Gy i jedinjenjima i ekstraktima izolovanim iz ruja. Prikazani rezultati predstavljaju jedan reprezentativni eksperiment, u okviru kojeg je analizirano 50 pojedinačnih kometa. Za svaku kometu određena je vrednost parametra tail intensity, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost tail intensity sa standardnom devijacijom.*

## 4 Diskusija

U farmakognozijskim istraživanjima, pronađeno je da biološke aktivnosti biljnih ekstrakata značajno zavise od hemijskih konstituenata biljke, prvenstveno sekundarnih metabolita i njihovih interakcija (Kowalski & Baj, 2025). Iako sekundarni metaboliti ili bioaktivna jedinjenja nisu neophodni za preživljavanje biljke koja ih sintetiše, imaju važne ekološke i adaptivne uloge, odnosno važne biološke aktivnosti (npr. antimikrobne, antiviralne, antiinflamatorne, antioksidativne, citotoksične) (Kowalski & Baj, 2025). Od izuzetne je važnosti hemijsko profilisanje ispitivanih uzoraka uporedo sa njihovim biološkim ispitivanjem kao što je to urađeno u mnogim dostupnim studijama u literaturi. U ispitivanom ekstraktu ruja, osim očekivanih, prethodno pronađenih sekundarnih metabolita, po prvi put su pronađeni i 3-O-metilepifustin (flavonol), epitaksifolin (flavonol) i sulfuretin auronol. Butin, eriodiktiol, fisetin, fustin i taksifolin, pronađeni u značajnim količinama, predstavljaju očekivan rezultat koji je u saglasnosti sa ranije opisanim rezultatima (Antal et al., 2010; Matić et al., 2016). Takođe, prema literaturnim podacima, miricetin, kempferol, kvercetin, galna kiselina i katehin su pronađeni u nekim vrstama uzoraka ruja (Antal et al., 2010; Matić et al., 2016). Interesantno je da su se Novaković i saradnici takođe bavili ispitivanjem dihlormetanskog ekstrakta srži drveta ruja i opisali trinaest ranije poznatih hemijskih konstituenata (derivati i metaboliti sulfuretina, fustina, fisetina, butina, buteina, taksifolina i eriodiktiola), ali i dva nova jedinjenja: 2,10-oksi-metoksisulfuretin i kotinignan A (Novaković et al., 2019). Kotinignan A predstavlja vrstu auroclignana. Važno je napomenuti da su jedinjenja ispitivana u ovoj disertaciji izolovana po proceduri detaljno opisanoj u publikaciji Novakovića i saradnika (Novaković et al., 2019). Najveći broj jedinjenja je izolovan kao u pomenutom radu, osim 2,10-oksi-metoksisulfuretina i  $\beta$ -

rezorcilne kiseline koji su tada bili izolovani u malim količinama, a u trenutnom istraživanju nisu pronađeni. Slična jedinjenja pronađena su i u uzorcima biljke *Toxicodendron vernicifluum*, bliskog srodnika ruja iz iste porodice (Antal et al., 2010). Iz rezultata, koji su u saglasnosti sa literaturnim podacima, može se zaključiti da su fenolne komponente dominantna grupa sekundarnih metabolita u ekstraktima ruja, i to prvenstveno iz klasa flavonoida, halkona, aurna, te da flavonoidni profil sadrži i aglikonske i glikozidne derivate, od jednostavnih flavonola do aurna i flavanonskih derivata/metabolita. Ovo ukazuje na postojanje potencijalne kompleksne biosintetičke mreže unakrsne signalizacije kada je reč o sintezi fenilpropanoida kod ove biljke, slično kao što je slučaj sa blisko srodnim rodnom *Toxicodendron* (Bai et al., 2022; Rudrapal et al., 2021; Zhao et al., 2024). Halkoni predstavljaju svojevrsni metabolički neksus, ushodno od kog se sintetišu flavanoni, flavanoli i auronska jedinjenja, a nishodno flavanoli i tanini. Prisustvo O-metilovanih derivata takođe ukazuje na enzimsku transformaciju prekursorskih jedinjenja u kasnijim stadijumima biosinteze, što navodi na zaključak da je fenilpropanoidni metabolizam visoko specifičan i kompleksan u drvetu (srži) ruja (Lam et al., 2007; Zhao et al., 2024). Moguće je da su upravo halkoni u određenom procentu odgovorni za neke od bioaktivnosti ruja, budući da su dobro proučeni i prepoznati u literaturi kao molekuli sa antioksidativnim, antitumorskim, antiinflamatornim i drugim dejstvima (Rudrapal et al., 2021). Kao što se vidi i iz hemijske analize uzoraka srži drveta ove biljke u istraživanju, dominantni sekundarni metaboliti u drvetu su aglikonski flavonoidi (poput flavanola i aurna). Važno je napomenuti da se prethodno opisani hemijski profil drvenastog dela razlikuje od profila koji se očekuje u listovima iste biljke. Listove uglavnom karakteriše prisustvo flavonolnih glikozida i fenolnih kiselina, poput hlorogene, kofeinske i galne kiseline i njihovih derivata (Matić et al., 2016; Sukhikh et al., 2021). Ova relativno polarna jedinjenja imaju važnu ulogu u zaštiti biljke od UV zračenja, a njihova biosinteza može biti značajno modulirana u odgovoru na akutni stres. Nasuprot tome, sekundarni metaboliti prisutni u srži drveta odražavaju drugačiji hemijski profil, što može biti posledica različitih fizioloških funkcija i uslova kojima su ovi biljni organi izloženi (Rao & Zheng, 2025). Analizom literature uočeno je da hemizam listova ruja značajnije varira, kao i aktivnost nekih enzima u listu, poput fenilalanin-amonijačne liaze (Stanković et al., 2025), koja deluje i u srži. Pretpostavlja se da je, bar u nekoj meri, podložna sličnoj modulaciji sredinskim faktorima kao što je podložna i u listu. Prinos sekundarnih metabolita kao i koncentracija istih u uzorku u ovoj studiji pokazali su zavisnost u odnosu na rastvarač, pa je tako MME pokazao veći prinos suve materije (oko 9%) u odnosu na vodeni ekstrakt (oko 6%), što upućuje na zaključak da voda kao polarni rastvarač ostvaruje nešto niži prinos u poređenju sa mešanim organskim rastvaračima. Ovo je u saglasnosti sa generalnim principima ekstrakcije biljnog materijala, iz mekih tkiva (poput listova) i tvrdih, kao što su drvo i srž, koje tipično sadrže više lignina i tanina, i manje polarnih komponenti nego listovi (Kowalski & Baj, 2025; Žlabur et al., 2020). Vodeno-alkoholni rastvarači, u slučaju listova *C. cogggyria*, pokazuju veću efikasnost u ekstrakciji, daju veći prinos sekundarnih metabolita u odnosu na čisti alkoholni rastvarač. Takav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima studije u okviru doktorske disertacije za MME i EE, iako je ovde predmet ekstrakcije bila srž drvenastog dela biljke. Zavisno od ciljane komponente, njene polarosti i aktivnosti ekstrakta, izbor rastvarača može doprineti većem prinosu, a onda je moguće i dodatno koncentrovati aktivne materije raznim metodama. Tako su Ivanov i saradnici pokazali da smeša etil-acetata i vode predstavlja najefikasniji sistem rastvarača za ekstrakciju kondenzovanih galotanina iz listova, čija je biološka aktivnost povezana sa inhibicijom tumor-promovišućeg enzima prolil-oligopeptidaze i fibroblast-aktivirajućeg proteina  $\alpha$  (FAP) (Ivanov et al., 2023).

U ovoj studiji ispitivani su citotoksični efekti tri pripremljena ekstrakta i dvanaest izolovanih jedinjenja iz srži *C. cogggyria*. Ispitivana jedinjenja bila su: butin (1), fustin (2), 3-O-metilfustin (3), 3-O-metilepifustin (6), eriodiktiol (4), taksifolin (5), fisetin (8), butein (11), sulfuretin (10), sulfuretin auronol (12), sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukozid (9) i kotinignan A (13), kao i EE, VE i MME. Ispitivanje je

sprovedeno na sedam humanih malignih ćelijskih linija: ćelijska linija karcinoma grlića materice HeLa, ćelijska linija trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije HL-60, ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije K562, ćelijska linija melanoma A375, ćelijska linija karcinoma prostate PC-3 i ćelijska linija karcinoma prostate DU 145. Takođe, ispitivanje je vršeno i na dve normalne humane ćelijske linije, ćelijskoj liniji humanih fetalnih fibroblasta pluća MRC-5 i humanoj ćelijskoj liniji keratinocita HaCaT. Epitaksifolin (7) nije ispitan zbog male izolovane količine. Ekstrakti su dobijeni iz drvenastog dela biljke i imali su drugačiji sastav u odnosu na ekstrakte drugih delova biljke. Iz literaturnih podataka poznato je da postoje regionalne varijacije u hemijskom profilu biljaka, pa je tako očekivano da postoje i u srži *C. coggynia*, zavisno od edafoklimatskih faktora. Međutim, komparativne studije su retke i nema dovoljno studija koje su se bavile samom srži (Antal et al., 2021). Halkon butein (11) pokazao je najizraženiji citotoksični efekat prema svim ispitivanim ćelijskim linijama tumora, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 8,66  $\mu M$  na HeLa ćelijama do 90,52  $\mu M$  na DU 145 ćelijama. Citotoksični efekti buteina (11) zabeleženi su na različitim vrstama tumorskih ćelija, uključujući hroničnu mijeloidnu leukemiju K562, akutnu promijelocitnu leukemiju HL-60, trostruko negativni karcinom dojke MDA-MB-231 i maligni melanom A375. Pored toga, butein (11) je imao koeficijent selektivnosti od 9,91 za MRC-5 i 4,21 za HaCaT ćelije u poređenju sa njegovom citotoksičnošću prema HeLa ćelijama. Uticaj buteina na preživljavanje ćelija procenjen je MTT testom u drugoj studiji, pri čemu je utvrđena zavisnost citotoksičnosti od doze i vremena na ćelijama humanog karcinoma grlića materice C-33A i SiHa. Prema podacima iz literature,  $IC_{50}$  za SiHa ćelije nakon 72 sata inkubacije sa buteinom iznosila je 8,30  $\mu M$ , što je u skladu sa rezultatom našeg istraživanja (8,66  $\mu M$  za HeLa ćelije nakon istog vremena inkubacije) (Yang et al., 2018b). U poređenju sa njegovim zatvorenim auronskim analogom, sulfuretinom (10), butein (11) je pokazao bolju citotoksičnu aktivnost. Flavanon butin (1) ispoljio je snažan citotoksični efekat i selektivnost prema K562 liniji leukemije, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 19,67  $\mu M$ . Slični nivoi osetljivosti zabeleženi su i kod dve vrste karcinoma prostate, DU 145 (186,03  $\mu M$ ) i PC-3 (195,57  $\mu M$ ). Prema nama dostupnim informacijama u literaturi, ne postoje podaci o citotoksičnoj aktivnosti butina. Važno je napomenuti da dodatna hidroksilna grupa u položaju 3 kod fustina (2) ili u položaju 5 kod eriodiktiola (4), kao i metoksi grupa u položaju 3 kod 3-O-metilfustina (3), značajno umanjuju citotoksičnu aktivnost. Fisetin (8) pokazao je izraženu citotoksičnu aktivnost na malignim ćelijskim linijama HL-60 i MDA-MB-231, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 42,79  $\mu M$  i 45,05  $\mu M$ . Na normalnim ćelijama MRC-5, fisetin nije pokazao citotoksičnost pri koncentraciji od 400  $\mu M$ , što je u skladu sa literaturnim nalazima koji ukazuju na to da fisetin ima minimalan ili slab efekat na zdrave ćelije, čak i pri koncentracijama koje su izrazito citotoksične za ćelije karcinoma dojke (Smith et al., 2016). Kombinacija fisetina i 5-fluorouracila pokazala je smanjenje ukupnog broja intestinalnih tumora. Fisetin bi mogao biti korišćen kao preventivno sredstvo i adjuvantna terapija uz 5-fluorouracil za lečenje *PIK3CA*-mutiranog kolorektalnog karcinoma (Khan et al., 2019a). Ćelije MDA-MB-453 pokazale su inverznu zavisnost broja ćelija od koncentracije fisetina, gde je porast koncentracije od 0 do 100  $\mu M$  doveo do smanjenja broja ćelija u različitim vremenskim intervalima (Guo et al., 2019). Prema istraživanju Yinga i saradnika, fisetin ispoljava antitumorsko delovanje i indukuje apoptozu u HeLa ćelijama zavisno od doze i vremena, *in vitro* i *in vivo* (Ying et al., 2012). Sulfuretin (10) je pokazao citotoksičnost prema hroničnoj mijeloidnoj leukemiji K562 sa  $IC_{50}$  vrednošću od 21,94  $\mu M$  i vrednostima koeficijenta selektivnosti (KS) 7,05 (MRC-5) i 5,75 (HaCaT) u poređenju sa K562 ćelijama. Sa KS = 7,05 sulfuretin je pokazao najveću selektivnost citotoksične aktivnosti prema K562 ćelijama među svim ispitivanim jedinjenjima i ekstraktima testiranim na ovoj liniji. U poređenju sa sulfuretinom, njegov auronol, sulfuretin auronol (12), ispoljio je citotoksičnost samo prema HL-60 i K562 ćelijama leukemije, bez efekata na druge ispitivane maligne i normalne ćelijske linije, što ukazuje da dodatna hidroksilna grupa u C-2 i prekid rezonance i delokalizacije elektrona negativno utiču na citotoksičnu aktivnost. Osetljivost ćelijske linije humane akutne promijelocitne leukemije HL-60 i ćelijske linije humanog histiocitnog limfoma U937 na sulfuretin (10) bila je visoka, sa  $IC_{50}$  vrednostima 56,8  $\mu M$  i 76,3  $\mu M$  (Lee

et al., 2012), što je u skladu sa rezultatima naše studije u okviru doktorske disertacije za HL-60 ćelijsku liniju. Sulfuretin (10) i sulfuretin auronol (12) pokazali su značajnu citotoksičnost prema HL-60 ćelijama sa  $IC_{50}$  vrednostima 36,24  $\mu$ M i 42,50  $\mu$ M. Pored toga, sulfuretin auronol (12) imao je  $KS > 9,41$  prema obe ispitivane normalne ćelijske linije. Naši rezultati pokazali su da su  $IC_{50}$  vrednosti za eriodiktiol (4) na malignim ćelijskim linijama bile relativno niske, sa izuzetkom citotoksičnosti prema MDA-MB-231 ćelijama. U studiji Debnatha i saradnika eriodiktiol (4) je testiran u koncentracijama 0-200  $\mu$ M na četiri maligne ćelijske linije: ćelijska linija humanog karcinoma bubrežnih ćelija SK-RC-45, ćelijska linija humanog karcinoma grlića materice HeLa, ćelijska linija humanog kolorektalnog karcinoma HCT-116 i ćelijska linija humanog karcinoma dojke MCF-7 (Debnath et al., 2022). Slično našim rezultatima, eriodiktiol je pokazao dobru selektivnost citotoksične aktivnosti prema ćelijama karcinoma dojke ( $KS > 2,66$ ; u našem istraživanju 3,02 i 3,35), iako je jača citotoksičnost zabeležena prema MDA-MB-231 nego prema MCF-7 ćelijama, kao što su pokazali i Debnath i saradnici (Debnath et al., 2022).  $IC_{50}$  vrednosti više od 100  $\mu$ M i niska selektivnost eriodiktiola potvrđene su za HeLa ćelije. Prema nama dostupnim podacima, u literaturi ne postoje izveštaji o citotoksičnoj aktivnosti kotinignana A (13), s obzirom na to da je nedavno prvi put izolovan (Novaković et al., 2019). Kotinignan A (13) pokazao je značajnu citotoksičnost prema K562 i HeLa ćelijama, sa  $IC_{50}$  vrednošću od 19,04  $\mu$ M za K562. Takođe, kotinignan A (13) pokazao je sličnu citotoksičnost prema PC-3 i DU 145 ćelijama karcinoma prostate (oko 75  $\mu$ M). Fustin (2) nije pokazao citotoksičnost prema HeLa, DU 145, PC-3, HL-60, HaCaT i MRC-5 ćelijama. Aktivnost je ispoljena samo prema MDA-MB-231, K562 i A375 ćelijskim linijama, što je u skladu sa nedavno objavljenom studijom u kojoj je prikazano antitumorsko dejstvo fustina prema B16, ćelijskoj liniji melanoma poreklom iz miša (Kumazoe et al., 2024). Kada su u pitanju citotoksični efekti tri ispitana ekstrakta, MME i EE pokazali su najjaču citotoksičnost prema HL-60 i K562 leukemijskim ćelijama. VE je ispoljio najjači citotoksični efekat prema HL-60 ćelijama. Tretman VE ispoljio je slabiju citotoksičnost na DU 145, MRC-5, A375, K562, HL-60, MDA-MB-231 i PC-3 ćelijama u poređenju sa MME i EE. Prema HeLa ćelijama, EE i VE imali su slične  $IC_{50}$  vrednosti, dok je MME pokazao niže  $IC_{50}$  vrednosti. Važno je razmotriti procenat jedinjenja u ekstraktima, naročito pri poređenju EE i VE. EE dobijen iz *C. coggygia* sadržao je 9,3% butina (1), 0,8% buteina (11) i 5,0% fisetina (8), dok VE nije sadržao fisetin (8), što može uticati na citotoksičnost ekstrakata. Pored toga, sadržaj sulfuretina (10) u EE iznosio je 14,4%, dok je u VE bio samo 3,4%, što takođe može doprineti razlikama u citotoksičnosti, a posledica je loše rastvorljivosti sulfuretina u vodi (Nossier et al., 2026). Poređenjem citotoksičnosti EE i VE može se zaključiti: EE je pokazao 2,6 puta jači citotoksični efekat prema K562 i gotovo isti prema A375 ćelijama u poređenju sa VE; VE je imao 28% više  $IC_{50}$  vrednosti na normalnim fibroblastima MRC-5; VE je ispoljio veće  $IC_{50}$  i, samim tim, manju citotoksičnost na svim ispitanim malignim ćelijskim linijama osim HeLa i DU 145; MME je pokazao jaču citotoksičnost na HeLa, PC-3 i DU 145 ćelijama nego EE i VE, dok su na K562, A375 i DU 145 ćelijama MME i EE imali sličnu citotoksičnost. Može se pretpostaviti da veći procenti sulfuretina (10), butina (1), buteina (11) i fisetina (8) u EE utiču na veću citotoksičnost prema leukemijskim ćelijama, ali takva tvrdnja zahteva dodatne dokaze. Ukratko, uticaj ekstrakata naspram pojedinačnih jedinjenja zavisi od više faktora: sastava ekstrakta, strukture i bioaktivnosti svake komponente, mogućih sinergijskih interakcija i osetljivosti ćelija. Efekat više jedinjenja u ekstraktu može biti sinergistički, antagonistički ili neutralan, što može rezultirati različitim nivoima citotoksičnosti u poređenju sa pojedinačnim jedinjenjima. Metanolni ekstrakti listova i cvetova *C. coggygia* ispitivani su na dve humane ćelijske linije karcinoma: HeLa i LS174 (Šavikin et al., 2009). Ekstrakt listova pokazao je veću potentnost na HeLa, dok je ekstrakt cvetova ispoljio blago jači efekat na LS174 ćelijama. Glavne komponente bile su galna kiselina i njeni derivati, sa samo tragovima urušiola (Šavikin et al., 2009). Gospodinova i saradnici ispitivali su vodeno-etanolni ekstrakt listova standardizovan na ukupne polifenole i flavonoide i pokazali značajnu citotoksičnost na MCF-7 ćelijama karcinoma dojke (Gospodinova et al., 2020). Ekstrakti listova i cvetova jasno se razlikuju od jedinjenja izolovanih iz drvenastih delova biljke ispitivanih u ovoj studiji. Potencijal modulacije ćelijskog

preživljavanja široko je prepoznat zbog terapijskog značaja u onkologiji, a trenutna studija pruža značajan podatak o visokom stepenu selektivnosti ekstrakta ruja u odnosu na neizmenjene linije MRC-5 i HaCaT, što do sada u literaturi nije pokazano i zabeleženo. Za poređenje, metanolni ekstrakt lista ruja pokazao je selektivnost prema neizmenjenoj ćelijskoj liniji bubrežnog epitela afričkog zelenog majmuna (Vero) u odnosu na izmenjene HeLa ćelije, sa KS većim od 3,4 (Artun et al., 2016). Butein, uz sulfuretin, izolovan iz taksonomski i hemotaksonomski slične vrste ruja, *Toxicodendron vernicifluum*, takođe se pokazao kao najsnažnija citotoksična komponenta ekstrakta ove biljke u različitim ćelijskim kulturama (ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma pluća: A549, ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma ovarijuma: SK-OV-3, ćelijskoj liniji humanog melanoma: SK-MEL-2 i ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog adenokarcinoma: HCT-15), kako su opisali Lee i saradnici (Lee et al., 2014b). Iako je literaturnih podataka o citotoksičnosti *C. coggygia* na ovim ćelijskim linijama malo, dostupni su podaci o ekstraktima hemijski i taksonomski srodne vrste *Toxicodendron vernicifluum*, gde su ekstrakti kore pokazali citotoksičnost na MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama (Kim et al., 2019b; Lee et al., 2014a). Ovi podaci dodatno potvrđuju opravdanost testiranja u okviru doktorske disertacije i ukazuju na značajan citotoksični potencijal jedinjenja i ekstrakata iz srži *C. coggygia*, uzimajući u obzir sličnost u vrsti i koncentraciji sekundarnih metabolita kod ove dve vrste.

Model 3D sferoida predstavlja fiziološki relevantniji eksperimentalni sistem u odnosu na klasične 2D monoslojne kulture, jer bolje odražava međućelijske interakcije, gradijente kiseonika i hranljivih materija, kao i difuzione barijere koje značajno utiču na odgovor ćelija na tretman (Nath & Devi, 2016; Stojanov et al., 2025). 3D sferoidima nastoje se prevazići ograničenja 2D modela, na primer omogućavanjem hipoksije i poređenja aktivnosti u nekrotičnim i mirujućim zonama (Stojanov et al., 2025). 3D modeli se koriste u skriningu biološki aktivnih materija iz biljaka (Okuyama et al., 2023). Nakon 72 sata tretmana, površina HeLa sferoida pokazala je različite promene u odnosu na početnu vrednost kontrolnih sferoida. Kada su rezultati posmatrani u odnosu na početno stanje, najveća relativna površina zabeležena je nakon tretmana sulfuretin auronolom, dok su relativno visoke vrednosti uočene i nakon tretmana eriodiktinom i EE. Tretmani butinom, taksifolinom i VE takođe su pokazali površine iznad početne kontrole, dok su vrednosti nakon tretmana fisetinom i sulfuretinom bile približne početnoj vrednosti. Niže relativne površine uočene su nakon tretmana fustinom, buteinom i MME. Međutim, kada su rezultati normalizovani u odnosu na kontrolne sferoide na kraju eksperimenta, svi tretmani pokazali su manju površinu u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Najizraženije smanjenje površine uočeno je nakon tretmana MME i buteinom, dok je najmanje smanjenje zabeleženo nakon tretmana sulfuretin auronolom. Ostala ispitivana jedinjenja i ekstrakti pokazali su intermedijarne promene u odnosu na kontrolne sferoide. Ovakav obrazac ukazuje da pojedini tretmani mogu uticati na promenu veličine HeLa sferoida tokom perioda od 72 sata, pri čemu je efekat zavisao od primenjenog jedinjenja. Posebno smanjenje površine nakon tretmana MME i buteinom može ukazivati na izraženiju promenu rasta ili organizacije sferoida u odnosu na kontrolu, dok relativno očuvanje površine nakon tretmana sulfuretin auronolom ukazuje na slabiju promenu ovog parametra. Ipak, površina sferoida predstavlja morfološki parametar i sama po sebi ne omogućava direktno zaključivanje o vijabilnosti, proliferaciji ili indukciji ćelijske smrti. Stoga ove nalaze treba razmatrati zajedno sa rezultatima funkcionalnih i molekularnih analiza kako bi se preciznije odredio biološki odgovor HeLa sferoida na ispitivane tretmane. Ovo sugerise da se ispitivana jedinjenja značajno razlikuju u sposobnosti delovanja u postavci sferoida, koji su zahtevniji i često vernije odražavaju *in vivo* otpornost na tretman nego monoslojne ćelijske kulture. Ipak, ove rezultate treba tumačiti kao preliminarne, jer je u ovom istraživanju u okviru doktorske disertacije dostupan samo po jedan biološki replikat, bez prikaza biološke varijabilnosti. Zbog toga se u ovom trenutku mogu izvesti samo deskriptivni zaključci, dok se statistička značajnost ne može proceniti. Buduća istraživanja sa biološkom varijabilnošću, analizom zavisnosti od doze i vremenskim praćenjem efekata bila bi neophodna kako bi se potvrdila stabilnost uočenih razlika i procenilo da li se isti redosled

aktivnosti održava i u drugim eksperimentalnim uslovima. Wan i saradnici opisuju kako je u 3D sferoidima sa ćelijskim linijama karcinoma dojke i fibroblastima specifičnim za tumorsku mikrosredinu ekstraktima biljaka *Petiveria alliacea* i *Caesalpinia spinosa* sprečeno unakrsno signaliziranje između ćelija karcinoma i fibroblasta (Wan et al., 2016). Na taj način, pokazano je indirektno dejstvo koje je sprečilo razvoj tumor-specifičnog fibroblastnog fenotipa (CAF, engl. cancer-associated fibroblast phenotype). Još jedan značajan neposredan efekat je smanjenje rasta 3D sferoida, vijabilnosti njihovih ćelija i povećanje broja nekrotičnih jedara, što su u svojoj studiji dokazali Lee i saradnici kao dejstvo buteina, izolovanog iz ruju srodne vrste, na ćelijama karcinoma prostate (Lee et al., 2025). Efekat je ipak bio manji nego onaj u 2D modelima, što je očekivan rezultat u saglasnosti sa rezultatima dobijenim i u okviru našeg istraživanja. Nakon 72 sata tretmana, površina MDA-MB-231 sferoida pokazala je izraženije promene u odnosu na početno stanje nego što je uočeno kod HeLa sferoida. Kada su rezultati posmatrani u odnosu na početnu vrednost kontrolnih sferoida, najveće povećanje površine zabeleženo je nakon tretmana sulfuretinom, dok je izraženo povećanje uočeno i nakon tretmana sulfuretin auronolom i fisetinom. Povećanje površine u odnosu na početno stanje registrovano je i nakon tretmana buteinom, fustinom, VE, butinom, MME i taksifolinom, dok je nakon tretmana EE površina ostala približna početnoj vrednosti. Kada su rezultati normalizovani u odnosu na kontrolne sferoide na kraju eksperimenta (72 sata), nakon većine tretmana površina sferoida bila je približna ili veća od odgovarajuće kontrole. Najizraženije povećanje u odnosu na kontrolu nakon 72 sata uočeno je nakon tretmana sulfuretinom, a zatim nakon tretmana sulfuretin auronolom i fisetinom. Povećana površina u odnosu na kontrolu zabeležena je i nakon tretmana fustinom i buteinom, dok su vrednosti nakon tretmana VE bile približne kontrolnim sferoidima. Nasuprot tome, nakon tretmana EE zabeleženo je izraženije smanjenje površine u odnosu na kontrolu, dok su butin, MME i taksifolin pokazali blago smanjenje ovog parametra. U poređenju sa HeLa sferoidima, MDA-MB-231 sferoidi pokazali su izraženije povećanje površine nakon pojedinih tretmana, naročito nakon primene sulfuretina, sulfuretin auronola i fisetina. Ovakav odgovor ukazuje na različitu morfološku reakciju dve ispitivane ćelijske linije na primenjena jedinjenja srži drveta ruja. Međutim, povećanje površine sferoida ne može se direktno interpretirati kao povećana proliferacija ili smanjena citotoksičnost, budući da na ovaj parametar mogu uticati i promene u organizaciji, kompaktnosti i strukturi sferoida. U 3D modelu HepG2 sferoida, najveću aktivnost pokazala je frakcija dobijena nakon gastrične faze gastrointestinalne digestije, koja je pri koncentraciji od 200 µg GAE/ml (GAE, ekvivalenti galne kiseline, engl. Gallic Acid Equivalents) smanjila vijabilnost sferoida za približno 40% (Pressete et al., 2026). Pressete i saradnici su pratili i vijabilnost i površinu/prečnik sferoida, i ispitivani tretmani menjali su površinu i prečnik sferoida, što je sa eksperimentalne strane slična postavka istraživanju u okviru doktorske disertacije (Pressete et al., 2026). Rezultati merenja relativne fluorescencije kalceina pokazali su da je odgovor HeLa sferoida zavisio od primenjenog jedinjenja i njegove koncentracije. Kod više ispitivanih tretmana uočena je tendencija smanjenja relativne fluorescencije sa povećanjem koncentracije, što je naročito bilo izraženo nakon tretmana buteinom, MME, EE i VE, sulfuretinom i fisetinom. Najizraženije promene pri višim koncentracijama uočene su nakon tretmana MME i sulfuretinom, dok je kod buteina takođe registrovan izražen pad fluorescencije sa povećanjem koncentracije (100-400 µM). Kod butina je uočen blaži koncentracijski zavisian pad relativne fluorescencije, uz nešto veću varijabilnost između merenja. EE i VE pokazali su sličan obrazac, sa izraženijim smanjenjem fluorescencije pri višim koncentracijama. Fisetin je takođe pokazao smanjenje relativne fluorescencije sa porastom koncentracije, pri čemu je najizraženija promena registrovana pri najvišoj koncentraciji (400 µM). Nasuprot tome, taksifolin je pokazao relativno stabilan nivo fluorescencije u ispitivanom koncentracionom opsegu (200-800 µM), bez izražene koncentracijski zavisne promene. Eriodiktiol je takođe pokazao relativno stabilne vrednosti pri nižim i srednjim koncentracijama, dok je pri najvišoj koncentraciji uočeno smanjenje. Fustin i sulfuretin auronol pokazali su manje izražene promene relativne fluorescencije u poređenju sa jedinjenjima kod kojih je uočena jasnija koncentracijska zavisnost. S obzirom na to da je kalcein korišćen kao indikator vijabilnosti ćelija,

smanjenje relativne fluorescencije sa povećanjem koncentracije može ukazivati na smanjenje udela metabolički aktivnih i vijabilnih ćelija unutar sferoida. Ipak, ovaj rezultat sam po sebi ne omogućava zaključivanje o mehanizmu smanjenja vijabilnosti niti razlikovanje između različitih oblika ćelijske smrti. Zbog toga rezultate kalcein testa treba razmatrati zajedno sa rezultatima drugih funkcionalnih i molekularnih analiza, posebno u kontekstu procene citotoksičnog odgovora ispitivanih jedinjenja. Rezultati merenja relativne fluorescencije kalceina u MDA-MB-231 sferoidima pokazali su izraženu koncentracijski zavisnu promenu nakon većine ispitivanih tretmana. Kod buteina, ispitivanog u koncentracijama od 100, 200 i 400  $\mu\text{M}$ , uočeno je postepeno smanjenje relativne fluorescencije sa povećanjem koncentracije. Sličan obrazac registrovan je i nakon tretmana butinom u istom koncentracionom opsegu, pri čemu je pad fluorescencije bio naročito izražen pri 400  $\mu\text{M}$ . Kod MME, EE i VE, ispitivanih u koncentracijama od 100, 200 i 400  $\mu\text{g/ml}$ , takođe je uočeno smanjenje relativne fluorescencije sa povećanjem koncentracije. Najizraženija promena registrovana je pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, odnosno 400  $\mu\text{g/ml}$ , posebno nakon tretmana MME. Sulfuretin, ispitivan u koncentracijama od 100, 200 i 400  $\mu\text{M}$ , pokazao je izražen koncentracijski zavisni pad kalcein-signala, sa naročito izraženom promenom pri 400  $\mu\text{M}$ . Fisetin, takođe ispitan u koncentracijama od 100, 200 i 400  $\mu\text{M}$ , pokazao je sličan obrazac, sa progresivnim smanjenjem relativne fluorescencije pri povećanju koncentracije. Kod taksifolina, ispitanog u koncentracijama od 200, 400 i 800  $\mu\text{M}$ , relativna fluorescencija je bila relativno očuvana pri nižim koncentracijama, dok je pri 800  $\mu\text{M}$  zabeleženo izraženije smanjenje. Fustin, ispitan u koncentracijama od 200 i 400  $\mu\text{M}$ , pokazao je blažu koncentracijski zavisnu promenu. Sulfuretin auronol, ispitan u koncentracijama od 200 i 400  $\mu\text{M}$ , pokazao je relativno očuvanje kalcein-signala pri nižoj koncentraciji i smanjenje pri višoj koncentraciji. Eriodiktiol, ispitan u koncentracijama od 400 i 800  $\mu\text{M}$ , pokazao je relativno očuvanje fluorescencije pri 400  $\mu\text{M}$ , uz smanjenje pri 800  $\mu\text{M}$ . U poređenju sa HeLa sferoidima, kod MDA-MB-231 sferoida uočen je izraženiji i konzistentniji koncentracijski zavisni pad relativne fluorescencije nakon većeg broja tretmana. Ovakav obrazac ukazuje na različit odgovor dve ćelijske linije na ispitivana jedinjenja i ekstrakte. Smanjenje fluorescencije može ukazivati na smanjenje broja ili aktivnosti vijabilnih ćelija u sferoidima. U celini, rezultati kalcein bojenja podržavaju zaključak da 3D sferoidni modeli mogu značajno doprineti karakterizaciji antitumorskog potencijala ispitivanih jedinjenja i ekstrakata, jer omogućavaju istovremeno sagledavanje promena u veličini sferoida i očuvanosti njihove vijabilne ćelijske komponente. Istovremeno, razlike između rezultata dobijenih merenjem površine i kalcein bojenja naglašavaju da ova dva parametra treba posmatrati komplementarno. Smanjenje površine može biti posledica inhibicije proliferacije ili promena u organizaciji i kompaktnosti sferoida, dok smanjenje signala nakon kalcein bojenja ukazuje na smanjenje metabolički aktivne, odnosno vijabilne ćelijske populacije. Zbog toga kombinovanje ova dva pristupa pruža potpuniju sliku odgovora 3D tumorskih modela na tretman. Posebno je značajno što su najaktivniji tretmani u velikoj meri zavisili od ćelijske linije. U tom kontekstu, rezultati dobijeni za pojedine ekstrakte i druge flavonoide predstavljaju osnovu za njihovo dalje ispitivanje u složenijim 3D sistemima, uz uključivanje većeg broja bioloških replikata, različitih koncentracija i vremenskih tačaka, kao i dodatnih markera proliferacije i ćelijske smrti. Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima koja ukazuju da se antitumorska aktivnost biljnih jedinjenja i ekstrakata može značajno razlikovati između 2D i 3D modela. Ispitivanje 34 biljna ekstrakta na modelima karcinoma dojke pokazalo je veću otpornost u 3D kulturama u odnosu na monoslojne kulture, što se povezuje sa otežanom permeabilizacijom jedinjenja i složenijom organizacijom sferoida (Phan et al., 2020). S druge strane, istraživanja na MCF-7 sferoidima pokazala su da ekstrakt zelenog čaja može biti aktivniji od izolovanog epigalokatehin-3-galata (EGCG), ukazujući na mogući doprinos aditivnog ili sinergističkog delovanja više komponenti (Santos et al., 2024). Slični nalazi dobijeni su i za biljne ekstrakte u 3D modelima leukemije i trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, gde su ekstrakti zadržali izraženu antitumorsku aktivnost (Prada et al., 2024).

Antimigratorno istraživanje ekstrakata i jedinjenja ruja u okviru doktorske disertacije prvo je koje izveštava o antimigratornim efektima ekstrakata srži *C. coggygia*, ukazujući na izuzetan antitumorski potencijal ove biljke kao bogatog izvora bioaktivnih materija. Uticaj ekstrakata srži *C. coggygia* i tri izolovana jedinjenja na ekspresiju onkogenih uključenih u invaziju i angiogenezu (*MMP2*, *MMP9* i *VEGFA*) pokazao je da je samo tretman EE značajno smanjio ekspresiju *MMP2*, što može ukazivati da specifična kombinacija jedinjenja u ovom ekstraktu smanjuje migratorni potencijal HeLa ćelija. S druge strane, tretman sulfuretinom smanjio je ekspresiju *VEGFA*, što takođe može doprineti smanjenju migracije. Pokazano je da ekstrakti i pojedinačna jedinjenja inhibiraju migraciju ćelija cervikalnog karcinoma i da različite komponente mogu regulisati specifične signalne puteve. Rastvarač može značajno uticati na procenat aktivnih materija u matriksu ekstrakta, a samim tim i na njihov eventualni sinergizam i/ili antagonizam i, konačno, na intenzitet citotoksične aktivnosti. Tako je u ovom istraživanju pronađeno da MME i EE drveta ruja imaju intenzivnije citotoksično dejstvo na ćelijsku liniju HL-60 (ali i niz drugih malignih ćelijskih linija) nego vodeni ekstrakt istog materijala. Interesantno je da je tretman ovim ekstraktima kod HeLa ćelijske linije u manjoj meri umanjio nivo ekspresije gena za matriksnu metaloproteazu-9, dok izolovana jedinjenja mogu delovati suprotno, upućujući još jednom na činjenicu da efekat biljnog ekstrakta u matriksu nije jednak prostom zbiru dejstva njegovih komponenti. Ovo može biti posledica tzv. efekta pratnje (engl. *entourage effect*), fenomena opisanog u fitomedicinskim istraživanjima, pri kojem kombinacija različitih bioaktivnih jedinjenja iz biljke može ispoljiti snažniji ili kvalitativno drugačiji biološki efekat u odnosu na efekte pojedinačnih komponenti. Posebno se ovaj fenomen razmatra kod kanabinoida, ali i kod drugih biljnih bioaktivnih jedinjenja, uključujući flavonoide (André et al., 2024; Caesar & Cech, 2019). Značajan antimigratorni efekat koji su MME ( $p < 0,05$ ), EE ( $p < 0,01$ ), VE ( $p < 0,01$ ), butin ( $p < 0,05$ ), butein ( $p < 0,01$ ) i sulfuretin ( $p < 0,01$ ) ispoljili na HeLa ćelijama nakon 48 sati inkubacije sugerise da ovi ekstrakti i jedinjenja mogu modulisati ćelijsku migraciju, što je ključan proces u invaziji i metastaziranju. Posebno je interesantno što je MME pokazao najsnažniji inhibicioni efekat, pri čemu je rana ostala otvorena 71,64% nakon 48 sati, što ukazuje na potencijalno selektivan i efikasan mehanizam delovanja ovog ekstrakta na migratorne puteve ćelija. Sulfuretin i butin su takođe pokazali izražen supresivni efekat (47,88% i 44,19%), što može biti povezano sa njihovim sposobnostima da inhibiraju signalne puteve povezane sa reorganizacijom citoskeleta i pokretljivošću ćelija. Butein je imao nešto slabiji efekat (37,91%), što ukazuje na razlike u bioaktivnosti flavonoida u zavisnosti od njihove hemijske strukture i interakcija na molekularnom nivou unutar ćelija. Ovi nalazi podržavaju prethodna istraživanja koja su pokazala da polifenoli i specifični biljni ekstrakti mogu značajno uticati na migraciju tumorskih ćelija, sugerisući njihov potencijal u antimetastatskoj terapiji. Na primer, flavonoid artemetin i njegovi derivati delovali su antimigratorno prema sličnoj metodologiji, takođe na HeLa ćelije u scratch eseju, a kao ciljane molekule imali su filamine A i B, izazivajući deorganizaciju aktinskih filamenata i značajno smanjujući migratorni potencijal i zarastanje rane, kao što su pokazali Ferraro i saradnici (Ferraro et al., 2022). Ekstrakti celovitih delova biljaka poput vodeno-etanolnog ekstrakta *Fridericia platyphylla* pokazali su značajan antimigratorni potencijal kod HeLa i SiHa linija u ovom eseju (Brito et al., 2025). Takođe, vodeno-etanolni ekstrakt ploda vrste srodne ruju, *Rhus coriaria*, pokazao je antimigratorni potencijal u ćelijskoj liniji izmenjenih ćelija grlića materice, nakon 24 sata (15-35% inhibicije zarastanja), što je skromniji rezultat od rezultata dobijenog u ovoj studiji, ali podržava opravdanost testiranja srži ruja budući da se radi o sličnom hemijskom profilu biljaka (Abdallah et al., 2019).

Uticaj ekstrakata i jedinjenja dobijenih iz *C. coggygia* na raspodelu faza ćelijskog ciklusa u HeLa ćelijama tretiranim  $IC_{50}$  i  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama tokom 24 sata i 48 sati bio je istražen. Ispitani ekstrakti (EE, VE, MME) i jedinjenja (butin, butein i sulfuretin) povećali su procenat HeLa ćelija u subG1 fazi u odnosu na kontrolne ćelije, što ukazuje na indukciju apoptoze. Najizraženije povećanje subG1 populacije nakon 24 sata primećeno je kod ćelija tretiranih buteinom pri  $IC_{50}$  koncentraciji (37,40% u poređenju sa

0,84% u kontrolnoj grupi,  $p < 0,05$ ), dok je tretman  $2 \times IC_{50}$  dao sličan efekat (34,66% naspram 0,84%,  $p < 0,05$ ). Nakon 48 sati, značajno povećanje subG1 populacije primećeno je kod ćelija tretiranih VE pri  $IC_{50}$  koncentraciji (31,27% u poređenju sa 2,1% u kontrolnoj grupi,  $p < 0,05$ ). MME i EE su pratili ovu tendenciju sa 21,29% i 20,47% ćelija u subG1 fazi, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno. EE je izazvao značajno povećanje procenta ćelija u S fazi nakon 24 sata tretmana  $IC_{50}$  koncentracijom ( $p < 0,01$ ) i nakon 48 sati tretmana  $2 \times IC_{50}$  ( $p < 0,05$ ). VE je izazvao zastoj u S fazi nakon 24 sata i 48 sati tretmana sa  $2 \times IC_{50}$  ( $p < 0,05$ ), dok su MME i sulfuretin takođe povećali procenat ćelija u S fazi nakon 48 sati inkubacije, pri čemu je efekat sulfuretina bio statistički značajan ( $p < 0,01$ ). Povećanje ćelija u G2/M fazi primećeno je nakon 48 sati tretmana buteinom, butinom, EE, MME i VE u različitim koncentracijama, pri čemu je povećanje kod  $2 \times IC_{50}$  butina bilo statistički značajno ( $p < 0,05$ ). Nadalje, primećeno je značajno nakupljanje ćelija u S fazi nakon 48 sati tretmana, što je u skladu sa razlikama u modelima ćelijskih linija u odnosu na nalaze Moona i saradnika (Moon et al., 2010). Tretman HeLa ćelija  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama ekstrakata i jedinjenja takođe je povećao procenat ranih i kasnih apoptotskih ćelija u odnosu na netretirane kontrole. Posebno, VE je povećao procenat apoptotskih ćelija na 27,90% u poređenju sa 3,91% u kontrolama, sa značajnim povećanjem kasnih faza apoptoze ( $p < 0,01$ ). MME je izazvao značajno povećanje kako ranih (9,09%,  $p < 0,05$ ), tako i kasnih (14,21%,  $p < 0,05$ ) apoptotskih ćelija, ukupno 23,30% u poređenju sa kontrolom (3,91%). Zanimljivo, MME je više indukovao ranu apoptozu, dok je VE više uticao na kasnu apoptozu. EE je povećao procenat PI pozitivnih, aneksin-V negativnih mrtvih ćelija (17,50% naspram 1,16%) i apoptotskih ćelija u ranoj i kasnoj fazi (21,63% naspram 3,91%,  $p < 0,05$ ). Sulfuretin je značajno povećao procenat mrtvih ćelija (27,88% naspram 1,16%,  $p < 0,01$ ), dok je butin pokazao nešto jači efekat od buteina, sa značajnim povećanjem apoptotskih ćelija (14,47% naspram 3,91%,  $p < 0,01$  za ranu i  $p < 0,05$  za kasnu apoptozu). Butein je povećao procenat apoptotskih ćelija sa 3,91% na 11,63%, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Predtretman HeLa ćelija inhibitorom kaspaze-3 pre izlaganja  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama EE, VE, MME, butina i sulfuretina doveo je do smanjenja subG1 populacije u poređenju sa tretmanom samo ekstraktima ili jedinjenjima. Sulfuretin je, u skladu sa studijom Lee i saradnika, značajno povećao aktivaciju kaspaza-8, -9 i -3 i cepanje supstrata poli(ADP-riboza) polimeraze (engl. Poly [ADP-Ribose] Polymerase, PARP) u HL-60 ćelijama (Lee et al., 2012). Sličan efekat, mada blaži, primećen je kod buteina (12,26% naspram 15,79%). Najizraženije smanjenje subG1 populacije (4,48% naspram 15,02%) zabeleženo je kod ćelija tretiranih VE u kombinaciji sa inhibitorom kaspaze-3. Predtretman inhibitorom kaspaze-8 pre tretmana  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama svih jedinjenja i ekstrakata doveo je do značajnog smanjenja subG1 populacije u poređenju sa tretmanom samo ekstraktom ili jedinjenjem. Najizraženiji efekti primećeni su kod MME, EE i VE (1,08% naspram 11,48%, 1,16% naspram 10,53% i 1,66% naspram 15,02%, redom), što ukazuje na ključnu ulogu kaspaze-8 u iniciranju apoptoze ovim ekstraktima. Sličan trend primećen je i kod predtretmana inhibitorom kaspaze-9, pri čemu su najveća smanjenja zabeležena kod MME, EE i VE (1,01% naspram 11,48%, 1,28% naspram 10,53% i 1,88% naspram 15,02%). Ovi nalazi sugerišu da ekstrakti i jedinjenja iz *C. coggygria* mogu inicirati apoptozu u HeLa ćelijama kroz aktivaciju kaspaza-3, -8 i -9, što se poklapa sa rezultatima Gospodinove i saradnika, gde je ekstrakt suvih listova *C. coggygria* povećao subG1 populaciju MCF-7 ćelija (Gospodinova et al., 2020). U ovoj studiji dodatno je istraženo kako ekstrakti i jedinjenja dobijena iz srži drveta *C. coggygria* utiču na raspodelu faza ćelijskog ciklusa u K562 ćelijama nakon tretmana  $IC_{50}$  i  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama tokom inkubacije od 24 i 48 sati. Nakon 24 sata tretmana, značajno povećanje subG1 faze primećeno je kod ćelija tretiranih buteinom ( $p = 0,0069$ ), sulfuretinom ( $p = 0,0006$ ), EE ( $p = 0,0240$ ) i VE ( $p = 0,0086$ ) pri  $IC_{50}$  koncentraciji u poređenju sa kontrolom, što sugeriše ranu indukciju apoptoze. Biološka svojstva buteina široko su proučavana; uključuju antiinflamatorna, antioksidativna, neuroprotektivna i antitumorska dejstva (Padmavathi et al., 2017). Antitumorski lekovi često deluju preko regulacije ćelijskog ciklusa, a za butein je pokazano da može da izazove zastoj ćelijskog ciklusa u G2/M fazi, praćen indukcijom apoptoze, u zavisnosti od koncentracije i vremena inkubacije (Moon et

al., 2010). Najizraženije povećanje subG1 populacije nakon 48 sati primećeno je kod ćelija tretiranih VE pri  $2 \times IC_{50}$  koncentraciji (41,87% u poređenju sa 5,08% u kontroli). Ovi rezultati, posebno na humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7, su u dobroj saglasnosti sa nalazima Gospodinove i saradnika koji opisuju značajan procenat ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa po tretmanu ekstraktom listova *C. coggygria* (Gospodinova et al., 2017). Butein je izazvao najveći G1 zastoje nakon 24 sata pri  $IC_{50}$  koncentraciji (57,80% u poređenju sa 45,04% u kontroli), mada opisana promena nije bila statistički značajna. Nakon 48 sati tretmana  $2 \times IC_{50}$  koncentracijom, butein je izazvao G2/M zastoje ( $p = 0,0175$ ). VE ( $p = 0,0008$ ) i MME ( $p = 0,0008$ ) takođe su izazvali značajno povećanje subG1 populacije nakon  $IC_{50}$  tretmana tokom 48 sati, što dodatno potvrđuje njihovu sposobnost da indukuju apoptozu. Tretman K562 ćelija  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama ekstrakata (EE, VE, MME) i jedinjenja (butin, butein, sulfuretin) povećao je procenat ranih i kasnih apoptotskih ćelija u poređenju sa kontrolom. Butein je značajno povećao ukupnu populaciju apoptotskih ćelija na 27,97% (u poređenju sa 2,94% u kontroli), utičući na ranu ( $p = 0,0142$ ) i kasnu apoptozu. Slično tome, VE je izazvao povećanje apoptotskih ćelija na 29,99% naspram 2,94%, sa značajnim efektom u ranoj ( $p = 0,0458$ ) i kasnoj fazi apoptoze ( $p = 0,0487$ ). Sve grupe tretmana pokazale su povećan procenat kasno apoptotskih ćelija. VE i MME su značajno povećali broj mrtvih ćelija (PI pozitivne, aneksin-V negativne) ( $p = 0,0217$  i  $p = 0,0027$ , redom). U K562 ćelijskoj liniji, butein je bio efikasniji od butina u indukciji apoptoze, dok je sulfuretin pokazao nešto slabiji efekat. Među ekstraktima, VE je bio najefikasniji u indukciji apoptoze, dok su EE i MME pokazali slične sposobnosti. Jedan od mogućih razloga za izraženiju aktivnost vodenih ekstrakata jeste različita rastvorljivost pojedinih bioaktivnih komponenti. Određene glikozidne forme flavonoida, odnosno flavonoidni derivati vezani za šećerne ostatke, kao i pojedine fenolne kiseline i polisaharidi, bolje su rastvorljivi u vodi nego u sistemima voda-etanol ili u čistom etanolu. Imajući u vidu da pojedina od ovih jedinjenja mogu ispoljavati proapoptotsko i druga biološki relevantna dejstva, njihova veća rastvorljivost u vodi može doprineti efikasnijoj ekstrakciji, a samim tim i izraženijoj biološkoj aktivnosti vodenih ekstrakata. U našem slučaju, u VE, pored nekih flavonoida kao što su fustin, sulfuretin i drugi koji nisu glikozilovani i slabije se rastvaraju u vodi, više su zastupljeni tanini i derivati galne kiseline za koje je poznato da imaju značajnu citotoksičnu aktivnost (Bai et al., 2025). Ukupno, ovi nalazi ukazuju da ekstrakti i flavonoidi iz *C. coggygria* efikasno indukuju apoptozu u HeLa i K562 ćelijama, uz selektivnu modulaciju različitih faza ćelijskog ciklusa i aktivaciju ključnih kaspaza, što može biti osnova njihovog antitumorskog delovanja i dodatno potvrđuje njihov potencijal za dalja istraživanja. Dobijeni rezultati pokazali su da samo MME ekstrakt izolovan iz srži drveta vrste *C. coggygria* može indukovati apoptozu u K562 ćelijama putem aktivacije kaspaza-3, -8 i -9, dok je EE indukovao apoptozu aktivacijom kaspaza-3 i -8. Dok je regulacija unutrašnjih i spoljašnjih apoptotskih puteva ekstraktima ruža slabo proučena, slično dejstvo na kaspaze (aktivacija kaspaza-3, -8 i -9 i cepanje PARP) u K562 ćelijskoj liniji pokazali su ekstrakti biljaka *Nitraria retusa* i *Punica granatum* (Asmaa et al., 2015; Boubaker et al., 2011), što je u dobroj saglasnosti sa rezultatima iz istraživanja u okviru doktorske disertacije. Rezultati dobijeni u ovom radu na K562 ćelijskoj liniji otvaraju prostor za dalja, detaljnija mehanistička istraživanja.

Nakon 24 sata tretmana netoksičnim koncentracijama butina na neizmenjenim humanim MRC-5 ćelijama, zabeležen je blag pad intraćelijske koncentracije ROS. U eksperimentu sa indukovanim oksidativnim stresom vodonik-peroksidom, utvrđeno je da butin ne samo da nije smanjio nivo ROS, već ih je udvostručio. Nasuprot tome, u studiji Zhanga i saradnika, butin je smanjio nivo ROS koji je bio povećan dejstvom  $H_2O_2$  u fibroblastima pluća kineskog hrčka (V79-4) (Zhang et al., 2010). Vodonik-peroksid povećao je nivo 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina (8-OHdG), markera oštećenja DNK usled ROS, dok je butin, prema studiji Kanga i saradnika, smanjio njegov nivo (Kang et al., 2009). Naši rezultati pokazuju suprotno. Antioksidativna aktivnost raznih ekstrakata ruža dobro je proučena u *in vitro* hemijskim esejima i pokazuje izuzetnu redukcionu sposobnost i antioksidativno dejstvo. Tako su Šavikin i saradnici pokazali da ekstrakti listova i cvetova ispoljavaju izraženu antioksidativnu aktivnost u DPPH

testu i probi inhibicije lipidne peroksidacije (Šavikin et al., 2009). Dodatno, Sukhikh i saradnici pokazali su značajnu redukciju sposobnost u FRAP eseju i procenili ukupnu antioksidativnu aktivnost ekstrakata (lista, etil-acetatna frakcija) ruja na oko 145 mg ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu ekstrakta (Sukhikh et al., 2021).

U ovoj studiji, sve tri vrste ekstrakta srži ruja, ali i sulfuretin i butein smanjili su koncentraciju ROS u kulturi neizmenjenih MRC-5 ćelija *in vitro*. Butin je takođe pokazao graničan efekat smanjenja ROS u istoj postavci eksperimenta, ali u znatno manjoj meri. EE je indukovao najizraženiju, statistički značajnu redukciju nivoa ROS u ćelijama MRC-5. Slično koncipirana studija na biljnom materijalu *Raphanus sativus* pokazala je da frakcionisanje listova polarnijim rastvaračima značajno efikasnije snižava nivo ROS u MRC-5, gde je postavka eksperimenta bila ista kao u ovoj studiji u okviru doktorske disertacije (indukcija ROS vodonik-peroksidom) i koreliše sa najvišom koncentracijom fenolnih komponenti u tom ekstraktu (Luo et al., 2018). Ovakav rezultat potkrepljuje činjenicu da je EE u ovom radu pokazao snažnije ROS inhibitorno dejstvo od MME, koji je uopšte uzev manje polarnosti, mada ne objašnjava zašto je najpolarniji VE pokazao nešto slabiju aktivnost od EE. Moguće je da i neke slabo polarne komponente, rastvorljive u etanolu, ali ne i u vodi (poput terpenoida), doprinose snižavanju intraćelijskih nivoa ROS kada je njihova produkcija podstaknuta tretmanom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neobično je da je butin kao izolovano jedinjenje imao minimalan efekat na inhibiciju ROS ili čak imao prooksidativno dejstvo. Ipak, pojava paradoksalnog prooksidativnog delovanja antioksidantnih molekula, usled neadekvatne doze, produženog delovanja ili specifičnog ćelijskog stanja, nije retkost. Tako antioksidanti mogu povećati nivo ROS kada deluju u ishemičnom tkivu ili ćelijama izloženim toksičnom delovanju ili jonima nekih metala (posebno Fe i Cu) (Bouayed & Bohn, 2010; Kozlov et al., 2024). Dodatno, hronično izlaganje tipičnim antioksidantima u ćelijskim sistemima je već opisano kao izazivač povećane ROS produkcije, što je dokazano na primerima melatonina, koji nakon inkubacije od 24 sata u HepG2 ćelijskoj liniji pokazuje antioksidativno delovanje, a 96 sati nakon tretmana dovodi do povećanja ROS (Osseni et al., 2000). Slično tome, egzogeni sintetički antioksidanti poput N-acetilcisteina ili tokoferola, po hroničnom izlaganju u istim dozama, rezultirali su povećanom ROS produkcijom u kulturi adipocita (Peris et al., 2018). Prema našem najboljem saznanju, uvidom u literaturu u trenutku podnošenja ove studije, nema drugih istraživanja na ruju koja su procenjivala efekat njegovih ekstrakata na koncentraciju intraćelijskih ROS u kulturi ćelija MRC-5. Dosadašnje studije ukazuju da ekstrakti ruja modulišu markere oksidativnog stresa i urođene antioksidativne sisteme, uključujući enzimske i glutathion-posredovane mehanizme, na ćelijskom i sistemskom nivou (Aksoy et al., 2016; Matić et al., 2016; Sukhikh et al., 2021). Sukhikh i saradnici su pokazali da ekstrakti ruja utiču na povećanje redukovane forme glutathiona i antioksidantnih enzima CAT i GPx u enzimskim esejima (Sukhikh et al., 2021). Šavikin i saradnici opisuju korelaciju između antioksidativne *in vitro* aktivnosti ekstrakata ruja i smanjenja oštećenja indukovanih oksidativnim stresom u humanoj ćelijskoj liniji cervikalnog karcinoma i humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma debelog creva, mada bez direktnog praćenja koncentracije intraćelijskih ROS (Šavikin et al., 2009). Hepatoprotektivno i donekle sistemski protektivno dejstvo metanolnog ekstrakta ruja od pirogalolom-indukovanog oksidativnog stresa pokazali su Matić i saradnici u *in vitro* i *in vivo* studiji, na model-organizmu, Wistar pacovima (Matić et al., 2013b). Autori pomenute studije takođe opisuju smanjenje markera oksidativnog stresa poput tiobarbituratnih derivata i povećanje nivoa antioksidantnih enzima. Sulfuretin je u ovom istraživanju značajno smanjio nivo intraćelijskih ROS (za oko 50%) indukovanih vodonik-peroksidom; međutim, izraženiji efekat uočen je kod matriksnih biljnih ekstrakata, što ukazuje na doprinos drugih prisutnih bioaktivnih komponenti i potencijalnu sinergiju. Kao što je već pomenuto, neki sekundarni metaboliti, a posebno kanabinoidni i flavonoidni bioaktivni metaboliti, ispoljavaju drugačiji efekat u rastvaraču nego što je za očekivati od prostog zbira delova (André et al., 2024; Caesar & Cech, 2019). Ovakav efekat može dodatno doprineti objašnjenju naizgled paradoksalnog ponašanja opisanog kod butina, odnosno povećanja intraćelijskih ROS u okviru

ovog istraživanja, pod definisanim uslovima. U drugim studijama, sulfuretin je pokazao sposobnost redukcije intraćelijskih ROS u hepatocitima izloženim oksidativnom stresu indukovanom terc-butil-hidroperoksidom, posredstvom modulacije Nrf2/ARE signalnog puta i aktivnosti hem-oksigenaze (Lee et al., 2014a). Slično tome, butein je smanjivao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukovanu produkciju ROS u H9c2 ćelijama, takođe putem Nrf2 signalnog puta, uz istovremeno povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima (SOD1/2, CAT), što su pokazali Tungalag i saradnici (Tungalag et al., 2022). U butein-senzitivnim linijama karcinoma dojke, butein je ispoljio antioksidativno dejstvo, smanjujući koncentraciju ROS, što je korelisalo sa indukovanom ćelijskom smrću, sugerišući da je kontekst redukcije ROS ključan za konačnu biološku aktivnost buteina (Cho et al., 2014).

Pri izvođenju komet eseja u cilju utvrđivanja genotoksičnosti, najizraženije povećanje *tail intensity*, odnosno fragmentacije DNK molekula, u odnosu na kontrolu zabeleženo je nakon tretmana MME. Zbirno, svi ispitivani tretmani pokazali su veće vrednosti *tail intensity* u odnosu na kontrolu, pri čemu je intenzitet povećanja varirao u zavisnosti od tretmana. Ostali tretmani pokazali su blago do umereno povećanje ovog parametra u odnosu na netretirane ćelije.

Cilj istraživanja transkriptomskih podataka u okviru doktorske disertacije bio je da se detaljno ispituju antitumorska svojstva butina, buteina i sulfuretina, analizirajući njihov uticaj na puteve i pojedinačne gene metodom sekvenciranja molekula ukupne iRNK u ćeliji. To je ostvareno bioinformatičkim analizama podataka dobijenih sekvenciranjem i integrisanjem pristupa koji obuhvata i analizu visokih performansi (engl. *high-throughput*) i citometrijske eseje ćelija. *In vitro* antitumorski potencijal ispitivanih ekstrakata i jedinjenja je pokazan na leukemijskoj ćelijskoj liniji K562. Rezultati aneksin V-FITC/PI bojenja na HeLa ćelijskoj liniji su u skladu sa istraživanjem Tanga i saradnika koji su pokazali da butein izaziva statistički značajan, dozno-zavisan porast apoptotskih ćelija u akutnoj limfoblastnoj leukemijskoj liniji RS4-11 (Tang et al., 2016). Studije su pokazale da butein deluje citotoksično na više drugih maligniteta, uključujući pankreasni karcinom, karcinom jajnika, leukemiju, limfome i rak kože (Padmavathi et al., 2015). Pored toga, koliko nam je poznato, u vreme sprovođenja istraživanja u okviru doktorske disertacije nijedna studija nije izvestila o efektima butina i sulfuretina upotrebom metoda visokih performansi. DGE analiza je pokazala najveći broj DEG nakon tretmana buteinom (n = 809), manji broj DEG nakon tretmana butinom (n = 439), dok je tretman sulfuretinom rezultovao najmanjim brojem DEG (n = 299). Nadalje, tretmani buteinom i butinom indukovali su veći broj pozitivno regulisanih (engl. *up-regulated*) gena u poređenju sa negativno regulisanim (engl. *down-regulated*) genima, dok je sulfuretin doveo do približno jednakog broja pozitivno i negativno regulisanih gena. Venov dijagram prikazuje 134 DEG zajednička za sva tri tretmana, dok je 166 DEG bilo zajedničko za butin i butein, a 51 DEG zajednički za sulfuretin i butein. Samo 28 DEG bilo je zajedničko za butin i sulfuretin. Pet statistički najznačajnijih gena nakon tretmana butinom su: FTL, VGF, SLCO2B1/OATP2B1, NQO1 i PKLR (FDR vrednosti redom: 4,03733E-06, 4,92235E-06, 5,83737E-06, 9,9462E-06 i 1,03864E-05). Pet statistički najznačajnijih gena nakon tretmana buteinom su: NQO1, VGF, FTL, AKR1C1 i OSGIN1 (FDR vrednosti redom: 2,66443E-08, 2,66443E-08, 2,66443E-08, 2,66443E-08 i 2,66443E-08). Pet statistički najznačajnijih gena nakon tretmana sulfuretinom su: VGF, NQO1, PKLR, LRRC4B i SPTA1 (FDR vrednosti redom: 0,000155444, 0,000155444, 0,000155444, 0,000155444 i 0,000155444). Sama transkriptomska analiza ne može objasniti posttranskripcione, translacione i posttranslacione modifikacije, koje su ključne za funkcionalnost proteina i aktivaciju puteva. Stoga, da bi se potvrdila biološka značajnost uočenih promena na nivou transkripta, neophodna je funkcionalna validacija na nivou proteina. Tretman butinom, buteinom i sulfuretinom doveo je do smanjenja nivoa iRNK za *CCND1-CDK4*, koji deluju kao ključni regulatori prelaska iz G1 u S fazu (Baker et al., 2022). Fosforilacija Rb proteina od strane *D1-CDK4* kompleksa predstavlja kritičnu kontrolnu tačku u ćelijskom ciklusu, osiguravajući da ćelija pređe u S fazu samo kad su ispunjeni neophodni uslovi/signalni mehanizmi (Nevzorova & Trautwein, 2015). Inhibitori CDK4/6 predstavljaju

novu klasu lekova koji ometaju rast ćelija raka sprečavajući njihov prelazak kroz ćelijski ciklus (de Groot et al., 2017; Hirai et al., 1995). Iako se G1/S put često smatra jednostavnim regulatornim procesom, svaki element puta ima više homolognih proteina, a svi podležu posttranskripcionim, translacionim i posttranslacionim modifikacijama (Rubin et al., 2020). Pored toga, ključne pozitivne i negativne povratne petlje povezuju različite komponente puta (Rubin et al., 2020). Kompleks *CCNE1-CDK2* (koji su sva tri tretmana, butin, butein i sulfuretin, negativno regulisala) pokreće ćeliju preko *restriction point*-a i inicira sintezu DNK (Mansilla et al., 2020). Pored toga, CKI p18 i p19 su blago pozitivno regulisani u sve tri grupe tretmana. Prelazak iz G1 u S fazu zavisi od funkcije proteinskih kompleksa poput ciklin *D-CDK4/6* i ciklin *E-CDK2*. Ovi kompleksi fosforilišu Rb protein, što dovodi do otpuštanja E2F transkripcionog faktora i aktivacije gena koji promovišu replikaciju (Zhang et al., 2012). Smanjenje nivoa transkripata ovih kompleksa očekivano vodi ka akumulaciji ćelija u G1 fazi (Jana et al., 2018; Kumarasamy et al., 2025). Dodatno, produžetak G1 faze ili zastoje u G2 fazi može biti pokrenut transkripcionom aktivacijom *p21* inhibitora CDK preko p53, koji je odsutan u K562 ćelijama (GeneCards, n.d.). Očekuje se da povećani nivoi p18/p19 i smanjeni *CCND1/CCNE1-CDK* dovedu do G1 zastoja, ali citometrijski podaci su pokazali statistički značajan pad ćelija u G1 fazi za butin (za  $2 \times IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0306$ ; i  $IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0434$ ) i butein ( $2 \times IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0026$ ; i  $2 \times IC_{50}$ , 24 sata,  $p = 0,0390$ ). U ovom istraživanju, butin je doveo do smanjenja broja K562 ćelija u G1 fazi i bio je povezan sa smanjenjem sinteze ATP-a, splajsovanja i sinteze ribozoma. Ipak, primećen je porast u aktivaciji transkripcije stimulisan nervnim faktorom rasta (engl. Nerve Growth Factor, NGF), signalizacije putem *NTRK1* (*TRKA*), signalizacije putem *NTRK* i enzima za antioksidaciju/detoksikaciju regulisanih faktorom *NFE2L2*. Poznato je da butin aktivira *NFE2L2*-zavisnu indukciju Mn SOD putem *PI3K/AKT* signalnog puta, delujući kao antioksidant (Ross & Siegel, 2017), dok je dokumentovano da NRF2 transkripciono aktivira p21 (Long et al., 2000). Smanjenje proizvodnje ATP-a, što je slučaj za butin i butein, može imati redundantni uticaj unutar ćelija. Dodatno, metanolni ekstrakt nadzemnih delova *C. coggyria* pokazao je sposobnost indukcije zastoja u G1 fazi kod izmenjenih humanih adenokarcinoma dojke MCF-7 ćelija, kao i kod adenokarcinoma pluća A549, limfoblastoidne humane ćelijske linije TK6 i humane linije histiocitnog limfoma U937, što ukazuje na G0/G1 kontrolnu tačku kao mehanizam inhibicije proliferacije (Pollio et al., 2016). Regulacija napredovanja kroz S fazu i prelazak u G2 je pod kontrolom ciklina *A2/CDK2* (Pei et al., 2026). Procenat ćelija u S fazi značajno se smanjio sa VE tretmanom na obe koncentracije pri 24 sata inkubacije ( $IC_{50}$ ,  $p = 0,0242$ ; i  $2 \times IC_{50}$ ,  $p = 0,0123$ ), i buteinom ( $2 \times IC_{50}$ , 24 sata,  $p = 0,0153$ ). Međutim, nakon 48 sati tretmana butinom, buteinom i sulfuretinom, zabeležena je akumulacija ćelija u S fazi koja nije bila statistički značajna, ali je i dalje biološki relevantna, jer upućuje na dozno-zavisan efekat tretmana i potencijalno paradoksalno dejstvo nakon predugog izlaganja. Statistički značajno nagomilavanje dela ćelija u G2/M fazi primećeno je pri tretmanu buteinom i sulfuretinom. Sulfuretin je pokazao pomalo drugačiji RNK obrasac ekspresije: povećani *CCNA2* i *CCNH-CDK7*. Kod sulfuretina, akumulacija ćelija u S fazi bila je evidentna u poređenju sa kontrolom (osim u 24-časovnim tačkama). Međutim, razlika nije bila statistički značajna, ali je biološki konzistentna sa RNK profilom ekspresije. Statistički značajno smanjenje broja ćelija u G2/M fazi zabeleženo je nakon tretmana EE ( $2 \times IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0331$ ; i  $IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0141$ ) i VE ( $2 \times IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0044$ ). Takođe, statistički značajan G2/M zastoj ćelija posle tretmana buteinom ( $2 \times IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0175$ ) i sulfuretinom ( $IC_{50}$ , 48 sati,  $p = 0,0158$ ) je zabeležen. Dodatno, nakon tretmana buteinom ( $2 \times IC_{50}$ , 24 sata) primećen je, mada ne i statistički značajan, G2/M zastoj. VE sadrži niske procenat butina i sulfuretina, što podržava nalaze iz GSEA i citometrijskih testova (Pašić et al., 2025). Sulfuretin je ponovo pokazao pomalo drugačiji RNK obrazac, koji je u skladu sa rezultatima ćelijskih testova: statistički značajan ( $p = 0,0158$ ) G2/M zastoj posle 48 sati pri  $IC_{50}$  koncentraciji, karakterisan pozitivnom regulacijom *CCNA2* i *CCNB1*, i negativnom regulacijom *CDK1*. Zastoj u G2/M fazi može ukazivati na intenziviranje signalnih puteva stresa i/ili indukciju oštećenja DNK kod tretiranih ćelija. Novije istraživanje potvrdilo je sličan efekat etil-acetatno-vodenog ekstrakta listova *C. coggyria*

na HepG2 izmenjene ćelije jetre, uz dozno-zavisnu akumulaciju ćelija u S fazi i povećanu subG1 populaciju, dok su G1 i G2/M populacije očekivano smanjene (Sulikovska et al., 2026). Rezultati studije ukazuju da samo MME ekstrakt iz srži *C. coggygia* može izazvati apoptozu u K562 ćelijama putem kaspaza-3, -8 i -9. Rezultati na HeLa ćelijama cervikalnog karcinoma su pokazali da EE, VE i MME ekstrakti srži *C. coggygia* indukuju apoptozu aktivacijom kaspaza-3, -8 i -9. Takođe, spoljašnji put apoptoze je modulisan; tretman sulfuretinom i butinom je uzrokovao pozitivnu regulaciju svih spoljašnjih receptora: *TRAIL-R*, *Fas*, *perforin* i *TNF-R1*, dok je butein smanjio *Fas* i *perforin*, a povećao *TRAIL-R* i *TNF-R1*. Butein je pokazao statistički značajan porast ćelija K562 u ranom stadijumu apoptoze, dok su butin i sulfuretin pokazali statistički značajan porast ćelija u kasnoj apoptozi ispitivane ćelijske linije K562. Iako je butein značajno povećao udeo ćelija u kasnoj apoptozi, taj porast nije bio statistički značajan. Gen *OSGIN1* je statistički značajno pozitivno regulisan u tretmanima butinom (FDR: 4,02E-05) i buteinom (FDR: 2,66443E-08), sa log<sub>2</sub>FC od 1,02 u butinu i 1,87 u buteinu. Butein inhibira rast krvnih sudova u tumorima i širenje i invaziju malignih ćelija u prostati, jetri i bešici blokirajući faktore kao što su *MMP* i *VEGF* (Padmavathi et al., 2017). U prethodnim eksperimentima na ćelijskoj liniji HeLa tretman EE bio je jedini koji je značajno smanjio ekspresiju gena *MMP2*, što sugerise da određena kombinacija i proporcija jedinjenja u ovom ekstraktu može smanjiti migratorni potencijal HeLa ćelija smanjenjem iRNK za *MMP2*. Nasuprot tome, sulfuretin je smanjio migraciju HeLa ćelija, što bi delimično moglo biti dovedeno u vezu sa njegovom sposobnošću da potisne ekspresiju *VEGFA* (Pašić et al., 2025).

U sva tri tretmana jedinjenjima, iRNK za *NQO1* bila je povišena sa FDR vrednostima 9,9462E-06, 2,66443E-08 i 0,000155444 za butin, butein i sulfuretin, redom. Štaviše, izražena aktivacija gena imunskog odgovora kod tretmana sulfuretinom upućuje na imunomodulatorni aspekt njegovog dejstva, a pozitivna regulacija enzima za odgovor na metabolički stres (npr. *NQO1*) kod svih jedinjenja ukazuje na uticaj na ćelijsku redoks/metaboličku homeostazu. Klaster analiza puteva pokazala je da je najveći broj izmenjenih puteva unutar klastera signalizacije i imunskog sistema detektovan nakon tretmana sulfuretinom. U ranijim istraživanjima utvrđeno je da tretman neizmenjenih MRC-5 ćelija butinom, buteinom i sulfuretinom dovodi do smanjenja intraćelijskih nivoa ROS u poređenju sa kontrolom, pri čemu je smanjenje bilo statistički značajno nakon tretmana sulfuretinom ( $p < 0,05$ ) (Pašić et al., 2025). Među ispitivanim jedinjenjima, sulfuretin se pokazao najučinkovitijim u snižavanju nivoa ROS. Butin je pozitivno regulisao više puteva u klasteru signalizacije i imunskog sistema nego butein. Tretman sulfuretinom imao je efekat pozitivne regulacije puteva ćelijskog ciklusa; butin je doveo do negativne regulacije puteva iz ovog klastera, dok je butein u nekim slučajevima negativno regulisao, a u drugim pozitivno regulisao puteve ćelijskog ciklusa. Iako su sva tri ispitivana jedinjenja, butin, butein i sulfuretin, uticala na iste klastere, različiti broj pozitivno i negativno regulisanih puteva ili kombinacija oba ukazuje na to da svako jedinjenje utiče na različite puteve i ima svoj jedinstven signalni potpis na transkripcionom nivou. Da bi se nalazi sekvenciranja iRNK i ćelijskih eseja bolje i detaljnije mogli tumačiti, neophodna je dalja *in vivo* validacija i/ili dalja *in vitro* istraživanja koja analiziraju rezultate sekvenciranja iRNK sa višim koncentracijama tretmana ( $IC_{50}$  ili  $2 \times IC_{50}$ ). Buduće studije treba da procene efikasnost i bezbednost ovih jedinjenja u životinjskim modelima leukemije i potvrde da su transkriptomске promene uočene *in vitro* u korelaciji sa antitumorskim efektima *in vivo*. Podaci o ekspresiji gena prezentovani u ovom istraživanju dobijeni su analizom sekvenciranja iRNK. Posledično, nalazi ukazuju na promene na nivou iRNK, ali ne daju direktan uvid u nivo/aktivnost proteina. Zaključno, ova sveobuhvatna transkriptomska analiza uspostavlja butin, butein i sulfuretin kao jedinjenja koja *in vitro* selektivno modulišu puteve preživljavanja ćelija raka, podržavajući njihovo dalje *in vitro* i *in vivo* istraživanje. Ovi zaključci se zasnivaju isključivo na metodologiji obogaćenja genskih skupova puta apoptoze u bazama KEGG i Reactome i ne podrazumevaju statistički značajnu diferencijalnu ekspresiju bilo kog pojedinačnog gena. Statistička značajnost puteva u KEGG i/ili izostanak statističke značajnosti

u Reactomu za isti put, npr. apoptotski, naglašava da zaključci na nivou puteva mogu zavisiti od baze podataka i definicija genskih skupova koji se koriste. Razlike između Reactome i KEGG mogu proistići iz razlika u načinu na koji su putevi definisani, iz sastava genskih skupova, kao i iz nivoa detaljnosti opisanih puteva u bazama podataka. Ove razlike su očekivane i odražavaju raznolikost među izvorima za biološke puteve, a ne pristrasno tumačenje.

Terapijski prozor kombinovanog tretmana predstavlja različite efekte zračenja na normalne neizmenjene i na maligne ćelije. U istraživanju u okviru doktorske disertacije procenjen je potencijalni terapijski prozor kombinacije ispitivanih jedinjenja ruja i biljnih ekstrakata (EE, VE i MME) sa jonizujućim zračenjem, odnosno terapijskom frakcionom dozom od 2 Gy. Poređenjem odgovora na dozu od 2 Gy, ispitivane su normalna ćelijska linija fibroblasta pluća MRC-5 i tumorska ćelijska linija trostruko negativnog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231. Terapijski prozor se u ovom kontekstu može posmatrati kao sposobnost tretmana da očuva ili poveća preživljavanje normalnih ćelija, uz istovremeno izraženije smanjenje preživljavanja malignih ćelija. U odnosu na kontrolu 2 Gy kod MRC-5 ćelija, kombinacija jedinjenja ruja sa 2 Gy nije dodatno smanjila preživljavanje u poređenju sa zračenom kontrolom, što ukazuje da ovi tretmani ne pojačavaju citotoksičnost zračenja u normalnim ćelijama. Posebno se izdvaja fustin, koji pokazuje trend radioprotektivnog dejstva (u domenu očuvanja preživljavanja ćelija, ne povećanja preživljavanja), dok su butin, fisetin i taksifolin imali vrednosti bliske kontroli. Međutim, ekstrakti EE i VE su smanjili preživljavanje i u MRC-5 (0,46 i 0,54), što može predstavljati ograničenje njihove selektivnosti i potencijalni rizik za neizmenjeno tkivo. U suprotnosti sa nalazima na MRC-5 ćelijama, u MDA-MB-231 ćelijama sva jedinjenja i ekstrakti su u kombinaciji sa 2 Gy doveli do nižeg preživljavanja nego samo zračena kontrola, pri čemu su butin i EE imali najizraženiji efekat. Ovakav jasno izražen odgovor između normalnih i malignih ćelija podržava postojanje selektivnog radiosenzitizujućeg efekta u malignim ćelijama, naročito za butin i ekstrakt EE. Analiza u odnosu na nezračenu kontrolu dodatno potvrđuje očekivani doprinos zračenja smanjenju preživljavanja analiziranih ćelija. Ipak, kod MRC-5 određena jedinjenja (naročito fustin i taksifolin) zadržavaju relativno više vrednosti preživljavanja u odnosu na ostale tretmane, što može ukazivati na potencijalno ublažavanje štetnog efekta zračenja u normalnim ćelijama. Kod MDA-MB-231, kombinacije sa zračenjem dovode do izraženijeg pada preživljavanja, posebno za butin i EE, što dodatno podržava njihovu potencijalnu radiosenzitizujuću ulogu u ispitivanom malignom modelu ćelija i u ispitivanim uslovima. Zbirno, rezultati sugerišu da određena jedinjenja (posebno fustin, a zatim taksifolin/fisetin) mogu doprineti relativnoj zaštiti normalnih ćelija, dok istovremeno pojedini tretmani (posebno butin i EE) pojačavaju citotoksični efekat zračenja u malignim ćelijama, što ukazuje na potencijal za dalje istraživanje proširivanja terapijskog prozora primenom jedinjenja i ekstrakata ruja. Jonizujuće zračenje dozom od 2 Gy može dovesti do oštećenja DNK, pri čemu aktivacija kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa predstavlja važan odgovor ćelija na nastali stres i omogućava zaustavljanje proliferacije i potencijalnu popravku oštećenja. U malignim ćelijama, promene u raspodeli ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon izlaganja zračenju mogu odražavati različite oblike odgovora na oštećenje DNK, uključujući promene u progresiji kroz S i G2/M fazu, replikacioni stres i aktivaciju mehanizama ćelijske smrti. U ovom radu, kombinovanje butina, EE i VE sa zračenjem od 2 Gy nije izazvalo jedinstven obrazac promene raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, već su uočene različite promene u zavisnosti od primenjenog tretmana. Samo zračenje od 2 Gy nije izazvalo izraženu promenu raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa u odnosu na nezračenu kontrolu. Udeo ćelija u G1, S i G2/M fazi ostao je relativno sličan, dok je subG1 frakcija pokazala samo blago povećanje. Ovakav rezultat ukazuje da primenjena doza zračenja, pod uslovima ovog eksperimentalnog pristupa, nije dovela do izražene redistribucije ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa. Slično tome, aneksin V-FITC/PI analiza pokazala je samo blage promene u populacijama povezanim sa ćelijskom smrću, pri čemu su rani apoptotski, kasno apoptotski/sekundarno nekrotični i nekrotični udeli nakon 2 Gy iznosili 1,91%, 3,69% i 4,16%, u poređenju sa 1,50%, 3,36% i 3,88% u

nezračenju kontroli. Ovi rezultati zajedno ukazuju na relativno blag odgovor MDA-MB-231 ćelija na samu dozu od 2 Gy. Kod kombinovanog tretmana butinom i 2 Gy uočena je izraženija promena raspodele ćelija u odnosu na zračenu kontrolu, koja se prvenstveno ogledala u povećanju populacije ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa. Udeo ćelija u S fazi povećan je na 25,25%, u poređenju sa 14,14% nakon tretmana butinom bez zračenja, uz istovremeno smanjenje G1 i G2/M populacije. Ovakav obrazac ukazuje da je kombinovani tretman posebno uticao na progresiju ćelija kroz S fazu. Akumulacija ćelija u S fazi može biti povezana sa usporavanjem progresije replikacije usled prisustva oštećenja DNK ili drugih oblika ćelijskog stresa. Međutim, aneksin V-FITC/PI analiza pokazala je samo blago povećanje rane apoptoze sa 2,49% na 2,62% i kasne apoptoze/sekundarne nekroze sa 3,25% na 4,02%, dok je nekrotična populacija ostala praktično nepromenjena (3,86% naspram 3,82%). Ovakva podudarnost rezultata ukazuje da se odgovor na kombinaciju butina i zračenja prvenstveno manifestuje kroz promenu dinamike proliferacije, odnosno akumulaciju ćelija u S fazi, dok je prelazak u regulisanu ćelijsku smrt, koja je u ovoj eksperimentalnoj postavci ispitivana, relativno ograničen. Kod EE + 2 Gy promena u raspodeli ćelija bila je drugačijeg karaktera. U odnosu na EE bez zračenja, došlo je do smanjenja G1 populacije i blagog povećanja S populacije, dok je G2/M populacija ostala na približno istoj vrednosti. Najizraženija promena odnosila se na subG1 frakciju ćelija, koja je povećana sa 4,32% kod EE na 5,11% nakon kombinovanja sa 2 Gy. Povećanje subG1 populacije može ukazivati na veći udeo ćelija sa fragmentisanom DNK i karakteristikama povezanim sa ćelijskom smrću. Ovaj rezultat je praćen povećanjem svih analiziranih populacija ćelijske smrti u aneksin V-FITC/PI testu. Udeo ćelija u ranoj apoptozi povećan je sa 3,20% kod EE na 3,78% nakon kombinovanja sa 2 Gy, dok je kasna apoptoza/sekundarna nekroza povećana sa 5,80% na 6,49%, a nekrotična populacija sa 7,18% na 8,78%. Iako su promene granično povećane, njihova saglasnost sa povećanjem subG1 frakcije ukazuje da kombinovanje EE sa zračenjem može dodatno usmeriti deo ćelijske populacije ka procesima povezanim sa ćelijskom smrću. Kod VE + 2 Gy uočena je drugačija promena u odnosu na butin i EE. Kombinovani tretman bio je praćen povećanjem G2/M populacije i smanjenjem S populacije u poređenju sa VE bez zračenja, dok je subG1 frakcija povećana sa 3,22% na 4,46%. Akumulacija ćelija u G2/M fazi može odražavati zadržavanje ćelija usled prisustva oštećenja DNK i aktivacije kontrolnih mehanizama pre ulaska u mitozu. Istovremeno povećanje subG1 frakcije ukazuje da je deo ćelija prešao iz stanja proliferacije ka procesu ćelijske smrti. Ovakav nalaz je dodatno podržan aneksin V-FITC/PI analizom, koja je pokazala najizraženiji odgovor među ispitivanim tretmanima. Udeo ranih apoptotskih ćelija povećan je sa 4,47% na 5,41%, kasne apoptoze/sekundarne nekroze sa 7,90% na 9,74%, dok je nekrotična populacija povećana sa 8,01% na 10,33%. Posebno je značajno povećanje nekrotične populacije, što ukazuje da kombinacija VE i 2 Gy, pored uticaja na ćelijski ciklus, može izraženije narušiti održivost ćelijske populacije, ali ne u smeru regulisane ćelijske smrti, što u ovom konceptu istraživanja nije od značaja. Posmatrano zajedno, rezultati analize ćelijskog ciklusa i aneksin V-FITC/PI testa ukazuju da različiti tretmani modulišu odgovor MDA-MB-231 ćelija na zračenje od 2 Gy kroz različite obrasce. Pri tome, povećanje subG1 frakcije nakon kombinovanja tretmana sa zračenjem nije bilo samo izolovana promena ćelijskog ciklusa, već je bilo praćeno odgovarajućim povećanjem (mada graničnim) populacija detektovanih aneksin V-FITC/PI analizom. Ovo je posebno izraženo kod VE, dok je kod EE takođe uočena saglasnost između povećanja subG1 frakcije i apoptotskog i nekrotičnog odgovora. Nasuprot tome, kod butina je dominantna promena bila prelazak ćelija u S fazu, dok su promene u populacijama ćelijske smrti bile znatno manje izražene. Ovo može ukazivati da se kod različitih tretmana odgovor na zračenje odvija kroz različite faze ćelijskog odgovora: od promene progresije kroz ćelijski ciklus do aktivacije procesa ćelijske smrti. Zaključno, rezultati pokazuju da tretmani izdvojeni na osnovu MTT analize, pored uticaja na metaboličku aktivnost i preživljavanje ćelija, utiču i na odgovor MDA-MB-231 ćelija na jonizujuće zračenje na nivou ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti. Ove razlike ukazuju na potencijalno različite mehanizme odgovora ćelija na kombinaciju ispitivanih

tretmana i zračenja i podržavaju zaključak da efekat kombinovanih tretmana nije posledica samo opšteg smanjenja vijabilnosti, već uključuje i promene u regulaciji ćelijskog ciklusa i procesima ćelijske smrti.

Pri proceni genotoksičnosti nakon izlaganja zračenju od 2 Gy, kontrolne ćelije pokazale su intenzitet repa komete (engl. tail intensity) od 29,28, dok su butin i VE imali nešto niže vrednosti, 26,77 i 27,15, redom. Ovakav nalaz može ukazivati na potencijalno smanjenje nivoa oštećenja DNK izazvanog zračenjem u prisustvu butina i VE. Nasuprot tome, EE je pokazao višu vrednost od ozračene kontrole: 34,84, što može ukazivati na izraženije oštećenje DNK i potencijalni radiosenzitizujući efekat. MME je pokazao visoku vrednost tail intensity u MRC-5 ćelijama bez zračenja (44,47), što ukazuje na oštećenje DNK; zbog ograničenja eksperimenta, ovaj nalaz treba tumačiti kao preliminarni rezultat. S obzirom na to da rezultati potiču iz jednog reprezentativnog eksperimenta, navedeni nalazi predstavljaju deskriptivne pokazatelje i zahtevaju potvrdu u nezavisnim biološkim replikatima. Sličan koncept može se uočiti i u rezultatima Saloua i saradnika, budući da su prirodna jedinjenja i ekstrakti pokazali potencijal da modulišu ćelijski odgovor na jonizujuće zračenje (Saloua & Alansari, 2025). Dok je u tom istraživanju pokazano da 2-feniletil-izotiocijanat iz potočarke može pojačati detoksikaciju različitih hemijskih kancerogena, rezultati ovog rada ukazuju da prirodna jedinjenja mogu uticati i na odgovor ćelija na fizičke štetne agense, uključujući oštećenje DNK, preživljavanje i indukciju ćelijske smrti nakon zračenja (Saloua & Alansari, 2025).

Rezultati predstavljeni i diskutovani u okviru doktorske disertacije predstavljaju *in vitro* rezultate nastale pod definisanim uslovima koncentracije i vremena inkubacije, kao i, ukoliko je primenljivo, drugih definisanih varijabli. Rezultati dobijeni na 3D ćelijskim modelima; primenom specifičnih peptidnih inhibitora kaspaza na HeLa i K562 ćelijskim linijama; procenom stepena apoptoze aneksin V-FITC/PI esejom u kombinaciji sa zračenjem; kao i rezultati komet eseja sa i bez zračenja, prikazani su kao reprezentativni eksperimenti. Shodno tome, ove rezultate treba tumačiti u tom kontekstu, kao preliminarne nalaze koji ukazuju na moguće pravce za dalja istraživanja mehanizama dejstva ruja. Potrebno je naglasiti da ekstrakti i izolovana jedinjenja koja nisu detaljnije ispitivana u okviru ove disertacije pokazuju slabu do umerenu, a ne izraženu citotoksičnu aktivnost u poređenju sa referentnim citostatikom cisplatinom, čije su IC<sub>50</sub> vrednosti na istim ćelijskim linijama bile dosta niže. Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, radna hipoteza da ekstrakti i jedinjenja ruja ispoljavaju selektivni citotoksični efekat prema malignim u odnosu na neizmenjene ćelije, uz izraženu selektivnost prema određenim tipovima tumora, može se smatrati potvrđenom. Ovaj zaključak je potkrepljen rezultatima MTT eseja (n = 3), koji su pokazali KS od 9,91 za butein prema HeLa ćelijama, 7,05 za sulfuretin prema K562 ćelijama i >9,41 za sulfuretin auronol prema HL-60 ćelijama, uz izraženu preferencijalnu osetljivost HL-60 i K562 ćelijskih linija. Hipoteza da se citotoksično dejstvo ostvaruje aktivacijom apoptotske ćelijske smrti malignih ćelija takođe je potvrđena rezultatima analize ćelijskog ciklusa i aneksin V-FITC/PI eseja na HeLa i K562 ćelijama, koji su pokazali statistički značajno povećanje subG1 i apoptotskih populacija. Doprinos pojedinačnih kaspaza-3, -8 i -9 apoptotskom odgovoru u HeLa ćelijama nije moguće pouzdano potvrditi, s obzirom na to da su eksperimenti sa inhibitorima kaspaza izvedeni kao reprezentativni eksperimenti. Hipoteza o antioksidativnom dejstvu ekstrakata i jedinjenja ruja u neizmenjenim humanim ćelijama delimično je potvrđena merenjem intraćelijskih ROS u MRC-5 ćelijama, pri čemu je zabeleženo značajno smanjenje nivoa ROS nakon tretmana EE (p < 0,01 u bazalnim uslovima i p < 0,05 nakon izlaganja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i sulfuretinom (p < 0,05), dok je butin pokazao suprotan, prooksidativni efekat, sa povećanjem nivoa ROS 2,11 puta. Hipoteza da ekstrakti i jedinjenja ruja ne ispoljavaju genotoksičnost prema neizmenjenim humanim ćelijama nije mogla biti sa sigurnošću potvrđena, budući da je procena genotoksičnosti sprovedena isključivo alkalnim komet esejom u okviru jednog reprezentativnog eksperimenta, bez nezavisnih bioloških replikata, zbog čega se na osnovu dobijenih rezultata ne može izvesti pouzdan zaključak o odsustvu genotoksičnog potencijala. Antiinvazivni efekat ekstrakata i jedinjenja ruja na malignim ćelijama *in vitro* potvrđen je

rezultatima *scratch* eseja na HeLa ćelijama, koji su pokazali značajnu inhibiciju migracije nakon svih šest tretmana posle 48 sati, dok su rezultati RT-qPCR analize dodatno ukazali na značajno smanjenje ekspresije *MMP2* nakon tretmana EE ( $p < 0,05$ ) i *VEGFA* nakon tretmana sulfuretinom ( $p < 0,01$ ). Konačno, hipoteza o radiomodulatornom dejstvu ekstrakata i jedinjenja ruja delimično je potvrđena, budući da je u MTT eseju u kombinaciji sa zračenjem od 2 Gy utvrđena statistički značajna radiosenzitizacija MDA-MB-231 ćelija nakon tretmana butinom, EE i VE, dok radioprotektivni efekat prema MRC-5 ćelijama nije potvrđen, jer nijedan od primenjenih tretmana nije doveo do statistički značajnog povećanja preživljavanja. U celini, dobijeni rezultati pružaju eksperimentalnu osnovu za zaključak da ekstrakti i bioaktivna jedinjenja ruja ispoljavaju izražen antitumorski potencijal, pre svega kroz selektivnu citotoksičnu aktivnost, indukciju apoptotske ćelijske smrti i inhibiciju migratornog potencijala malignih ćelija, dok antioksidativni i radiomodulatorni efekti zavise od primenjenog jedinjenja, ćelijskog modela i uslova tretmana, a pitanje genotoksičnosti zahteva dodatnu eksperimentalnu validaciju.

## 5 Zaključci

U skladu sa postavljenim hipotezama i ciljevima istraživanja, a na osnovu prikazanih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci: srž drveta vrste *C. coggygia* Scop. predstavlja bogat i do sada nedovoljno istražen izvor bioaktivnih flavonoida sa *in vitro* antitumorskim dejstvom. Potvrđeno je da ekstrakti srži drveta ruja i iz njih izolovana jedinjenja butein, butin i sulfuretin ostvaruju selektivno citotoksično dejstvo prema humanim malignim ćelijama, sa najizraženijim efektom prema ćelijama leukemije. Ekstrakti i jedinjenja ruja ostvaruju svoje antitumorsko dejstvo kroz više komplementarnih mehanizama: indukciju apoptotske ćelijske smrti, tretman-specifičan poremećaj propagacije ćelija kroz ćelijski ciklus, inhibiciju migracije malignih ćelija uz smanjenje ekspresije *MMP2* i *VEGFA*, kao i koordinisano transkripciono reprogramiranje koje obuhvata supresiju mitohondrijske bioenergetike, obrade RNK i translacije uz aktivaciju NRF2-posredovanog antioksidativnog i detoksikacionog odgovora. Pri netoksičnim koncentracijama, EE i sulfuretin ispoljavaju antioksidativno dejstvo na neizmenjenim humanim fibroblastima pluća, dok butin u istim uslovima deluje prooksidativno. U kombinaciji sa terapijskom frakcionom dozom jonizujućeg zračenja, butin i EE značajno smanjuju preživljavanje malignih ćelija dojke, bez potvrđene zaštite neizmenjenih ćelija. Butein se, po intenzitetu citotoksičnosti i obimu transkripcionog odgovora, izdvaja kao vodeći kandidat, a sulfuretin kao jedinjenje sa najselektivnijim dejstvom prema leukemijskim ćelijama i jedinstvenim signalnim potpisom. Dobijeni rezultati opravdavaju dalju funkcionalnu validaciju na nivou proteina i ispitivanja na *in vivo* modelima.

## 6 Literatura

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 400-414. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>
- Abbasi, M. A., Rubab, K., Aziz-ur-Rehman, Riaz, T., Shahzadi, T., Khalid, M., & Ajaib, M. (2012). In vitro assessment of relief to oxidative stress by different fractions of *Boerhavia procumbens*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(2), 357-364.
- Abdallah, S., Abu-Reidah, I., Mousa, A., & Abdel-Latif, T. (2019). *Rhus coriaria* (sumac) extract reduces migration capacity of uterus cervix cancer cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(5), 591-596. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.06.004>
- Abdel-Magid, A. F. (2021). Potential of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Cancer Therapy. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(2), 182-184. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.1c00017>
- Abdullah, H., Ismail, I., Suppian, R., & Zakaria, N. M. (2023). Natural Gallic Acid and Methyl Gallate Induces Apoptosis in Hela Cells through Regulation of Intrinsic and Extrinsic Protein Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8495. <https://doi.org/10.3390/ijms24108495>
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1. [https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_175_19)
- Ahmed, A., & Tait, S. W. G. (2025). Molecular Cell Biology of Apoptosis in Health and Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1481, 1-28. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-92785-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-92785-0_1)
- Aksoy, H., Sen, A., Sancar, M., Sekerler, T., Akakin, D., Bitis, L., Uras, F., Kultur, S., & Izzettin, F. V. (2016). Ethanol extract of *Cotinus coggygria* leaves accelerates wound healing process in diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(11), 2732-2736. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1181660>
- Alfaro-Almaguer, J. A., Mejía-Manzano, L. A., & González-Valdez, J. (2022). State-of-the-Art and Opportunities for Bioactive Pentacyclic Triterpenes from Native Mexican Plants. *Plants*, 11(17), 2184. <https://doi.org/10.3390/plants11172184>
- Al-Naqeb, G., Kalmpourtzidou, A., Giampieri, F., De Giuseppe, R., & Cena, H. (2024). Genotoxic and antigenotoxic medicinal plant extracts and their main phytochemicals: “A review”. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1448731. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1448731>
- Andrabi, S. M., Sharma, N. S., Karan, A., Shahriar, S. M. S., Cordon, B., Ma, B., & Xie, J. (2023). Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Advanced Science*, 10(30), 2303259. <https://doi.org/10.1002/advs.202303259>

- André, R., Gomes, A. P., Pereira-Leite, C., Marques-da-Costa, A., Monteiro Rodrigues, L., Sassano, M., Rijo, P., & Costa, M. D. C. (2024). The Entourage Effect in Cannabis Medicinal Products: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*, 17(11), 1543. <https://doi.org/10.3390/ph17111543>
- Antal, D. S., Ardelean, F., Jijie, R., Pinzaru, I., Soica, C., & Dehelean, C. (2021). Integrating Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology of *Cotinus coggygria* and *Toxicodendron vernicifluum*: What Predictions can be Made for the European Smoketree? *Frontiers in Pharmacology*, 12, 662852. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.662852>
- Antal, D. S., Ardelean, F., Pinzaru, I., Borcan, F., Ledeti, I., Coricovac, D., Zupkó, I., Baghdikian, B., Ollivier, E., Soica, C., & Bolintineanu, S. L. (2016). Effects of cyclodextrin complexation on the anti-cancer effects of *Cotinus coggygria* extract and its constituents, butein and sulfuretin. *Revista de Chimie*, 67(8), 1618-1622.
- Antal, D. S., Schwaiger, S., Ellmerer-Müller, E. P., & Stuppner, H. (2010). *Cotinus coggygria* wood: novel flavanone dimer and development of an HPLC/UV/MS method for the simultaneous determination of fourteen phenolic constituents. *Planta Medica*, 76(15), 1765-1772. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249878>
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., de Carvalho, R. F., de Souza, E. B., & de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>
- Artun, F. T., Karagoz, A., Ozcan, G., Melikoglu, G., Anil, S., Kultur, S., & Sutlupinar, N. (2016). In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *Journal of BUON*, 21(3), 720-725. <https://doi.org/10.3390/proceedings1101019>
- Asmaa, M. S., Ali, A.-J., Farid, J., & Azman, S. (2015). Growth inhibitory effects of crude pomegranate peel extract on chronic myeloid leukemia, K562 cells. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 5(2), 100. <https://doi.org/10.4103/2229-516x.157154>
- ATCC. (n.d.). *ATCC: The global bioresource center*. Retrieved September 18, 2026, from <https://www.atcc.org/>
- Attique, I., Haider, Z., Khan, M., Hassan, S., Soliman, M. M., Ibrahim, W. N., & Anjum, S. (2025). Reactive Oxygen Species: From Tumorigenesis to Therapeutic Strategies in Cancer. *Cancer Medicine*, 14(10), e70947. <https://doi.org/10.1002/cam4.70947>
- Bai, G., Chen, C., Zhao, C., Zhou, T., Li, D., Zhou, T., Li, W., Lu, Y., Cong, X., Jia, Y., & Li, S. (2022). The chromosome-level genome for *Toxicodendron vernicifluum* provides crucial insights into Anacardiaceae evolution and urushiol biosynthesis. *iScience*, 25(7), 104512. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104512>
- Bai, H., Hu, X., Meng, C., Zu, W., Qiu, X., Liu, J., Liu, J., Liu, J., Wang, X., & Li, M. (2025). The phytochemistry, pharmacology and modern applications of *Cotinus coggygria* Scop.: A comprehensive review with future perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 353, 120366. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.120366>

- Bai, X., Ma, Y., & Zhang, G. (2015). Butein suppresses cervical cancer growth through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncology Reports*, 33(6), 3085-3092. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3922>
- Baker, S. J., Poulikakos, P. I., Irie, H. Y., Parekh, S., & Reddy, E. P. (2022). CDK4: a master regulator of the cell cycle and its role in cancer. *Genes & Cancer*, 13, 21. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.221>
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell*, 14(2), 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>
- Bilen, S., Yilmaz, S., & Bilen, A. M. (2013). Influence of Tetra (*Cotinus coggygria*) Extract against *Vibrio anguillarum* Infection in Koi Carp, *Cyprinus carpio* with Reference to Haematological and Immunological Changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(3), 517-522. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13\\_3\\_16](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_3_16)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9. <https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants: Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Boubaker, J., Bhouri, W., Sghaier, M. B., Bouhlel, I., Skandrani, I., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2011). Leaf extracts from *Nitraria retusa* promote cell population growth of human cancer cells by inducing apoptosis. *Cancer Cell International*, 11(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-11-37>
- Boucherle, B., Peuchmaur, M., Boumendjel, A., & Haudecoeur, R. (2017). Occurrences, biosynthesis and properties of auronones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry*, 142, 92-111. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.06.017>
- Bradic, J., Vuletic, M., Jakovljevic, V., Sretenovic, J., Zivanovic, S., Tomovic, M., Zivkovic, J., Kocovic, A., & Dragicevic, N. (2025). Oral Gel Formulation of *Cotinus coggygria* Scop. Stem Bark Extract: Development, Characterization, and Therapeutic Efficacy in a Rat Model of Aphthous Stomatitis. *Pharmaceutics*, 17(10), 1293. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17101293>
- Brajušković, G. R. (2005). Apoptosis in malignant diseases. *Archive of Oncology*, 13(1), 19-22. <https://doi.org/10.2298/aoo0501019b>
- Brito, J. A. R., Miranda, A. D. J. A., Lima, V. A. S., Buna, S. D. S. S., Rosário, M. S. D., Lima, R. F., Martins, M. M., Andrade, M. S. D., Nascimento, M. D. S. B., Bolzani, V. D. S., de Azevedo-Santos, A. P. S., Lima, J. A., Xavier, J. K. D. A. M., & da Rocha, C. Q.. (2025). Antiproliferative and Anti-Migratory Activities of an Extract from *Fridericia platyphylla* Leaves and Its Molecular Profile. *Plants*, 14(17), 2693. <https://doi.org/10.3390/plants14172693>

- Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, 36(6), 869. <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>
- Cand , C., Cecconi, F., Dessen, P., & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science*, 115(24), 4727-4734. <https://doi.org/10.1242/jcs.00210>
- Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*, 28(13), 4982. <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>
- Chen, Y., Chen, L., Lun, A. T. L., Baldoni, P. L., & Smyth, G. K. (2025). edgeR v4: powerful differential analysis of sequencing data with expanded functionality and improved support for small counts and larger datasets. *Nucleic Acids Research*, 53(2), gkaf018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf018>
- Chen, Y., Li, Y., Huang, L., Du, Y., Gan, F., Li, Y., & Yao, Y. (2021). Antioxidative Stress: Inhibiting Reactive Oxygen Species Production as a Cause of Radioresistance and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6620306. <https://doi.org/10.1155/2021/6620306>
- Cho, S. G., Woo, S. M., & Ko, S. G. (2014). Butein suppresses breast cancer growth by reducing a production of intracellular reactive oxygen species. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-51>
- Cunha, A. B., & David, J. M. (2024). Chemical composition, biological activities and uses of Anacardiaceae species: An updated review. *Química Nova*, 47(2). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230101>
- da Costa, M. P., Bozinis, M. C. V., Andrade, W. M., Costa, C. R., da Silva, A. L., Alves de Oliveira, C. M., Kato, L., Fernandes, O. D. F. L., Souza, L. K. H., & Silva, M. D. R. R. (2014). Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 245. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-245>
- Debnath, S., Sarkar, A., Mukherjee, D. D., Ray, S., Mahata, B., Mahata, T., Parida, P. K., Das, T., Mukhopadhyay, R., Ghosh, Z., & Biswas, K. (2022). Eriodictyol mediated selective targeting of the TNFR1/FADD/TRADD axis in cancer cells induce apoptosis and inhibit tumor progression and metastasis. *Translational Oncology*, 21, 101433. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101433>
- de Groot, A. F., Kuijpers, C. J., & Kroep, J. R. (2017). CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: A review. *Cancer Treatment Reviews*, 60, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.09.003>
- Demirci, B., Demirci, F., & Baser, K. H. C. (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygria* Scop. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(1), 43-44. <https://doi.org/10.1002/ffj.1149>

- Devi, K. P., Rajavel, T., Habtemariam, S., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2015). Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. *Life Sciences*, 142, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.004>
- Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 297-306. <https://doi.org/10.1038/nrm3567>
- Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T., & Devkota, H. P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 120, 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.003>
- Enciclopedie de etnobotanică românească*. (n.d.). Retrieved September 15, 2026, from <https://search.worldcat.org/title/Enciclopedie-de-etnobotanica-romaneasca/oclc/6982325>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 594, 57-72. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4)
- Esteras, N., & Abramov, A. Y. (2022). Nrf2 as a regulator of mitochondrial function: Energy metabolism and beyond. *Free Radical Biology and Medicine*, 189, 136-153. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.013>
- Farsad-Naeimi, A., Alizadeh, M., Esfahani, A., & Darvish Aminabad, E. (2018). Effect of fisetin supplementation on inflammatory factors and matrix metalloproteinase enzymes in colorectal cancer patients. *Food & Function*, 9(4), 2025-2031. <https://doi.org/10.1039/c7fo01898c>
- Ferraro, G., Belvedere, R., Petrella, A., Tosco, A., Stork, B., Salamone, S., Minassi, A., Pollastro, F., Morretta, E., & Monti, M. C. (2022). Drug affinity-responsive target stability unveils filamins as biological targets for artemetin, an anti-cancer flavonoid. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 964295. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.964295>
- Ferrer-Gallego, P. P. (2016). Lectotypification of *Rhus cotinus* L., replaced synonym of *Cotinus coggygia* Scop. (Anacardiaceae). *Candollea*, 71(2), 307-309. <https://doi.org/10.15553/c2016v712a15>
- Fisher, R. P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science*, 118(22), 5171-5180. <https://doi.org/10.1242/jcs.02718>
- Fitter, A. H. (1977). [Review of the book *Flora Europaea: Vol. 4*, by T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, & D. A. Webb (Eds.)]. *Oryx*, 14(1), 77. <https://doi.org/10.1017/s0030605300014939>
- Fraternale, D., & Ricci, D. (2014). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Cotinus coggygia* Scop. from Italy. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 366-370. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2014.895192>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama,

- E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- GeneCards. (n.d.). *OSGIN1 gene*. Retrieved September 7, 2026, from <https://www.genecards.org/card/OSGIN1>
- Gligorijević, N. N. (2012). *Ispitivanje antiproliferativnog i in vitro antimetastatskog potencijala pikolinato rutenijum(II)-cimenskog kompleksa: poređenje sa serijom rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa sličnom strukturom* [Doctoral dissertation, University of Belgrade]. <https://doi.org/10.2298/bg20120716gligorijevic>
- Gligorijević, N., Arandelović, S., Filipović, L., Jakovljević, K., Janković, R., Grgurić-Šipka, S., Ivanović, I., Radulović, S., & Tešić, Ž. L. (2012). Picolinate ruthenium(II)-arene complex with in vitro antiproliferative and antimetastatic properties: Comparison to a series of ruthenium(II)-arene complexes with similar structure. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 108, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.12.002>
- Gospodinova, Z., Bózsity, N., Nikolova, M., Krasteva, M., & Zupkó, I. (2017). Antiproliferative Properties Against Human Breast, Cervical and Ovarian Cancer Cell Lines, and Antioxidant Capacity of Leaf Aqueous Ethanolic Extract from *Cotinus coggygria* Scop. *Acta Medica Bulgarica*, 44(2), 20-25. <https://doi.org/10.1515/amb-2017-0014>
- Gospodinova, Z. I., Zupkó, I., Bózsity, N., Manova, V. I., Georgieva, M. S., Todinova, S. J., Taneva, S. G., Ocsovszki, I., & Krasteva, M. E. (2020). *Cotinus coggygria* Scop. induces cell cycle arrest, apoptosis, genotoxic effects, thermodynamic and epigenetic events in MCF7 breast cancer cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(3-4), 129-140. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0087>
- Gospodinova, Z., Nikolova, M., & Antov, G. (2021). In vitro Antiproliferative Effects of *Cotinus coggygria* Scop. on human non-melanoma and melanoma skin cancer cells. *American Journal of Pharmacy and Health Research*, 9(7), 1-10. <https://doi.org/10.46624/ajphr.2021.v9.i7.001>
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27-41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Guerra, R. N. M., Oliveira, A. S., Farias, J. R., Franco, D. C. G., Santos, P. G., Barbosa, N. T., Muniz, S. B., Abreu, A. G., & Nascimento, F. R. F. (2025). Anacardiaceae Family: Effect of Isolated Compounds and Other Identified Phytochemicals Against Clinically Relevant *Candida* Species - A Short Review. *Antibiotics*, 14(3), 308. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030308>
- Guo, G., Zhang, W., Dang, M., Yan, M., & Chen, Z. (2019). Fisetin induces apoptosis in breast cancer MDA-MB-453 cells through degradation of HER2/neu and via the PI3K/Akt pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(4), e22268. <https://doi.org/10.1002/jbt.22268>
- Gupta, P., Zhao, H., Hoang, B., & Schwartz, E. L. (2022). Targeting the untargetable: RB1-deficient tumours are vulnerable to Skp2 ubiquitin ligase inhibition. *British Journal of Cancer*, 127(6), 969. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01898-0>

- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>
- Hancock, J. T., Desikan, R., & Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 345-350. <https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290345>
- Hao, Q., Zhao, W., Li, Z., Lai, Y., Wang, Y., Yang, Q., & Zhang, L. (2025). Combination therapy and dual-target inhibitors based on cyclin-dependent kinases (CDKs): Emerging strategies for cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 289, 117465. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117465>
- Hashida, K., Tabata, M., Kuroda, K., Otsuka, Y., Kubo, S., Makino, R., Kubojima, Y., Tonosaki, M., & Ohara, S. (2014). Phenolic extractives in the trunk of *Toxicodendron vernicifluum*: chemical characteristics, contents and radial distribution. *Journal of Wood Science*, 60(2), 160-168. <https://doi.org/10.1007/s10086-013-1385-8>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167-197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
- Hermanowicz, J. M., Kwiatkowska, I., & Pawlak, D. (2020). Important players in carcinogenesis as potential targets in cancer therapy: an update. *Oncotarget*, 11(32), 3078. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27689>
- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J.-Y., Ashmun, R. A., & Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), 2672-2681. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.5.2672>
- Hodges, R. E., & Minich, D. M. (2015). Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2015, 760689. <https://doi.org/10.1155/2015/760689>
- Huang, K. (1998). *The Pharmacology of Chinese Herbs*. <https://doi.org/10.4324/9780367801892>
- Ivanov, I., Vasileva, A., Tasheva, D., & Dimitrova, M. (2023). Isolation and characterization of natural inhibitors of post-proline specific peptidases from the leaves of *Cotinus coggygria* Scop. *Journal of Ethnopharmacology*, 314, 116508. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116508>
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., & Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.033>
- Jana, S., Patra, K., Jana, J., Mandal, D. P., & Bhattacharjee, S. (2018). Nrf-2 transcriptionally activates P21Cip/WAF1 and promotes A549 cell survival against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Chemico-Biological Interactions*, 285, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.030>
- Jangpangi, D., Patni, B., Chandola, V., & Chandra, S. (2025). Medicinal plants in a changing climate: understanding the links between environmental stress and secondary metabolite synthesis. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1587337. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1587337>

- Jayasooriya, R. G. P. T., Molagoda, I. M. N., Park, C., Jeong, J. W., Choi, Y. H., Moon, D. O., Kim, M. O., & Kim, G. Y. (2018). Molecular chemotherapeutic potential of butein: A concise review. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.028>
- Jiménez-González, V., Benítez, G., Pastor, J. E., López-Lázaro, M., & Calderón-Montaña, J. M. (2023). Evaluation of Anticancer Activity of 76 Plant Species Collected in Andalusia (Spain) against Lung Cancer Cells. *Plants*, 12(18), 3275. <https://doi.org/10.3390/plants12183275>
- Jing, B., Ma, Z., Feng, J., Liang, H., Li, C., & Zhang, X. (2012). Evaluation of the Antiviral Activity of Extracts from Plants Grown in the Qinling Region of China Against Infection by Tobacco mosaic virus (TMV). *Journal of Phytopathology*, 160(4), 181-186. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01880.x>
- Joshi, S. C., & Mathela, C. S. (2014). Essential oil composition of *Rhus cotinus* and its antioxidant activity. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4(3), 39-43. <https://www.scholarsresearchlibrary.com/abstract/essential-oil-composition-of-rhus-cotinus-and-its-antioxidant-activity-7687.html>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kang, K. A., Lee, J. H., Chae, S., Zhang, R., Piao, M. J., Kim, H. S., You, H. J., & Hyun, J. W. (2009). Butin decreases oxidative stress-induced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels via activation of oxoguanine glycosylase 1. *Chemico-Biological Interactions*, 181(3), 338-342. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.07.011>
- Karpuz, M., Silindir-Gunay, M., & Ozer, A. Y. (2018). Current and Future Approaches for Effective Cancer Imaging and Treatment. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 33(2), 39-51. <https://doi.org/10.1089/cbr.2017.2378>
- Kasai, H., Kawai, K., & Li, Y. S. (2013). Free radical-mediated cytosine C-5 methylation triggers epigenetic changes during carcinogenesis. *Biomolecular Concepts*, 4(3), 213-220. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0052>
- Khan, A. E. M. A., Arutla, V., & Srivenugopal, K. S. (2024). Human NQO1 as a Selective Target for Anticancer Therapeutics and Tumor Imaging. *Cells*, 13(15), 1272. <https://doi.org/10.3390/cells13151272>
- Khan, N., Jajeh, F., Eberhardt, E. L., Miller, D. D., Albrecht, D. M., Van Doorn, R., Hruby, M. D., Maresh, M. E., Clipson, L., Mukhtar, H., & Halberg, R. B. (2019a). Fisetin and 5-fluorouracil: Effective combination for PIK3CA-mutant colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 145(11), 3022-3032. <https://doi.org/10.1002/ijc.32367>
- Khan, T., Ali, M., Khan, A., Nisar, P., Jan, S. A., Afridi, S., & Shinwari, Z. K. (2019b). Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. *Biomolecules*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.3390/biom10010047>

- Kiehlmann, E., & Slade, P. W. (2003). Methylation of Dihydroquercetin Acetates: Synthesis of 5-O-Methyldihydroquercetin. *Journal of Natural Products*, 66(12), 1562-1566. <https://doi.org/10.1021/np034005w>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019a). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907-915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kim, J. M., Noh, E. M., Kwon, K. B., Kim, J. S., You, Y. O., Hwang, J. K., Hwang, B. M., Kim, M. S., Lee, S. J., Jung, S. H., Youn, H. J., Chung, E. Y., & Lee, Y. R. (2013a). Suppression of TPA-induced tumor cell invasion by sulfuretin via inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 expression. *Oncology Reports*, 29(3), 1231-1237. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2218>
- Kim, M. S., Lee, C. W., Kim, J. H., Lee, J. C., & An, W. G. (2019b). Extract of *Rhus verniciflua* Stokes Induces p53-Mediated Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 9407340. <https://doi.org/10.1155/2019/9407340>
- Kim, S., Kim, D. H., Lee, S. H., Kim, M. J., Yoon, J.-H., Chung, H. Y., Na, C. S., & Kim, N. D. (2013b). Urushiol Induces Apoptosis via a p53-dependent Pathway in Human Gastric Cancer Cells. *Journal of Cancer Prevention*, 18(2), 169-176. <https://doi.org/10.15430/jcp.2013.18.2.169>
- Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 322. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00322>
- Komata, T., Kanzawa, T., Takeuchi, H., Germano, I. M., Schreiber, M., Kondo, Y., & Kondo, S. (2003). Antitumour effect of cyclin-dependent kinase inhibitors (p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1) on malignant glioma cells. *British Journal of Cancer*, 88(8), 1277. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600862>
- Korotkevich, G., Sukhov, V., Budin, N., Shpak, B., Artyomov, M. N., & Sergushichev, A. (2016). Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/060012>
- Kowalski, R., & Baj, T. (2025). Secondary Metabolites from Natural Products: Extraction, Isolation and Biological Activities. *Molecules*, 30(21), 4233. <https://doi.org/10.3390/molecules30214233>
- Kozlov, A. V., Javadov, S., & Sommer, N. (2024). Cellular ROS and Antioxidants: Physiological and Pathological Role. *Antioxidants*, 13(5), 602. <https://doi.org/10.3390/antiox13050602>
- Kültür, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 341-364. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.035>
- Kumarasamy, V., Wang, J., Roti, M., Wan, Y., Dommer, A. P., Rosenheck, H., Putta, S., Trub, A., Bisi, J., Strum, J., Roberts, P., Rubin, S. M., Frangou, C., McLean, K., Witkiewicz, A. K., & Knudsen, E. S. (2025). Discrete vulnerability to pharmacological CDK2 inhibition is governed by heterogeneity of the cancer cell cycle. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56674-4>

- Kumazoe, M., Fujimura, Y., Shimada, Y., Onda, H., Hatakeyama, Y., & Tachibana, H. (2024). Fustin suppressed melanoma cell growth via cAMP/PKA-dependent mechanism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 88(8), 900-907. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae072>
- Lai, A. Y., Sorrentino, J. A., Dragnev, K. H., Weiss, J. M., Owonikoko, T. K., Rytlewski, J. A., Hood, J., Yang, Z., Malik, R. K., Strum, J. C., & Roberts, P. J. (2020). CDK4/6 inhibition enhances antitumor efficacy of chemotherapy and immune checkpoint inhibitor combinations in preclinical models and enhances T-cell activation in patients with SCLC receiving chemotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2), e000847. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000847>
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I., & Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311(5762), 847-851. <https://doi.org/10.1126/science.1115035>
- Lam, K. C., Ibrahim, R. K., Behdad, B., & Dayanandan, S. (2007). Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*, 50(11), 1001-1013. <https://doi.org/10.1139/g07-077>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, 15(2), R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Lee, D. S., Kim, K. S., Ko, W., Li, B., Jeong, G. S., Jang, J. H., Oh, H., & Kim, Y. C. (2014a). The Cytoprotective Effect of Sulfuretin against tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Hepatotoxicity through Nrf2/ARE and JNK/ERK MAPK-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8863-8877. <https://doi.org/10.3390/ijms15058863>
- Lee, J. O., Moon, J. W., Lee, S. K., Kim, S. M., Kim, N., Ko, S. G., Kim, H. S., & Park, S. H. (2014b). *Rhus verniciflua* extract modulates survival of MCF-7 breast cancer cells through the modulation of AMPK-pathway. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37(5), 794-801. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00893>
- Lee, K. W., Chung, K. S., Seo, J. H., Yim, S. V., Park, H. J., Choi, J. H., & Lee, K. T. (2012). Sulfuretin from heartwood of *Rhus verniciflua* triggers apoptosis through activation of Fas, Caspase-8, and the mitochondrial death pathway in HL-60 human leukemia cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(9), 2835-2844. <https://doi.org/10.1002/jcb.24158>
- Lee, S. O., Kim, S. J., Kim, J. S., Ji, H., Lee, E. O., & Lee, H. J. (2018). Comparison of the main components and bioactivity of *Rhus verniciflua* Stokes extracts by different detoxification processing methods. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2310-x>
- Lee, Y., Lee, C., Lee, S. H., & Lee, Y. J. (2025). Effect of Butein, a Plant Polyphenol, on Apoptosis and Necroptosis of Prostate Cancer Cells in 2D and 3D Cultures. *Life*, 15(6), 836. <https://doi.org/10.3390/life15060836>

- Li, Q., Geng, S., Luo, H., Wang, W., Mo, Y. Q., Luo, Q., Wang, L., Song, G. B., Sheng, J. P., & Xu, B. (2024). Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 266. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01953-7>
- Li, Y., Jia, S., & Dai, W. (2020). Fisetin Modulates Human Oral Squamous Cell Carcinoma Proliferation by Blocking PAK4 Signaling Pathways. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 773-782. <https://doi.org/10.2147/dddt.s229270>
- Long, D. J., Waikel, R. L., Wang, X.-J., Perlaky, L., Roop, D. R., & Jaiswal, A. K. (2000). NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 60(21), 5913-5915.
- Lu, Y., Shan, L., Cheng, X., & Zhu, X. L. (2024). Exploring the mechanism underlying the therapeutic effects of butein in colorectal cancer using network pharmacology and single-cell RNA sequencing data. *Journal of Gene Medicine*, 26(1), e3628. <https://doi.org/10.1002/jgm.3628>
- Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D., & Woolf, P. J. (2009). GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, 10, 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-161>
- Luo, X., Zhang, H., Duan, Y., & Chen, G. (2018). Protective effects of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves extract against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human fetal lung fibroblast (MRC-5) cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.049>
- Mala flora Hrvatske*. (n.d.). Retrieved September 9, 2026, from <https://www.scribd.com/document/693605211/Mala-Flora-Hrvatske>
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6). <https://doi.org/10.1186/gb4184>
- Mandal, T., Shukla, D., Pattanayak, S., Barman, R., Ashraf, R., Dixit, A. K., Kumar, S., Kumar, D., & Srivastava, A. K. (2024). Ellagic Acid Induces DNA Damage and Apoptosis in Cancer Stem-like Cells and Overcomes Cisplatin Resistance. *ACS Omega*, 9(50), 48988-49000. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08819>
- Mansilla, S. F., de la Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., & Gottifredi, V. (2020). CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication. *Genes*, 11(6), 593. <https://doi.org/10.3390/genes11060593>
- Marčetić, M., Božić, D., Milenković, M., Malešević, N., Radulović, S., & Kovačević, N. (2013). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygria* Scop. *Phytotherapy Research*, 27(11), 1658-1663. <https://doi.org/10.1002/ptr.4919>
- Matić, I. Z. (2013). *In vitro ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata endemične biljne vrste Helichrysum zivojinii Černjavski et Soška* [Doctoral dissertation, University of Belgrade]. <https://doi.org/10.2298/bg20131112matic>

- Matić, I. Z., Aljančić, I., Žižak, Ž., Vajs, V., Jadranin, M., Milosavljević, S., & Juranić, Z. D. (2013a). In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-36>
- Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Solujić, S., Grdović, N., Vidaković, M., & Mihailović, M. (2011). Genotoxic potential of *Cotinus coggygria* Scop. (Anacardiaceae) stem extract in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2), 298-303. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572011005000001>
- Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Solujić, S., Mladenović, M., Stanković, N., & Mihailović, M. (2013b). Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.011>
- Matić, S., Stanić, S., Mihailović, M., & Bogojević, D. (2016). *Cotinus coggygria* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.05.012>
- Mehdiyeva, N. P., Alizade, V. M., Bussmann, R. W., Paniagua-Zambrana, N. Y., Khutsishvili, M., Kikvidze, Z., Batsatsashvili, K., Khojimatov, O. K., Nasab, F. K., Zeraatkar, A., Maisaia, I., Sikharulidze, S., Tchelidze, D., Fayvush, G., & Aleksanyan, A. (2024). *Rhus coriaria L. Anacardiaceae*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50009-6\\_26-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50009-6_26-2)
- Meloche, S., & Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26(22), 3227-3239. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>
- Milacic, M., Beavers, D., Conley, P., Gong, C., Gillespie, M., Griss, J., Haw, R., Jassal, B., Matthews, L., May, B., Petryszak, R., Ragueneau, E., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Stephan, R., Tiwari, K., Varusai, T., Weiser, J., . . . D'Eustachio, P. (2024). The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D672-D678. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1025>
- Milosavljevic, S., Djordjevic, I., Mandic, B., Tesevic, V., Stankovic, M., Todorovic, N., & Novaković, M. (2021). Flavonoids of the Heartwood of *Cotinus coggygria* Scop. Showing Protective Effect on Human Lymphocyte DNA. *Natural Product Communications*, 16(12). <https://doi.org/10.1177/1934578x211067289>
- Moon, D. O., Kim, M. O., Choi, Y. H., Hyun, J. W., Chang, W. Y., & Kim, G. Y. (2010). Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer Letters*, 288(2), 204-213. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.002>
- Moon, D. O., Kim, M. O., Lee, J. D., Choi, Y. H., & Kim, G. Y. (2009). Butein suppresses c-Myc-dependent transcription and Akt-dependent phosphorylation of hTERT in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 286(2), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.028>
- Mustafa, M., Ahmad, R., Tantry, I. Q., Ahmad, W., Siddiqui, S., Alam, M., Abbas, K., Moinuddin, Hassan, M. I., Habib, S., & Islam, S. (2024). Apoptosis: A Comprehensive Overview of

- Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*, 13(22), 1838. <https://doi.org/10.3390/cells13221838>
- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & Therapeutics*, 163, 94-108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
- Nevzorova, Y. A., & Trautwein, C. (2015). Regulation of Cell Cycle During Liver Regeneration. In *Liver Regeneration: Basic Mechanisms, Relevant Models and Clinical Applications* (pp. 153-166). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420128-6.00011-7>
- Ngo, V., & Duennwald, M. L. (2022). Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants*, 11(12), 2345. <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>
- Nishida, A., & Andoh, A. (2025). The Role of Inflammation in Cancer: Mechanisms of Tumor Initiation, Progression, and Metastasis. *Cells*, 14(7), 488. <https://doi.org/10.3390/cells14070488>
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59(6), 365-378. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.01.017>
- Nossier, E. S., Anwar, M. M., & El-Zahabi, M. A. (2026). Recent advances in drug repositioning and rediscovery for different therapeutic activities utilizing updated technological approaches. *Molecular Diversity*, 30(1), 299-326. <https://doi.org/10.1007/s11030-025-11248-w>
- Novaković, M., Djordjevic, I., Todorovic, N., Trifunovic, S., Andjelkovic, B., Mandic, B., Jadranin, M., Vuckovic, I., Vajs, V., Milosavljevic, S., & Tesevic, V. (2019). New aurone epoxide and auronolignan from the heartwood of *Cotinus coggygria* Scop. *Natural Product Research*, 33(19), 2837-2844. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1508141>
- Novaković, M., Todorovic, N., Jadranin, M., Djordjevic, I., Milosavljevic, S., Mandic, B., & Tesevic, V. (2023). A New Auronolignan from the *Cotinus coggygria* Heartwood. *Chemistry of Natural Compounds*, 59(3), 428-430. <https://doi.org/10.1007/s10600-023-04016-5>
- Novaković, M., Vučković, I., Janačković, P., Soković, M., Filipović, A., Tešević, V., & Milosavljević, S. (2007). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygria* from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(11), 1045-1051. <https://doi.org/10.2298/jsc0711045n>
- Okuyama, N. C. M., Ribeiro, D. L., da Rocha, C. Q., Pereira, É. R., Cólus, I. M. D. S., & Serpeloni, J. M. (2023). Three-dimensional cell cultures as preclinical models to assess the biological activity of phytochemicals in breast cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 460, 116376. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116376>
- Opiyo, S. A., Njoroge, P. W., Ndirangu, E. G., & Kuria, K. M. (2021). A Review of Biological Activities and Phytochemistry of *Rhus* Species. *American Journal of Chemistry*, 11(2), 28-36. <https://doi.org/10.5923/j.chemistry.20211102.02>

- Oren-Shamir, M., & Levi-Nissim, A. (1997). UV-light effect on the leaf pigmentation of *Cotinus coggygria* 'Royal Purple'. *Scientia Horticulturae*, 71(1-2), 59-66.  
[https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(97\)00073-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(97)00073-3)
- Ormerod, M. G. (2000). *Flow cytometry: A practical approach*. Oxford University Press.
- Osseni, R. A., Rat, P., Bogdan, A., Warnet, J. M., & Touitou, Y. (2000). Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sciences*, 68(4), 387-399.  
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00955-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00955-3)
- Padmavathi, G., Rathnakaram, S. R., Monisha, J., Bordoloi, D., Roy, N. K., & Kunnumakkara, A. B. (2015). Potential of butein, a tetrahydroxychalcone to obliterate cancer. *Phytomedicine*, 22(13), 1163-1171. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.015>
- Padmavathi, G., Roy, N. K., Bordoloi, D., Arfuso, F., Mishra, S., Sethi, G., Bishayee, A., & Kunnumakkara, A. B. (2017). Butein in health and disease: A comprehensive review. *Phytomedicine*, 25, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.12.002>
- Pandey, K., Park, N., Park, K. S., Hur, J., Cho, Y. B., Kang, M., An, H. J., Kim, S., Hwang, S., & Moon, Y. W. (2020). Combined CDK2 and CDK4/6 Inhibition Overcomes Palbociclib Resistance in Breast Cancer by Enhancing Senescence. *Cancers*, 12(12), 3566.  
<https://doi.org/10.3390/cancers12123566>
- Pašić, I., Novaković, M., Tešević, V., Milosavljević, S., Petrović, N., Stanojković, T., & Matić, I. Z. (2025). Exploring the anticancer potential of extracts and compounds from the heartwood of *Cotinus coggygria* Scop. wild growing in Serbia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12906-025-04768-3>
- Pei, Y., Yin, J., Liu, J., Liu, D., Wu, Q., Cai, X., Han, M., Tian, Y., Yang, L., & Liu, S. (2026). The role of NRF2 in human cancers: Pre-clinical insights paving the way for clinical trials. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 16(5), 101358. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2025.101358>
- Pellarin, I., Dall'Acqua, A., Favero, A., Segatto, I., Rossi, V., Crestan, N., Karimbayli, J., Belletti, B., & Baldassarre, G. (2025). Cyclin-dependent protein kinases and cell cycle regulation in biology and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 11.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-02080-z>
- Peris, E., Micallef, P., Paul, A., Palsdottir, V., Enejder, A., Bauzá-Thorbrügge, M., Olofsson, C. S., & Asterholm, I. W. (2018). Antioxidant treatment induces reductive stress associated with mitochondrial dysfunction in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 294(7), 2340.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.004253>
- Phan, N. L.-C., Pham, K. D., Nguyen, M. T.-T., Kim, N. P., Truong, K. D., & Pham, P. V. (2020). Anti-tumor activity of plant extracts against human breast cancer cells are different in monolayer and three-dimensional cell culture screening models: A comparison on 34 extracts. *Biomedical Research and Therapy*, 7(3), 3667-3677. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i3.593>

- Pimentel, J. M., Zhou, J. Y., & Wu, G. S. (2023). The Role of TRAIL in Apoptosis and Immunosurveillance in Cancer. *Cancers*, 15(10), 2752. <https://doi.org/10.3390/cancers15102752>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plants of the World Online. (n.d.). *Cotinus Mill.* Retrieved September 17, 2026, from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30173577-2>
- Pollio, A., Zarrelli, A., Romanucci, V., Di Mauro, A., Barra, F., Pinto, G., Crescenzi, E., Roscetto, E., & Palumbo, G. (2016). Polyphenolic Profile and Targeted Bioactivity of Methanolic Extracts from Mediterranean Ethnomedicinal Plants on Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, 21(4), 395. <https://doi.org/10.3390/molecules21040395>
- Poudel, S., Song, J., Jin, E. J., & Song, K. (2013). Sulfuretin-induced miR-30C selectively downregulates cyclin D1 and D2 and triggers cell death in human cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 572-578. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.012>
- Prada, A. L., Amado, J. R. R., Reis, E. T. D. N., Bicudo, G., Perdomo, R. T., & Martines, M. A. U. (2024). Antiproliferative potential of *Petiveria alliacea* L. extract-loaded nanodispersion against cancer cells. *Biotechnology Research and Innovation Journal*, 7(2). <https://doi.org/10.4322/biori.0142023>
- Pressete, C. G., dos Santos Lima, A., da Silva Monteiro, L. I., dos Santos Lima, M., Granato, D., Azevedo, L., & Antunes, L. M. G. (2026). Chemical composition, antiproliferative, and cell death potential of crude and digested jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) leaf extracts in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells in 2D and 3D culture: a bioprospecting approach. *Food Research International*, 225, 118174. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.118174>
- Qi, L., Wang, L., Jin, M., Jiang, M., Li, L., & Li, Y. (2023). Caspase-6 is a key regulator of cross-talk signal way in PANoptosis in cancer. *Immunology*, 169(3), 245-259. <https://doi.org/10.1111/imm.13633>
- Rahman, S., Jan, G., Jan, F. G., & Rahim, H. U. (2022). Phytochemical Investigation and Therapeutical Potential of *Cotinus coggygia* Scop. in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Genetics Research*, 2022, 8802178. <https://doi.org/10.1155/2022/8802178>
- Rakha, A., Shehzad, A., & Khan, K. (2024). Editorial: Plant bioactives: challenges of extraction and processing. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1357925. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1357925>
- Ramanathan, R., Tan, C. H., & Das, N. P. (1992). Cytotoxic effect of plant polyphenols and fat-soluble vitamins on malignant human cultured cells. *Cancer Letters*, 62(3), 217-224. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(92\)90099-h](https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90099-h)

- Rao, M. J., & Zheng, B. (2025). The role of polyphenols in abiotic stress tolerance and their antioxidant properties to scavenge reactive oxygen species and free radicals. *Antioxidants*, 14(1), 74. <https://doi.org/10.3390/antiox14010074>
- Raya-Morquero, E. M., Aguilar-Zarate, P., Sepúlveda, L., Michel, M. R., Iliná, A., Aguilar, C. N., & Ascacio-Valdés, J. A. (2025). Ellagitannins and Their Derivatives: A Review on the Metabolization, Absorption, and Some Benefits Related to Intestinal Health. *Microbiology Research*, 16(6), 113. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16060113>
- Redžić, S. S. (2007). The Ecological Aspect of Ethnobotany and Ethnopharmacology of Population in Bosnia and Herzegovina. *Collegium Antropologicum*, 31, 869-890.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rivero-Cruz, J. F., Chavez, D., Hernandez Bautista, B., Anaya, A. L., & Mata, R. (1997). Separation and characterization of *Metopium brownei* urushiol components. *Phytochemistry*, 45(5), 1003-1008. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00032-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00032-0)
- Ross, D., & Siegel, D. (2017). Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. *Frontiers in Physiology*, 8, 595. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00595>
- Roy, S., & Nicholson, D. W. (2000). Cross-Talk in Cell Death Signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(8), f21. <https://doi.org/10.1084/jem.192.8.f21>
- Rubin, S. M., Sage, J., & Skotheim, J. M. (2020). Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Molecular Cell*, 80(2), 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.020>
- Rudrapal, M., Khan, J., Dukhyil, A. A. B., Alarousy, R. M. I. I., Attah, E. I., Sharma, T., Khairnar, S. J., & Bendale, A. R. (2021). Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. *Molecules*, 26(23), 7177. <https://doi.org/10.3390/molecules26237177>
- Saloua, K. S., & Alansari, R. M. (2025). Impact of ionizing radiation and low-energy electrons on DNA functionality: radioprotection and radiosensitization potential of natural products. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 23(2), 100501. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2025.100501>
- Sánchez-Viesca, F., & Gómez, R. (2021). On the Chemistry of Sonnenschein Test for Strychnine. *American Journal of Chemistry*, 11(3), 49-51. <https://doi.org/10.5923/j.chemistry.20211103.02>
- Sandberg, M., Patil, J., D'Angelo, B., Weber, S. G., & Mallard, C. (2014). NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology*, 79, 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.004>

- Santos, R. A., Pessoa, H. R., Daleprane, J. B., de Faria Lopes, G. P., & da Costa, D. C. F. (2024). Comparative Anticancer Potential of Green Tea Extract and Epigallocatechin-3-gallate on Breast Cancer Spheroids. *Foods*, 13(1), 64. <https://doi.org/10.3390/foods13010064>
- Sava, G. P., Fan, H., Coombes, R. C., Buluwela, L., & Ali, S. (2020). CDK7 inhibitors as anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 805-823. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09885-8>
- Šavikin, K., Zdunic, G., Jankovic, T., Stanojkovic, T., Juranic, Z., & Menkovic, N. (2009). In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*. *Natural Product Research*, 23(18), 1731-1739. <https://doi.org/10.1080/14786410802267650>
- Schiliro, C., & Firestein, B. L. (2021). Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*, 10(5), 1056. <https://doi.org/10.3390/cells10051056>
- Schmidt, M., Rohe, A., Platzer, C., Najjar, A., Erdmann, F., & Sippl, W. (2017). Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. *Molecules*, 22(12), 2045. <https://doi.org/10.3390/molecules22122045>
- Scopoli, J. A. (1772). *Flora Carniolica: Exhibens plantas Carnioliae indigenas et distributas in classes, genera, species, varietates, ordine Linnaeano*. Impensis Ioannis Pauli Krauss. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.159554>
- Seiberg, M., Iotsova Stone, V., Zhao, R., & Bruning, E. (2007). *Compositions containing Cotinus coggygria extract and use thereof in treating hemorrhoids* (U.S. Patent Application Publication No. 2007/0104806 A1). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US20070104806A1>
- Seiberg, M., Iotsova Stone, V., Zhao, R., & Bruning, E. (2010). *Ingestible compositions containing extracts* (U.S. Patent No. 7,754,248). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US7754248B2>
- Shen, Q., Shang, D., Ma, F., & Zhang, Z. (1991). [Pharmacological study on anti-hepatitis effect of *Cotinus coggygria* Scop. syrup]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 16(12), 746-749, 763-764.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Simić, M., Vučićević, D., Milenković, M., & Kovačević, N. (2008). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Cotinus coggygria* extracts. *Planta Medica*, 74(9), PA63. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1084061>
- Simpson, M. G. (2010). Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. In *Plant Systematics* (2nd ed., pp. 275-448). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374380-0.50008-7>
- Simpson, M. G. (2019). *Plant systematics* (3rd ed.). Academic Press.

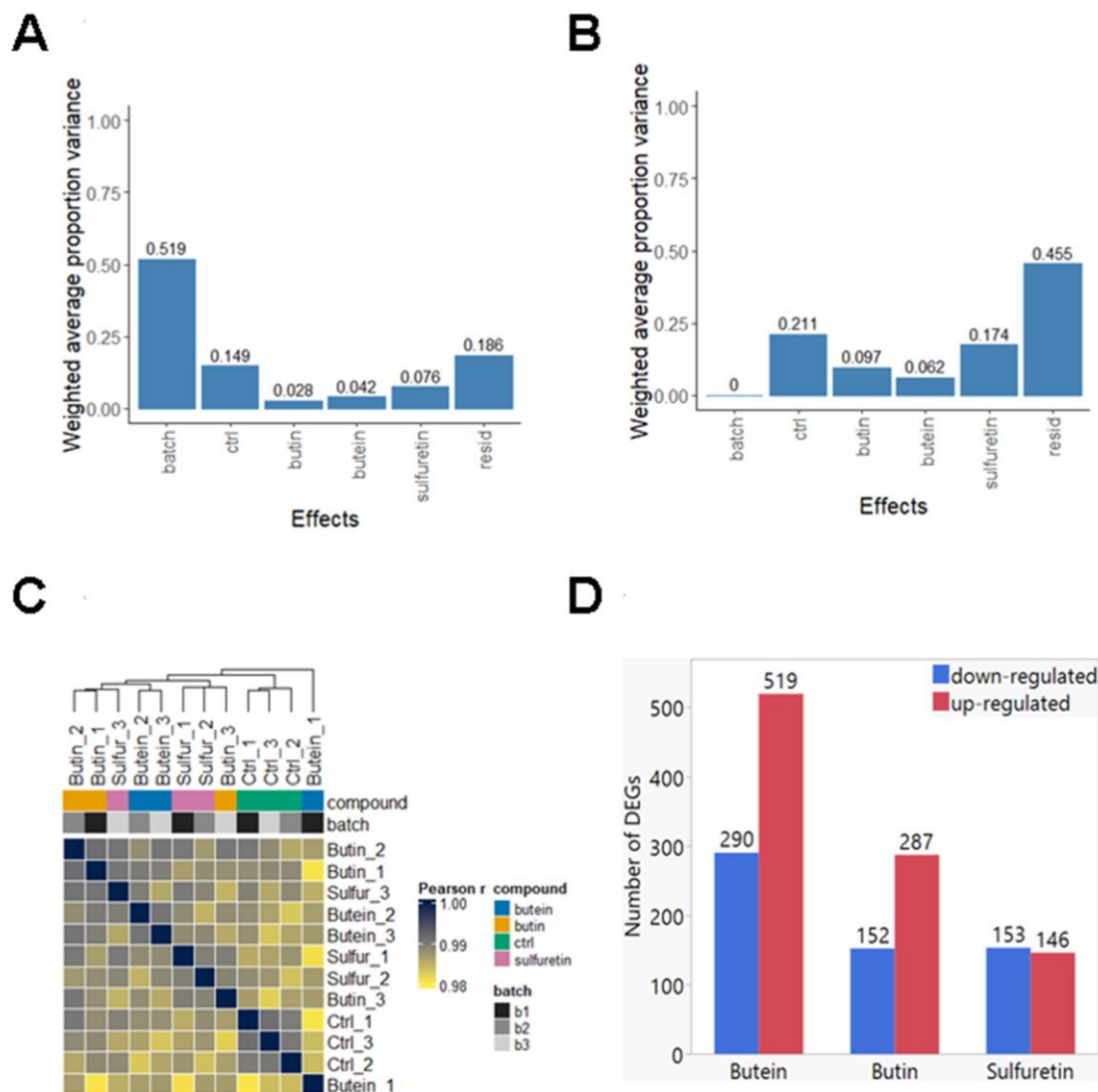
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320-7326. <https://doi.org/10.1074/jbc.m008363200>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244-1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>
- Smith, B. D., Bentzen, S. M., Correa, C. R., Hahn, C. A., Hardenbergh, P. H., Ibbott, G. S., McCormick, B., McQueen, J. R., Pierce, L. J., Powell, S. N., Recht, A., Taghian, A. G., Vicini, F. A., White, J. R., & Haffty, B. G. (2011). Fractionation for whole breast irradiation: an American Society for Radiation Oncology (ASTRO) evidence-based guideline. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 81(1), 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.04.042>
- Smith, M. L., Murphy, K., Doucette, C. D., Greenshields, A. L., & Hoskin, D. W. (2016). The Dietary Flavonoid Fisetin Causes Cell Cycle Arrest, Caspase-Dependent Apoptosis, and Enhanced Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(8), 1913-1925. <https://doi.org/10.1002/jcb.25490>
- Sosa-Hernández, J. E., Escobedo-Avellaneda, Z., Iqbal, H. M. N., & Welte-Chanes, J. (2018). State-of-the-Art Extraction Methodologies for Bioactive Compounds from Algal Biome to Meet Bio-Economy Challenges and Opportunities. *Molecules*, 23(11), 2953. <https://doi.org/10.3390/molecules23112953>
- Springs, S. L., Diavolitsis, V. M., Goodhouse, J., & McLendon, G. L. (2002). The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45715-45718. <https://doi.org/10.1074/jbc.c200524200>
- Stanić, S., Matić, S., Delić, G., Mihailović, M., Bogojević, D., & Solujić, S. (2011). Study of genotoxicity and antigenotoxicity of the *Cotinus coggygria* Scop. methanol extract by *Drosophila melanogaster* sex-linked recessive lethal test. *Russian Journal of Genetics*, 47(7), 770-774. <https://doi.org/10.1134/s1022795411070167>
- Stanković, M., Zlatić, N., Locatelli, M., Perrucci, M., Marković, T., & Jakovljević, D. (2025). Comprehensive study of habitat substrate-related variability of *Cotinus coggygria* Scop. as a valuable source of natural bioactive compounds. *Plants*, 14(17), 2695. <https://doi.org/10.3390/plants14172695>
- Stanojković, T., Marković, V., Matić, I. Z., Mladenović, M. P., Petrović, N., Krivokuća, A., Petković, M., & Joksović, M. D. (2018). Highly selective anthraquinone-chalcone hybrids as potential antileukemia agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(15), 2593-2598. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.048>

- Stojanov, S. J., Grozdanić, M., Ljujić, M., Dragičević, S., Dragoj, M., & Dinić, J. (2025). Cancer 3D Models: Essential Tools for Understanding and Overcoming Drug Resistance. *Oncology Research*, 33(10), 2741-2785. <https://doi.org/10.32604/or.2025.067126>
- Stojanovic, B., Jovanovic, I., Dimitrijevic Stojanovic, M., Stojanovic, B. S., Kovacevic, V., Radosavljevic, I., Jovanovic, D., Miletic Kovacevic, M., Zornic, N., Arsic, A. A., Eric, S., Mirkovic, N., Nesic, J., Jakovljevic, S., Lazarevic, S., Milivojcevic Bevc, I., & Milosevic, B. (2025). Oxidative Stress-Driven Cellular Senescence: Mechanistic Crosstalk and Therapeutic Horizons. *Antioxidants*, 14(8), 987. <https://doi.org/10.3390/antiox14080987>
- Stojiljković, I., Jović, M., Ivković, Đ., Agatonovic-Kustrin, S., & Morton, D. (2025). Enhancing the antioxidant and antimicrobial activities of *Cotinus coggygia* Scop. leaf extracts through fermentation. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2025.2559759>
- Stojković, D., Dragičević, N., Ivanov, M., Gajović, N., Jurišević, M., Jovanović, I., Tomović, M., & Živković, J. (2025). New Evidence for *Cotinus coggygia* Scop. Extracts Application in Gastrointestinal Ailments. *Pharmaceuticals*, 18(1), 98. <https://doi.org/10.3390/ph18010098>
- Sukhikh, S., Noskova, S., Pungin, A., Ivanova, S., Skrypnik, L., Chupakhin, E., & Babich, O. (2021). Study of the Biologically Active Properties of Medicinal Plant *Cotinus coggygia*. *Plants*, 10(6), 1224. <https://doi.org/10.3390/plants10061224>
- Sulikovska, I., Djeliova, V., Georgieva, A., Tsvetanova, E., Kirazov, L., Vasileva, A., Mitev, V., Ivanov, I., & Dimitrova, M. (2026). In Vitro and In Silico Assessment of the Anticancer Potential of Ethyl Acetate/Water Extract from the Leaves of *Cotinus coggygia* Scop. in HepG2 Human Hepatocarcinoma Cells. *Applied Sciences*, 16(2), 740. <https://doi.org/10.3390/app16020740>
- Suski, J. M., Braun, M., Strmiska, V., & Sicinski, P. (2021). Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*, 39(6), 759-778. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010>
- Tang, D., & Kang, R. (2024). NFE2L2 and ferroptosis resistance in cancer therapy. *Cancer Drug Resistance*, 7. <https://doi.org/10.20517/cdr.2024.123>
- Tang, Y. L., Huang, L. B., Lin, W. H., Wang, L. N., Tian, Y., Shi, D., Wang, J., Qin, G., Li, A., Liang, Y. N., Zhou, H. J., Ke, Z. Y., Huang, W., Deng, W., & Luo, X. Q. (2016). Butein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in acute lymphoblastic leukemia via FOXO3a/p27kip1 pathway. *Oncotarget*, 7(14), 18651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7624>
- Thapa, P., Prakash, O., Rawat, A., Kumar, R., Srivastava, R. M., Rawat, D. S., & Pant, A. K. (2020). Essential Oil Composition, Antioxidant, Anti-inflammatory, Insect Antifeedant and Sprout Suppressant Activity in Essential Oil From Aerial Parts of *Cotinus coggygia* Scop. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(1), 65-76. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2020.1729246>
- Tian, X., Srinivasan, P. R., Tajiknia, V., Sanchez Sevilla Uruchurtu, A. F., Seyhan, A. A., Carneiro, B. A., De La Cruz, A., Pinho-Schwermann, M., George, A., Zhao, S., Strandberg, J., Di Cristofano, F., Zhang, S., Zhou, L., Raufi, A. G., Navaraj, A., Zhang, Y., Verovkina, N.,

- Ghandali, M., . . . El-Deiry, W. S. (2024). Targeting apoptotic pathways for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 134(14), e179570. <https://doi.org/10.1172/jci179570>
- Tungalag, T., Park, K. W., & Yang, D. K. (2022). Butein Ameliorates Oxidative Stress in H9c2 Cardiomyoblasts through Activation of the NRF2 Signaling Pathway. *Antioxidants*, 11(8), 1430. <https://doi.org/10.3390/antiox11081430>
- Tzakou, O., Bazos, I., & Yannitsaros, A. (2005). Essential oils of leaves, inflorescences and infructescences of spontaneous *Cotinus coggygria* Scop. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(5), 531-533. <https://doi.org/10.1002/ffj.1456>
- UA Campus Arboretum. (n.d.). *Find trees & learn*. Retrieved September 9, 2026, from <https://apps.cals.arizona.edu/arboretum/browse.aspx>
- Valianou, L., Stathopoulou, K., Karapanagiotis, I., Magiatis, P., Pavlidou, E., Skaltsounis, A. L., & Chrysoulakis, Y. (2009). Phytochemical analysis of young fustic (*Cotinus coggygria* heartwood) and identification of isolated colourants in historical textiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(3), 871-882. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2767-z>
- van Bemmell, D. M., Brank, A. S., Eritja, R., Marquez, V. E., & Christman, J. K. (2009). DNA (Cytosine-C5) methyltransferase inhibition by oligodeoxyribonucleotides containing 2-(1H)-pyrimidinone (zebularine aglycon) at the enzymatic target site. *Biochemical Pharmacology*, 78(6), 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.017>
- Van der Merwe, J. P., Ferreira, D., Brandt, E. V., & Roux, D. G. (1972). Immediate biogenetic precursors of mopanol and peltogynols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 8(9), 521-522. <https://doi.org/10.1039/c39720000521>
- Wan, X., Li, Z., Ye, H., & Cui, Z. (2016). Three-dimensional perfused tumour spheroid model for anti-cancer drug screening. *Biotechnology Letters*, 38(8), 1389. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2035-1>
- Wang, T., Hou, J., Wang, Y., Feng, X., & Liu, X. (2025). Urushiol-Based Antimicrobial Coatings: Molecular Mechanisms, Structural Innovations, and Multifunctional Applications. *Polymers*, 17(11), 1500. <https://doi.org/10.3390/polym17111500>
- Westenburg, H. E., Lee, K. J., Lee, S. K., Fong, H. H. S., Van Breemen, R. B., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, A. D. (2000). Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygria*. *Journal of Natural Products*, 63(12), 1696-1698. <https://doi.org/10.1021/np000292h>
- Yan, W., Chen, S., Zhao, Y., & Ye, X. (2018). Fisetin inhibits the proliferation of gastric cancer cells and induces apoptosis through suppression of ERK 1/2 activation. *Oncology Letters*, 15(6), 8442. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8388>
- Yang, C., Xie, X., Tang, H., Dong, X., Zhang, X., & Huang, F. (2018a). Transcriptome analysis reveals GA induced apoptosis in HCT116 human colon cancer cells through calcium and p53 signal pathways. *RSC Advances*, 8(22), 12449-12458. <https://doi.org/10.1039/c8ra00260f>

- Yang, P. Y., Hu, D. N., Kao, Y. H., Lin, I. C., & Liu, F. S. (2018b). Butein induces apoptotic cell death of human cervical cancer cells. *Oncology Letters*, 16(5), 6615. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9426>
- Yarat, A., Sacan, O., Akyuz, S., Alev, B., Pisiriciler, R., Ak, E., & Yanardag, R. (2013). In vitro effect of aqueous plant extracts on antioxidant parameters in saliva samples. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(3), 118-125. <https://doi.org/10.5897/jmpr012.530>
- Yi, T., Wen, J., Golan-Goldhirsh, A., & Parfitt, D. E. (2008). Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*, 95(2), 241-251. <https://doi.org/10.3732/ajb.95.2.241>
- Ying, T. H., Yang, S. F., Tsai, S. J., Hsieh, S. C., Huang, Y. C., Bau, D. T., & Hsieh, Y. H. (2012). Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8/-caspase-3-dependent pathway. *Archives of Toxicology*, 86(2), 263-273. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0754-6>
- You, M., Xie, Z., Zhang, N., Zhang, Y., Xiao, D., Liu, S., Zhuang, W., Li, L., & Tao, Y. (2023). Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01442-3>
- Zannou, O., Koca, I., Tahergorabi, R., & Ibrahim, S. A. (2025). Bioavailability and purification of anthocyanins extracted from blackberry fruit using deep eutectic solvent. *Industrial Crops and Products*, 230, 121069. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121069>
- Zhang, C., Quan, Y., Yang, L., Bai, Y., & Yang, Y. (2022a). 6-Methoxyflavone induces S-phase arrest through the CCNA2/CDK2/p21CIP1 signaling pathway in HeLa cells. *Bioengineered*, 13(3), 7277-7292. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2047496>
- Zhang, L., Yang, X., Li, X., Li, C., Zhao, L., Zhou, Y., & Hou, H. (2015). Butein sensitizes HeLa cells to cisplatin through the AKT and ERK/p38 MAPK pathways by targeting FoxO3a. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(4), 957-966. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2324>
- Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., Li, X., Cai, H., Wu, X., Zheng, Q., & Cai, C. (2021). CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *American Journal of Cancer Research*, 11(5), 1913. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8167670/>
- Zhang, R., Chae, S., Lee, J. H., & Hyun, J. W. (2012). The cytoprotective effect of butin against oxidative stress is mediated by the up-regulation of manganese superoxide dismutase expression through a PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(6), 1987-1997. <https://doi.org/10.1002/jcb.24068>
- Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Chang, W. Y., Maeng, Y. H., Chae, S., Lee, I. K., Kim, B. J., & Hyun, J. W. (2010). Butin reduces oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction via scavenging of reactive oxygen species. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 922-927. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.001>

- Zhang, Z., Golomb, L., & Meyerson, M. (2022b). Functional Genomic Analysis of CDK4 and CDK6 Gene Dependency across Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, 82(11), 2171-2184. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-21-2428>
- Zhang, Z., Hou, L., Liu, D., Luan, S., Huang, M., & Zhao, L. (2024). Directly targeting BAX for drug discovery: Therapeutic opportunities and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 14(6), 2378-2401. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.02.010>
- Zhao, A., He, Y., Sun, R., Xie, D. D., Bai, H., Han, F., Huang, X., Wu, H., & Liu, C. (2024). Transcriptome and Metabolomic Analyses Reveal Tissue-Specific Glycosylation of Phenylpropanoids and Flavonoids in *Toxicodendron vernicifluum*. *Physiologia Plantarum*, 176(5), e14545. <https://doi.org/10.1111/pp1.14545>
- Zhao, H., & Li, Y. (2021). Cancer metabolism and intervention therapy. *Molecular Biomedicine*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s43556-020-00012-1>
- Zhou, Y., Shen, J. K., Hornicek, F. J., Kan, Q., & Duan, Z. (2016). The emerging roles and therapeutic potential of cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in human cancer. *Oncotarget*, 7(26), 40846-40859. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8519>
- Žlabur, J. Š., Žutić, I., Radman, S., Pleša, M., Brnčić, M., Barba, F. J., Rocchetti, G., Lucini, L., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Brnčić, S. R., Galić, A., & Voća, S. (2020). Effect of Different Green Extraction Methods and Solvents on Bioactive Components of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Flowers. *Molecules*, 25(4), 810. <https://doi.org/10.3390/molecules25040810>



**Prilog 1 A:** Analiza glavnih komponenti varijanse (engl. *Principal Variance Component Analysis*) sa uključenim efektom serije (engl. *batch effect*).

**B:** Analiza glavnih komponenti varijanse na podacima normalizovanim prema efektu serije.

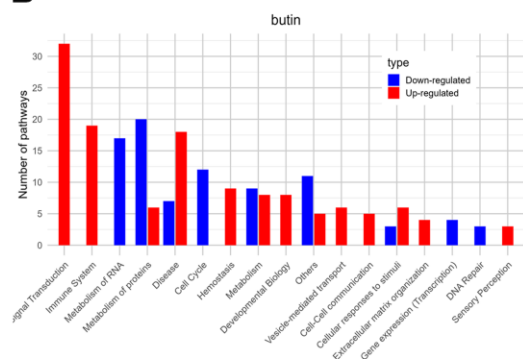
**C:** Heatmap korelacija urađen na podacima normalizovanim prema efektu serije.

**D:** Broj pozitivno i negativno regulisanih DEG u svakoj tretiranoj grupi.

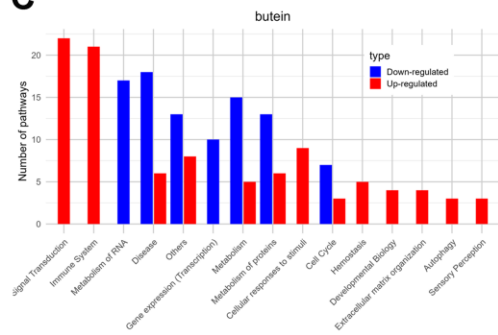
**A**



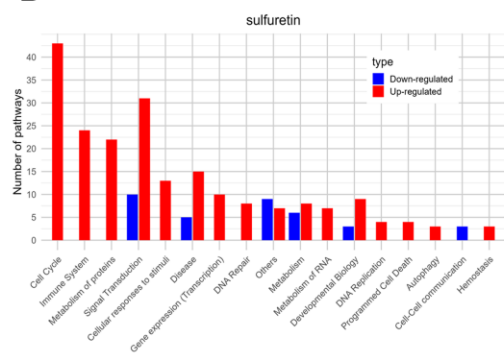
**B**



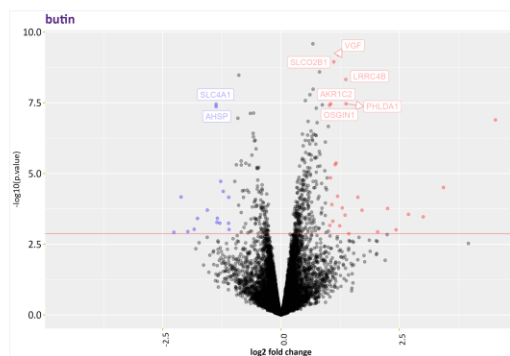
**C**



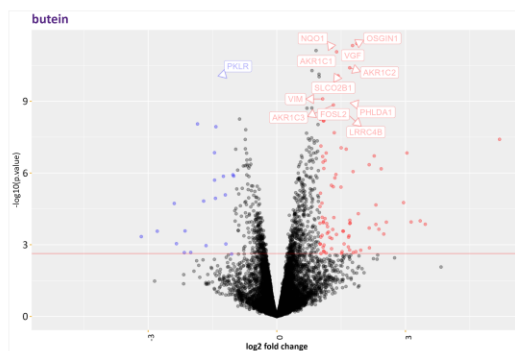
**D**



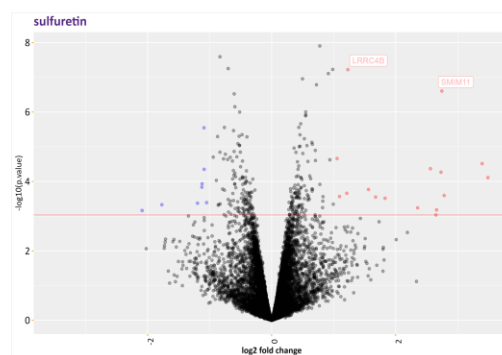
**E**



**F**



**G**

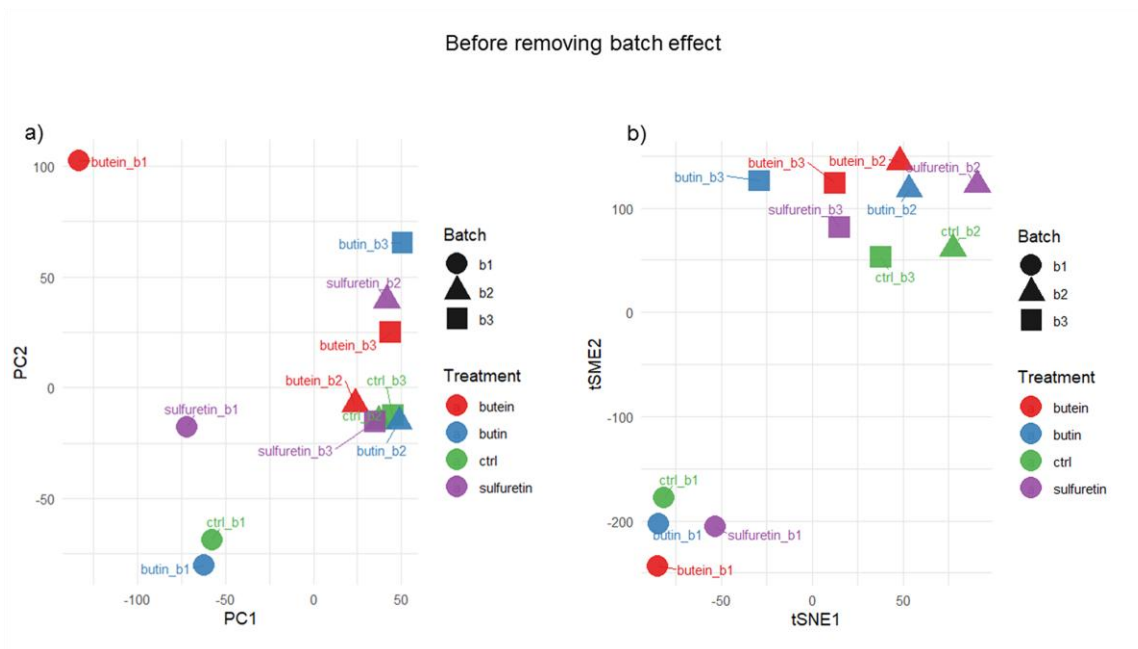


*Prilog 2*

**A:** Venov dijagram koji prikazuje značajne DEG zajedničke za tretmane butinom, buteinom i sulfuretinom.

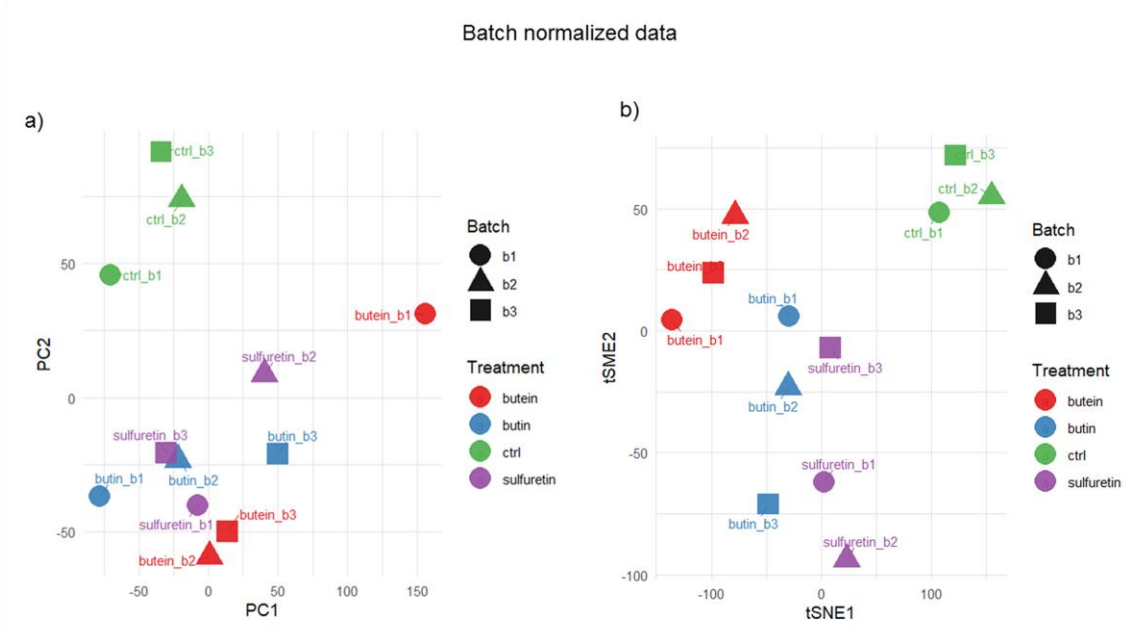
**B-D:** Klaster analiza puteva koja prikazuje najznačajnije negativno regulisane (plavo) i pozitivno regulisane (crveno) signalne/metaboličke puteve za **B:** butin, **C:** butein i **D:** sulfuretin.

**E-G:** Volcano grafici za tretmane **E:** butinom, **F:** buteinom i **G:** sulfuretinom.



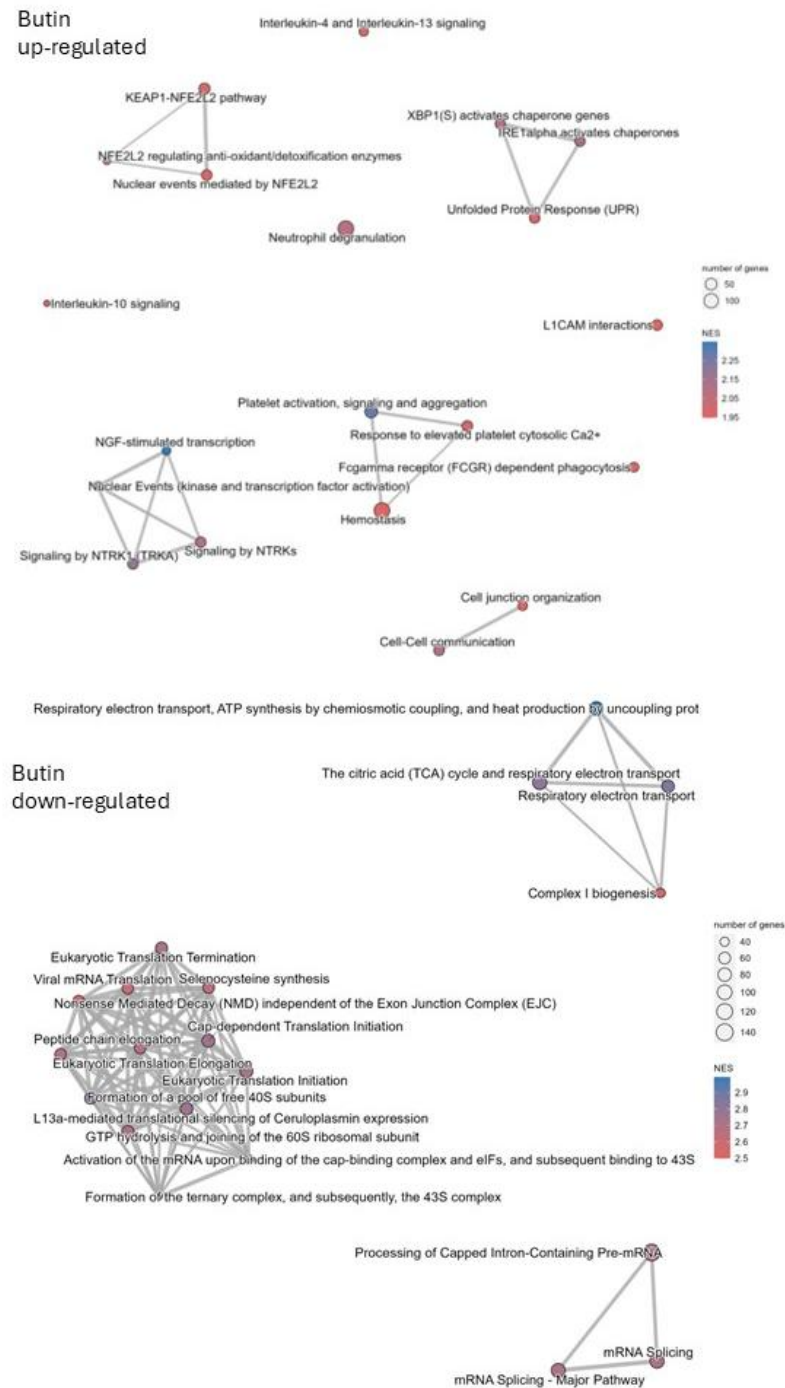
### Prilog 3

**a)** PCA grafikon koji prikazuje grupisanje uzoraka uslovljeno efektom serije pre korekcije efekta serije. **b)** t-SNE grafikon koji prikazuje grupisanje uzoraka uslovljeno efektom serije pre korekcije efekta serije.

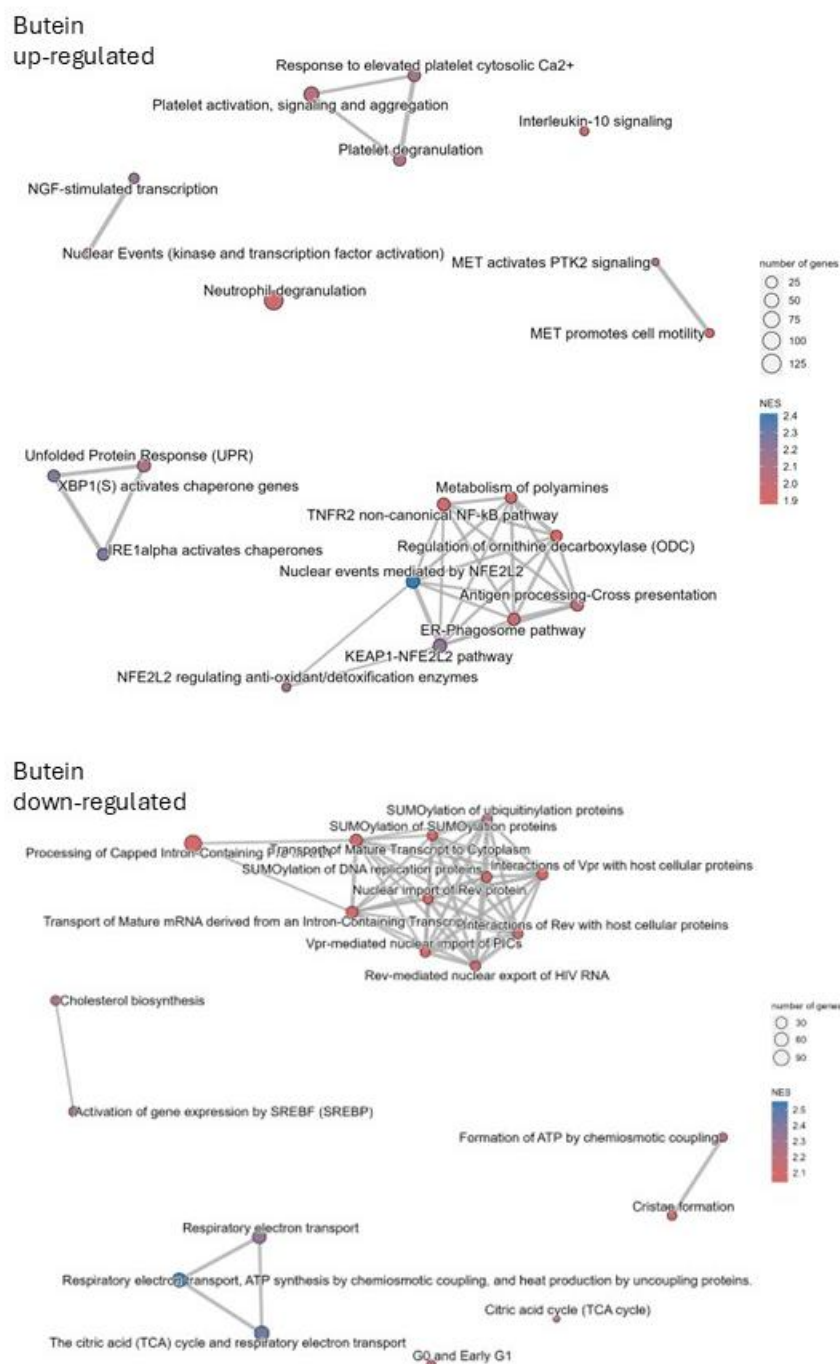


## Prilog 4

- a) PCA grafikon nakon uklanjanja varijanse povezane sa efektom serije.  
b) t-SNE grafikon nakon uklanjanja varijanse povezane sa efektom serije.

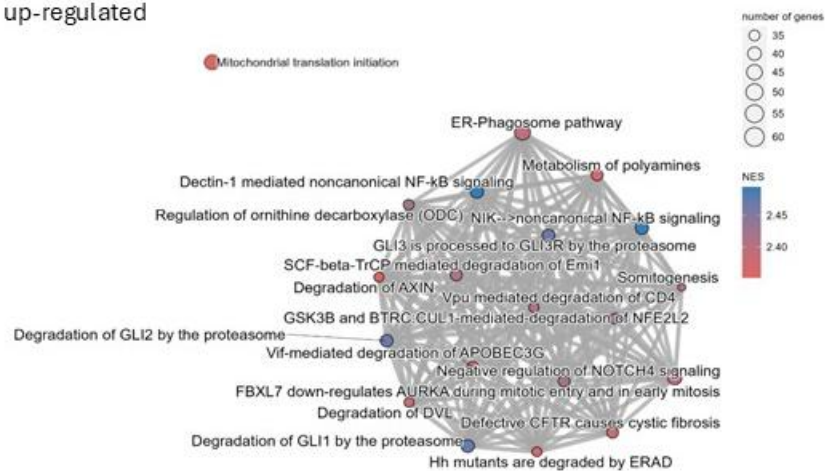


**Prilog 5 Mreže signalnih puteva koje prikazuju visoko obogaćene, značajno izmenjene signalne puteve nakon tretmana butinom.**

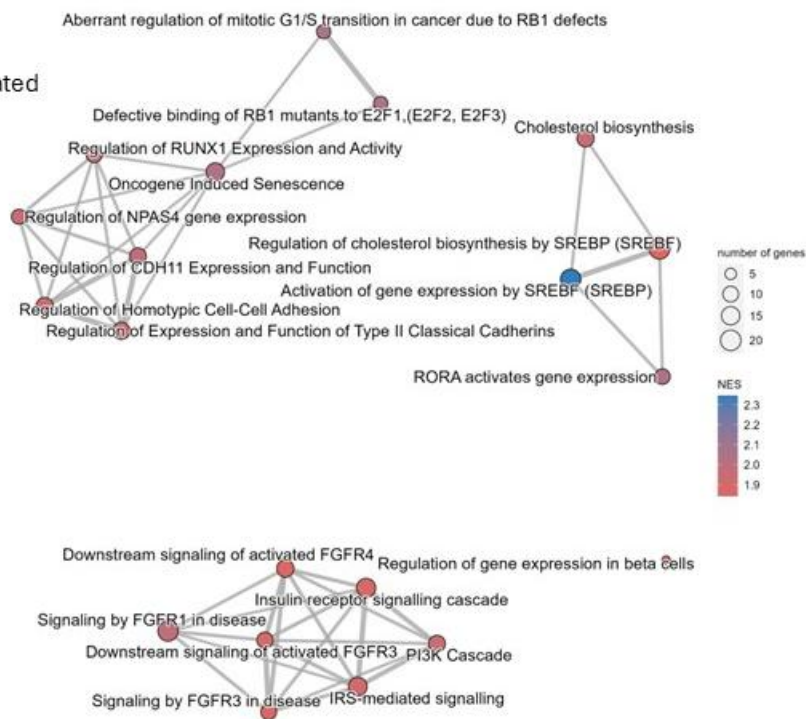


**Prilog 6 Mreže signalnih puteva koje prikazuju visoko obogaćene, značajno izmenjene signalne puteve nakon tretmana buteinom.**

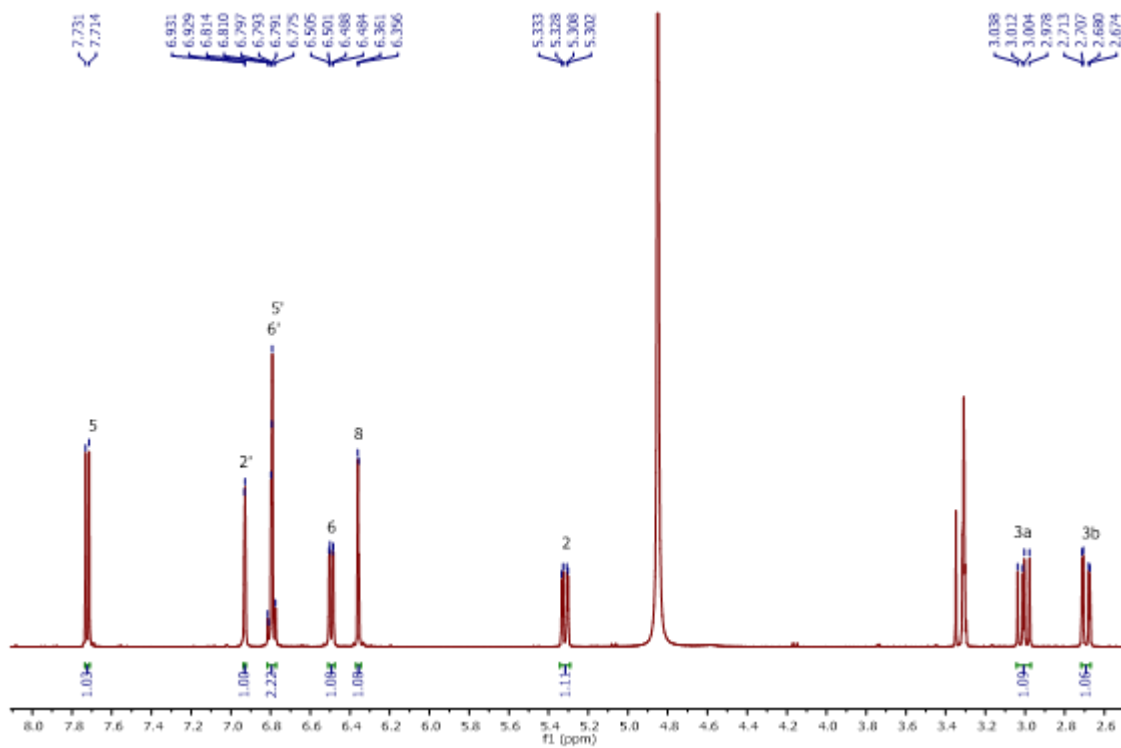
Sulfuretin  
up-regulated



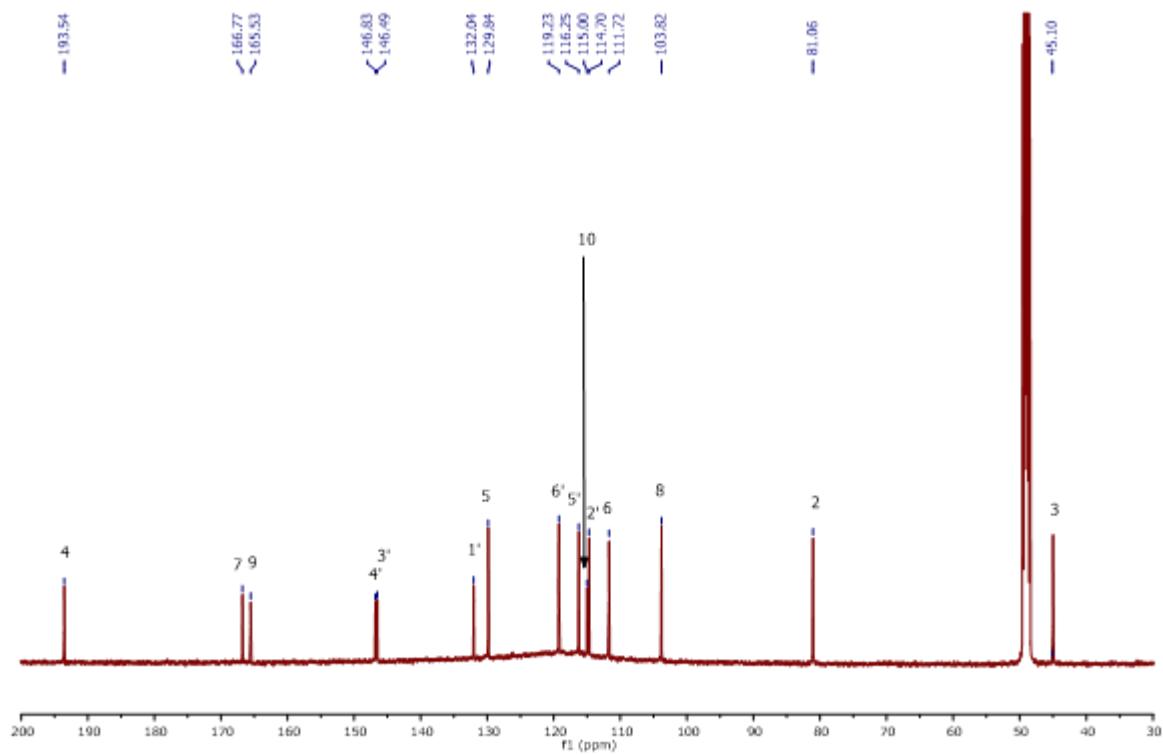
Sulfuretin  
down-regulated



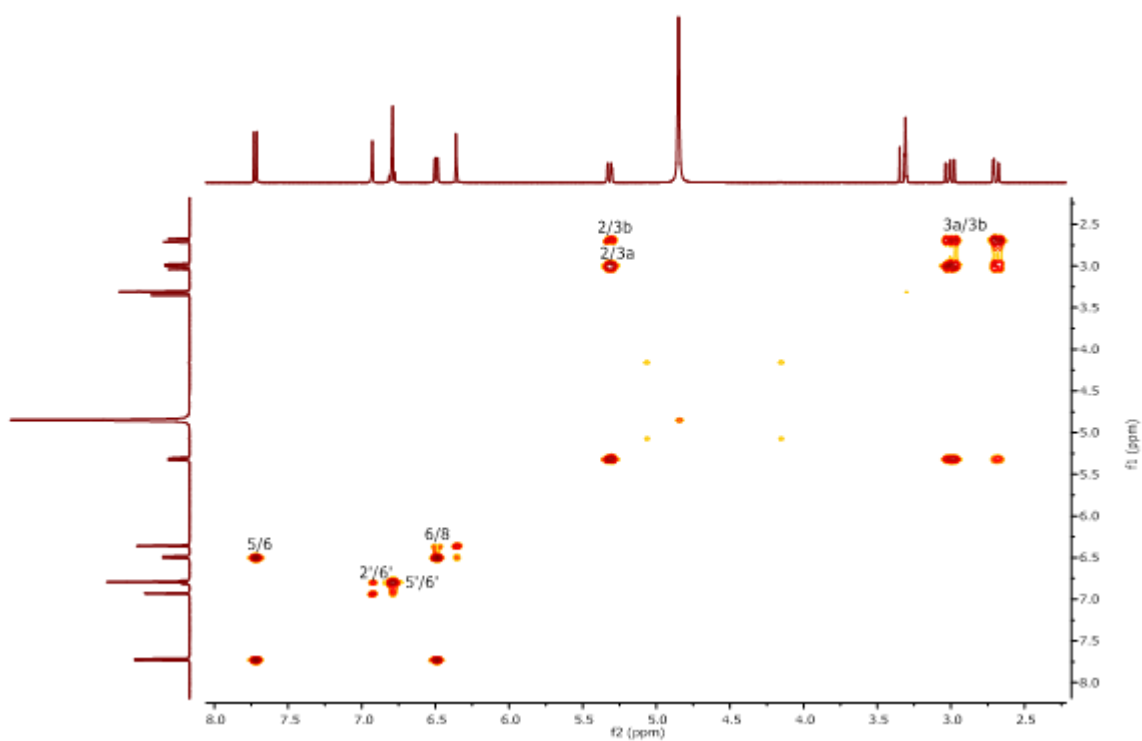
**Prilog 7 Mreže signalnih puteva koje prikazuju visoko obogaćene, značajno izmenjene signalne puteve nakon tretmana sulfuretinom.**



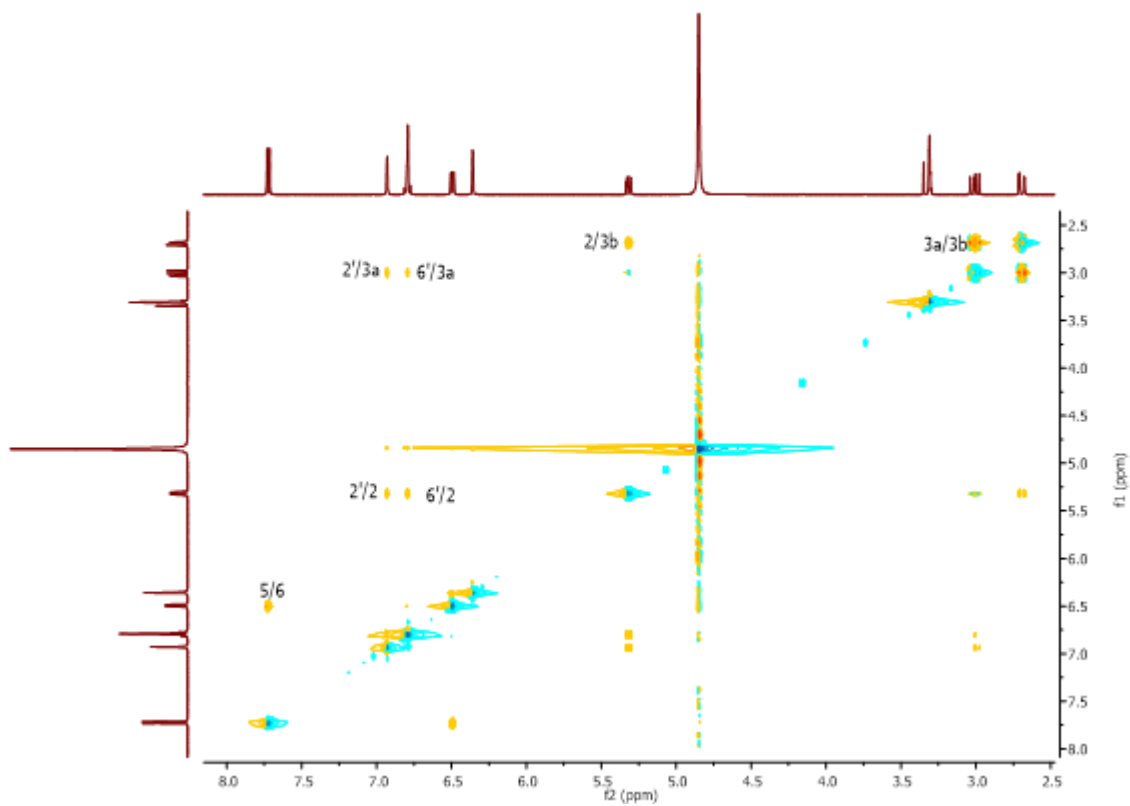
Prilog 8 <sup>1</sup>H NMR spektar butina (1) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



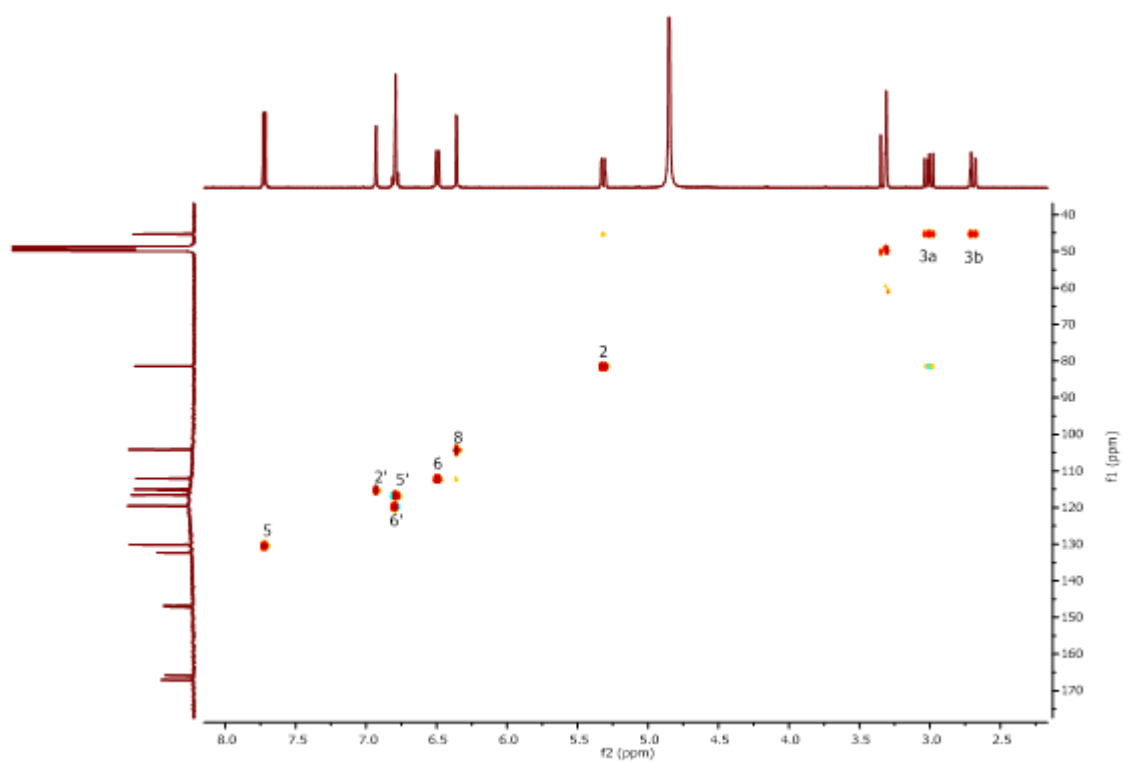
Prilog 9 <sup>13</sup>C NMR spektar butina (1) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



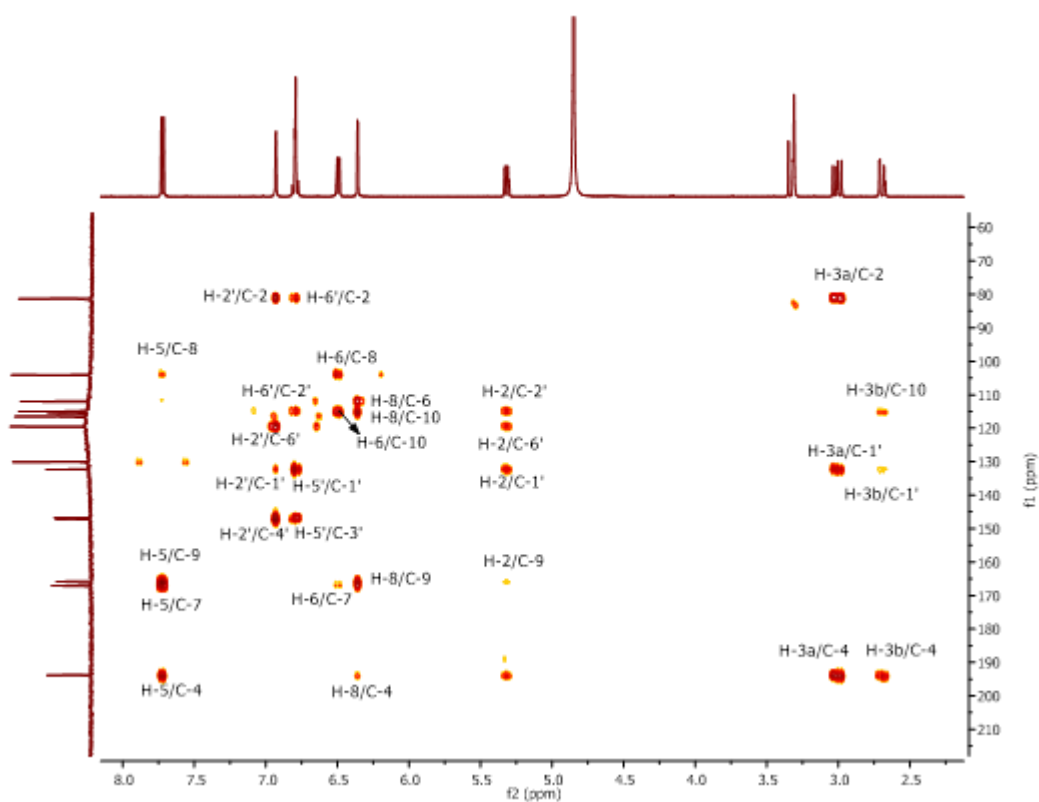
***Prilog 10 COSY spektar butina (1) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.***



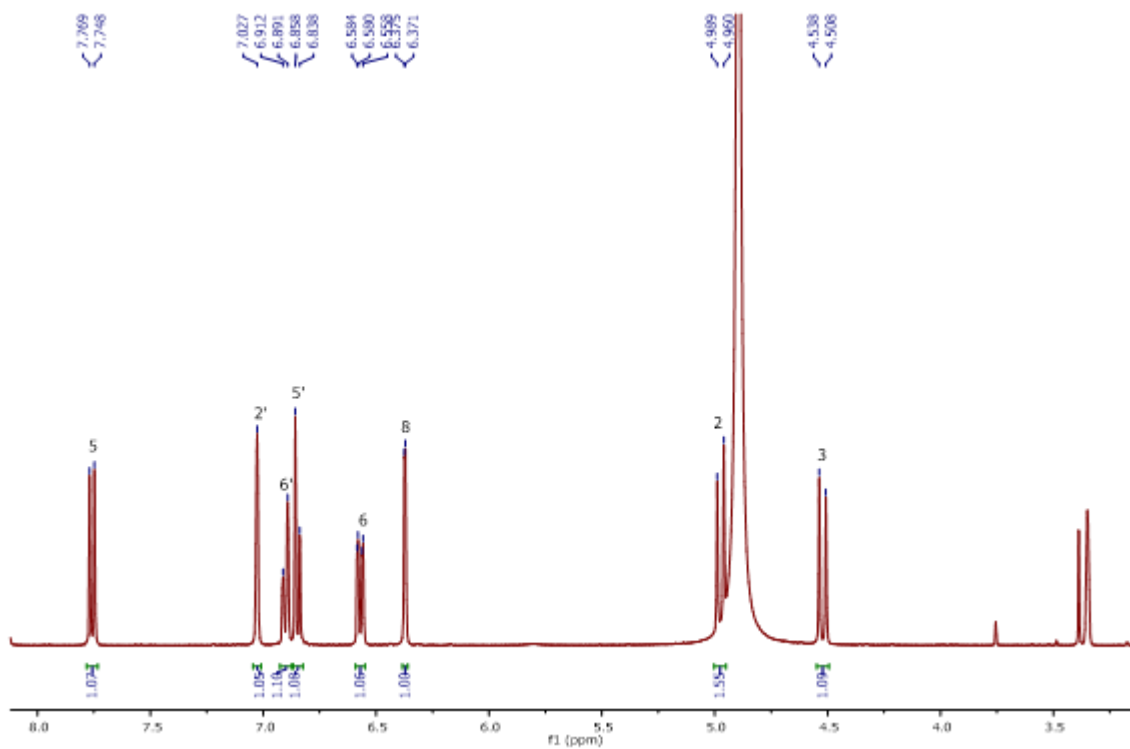
***Prilog 11 NOESY spektar butina (1) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.***



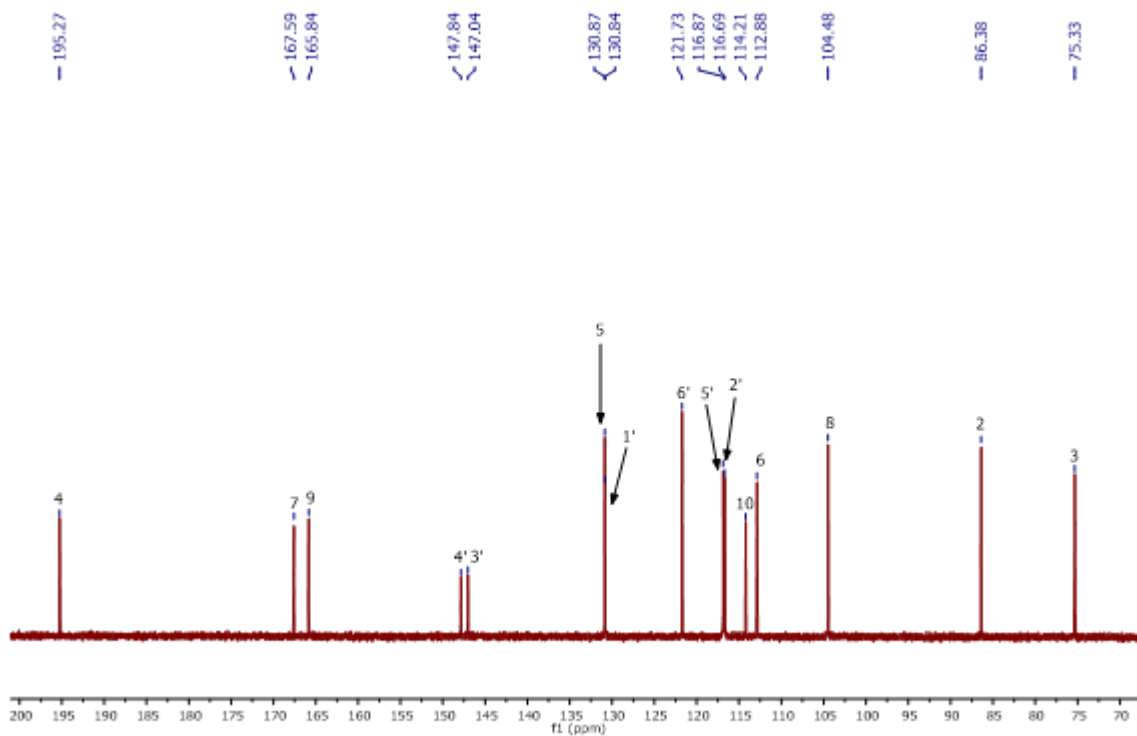
**Prilog 12 HSQC spektar butina (1) snimljen u  $CD_3OD$ .**



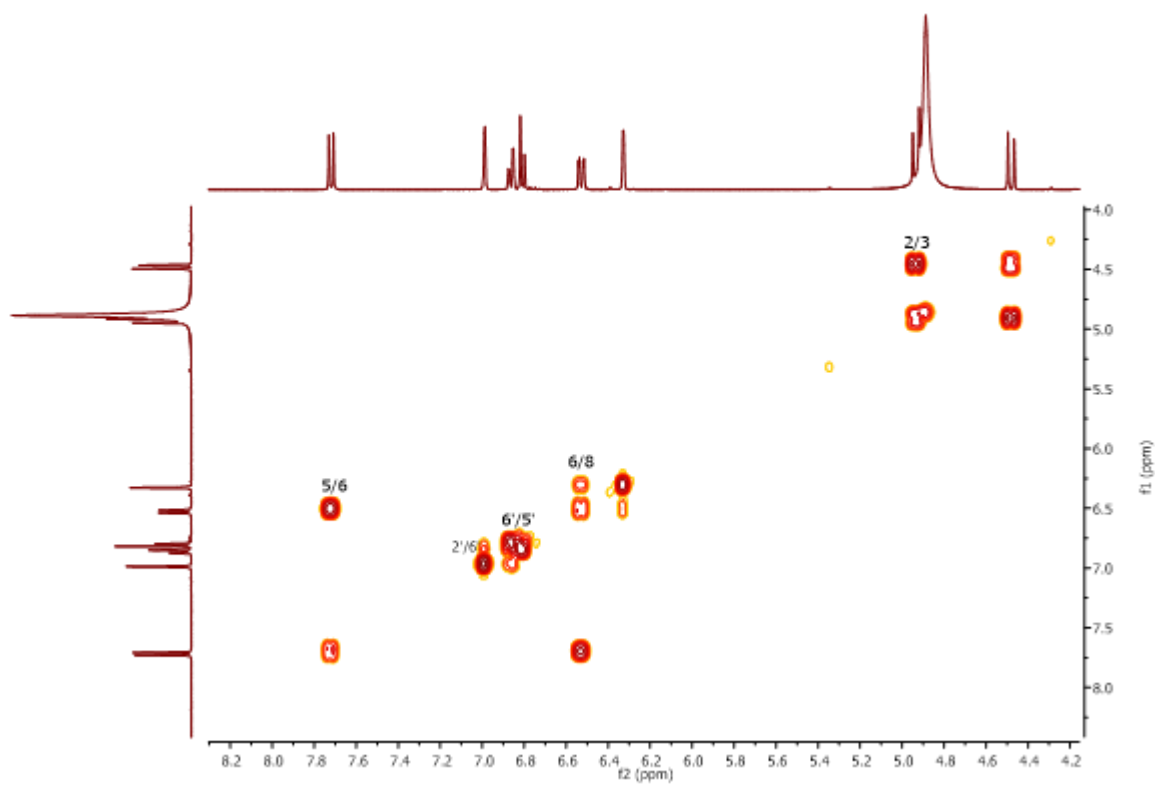
**Prilog 13 HMBC spektar butina (1) snimljen u  $CD_3OD$ .**



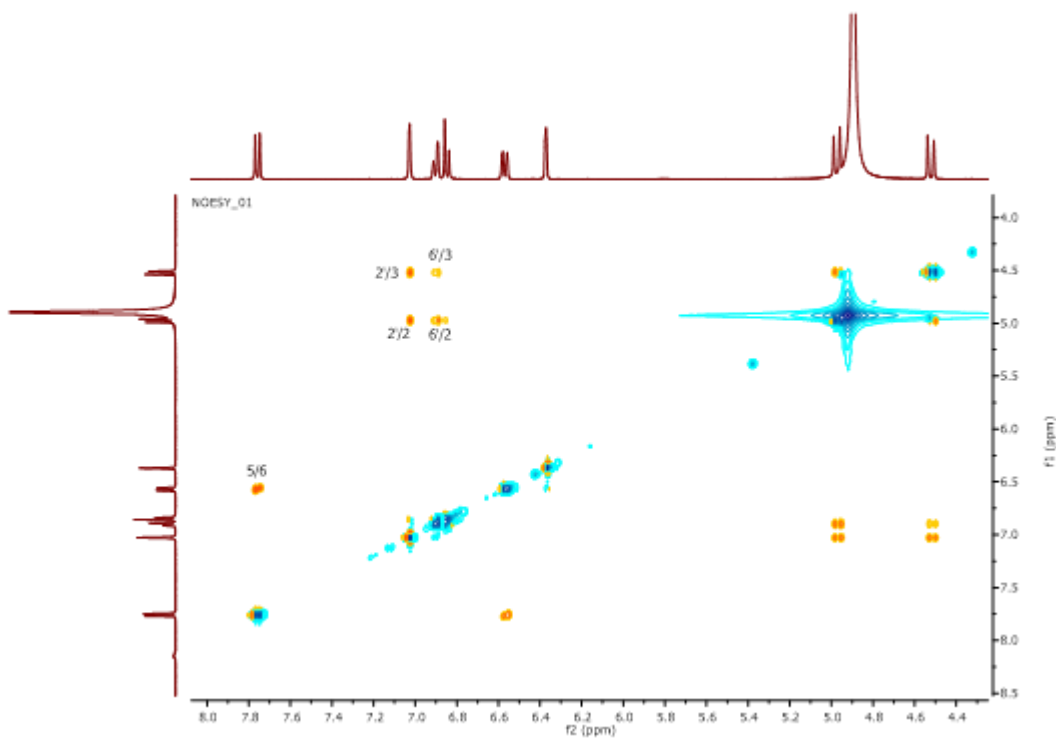
Prilog 14 <sup>1</sup>H NMR spektar fustina (2) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



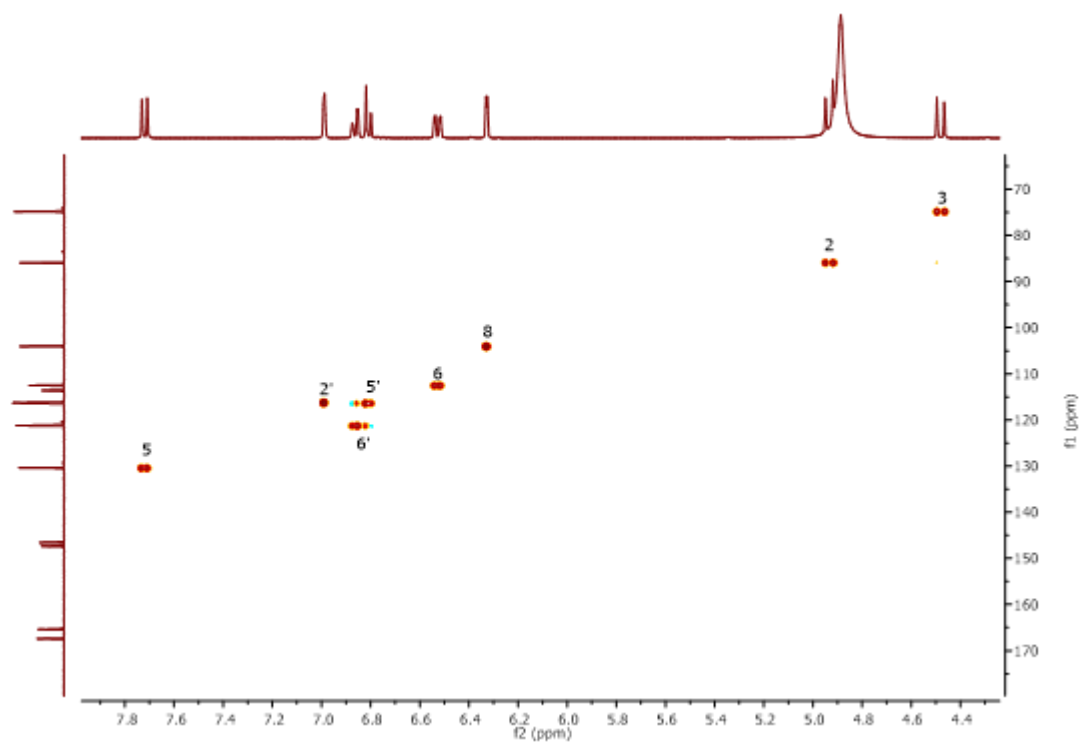
Prilog 15 <sup>13</sup>C NMR spektar fustina (2) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



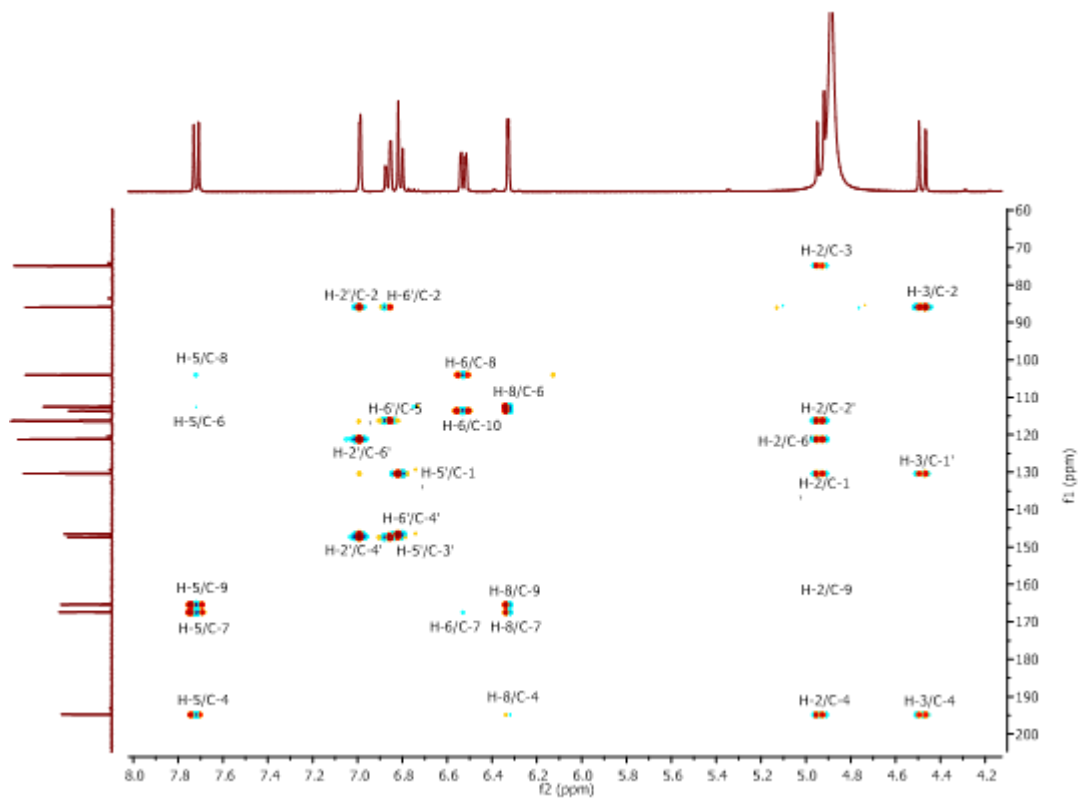
***Prilog 16 COSY spektar fustina (2) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.***



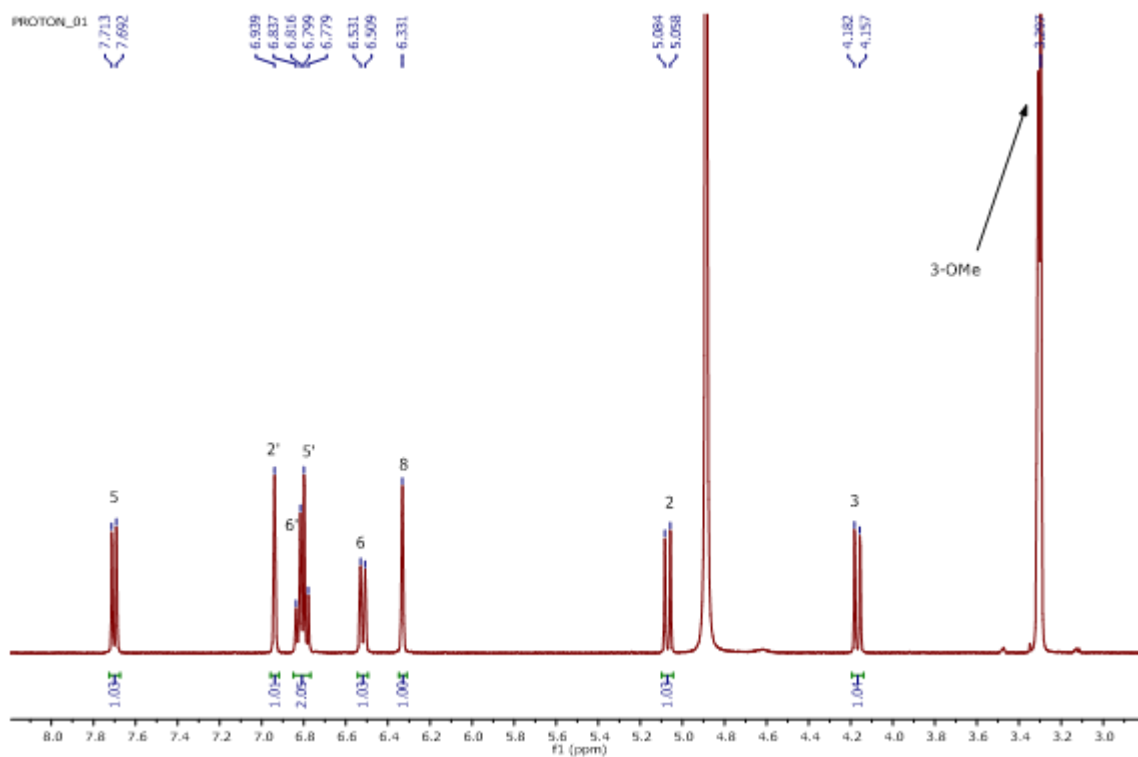
***Prilog 17 NOESY spektar fustina (2) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.***



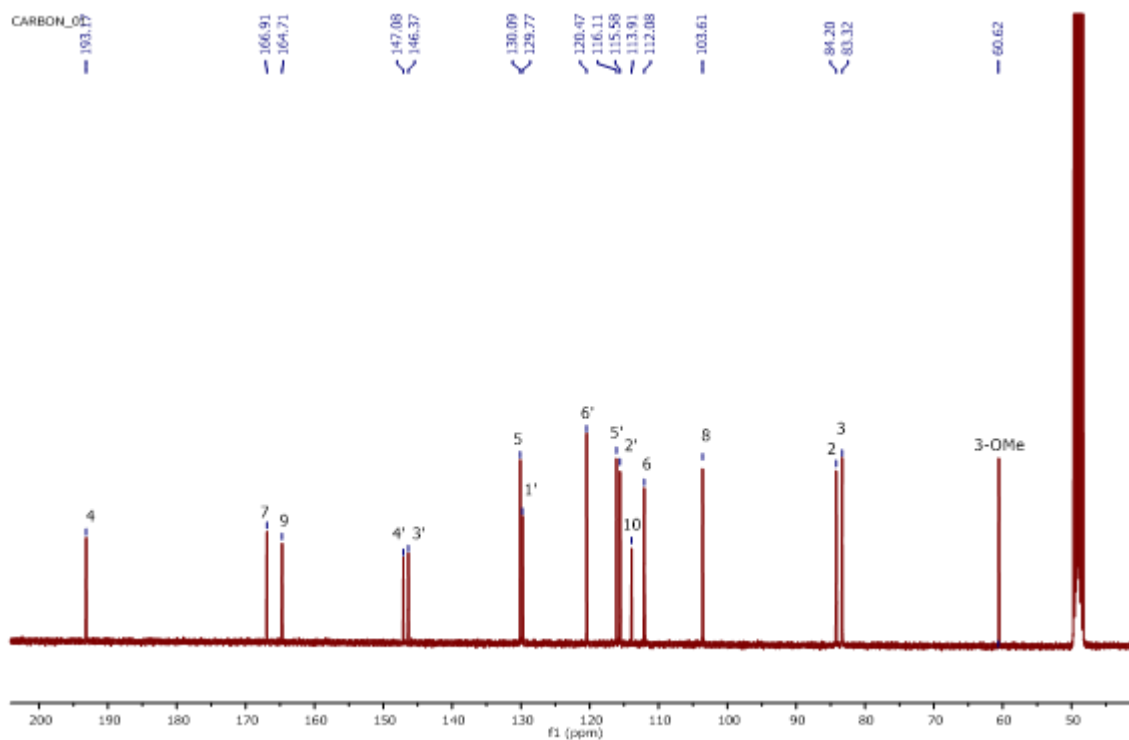
*Prilog 18 HSQC spektar fustina (2) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



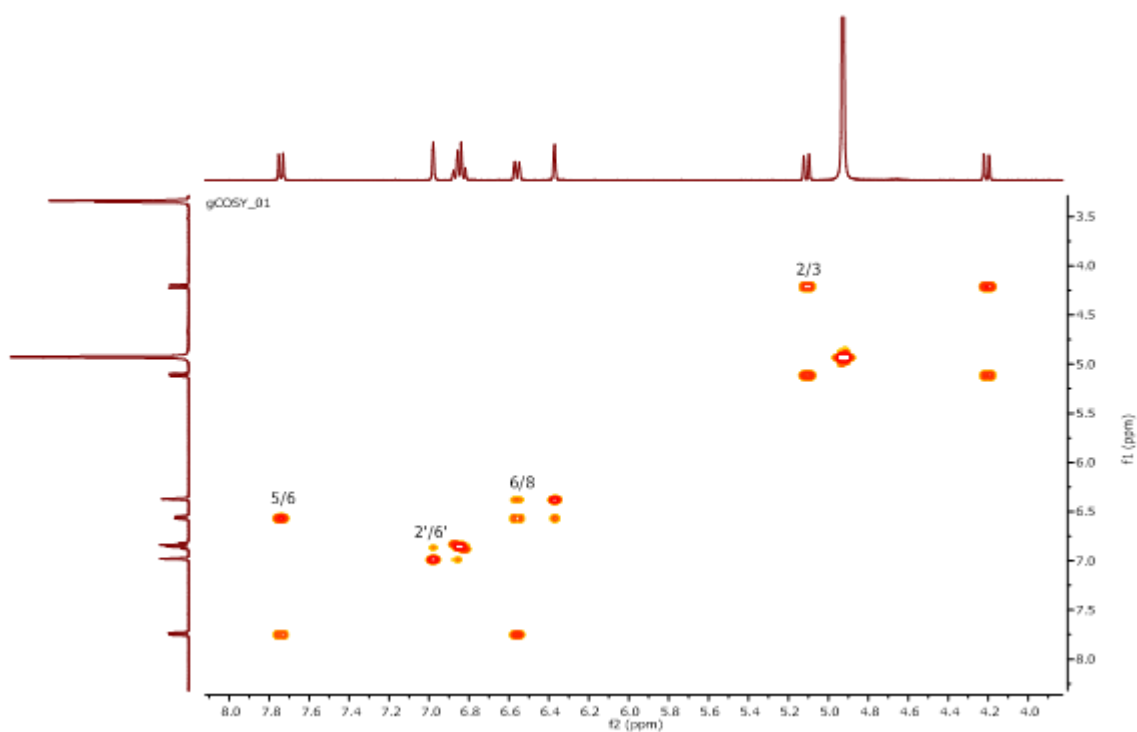
*Prilog 19 HMBC spektar fustina (2) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



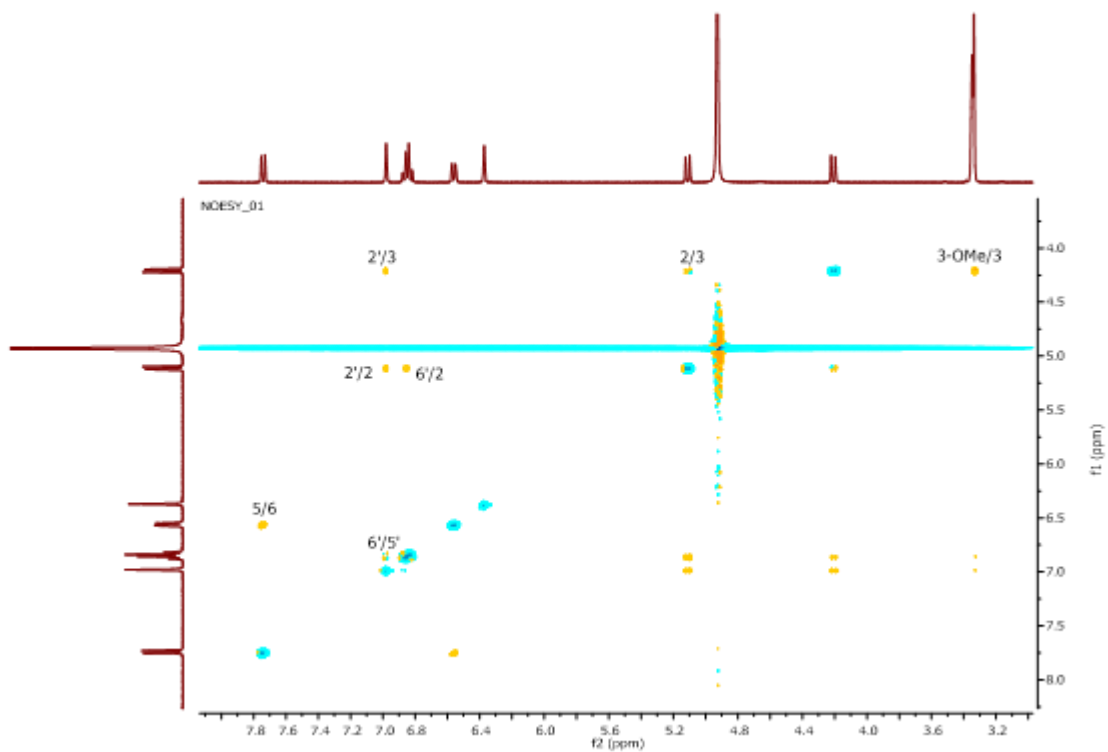
**Prilog 20  $^1\text{H}$  NMR spektar 3-O-metilfustina (3) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



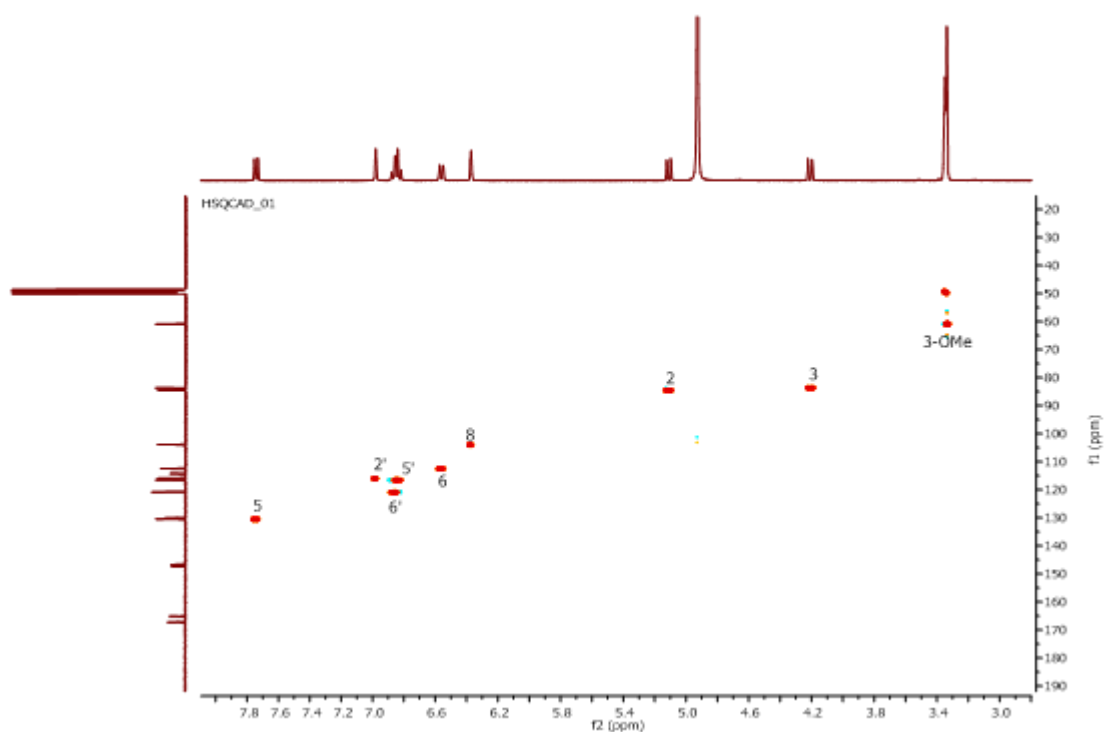
**Prilog 21  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 3-O-metilfustina (3) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



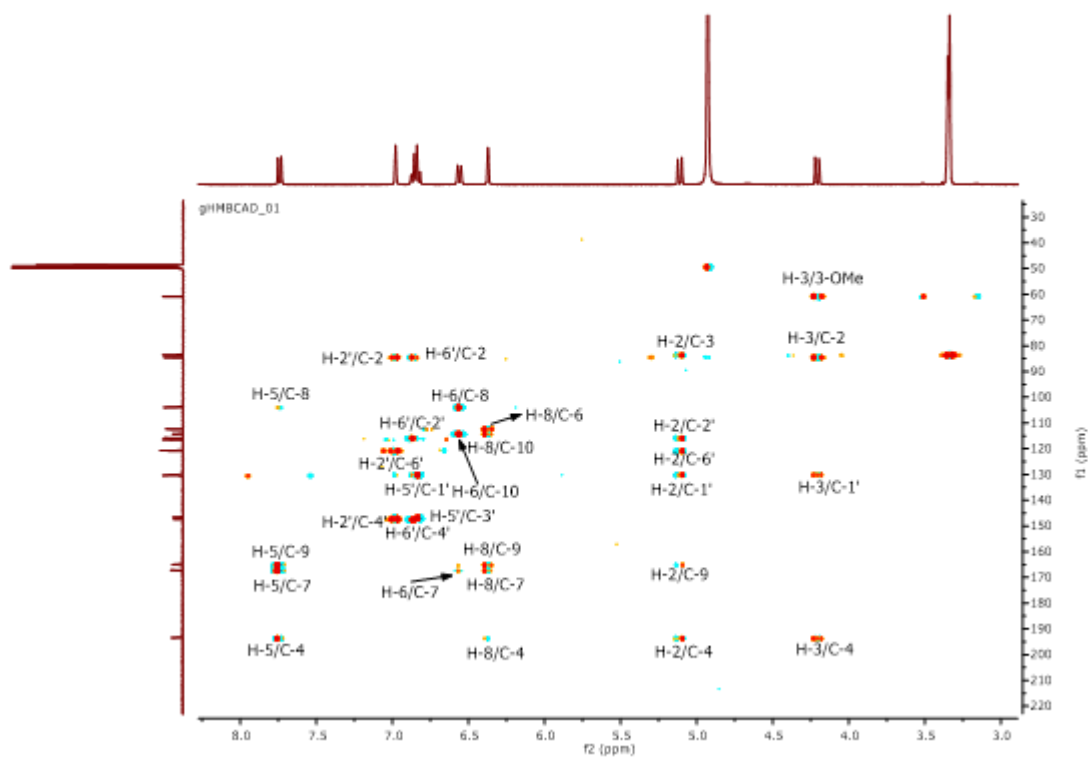
*Prilog 22 COSY spektar 3-O-metilfustina (3) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



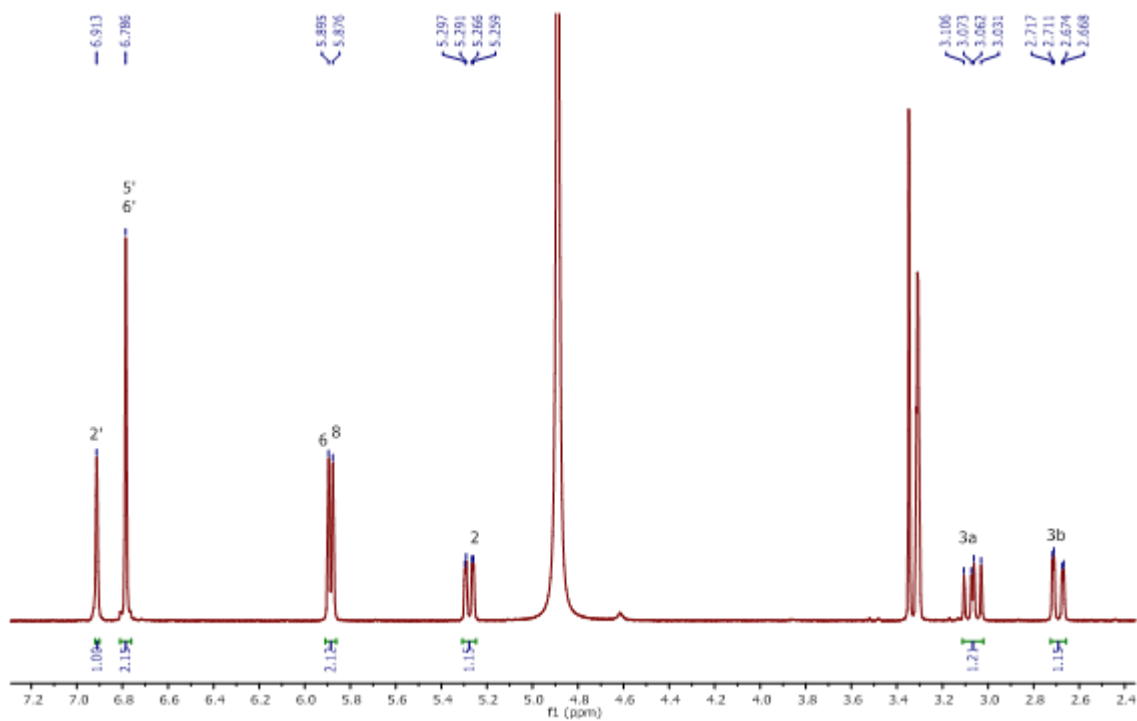
*Prilog 23 NOESY spektar 3-O-metilfustina (3) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



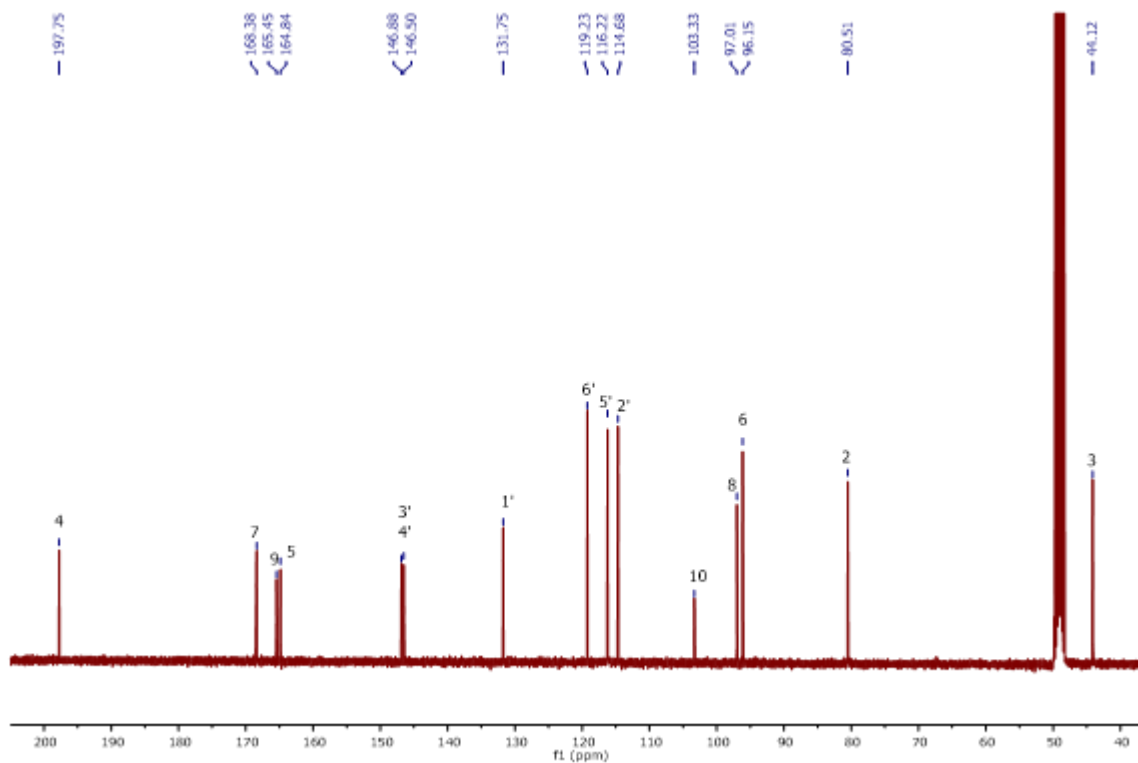
**Prilog 24 HSQC spektar 3-O-metilfustina (3) snimljen u  $CD_3OD$ .**



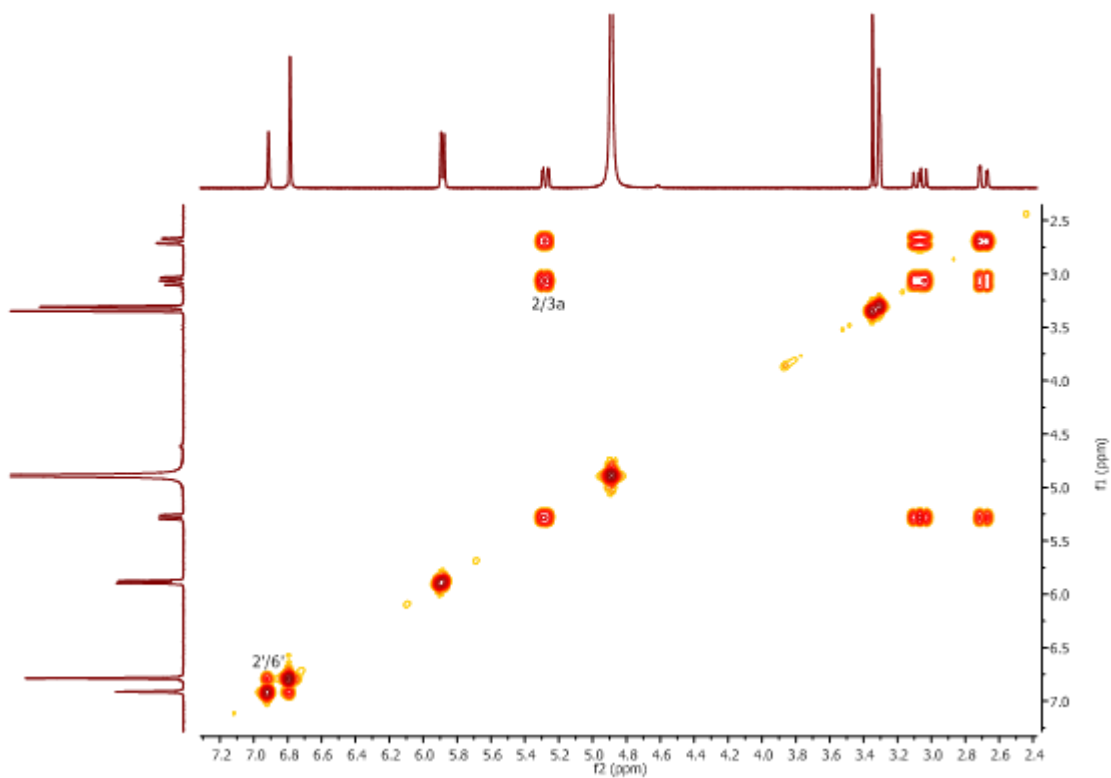
**Prilog 25 HMBC spektar 3-O-metilfustina (3) snimljen u  $CD_3OD$ .**



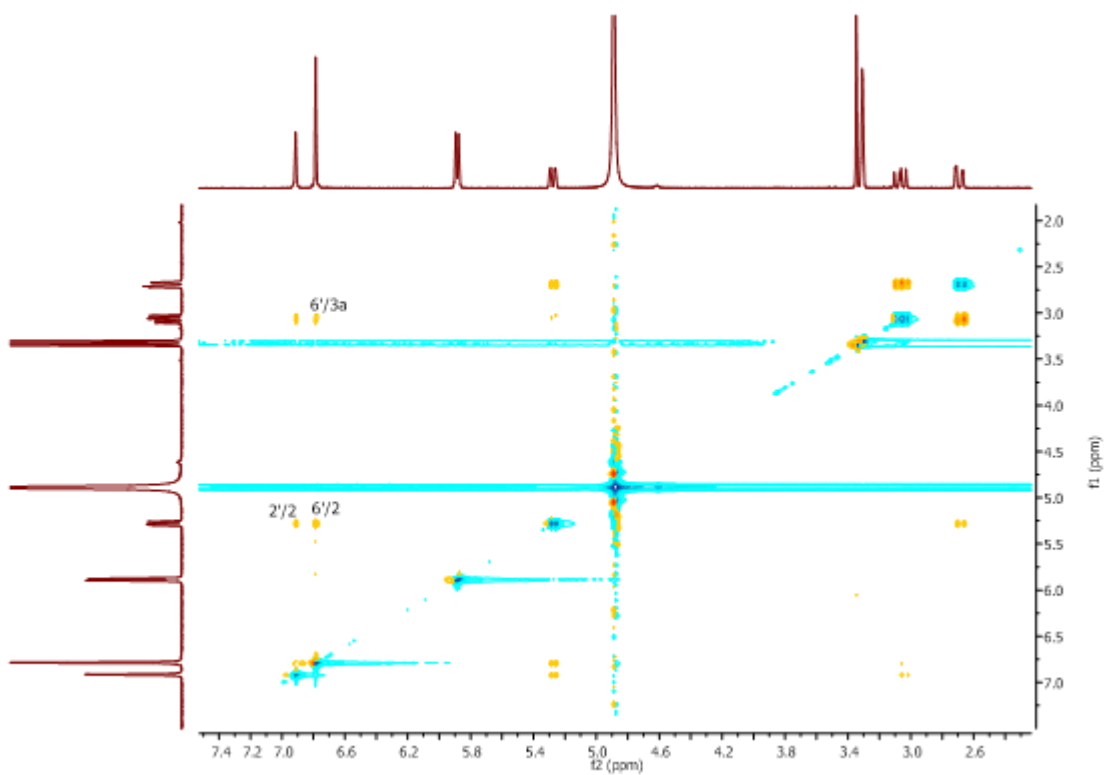
Prilog 26 <sup>1</sup>H NMR spektar eriodiktiola (4) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



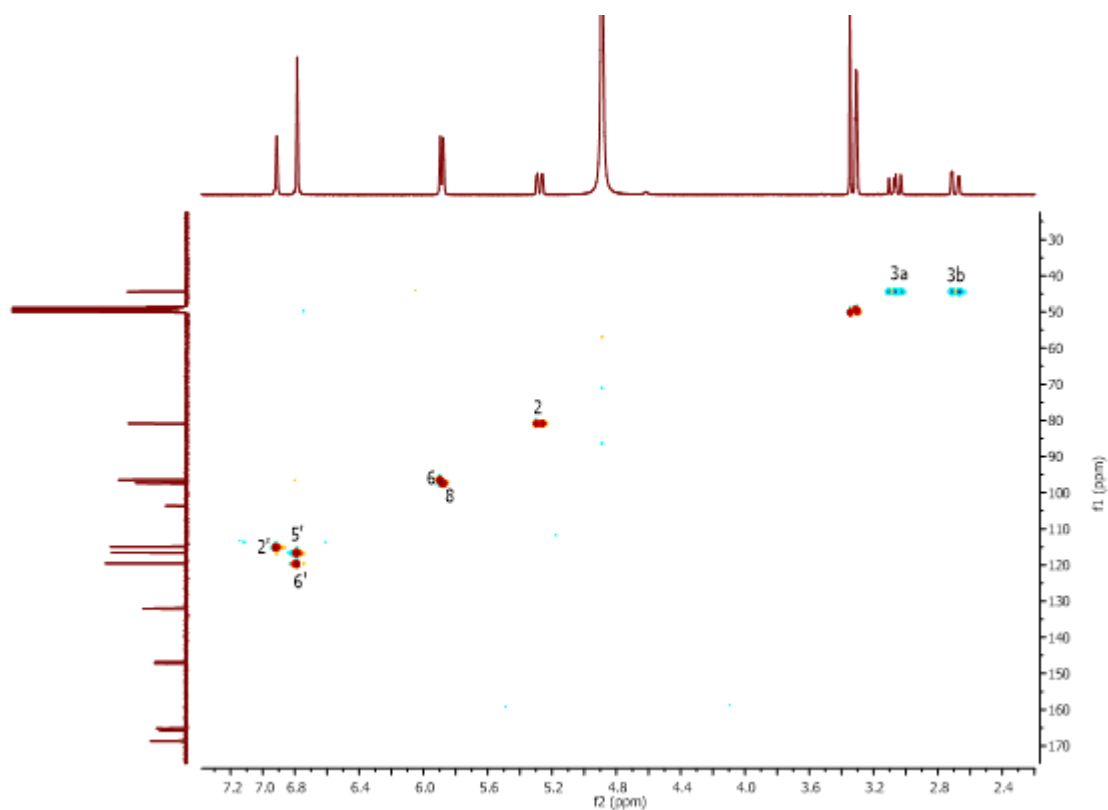
Prilog 27 <sup>13</sup>C NMR spektar eriodiktiola (4) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



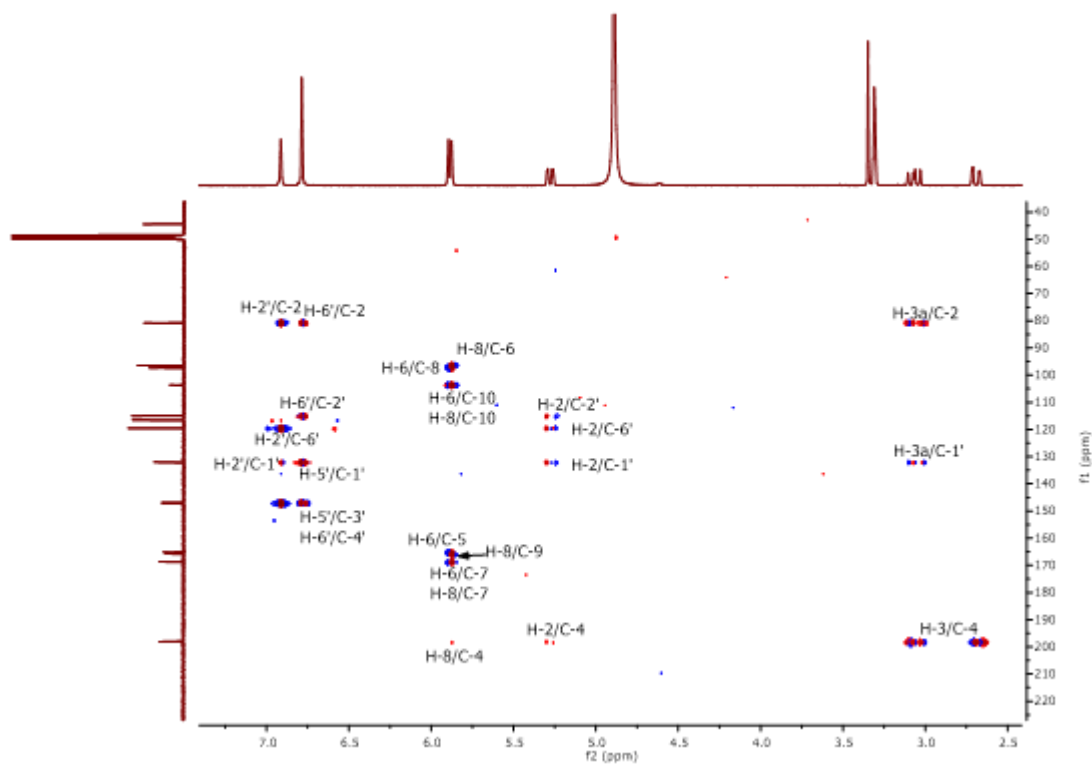
*Prilog 28 COSY spektar eriodiktiola (4) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



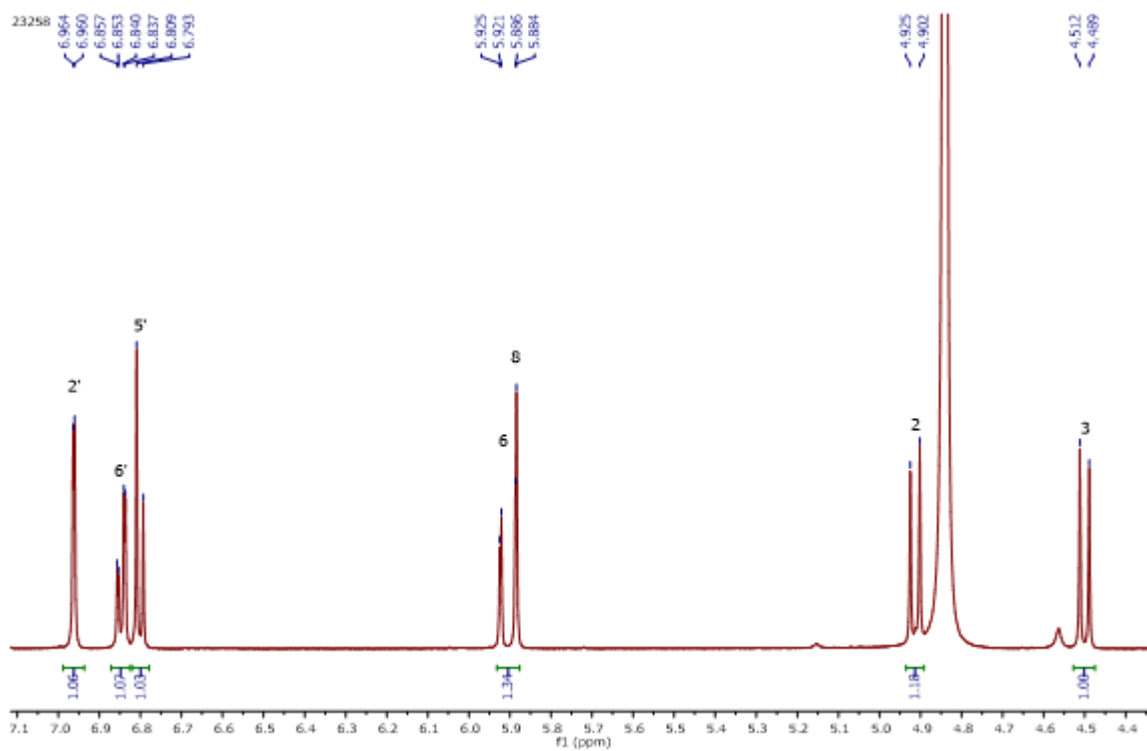
*Prilog 29 NOESY spektar eriodiktiola (4) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



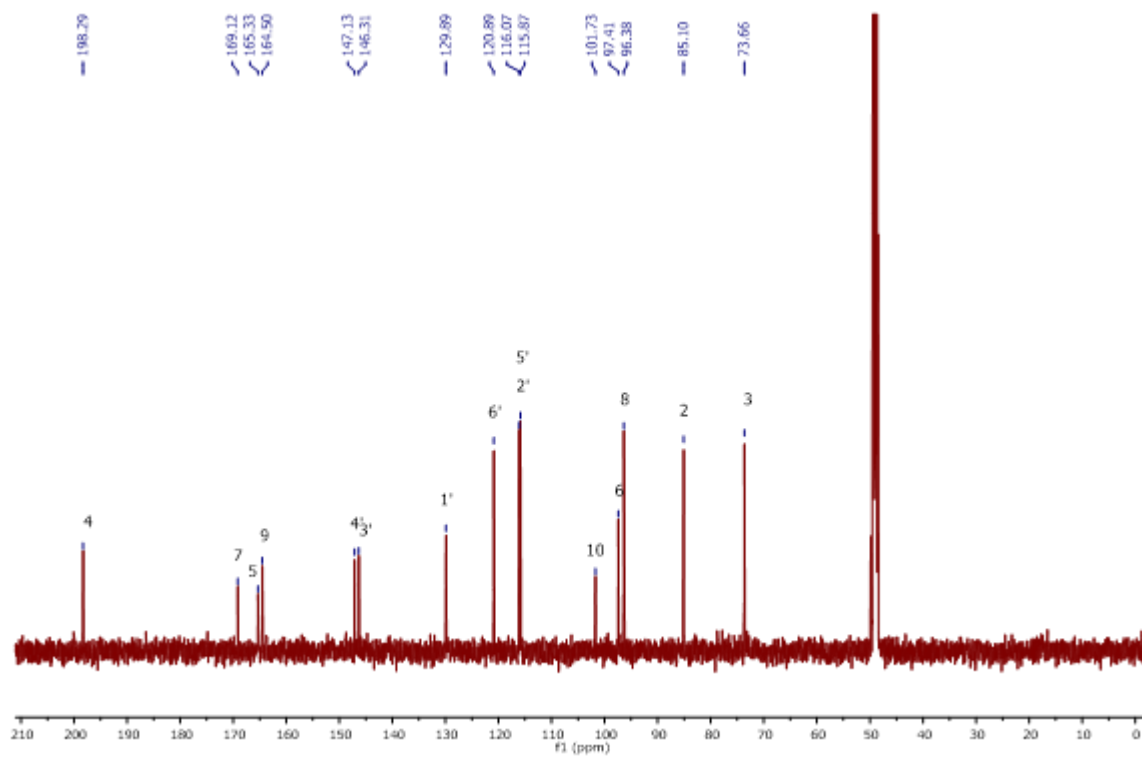
**Prilog 30 HSQC spektar eriodiktiola (4) snimljen u  $CD_3OD$ .**



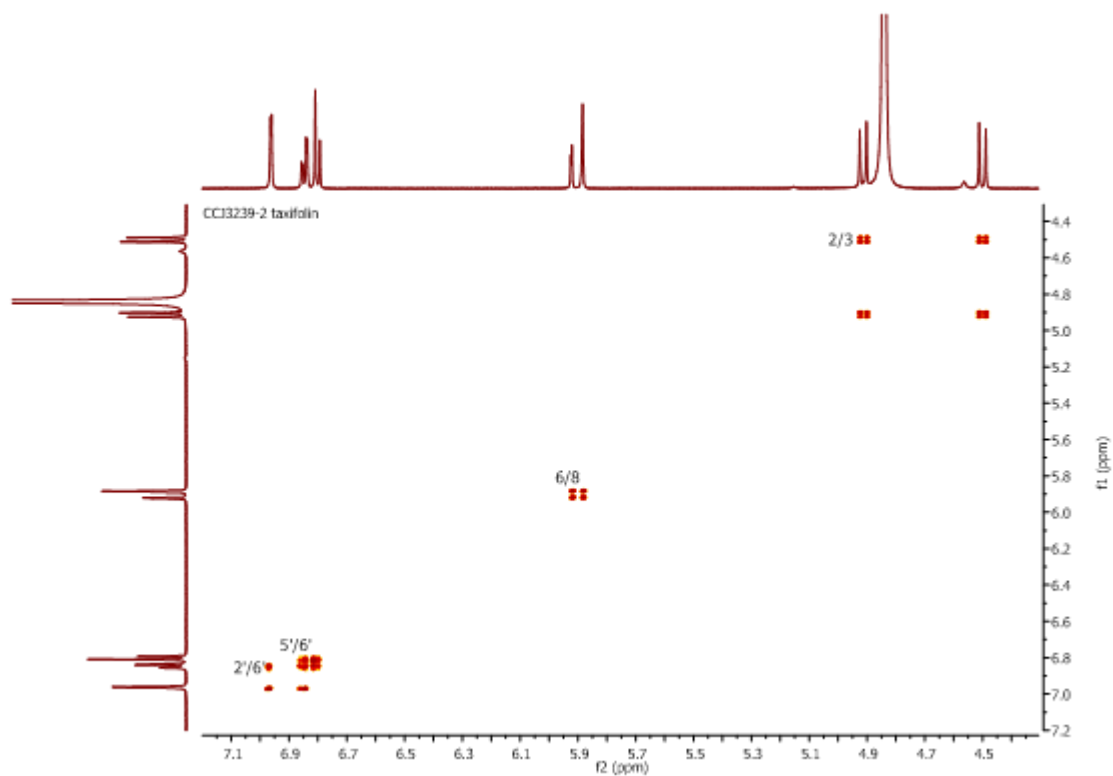
**Prilog 31 HMBC spektar eriodiktiola (4) snimljen u  $CD_3OD$ .**



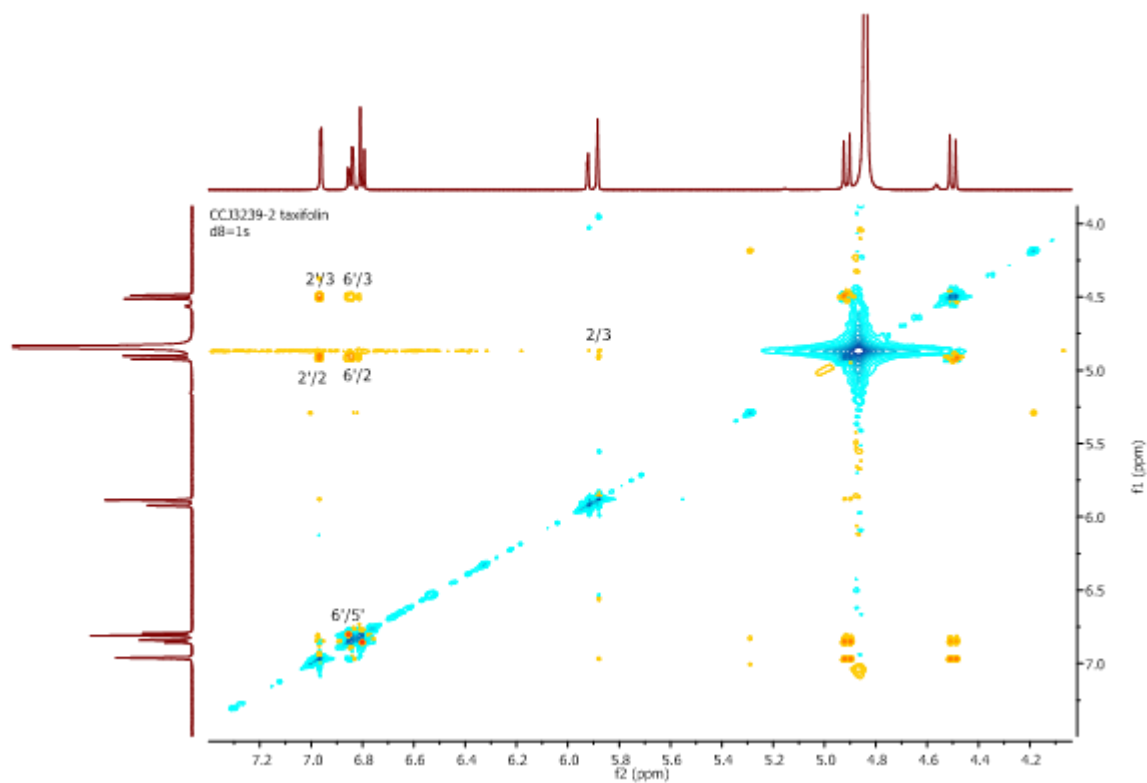
**Prilog 32 <sup>1</sup>H NMR spektar taksifolina (5) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



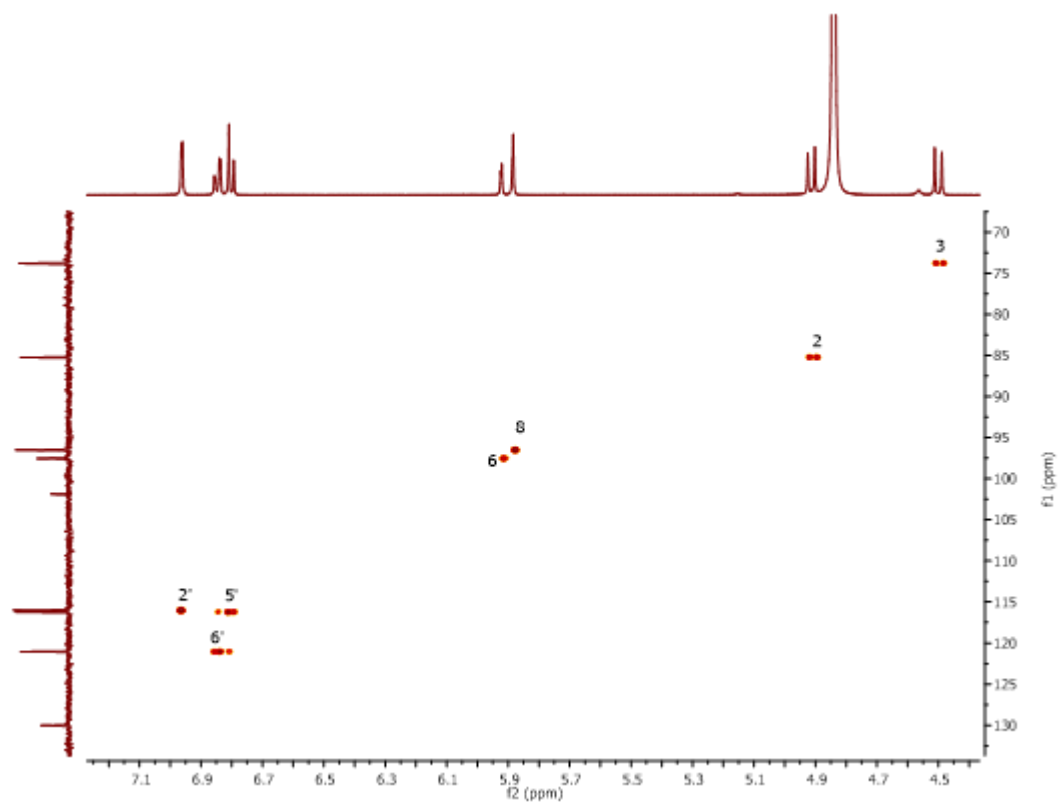
**Prilog 33 <sup>13</sup>C NMR spektar taksifolina (5) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



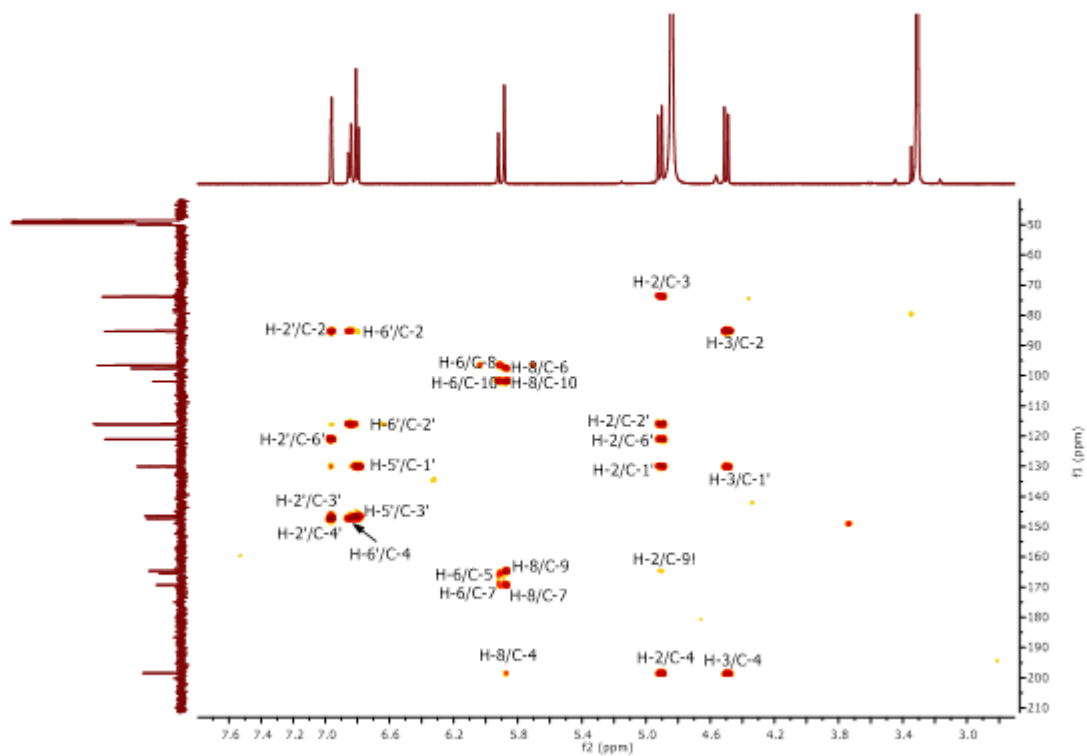
**Prilog 34 COSY spektar taksifolina (5) snimljen u  $CD_3OD$ .**



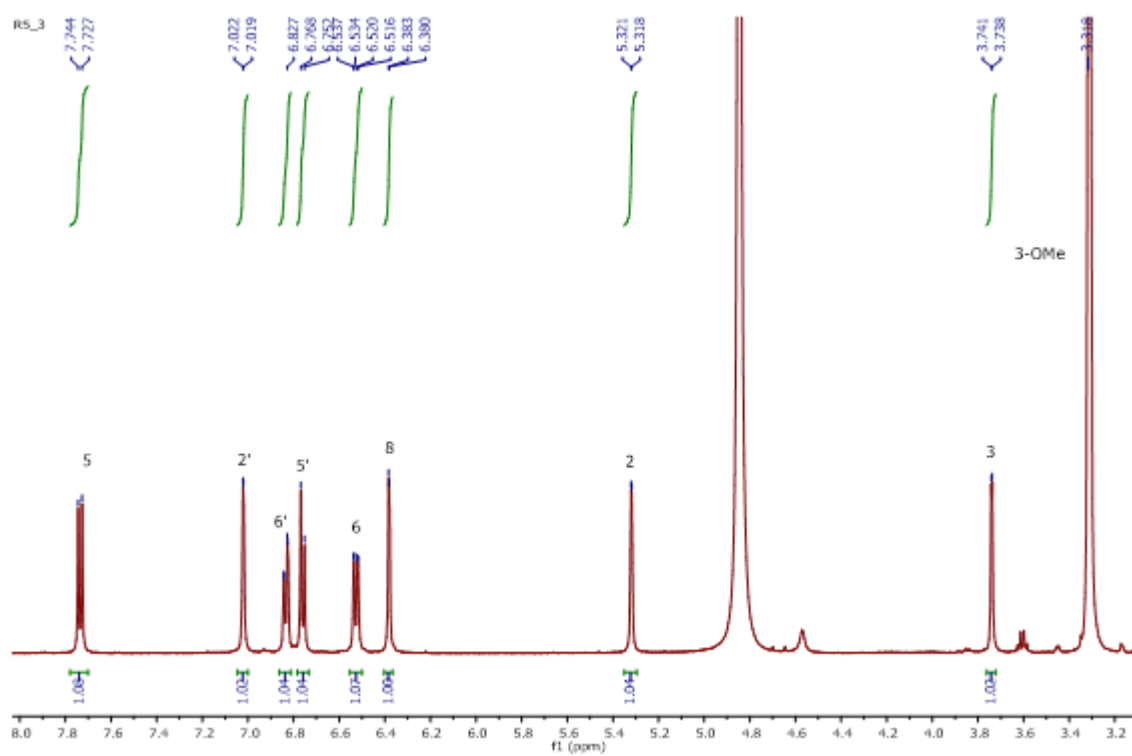
**Prilog 35 NOESY spektar taksifolina (5) snimljen u  $CD_3OD$ .**



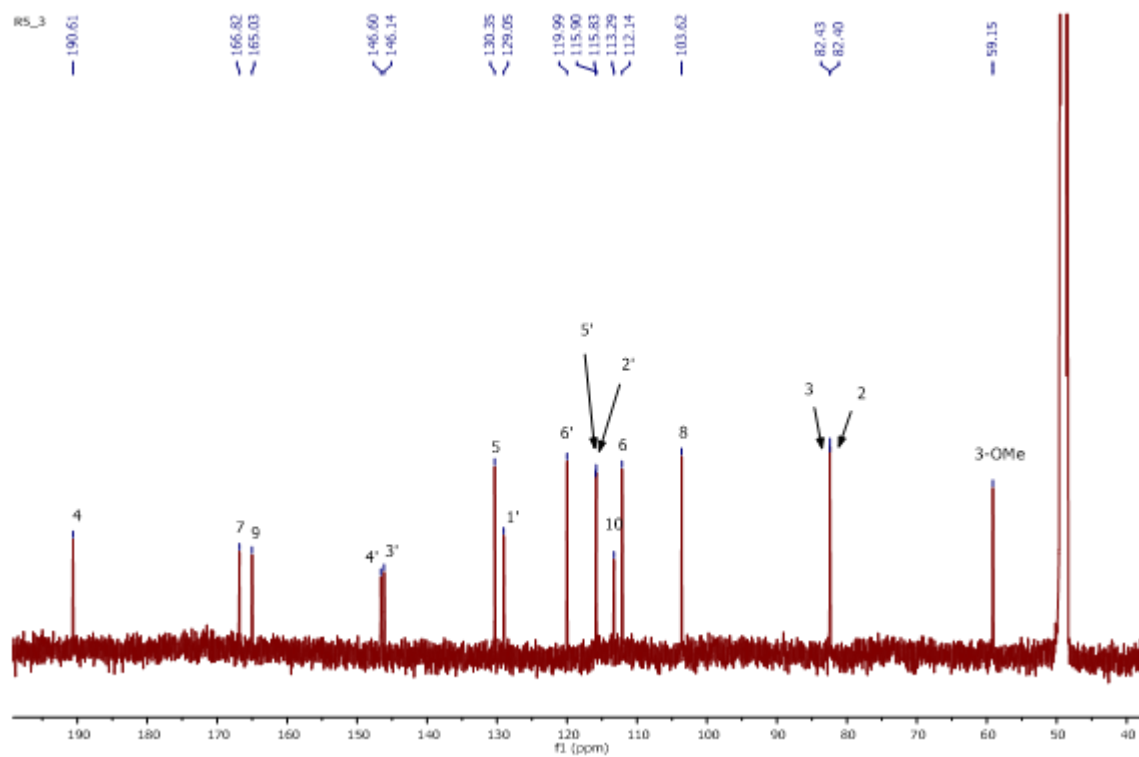
**Prilog 36 HSQC spektar taksifolina (5) snimljen u  $CD_3OD$ .**



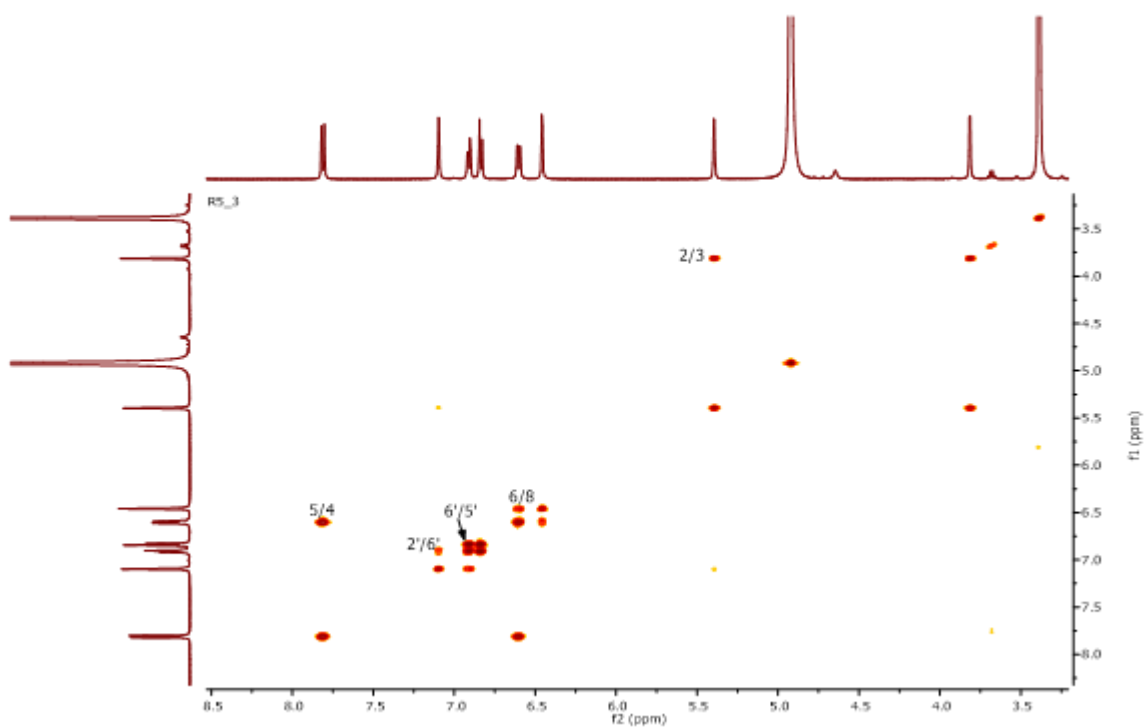
**Prilog 37 HMBC spektar taksifolina (5) snimljen u  $CD_3OD$ .**



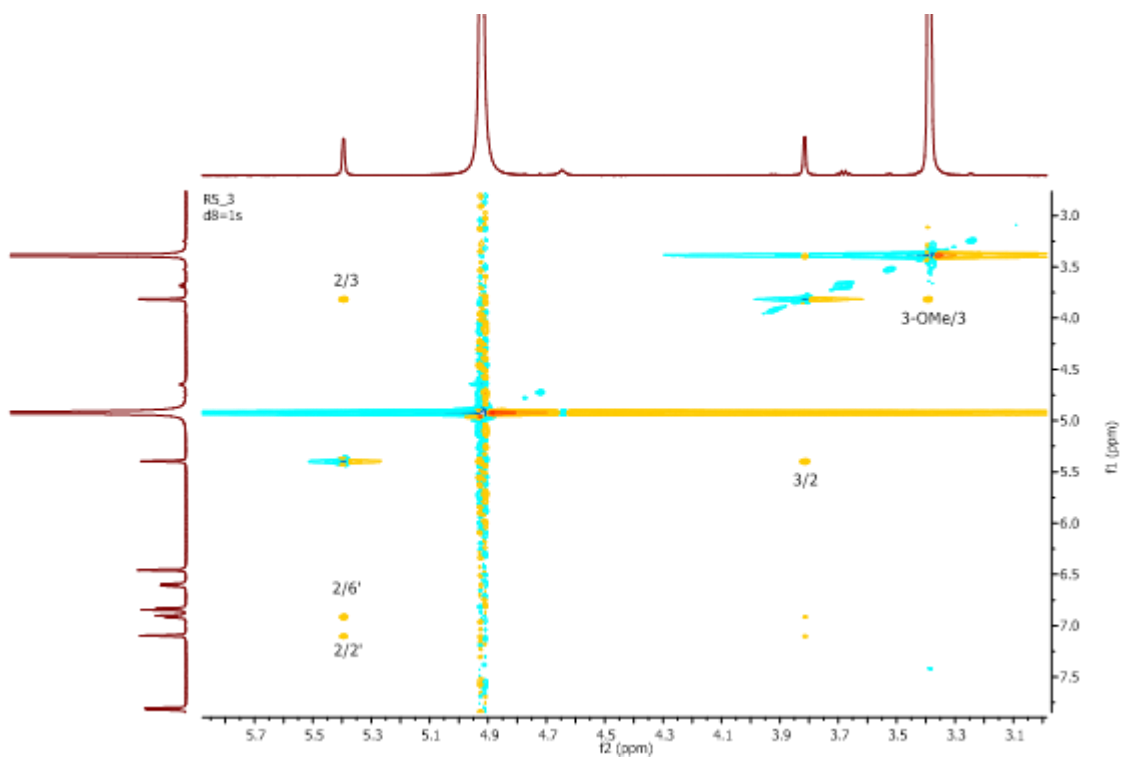
**Prilog 38 <sup>1</sup>H NMR spektar 3-O-metilepifustina (6) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



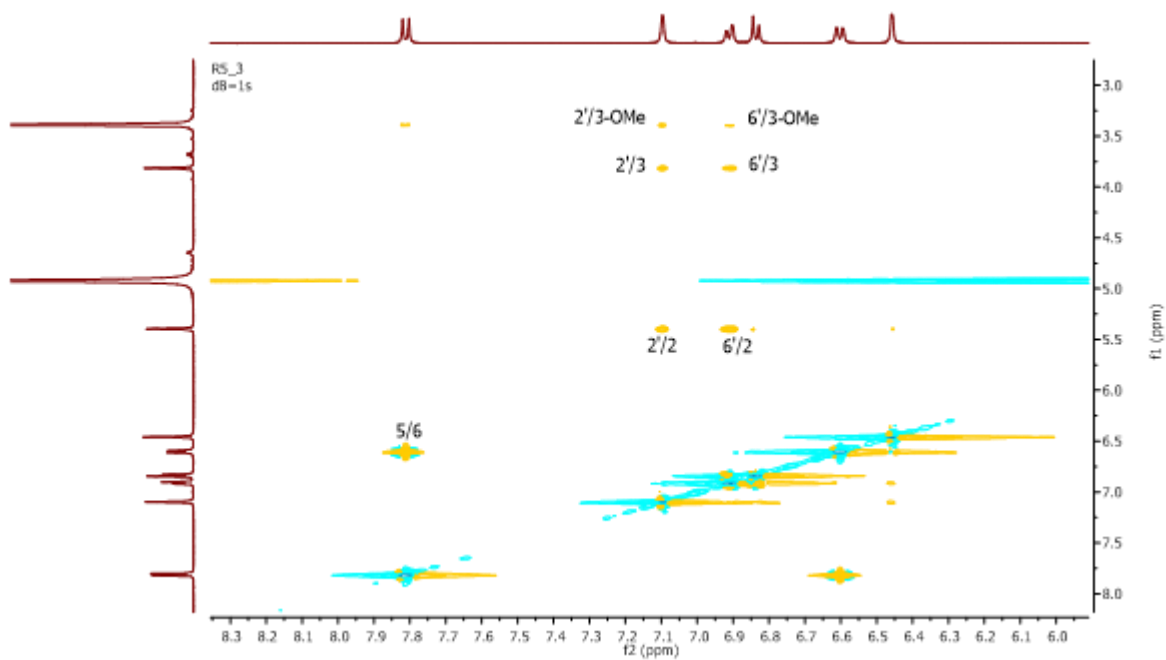
**Prilog 39 <sup>13</sup>C NMR spektar 3-O-metilepifustina (6) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



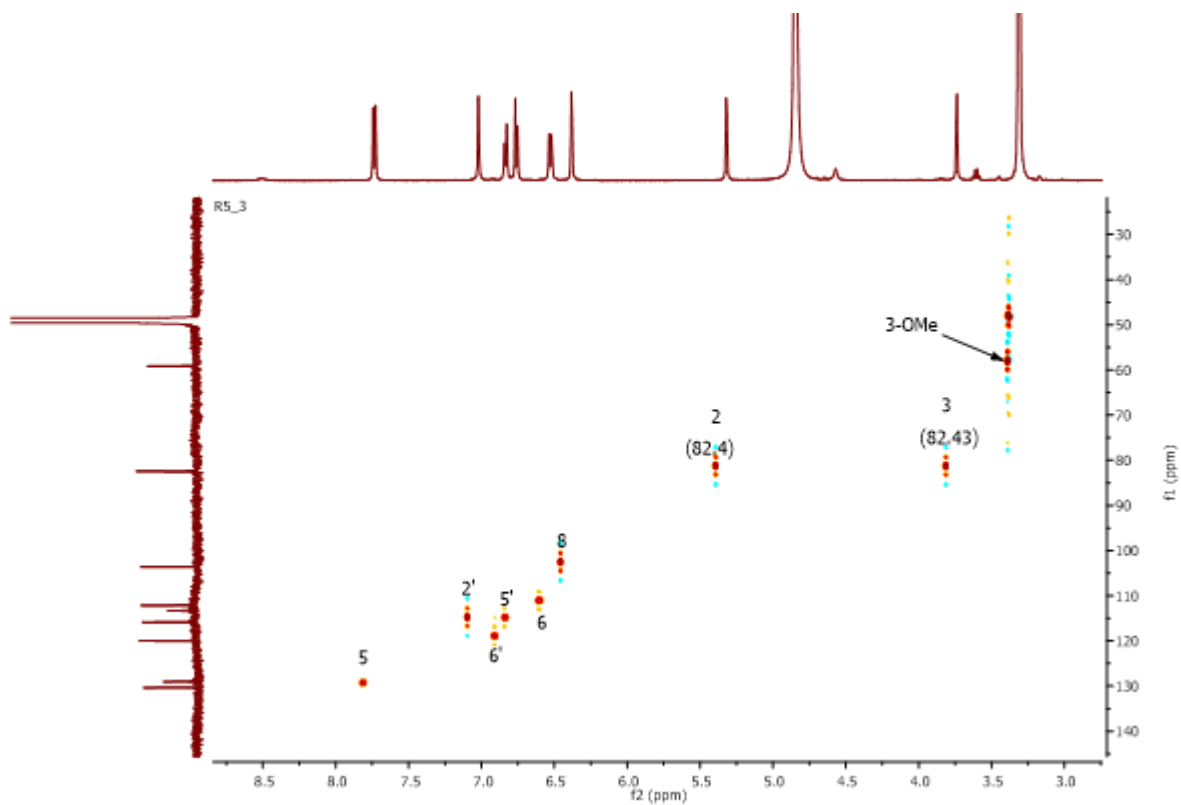
**Prilog 40 COSY spektar 3-O-metilepifustina (6) snimljen u  $CD_3OD$ .**



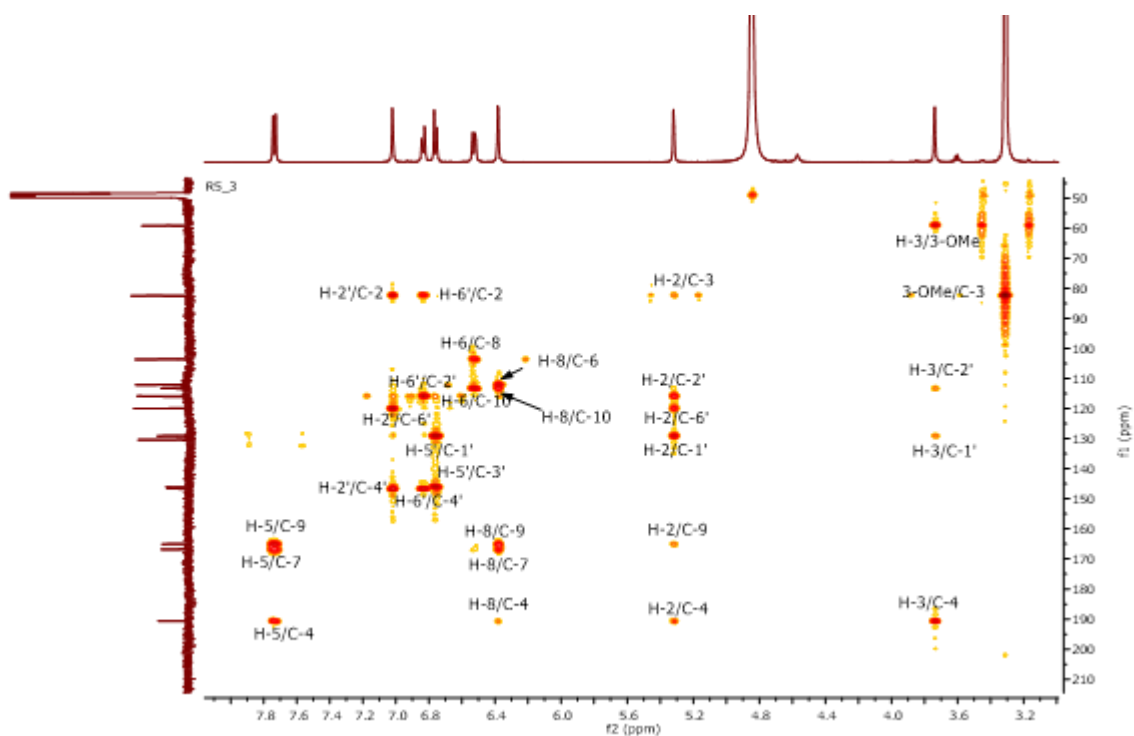
**Prilog 41 Prvi deo NOESY spektra 3-O-metilepifustina (6), snimljenog u  $CD_3OD$ .**



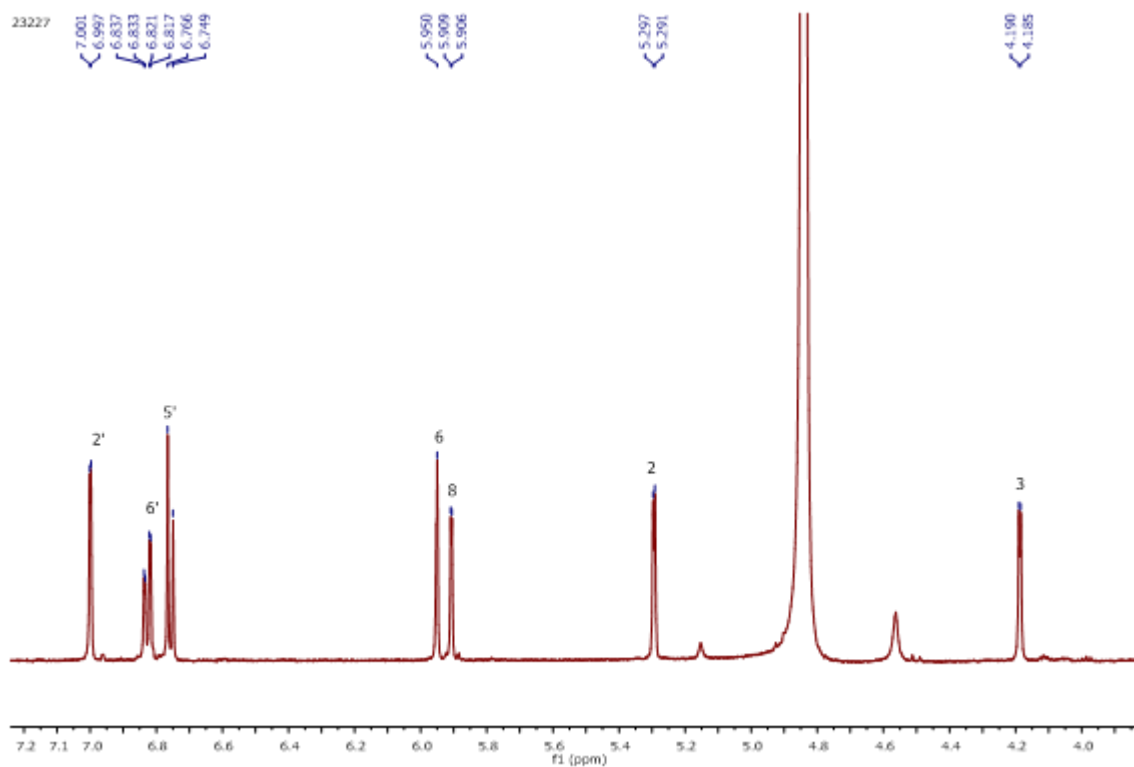
**Prilog 42** Drugi deo NOESY spektra 3-O-metilepifustina (6), snimljenog u CD<sub>3</sub>OD.



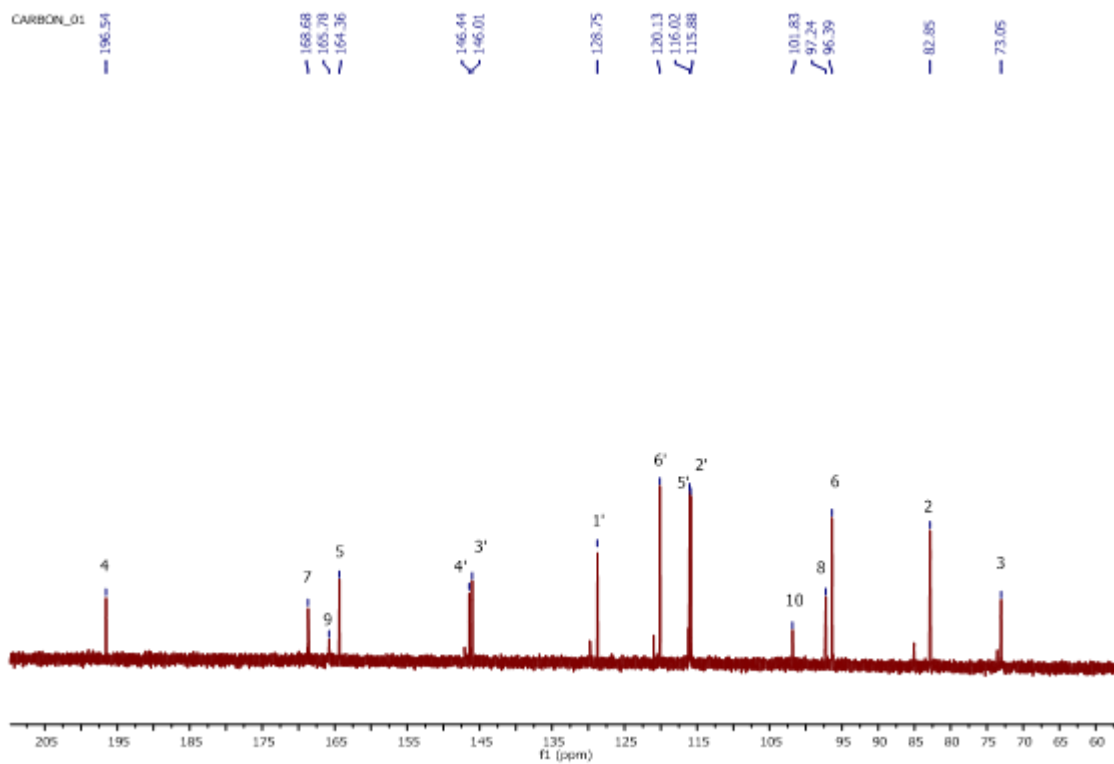
**Prilog 43** HSQC spektar 3-O-metilepifustina (6) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.



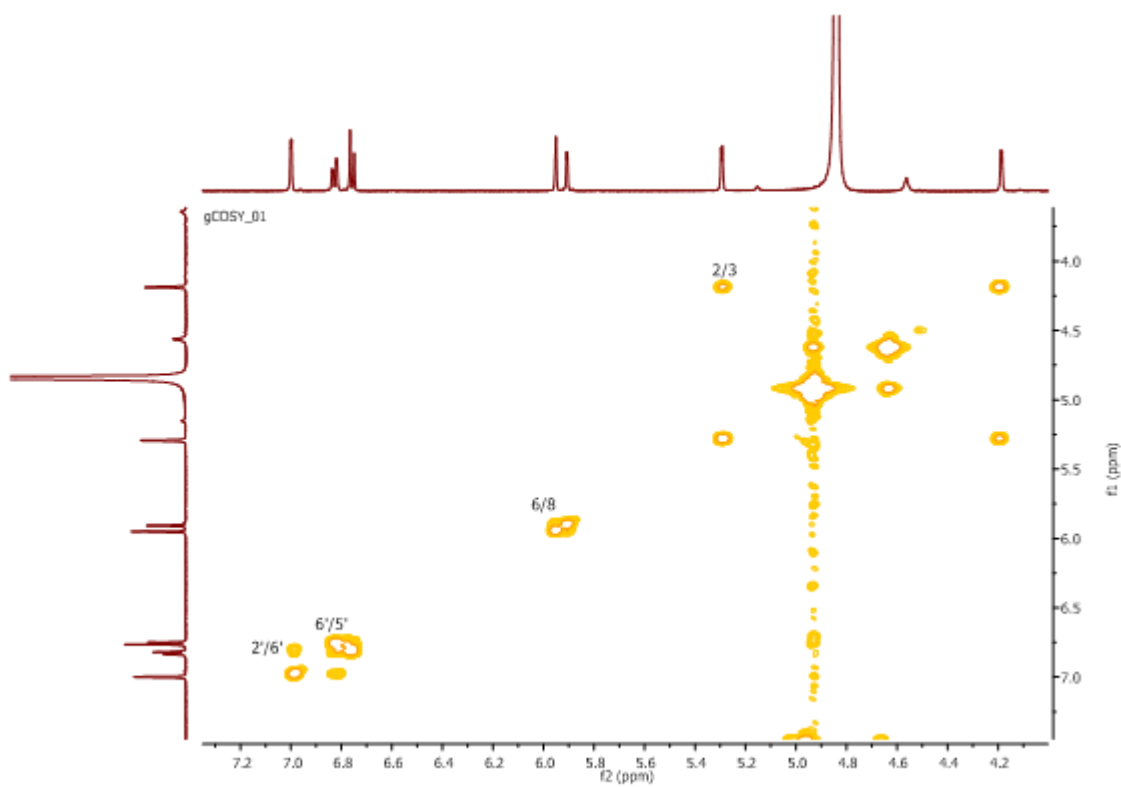
**Prilog 44 HMBC spektar 3-O-metilepifustina (6) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



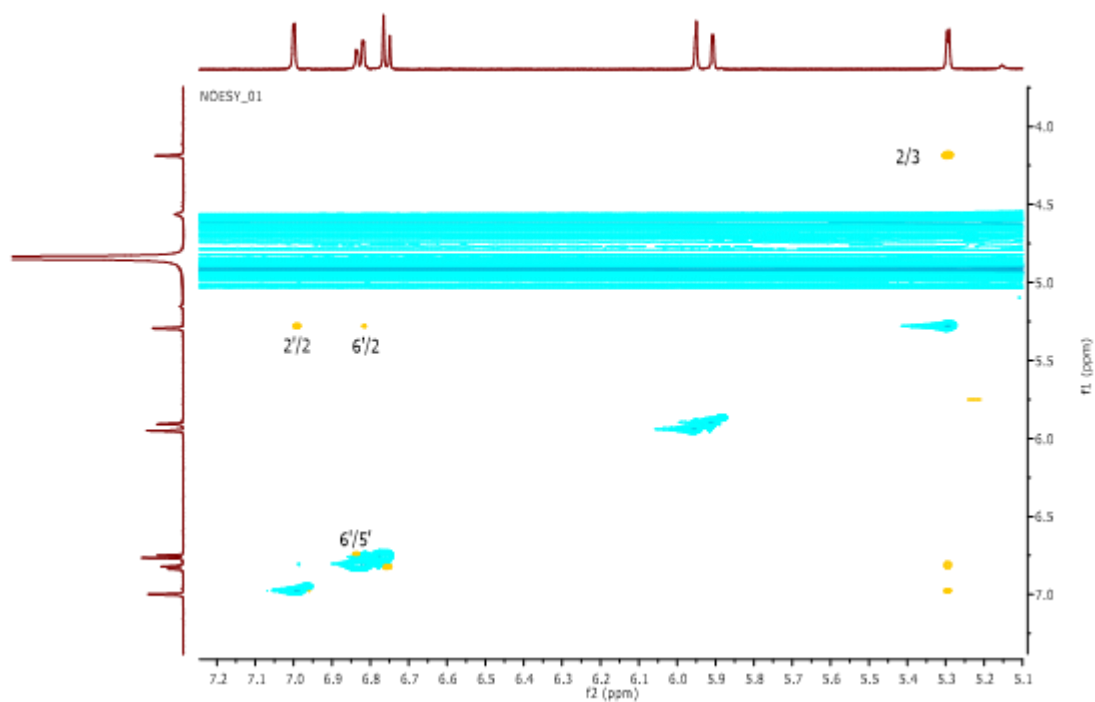
**Prilog 45 <sup>1</sup>H NMR spektar epitaksifolina (7) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



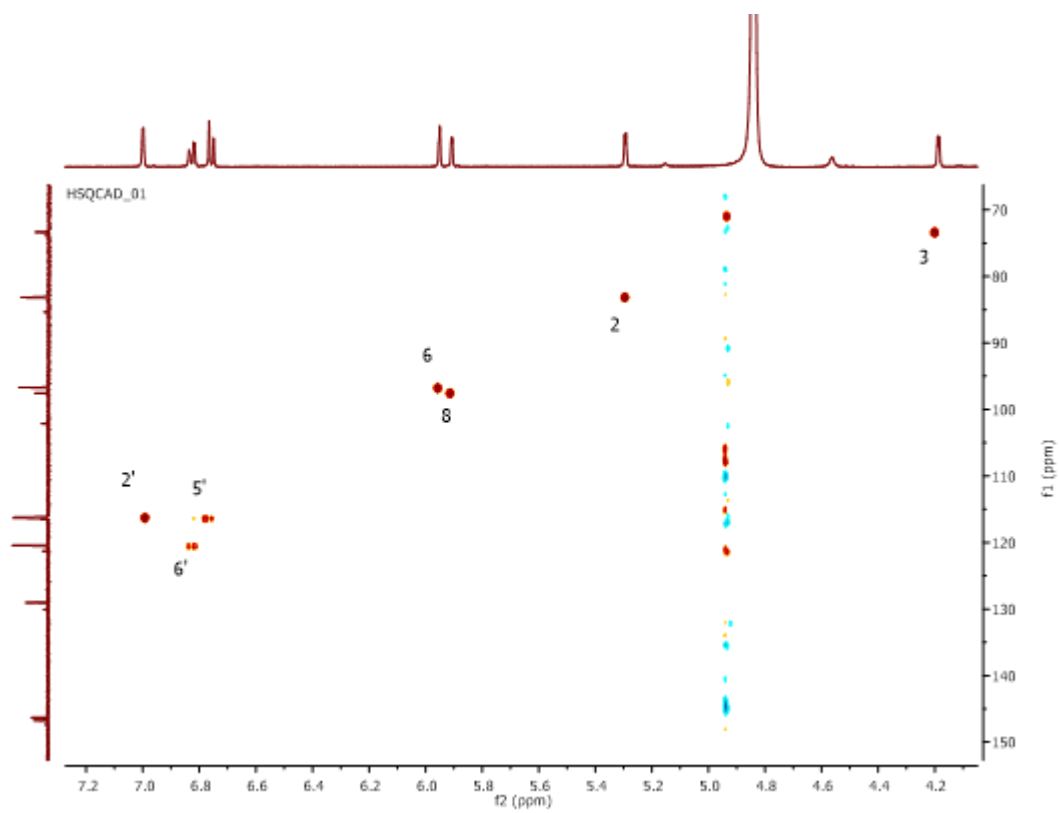
**Prilog 46  $^{13}\text{C}$  NMR spektar epitaksifolina (7) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



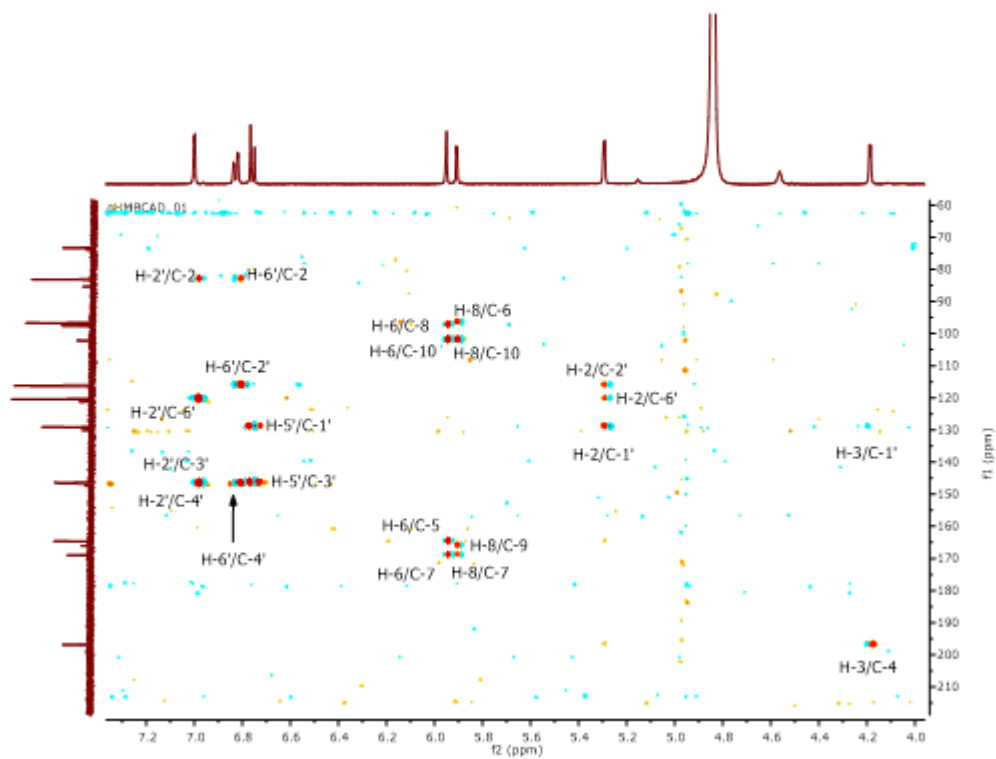
**Prilog 47 COSY spektar epitaksifolina (7) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



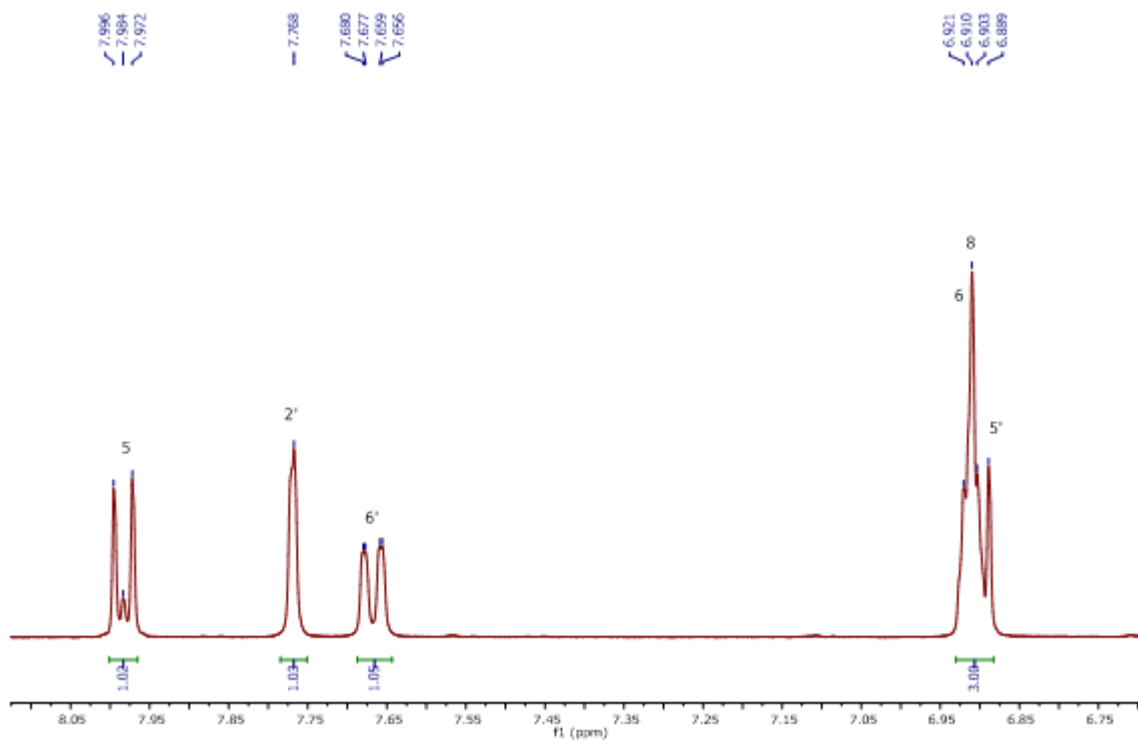
**Prilog 48 NOESY spektar epitaksifolina (7) snimljen u  $CD_3OD$ .**



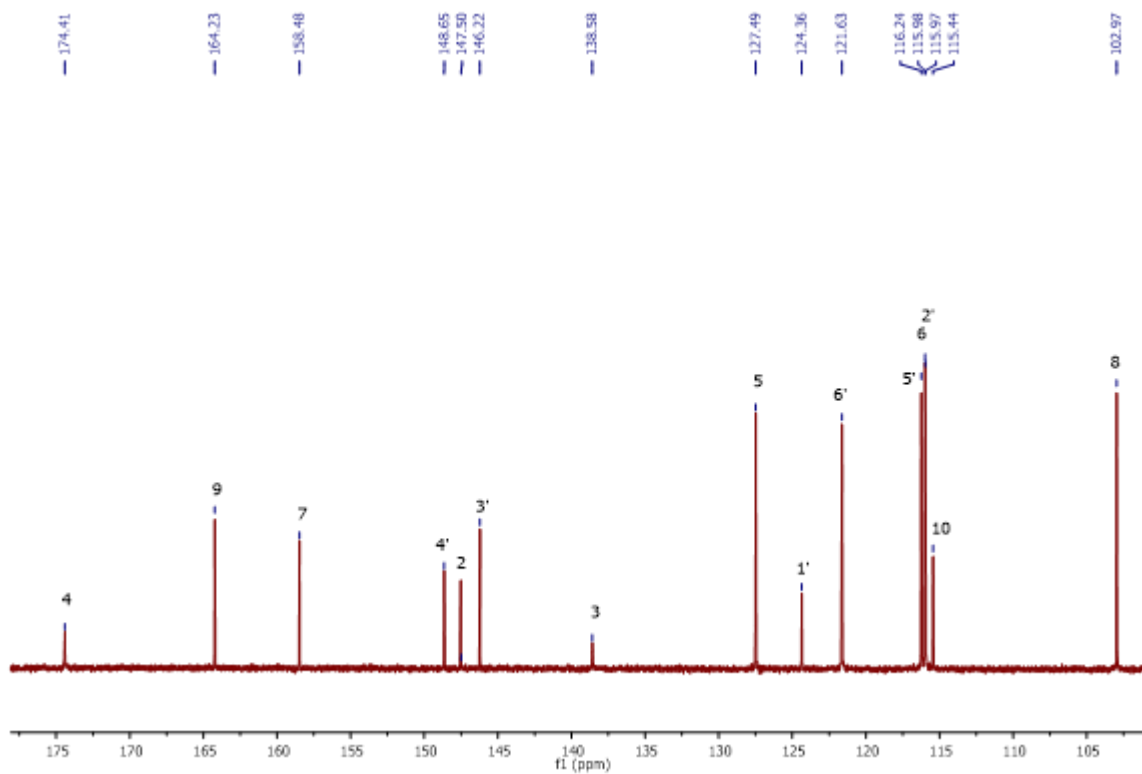
**Prilog 49 HSQC spektar epitaksifolina (7) snimljen u  $CD_3OD$ .**



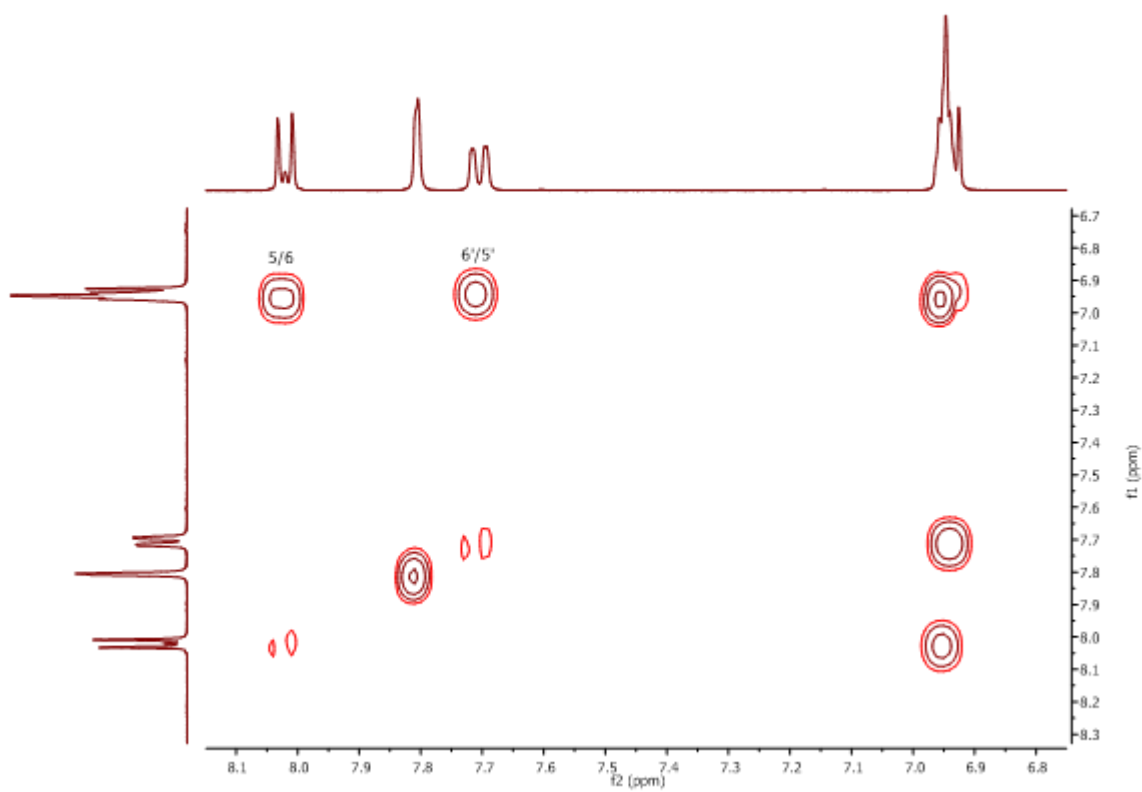
**Prilog 50 HMBC spektar epitaksifolina (7) snimljen u  $CD_3OD$ .**



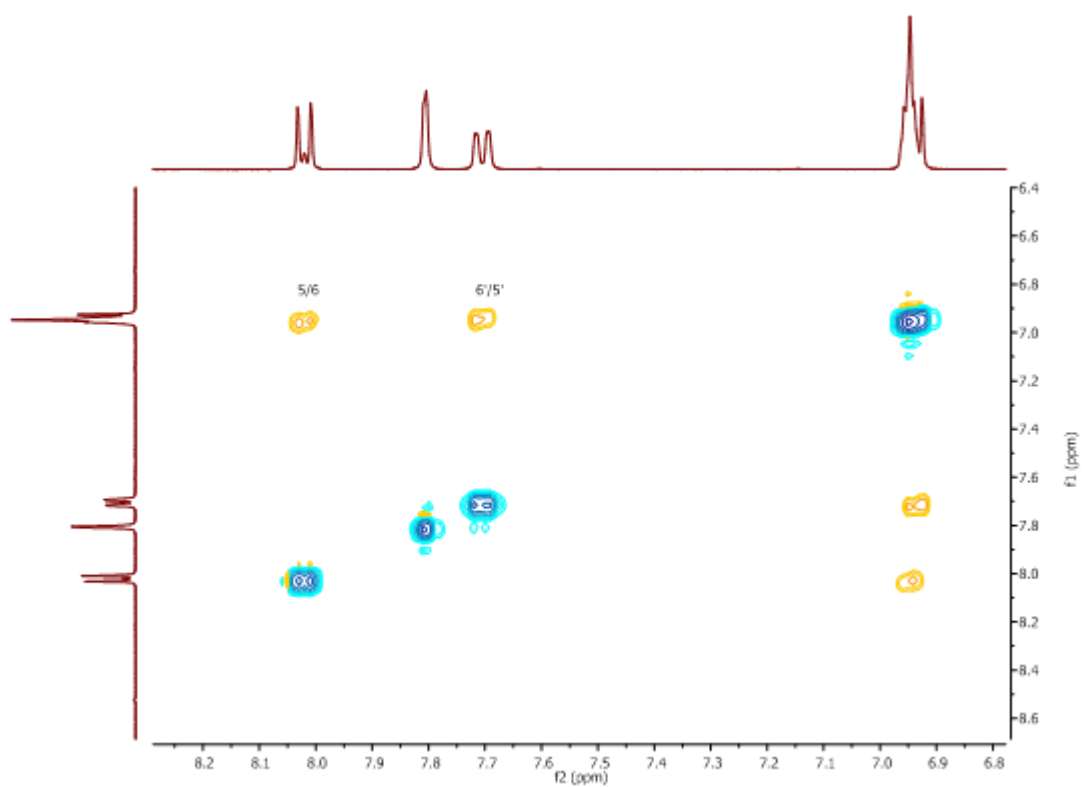
**Prilog 51  $^1H$  NMR spektar fisetina (8) snimljen u  $CD_3OD$ .**



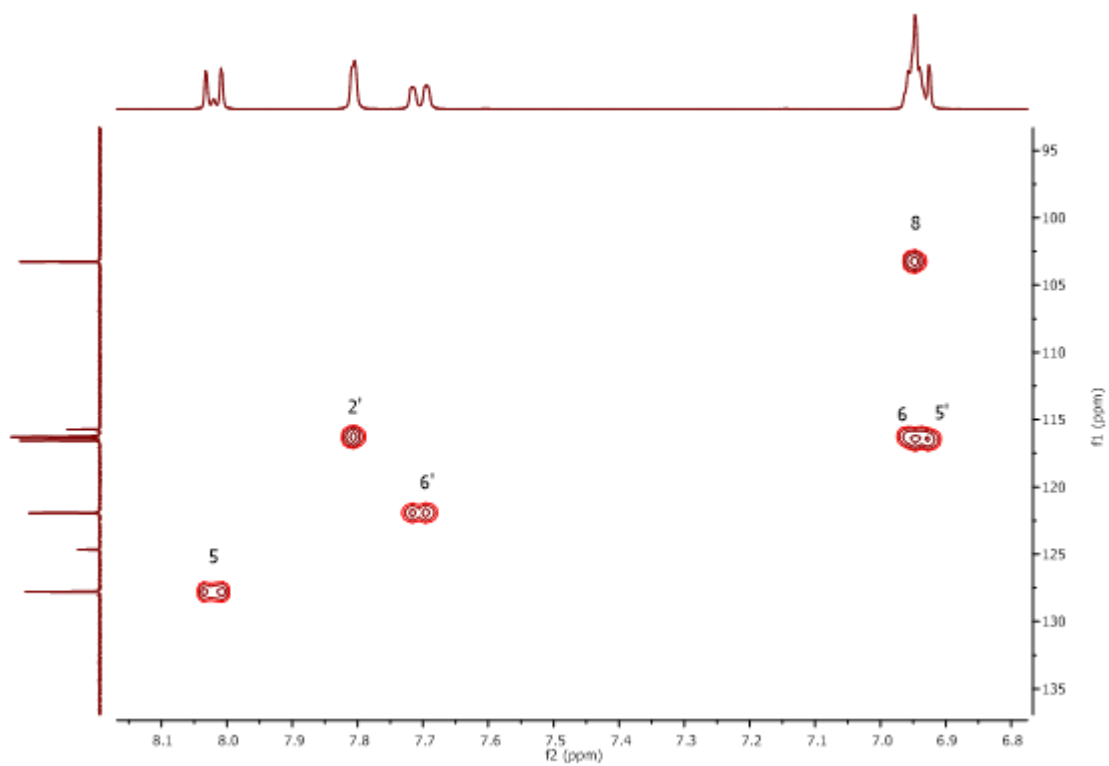
**Prilog 52 <sup>13</sup>C NMR spektar fisetina (8) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



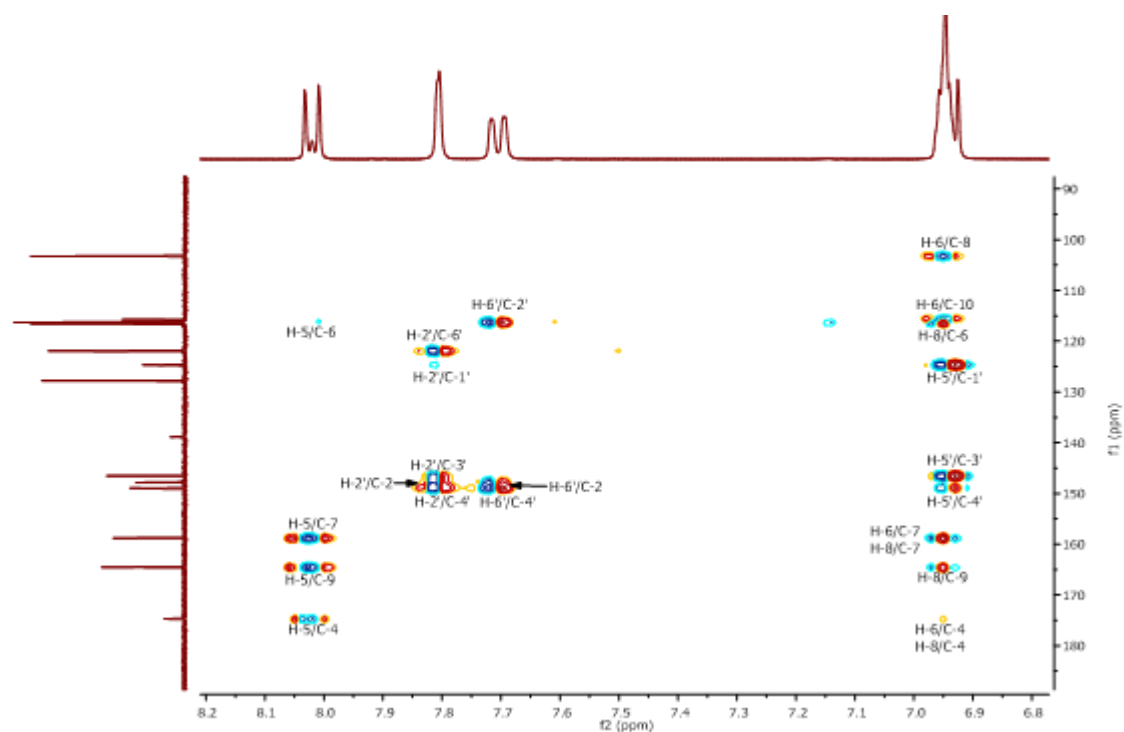
**Prilog 53 COSY spektar fisetina (8) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.**



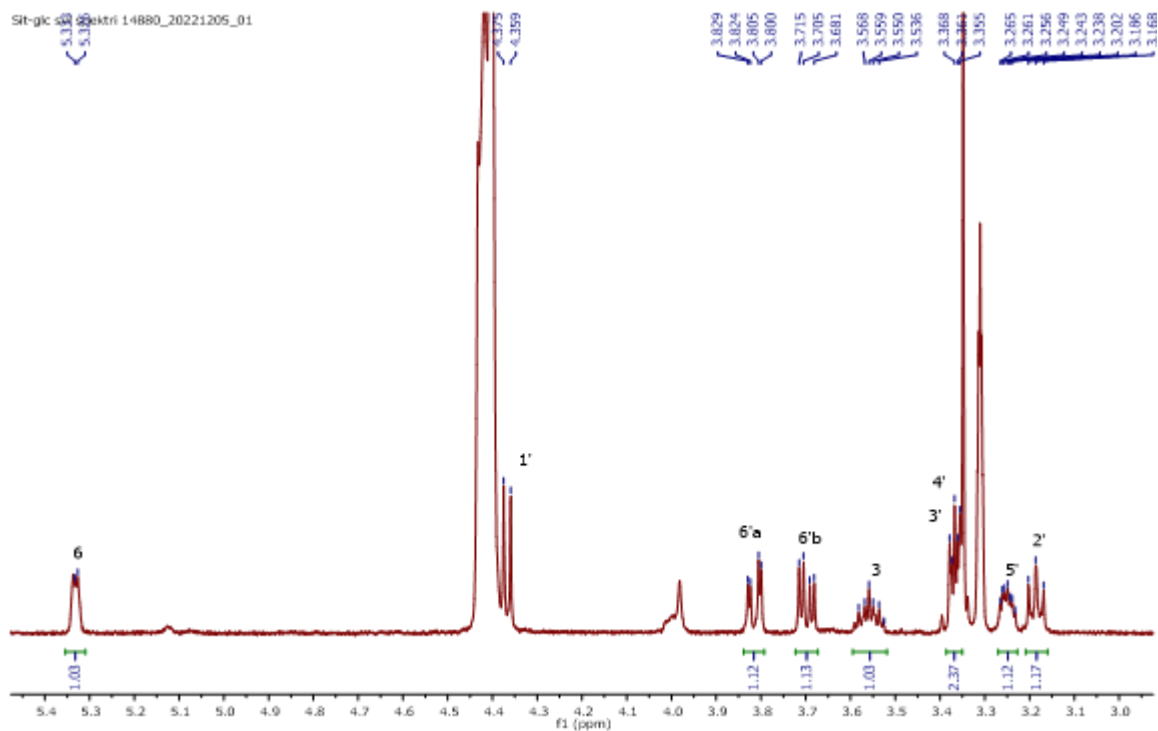
*Prilog 54 NOESY spektar fisetina (8) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



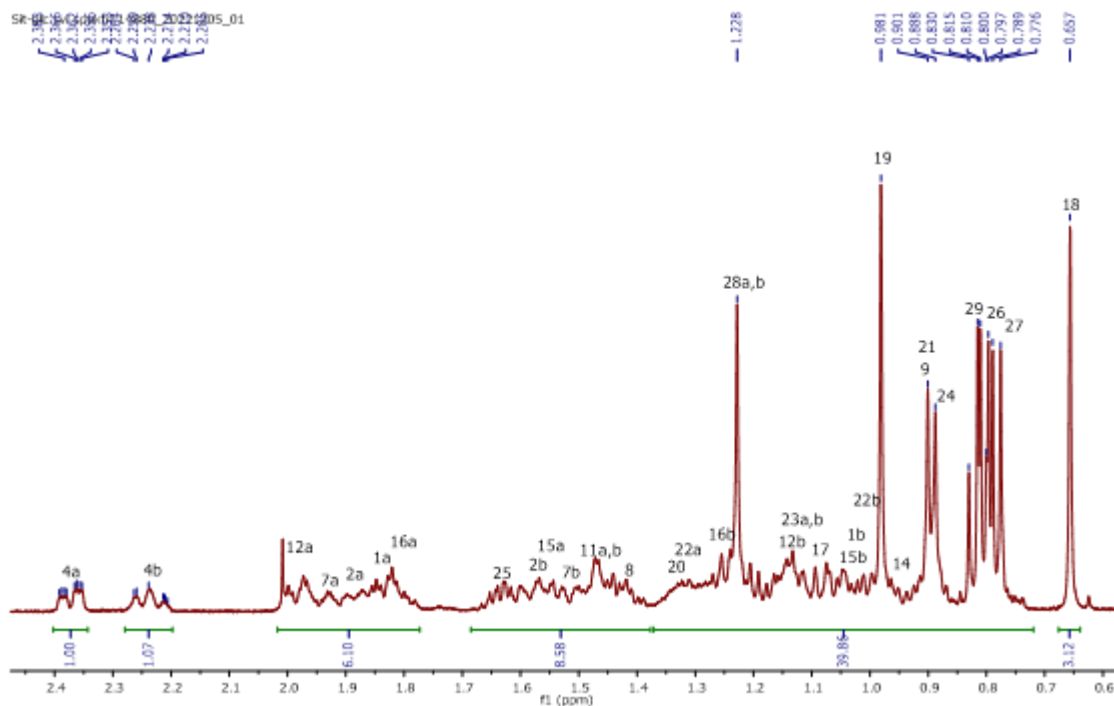
*Prilog 55 HSQC spektar fisetina (8) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



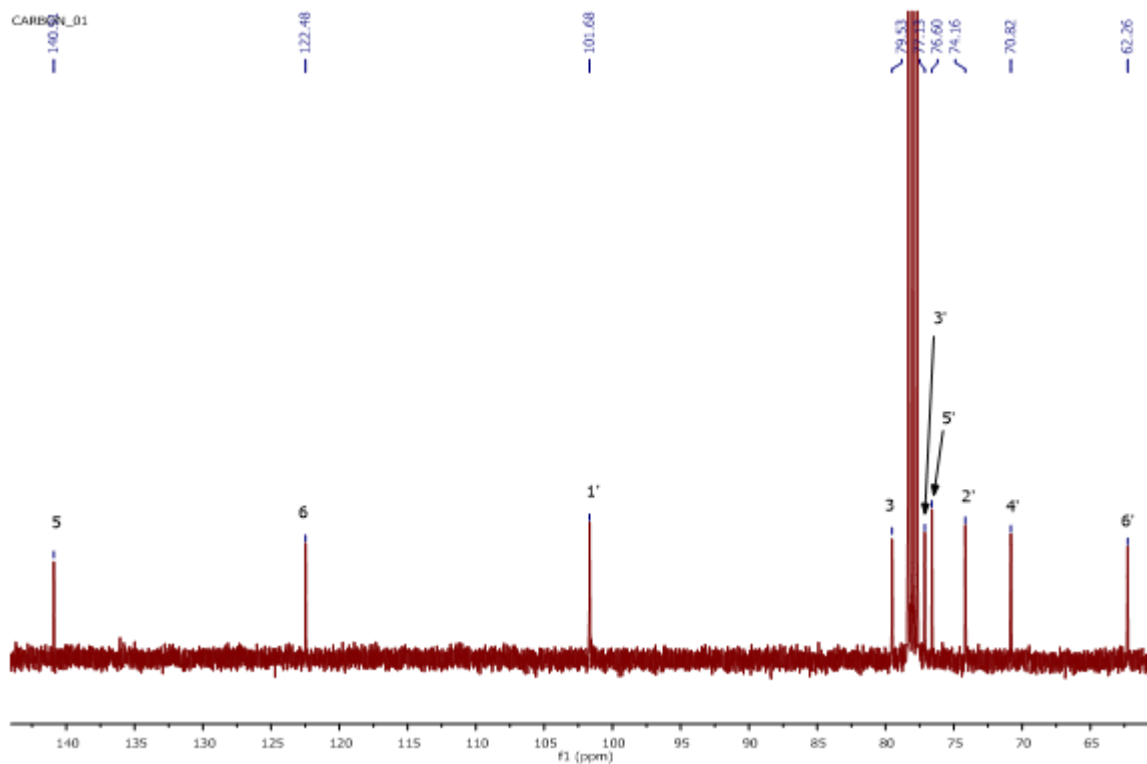
**Prilog 56 HMBC spektar fisetina (8) snimljen u  $CD_3OD$ .**



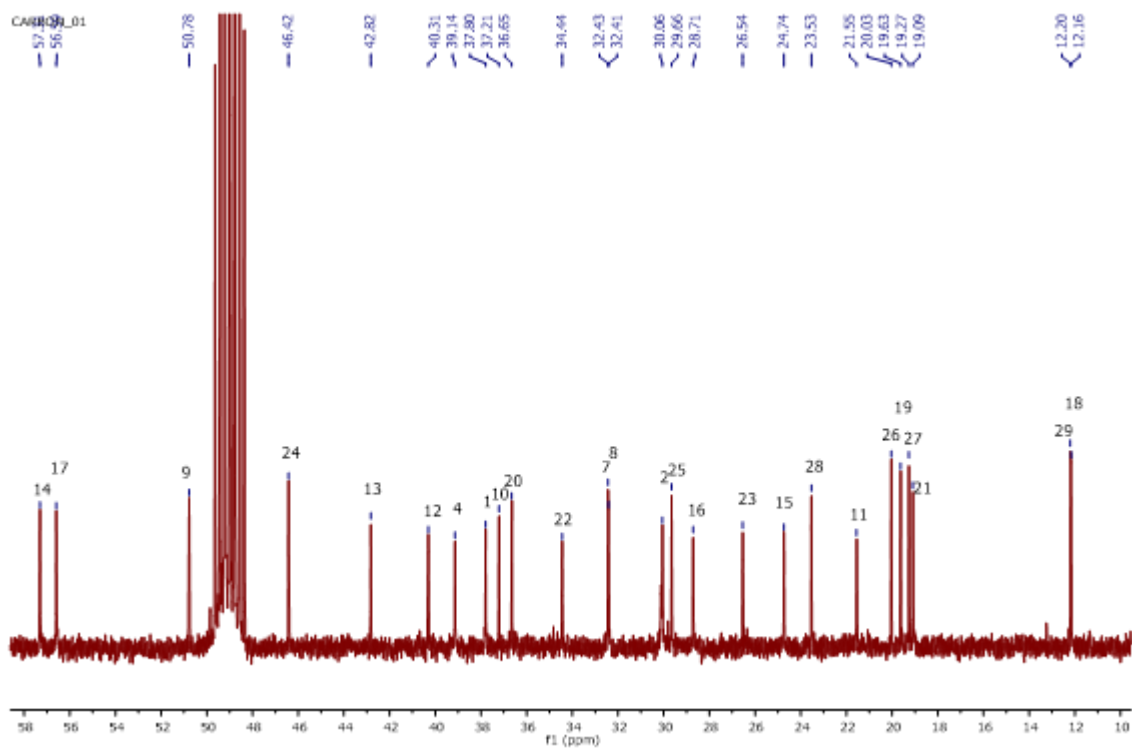
**Prilog 57 Prvi deo  $^1H$  NMR spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $CDCl_3$  +  $CD_3OD$ .**



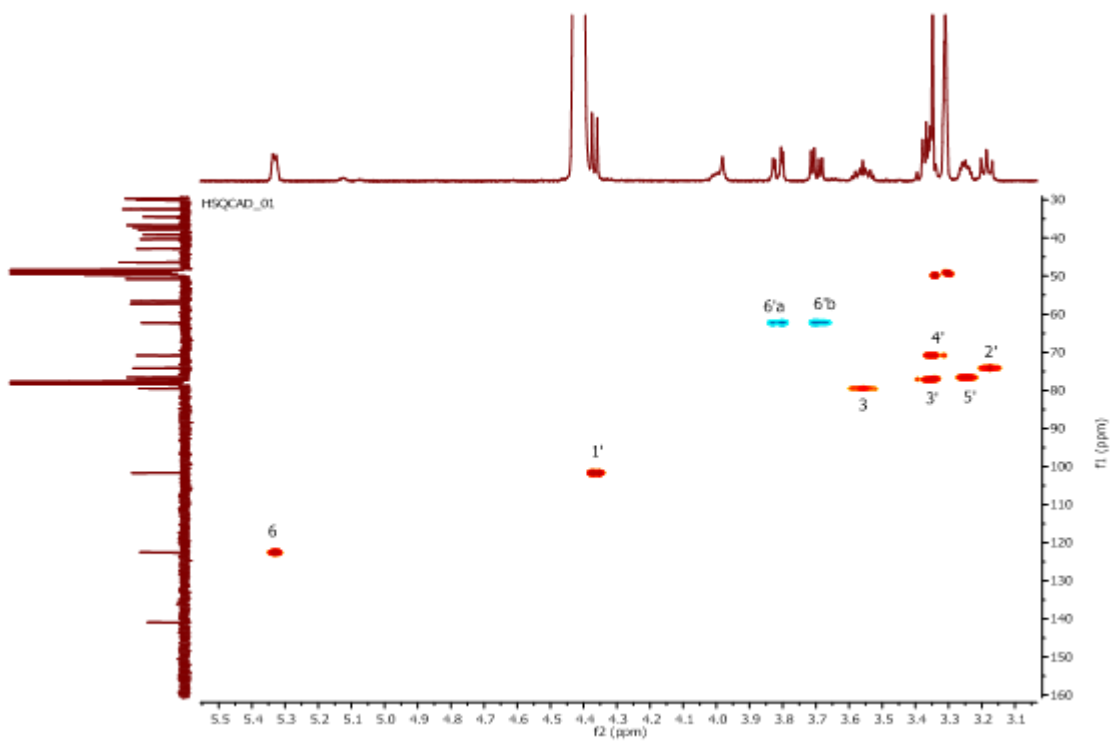
**Prilog 58 Drugi deo  $^1\text{H}$  NMR spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



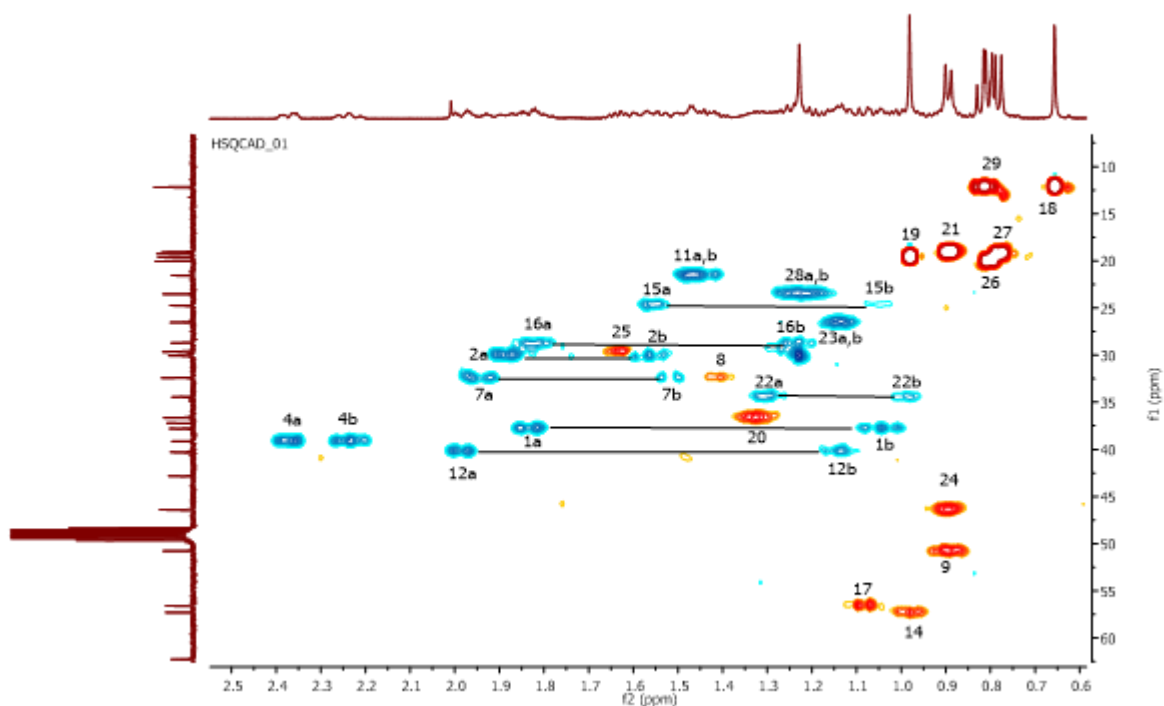
**Prilog 59 Prvi deo  $^{13}\text{C}$  NMR spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



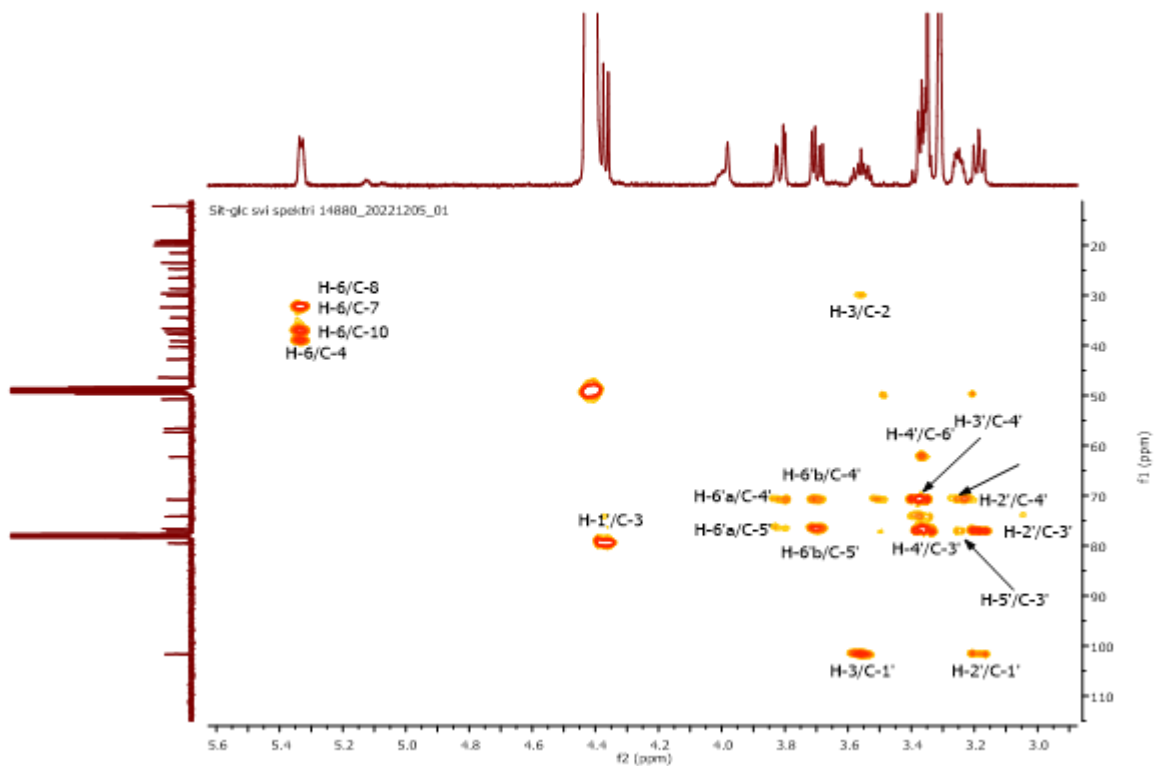
**Prilog 60 Drugi deo  $^{13}\text{C}$  NMR spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



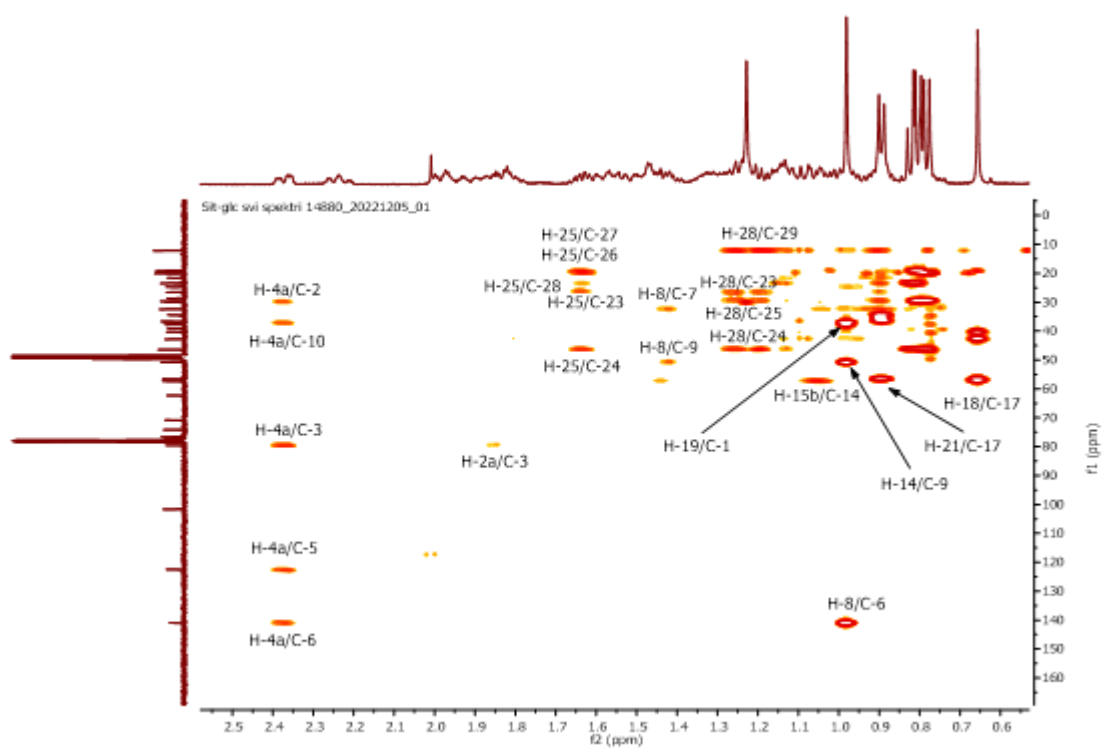
**Prilog 61 Prvi deo HSQC spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



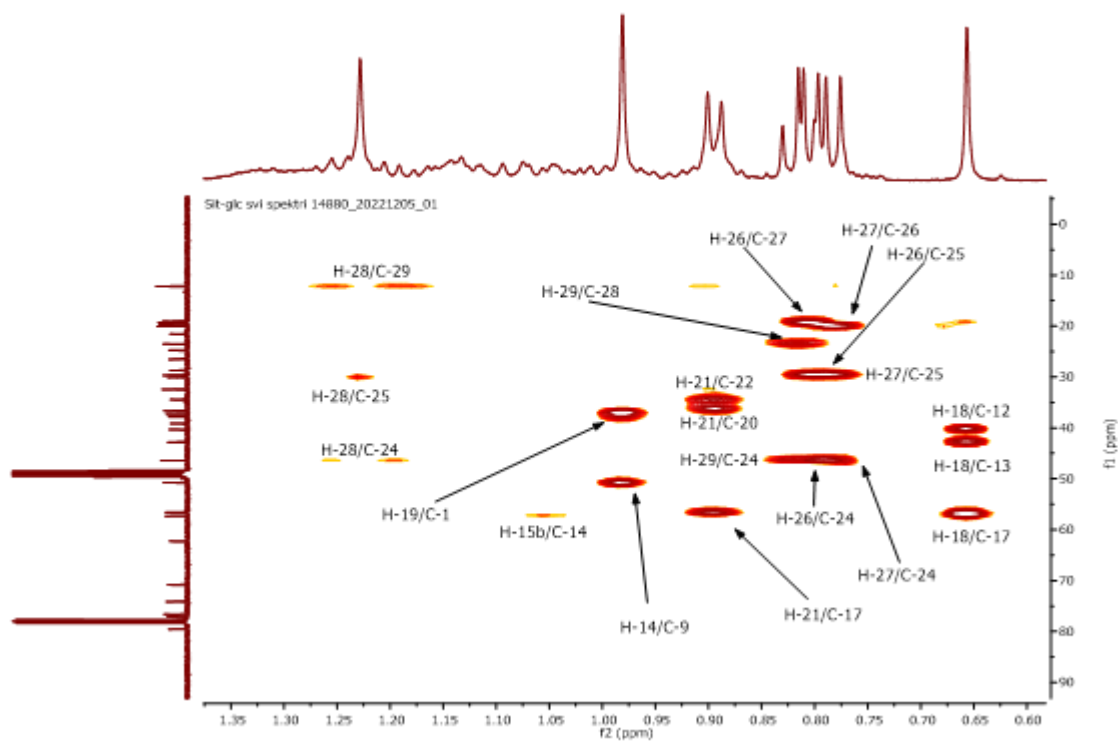
**Prilog 62 Drugi deo HSQC spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $CDCl_3$  +  $CD_3OD$ .**



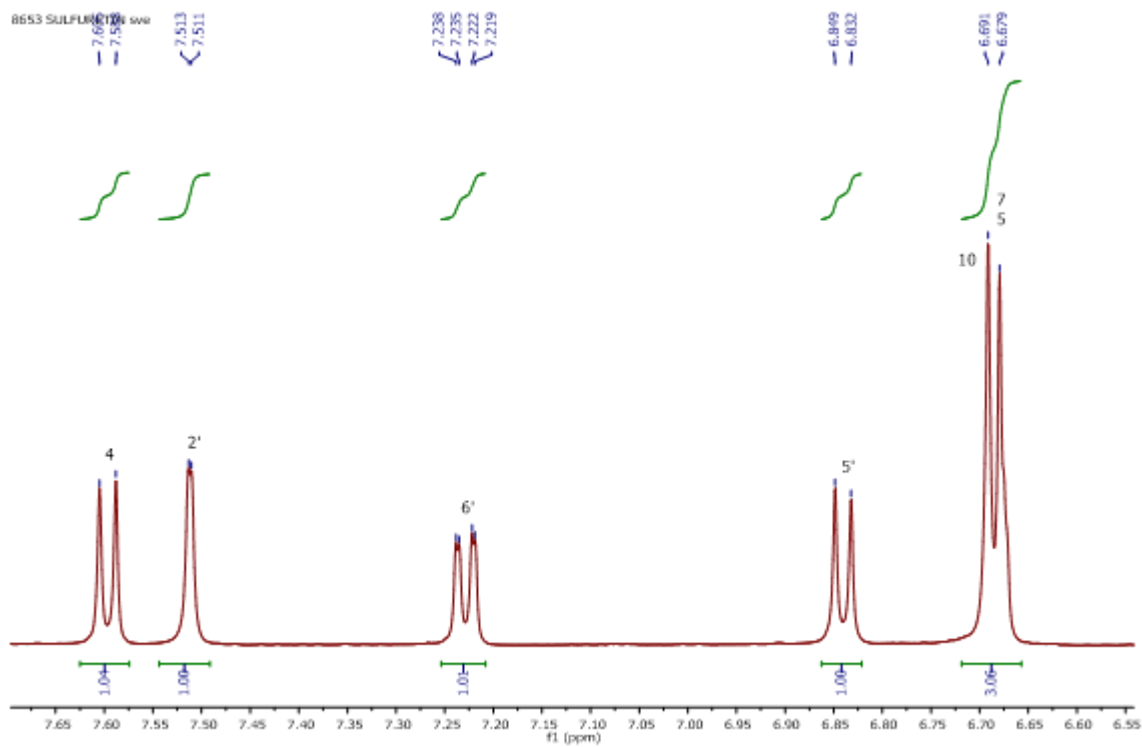
**Prilog 63 Prvi deo HMBC spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $CDCl_3$  +  $CD_3OD$ .**



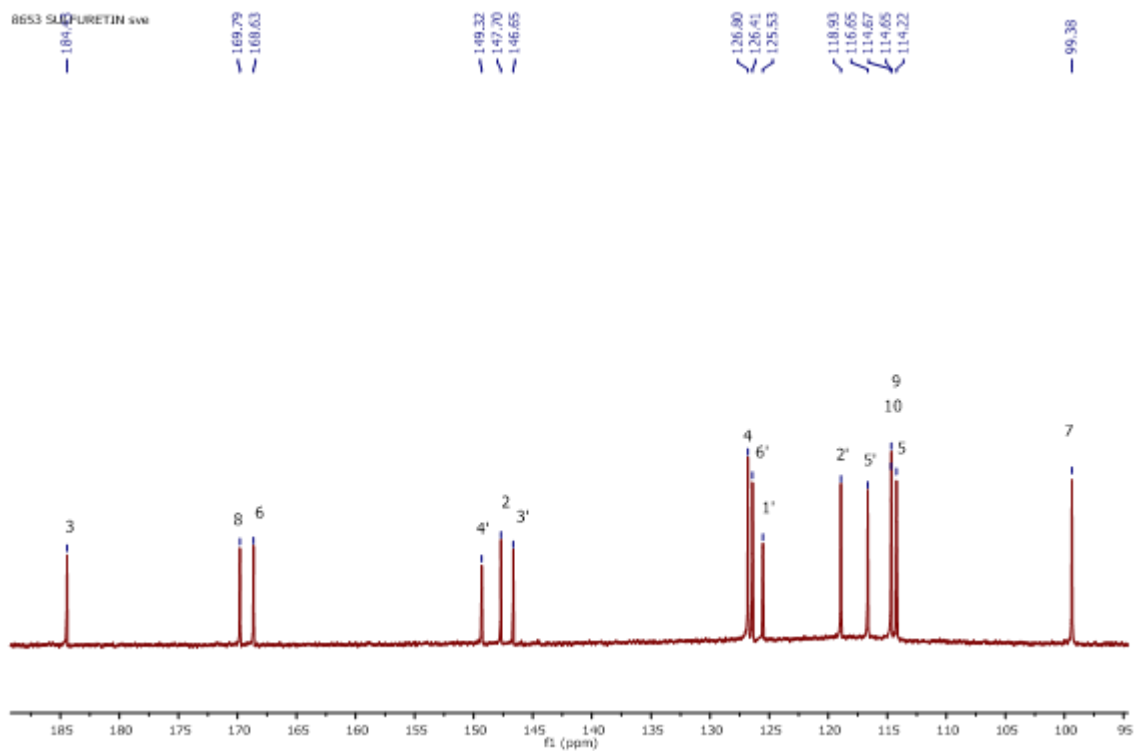
**Prilog 64 Drugi deo HMBC spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $CDCl_3$  +  $CD_3OD$ .**



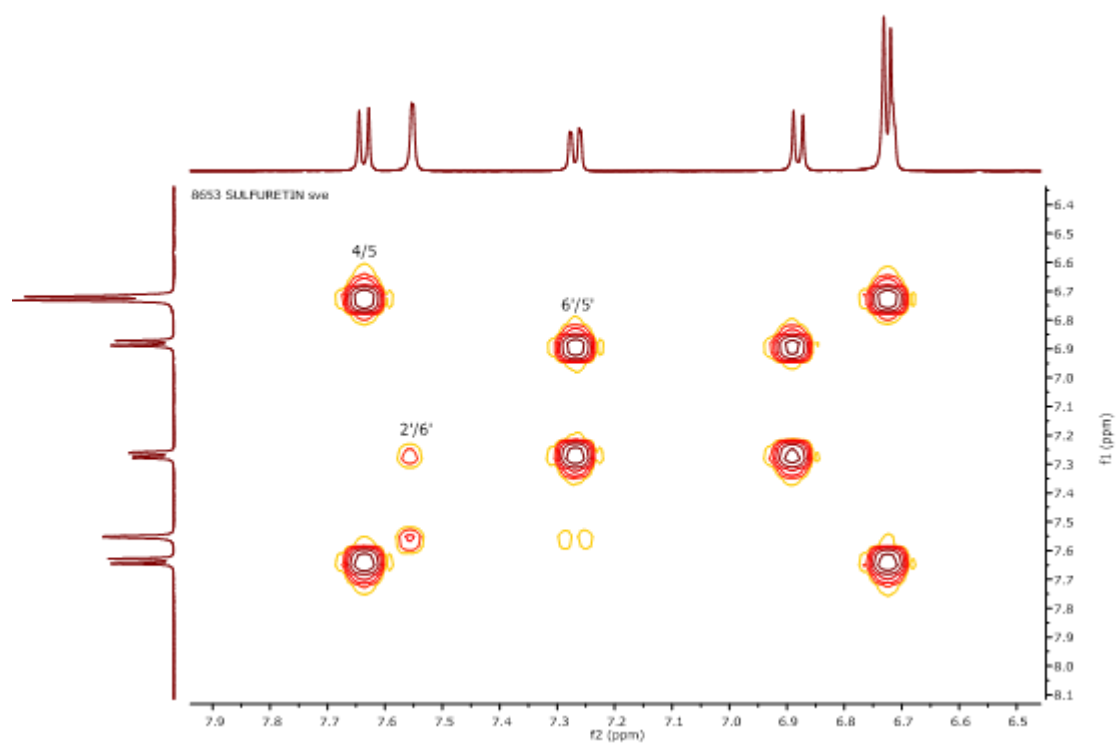
**Prilog 65 Treći deo HMBC spektra sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukoziida (9), snimljenog u smeši  $CDCl_3$  +  $CD_3OD$ .**



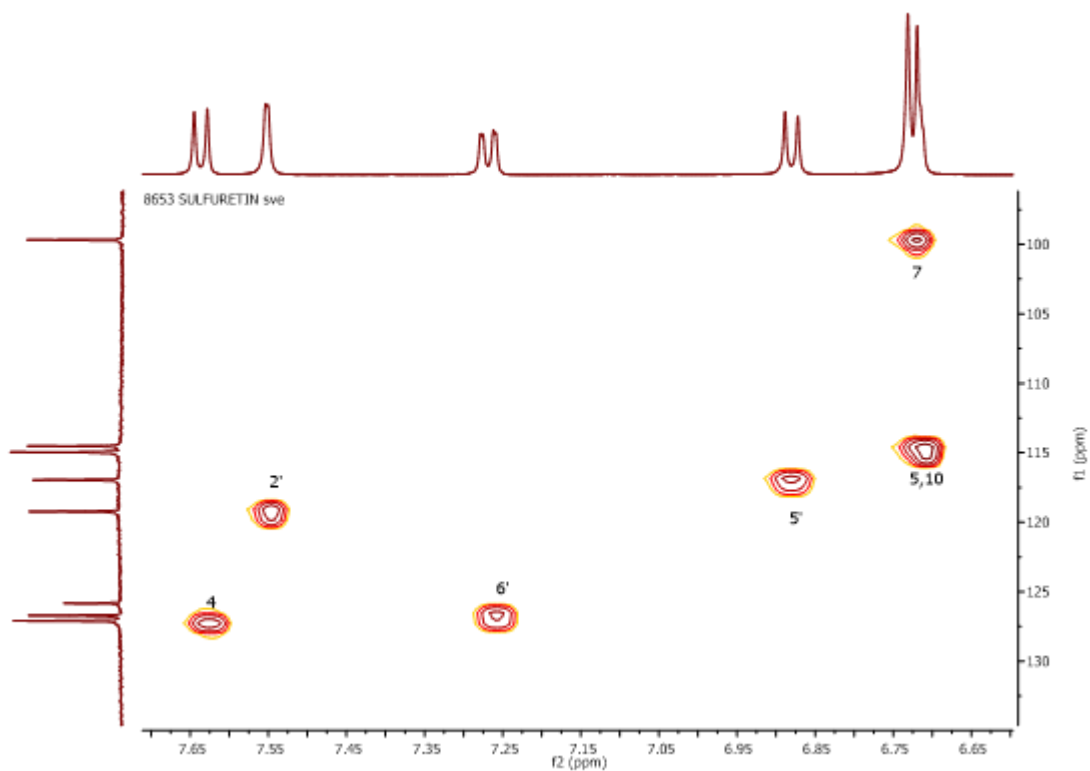
**Prilog 66  $^1\text{H}$  NMR spektar sulfuretina (10) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



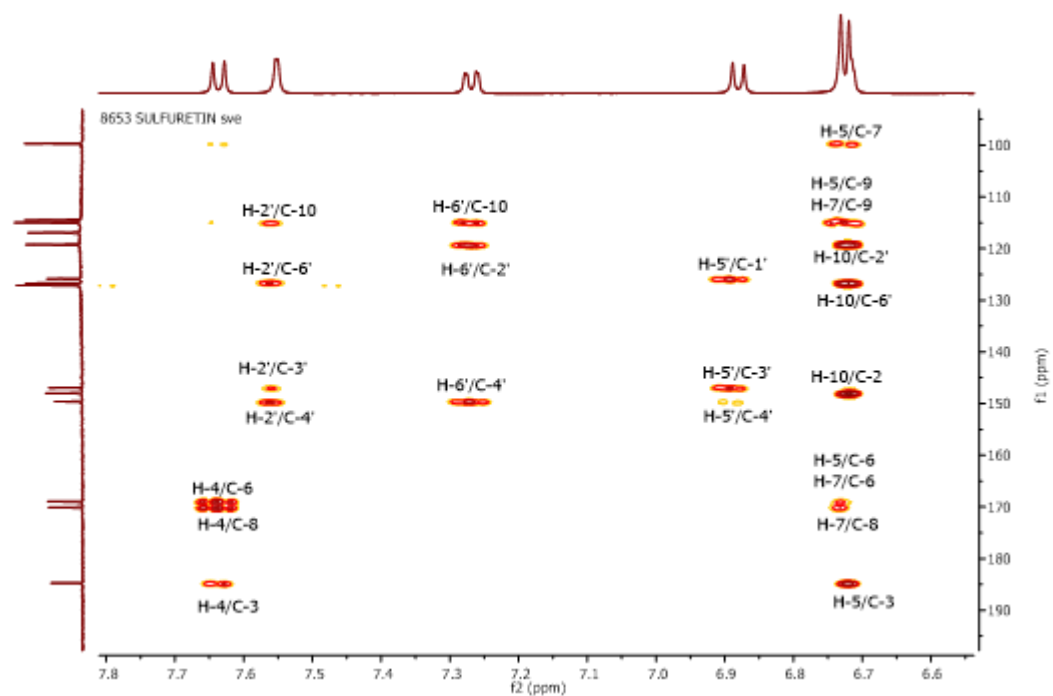
**Prilog 67  $^{13}\text{C}$  NMR spektar sulfuretina (10) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



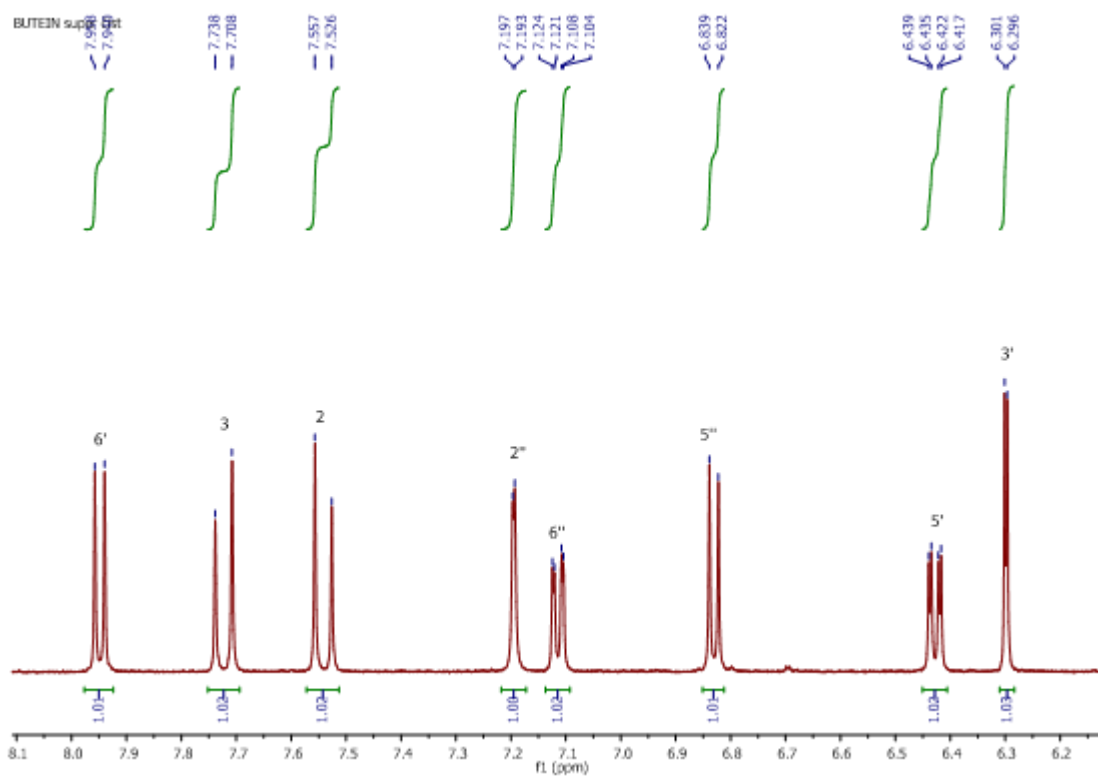
***Prilog 68 COSY spektar sulfuretina (10) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.***



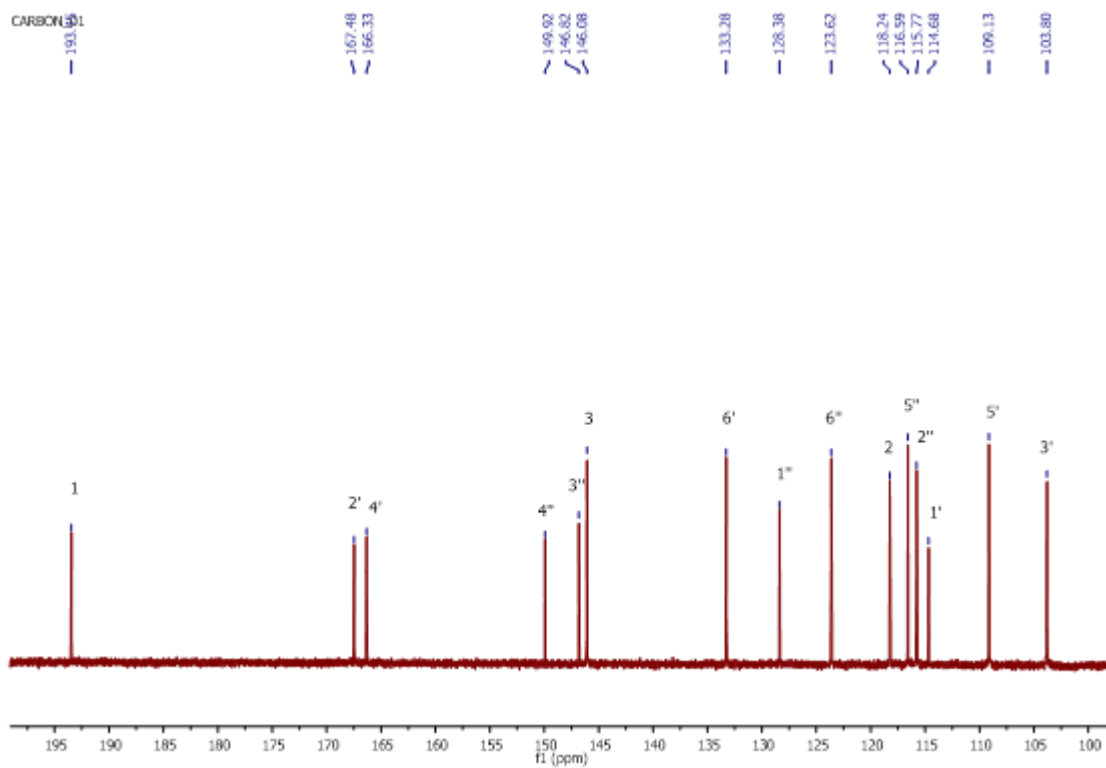
***Prilog 69 HSQC spektar sulfuretina (10) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.***



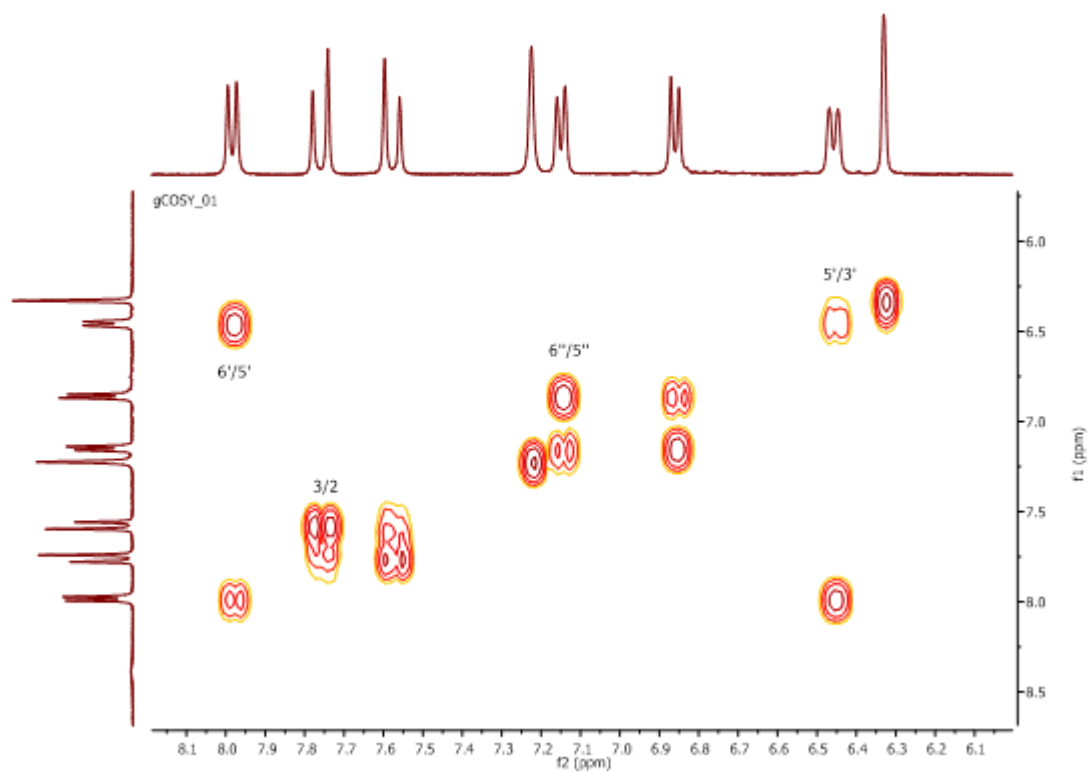
*Prilog 70 HMBC spektar sulfuretina (10) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



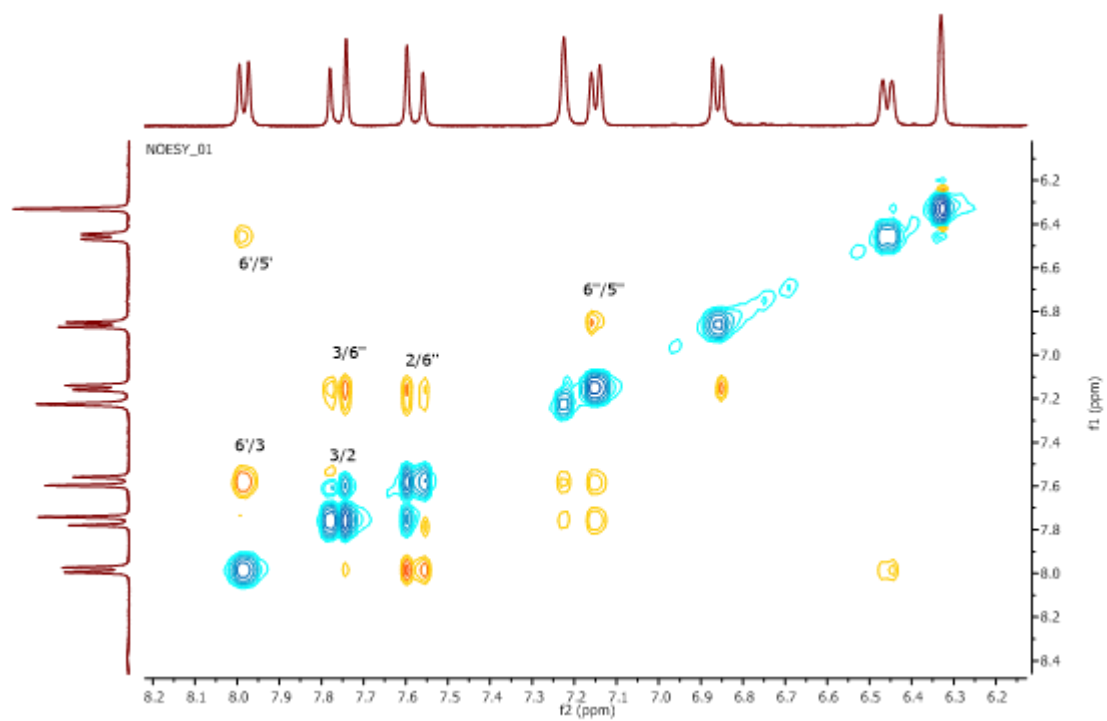
*Prilog 70 <sup>1</sup>H NMR spektar buteina (11) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



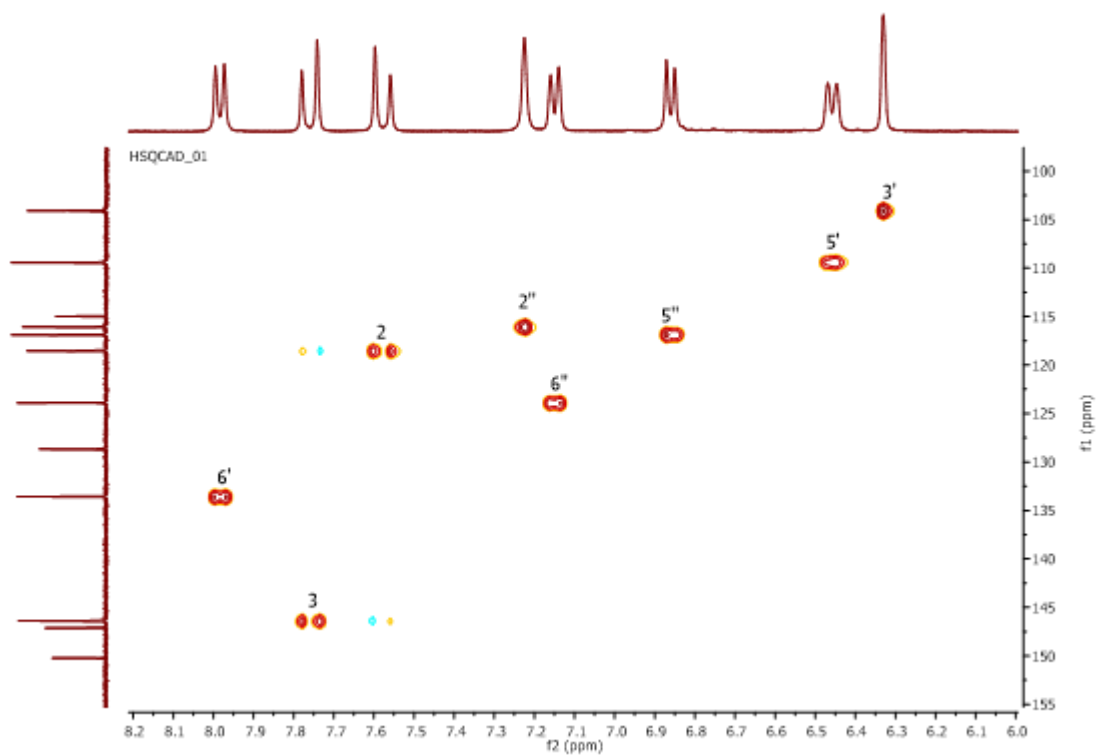
**Prilog 71  $^{13}\text{C}$  NMR spektar buteina (11) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



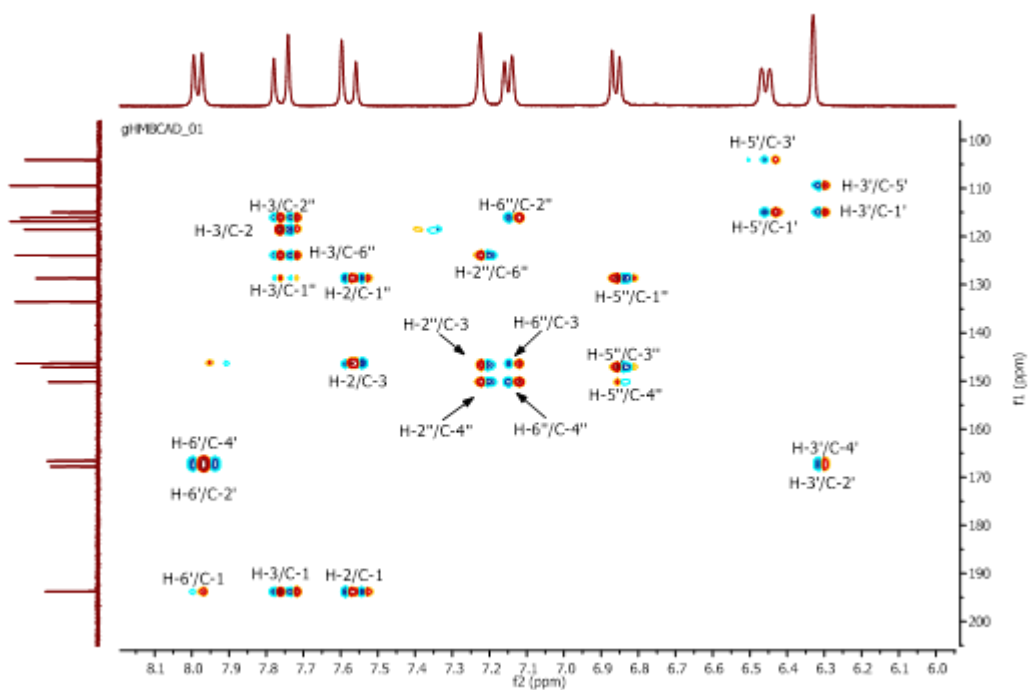
**Prilog 72 COSY spektar buteina (11) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



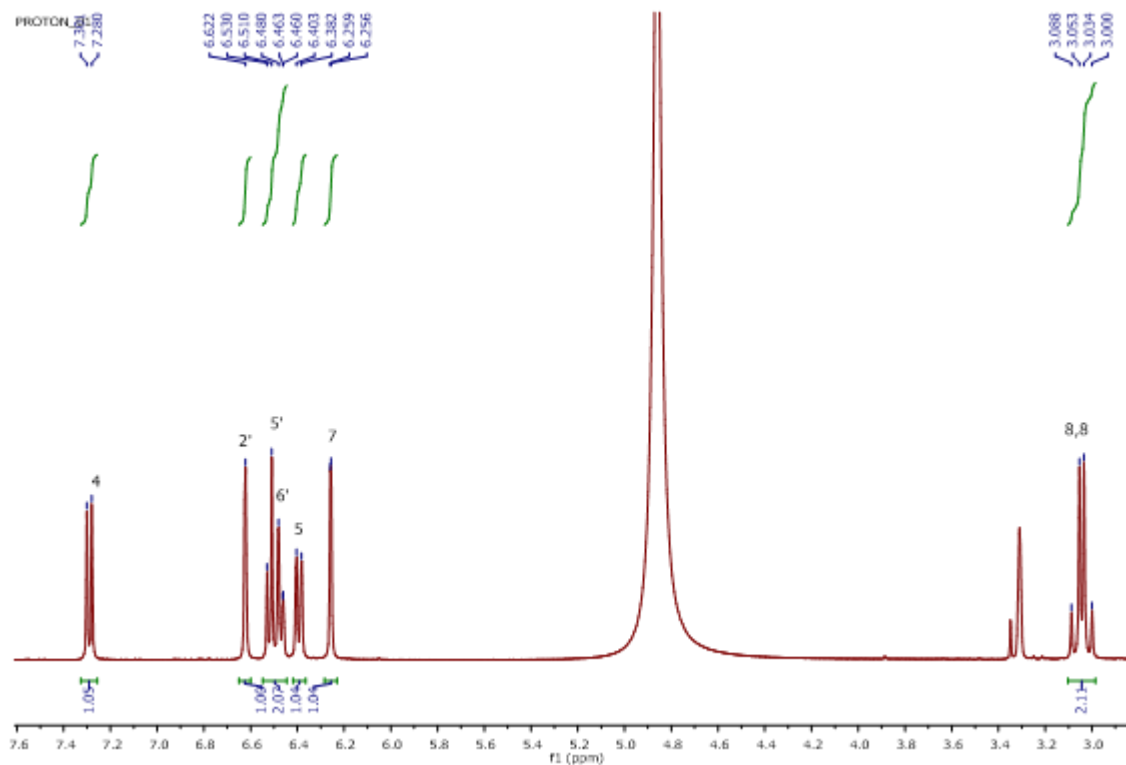
**Prilog 73 NOESY spektar buteina (11) snimljen u  $CD_3OD$ .**



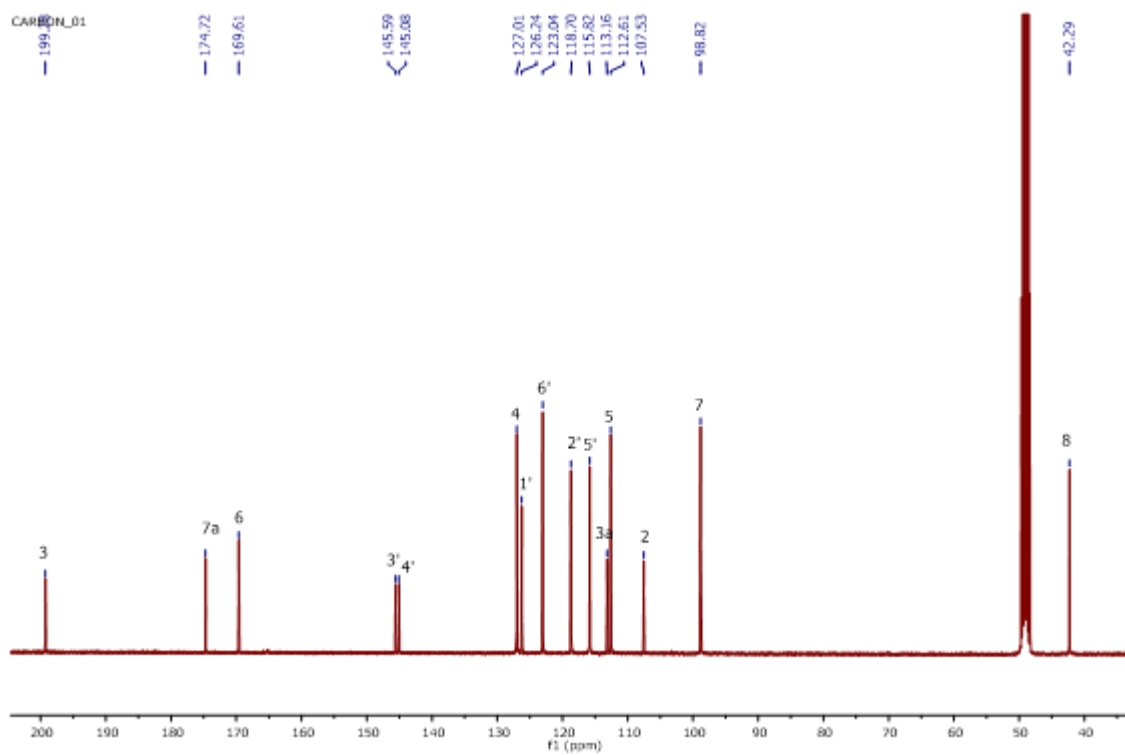
**Prilog 74 HSQC spektar buteina (11) snimljen u  $CD_3OD$ .**



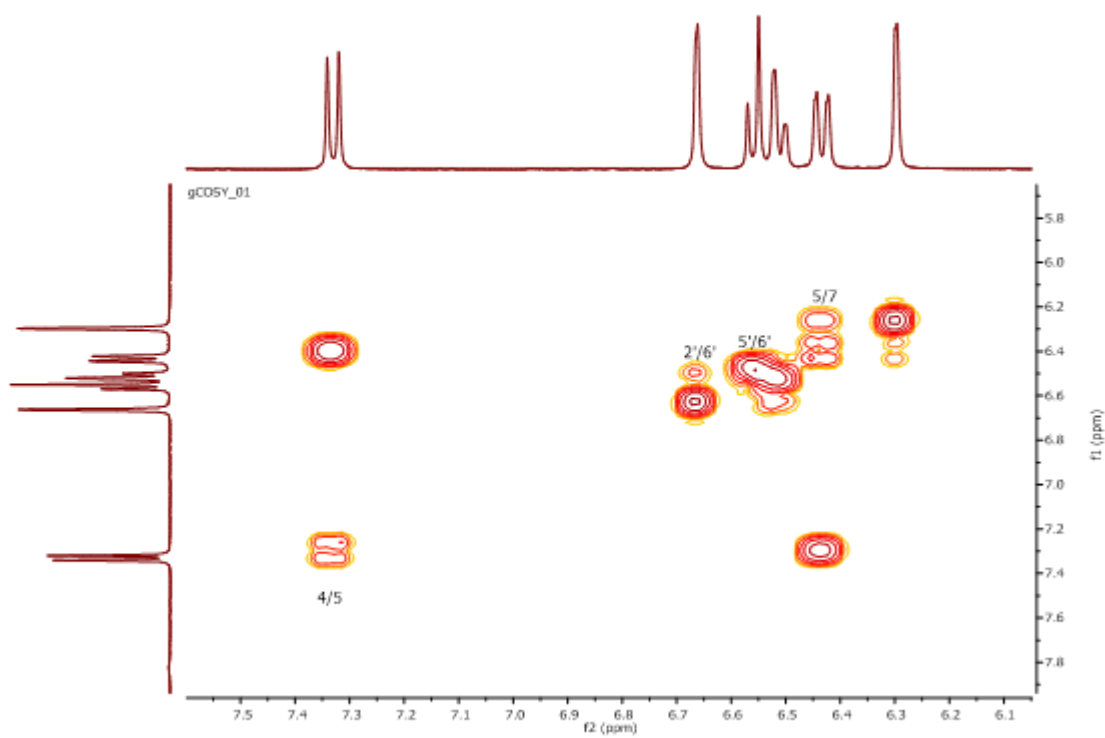
**Prilog 75 HMBC spektar buteina (11) snimljen u  $CD_3OD$ .**



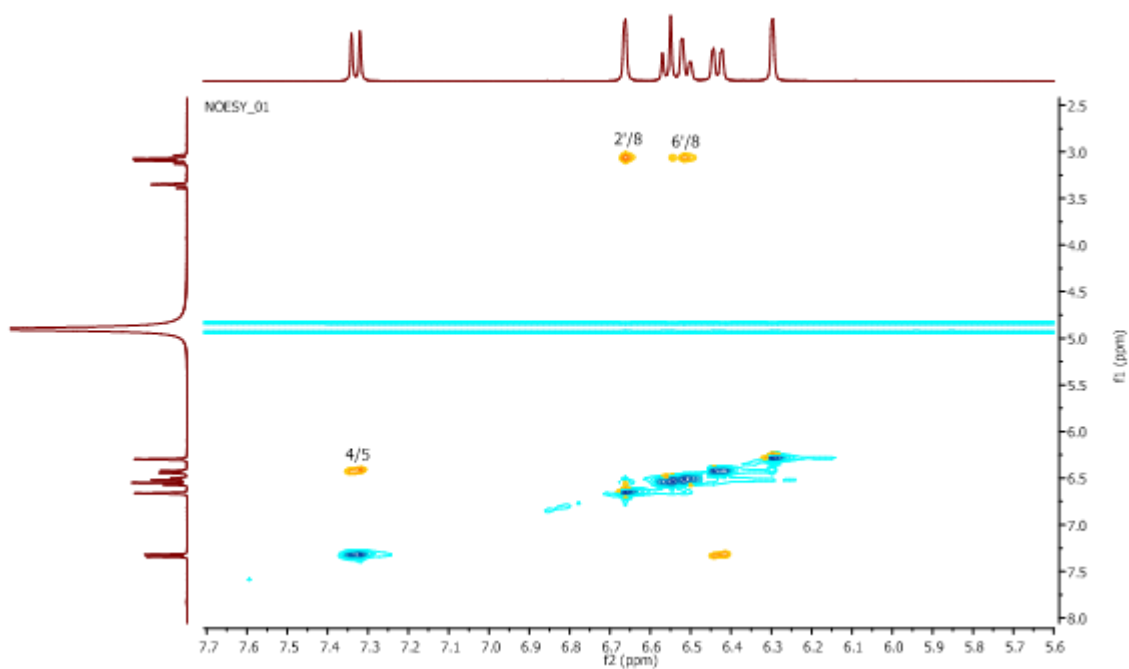
**Prilog 76  $^1H$  NMR spektar sulfuretin auronola (12) snimljen u  $CD_3OD$ .**



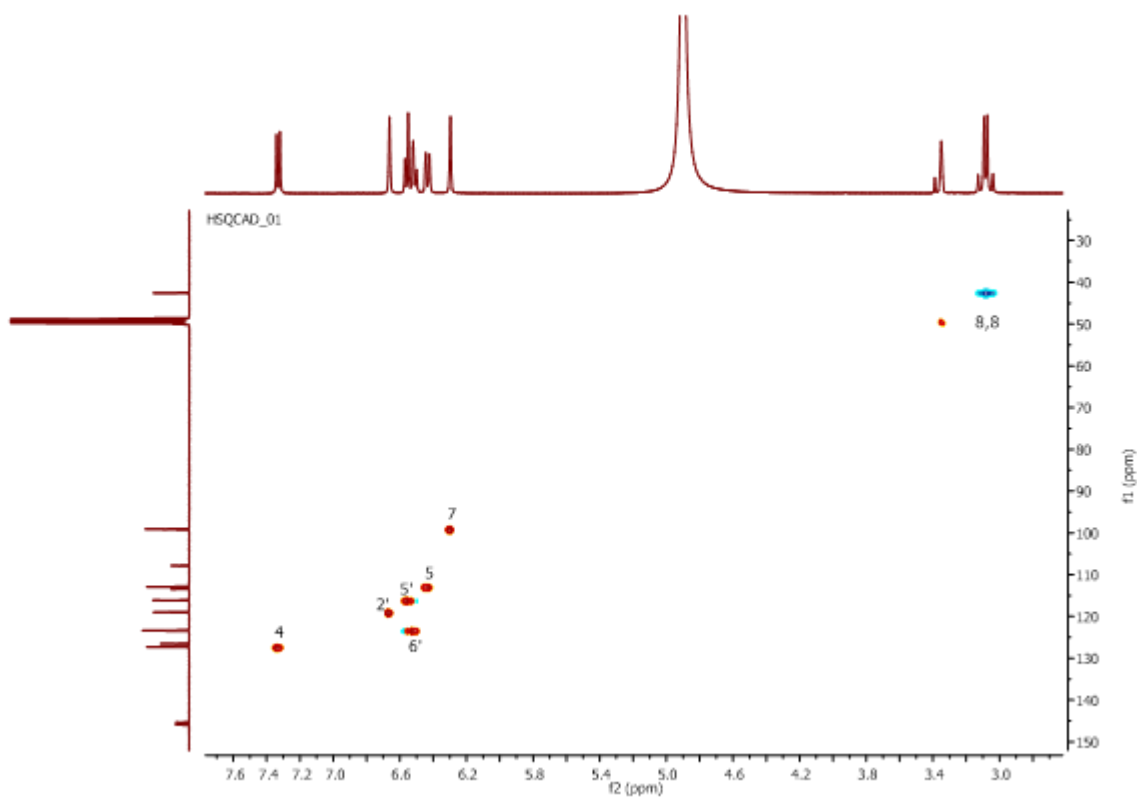
**Prilog 77  $^{13}\text{C}$  NMR spektar sulfuretin auronola (12) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



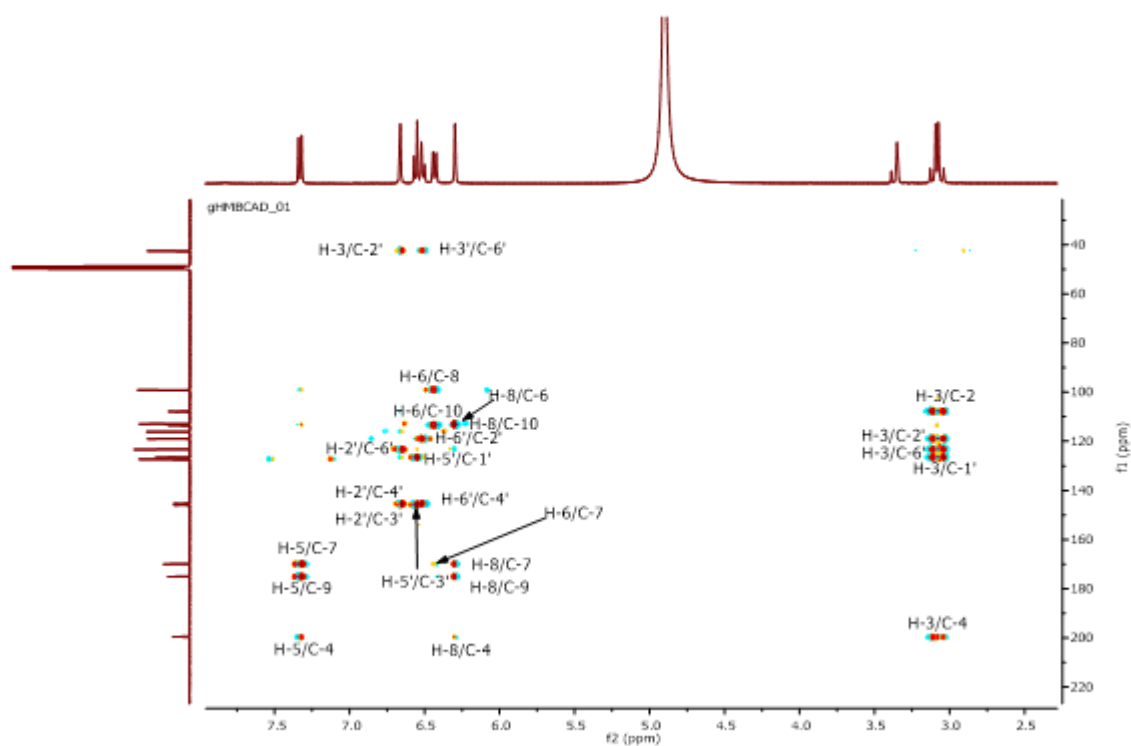
**Prilog 78 COSY spektar sulfuretin auronola (12) snimljen u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



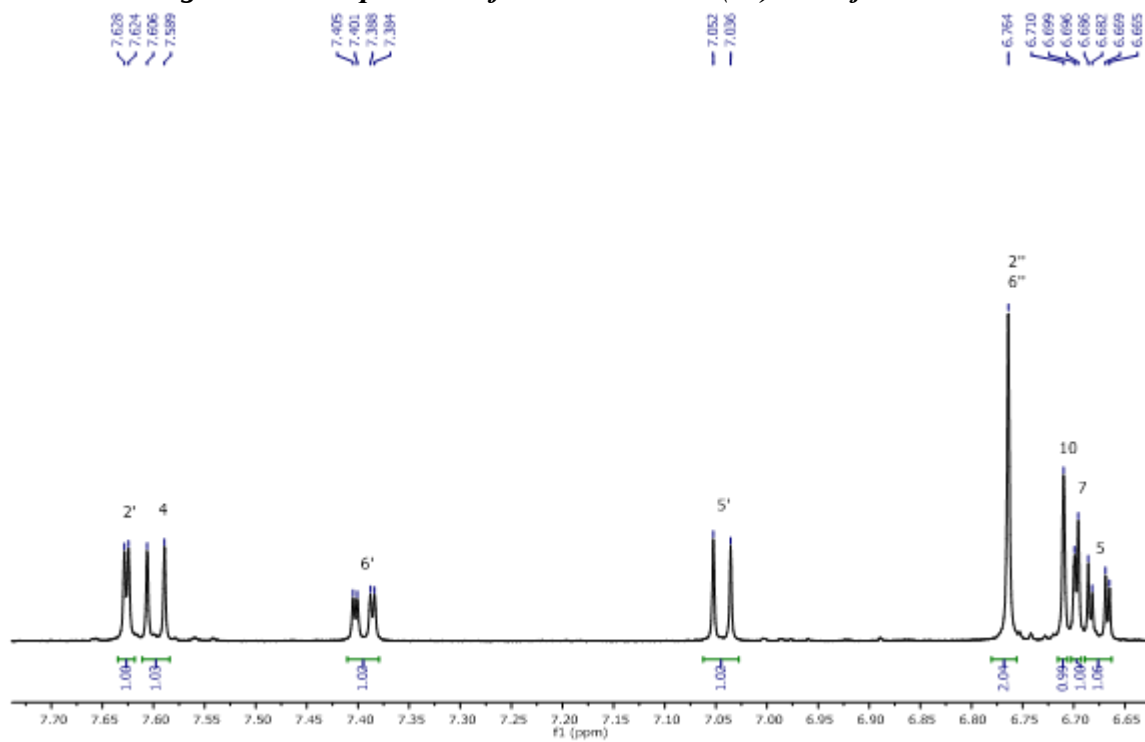
*Prilog 79 NOESY spektar sulfuretin auronola (12) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



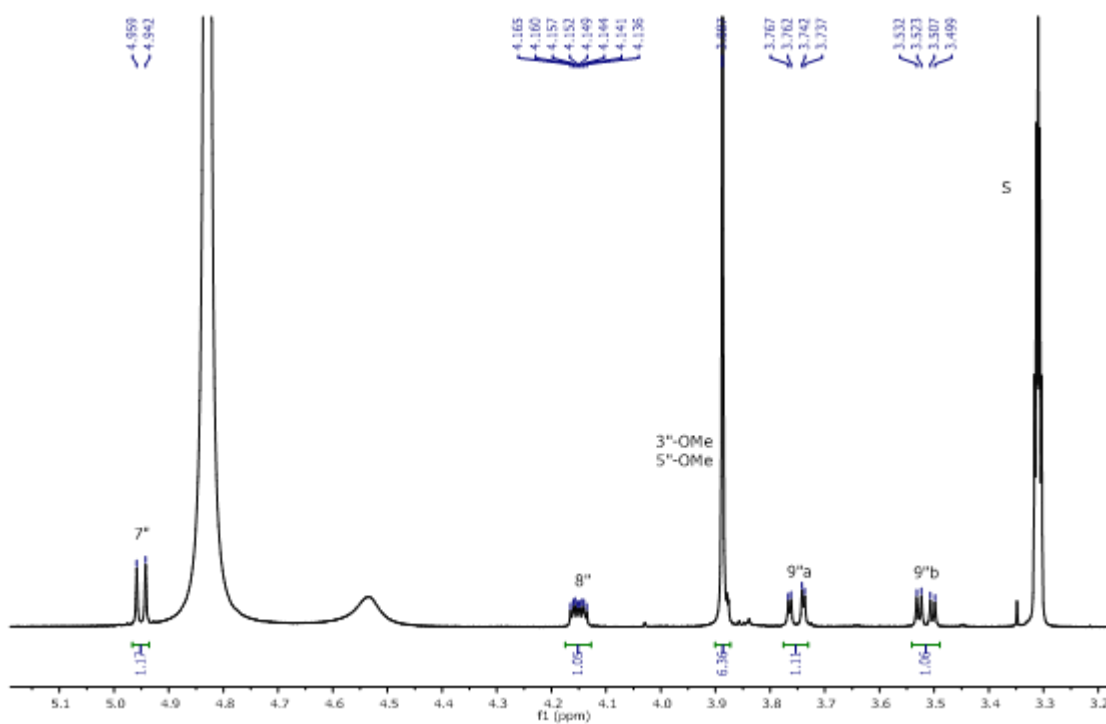
*Prilog 80 HSQC spektar sulfuretin auronola (12) snimljen u CD<sub>3</sub>OD.*



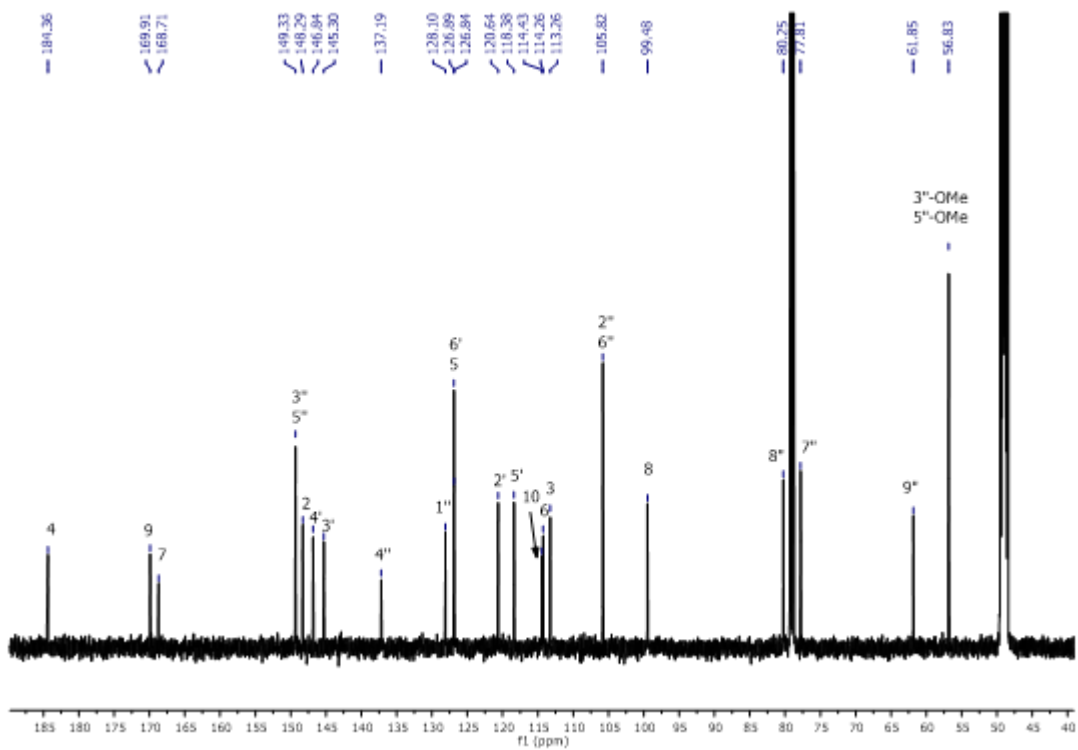
**Prilog 81 HMBC spektar sulfuretin auronola (12) snimljen u  $CD_3OD$ .**



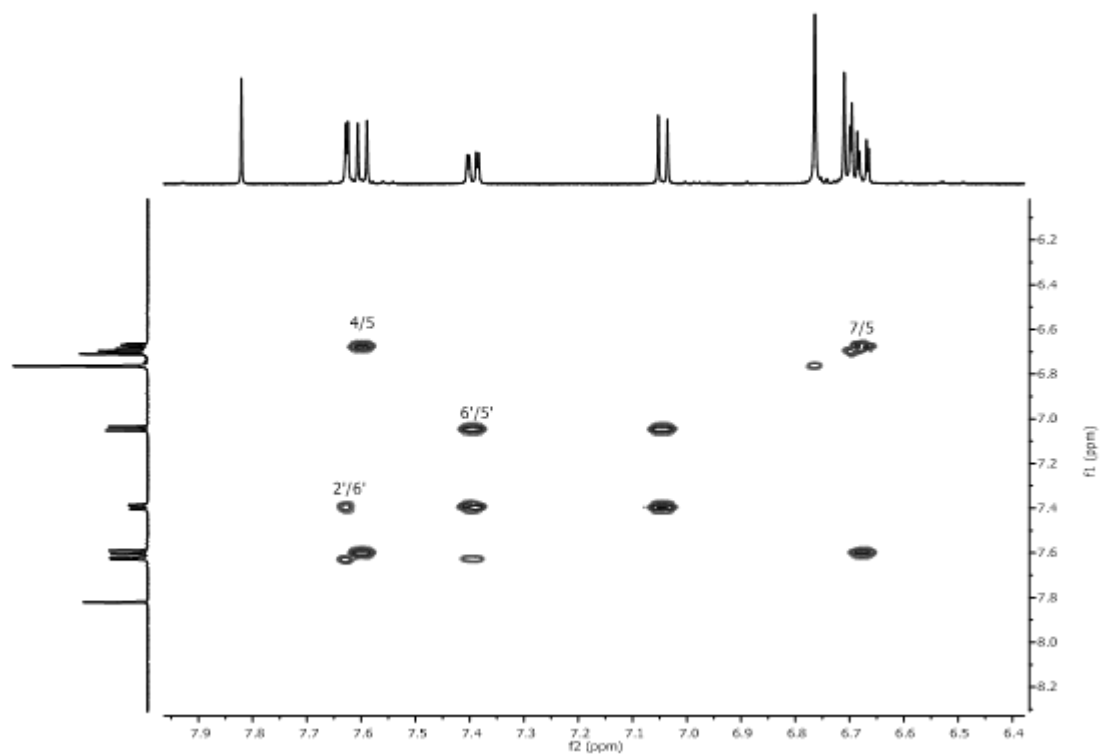
**Prilog 82 Prvi deo  $^1H$  NMR spektra kotinignana A (13), snimljenog u  $CD_3OD$ .**



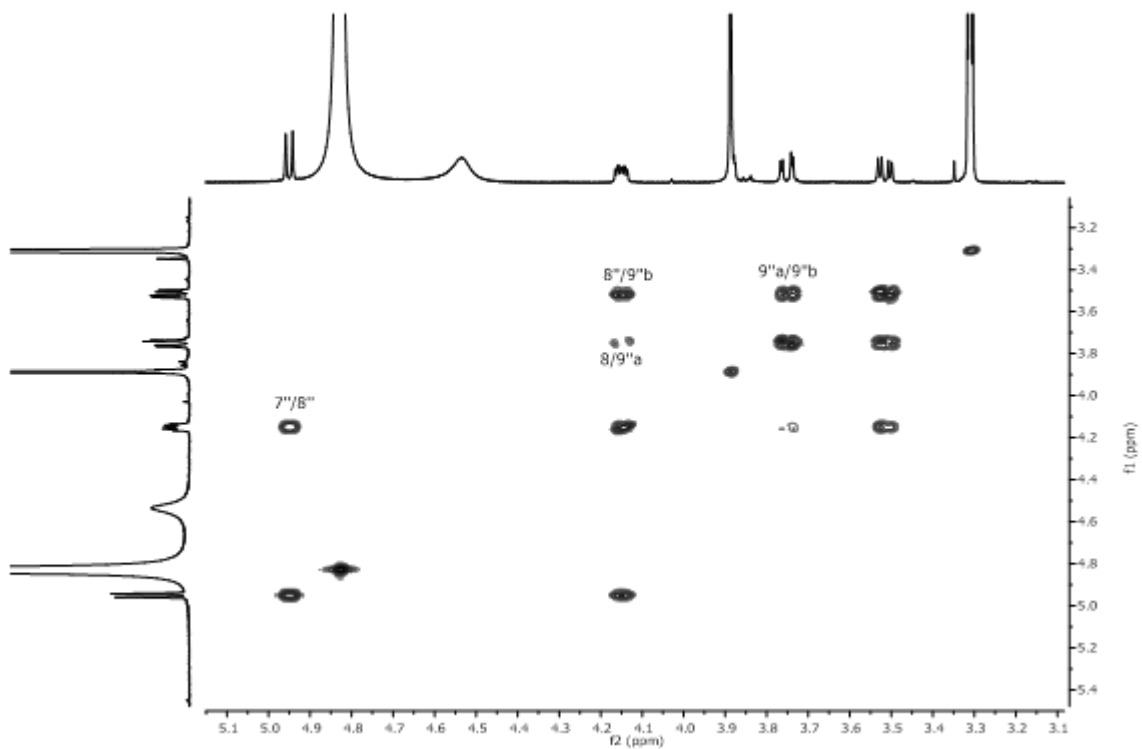
**Prilog 83 Drugi deo  $^1\text{H}$  NMR spektra kotinignana A (13), snimljenog u  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**



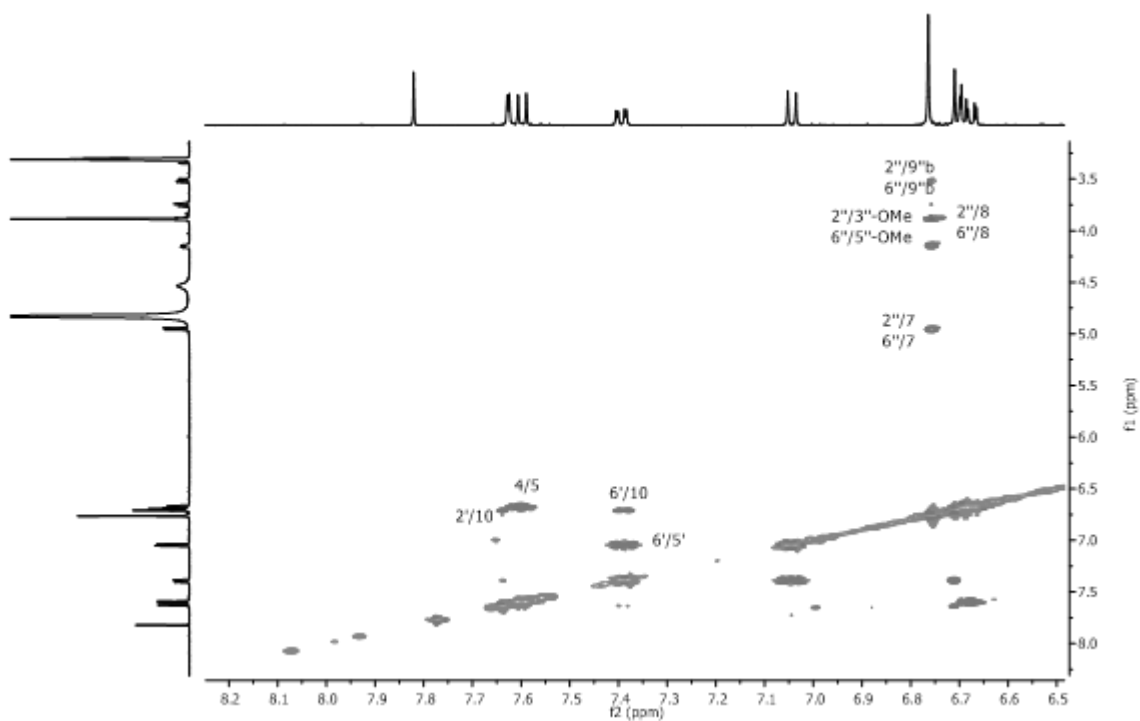
**Prilog 84  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kotinignana A (13) snimljen u smeši  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$ .**



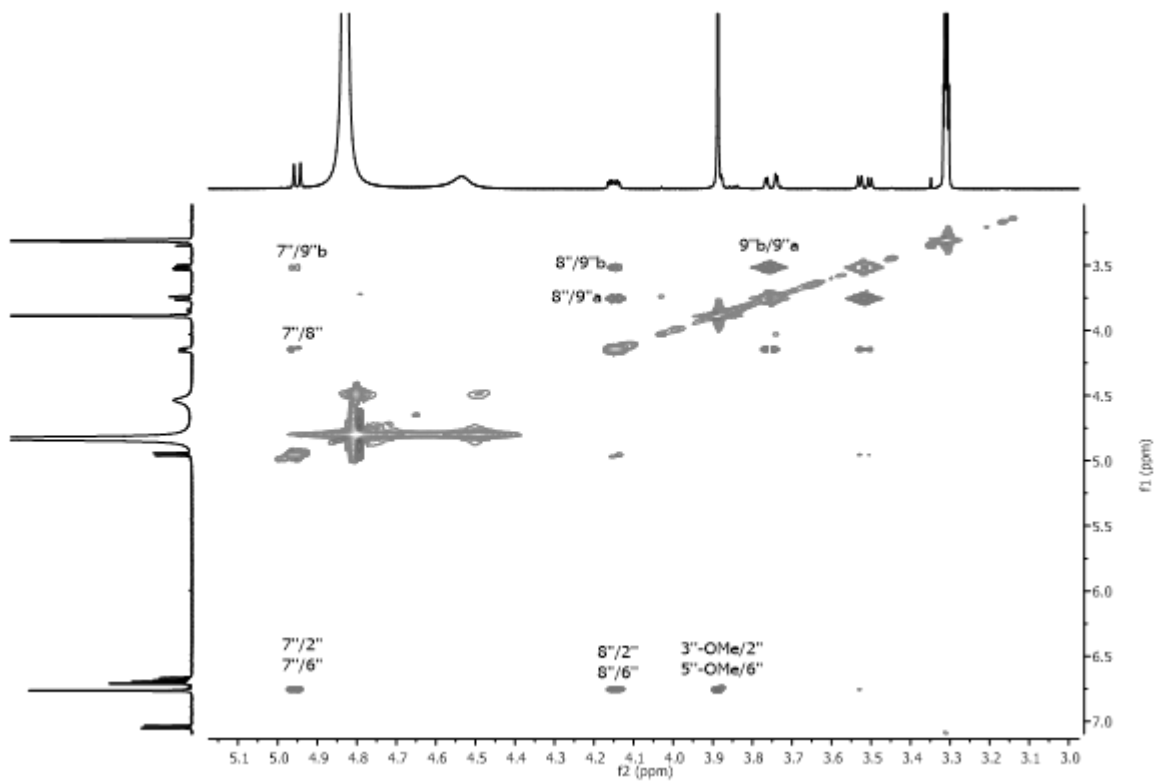
*Prilog 85 Prvi deo COSY spektra kotinignana A (13), snimljenog u CD<sub>3</sub>OD.*



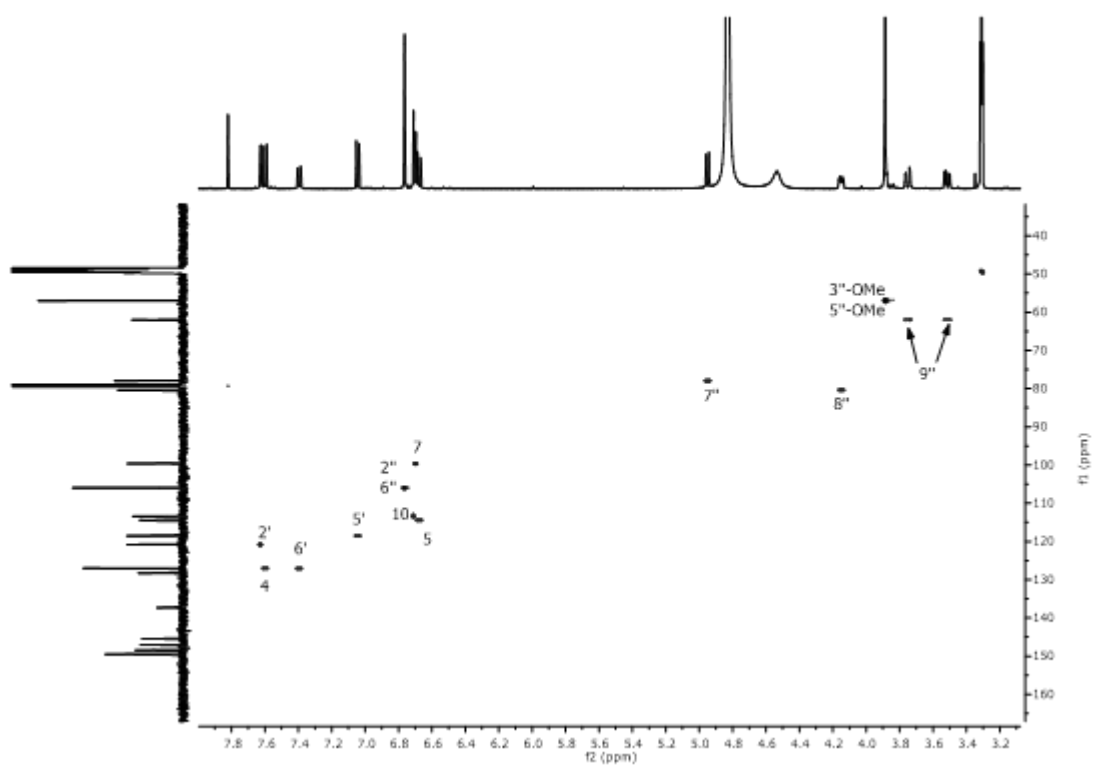
*Prilog 86 Drugi deo COSY spektra kotinignana A (13), snimljenog u CD<sub>3</sub>OD.*



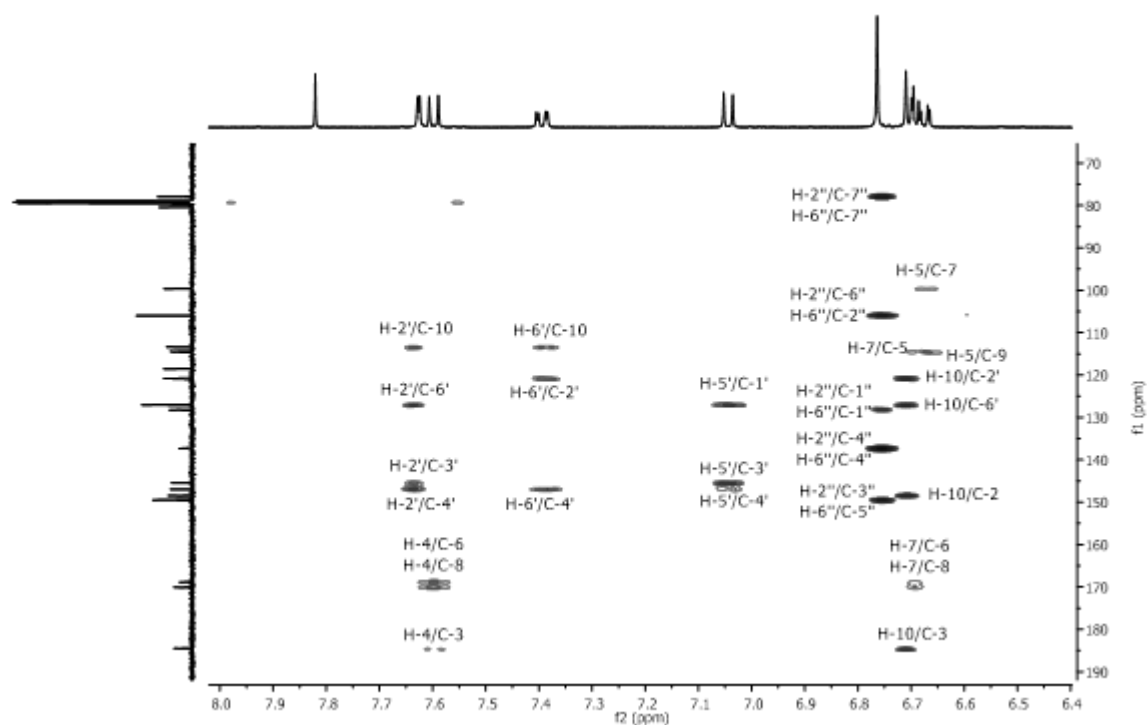
**Prilog 87 Prvi deo NOESY spektra kotinignana A (13), snimljenog u CD<sub>3</sub>OD.**



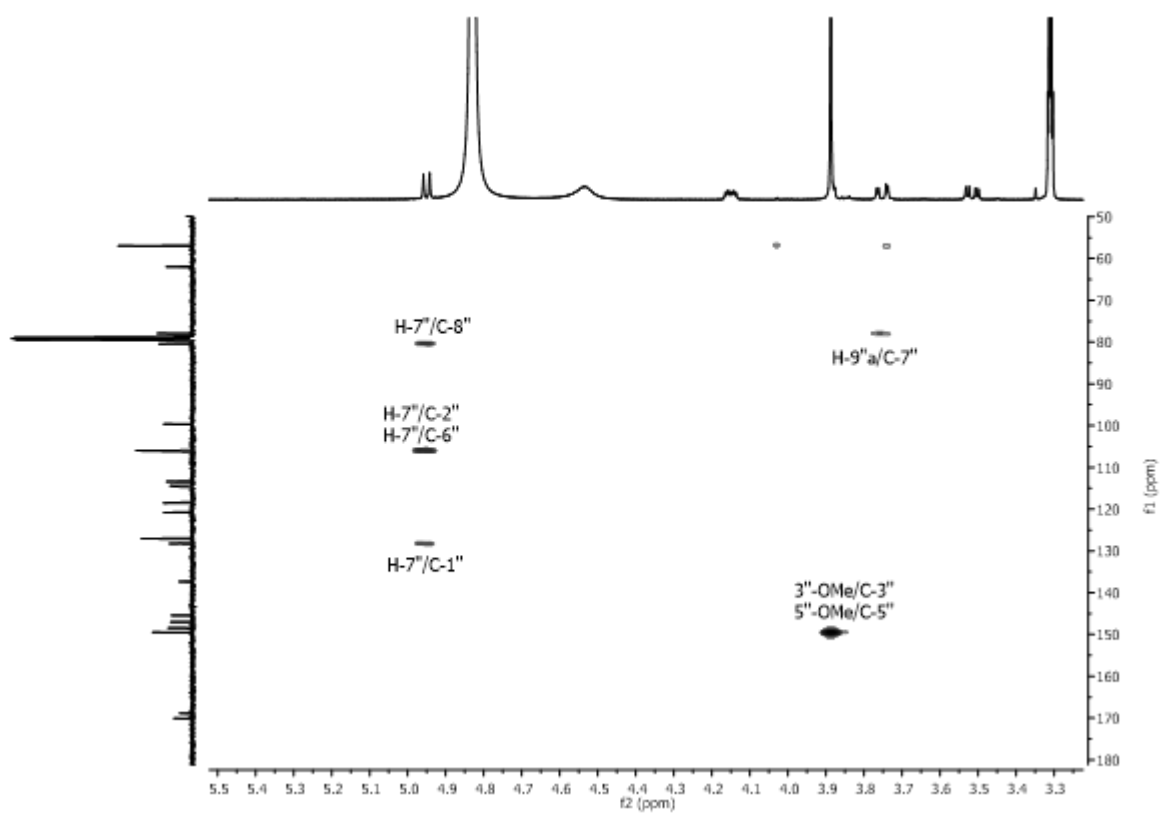
**Prilog 88 Drugi deo NOESY spektra kotinignana A (13), snimljenog u CD<sub>3</sub>OD.**



**Prilog 89 HSQC spektar kotinignana A (13) snimljen u smeši  $CD_3OD + CDCl_3$ .**



**Prilog 90 Prvi deo HMBC spektra kotinignana A (13), snimljenog u smeši  $CD_3OD + CDCl_3$ .**



**Prilog 91 Drugi deo HMBC spektra kotinignana A (13), snimljenog u smeši  $CD_3OD + CDCl_3$ .**

## 8 Biografija autora

Ivana Pašić je rođena 14. 12. 1997. godine u Subotici. Osnovnu i srednju školu završila je u Subotici. Osnovne akademske studije je upisala 2016. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biologija, podmodul Molekularna biologija, koje je završila u junu 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,39 i stekla zvanje diplomirani biolog. U oktobru iste godine upisala je master akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu Humana molekularna biologija, koje je završila jula 2021. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i odbranila master tezu pod nazivom: „Asocijacija varijante rs14123247 u genu za glukokortikoidni receptor i samoubistva“ na Katedri za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Olivera Stojkovića i prof. dr Gorana Brajuškovića. U oktobru 2021. godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu Molekularna biomedicina. Zaposlena je u Odeljenju eksperimentalne onkologije, u Laboratoriji za radiobiologiju i eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije od januara 2022. godine. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je 27. 1. 2022. godine.

## 9 Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: „Antitumorska aktivnost ekstrakata i izolovanih jedinjenja iz biljne vrste *Cotinus coggygria* Scop.“ koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

☒ 2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo - nekomercijalno bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo - bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu,

**Potpis autora**

---

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

## 10 Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ivana Pašić

Broj indeksa: M3007/2021

Studijski program: molekularna biologija

Naslov rada: „Antitumorska aktivnost ekstrakata i izolovanih jedinjenja iz biljne vrste *Cotinus coggygria* Scop.“

Mentori: dr Ivana Matić i dr Miloš Brkušanin

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

**Potpis autora**

---

## 11 Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Ivana Pašić

Broj indeksa: M3007/2021

**Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom:**

„Antitumorska aktivnost ekstrakata i izolovanih jedinjenja iz biljne vrste *Cotinus coggygria* Scop.“

- **rezultat sopstvenog istraživačkog rada;**
- **da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;**
- **da su rezultati korektno navedeni**
- **da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.**

**U Beogradu,**

**Potpis autora**

---