



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Сања Матић

**ЕФЕКАТ МЕТАНОЛСКОГ ЕКСТРАКТА БИЉКЕ *Cotinus coggygria* SCOP.
НА ФУНКЦИЈУ ГЕНЕТИЧКОГ МАТЕРИЈАЛА РАЗЛИЧИТИХ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ МОДЕЛ ОРГАНИЗАМА**

Докторска дисертација

Крагујевац

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I Аутор

Име и презиме: **Сања Матић**

Датум и место рођења: 09.07.1981. године, Крагујевац

Садашње запослење: Истраживач сарадник у Лабораторији за генетику и молекуларну физиологију

II Докторска дисертација

Наслов: Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* Scop. на функцију генетичког материјала различитих експерименталних модел организама

Број страница: 147

Број слика: 18, Број схема: 3, Број табела: 22.

Број библиографских јединица: 239

Установа и место где је издрађена: Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област (УКД): 575

Ментор: Проф. др Снежана Станић

III Оцена одбране

Датум пријаве теме: 04.05.2011. године

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 1051/6 од 06.07.2011. године

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 380/X-1 од 11.05.2011. године

Др **Снежана Станић**, доцент, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Генетика и еволуција

Др **Мирјана Михаиловић**, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија

Др **Славица Солујић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија

Комисија за оцену докторске дисертације: 670/ VII-1 од 11.09.2013. године

Др **Снежана Станић**, ванредни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Генетика и еволуција

Др **Мирјана Михаиловић**, научни саветник, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија

Др **Славица Солујић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија

Комисија за одбрану докторске дисертације: 670/ VII-1 од 11.09.2013. године

Др **Снежана Станић**, ванредни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Генетика и еволуција

Др **Мирјана Михаиловић**, научни саветник, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија

Др **Славица Солујић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија

Датум одбране дисертације:

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за Генетику и молекуларну физиологију на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Лабораторији за Молекуларну биологију на Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду и у Лабораторији за Биохемију на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, у оквиру реализације пројеката Министарства за науку и технолошки развој бр. 143008 и Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. 43004.

Дубоку захвалност дугујем свом ментору проф. др Снежани Станић, на пруженој прилици да учим и радим оно што волим, драгоценим, људским и стручним саветима и помоћи током студирања и рада. Захваљујем се проф. др Славици Солујић за сву подршку и интересовање за мој рад. Посебну захвалност дугујем др Мирјани Михаиловић на свесрдној помоћи, бројним идејама и сугестијама у планирању, извеђењу експерименталног дела и писању тезе, а изнад свега на искреном пријатељству. Захваљујем се колегама у Лабораторији за Биохемију на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу за свакодневну помоћ и велику подршку током рада. Велико хвала свим запосленима у научно-истраживачкој институцији "Синиша Станковић" са Одељења за молекуларну биологију на великом пријатељству током рада и на помоћи и колегијалности.

На крају, посебну захвалност дугујем мојој породици, мојим родитељима и Небојши, на љубави и подршци током докторских студија и израде докторске дисертације.

ИЗВОД

Бројна истраживања у генетичкој токсикологији указују да велики број агенса природног порекла показује генотоксични ефекат на различитим типовима ћелија и експерименталним модел организмима. Од велике је важности укључивање генотоксичног приступа у токсиколошку евалуацију биљних екстраката који и поред повољних својстава могу да садрже хемијске компоненте са мутагеним, тератогеним и/или канцерогеним активностима. Применом теста за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма *Drosophila melanogaster* на нивоу герминативних ћелија и Комет теста код *D. melanogaster* и пацова соја Wistar на нивоу соматских ћелија у *in vivo* условима утврђена је антигенотоксична активност метанолског екстракта биљне врсте *Cotinus coggygia* Scop. Антимикробна активност утврђена је применом стандардних метода, диск дифузионе и агар дилуционе. Процена антиоксидативне активности спроведена је на основу праћења *in vitro* способности неутрализације слободних радикала (DPPH·), редукционог потенцијала и хелационе активности метанолског екстракта. Применом спектрофотометријских метода одређен је садржај, а применом HPLC технике и идентификација фенолних компоненти. Осим наведеног, део истраживања је посвећен утврђивању механизма хепатопротективне активности метанолског екстракта на основу: процене биохемијских параметара у серуму пацова; релативне концентрације и експресије акутно фазних протеина у серуму и јетри пацова; *in vivo* инхибиције липидне пероксидације и активности антиоксидативних ензима; као и утицај метанолског екстракта на експресију транскрипционих фактора.

SUMMARY

Numerous studies in genetic toxicology indicate that a large number of natural agents showed genotoxic effects in different cell types and experimental model organisms. Plant extracts that appear to have favorable properties, may contain chemical compounds with mutagenic, teratogenic and/or carcinogenic activity, and it is of great importance to the inclusion of genotoxic approaches to toxicological evaluation of plant extracts. Applying a test for the detection of sex linked recessive lethal mutations in eukaryotic model organism *Drosophila melanogaster*, at the level of germ cells, and the Comet assay in *D. melanogaster* and Wistar rats, at the level of somatic cells, potential antigenotoxic activity of the methanol extract of plant *Cotinus coggygia* Scop. was determined. Antimicrobial activity was determined by standard disk diffusion and agar dilution methods. Evaluation of antioxidant activity was carried out by monitoring the *in vitro* ability to neutralize free radicals (DPPH•), the reduction potential and chelation activities of the methanol extract. Applying spectrophotometric methods and HPLC technique the content of phenolic compounds was determined. In addition, part of the survey examines the mechanisms of hepatoprotective activities of the methanol extract on the basis of: assessment of biochemical parameters in rats, relative concentration and expression of acute phase proteins in serum and liver of rats, *in vivo* inhibition of lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes, and the effect of methanol extract on the expression of transcription factors.

САДРЖАЈ

ИЗВОД

SUMMARY

1. УВОД	1
1.1. Род <i>Cotinus</i> (Anacardiaceae) и његов таксономски положај.....	2
1.1.1. Билошке карактеристике фамилије Anacardiaceae и врсте <i>Cotinus coggygia</i>	3
1.1.2. Фитохемијски састав и биолошка активност врсте <i>Cotinus coggygia</i>	4
1.2. Секундарни метаболити биљака - полифенолна једињења.....	7
1.3. Детекција и евалуација генотоксичног ефекта агенса природног порекла.....	12
1.3.1. Тест полно везаних рецесивно леталних мутација код <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3.2. Комет тест.....	16
1.3.3. Методе за утврђивање присуства и детекцију мутација.....	17
1.4. Антимикробни потенцијал.....	19
1.5. Антиоксиданти и антиоксидативни потенцијал.....	21
1.6. Хепатопротективни потенцијал.....	24
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	26
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	28
3.1. Материјал коришћен у истраживањима.....	29
3.1.1. Биљни материјал.....	29
3.1.2. Хемикалије и реагенси.....	29
3.1.3. Експериментални модел организми.....	29
3.2. Методе коришћене у истраживањима.....	30
3.2.1. Поступак термичког третмана биљног материјала и екстракције са метанолом по Soxhlet-у.....	30
3.2.2. Испитивање хемијског састава метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	30
3.2.2.1. Спектрофотометријска метода са Folin-Ciocalteu реагенсом за одређивање укупне количине фенола у екстракту биљке <i>Cotinus coggygia</i>	30

3.2.2.2. Спектрофотометријска метода са алуминијум-хлоридом за одређивање укупне количине флавоноида у екстракту биљке <i>Cotinus coggygia</i>	31
3.2.2.3. Спектрофотометријска метода за одређивање укупне количине танина у екстракту биљке <i>Cotinus coggygia</i>	31
3.2.2.4. HPLC метода за утврђивање квалитативног и квантитативног састава метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	32
3.2.3. Ефекат метанолског екстракта на функцију генетичког материјала код различитих модел организама.....	33
3.2.3.1. Тест за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма <i>Drosophila melanogaster</i> у <i>in vivo</i> условима	33
3.2.3.2. Алкална верзија Комет теста код <i>Drosophila melanogaster</i> у <i>in vivo</i> условима.....	36
3.2.3.3. Алкална верзија Комет теста код албино пацова соја Wistar у <i>in vivo</i> условима.....	39
3.2.4. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> применом стандардних микробиолошких метода	42
3.2.4.1. <i>In vitro</i> одређивање антимикробне активности екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> дифузионом методом	43
3.2.4.2. <i>In vitro</i> одређивање антимикробне активности екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> дилуционом методом	43
3.2.5. Одређивање антиоксидативне активности метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	44
3.2.5.1. Одређивање "скевинцер" активности на DPPH` радикале метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> у <i>in vitro</i> условима.....	44
3.2.5.2. Одређивање Fe ²⁺ хелационе активности метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> у <i>in vitro</i> условима	45
3.2.5.3. Одређивање редуктивне активности метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> у <i>in vitro</i> условима	45
3.2.6. Одређивања биохемијских параметара у серуму пацова у <i>in vivo</i> условима.....	46
3.2.6.1. Одређивање концентрације аспартат-аминотрасферазе	46
3.2.6.2. Одређивање концентрације аланин-аминотрансферазе.....	47

3.2.6.2. Одређивање концентрације алкалне фосфатазе	48
3.2.6.3. Одређивање концентрације укупног билирубина	49
3.2.6.4. Одређивање концентрације гвожђа у серуму пацова соја Wistar	50
3.2.7. Квантитативна анализа акутно фазних протеина Нр и α_2 М	51
3.2.7.1. Релативна концентрација акутно фазних протеина Нр и α_2 М у серуму пацова соја Wistar	51
3.2.8. Одређивање концентрације липидних пероксида применом TBARS есеја у јетри и серума пацова у <i>in vivo</i> условима	52
3.2.9. Одређивање активности антиоксидативних ензима у јетри пацова у <i>in vivo</i> условима.....	53
3.2.10. Квантитативна анализа експресије протеина	55
3.2.10.1. Електрофоретско раздвајање протеина	55
3.2.10.2. Бојење протеина на полиакриламидном гелу.....	56
3.2.10.3. Пренос протеина на PVDF мембране.....	56
3.2.10.4. Western имуно-блот анализа за различита антитела	57
3.2.11. Статистичка обрада података	57
4. РЕЗУЛТАТИ	58
4.1. Хемијски састав метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	59
4.1.1. Спектофотометријско одређивање полифенолних једињења у екстракту биљке <i>Cotinus coggygia</i>	59
4.1.2. HPLC анализа метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	59
4.2. Ефекат метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> на функцију генетичког материјала код различитих модел организама.....	61
4.2.1. Тест за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма <i>Drosophila melanogaster</i> у <i>in vivo</i> условима.....	62
4.2.2. Алкална верзија Комет теста код <i>Drosophila melanogaster</i> у <i>in</i> <i>vivo</i> условима	66
4.2.3. Алкална верзија Комет теста код албино пацова соја Wistar у <i>in</i> <i>vivo</i> условима	68
4.3. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	77
4.3.1. Антимикробна активност екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> применом дифузионе методе.....	77

4.3.2. Антимикробна активност екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> применом дилуционе методе.....	79
4.4. Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	80
4.4.1. Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> применом DPPH методе <i>in vitro</i>	80
4.4.2. <i>In vitro</i> хелациона активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	81
4.4.3. <i>In vitro</i> редуктивна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	82
4.5. Механизми хепатопротективне активности метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	83
4.5.1. Биохемијски параметри у серуму пацова <i>in vivo</i>	83
4.5.2. Релативна концентрација и експресија акутно фазних протеина у серуму и јетри пацова.....	86
4.5.3. Концентрација липидних пероксида у серуму и јетри пацова у <i>in vivo</i> условима	90
4.5.4. Активност антиоксидативних ензима у јетри пацова у <i>in vivo</i> условима	91
4.5.5. Квантитативна анализа експресије транскрипционих фактора NF-κB и Akt.....	93
5. ДИСКУСИЈА	97
5.1. Хемијски састав метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	98
5.2. Ефекат метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i> на функцију генетичког материјала код различитих модел организама	100
5.3. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	105
5.4. Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	107
5.5. Механизми хепатопротективне активности метанолског екстракта биљке <i>Cotinus coggygia</i>	109
6. ЗАКЉУЧЦИ	116
7. ЛИТЕРАТУРА	122
8. ПРИЛОЗИ	141

- Табела 1.** Тестови за детекцију генотоксичности агенаса природног и вештачког порекла
- Табела 2.** Садржај укупних фенола, флавоноида и танина у метанолском екстракту биљке *Cotinus coggygria*
- Табела 3.** Квалитативни и квантитативни састав метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria*
- Табела 4.** Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygria*
- Табела 5.** Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са етил метаносулфонатом и метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygria*
- Табела 6.** Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са мирицетином
- Табела 7.** Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са кверцетином
- Табела 8.** Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са рузмаринском киселином
- Табела 9.** Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом квалитативних параметара
- Табела 10.** Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом квантитативних параметара
- Табела 11.** Генотоксичност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом Комент есеја на пацовима соја Wistar
- Табела 12.** Репни моменат 24 и 72 сата након третмана албино пацова соја Wistar са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygria*
- Табела 13.** Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* у јетри пацова соја Wistar 24 и 72 сата након третмана
- Табела 14.** Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* у коштаном сржи пацова соја Wistar 24 и 72 сата након третмана
- Табела 15.** Антигенотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* и мирицетина 2 или 12 сати након третмана са пирогалолом применом алкалне верзије Комент теста у *in vivo* условима
- Табела 16.** Ефекат пирогалола и претретмана са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygria* на степен ДНК оштећења у јетри пацова соја Wistar

- Табела 17.** Антимикробна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria*
- Табела 18.** Минималне инхибиторне концентрације (MIC, $\mu\text{g/ml}$) метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* у *in vitro* условима
- Табела 19.** Укупно и феро гвожђе у серуму пацова третираних екстрактом биљке *Cotinus coggygria* и пирогалолом
- Табела 20.** AST, ALT, ALP и укупни билирубин у серуму пацова третираних екстрактом биљке *Cotinus coggygria* и мирицетином
- Табела 21.** Ефекат екстракта биљке *Cotinus coggygria* на TBARS у серуму и јетри пацова соја Wistar
- Табела 22.** Ефекат екстракта биљке *Cotinus coggygria* на активност антиоксидативних ензима у јетри пацова соја Wistar

Схема 1. Биосинтеза шикимске киселине

Схема 2. Примери инаktivације слободних радикала

Схема 3. Алкилација ДНК секвенце ЕМС-ом, формирање O^6 -етилгуанина и O^4 -етилтимина

- Слика 1.** *Cotinus coggygia* Scop.
- Слика 2.** Хемијска структура хидроксициметних киселина
- Слика 3.** Хемијска структура хидроксибензоевих киселина
- Слика 4.** Основна структура флавоноида
- Слика 5.** Фенотипске разлике у боји очију код мужјака "дивљег типа" (А) и *Vasc* мужјака (Б), разликовање женке од мужјака (постојање полног чешља на предњим екстремитетима мужјака (В и Г))
- Слика 6.** Развојни циклус врсте *Drosophila melanogaster*
- Слика 7.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са етидијум бромидом. Класа 0 – неоштећена ДНК; класа 1, 2 и 3 - мање, средње и дуге ДНК миграције и класа 4 - максимално оштећење ДНК
- Слика 8.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са SYBR GREEN I. Класа 0 – неоштећена ДНК; класа 1, 2 и 3 - мање, средње и дуге ДНК миграције и класа 4 - максимално оштећење ДНК
- Слика 9.** HPLC-хроматограм метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*
- Слика 10.** Процент редукције (%P) ДНК оштећења након третмана са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia* и мирицетином 2 и 12 сати пре третмана са пирогалолом
- Слика 11.** Детекција ДНК оштећења у јетри пацова применом репног момента након претретмана са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia* и мирицетином 2 и 12 сати пре третмана са пирогалолом
- Слика 12.** Утицај метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* на трансформацију DPPH[•] радикала
- Слика 13.** Хелациона активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*
- Слика 14.** Редуктивна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*
- Слика 15.** Релативна концентрација хаптоглобина (Hp) и α_2 -макроглобулина (α_2M) у серуму пацова третраних са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*
- Слика 16.** Експресија хаптоглобина и α_2 -макроглобулина у јетри пацова третраних са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*
- Слика 17.** Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* пре апликације пирогалола на релативни ниво протеина NF- κ B (p65) (А) и Akt (Б).
- Слика 18.** Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* и мирицетина пре апликације пирогалола на релативни ниво протеина Akt

1. УВОД

Поред неоспорног значаја за фармацеутску индустрију, природни производи биљака налазе широку примену у производњи дијетских суплемената и функционалне хране. Осим задовољавајућих нутритивних својстава производи биљног порекла испољавају и одређене фармаколошке и физиолошке ефекте на људско здравље, што је од великог значаја у превенцији настанка болести савременог човека. Због тога су испитивања биолошких активности и хемијска карактеризација до сад неиспитаних биљних врста од изузетног научног и практичног интереса, јер воде ка новим изворима биолошки активних природних производа.

Поред широко распрострањене традиционалне примене као медикамената или додатака исхрани, већина врста фамилије Anacardiaceae није детаљно окарактерисана и у литератури постоји врло мало података о биолошкој активности и хемијском саставу како екстраката, тако и етарских уља.

1.1. Род *Cotinus* (Anacardiaceae) и његов таксономски положај

Anacardiaceae је фамилија дрвенастих дикотиледоних скривеносеменица која обухвата око 800 врста у 82 рода. У фамилији се филогенетски разликују две групе родова, организованих у потфамилије Anacardioideae и Spondoideae.

Припадници фамилије Anacardiaceae су распрострањене широм света, углавном на равничарским стаништима, пре свега у тропима и субтропима али и у умереној зони. Могу се наћи на западној хемисфери, у Африци, јужној Европи, умереној и тропској Азији, тропској и суптропској Аустралији и на већини Пацифичких острва. Anacardiaceae су одсутне из северне Европе и умерене и сушне Аустралије, са Новог Зеланда, Галапагоских острва, са пустиња и станишта на великим висинама.

Cotinus је мали род листопадних дрвенастих биљака у оквиру фамилије Anacardiaceae са две врсте: евроазијска, *Cotinus coggygria* Scop. (синоним *Rhus cotinus* L.) и северноамеричка, *Cotinus obovatus* Raf. Флора Србије дефинише два варијетета врсте *Cotinus coggygria*: вар. *laevis* и вар. *arenaria* (1). До 1965. године ова врста је класификована унутар сродног рода *Rhus*, када је Barkley (2) поделио *Rhus sensu lato* у девет родова од којих је један и род *Cotinus*.

Биљке рода *Cotinus* су животне форме дрвета или жбуна, висине до 7 m (евроазијски руј), или 12 m (амерички руј). Листови су цели, округлог облика, са равним ободом, дужине од 3 до 13 cm. Цветови су ситни, величине до 3 mm, петочлани, жућкасте боје, сакупљени у вршне метличасте цвасти величине до 30 cm. Биљке су једнодоме, понекад дводоме. Плод је сува, ситна коштуница која садржи једно семе, а на којој се задржавају чашични листићи (3). У

Србији локални назив за биљку *C. coggygia* је "руј" или "рујевина" јер лишће у јесен добија ружичасту или тамноцрвено-љубичасту, рујну боју услед оксидације танина (Слика 1). Распрострањена је у јужној Европи, централној Кини и на Хималајима, где расте на сувим стеновитим обронцима и у саставу листопадних шума, најчешће на ободу, понекад доминира и у спрату жбуња обично на кречњаку.



Слика 1. *Cotinus coggygia* Scop.

(<http://www.sciencephoto.com/media/95341/view>, април 2011)

1.1.1. Билошке карактеристике фамилије Anacardiaceae и врсте *Cotinus coggygia*

Биљке из фамилије Anacardiaceae имају дугу историју употребе у исхрани: манго (*Mangifera indica* L.), pistaћи (*Pistacia vera* L.), индијски орах (*Anacardium occidentale* L.) и рози бибер (*Schinus terebinthifolia* L.), врсте које се примењују широм света, и врсте као што су *Spondias* L., *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. и *Tapirira* Aubl., са ограниченом, локализованом култивацијом и потрошњом.

У традиционалној медицини, због својих фармаколошких ефеката, припадници ове фамилије се користе за лечење различитих обољења. *Rhus glabra* се традиционално користи у лечењу бактеријских обољења као што су сифилис, гонореја, дизентерија и гангрена. *R. coriaria* се обично користи као зачин али и као лековита биљка посебно за зарастање рана (4). Врсте рода *Toxicodendron* се користе у лечењу херпеса и акутног реуматизма (5); рода *Anacardium*, кора за зубобољу и дизентерију, а лишће за дијареју; *Antrocarion*, воће за

стомачне тегобе, а кора за болести јетре; *Buchanania Spreng.* за грозницу, кожна обољења, ујед змија и инсеката, полних болести; корен врста рода *Heeria* Meissn. се користи за дигестивне тегобе; корен врста из рода *Lannea* се користи код венеричних болести, кора за стомачне тегобе, а лишће за зарастање рана и као лаксатив; корен врста из рода *Ozoroa* се користи код мигрене, дизентерије, бола у стомаку и леђима, маларије, а лишће код кожних обољења; лишће врста из рода *Sorindeia* се користи као лаксатив и диуретик; воће врста рода *Spondias* се користи као диуретик, кора за кашаљ и лечење рана док се лишће користи за стомачне тегобе, род *Trichoscipha*, кора се користи за велике богиње, констипацију код одојчади и код крварење у трудноћи (6).

У народној медицини биљка *C. coggyria* Scop. се користи као антисептик, за зарастање рана, против упала и против крварења (7). Ова биљка се често користи за лечење разних болести, као што су дијареја и парадонтоза (8). Показано је да сируп ове биљке штити јетру од хемијских оштећења (9). Руј се употребљава као адстригенс (за лечење запаљења коже и слузокоже), против грознице (10), као коагулант, за повишену температуру и као третман код болести ока (11). Северноамерички Индијанци су употребљавали плодове руја у свежем стању или су га користили уместо сирћета и за припремање напитка сличног лимунади. У кожарској индустрији користи се за штављење и бојење коже и вуне. Захваљујући црвеним листовима служи и као декоративна врста (12).

1.1.2. Фитохемијски састав и биолошка активност врсте *Cotinus coggyria*

Врсте фамилије Anacardiaceae биле су предмет бројних истраживања, било да се ради о фитохемијским испитивањима, биолошким, биохемијским, физиолошким и еколошким студијама.

Резултат фитохемијских испитивања биљке *C. coggyria* је изолација и структурна идентификација неколико фенолних једињења, углавном аурона, халкона, дихидрофлавона и дихидрофлавонола. Међу њима, најзаступљенији су сулфуретин, сулфуреин, биаурон дисулфуретин 2,2'-[1,2-бис(3,4-дихидроксифенил)-1,2-етандилиден]-бис[6-хидрокси-3(2H)-бензофуранон], 7,3',4'-трихидрокси-дихидрофлавон, 5,7,4'-трихидрокси-дихидрофлавон, 4,2',4'-трихидроксиалкон, 3,7,3',4'-тетрахидрокси-дихидрофлавон, 3,5,7,3',4'-пентахидрокси-дихидрофлавон, фисетин, гална киселина и њени деривати, метил галате и пентагалол глюкоза (13, 14).

Испитивањем хемијског састава метанолског екстракта добијеног из стабла ове биљне врсте утврђено је присуство: 3',4',6'-трихидроксиаурона (сулфуретин), 3',4',7-

трихидроксифлавонола (фисетин), 3',4',7-трифидроксифлаванола (фустин), 3',4',5,7-тетрахидроксифлавонола (кверцетин), 3',4',5,7-тетрахидроксифлаванола (таксифолин), 4',7-дихидроксифлаванола, 3',4',7-трихидроксифлаванона (бутин), 4',7-дихидроксифлаванона (ликвиритигенин), транс-2',3,4,4'-тетрахидроксиалкона (бутеин), 4',5,7-трихидроксифлаванона, транс-2',4,4'-трихидроксиалкона (15), катехина, ериодиктиола и кверцетина (16).

Simić и сарадници (17) су испитивали хемијски састав воденог, етил-ацетатног и хлороформског екстракта биљке *C. coggygia* и указали на највиши садржај тоталних фенола (92.9%), танина (83.4%) и флавоноида (3.5%) у етил-ацетатној фракцији. Применом HPLC (енг. *high-pressure liquid chromatography*) методе у овом екстракту је утврђено присуство галне киселине, апигенина и литеолина.

За разлику од екстракта, знатно више података постоји о саставу есенцијалних уља ове врсте са различитих локалитета. Испитивањем састава етеричних уља добијених из цветова, лишћа и стабљика биљке *C. coggygia* са југа Србије (локалитет Рујиште, на северу Косова) утврђено је присуство компоненти из групе монотерпена и сесквитерпена са доминацијом монотерпена лимонен и α -пинен (18). Есенцијална уља добијена из грана и лишћа биљке *C. coggygia* са два локалитета, Делиблатска пешчара и Земун, показала су сличан хемијски састав са доминацијом лимонена, (Z)- β -оцимена, α -пинена, (E)- β -оцимена и терпинолена (19). У есенцијалном уљу из Турске утврђено је присуство лимонена, (Z)- β -оцимена и (E)- β -оцимена (7). У есенцијалном уљу из Бугарске идентификовани су α -пинен, лимонен и β -пинен (20). У етеричном уљу из Мађарске утврђено је присуство лимонена, α -пинена, β -пинена, Δ^3 -карена и α -терпинолена (21). У уљу из Грчке главне компоненте су биле различите у различитим узорцима: у једном узорку главне компоненте су лимонен, α -пинен и терпинолен; у другом мирцен, сабинен и α -пинен; а у трећем сабинен, мирцен, лимонен и терпин-4-ол (22).

Биолошка испитивања врсте *C. coggygia* показала су да екстракти, есенцијална уља и изоловане компоненте поседују биолошке активности, што потврђује и широку примену саме врсте у традиционалној медицини.

Многе активности врсте *C. coggygia* су и експериментално потврђене. Посебан значај придаје се истраживањима антиоксидативне активности екстраката врсте *C. coggygia* (8, 13, 17, 23) као и инхибиција ацетил-холинестерасе екстрактом добијеним из стабла ове биљне врсте (24).

Испитиван је и анти-инфламаторни ефекат екстраката добијених из младих изданака врсте *C. coggygia* на едем шапа пацова изазван карагенином (17).

Доказан је цитотоксичан ефекат екстракта цвета и лишћа према LS174 ћелијама хуманог канцера црева и према ћелијама хуманог карцинома грлића материце HeLa (23).

Екстракти листова и цветова врсте *C. coggygia* показали су антимикуробну активност на велики број бактеријских сојева, како на Грам позитивне тако и на Грам негативне бактерије (25). Есенцијална уља ове биљне врсте показала су значајну антибактеријску и антифугалну активност према Грам позитивним бактеријама у односу на стандард (19).

1.2. Секундарни метаболити биљака - полифенолна једињења

Захваљујући научним сазнањима данас је познато да је медицински значај лековитих биљака у уској вези са садржајем секундарних биомолекула, од којих неки испољавају изразито снажне фармаколошке ефекте. Секундарни биомолекули биљака, гледано са еколошке стране, настали су еволуцијом као компоненте хемијске одбране биљака од других биљних врста, инсеката и животиња (26).

Велики број ароматског и зачинског биља садржи фенолна једињења. У ширем смислу називају се полифенолима, а укључују спојеве различите хемијске структуре од једноставних хидроксициметних киселина, антоцијанина, до сложенијих флавоноида и танина. Заштитна улога фенолних једињења у биолошким системима приписује се њиховој способности спаривања ("хватања") електрона слободних радикала (27, 28), хелатног везивања јона прелазних метала (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Mg^{2+}), активирања антиоксидативних ензима и инхибирања оксидаза. Зато се фенолним једињењима приписују и многа терапијска деловања, као што су антибактеријско, противупално, антиалергијско, антимутагено, антивирално и антиканцерогено (29).

Фенолна једињења представљају широко распрострањену групу биљних метаболита која могу бити врло једноставне структуре, као што су фенолне киселине, или врло сложене структуре, као што су проантоцијанидоли. Заједничка карактеристика фенолних једињења је да садрже ароматичан прстен са једном или више хидроксилних група (30).

Природна фенолна једињења настају током два биосинтетичка пута:

- 3 путем биосинтезе ароматичних аминокиселина преко шикимске киселине као интермедијера и
- 3 путем биосинтезе бензеновог прстена из ацетата (ацетогенински пут).

Метаболички пут шикимске киселине представља главни хемизам биосинтезе фенолних једињења у биљкама. Путем биосинтезе шикимске киселине настају деривати бензоеве киселине (гална и протокатехинска киселина), а из ароматичних аминокиселина настају деривати циметне киселине (Схема 1). Циметна киселина се даље трансформише до осталих $\text{C}_6\text{-C}_3$ фенилпропаноида, кумаринске, кафене, ферулне и синапинске киселине и њихових деривата (31).

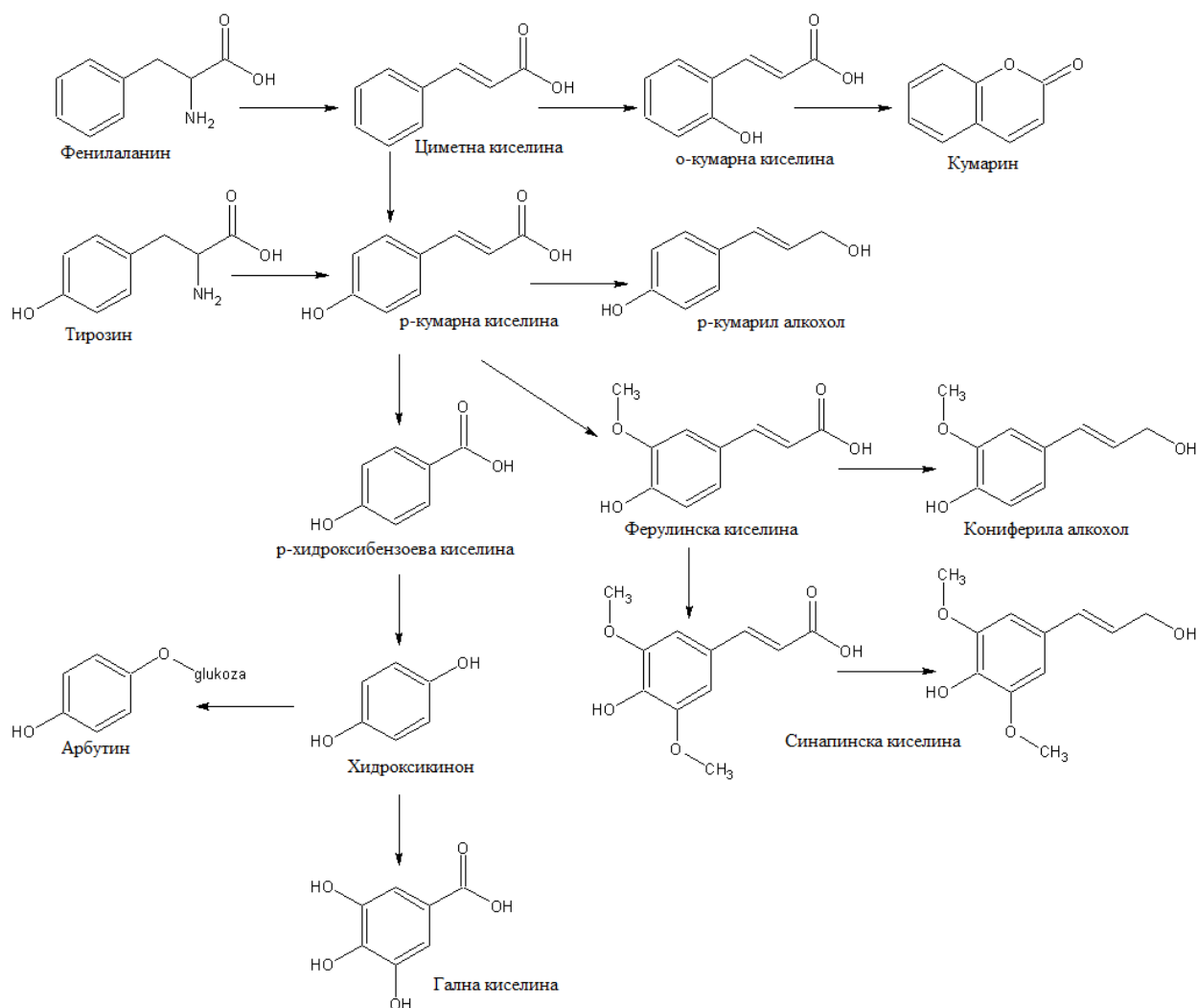


Схема 1. Биосинтеза шикимске киселине

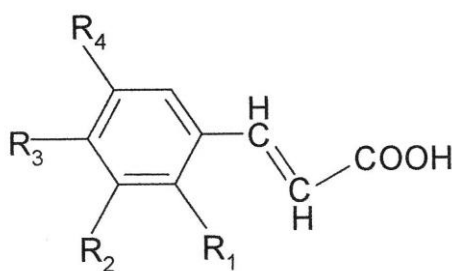
Осим метаболичког пута шикимске киселине, фенолна једињења у биљкама могу настати и ацетогенинским путем. Овим биосинтетским путем ароматични прстен настаје кондензацијом сирћетне киселине у линеарни низ састављен од наизменичних кетонских и метиленских група које даље подлежу циклизацији по механизму алдолне или Claisen-ове кондензације. Прстен А флавоноида потиче од полиацетилног низа, а прстен Б из угљених хидрата преко шикимске киселине.

Фенолне киселине и флавоноиди су од свих полифенола најчешће предмет научних истраживања. Фенолне киселине се састоје од фенолног језгра и бочног низа који садржи један (деривати бензоеве киселине) или три (деривати циметне киселине) угљеникова атома.

Фенолне киселине заступљене у биљном свету деле се на:

☞ хидроксициметне киселине (C₆-C₃), (Слика 2):

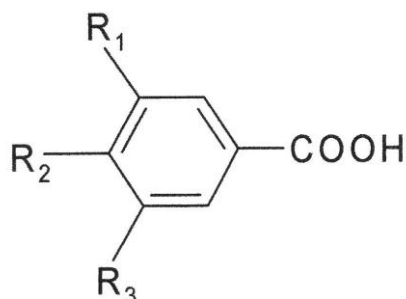
☞ Ферулинска киселина	R ₁ =R ₂ =H R ₃ =OH R ₄ =OCH ₃
☞ <i>p</i> - кумаринска киселина	R ₁ =R ₂ =R ₄ =H R ₃ =OH
☞ Кафеинска киселина	R ₁ =R ₂ =H R ₃ =R ₄ =OH
☞ Синапинска киселина	R ₁ =H R ₃ =OH R ₂ =R ₄ =OCH ₃



Слика 2. Хемијска структура хидроксициметних киселина

3 и хидроксибензоеве киселине (C_6-C_1), (Слика 3):

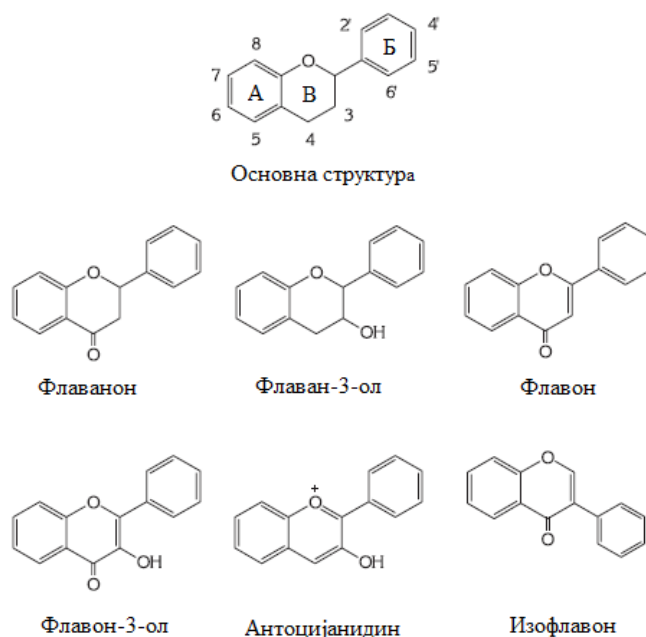
3 Гална киселина	$R_1=R_2=R_3=OH$
3 Протокатехинска киселина	$R_1=H$ $R_2=R_3=OH$
3 Ванилинска киселина	$R_1=H$ $R_2=OH$ $R_3=OCH_3$
3 Сирингинска киселина	$R_2=OH$ $R_1=R_3=OCH_3$



Слика 3. Хемијска структура хидроксибензоевих киселина

Разлика у структури између појединих хидроксициметних и хидроксибензоевих киселина последица су ступња хидроксилације и метилације ароматског прстена (32).

Флавоноиди су веома распрострањена органска једињења биљног порекла. Хемијски флавоноиди су полифенолна једињења мале молекулске масе. У групу флавоноида у ужем смислу убрајају се флавони, изофлавоноли, флаванони, флаванолни, флаванолни, а у ширем смислу и нека биогенетски сродна полифенолна једињења, као што су антоцијанидини, катехини, леукоантоцијанидини, халкони, дихидрохалкони и аурони (33). Присуство хидроксилних група флавоноиде чини ефикаснијим у терапији. Најзаступљенији су флавоноиди са два бензенова прстена (А и Б) повезана пиринским прстеном (В) који садржи кисеоник (Слика 4).



Слика 4. Основна структура флавоноида

Флавоноиди показују широк спектар биолошке активности и често се користе у фитотерапији. Неки флавоноиди делују као коронарни вазодилататори, други се користе као анти-инфламаторни агенси, диуретици и хепатопротективи (34, 35), док неки показују позитиван ефекат на кардиоваскуларна обољења (36, 37) и канцерогене и мутагене промене (38, 39).

Танини су сложена природна полифенолна једињења, за које је заједничко да стварају комплексе са протеинима, мукополисахаридима, нуклеинским киселинама и алкалоидима (40). У везивању учествују фенолне, односно кетофункционалне групе танина, хидроксилне и пептидне групе протеина.

Према хемијској структури, као и према реакцији са солима гвожђа, танини се могу поделити на:

- ☞ хидролизуюће танине (галотанини и пирогални танини) и
- ☞ катехинске (кондензоване) танине.

Досадашње студије су указале на антивирусну и цитотоксичну активност танина (41, 42). Потврђена је и корелација између структуре танина и цитотоксичне активности у *in vitro* условима на ћелијама карцинома утеруса и карцинома назофаринкса (43). Претпоставља се да је механизам дејства танина на вирус Herpes Simplex тип 1 заснован на реакцији танина са протеинима вируса при чему процес интеракције зависи од рН вредности средине и природе протеина (43, 44).

1.3. Детекција и евалуација генотоксичних ефеката агенса природног порекла

За велики број биљних врста, које су одличан извор биолошки активних једињења, углавном није познат утицај на људско здравље или генетички материјал. Употреба биљног екстракта у лечењу различитих болести је врло честа у народној медицини. Биљни екстракти, који очигледно имају повољна својства, могу да садрже хемијске компоненте са мутагеним, тератогеним и/или канцерогеним активностима. Присутне генотоксичне компоненте могу да интерагују са ДНК молекулом водећи до генетских оштећења. Од изузетне је важности укључивање генотоксичног приступа у токсиколошку евалуацију њиховог потенцијалног мутагеног или генотоксичног ефекта.

Основни циљ бројних метода које се користе у генетичкој токсикологији је откривање агенаса који изазивају генетичке промене у герминативним и/или соматским ћелијама, као и процењивање, на основу експерименталних података, степена опасности излагања тим агенсима.

Један од основних квалитета који мора да испуњава тест у генетичкој токсикологији јесте примењивост добијених резултата на човека. Резултати треба да дају прецизну информацију о степену ризика за човека у одређеним околностима. Тестови морају испољити осетљивост, могућност детекције генотоксичног ефекта за сваки агенс који га потенцијално може поседовати, без обзира на интензитет његове активности или степен присутности. Од великог је значаја и поновљивост теста која се постиже униформношћу тест-организама и стандардизацијом експерименталних процедура. Пожељно је да тест буде погодан за испитивање што већег броја агенаса као и да постоји могућност статистичке обраде резултата.

При одабиру метода за утврђивање генотоксичног ефекта неког агенса користе се две главне стратегије:

- 3 хијерархијски (фазни) приступ и
- 3 матриксни приступ (батерија тестова).

Хијерархијски приступ испитивању генотоксичности састоји се у коришћењу система тестирања у три нивоа (корака). Супстанце чији генотоксични ефекат треба утврдити морају проћи први ниво тестирања. Тестови који се на том нивоу примењују морају бити брзи (краткотрајни), поуздани и са релативно ниском ценом коштања. Ова фаза тестирања у хијерархијском приступу представља тзв. енг. "screening" фазу. Други ниво тестирања обезбеђује детекцију евентуалног генотоксичног ефекта код вишећелијских еукариота. У ту

сврху примењују се тестови са *Drosophila melanogaster* и културама сисарских ћелија, који омогућавају детекцију генских и хромозомских мутација. Трећа фаза тестирања има задатак да квантификује стварни мутациони ризик за човека. Стога је важно да су тест-организми који се користе биолошки, а пре свега физиолошки и биохемијски, што сличнији човеку. У овој фази, тестирање се искључиво врши у *in vivo* условима на сисарском модел организму.

Други стратегијски приступ тестирању агенаса на генотоксичност је коришћење батерије тестова (матриксни приступ). Батерија тестова која се у ту сврху користи састоји се од неколико тестова са различитим нивоом детекције. Ради утврђивања генотоксичног ефекта, испитивани агенс пролази кроз све тестове који се групишу у конкретну батерију. Процена генотоксичног потенцијала испитиваног агенса и евалуација ризика за човека врши се на основу резултата добијених применом свих одабраних експерименталних процедура. Принцип формирања батерије тестова је врло деликатан. С обзиром да је потребно добити што поузданије податке, за што краће време и уз што нижу цену тестирања, неопходно је одабрати најбољу комбинацију тестова која задовољава постављене услове. Преовлађује став да је најцелисходније формирати такву батерију тестова која ће омогућити мерење способности супстанце да изазове генотоксични ефекат и дати резултате за процену ризика. Матриксни приступ је погодан за екстензивно тестирање за што краће време, али је цена тестирања по испитиваном узорку већа. Овај приступ је посебно погодан при развоју нових супстанци јер, за релативно кратко време, пружа довољну количину података потребних за доношење поузданих закључака.

Релативна вредност тестова зависи од многих фактора који проистичу из биологије тест-организма, односно тест-система. Вредност теста је утолико већа уколико тест-систем више имитира услове људског организма, тј. његовог метаболизма. Стога је већа "тежина" тестова који се изводе у *in vivo*, од тестова који се изводе у *in vitro* условима. Тестови на еукариотским модел организмима имају предност у односу на тестове са прокариотским организмима, као што и сисарски системи имају предност у односу на несисарске.

Од велике важности за предвиђање генотоксичног ефекта испитиваног агенса је тип ћелија. Поједини агенси показују генотоксичан ефекат код једне врсте организама или у одређеном типу ћелија, док такав ефекат не испољавају код других организама или ћелија. Тестови који детектују ефекат на герминативним ћелијама имају већу примењивост и поузданост за предвиђање мутагеног ефекта у односу на тестове код којих се генотоксични потенцијал процењује на нивоу соматских ћелија (45). Генетичке промене у соматским и герминативним ћелијама су повезане са озбиљним здравственим проблемима, који се у принципу могу појавити и при ниским нивоима изложености.

Мутације у соматским ћелијама могу изазвати канцер уколико се јаве у прото-онкогенима, тумор супресор генима и/или генима одговорним за ДНК оштећења (46). Акумулација ДНК оштећења у соматским ћелијама игра важну улогу код дегенеративних стања као што су имуне дисфункције, кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести (47, 48, 49, 50). Мутације у герминативним ћелијама изазивају потенцијалне генетске болести у будућим генерацијама јер се овакве мутације преносе на потомство (51). Резултати компаративних истраживања су показали да, у квалитативном смислу, већина мутагена на нивоу герминативних ћелија уједно показује и генотоксичан ефекат у соматским ћелијама, тако да негативни резултати у *in vivo* тестовима са соматским ћелијама генерално указују на одсуство генотоксичног ефекта и у герминативним ћелијама (52).

Приликом избора адекватног теста за утврђивање генотоксичности треба имати у виду да ни један од постојећих тестова не може у потпуности да испуни све наведене квалитативне услове. Опште је прихваћен став да доношење закључака са високим степеном сигурности о постојању или непостојању способности неког агенса да изазове оштећења и промене на генетичком материјалу, не може се базирати само на резултатима једног теста, или групе тестова на истом или сличном модел организму. Да би се донео закључак о постојању или непостојању генотоксичног ефекта потребно је тестирати агенс применом серије одабраних тестова.

У циљу откривања агенса који могу да изазову генетичке промене у герминативним или соматским ћелијама код различитих модел организама могу се користити различити тестови за детекцију мутација који се генерално деле у три групе (Табела 1).

Табела 1. Тестови за детекцију генотоксичности агенаса природног и вештачког порекла

Тестови за детекцију генских мутација	Тест реверзних мутација код <i>Salmonella typhiurium</i>
	Тест реверзних мутација код <i>Escherichia coli</i>
	Тест генских мутација у култури сисарских ћелија
	Тест полно везаних рецесивно леталних мутација код <i>Drosophila melanogaster</i>
	Тест генских мутација код <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Спот тест код миша
Тестови за детекцију хромозомских мутација	<i>In vivo</i> и <i>in vitro</i> цитогенетски тест
	Микронуклеус тест
	Тест доминантно леталних мутација
	Тест наследних транслокација
	Цитогенетски тест на сисарским ћелијама
Тестови за детекцију ефеката на нивоу ДНК	Тест измене сестринских хроматида <i>in vitro</i>
	Тест митотске рекомбинације на квасцу
	Не планирана синтеза ДНК <i>in vitro</i>
	Комет тест (53)

In vivo испитивања генотоксичности на вишем нивоу биолошке организације са еукариотским ћелијама или организмима су знатно релевантнија за процену ризика по човека.

1.3.1. Тест полно везаних рецесивно леталних мутација код *Drosophila melanogaster*

Тест за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација (енг. *sex-linked recessive lethal test for mutagenicity*, SLRL) је краткотрајан тест за детекцију мутагености код еукариотског организма *Drosophila melanogaster* у *in vivo* условима и један од најсензитивнијих тестова који се изводи на овом модел организму. Врсте рода *Drosophila* су један од најпогоднијих објеката за лабораторијска истраживања у генетици јер је тип интерцелуларне активације сличан као и код сисара. Микрозоми *Drosophila* су способни за

исте ензимске реакције које се одигравају у јетри сисара (54), па се резултати могу применити и на сисарски организам.

SLRL тестом се може утврдити фреквенца генских мутација и малих делеција у герминативним ћелијама мужјака *D. melanogaster*. Применом овог теста добија се стварни наследни ефекат јер се наследне промене мере на нетретираном потомству. SLRL тест покрива рецесивне леталне мутације на око 800 гена (55) смештених на X-хромозому *D. melanogaster*, при чему X-хромозом представља апроксимативно 1/5 генома поменути врсте.

Висок степен корелације (између 85 и 91%) утврђен је између канцерогене и мутагене активности у SLRL тесту због чега се овај тест често употребљава у генотоксиколошким истраживањима.

Принцип теста заснива се на следећем:

- ☞ рецесивне леталне мутације доводе до угинућа јединки када су у хомозиготном стању;
- ☞ штетни утицај рецесивне леталне мутације "маскиране" доминантним алелом на одговарајућем хомологом хромозому се не испољава;
- ☞ ако се рецесивна летална мутација налази на X-хромозому тада код мужјака нема одговарајућег генског локуса на Y хромозому (хемизиготно стање) и не постоји могућност хетерозиготне комбинације са доминантним алелом. Мужјаци који носе рецесивне леталне мутације угинуће пре завршетка постембрионалног развића;
- ☞ женке могу имати на једном X хромозому рецесивни летални алел, а на другом нелеталан доминантни алел. Ова хетерозиготна комбинација омогућава нормално преживљавање женки и преношење рецесивне леталне мутације у следећу генерацију, где ће се испољити код половине мужјака у потомству те женке.

Тест полно везаних рецесивно леталних мутација се може користити за детекцију генотоксичности како синтетичких агенаса (56, 57, 58, 59, 60, 61), тако и агенаса природног порекла (62, 63).

1.3.2. Кошет тест

Кошет тест (енг. *single cell gel electrophoresis*, SCGE, или *Comet assay*) је један од високо осетљивих тестова за тестирање генотоксичности који се користи за детекцију широког спектра оштећења ДНК (64, 65). У последњих неколико година Кошет тест је стекао широку пажњу јер је релативно једноставан за руковање и може се применити на ћелијама изолованих из различитих организама и ткива. *In vivo* Кошет тест представља користан тест

индикатор у погледу своје осетљивости на супстанце које изазивају мутације гена и/или структурне хромозомске аберације (66).

Данас се највише користе две верзије Комет теста, једну су предложили Olive и сарадници (67), а другу Singh и сарадници (68). Прва верзија теста се одвија у неутралним условима и омогућује специфично откривање дволанчаних прекида у молекулу ДНК. Друга верзија Комет теста је у алкалним условима (pH 13), омогућује откривање великог броја различитих оштећења генома, и уједно се ова верзија сматра оптималном за откривање ефеката различитих генотоксичних материја. Током последњих деценија, алкална верзија Комет теста у *in vivo* условима, поред широке употребу у различитим областима, користи се и као стандардно средство у фармацеутској индустрији за процену безбедности нових лекова и, све више, као средство за евалуацију генотоксичности агенаса природног и вештачког порекла (69, 70, 71).

Комет метода је једна од ретких метода која омогућава анализу појединачних интерфазних ћелија на врло малом узорку, са резултатима доступним за неколико сати након излагања токсичном агенсу.

1.3.3. Методе за утврђивање присуства и детекцију мутација

Технолошки напредак у молекулараној генетици довео је до развоја брзих и једноставних метода за лако и прецизно детектовање мутација.

Молекуларно-генетичке методе за анализу мутација се могу поделити у две групе:

1. Методе за утврђивање присуства (скрининг) мутација подразумевају да се фрагмент ДНК познате секвенце тестира на присуство било које разлике (непознати полиморфизам који може представљати потенцијалну мутацију) у односу на референтну *Wt* ДНК секвенцу.

Методе за утврђивање присуства мутација се заснивају на:

- ☞ промени конформације, па самим тим и електрофоретске покретљивости, ДНК фрагмента који садржи секвенцу различиту од *Wt* секвенце:
 - ☞ гел електрофореза са градијентом денатуришућег агенса (енг. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE*).
 - ☞ гел електрофореза у температурном градијенту (енг. *Temperature Gradient Gel Electrophoresis – TGGE*) и
 - ☞ гел електрофореза са константном концентрацијом денатуришућег агенса (енг. *Constant Denaturant Gel Electrophoresis – CDGE*);

- ☞ на промени електрофоретске покретљивости хетеродуплексних ДНК молекула, тј. дволанчаних хибридних ДНК молекула у којима један ланац потиче од мутираног алела, а други од *Wt* алела:
 - ☞ хетеродуплекс анализа
- ☞ на препознавању и/или хемијској или ензимској разградњи погрешно спарених база у хетеродуплексном ДНК молекулу:
 - ☞ хемијско и ензимско сечење погрешно спарених база (енг. *Chemical Cleavage of Mismatches – CCM*)
 - ☞ скрининг тачкастих мутација коришћењем *mismatch-repair* протеина

Метода секвенцирања ДНК молекула се убраја у методе за скрининг јер не подразумева *a priori* претпоставку о позицији и типу тражене мутације.

2. Методе за детекцију и идентификацију мутација подразумевају да се узорак ДНК тестира на присуство/одсуство тачно одређене (специфичне) мутације.

У ову групу спадају:

2.1. Методе за анализу полиморфизма нуклеотидне секвенце:

- ☞ рестрикциона дигестија PCR (енг. *Polymerase Chain Reaction*) продукта,
- ☞ хибридизација PCR продукта са алел-специфичним пробама,
- ☞ дот блот,
- ☞ слот блот или Southern blot хибридизација,
- ☞ алел специфични PCR.

2.2. Методе за анализу полиморфизма дужине секвенце:

- ☞ PCR
- ☞ Southern blot.

Тестирање ДНК узорка на присуство/одсуство одређене мутације је једноставније него скрининг ДНК узорка за непознату мутацију, али није увек могуће.

Оптимална метода за анализу мутација требало би да задовољава одређене критеријуме:

- ☞ да буде поуздана,
- ☞ да буде брза,
- ☞ да је јефтина,
- ☞ да даје тачну информацију о позицији и природи детектоване мутације,
- ☞ да није пуно захтевна у смислу рада и времена,
- ☞ да не захтева коришћење опасних реагенаса и
- ☞ да постоји начин за њену аутоматизацију како би лако ишла у рутинску употребу.

1.4. Антимикробни потенцијал

Због резистентности бактерија на велики број антибиотика, али и способности биљака да синтетишу биолошки активне материје, примена препарата биљног порекла добија све већи значај у контроли и сузбијању бактерија.

Антимикробни лекови ефикасно делују на бројне узрочнике инфекција, међутим има и оних који нису довољно ефикасни, који се слабије ресорбују, на које се развила резистенција код бактерија, или пак оних који изазивају веома озбиљна нежељена дејства (72). Последњих година су инфекције узроковане пре свега резистентношћу микроорганизама на конвенционалну терапију, и сами тим резултују дужим трајањем болести и већим ризиком од смртног исхода (73). Стога је неопходно развити природан и безбедан начин контроле и заштите људи и животиња од инфекција.

У циљу проналажења нових средстава у борби против инфекција изазваних мултирезистентним сојевима бактерија, у свету су све актуелнија испитивања антибактеријског деловања неантибиотских супстанци укључујући и биљне екстракте, етерична уља или изолована једињења као што су алкалоиди, флавоноиди, лактони и дитерпени (74, 75, 76, 77).

Одавно је познато да биљни екстракти показују значајан негативан утицај на раст и размножавање бактерија и да је њихова примена у традиционалној медицини, при третирању бактеријских инфекција, вишеструка.

Антимикробни потенцијал природних производа објашњава се чињеницом да производи овог типа нарушавају структуру липида који улазе у састав мембрана бактерија, чинећи их на тај начин порозним и лако пропустљивим за различите молекуле (78, 79), што доводи до инхибиције раста и, у већини случајева, смрти (80).

Главна разлика између бактерија и ћелија сисара је у присутности ригидног зида изван ћелијске мембране бактерија. Структура која даје чврстоћу ћелијском зиду и резистенцију на осмотску лизу код грам-позитивних бактерија је пептидогликан. Код грам-позитивних бактерија пептидогликан представља спољашњи слој ћелијске мембране, док код грам-негативних бактерија постоји и спољашња мембрана изван танког пептидогликанског слоја. Већа осетљивост грам-позитивних бактерија на дејство тест супстанце објашњава се чињеницом да је плазмална мембрана ових бактерија лакше доступна, што за последицу има повећање пропустљивости мембране за јоне, екскрецију интрацелуларних компоненти у спољашњу средину и оштећење ензимског система бактерија (81, 82, 83).

При испитивању антимикробног потенцијала биљних екстраката поред диск дифузионе методе, најчешће се користи агар дилуциона метода, као и дилуциона метода у епруветама или микротитар плочама (84, 85).

Антимикробна једињења могу да имају бактериостатски ефекат, тј. спречавају синтезу појединих фактора битних за живот, раст и размножавање ћелије, и бактерицидно дејство тј. да убијају бактеријску ћелију. Антибиограмом се дефинише бактериостатска антимикробна активност. Антибиограм представља мерило осетљивости културе на антибиотик и, у зависности да ли се одређује дифузионом или дилуционом методом, може се представити преко пречника зоне инхибиције у којој антибиотик спречава раст културе, односно минималне инхибиторске концентрације при којој спречава раст и развој ћелија микроорганизама (86).

1.5. Антиоксиданти и антиоксидативни потенцијал

Многобројне студије, које проучавају биолошке активности хемијских супстанци биљног порекла, потврђују да су неке од њих природни антиоксиданти који могу имати и антигенотоксичну (87, 88, 89) и антиканцерогену (90) способност или да индукују апоптозу која може бити важна у лечењу различитих обољења (91).

За синтетске антиоксиданте, као што су *бутилирани хидрокситолуен* (БХТ) и *бутилирани хидроксианизол* (БХА), који су познати по својој способности да заустављају ланчану реакцију липидне пероксидације, је доказано да показују канцерогени ефекат и да изазивају оштећење јетре (92). Природни антиоксиданти, у великом броју случајева, се добијају из биљака, те се безусловно сматрају безбедним за употребу. Улога биљака, као и сирових и пречишћених екстраката биљног материјала, у превенцији и лечењу болести приписује се делимично антиоксидативним својствима фитохемикалија али и великом броју полифенолних једињења. Значајна група природних антиоксиданата су биљни секундарни метаболити које чине биљни феноли (фенолне киселине, флавонони, изофлавонони, флаван-3-оли, антоцијани, проантоцијанидини, танини...), терпеноиди, токофероли, глукозинолати, као и једињења која садрже сумпор, који поред антиоксидативних поседују и антимулагена, антиканцерогена, анти-инфламаторна, антиулкусна и антимикуробна својства. Полифенолна једињења поседују многа биолошка и фармаколошка дејства, што указује да они у значајној мери утичу на основне ћелијске функције као што су раст, деоба и/или смрт ћелије (апоптоза). Антиоксидативна активност полифенолних једињења заснива се на њиховом редокс потенцијалу, па стога они могу да делују као редукујући агенси, "квенчери" синглетног кисеоника, да отпуштају водоник и хелирају метале (8).

Антиоксиданти су супстанце које присутне у малим количинама у односу на супстрат који је подложен оксидацији (липиди, протеини, угљени хидрати, ДНК) значајно инхибирају или потпуно спречавају њихову оксидацију (93). У ширем смислу, антиоксидант је заправо агенс који онемогућава, спречава или уклања оксидативна оштећења циљног молекула (94).

Деловање антиоксиданата се заснива на њиховој способности да:

- ☞ делују као "скевинџери" слободних радикала, односно донори електрона или Н-атома;
- ☞ комплексирају јоне метала, спречавајући њихову каталитичку функцију у процесима разградње липидних хидро-пероксида и настанку слободних радикала;
- ☞ разграђују хидро-пероксиде липида, трансформишући их у нерадикалске врсте (нпр. алкохоле);

- ☞ спречавају дејство синглетних облика кисеоника;
- ☞ инхибирају неке ензиме;
- ☞ показују синергистичке ефекте или
- ☞ редукују нека једињења (95).

Антиоксидативни систем обједињује више нивоа заштите који се могу поделити на:

☞ примарни

☞ ензимске компоненте: супероксид-дизмутаза (SOD), каталаза (CAT), ензими глутатион редокс циклуса (глутатион-пероксидаза (GSHPx), глутатион-редуктаза (GR), глутатион-С-трансфераза (GST) и други), затим цитохром-оксидазе, као и тиоредоксин и фамилија пероксиредоксин протеина који функционишу као сакупљачи супероксид-анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) и водоник-пероксида (96, 97).

☞ неензимске компоненте: глутатион (GSH), аскорбинска киселина (витамин C), α -токоферол (витамин E), β -каротен (провитамин A), коензим Q (CoQ, убихинон), металотионеин (MT).

☞ секундарни - протеин специфичне оксидоредуктазе (тиол-трансфераза, протеин-ADP-рибозил-трансфераза и АТФ и Ca^{2+} -независна трансфераза) (98, 99).

У погледу биолошких система, познато је да реактивне врсте кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS) могу да "нападају" липиде ћелијских мембрана, протеине ткива или ензиме, угљене хидрате и ДНК, да узрокују оксидацију и тиме изазову оштећења мембрана, ДНК и модификацију протеина (100).

Антиоксидативни систем има значајну улогу у заштити при ћелијским оштећењима. Примарни антиоксиданти спречавају стварање реактивних врста кисеоника и представљају прву линију одбране ћелија од оксидативног стреса. Наведени антиоксиданти блокирају ланчану реакцију слободних радикала и, самим тим, онемогућавају пратећу пероксидацију липида (96), јер сваки од њих детоксикује неког припадника реактивних врста кисеоника (101). Један од примера је спрега која постоји између супероксид-дизмутазе, каталазе и глутатион-пероксидазе (Схема 2). Супероксид-дизмутаза је металоензим са три изоензимске форме (102): цитосолна (Cu,Zn-SOD), митохондријална (Mn-SOD) и екстрацелуларна (EC-SOD), које учествују у дизмутацији супероксид-анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) до O_2 и H_2O_2 (каталитички уклањају $O_2^{\cdot-}$). На њихово деловање се наставља активност ензима каталазе (103) и глутатион-пероксидазе. Каталаза (CAT) разлаже водоник-пероксид до воде (H_2O) и молекулског кисеоника (O_2), док га глутатион-пероксидазе (GSH-Px; GPx), са изузетком хепатоцитне глутатион-С-трансферазе (GST), преводи у H_2O и оксидовани глутатион (96, 97).

1.6. Хепатопротективни потенцијал

Имајући у виду озбиљне нежељене нуспојаве синтетичких агенаса (104) све је већа тежња ка истраживањима у циљу процене научних основа за традиционалне биљне лекове са хепатопротективним потенцијалом (105). Проблем употребе биљних лекова или њихових екстраката у савременој медицини је у чињеници да научни докази, у већини случајева, недостају. Ограничавајући фактори који доприносе овој ситуацији су:

- 3 недостатак стандардизације,
- 3 недостатак идентификације биолошки активних компоненти (106),
- 3 механизам деловања није довољно познат,
- 3 непостојање клиничких студија и
- 3 недостатак токсиколошких евалуација (107).

Управо из ових разлога, студије са биљним екстрактима су корисне како би се добиле информације о њиховој безбедности, ефикасности и механизмима деловања.

Деловање различитих хепатотропних и хепатотоксичних супстанци (лекова, токсичних материја, вируса...) доводи до микроморфолошких, ултраструктурних и функционалних промена и поремећаја јетре. Јетра има важну детоксикациону улогу, како од токсичних материја које се стварају у току нормалног ендогеног метаболизма, тако и од оних који долазе у организам из спољашње средине (108).

Природни лекови, који се добијају из лековитих биљака, сматрају се ефикасним и безбедним алтернативним третманом за хепатотоксичност. Биљке које показују хепатопротективну активност садрже различите хемијске компоненте као што су феноли, кумарини, лигнани, етерична уља, монотерпени, каротеноиди, гликозиди, флаваноиди, органске киселине, липиди, алкалоиди и ксантени (109).

Јетра је орган који генерише реактивне врсте кисеоника који индукују оксидативна оштећења ткива. Ови радикали реагују са ћелијским мембранама и индукују липидну пероксидацију (110, 111) или изазивају инфламацију, као важан патолошки посредник у многим клиничким поремећајима (112). Редукција ових радикала антиоксидантима је од кључног значаја за заштиту ћелија против разних болести као што је поремећај јетре (113, 114).

За испитивање хепатопротективног потенцијала биљних екстраката као модел токсичног оштећења јетре најчешће се користе једињења која доводе до оштећења хепатоцита механизмом у који су укључени слободни радикали попут угљен тетрахлорида (115) и

пирогалола (116, 117). Оваква једињења се примењују за процену хепатопротективног дејства управо биљних екстраката за које се зна или се претпоставља да делују антиоксидантно.

С обзиром на разноврсност и сложеност функције јетре, не може се применом само једне методе проценити степен оштећења већ је потребно применити "батерију" тестова (118, 119). Генерално за утврђивање степена оштећења јетре мери се ниво аспартат-аминотрансферазе (AST), аланин-аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP), билирубина и албумина.

Опште прихваћена класификација тестова за испитивање функције јетре обухвата три групе (120):

- ☞ тестови за утврђивање капацитета јетре за транспорт органских анјона и метаболизам лекова (одређивање билирубина у серуму и урину),
- ☞ тестови за откривање оштећења хепатоцита (тестови за одређивање нових ензима у серуму попут аминотрансфераза, алкалне фосфатазе...) и
- ☞ тестови за утврђивање капацитета биосинтезе јетре (серумски протеини, албумин, преалбумин, церулоплазмин, 1-антитрипсин, протромбинско време...).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Полазећи од претпоставке да би до сада неистражена биљна врсте рода *Cotinus*, са територије републике Србије, могла бити потенцијални извор нових биолошки активних једињења, ова докторска дисертација имала је за циљ спровођење детаљних фитохемијских и биолошких испитивања метанолског екстракта биљне врсте *Cotinus coggygria* Scop.

Циљ фитохемијских испитивања била је идентификација и квантификација фенолних једињења у екстракту биљне врсте *C. coggygria* применом спектрофотометријских метода и HPLC анализе.

Мултидисциплинарни приступ је примењен са циљем да се обједини неколико биолошких активности метанолског екстракта биљке *C. coggygria*: примарни циљ је био да се утврди ефекат метанолског екстракта на функцију генетичког материјала код различитих модел организама, а затим и евалуација антимикуробне, антиоксидативне и хепатопротективне активности екстракта ради утврђивања терапеутског потенцијала.

Ефекат метанолског екстракта на функцију генетичког материјала код различитих модел организама утврђен је применом теста за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма *Drosophila melanogaster* на нивоу герминативних ћелија и Комет теста код *D. melanogaster* и пацова соја Wistar на нивоу соматских ћелија у *in vivo* условима.

Антимикуробна активност утврђена је применом стандардних метода, диск дифузиона и агар дилуциона, на серију бактерија и гљива, које су узрок многих инфекција.

Процена антиоксидативне активности вршена је на основу праћења *in vitro* способности неутрализације слободних радикала (DPPH·), редукционог потенцијала и хелационе активности метанолског екстракта биљке *C. coggygria*.

У циљу утврђивања механизма хепатопротективне активности метанолског екстракта биљке *C. coggygria* примењене су методе за процену биохемијских параметара у серуму пацова; одређена је релативна концентрација и експресија акутно фазних протеина у серуму и јетри пацова; *in vivo* инхибиција липидне пероксидације и активност антиоксидативних ензима; као и утицај метанолског екстракта на експресију транскрипционих фактора.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал коришћен у истраживањима

3.1.1. Биљни материјал

Биљка *C. coggygria* је сакупљана на територији јужне Србије (у селу Рујишту, планина Рогозна, на северу Косова), у току маја и јуна 2007. Врста је идентификована и примерак је депонован (16178, БЕОУ) на Катедри за ботанику Биолошког факултета, Универзитета у Београду.

3.1.2. Хемикалије и реагенси

Сви реагенси и хемикалије употребљене у експерименталном раду су аналитичке чистоће.

Пирогалол (каталoшки број: 254002-50), SYBR GREEN I (каталoшки број: С 9430), тиобарбитурна киселина (ТВА), диметилсулфоксид (DMSO), *1,1-дифенил-2-пикрилхидразил* (каталoшки број: D9132), мирицетин (каталoшки број: М 6760), нипагин (каталoшки број: 111 Н5501) Sigma-Aldrich (St Louis, Mo., USA); инхибитори протеазе (Mix G, Serva), PVDF мембране (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotechnology); поликлонална антитета (NF-кВ р65, фосфорилисан NF-кВ р65 (Ser311) (pNF-кВ), Akt 1/2/3, фосфорилисан Akt 1/2/3 (Ser 473) (pAkt), α_2 -макроглобулин (α_2M), тубулин (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA) и хаптоглобин (Hр) (Sigma Aldrich Inc, Milwaukee, Wis., USA); анти-хумана антитета за Hр и α_2M (Sigma Aldrich Inc, Milwaukee, Wis., USA).

3.1.3. Експериментални модел организми

За извођење теста за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација у *in vivo* условима користе се две лабораторијске линије еукариотског модел организма *D. melanogaster*: једна линија је са нормалним фенотипом ("дивљи тип") и без леталних рецесивних мутација у генотипу ("*Canton S*") и друга са генским мутацијама на X хромозому ("*Basc*" или "*Muller – 5*"). За извођење Комет теста користе се јединке "дивљег типа" ("*Canton S*"). Јединке *D. melanogaster* (Umea Stock Centre, Sweden) се чувају у теглицама са храњивим супстратом на константној температури од 25°C и при релативној влажности од 60%.

Током експерименталног рада коришћени су и албино пацови соја Wistar, адултни мужјаци старости 2-2.5 месеца чија је телесна маса варирала између 220-250 g. Пре и током

експеримента животиње су држане под контролисаним условима на температури од 20 до 22°C, са дневно-ноћним ритмом на 12 сати. Примењена је нормална исхрана животиња комерцијално доступном храном. Животиње су третиране по протоколима одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама, Института за биолошка истраживања у Београду, публикованим од стране Националног Института за здравље САД (публикација број 85/23, ревидирана 1986. године).

3.2. Методе коришћене у истраживањима

3.2.1. Поступак термичког третмана биљног материјала и екстракција са метанолом по Soxhlet-у

Осушене гране биљке *C. coggygia* (1.2 kg) уситњене су на мање комаде (2-6 mm) применом цилиндричне дробилице и естраховане са метанолом користећи Soxhlet-ову апаратуру. Добијени екстракт је профильтриран кроз филтер папира (Whatman, број 1) и концентрован на ротационом вакуум упаривачу до сува како би се уклонио растварач. Суви остатак (32 g) је чуван у тамним стакленим бочицама до даље примене.

3.2.2. Испитивање хемијског састава метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

3.2.2.1. Спектрофотометријска метода са Folin-Ciocalteu реагенсом за одређивање укупне количине фенола у екстракту биљке *Cotinus coggygia*

Метода по Folin-Ciocalteu је заснована на мерењу редукујућег капацитета полифенолних једињења, чијом дисоцијацијом настаје протон и феноксидни анјон. Настали феноксидни анјон редукује Folin-Ciocalteu реагенс до плаво обојеног јона.

Раствори и реагенси:

1. 7.5% раствор NaHCO_3
2. Folin-Ciocalteu реагенс
3. Стандардни раствор галне киселине

Спектрофотометријско одређивање

Реакциона смеша припремљена је мешањем 0.5 mL метанолског екстракта, 2.5 mL Folin-Ciocalteu реагенса и 2 mL 7.5% NaHCO_3 (121). Упоредо је припремљена и слепа проба. Након 15 минута на 45°C измерене су апсорбанце на $\lambda = 765 \text{ nm}$ на спектрофотометру (ISKRA, MA9523-SPEKOL 211). На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве стандардног раствора галне киселине, очитана је концентрација полифенолних једињења, а затим је садржај полифенолних једињења у екстракту изражен као еквивалент галне киселине (mg галне киселине/g сувог биљног материјала).

3.2.2.2. Спектрофотометријска метода са алуминијум-хлоридом за одређивање укупне количине флавоноида у екстракту биљке *Cotinus coggygria*

Одређивање укупних флавоноида засновано је на њиховој особини да са металима дају одговарајуће метало - комплексе.

Раствори и реагенси

1. 2% раствор AlCl_3
2. Стандардни раствор рутина

Спектрофотометријско одређивање

У 0.5 mL 2% раствора AlCl_3 додата је иста запремина екстракта, паралелно је припремљена и слепа проба (121). Апсорбанца је очитана на $\lambda = 415 \text{ nm}$ након 1 сата.

На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве стандардног раствора рутина, очитана је концентрација укупних флавоноида, а затим је садржај укупних флавоноида у екстракту изражен као еквивалент рутина (mg рутина/g сувог биљног материјала).

3.2.2.3. Спектрофотометријска метода за одређивање укупне количине танина у екстракту биљке *Cotinus coggygria*

Метода за одређивање кондензованих танина из биљног материјала се заснива на таложењу проантоцијанида формалдехидом (122). Најпре се одређује садржај укупних фенола помоћу Folin-Ciocalteu-овог реагенса, као што је описано раније. Затим се у екстракту на сваки еквивалент галне киселине додаје по 0.5 мол еквивалената флороглуцинола.

Количина танина у екстракту одређује се из 2 mL биљног екстракта користећи Folin-Ciocalteu-ову методу. Талог садржи проантоцианидине и познати износ флороглуцинола.

Галотанини су хидросолисабилни танини који садрже остатке галне киселине естерификоване до полиола. Галотанини могу бити квантитативно одређени методом са калијум-јодатом. Ова метода се заснива на реакцији калијум-јодата (KIO_3) са галоил естром (122), након чега се формира црвено обојење које прелази у жуто обојени комплекс. Концентрација црвеног интермедијера може се одредити спектрофотометријски мерењем апсорбанце раствора на 550 nm. Реакција је извршена додавањем 1.5 mL засићеног раствора калијум јодата у 3.5 mL екстракта на температури изнад 40°C до постизања максималне апсорбанце узорка (без обзира на време). Садржај галотанина одређен је користећи танинску киселину као стандард.

3.2.2.4. HPLC метода за утврђивање квалитативног и квантитативног састава метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria*

Квантификација појединих фенолних једињења урађена је применом течне хроматографије високе резолуције (енг. *high-pressure liquid chromatography*, HPLC) са реверзном фазом. Узорци су убризгавани у Waters HPLC систем који се састоји од 1525 бинарних пумпи, термостата и 717 аутосемплера повезаних са Waters 2996 диодом за детекцију зрачења (Waters, Milford, MA, USA). Раздвајање фенола је извршено на Symmetry C-18 RP колони величине 125 x 4 mm и пречником честица од 5 μ m (Waters, Milford, MA, USA), повезаној са одговарајућом заштитном колоном. Пре убризгавања, сви узорци су филтрирани кроз најлонски филтер са величином пора од 0.22 μ m (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Две мобилне фазе, А (0.1% фосфорна киселина) и Б (ацетонитрил) су коришћене при протоку од 1 mL/min са следећим градијент профилем: првих 20 минута са 10 на 22% Б, затим 20 минута линеарни раст до 40% Б, а затим 5 минута уназад до 10% Б и додатних 5 минута довођења у равнотежно време. Прикупљање података и спектрална евалуација за потврду пика спроведена је применом Waters Empower 2 софтвера (Waters, Milford, MA, USA).

3.2.3. Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* на функцију генетичког материјала код различитих модел организама

3.2.3.1. Тест за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма *Drosophila melanogaster* у *in vivo* условима

Један од најпогоднијих објеката за лабораторијска истраживања у биологији, а пре свега на пољу проучавања проблема везаних за мутационе процесе, јесу мушице рода *Drosophila*. Тип интерцелуларне активације присутан код *Drosophila* представља важну погодност за њихово коришћење као модел организме јер су њихови микрозоми способни за исте ензимске реакције које се одигравају у јетри сисара.

За извођење теста користе се две лабораторијске линије, једна са нормалним фенотипом (нпр. "Oregon", "Canton S"...) и друга са генским мутацијама на X хромозому које условљавају морфолошке промене у односу на "дивљи тип" ("Basc" или "Muller - 5") која носи три генетске мутације на локусима X хромозома: семидоминантна *Bar* мутација (*B*) – морфолошке промене облика сложеног ока адулта које се огледају у фенотипу познатом као бар-око; друга мутација је *apricot* (w^a) има фенотипски ефекат на око у виду промене боје ока (хомозиготна или хетерозиготна комбинација рецесивног алела w^a условљава светло-оранж боју очију) и трећа мутација *scute* (*sc*) условљава различиту дужину и број торакалних чекиња.

Код *Basc* линије на X хромозому се налази једна инверзија која спречава кросинг-овер и могућност да леталне мутације настале услед третмана мужјака буду инкорпориране у X хромозом који потиче од женке. Летална мутација, настала услед излагања X хромозома мушког родитеља неком фактору спољашње средине, ће бити пренета мушком потомству F_2 генерације које носи дати X хромозом. Одсуство мужјака са "дивљим фенотипом" у F_2 генерацији индикативно је за наслеђивање полно везаних рецесивно леталних мутација.

Припремни поступци

Експерименту испитивања утицаја метанолског екстракта биљке *C. coggygria* на функцију генетичког материјала код *D. melanogaster* као модел организма, претходи низ припремних поступака као што је разливање супстрата и пребацивање и одвајање мушица у циљу добијања неоплођених женки и мужјака одређене старости.

Поступак за припрему супстрата на којима се пребацују мушице приказан је у Прилогу 1.

Поступак пребацивања и одвајања мужјака од женки приказан је у Прилогу 2.

Третман

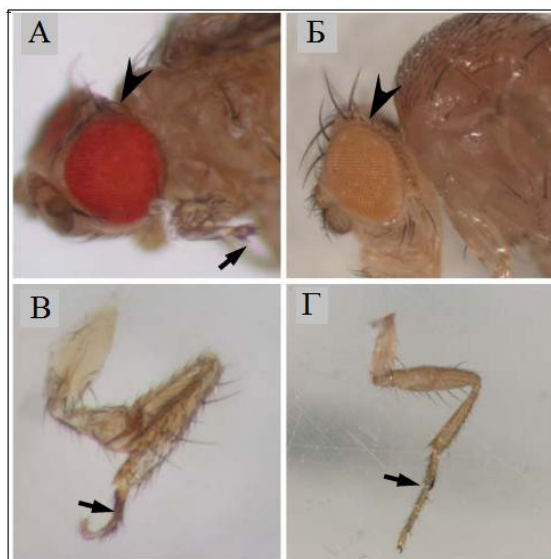
Мужјаци старости 3-4 дана се чувају у теглицама без храњивог супстрата 5 сати, а затим се пребацују у теглице са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (на дно теглице се постави филтер папир са 2 mL екстракта). Исти поступак се понавља и за негативну, 1% водени раствор сахарозе, и за позитивну контролу, 0.75 ppm етил метаносулфонат (ЕМС) (123). По истеку 24 сата мужјаци се пребацују у теглице са храњивим супстратом у којима бораве наредна 24 сата (тзв. период релаксације).

За испитивање антигенотоксичности мужјаци се држе 24 сата у теглицама у којима се налази филтер папир на који је нането 2 mL ЕМС-а, а затим 24 сата са 2 ml 2% раствором метанолског екстракта биљке *C. coggygia* (пост-третман). Исти поступак се понавља и за утврђивање антигенотоксичне активности мирицетина, главне компоненте метанолског екстракта биљке *C. coggygia*, као и кверцетина и рузмаринске киселине, у концентрацији од 100 ppm.

Поступак

По један третиран мужјак се укршта са по три неоплођене, нетретиране и три дана старе женке *Vasc* линије (I легло). Током два дана женке остају у теглицама са мужјацима, а затим се мужјаци пребацују у нове теглице са по три нове женке (II легло). Након три дана, мужјаци се пребацују у нове теглице са новим неоплођеним женкама (III легло), након три дана мужјаци се избацују, а женке остају у теглицама још пет дана, ради полагања јаја.

Након излегања јединки F₁ генерације сачека се три дана како би се обавило укрштање по принципу "брат-сестра", а затим се по принципу случајности из сваке теглице узима по десет парова и појединачно се ставе у флаконе. Након седам дана и након полагања јаја мушице се уклањају, а излегле јединке представљају F₂ генерацију. Генотоксичан/антигенотоксичан ефекат се утврђује на нивоу ове генерације. Јединке се прикупљају сваког другог дана у периоду од десет дана, а затим се пребројавају и региструју фенотипови (колико има "дивљег типа", а колико *Vasc* мужјака). Ако има мужјака "дивљег типа" то значи да на X хромозому није дошло до рецесивних леталних мутација. Уколико нема мужјака "дивљег типа" то значи да X хромозом има леталну мутацију (Слика 5).



Слика 5. Фенотипске разлике у боји очију код мужјака "дивљег типа" (А) и *Basc* мужјака (Б), разликовање женке од мужјака (постојање полног чешља на предњим екстремитетима мужјака (В и Г)
(<http://www.hoxfylmonsters.com/2009/01/novel-gateway-cloning-system-with-molecylar-tags-in-drosophila/>)

У F_2 генерацији женке су хомозиготне или хетерозиготне за *Basc* мутацију, а мужјаци су хемизиготни за *Basc* мутацију и/или су "дивљег типа", ако тестирани агенс није генотоксичан.

P: *Basc/Basc* x *X/Y*
 F_1 : *Basc/X* x *Basc/Y*
 F_2 : *Basc/Basc*; *BascY*; *Basc/X*; *X/Y*

Имајући у виду да сви стадијуми сперматогенезе нису подједнако осетљиви, третирани мужјаци се три пута сукцесивно укрштају са новим *Basc* женкама (I, II и III легло), и добија се потомство које се разликује по стадијуму сперматогенезе на ком је била герминативна ћелија при третману тест супстанцом. Прво легло даје потомке који су се развили из зигота који су настали спајањем јајне ћелије нетретираних женки и сперматозоида третираних мужјака који су на том стадијуму били у контакту са екстрактом. Друго легло даје потомке који су се развили из зигота који су настали спајањем јајне ћелије нетретираних женки и сперматозоида третираних мужјака који су на стадијуму сперматиде били у контакту са екстрактом, а треће легло даје потомке који су се развили из зигота који су настали спајањем

јајне ћелије нетретираних женки и сперматозоида третираних мужјака који су на стадијуму сперматоцита били у контакту са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (124).

Укупан број третираних X хромозома једнак је збиру леталних и нелеталних култура, а фреквенца полно везаних рецесивних летала израчунава се из формуле (1):

$$\% \text{ Летала} = \frac{\text{Број летала}}{\text{Број летала} + \text{Број нелетала}} \quad (1)$$

при чему се % летала утврђује у свакој експерименталној групи.

3.2.3.2. Алкална верзија Комет теста код *Drosophila melanogaster* у *in vivo* условима

У Генетичкој токсикологији најчешће се као модел организми користе пацови и мишеви, међутим, последњих неколико година, један од основних проблема, и за науку и за етику, је смањење броја експерименталних организама. У овом контексту, нагласак је дат на коришћењу алтернативних модел организама као што је *D. melanogaster*, чију употребу препоручује и Европски центар за валидацију алтернативних метода (енг. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*).

Комет метода (енг. *Single cell gel electrophoresis* или *Comet assay*) је једноставна, брза и осетљива техника за анализу и квантификовање ДНК оштећења на нивоу индивидуалне ћелије. Метода је названа Комет метода јер ДНК подсећа на комету - интактна ДНК чини главу, а оштећена ДНК реп "комете".

Принцип Комет методе састоји се у хоризонталној електрофорези индивидуалних, појединачних ћелија у агарозном гелу. Ћелије се претходно лизирају како би се отклонили ћелијски протеини при чему је ДНК молекулу омогућено одмотавање под алкалним или неутралним условима, а затим се ДНК пропушта кроз електрично поље и боји флуоресцентним бојама. Током електрофорезе покидани делови ДНК (оштећена ДНК) мигрирају од језгра (интактне ДНК). Дужина ДНК која је "отпуштена" од главе комете директно је пропорционална ДНК оштећењу. Најједноставнији типови ДНК оштећења су двоструки преломи ДНК ланца (енг. "*double strand breaks*"). Такви преломи се могу детектовати Комет методом у неутралним условима јер резултирају ДНК фрагментима. Једноструки преломи ДНК ланца (енг. "*single strand breaks*") стварају ДНК фрагменте само ако су два ланца ДНК одвојена или денатурирана (одмотавање ДНК се врши при рН од 12.1).

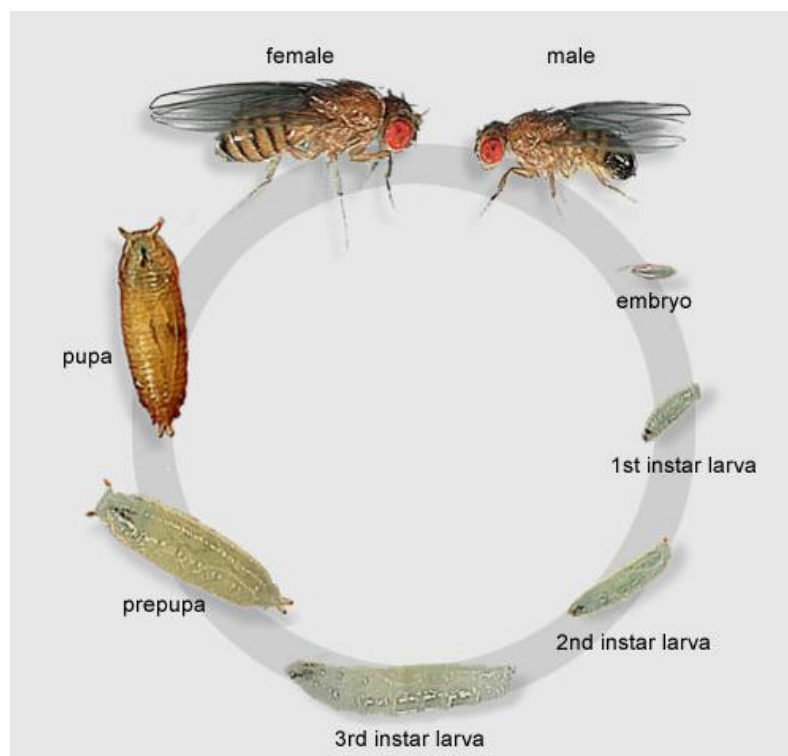
Контролисањем услова у којима се одвија лиза и одмотавање ДНК могуће је пратити различита оштећења ДНК молекула.

Због величине ћелија, протокол Комет теста у коме се као модел организам користи *D. melanogaster* се разликује од општег протокола. Концентрација агарозе са ниском тачком топљења је 1.5% насупрот 0.75% која се углавном користи и препоручује (69). Модификације постоје и у саставу пуфера за лизирање ћелија (не додаје се диметилсулфоксид) и трајању електрофорезе (електрофореза траје 15 минута).

Третман

За утврђивање генотоксичног ефекта метанолског екстракта биљке *S. coggygia* користи се предњи део задњег црева ларви на трећем ступњу развића лабораторијске линије "Canton S" (Слика 6).

Поступак дисекције и припреме узорака приказан је у Прилогу 3.



Слика 6. Развојни циклус врсте *Drosophila melanogaster*
(<http://www.hoxfulmonsters.com/2008/05/drosophila/>)

Једна група ларви (10 ларви по групи) старости 72 ± 2 сата ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) пребацује се на супстрат са ЕМС-ом (1 ml, 1 mM), друга група у супстрат са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (1%), трећа само на храњиви супстрат. Након 24 сата испирају се са 50 mM PSS (119.0 NaCl, 25 NaHCO₃, 11.1 глукоза, 4.7 KCl, 1.6 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, pH 7.4). Одстрани се предњи део задњег црева и пребаци у епендорф са 50 mM PSS и припреми се ћелијска суспензија по методи Howell и Taylor-а (125) модификованој од стране Mukhopadhyay и сарадника (126). Затим се 50 mM PSS замени са колагеназом (300 μl 0.5 mg/mL у PBS-у, pH 7.4, 15 минута на $24 \pm 1^\circ\text{C}$). Ћелијска суспензија се процеди кроз најлонску мрежу (60 μm), а колагеназа се уклони испирањем са PBS-ом, 3 пута по 5 минута уз благо мешање, и на крају се дода 80 μl PBS.

Поступак

Стаклене плочице се оперу детерџентом, осуше и обришу 70% етанолом. За плочице се користи 1% "нормална" агароза (енг. *normal melting agarosa* - NMA) у PbS-у (20 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 70 mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7.4), а затим се плочице суше у *Easy breeze gel dryer*-у или на собној температури током ноћи. За узорке се користи 1.5% агароза са ниском тачком топљења (енг. *low melting point agarose* - LMPA) у PbS-у.

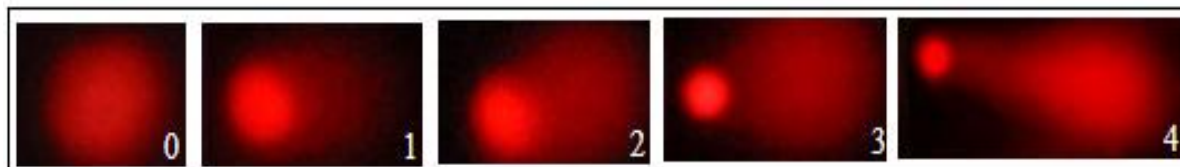
У 80 μl узорка додаје се 80 μl LMPA, а затим се одпипетира 75 μl и наноси се на претходно припремљене плочице, одмах се прекрије са покровним стаклом како би се ћелијска суспензија заједно са LMPA распоредила у танком слоју по предметном стаклу (126).

Након 10 минута пажљиво се уклоне покривна стакла и нанесе се 75 μl 1% LMPA. Након 10 минута плочице се поређају у пластичне посуде са пуфером за лизу (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10.0). По истеку 2 сата на 4°C , плочице се пребацују у пластичне посуде са пуфером за електрофорезу (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) 10 минута пре хоризонталне електрофорезе на 0.7 V/cm (300 mA/25 V, 15 минута). Плочице се изваде из кадице за електрофорезу, обришу се и поређају у пластичне посуде са пуфером за неутрализацију (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4; на собној температури 3 пута по 5 минута).

Пре анализирања неопходно је да се плочице осуше, а затим се боје етидијум бромидом (75 μl) и покрију покровним стаклом. Применом флуоресцентног микроскопа Nikon (Ti-Eclipse) анализирају се и сликају ћелије, за сваки узорак 3 мерења по 100 ћелија.

Степен оштећења ДНК утврђује се помоћу две комплементарне методе, квантитативне и квалитативне методе дистрибуције оштећења. "Комете" су визуално анализирани и

класификоване у пет категорија (127), дефинисаних као 0, 1, 2, 3 и 4, где 0 указује на одсуство ДНК оштећења; 1, 2 и 3 на мање, средње и дуге ДНК миграције; и 4 на највиши степен деградације, "комете" са врло малим главама и дугим репом (Слика 7).



Слика 7. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са етидијум бромидом. Класа 0 – неоштећена ДНК; класа 1, 2 и 3 - мање, средње и дуге ДНК миграције и класа 4 - максимално оштећење ДНК

Укупан скор се израчунава применом формуле (2) Manoharan и Banerjee (128):

$$\text{Укупан скор} = (\% \text{ ћелија у класи } 0 \times 0) + (\% \text{ ћелија у класи } 1 \times 1) + (\% \text{ ћелија у класи } 2 \times 2) + (\% \text{ ћелије у класи } 3 \times 3) + (\% \text{ ћелија у класи } 4 \times 4) \quad (2)$$

Након визуалне анализе ћелије су квантификоване применом софтвера TriTekCometScore™ Freeware v1.5 доступан на web страници http://www.aytocomet.com/main_home.php. Дужина репа и % ДНА у репу изабрани су као параметри за процену степена оштећења ДНК.

3.2.3.3. Алкална верзија Комет теста код албино пацова соја Wistar у *in vivo* условима

Третман

За процену утицаја метанолског екстракта биљке *C. coggygia* на функцију генетичког материјала на сисарском модел организму, пацови соја Wistar су подељени у четири групе са по пет животиња. Три групе животиња су третиране интраперитонеално једном дозом екстракта у концентрацији од 500, 1000 и 2000 mg/kg телесне масе. Концентрације су засноване на растворљивости метанолског екстракта у физиолошком раствору. Четврта

група је третирана са физиолошким раствором (0.9% NaCl) и представља негативну контролу. Три одвојена експеримента су спроведена. Животињама које су жртвоване декапитацијом 2, 12, 24, 48 и 72 сата након третмана уклоњене су и обрађене јетре, док је животињама жртвованим након 24 и 72 сата обрађена и коштана срже како би се добила суспензија ћелија.

У циљу утврђивања утицаја метанолског екстракта биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе пацова и мирицетина, у концентрацији која одговара тестираној дози екстракта, педесет животиња је подељено у десет експерименталних група, са по пет животиња у свакој групи. Прва група животиња, негативна контрола, третирана је са физиолошким раствором. Друга експериментална група третирана је интраперитонеално са пирогалолом, 100 mg/kg телесне масе, претходно раствореног у физиолошком раствору. Трећа експериментална група је третирана интраперитонеално једном дозом од 500 mg/kg екстракта биљке *C. coggygia* 2 сата пре третмана са пирогалолом, а четврта група је третирана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (500 mg/kg телесне масе) 12 сати пре третмана са пирогалолом. Пета и шеста група су третиране са једном дозом мирицетина, која одговара концентрацији присутној у тестираној дози екстракта. Након 2 сата, пета група, и након 12 сати, шеста експериментална група, су третиране са пирогалолом у концентрацији од 100 mg/kg. Седма и осма експериментална група интраперитонеално је третирана са једном дозом мирицетина, а девета и десета са екстрактом биљке *C. coggygia* (500 mg/kg телесне масе). Након третмана животиње су жртвоване, јетре су уклоњене и обрађене како би се добиле суспензије ћелија.

Поступак

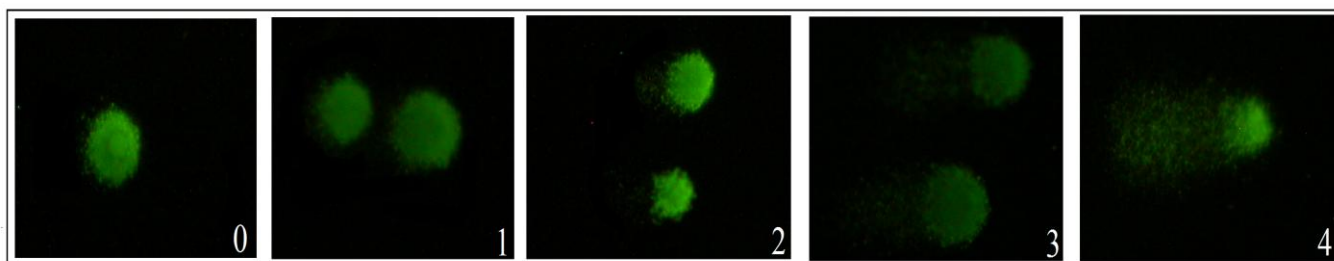
Стаклене плочице се оперу детергентом, осуше и обришу 70% етанолом. За припремање плочица користи се 1.5% "нормална" агароза у PbS-у (20 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 70 mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7.4). За припремање узорака користи се 1% агароза са ниском тачком топљења у PbS-у.

У узорку јетре или косне сржи додаје се по 1 mL свеже припремљеног и охлађеног HBSS пуфера (0.14 g/l CaCl₂, 0.4 g/l KCl, 0.06 g/l KH₂PO₄, 0.1 g/l MgCl₂·6H₂O, 0.1 g/l MgSO₄·7H₂O, 8.0 g/l NaCl, 0.35 g/l NaHCO₃, 0.09 g/l Na₂HPO₄·7H₂O, 1.0 g/l D-глукоза, 20 mM EDTA и 10% DMSO), уситни се узорак и процеди. Поступак се понавља три пута и коначна суспензија ћелија се прикупља.

Из смеше која се састоји од 10 μl ћелијске суспензије и 75 μl 1% LMPA одпипетира се 85 μl , наноси се на претходно припремљене плочице и одмах се прекрије са покровним стаклом како би се ћелијска суспензија заједно са LMPA распоредила у танком слоју по предметном стаклу.

Након 10 минута пажљиво се уклоне покривна стакла и нанесе се 100 μl 1% LMPA. Након 10 минута плочице се поређају у пластичне посуде са пуфером за лизу (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10.0). Након 1 сата и 30 минута на 4°C, плочице се пребацују у пластичне посуде са пуфером за електрофорезу (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0), 30 минута пре хоризонталне електрофорезе (2 kV и 139 mA током 30 минута). Плочице се изваде из кадице за електрофорезу, обришу се и поређају у пластичне посуде са пуфером за неутрализацију (0.4 Tris-HCl, pH 7.4, на собној температури 3 пута по 5 минута), а затим у 97% етанолу 20 минута (68).

Пре анализирања неопходно је да се плочице осуше у *Easy breeze gel dryer*-у 30 минута или током ноћи на собној температури, а затим се боје SYBR GREEN I (90 μl) и покрију покровним стаклом. Применом флуоресцентног микроскопа Leica DMLB са CCD камером анализирају се и сликају ћелије, за сваки узорак 3 мерења по 100 ћелија.



Слика 8. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са SYBR GREEN I. Класа 0 – неоштећена ДНК; класа 1, 2 и 3 - мање, средње и дуге ДНК миграције и класа 4 - максимално оштећење ДНК

Степен оштећења ДНК мерен је помоћу две комплементарне методе, квантитативне и квалитативне методе дистрибуције оштећења, као и код модел организма *D. melanogaster*. Комете су прво визуално анализирани и класификовани у пет категорија (127), дефинисаних као 0, 1, 2, 3 и 4 (Слика 8). Укупан скор је израчунат применом формуле (2). Процент редукције (%P) у укупном скору након третмана са метанолским екстрактом биљке *C.*

coggygia, а у циљу утврђивања антигенотоксичног ефекта, рачуна се применом формуле (3) (128, 129):

$$\%P = \frac{\text{с.в. укупног скора А} - \text{с.в. укупног скора Б}}{\text{с.в. укупног скора А} - \text{с.в. укупног скора В}} \times 100 \quad (3)$$

где с.в. укупног скора А представља средњу вредност укупног скора у позитивној контроли (пирогалол третираној групи); с.в. укупног скора Б представља средњу вредност укупног скора у групи третираној метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (или мирицетином) пре третмана са пирогалолом и с.в. укупног скора В представља средњу вредност укупног скора у негативној контроли.

Након визуелне анализе, ћелије су квантификоване применом софтвера TriTekCometScore™ Freeware v1.5. Дужина репа, % ДНА у репу и репни моменат изабрани су као параметри за процену степена оштећења ДНК.

3.2.4. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* применом стандардних микробиолошких метода

Експерименту одређивања антимикробне активности претходи низ припремних поступака комплетно урађених према предвиђеном протоколу публикованом од стране Националног комитета за клиничке лабораторијске стандарде САД (енг. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (130).

Припремни поступци за чврсте подлоге, на којима се врши засејавање култура, и течне подлоге, у којим се одређује антибиограм, приказани су у Прилогу 4.

У експеримент су укључене следеће културе:

Staphylococcus aureus (IPH), *Bacillus subtilis* (IPH), *Klebsiella pneumoniae* (B26), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Pseudomonas fluorescens* (B28), *Pseudomonas glycinea* (B40), *Bacillus mycoides* (B1), *Erwinia carotovora* (B31), *Agrobacterium tumefaciens* (B11), *Azotobacter chroococcum* (B14), *Enterobacter cloacae* (B22), *Trichoderma viride* (SB11), *Trichoderma harzianum* (SB12), *Penicillium chrysogenum* (SB 22), *Penicillium cyclopium* (SB 23), *Aspergillus glaucus* (SB 32) и *Fusarium oxysporum* (SB 91).

Све коришћене културе бактерија добијене су од Института за заштиту здравља у Крагујевцу и Природно-математичког факултета, Универзитета у Београду.

3.2.4.1. *In vitro* одређивање антимикробне активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* дифузионом методом

У претходно стерилисане Петри посуде одпипетира се по 1 mL суспензије спора одређене културе (6.5×10^6 CFU/mL за бактерије и 3×10^4 CFU/mL за гљиве; енг. *Colony forming unit*, CFU), а затим се разлива по 10 mL подлоге (храњиви и Myller-Hinton-ов агар за бактерије и Sabourand декстрозни агар за гљиве). Након очвршћавања и инкубације 20 минута на 37°C на подлогама се бактериолошком петљом формирају цилиндри пречника 7 mm (131), у којима се пипетом укапава метанолски екстракт биљке *C. coggygia* (150, 300, 500 и 1000 µg) односно стандард (Амрацин, 100 µg за бактерије и Нистатин, 100 µg за гљиве). Као контролни раствор коришћен је 5% DMSO. Након инкубација од 24 сата на 37°C за бактерије, и 48 сати на 28°C за гљиве, мерене су зоне инхибиције. Пречник зоне инхибиције мерен је у mm, два пута за сваку концентрацију.

3.2.4.2. *In vitro* одређивање антимикробне активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* дилуционом методом

Минимална инхибиторна концентрација (MIC) метанолског екстракта биљке *C. coggygia* одређена је макродилуционом методом (132, 133). Припреми се серија разблажења испитиваног екстракта у храњивој подлози. У епрувете се стерилном пипетом одмери по 1 mL течне подлоге. У прву епрувету се додаје 1 mL раствора екстракта, односно стандардног антибиотика одређене концентрације. Раствори подлоге и супстрата се мешају до хомогенизације. Потом се пипетом узима 1 mL добивеног раствора из прве епрувете и преносе у другу. Сукцесивним двоструким разблаживањем полазног раствора супстрата, добија се серија раствора екстракта у опсегу од 7.8 µg/mL до 500 µg/mL, односно стандардних једињења. Затим се у све епрувете додаје по 0.1 mL припремљене суспензије спора (5.4×10^6 CFU/mL за бактерије и 3×10^4 CFU/mL за гљиве). По истеку 24 сата за бактерије и 72 сата за гљиве, на температури од 38°C, читавају се вредности минималне инхибиторне концентрације. То је најмања концентрација екстракта која инхибира видљиви

раст микроорганизма. Као стандарди коришћени су Амрацин, 5 µg/mL за бактерије и Нистатин, 5 µg/mL за гљиве.

3.2.5. Одређивање антиоксидативне активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria*

In vitro антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке *C. coggygria* испитивана је применом DPPH методе, одређен је хелациони капацитет и редуктивна активност. У *in vivo* условима утврђена је концентрација липидних пероксида применом TBARS есеја и активност антиоксидативних ензима (SOD, MnSOD, CuZnSOD, CAT и GST).

3.2.5.1. Одређивање "скевинцер" активности на DPPH[•] радикале метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* у *in vitro* условима

Могућност неутрализације стабилног DPPH[•] радикала метанолским екстрактом биљке *C. coggygria* испитивана је применом DPPH (*1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил*) радикала са максималном апсорбанцом на 517 nm (134). Метода неутрализације DPPH[•] радикала се широко примењује при одређивању антиоксидативне активности на дугоживећим радикалима и представља стандардну методу утврђивања опште антиоксидативне активности испитиваног једињења (135).

Поступак

Од метанолског екстракта биљке *C. coggygria* почетне концентрације 1 mg/mL припреми се серија од шест раствора концентрације 5, 10, 25, 50, 125 и 250 µg/mL у етанолу. Као референтна супстанца у овом тесту коришћен је комерцијални антиоксидант, аскорбинска киселина (Asc). Свеж раствор *1,1-дифенил-2-пикрил-хидразида* се до употребе чува у фрижидеру, у нормалном суду заштићеном са алуминијумском фолијом.

У стаклене епрувете се одмери по 1 mL 0.3 mM DPPH раствореног у етанолу и по 2.5 mL екстракта различитих концентрација. Након 30 минута на собној температури мери се умањење апсорбанце раствора на таласној дужини од 517 nm у односу на бланко пробу. Процент инхибиције се израчунава по формули (4):

$$\% \text{ Инхибиције} = \frac{A_{\text{бланк}} - A_{\text{узорак}}}{A_{\text{бланк}}} \times 100 \quad (4)$$

где је $A_{\text{бланк}}$ апсорбанца DPPH без метанолског екстракта биљке *C. coggygia* и $A_{\text{узорак}}$ апсорбанца DPPH са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*.

3.2.5.2. Одређивање Fe^{2+} хелационе активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* у *in vitro* условима

Способности метанолског екстракта биљке *C. coggygia* да врши инхибицију стварања комплекса Fe^{2+} - ферозин одређена је методом по Decker и Welch (136).

Поступак

Припреми се серија раствора метанолског екстракта и стандарда етилен диамин тетра ацетичне киселине (енг. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) у метанолу.

У 1 mL екстракта различитог разблажења додаје се 3.7 mL метанола, 0.1 mL 2 mM раствора FeCl_2 и 0.2 mL 5 mM раствора ферозина. Смеша се остави да одстоји 10 минута на собној температури након чега се мере апсорбанце на 562 nm (у односу на метанол као бланко пробу, тј. стандард). Способност метанолског екстракта да у наведеним експерименталним условима хелатизује феро-јон рачуна се према једначини (5):

$$\text{Хелациони ефекат (\%)} = \frac{1 - A_{\text{узорка}}}{A_{\text{бланк}}} \times 100 \quad (5)$$

3.2.5.3. Одређивање редуктивне активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* у *in vitro* условима

Редуктивна способност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* одређена је применом методе по Oyaizu (137).

Поступак

У 0.3 mL екстракта додаје се 0.3 mL 1% калијум ферицијанида и 0.3 mL 200 mM фосфатног пуфера (pH 6.6). Након инкубирања 20 минута на 50°C и хлађења на собној температури, додаје се 0.3 mL 10% трихлорсирћетне киселине и центрифугира се 10 минута

на 1000 x g. Аликвотира се 0.6 mL супернатанта и помеша се са 0.12 mL 0.1% фери-хлорида и 0.6 mL дејонизоване воде. Смеша се остави да одстоји 10 минута на собној температури и мери се апсорбанца на 700 nm. Редуктивна активност цистеина је коришћена као стандард.

3.2.6. Одређивања биохемијских параметара у серуму пацова у *in vivo* условима

У серуму су одређене концентрације ензима аспартат аминотрасферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT) и алкалне фосфатазе (ALP), количина укупног билирубина и гвожђа. Сви параметри су одређени према клиничким протоколима Интернационалне Федерације за Клиничку Хемију (енг. *International Federation of Clinical Chemistry*, IFCC).

Третман

У овом експерименту су коришћени пацови соја Wistar који су 2 или 12 сати пре апликације 100 mg/kg пирогалола, раствореног у физиолошком раствору, интраперитонеално третирани са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (500 mg/kg), или са еквивалентном дозом мирицетина, док су контролне животиње третиране са физиолошким раствором или пирогалолом. Након третмана животиње су жртвоване, прикупљена је крв, центрифугирана на 3000 x g (Sorval центрифуга, ротор SS-34, DJB Labace Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, УК), 10 минута на 4°C. Серум у виду супернатанта изнад талог крвних ћелија је аликвотиран и чуван на -20°C.

3.2.6.1. Одређивање концентрације аспартат-аминотрасферазе (AST)

Каталитичка концентрација аспартат-аминотрансферазе мери се на основу реакције трансминације аспартата и редукције насталог оксал-ацетата (138).

Поступак

Реагенс А (пуфер/ензим реагенс):

Tris-HCl пуфер 100 mmol/L, pH 7.8,

L-Aspartate 300 mmol/L,

лактат дехидрогеназа ≥ 900 У/L,

малат дехидрогеназа ≥ 600 У/Л;

Реагенс Б (супстрат):

α -кетоглутарат 60 mmol/L и

NADH 0.9 mmol/L и

Радни реагенс:

Аликвот од 1 mL реагенса Б се помешаса 1 mL реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одпипетира се 100 μ L серума и 1000 μ L радног реагенса. Раствор се пажљиво промеша и након 1 минута се унесе у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и чита апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца се поново читава након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између узастопних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама по минути (ΔA /мин). Каталитичка активност AST-а рачуна се по формули (6):

$$\frac{\Delta A}{\text{МИН}} \times \frac{V_T \times 10^6}{\epsilon \times I \times V_c} = U/L \quad (6)$$

где је V_T укупна запремина раствора, V_c запремина анализираног узорка, ϵ моларна апсорбанца NADH на 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}}=6300$), I дебљина кивете од 1 cm, 1 U/L износи 0.0166 μ кат.

3.2.6.2. Одређивање концентрације аланин-аминотрансферазе (ALT)

Каталитичка концентрација аланин-аминотрансферазе мери се на основу реакције трансминације L-аланина и редукције насталог пирувата (139).

Поступак

Реагенс А (пуфер/ензим реагенс):

Tris-HCl пуфер 150 mmol/L pH 7.5,

L-Ala 750 mmol/L,

лактат дехидрогеназа ≥ 1200 У/Л;

Реагенс Б (супстрат):

α -кетоглутарат 90 mmol/L и

NADH 0.9 mmol/L и

Радни реагенс:

Аликвот од 1 mL реагенса Б се помеша са 1 mL реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одпипетирати 100 μ L серума и 1000 μ L радног реагенса. Раствор се пажљиво промеша и након 1 минута се унесе у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и прочита апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца се поново читава након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између узастопних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама по минути ($\Delta A/\text{мин}$). Каталитичка активност ALT рачуна се по формули (6).

3.2.6.3. Одређивање концентрације алкалне фосфатазе (ALP)

Каталитичка активност алкалне фосфатазе мери се на основу реакције хидролитичке дефосфорилације р-нитрофенолфосфата (140).

Поступак

Основни реагенси за одређивање каталитичке активности ALP припремају се мешањем следећих реагенаса:

Реагенс А:

AMP 420 mmol/L,
магнезијум-ацетат 2.4 mmol/L,
ZnSO₄ 1.2 mmol/L,
HEDTA 2.4 mmol/L, (pH=10.7),

Реагенс Б (супстрат):

4-нитрофенилфосфат (4-NPP) 16.3 mmol/L,

Радни реагенс:

Аликвот од 1 ml реагенса Б се помеша са 1 mL реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одпипетирати 20 μ L серума и 1000 μ L радног реагенса. Раствор се пажљиво промеша и након 1 минута се унесе у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и прочита апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца се поново читава након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између

узастопних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама по минути ($\Delta A/\text{мин}$). Каталитичка активност ALP рачуна се по формули (7):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} 2757 = U/L \quad (7)$$

3.2.6.4. Одређивање концентрације укупног билирубина

Билирубин реагује са диазо-једињењима градећи црвено обојени комплекс. Реакција се прекида додатком аскорбинске киселине која разара преосталу диазо боју. Концентрација укупног билирубина у серуму одређује се додатком Фелинговог раствора II при чему комплекс мења боју из црвене у плаву (141).

Поступак

Реагенс А:

кофеин-бензоат (260 mmol/L кофеина, 964 mmol/L натријум-ацетата, 520 mmol/L натријум-бензоата и 2.69 mmol/L Na₂EDTA);

Реагенс Б:

диазо реагенс I (29 mmol/L сулфанилне киселине, 175 mmol/L HCl),

диазо реагенс II (72 mmol/L натријум-нитрита);

10 mL реагенса I помеша се са 0.25 mL реагенса II;

Реагенс В:

аскорбинска киселина 227 mmol/L и

Реагенс Г (Фелинг II):

K₂Na-тартарат 1.24 mmol/L, NaOH 2.5 mol/L.

Раствор за одређивање укупног билирубина припрема се мешањем 2.0 mL реагенса А, 1.0 mL серума и 0.5 mL реагенса Б. Раствор се добро измеша и остави да остоји 10 минута након чега се додаје 0.1 mL реагенса В и 1.4 mL реагенса Г. Слепа проба припрема се мешањем 2.0 mL реагенса А, 0.1 mL реагенса В и 0.5 mL реагенса Б. Раствор се добро измеша и остави да стоји 10 минута након чега се додаје 1.4 mL реагенса Г. Укупни билирубин одређује се према формули (8):

$$(A_{y6} - A_{cn}) \times 73,5 = \mu\text{mol/L} \quad (8)$$

3.2.6.5. Одређивање концентрације гвожђа у серуму пацова соја Wistar

Ниво гвожђа у серуму мерена је применом Ferrimat кита (bioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, France), који омогућава колориметријско одређивање гвожђа у серуму и плазми без депротеинизације. Метода је заснована на дисоцијацији тровалентног гвожђа од свог носача трансферина у киселој средини и редукцији у двовалентну форму. Двовалентно гвожђе са хелатором (ферозином) гради плаво обојени комплекс. Интензитет боје, мерен на 590 nm, је директно пропорционалан концентрацији гвожђа у узорку. Концентрација гвожђа у узорку је одређена поређењем оптичке густине на 590 nm са стандардном кривом. С обзиром да се тровалентно гвожђе редукује у двовалентно, мерена је укупна концентрација гвожђа. Да би се утврдила концентрација слободног двовалентног гвожђа у серуму (на супрот укупном гвожђу), спроведена је иста процедура као и за одређивање укупног гвожђа осим што је редуктант (хидроксиламин) искључен из поступка.

Поступак

Реагенс 1:

Стандард гвожђа,

Реагенс 2:

Гуанидин хидрохлорид 4.5 mol/L,

хидроксиламин 230 mmol/L,

ацетатни пуфер 44.4 mmol/L pH 5.0,

Реагенс 3:

Ферозин и ацетатни пуфер 44.4 mmol/L pH 5.0.

Бланко проба припрема се мешањем 1.5 mL реагенса 3, 150 μ L реагенса 2 и 0.5 mL дестиловане воде која не садржи гвожђе. Узорак за анализу припрема се мешањем 1.5 mL реагенса 3, 150 μ L реагенса 2 и 0.5 mL серума. Стандардни раствор припрема се мешањем 1.5 mL реагенса 3, 150 μ L реагенса 2 и 0.5 mL реагенса 1. Након инкубације 40 минута на собној температури читају се апсорбанце на 590 nm.

3.2.7. Квантитативна анализа акутно фазних протеина Нр и $\alpha_2\text{M}$

3.2.7.1. Релативна концентрација акутно фазних протеина Нр и $\alpha_2\text{M}$ у серуму пацова соја Wistar

За анализу протеина серума пацова коришћена је метода једнодимензионалне ("Rocket") имуноелектрофорезе по модификованој методи Laurell-а (142). Метода се заснива на имунопреципитационој реакцији антиген - антитело у агарозном гелу на месту оптималног односа антигена и антитела. Антиген, односно протеин из серума, преципитира у агарозном гелу који садржи моноспецифично антитело искључиво на тај протеин. Концентрација антигена у узорку пропорционална је висини преципитационог лука и користи се за квантитативно одређивање антитела.

Третман

За мерење нивоа акутно фазних протеина Нр (хаптоглобин) и $\alpha_2\text{M}$ (α_2 -макроглобулин) у серуму, 30 пацова соја Wistar је подељено у шест група са по пет пацова у свакој групи. Једна група пацова, третирана интраперитонеално са физиолошким раствором, представља негативну контролу. Једна група је третирана са терпентинским уљем, 1 μL по граму телесне тежине пацова, у циљу индуковања акутно фазног одговора. Преостале четири групе пацова једнократно су третиране са *C. coggygia* метанолским екстрактом у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе. Животиње су жртвоване у различитим временским интервалима: контролна група и терпентином третиране животиње 24 сата након третмана, а преостале четири групе третиране са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12, 24, 48 и 72 сата након третмана. Након декапитације пацова узета крв је центрифугирана на 3000 x g (Sorval центрифуга, ротор SS-34, DJB Labace Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, UK), 10 минута на 4°C. Серум у виду супернатанта изнад талога крвних ћелија је аликвотиран и чуван на -20°C до употребе.

Поступак

На стаклене плочице се наноси 1% агароза у Tris-барбиталном пуферу (70 mM Tris-HCl pH 8.6, 20 mM барбитал, 3 mM Na-азид, 0.4 mM Са-лактат) у коју је претходно додата одговарајућа количина моноспецифичног антитела на Нр и $\alpha_2\text{M}$. Након полимеризације

агарозног гела наносени су узорци серума (10 μg) претходно разблажени на адекватан начин (1:15 в/в) у Tris-барбиталном пуферу. Електрофореза је текла у истом пуферу преко ноћи, при сталној волтажи од 100 V уз непрекидно хлађење апаратуре циркулишућом чесменском водом. На месту оптималног односа антигена и антитела формиран су комплекси у облику лукова. По завршној електрофорези гелови су испирани два сата са концентрованим PBS пуфером (340 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄, 70 mM KH₂PO₄, pH 7.2) ради уклањања непреципитованих протеина, а затим у води ради уклањања соли. Гелови су фиксирани на стаклене површине, осушени уклањањем воде помоћу вишеструких слојева филтер папира и сушени на 60°C. Гелови су бојени бојом Coomassie плаво R (0.25% боја, 40% метанол и 7% сирћетна киселина) и одбојени у одбојивачу (40% метанол и 7% сирћетна киселина). Квантификовање протеина је вршено пресликавањем лукова на милиметарском папиру и мерењем захваћене површине испод преципитационог лука. Релативна промена у концентрацији испитиваног протеина у серуму је изражена као однос између вредности за контролне (100%) и третиране пацове.

3.2.8. Одређивање концентрације липидних пероксида применом TBARS есеја у јетри и серуму пацова у *in vivo* условима

TBARS (енг. *thiobarbituric acid reactive substances*) есеј се заснива на реакцији малондиалдехида са тиобарбитурном киселином (ТБА) на 95°C. Ниво TBARS-а је одређен у јетри и серуму по методи Ohkawa и сарадника (143).

Третман

Двадесет пет пацова соја Wistar је подељено у пет експерименталних група, са по пет пацова у свакој групи. Прва група животиња, негативна контрола, третирана је са физиолошким раствором. Друга група животиња је третирана са пирогалолом (100 mg/kg). Трећа експериментална група је третирана интраперитонеално са једном дозом од 500 mg/kg телесне масе метанолског екстракта биљке *C. coggygia* 2 сата пре третмана са пирогалолом, а четврта група са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре третмана са пирогалолом. Пета експериментална група је третирана интраперитонеално са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (500 mg/kg телесне масе). Након третмана животиње су жртвоване, 500 mg јетре се изолује, испере са 0.9% NaCl и хомогенизује са 4.5 mL 0.15 mol/L KCl. Прикупљена крв се центрифугира на 3000 x g (Sorval центрифуга, ротор SS-34, DJB

Labace Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, UK), 10 минута на 4°C. Серум, у виду супернатанта изнад талога крвних ћелија, је аликвотиран и чуван на -20°C.

Поступак

У 0.1 mL аликвота хомогената јетре или серума додаје се 0.2 mL 8.1% SDS-а, 1.5 mL 20% сирћетне киселине (pH 3.5), 1.5 mL 0.8% ТВА, 0.7 mL воде и инкубира 60 минута на 95°C. Након хлађења на собној температури, додаје се 1 mL воде и 5 mL n-бутанол-пиридина (у запреминском односу 15:1), а затим се центрифугира 10 минута на 3000 x g. Апсорбанце црвено обојеног супернатанта се мере на 532 nm. Калибрациона крива је припремљена уз малондиалдехид као стандард (концентрација малондиалдехида је у опсегу од 25 nmol/mL до 1 μmol/mL).

3.2.9. Одређивање активности антиоксидативних ензима у јетри пацова у *in vivo* условима

Антиоксидативни систем има значајну улогу у заштити при ћелијским оштећењима. Примарни антиоксиданси спречавају стварање реактивних врста кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS) и представљају прву линију одбране ћелија од оксидативног стреса. Посебно су значајни тзв. антиоксидативни ензими и њихова улога у регулацији и одбрани организма од нежељених дејстава слободних радикала. Главни антиоксидативни ензими су: супероксид дизмутаза (енг. *superoxide dismutases*, SOD) са три изоензима; интрацелуларни: бакар-цинк супероксид дизмутаза (енг. *copper-zinc superoxide dismutases*, CuZn-SOD), митохондријски: манган супероксид дизмутаза (енг. *manganese superoxide dismutases*, Mn-SOD) и екстрацелуларни: EC-SOD; каталаза (енг. *catalase*, CAT) и глутатион-С-трансфераза (енг. *glutathione S-transferase*, GST).

Третман

Експеримент је обухватио двадесет и пет животиња подељених у пет експерименталних група, са по пет животиња у свакој групи. Прва група је третирана са физиолошким раствором, друга са пирогалолом (100 mg/kg), а трећа и четврта са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (500 mg/kg) 2 и 12 сати пре третмана са пирогалолом. Пета експериментална група је третирана интраперитонеално само са метанолским екстрактом

биљке *C. coggyria* (500 mg/kg). Након третмана животиње су жртвоване, одстрањене су јетре и по 300 g од сваке јетре је хомогенизовано у 0.25 mol/L сахарозе, 0.1 mol/L EDTA и 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4. У току хомогенизације посуда за хомогенизацију је хлађена на +4°C, а клип и посуда су после сваке јетре испирани физиолошким раствором. Након сонификације (три пута по 15 секунди са паузама од 10 секунди, 20 kHz), узорци су центрифугирани 90 минута на 100 000 x g у Beckmann Ti 50 центрифуги (Beckman Coulter, Inc., Miami, Fla., USA). Добивени супернатант је аликвотиран и чуван на -80°C.

Поступак

Да би се изразила активност антиоксидативних ензима по mg протеина, концентрације протеина су колориметријски одређене према методи Lowry и сарадника (144). Метода се заснива на биуретској реакцији пептидних веза протеина и купри јона у алкалној средини и реакцији фосфомолибденско-фосфоволфрамовог реагенса са тирозином и триптофаном садржаним у испитиваним протеинима. Узорак запремине 2 μ L разблажен је са водом до финалне запремине од 200 μ L и помешан са 1 mL свеже припремљеног раствора који се добија мешањем 1 mL 1% CuSO₄·5H₂O, 1 mL 2% K-Na-тартарата и 98 mL 2% Na₂CO₃ у 0.1 N NaOH. Након 10 минута на собној температури узорцима је додат Фолинов реагенс разблажен у односу 1:2 (в/в) са дестилованом водом. После 10 минута, колико је потребно да се развије боја, мерене су апсорпције узорака на 750 nm наспрам "слепе" пробе на спектрофотометру (Shimatzu UV-160).

Активност укупне SOD, заснована на способности SOD да инхибира аутооксидацију епинефрина до адренохрома (изражена као U/mg протеина), је мерена методом описаном од стране Misra и Fridovich (145). Активност манган-SOD (MnSOD) је одређена након преинкубације са 8 mmol/L KCN, док је активност бакар-цинк-SOD (CuZnSOD) израчуната из разлике између укупне SOD и MnSOD активности. Активност каталазе (CAT) је одређена праћењем брзине декомпозиције водоник пероксида и изражена је као μ mol H₂O₂/min/mg протеина (146). Активност ензима GST у хомогенату јетре је одређена методом Habig и сарадника (147), коришћењем 1-хлоро-2,4-динитробензена (CDNB) као супстрата, а изражена је у nmol GSH/min/mg протеина.

3.2.10. Квантитативна анализа експресије протеина

Western блот анализа подразумева трансфер биолошких узорака са гела на мембрану, као и њихову детекцију на површини мембране уз примену антитела. Специфичност антиген-антитело реакције омогућава да се у смеси различитих протеина детектује циљни протеин.

Третман

Четрдесет пацова соја Wistar је подељено у осам експерименталних група, са по пет пацова у свакој групи. Прва група животиња, негативна контрола, третирана је са физиолошким раствором (0.9% NaCl). Животиње у другој експерименталној групи су интраперитонеално третиране са пирогалолом (100 mg/kg телесне масе). Трећа експериментална група је третирана само са метанолским екстрактом биљке *C. coggyria* у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе, четврта са екстрактом 2 сата пре третмана са пирогалолом, а пета група са метанолским екстрактом 12 сати пре третмана са пирогалолом. Шеста експериментална група је третирана интраперитонеално само са мирицетином, седма са мирицетином 2 сата, а осма 12 сати пре аплицирања пирогалола. Након третмана животиње су жртвоване и јетре су уклоњене и обрађене како би се добили хомогенати.

Око 300 mg јетре пацова је хомогенизовано на 4°C у 2 mL претходно охлађеног пуфера за изолацију (10 mmol/L Tris, pH 7.6, 1 mmol/L EDTA, 250 mmol/L сахарозе) који садржи смешу инхибитора протеазе (Protease inhibitor, Mix G; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Узорци су центрифугирани 20 минута на 9700 x g, на 4°C у Eppendorf центрифуги. Супернатант је аликвотиран у епендорфе и подвргнут дубоком замрзавању на -80°C у течном азоту.

3.2.10.1. Електрофоретско раздвајање протеина

За раздвајање и карактеризацију протеина коришћена је техника једнодимензионалне електрофорезе на полиакриламидном гелу у присуству содиум-додецилсулфата (SDS). Ову методу, која се заснива на раздвајању протеина на основу њихових молекулских маса, поставио је Laemmli (148).

SDS-полиакриламидна гел електрофореза је систем са великом моћи раздвајања протеинских фракција захваљујући чињеници да полиакриламидни гел служи као инертни матрикс кроз који се протеини крећу под утицајем електричног поља, при чему величина пора гела зависи од његовог процента, тако да се поре могу прилагођавати маси протеина.

Сами протеини су ресуспендовани у раствору у коме се налази SDS који се везује за хидрофобне регионе протеинских молекула одвијајући их у ланчasti облик. Како сваки молекул протеина везује велики број молекула SDS-а, читав молекул постаје негативно наелектрисан и креће се у електричном пољу ка позитивном полу. У полиакриламидном гелу, који служи као молекулско сито, комплексна мешавина протеина се раздваја у низ дискретних трака које постају видљиве након бојења.

Током експеримента коришћен је полиакриламидни гел који садржи 12% акриламида, 0.3% метилен-бис-акриламида, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS и 4 M уреу. Гел је полимеризован уз додатак 0.05% TEMED-а и 0.02% амониум персулфата. Гел за сконцентрисавање узорака је 4% и садржи 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% APS и 0.1% TEMED. На гел је наношено по 20 μ g хомогената јетре, растворених у пуферу за узорак који садржи 5% SDS, 5 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM DTT и 20% глицерола. Као пуфер за електрофорезу коришћен је Tris-глицински пуфер pH 8.8 (0.192 M глицин, 25 mM Tris-HCl, 0.1% SDS). Електрофореза је трајала 1 сат на 0.12 kV кроз гел за сконцентрисавање, односно на 0.15 kV кроз гел за раздвајање протеина и рађена је у БиоРад систему (Mini-Protein II, Elektrophoresis Cell).

3.2.10.2. Бојење протеина на полиакриламидном гелу

По завршеној полиакриламидној електрофорези, протеини из контролних јетри и јетри третираних пацова су бојени у смеси која садржи 0.1% боју Coomassie-plavo (Coomassie brilliant blue R-250), метанол, воду и глацијалну сирћетну киселину у запреминском односу 2.5:2.5:1. Након бојења, преко ноћи, вршено је одбојавање гела у мешавини метанола, воде и глацијалне сирћетне киселине у запреминском односу 5:5:1.

3.2.10.3. Пренос протеина на PVDF мембране

Након раздвајања на једнодимензионалној електрофорези протеини су преношени на поливинилиден-флорид (PVDF) мембране (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Schenectady, N.Y., USA). Овај трансвер протеина са гела на мембране обављен је у апарату за трансфер БиоРад (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Након електрофорезе гел и мембране су инкубирани 90 минута у пуферу за трансфер (0.3% Tris бaze, 1.4% глицин, 20% метанол). Електро-пренос је вршен на 0.03 kV преко ноћи. По завршеном трансферу мембране су бојене бојом Ponceau-S (1% Ponceau-S у 5% сирћетној киселини), а гел

Сомассије-плавим ради провере исправности тока трансфера и електрофорезе. Мембране су чуване на 4°C до употребе у имуно-блот анализи.

3.2.10.4. Western имуно-блот анализа за различита антитела

Квантитативна анализа експресије протеина рађена је по модификованој методи Towbin и сарадника (149). Суштина ове методе је да се, након електрофоретског раздвајања протеина и њиховог пребацавања на мембране, примарно антитело везује за протеине, а секундарно антитело препозна антигене детерминанте на примарном антителу.

Мембране су инкубиране 30 мин у 0.05% Tween 20 и 3% немасном млеку у TBS пуферу (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl), а затим са полиспецифичним антителом за NF-κB p65, фосфорилисаним NF-κB p65 (Ser311) (pNF-κB), Akt 1/2/3, фосфорилисаним Akt 1/2/3 (Ser 473) (pAkt), α₂-макроглобулином (α₂M), тубулином (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA), и хаптоглобулином (Hp) (Sigma–Aldrich Inc., Milwaukee, Wis., USA) у раствору TBS-Tween два сата на собној температури. По завршеној инкубацији, мембране су испране неколико пута по 5 мин у раствору TBS-Tween и инкубиране са одговарајућим секундарним антителом коњугованом пероксидазом (IgG-HRP, sc-2379, Santa Cruz Biotechnology). Секундарно антитело коришћено је у разблажењу 1:1000 (в/в) у раствору TBS-Tween, током инкубације од једног сата на собној температури. Невезана секундарна антитела су потом одстрањена испирањем неколико пута по 5 мин у раствору TBS-Tween и два пута у самом TBS-у. Визуализација сигнала је постигнута луминол реагенсом (Santa Cruz Biotechnology), а квантификација са TotalLab (Phoretik) софтвером (верзија 1.10) у односу на тубулин или актин.

3.2.11. Статистичка обрада података

Међу дескриптивним статистичким параметрима за ниво анализираних обележја, израчуната је аритметичка средина са стандардном девијацијом (СД) или стандардном грешком (СМЕ), са 95% интервалом поверења. Статистички значајна разлика утврђена је на нивоу грешке од 5% ($p < 0.05$). За тестирање статистичке значајности коришћен је Студентов т тест за зависне узорке, Тестирање разлике између пропорција - разлика између великих независних узорака (150) и анализа варијансе (ANOVA тест). За статистичку обраду података коришћен је компјутерски софтверски програм SPSS верзија 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Хемијски састав метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

4.1.1. Спектофотометријско одређивање полифенолних једињења у екстракту биљке *Cotinus coggygia*

У Табели 2 приказани су резултати спектрофотометријског одређивања полифенолних једињења у метанолском екстракту биљке *C. coggygia*.

Садржај укупних фенола износи 3.78 mg по g биљке, укупних флавоноида 8.29 mg по g биљке, док је садржај кондензованих танина и галотанина 1.24 и 0.53 mg по g биљке, респективно.

Табела 2. Садржај укупних фенола, флавоноида и танина у метанолском екстракту биљке *Cotinus coggygia*

<i>Cotinus coggygia</i>	Укупни феноли	Укупни флавоноиди	Кондензовани танини	Галотанини
метанолски екстракт	(mg ГК/g биљке) ^a 3.78 ± 0.19	(mg РУ/g биљке) ^b 8.29 ± 0.37	(mg ГК/g биљке) ^b 1.24 ± 0.35	(mg ТК/g биљке) ^г 0.53 ± 0.03

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

^a милиграми еквивалената галне киселине (ГК) по граму сувог биљног материјала;

^b милиграми еквивалената рутина (РУ) по граму сувог биљног материјала;

^b милиграми еквивалената галне киселине (ГК) по граму сувог биљног материјала;

^г милиграми еквивалената танинске киселине (ТК) по граму сувог биљног материјала.

4.1.2. HPLC анализа метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Квалитативна и квантитативна анализа метанолског екстракта биљке *C. coggygia* извршена је применом поступка течне хроматографије под високим притиском.

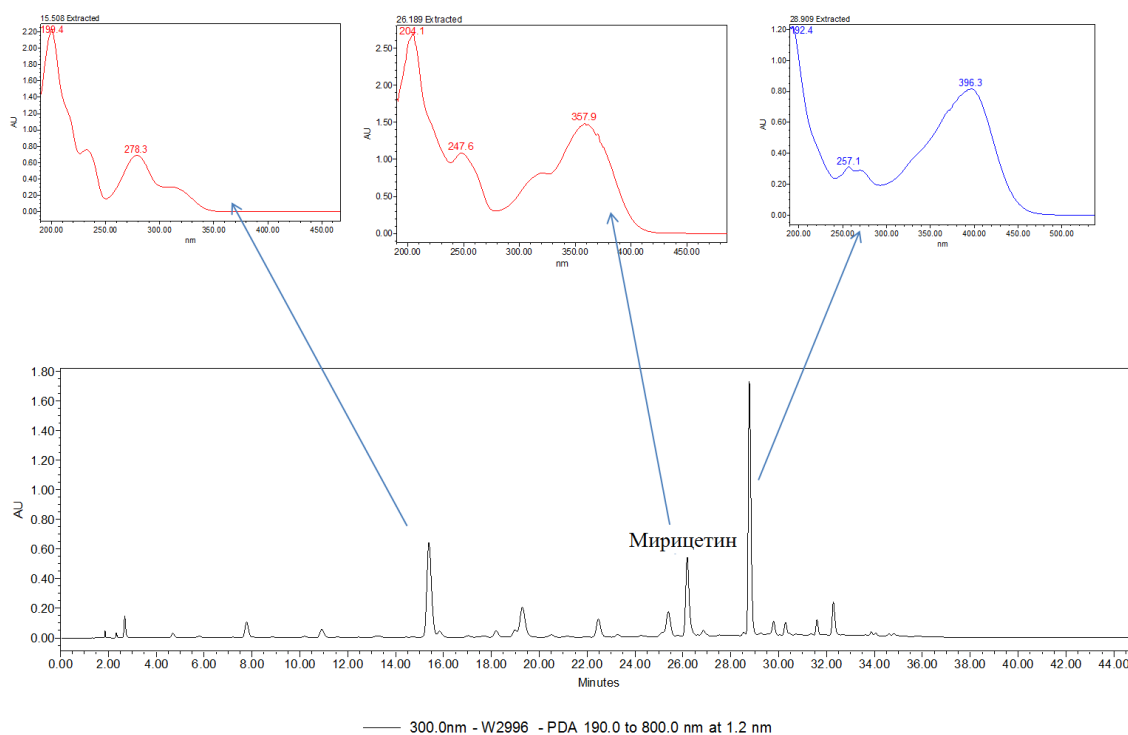
Табела 3. Квалитативни и квантитативни састав метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Екстракт биљке <i>Cotinus coggygia</i>	Садржај (µg/g екстракта) ^a
Рузмаринска киселина	18.55 ± 0.50
Кумаринска киселина	1.75 ± 0.51
Хлорогенска киселина	1.55 ± 0.04
Ферулна киселина	1.15 ± 0.36
Кафена киселина	0.75 ± 0.32
Мирицетин	511.50 ± 0.50
Кверцетин	69.80 ± 0.44
Кемпферол	8.90 ± 0.15
Резвератрол	2.65 ± 0.11
Рутин	0.25 ± 1.05

^aРезултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента

Квалитативном HPLC анализом метанолског екстракта биљке детектовано је присуство флавоноида и фенолних киселина (Табела 3). У поређењу са осталим квантификованим једињењима, својим садржајем се издвајају флавоноиди мирицетин са 511.50 µg/g и кверцетин са 69.80 µg/g. Од укупно пет детектованих фенолних киселина са 18.55 µg/g најзаступљенија је фенолкарбонска рузмаринска киселина.

Из приказаног хроматограма (Слика 9) може се видети да је, при наведеним условима, испитивани екстракт раздвојен на више компонената, међу којима је и мирицетин.



Слика 9. HPLC-хроматограм метанолског екстракта биљке *Cotinus coggyria*

4.2. Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggyria* на функцију генетичког материјала код различитих модел организама

Са фитомедицинске тачке гледишта процена генотоксичности је од нарочитог значаја јер генотоксични ефекат хемикалија или комплексне мешавине може бити од кључне важности.

У традиционалној медицини целе биљке или микстуре биљака имају већу примену у односу на изоловане компоненте. Биљни екстракти често показују значајнију *in vitro* или/и *in vivo* активност у односу на изоловане компоненте у еквивалентној концентрацији.

Имајући у виду да је квалитативном HPLC анализом метанолског екстракта детектовано да се мирицетин у поређењу са осталим квантификованим једињењима издваја својим садржајем, осим ефекта метанолског екстракта биљке *C. coggyria* на функцију генетичког материјала код различитих модел организама испитан је и утицај мирицетина у *in vivo* условима применом SLRL методе и Комет теста користећи *D. melanogaster* и пацове соја Wistar као модел организме.

4.2.1. Тест за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма *Drosophila melanogaster* у *in vivo* условима

Фреквенца герминативних мутација изазваних етил метаносулфонатом у концентрацији од 0.75 ppm знатно је виша од фреквенце мутација индукованих сахарозом, као негативном контролом. У односу на третман са сахарозом, екстракт биљке *C. coggygia* индуковао је рецесивне леталне Х-везане мутације у две герминативне ћелијске линије, у сперматозоидима и сперматоцитама, док су се сперматиде показале као отпорније (Табела 4). У поређењу са ЕМС-ом, као позитивном контролом, екстракт биљке *C. coggygia* је индуковао мутације у сперматоцитама, док су се сперматозоиди и сперматиде показале као отпорније на 5% метанолски екстракт (Табела 4).

Табела 4. Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*

	Сахароза ^а	ЕМС ^б	Сс екстракт ^в	$t_{\text{сахароза/ЕМС}}$	$t_{\text{сахароза/Сс екстракт}}$	$t_{\text{ЕМС/Сс екстракт}}$
I легло Σ	300	221	269	9.51	5.45	5.26
Број летала	5	73	34	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
% летала	1.67	33.03	12.64			
II легло Σ	269	161	284	8.38	2.57	7.04
Број летала	5	54	17	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.05^*$	$p < 0.001^{***}$
% летала	1.86	33.54	5.99			
III легло Σ	252	117	252	5.85	5.72	1.92
Број летала	6	30	43	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.5$
% летала	2.38	25.64	17.06			
I+II+III Σ	821	499	805	13.81	8.15	7.92
Број летала	16	157	94	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
% летала	1.95	31.46	11.67			

^а Сахароза; негативна контрола, 1%;

^б ЕМС; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 0.75 ppm;

^в Сс екстракт; метанолски екстракт биљке *Cotinus coggygia*, 5%.

Статистички значајне разлике: $p < 0.05^*$; $p < 0.001^{***}$

Пост-третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 2% утицао је на смањење генотоксичности ЕМС-а у две герминативне ћелијске линије (сперматозоиди и сперматиде) у односу на позитивну контролну групу (Табела 5).

Табела 5. Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са етил метаносулфонатом и метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*

Третман	I легло Σ Број летала % летала	II легло Σ Број летала % летала	III легло Σ Број летала % летала	I+II+III Σ Број летала % летала
Сахароза ^a	300	269	252	821
негативна контрола (1%)	5 1.67	5 1.86	6 2.38	16 1.95
ЕМС ^b	276	201	146	623
позитивна контрола (0.75 ppm)	91 32.97	67 33.33	37 25.34	195 31.30
ЕМС (0.75 ppm) + <i>C. coggygia</i> (2%) пост-третман	214 52 24.30	123 16 13.01	107 22 20.56	444 90 20.27
	10.79	9.10	6.11	14.50
$t_{\text{сахароза/ЕМС}}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
	7.53	3.55	4.52	9.23
$t_{\text{сахароза/ пост-третман}}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
	2.17	4.45	0.84	4.15
$t_{\text{ЕМС/пост-третман}}$	$p < 0.05^*$	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.5$	$p < 0.001^{***}$

^a Сахароза; негативна контрола, 1%;

^b ЕМС; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 0.75 ppm;

Статистички значајна разлика: $p < 0.05^*$; $p < 0.001^{***}$

Иако је третман са ЕМС-ом довео до значајног повећања у учесталости мутација у сва три легла, пост-третман са мирицетином (Табела 6) драстично је редуковао фреквенцу рецесивно

леталних X-везаних мутација, како у премејотичким, тако и у постмејотичким герминативним ћелијским линијама. У односу на негативну контролу, пост-третман са мирицетином статистички значајно је утицао на смањење генотоксичности ЕМС-а у све три герминативне ћелијске линије: сперматозоиди, сперматиде и сперматоците.

Табела 6. Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са мирицетином

	Сахароза ^а	ЕМС ^б	М ^в	$t_{\text{сахароза/ЕМС}}$	$t_{\text{сахароза/ЕМС + М}}$	$t_{\text{ЕМС/ЕМС + М}}$
I легло Σ	150	110	92	6.9	0.13	6.72
Број летала	3	37	2	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.0	33.03	2.17			
II легло Σ	135	81	61	6.20	0.23	5.81
Број летала	3	27	1	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.22	33.33	1.64			
III легло Σ	126	59	49	4.03	0.16	3.8
Број летала	3	15	1	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.38	25.42	2.04			
I+II+III Σ	411	250	202	9.9	0.17	9.87
Број летала	9	79	4	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.19	31.6	1.98			

^а Сахароза; негативна контрола, 1%;

^б ЕМС; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 0.75 ppm;

^в М; мирицетин, 100 ppm.

Статистички значајне разлике: $p < 0.001^{***}$

Пост-третман са кверцетином у концентрацији од 100 ppm статистички значајно је редуковао фреквенцу рецесивно леталних X-везаних мутација индукованих након третмана са ЕМС-ом у поређењу са негативном контролом (Табела 7).

Табела 7. Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са кверцетином

	Сахароза ^а	ЕМС ^б	К ^в	$t_{\text{сахароза/ЕМС}}$	$t_{\text{сахароза/ЕМС + К}}$	$t_{\text{ЕМС/ЕМС + К}}$
I легло Σ	150	110	89	6.9	1.52	5.2
Број летала	3	37	6	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.0	33.03	6.7			
II легло Σ	135	81	72	6.2	0.8	5.1
Број летала	3	27	3	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.22	33.33	4.2			
III легло Σ	126	59	72	4.03	0.6	3.5
Број летала	3	15	3	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.38	25.42	4.2			
I+II+III Σ	411	250	233	9.9	1.5	10.0
Број летала	9	79	12	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.19	31.6	5.2			

^а Сахароза; негативна контрола, 1%;

^б ЕМС; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 0.75 ppm;

^в К; кверцетин, 100 ppm.

Статистички значајне разлике: $p < 0.001^{***}$

Третман са рузмарином киселином 24 сата након третмана са ЕМС-ом редуковао је фреквенцу полно везаних рецесивно леталних мутација са високом сигнификантношћу ($p < 0.001^{***}$) у сва три легла. У поређењу са негативном контролом ова фенолна киселина је показала способност заштите ДНК од оштећења изазваног третманом са алкилирајућим агенсом (Табела 8).

Табела 8. Учесталост полно везаних рецесивно леталних мутација након третмана мужјака врсте *Drosophila melanogaster* са рузмаринском киселином

	Сахароза ^а	ЕМС ^б	РК ^в	$t_{\text{сахароза/ЕМС}}$	$t_{\text{сахароза/ЕМС + РК}}$	$t_{\text{ЕМС/ЕМС + РК}}$
I легло Σ	150	110	80	6.9	0.24	6.6
Број летала	3	37	2	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.0	33.03	2.5			
II легло Σ	135	81	91	6.2	0.65	6.4
Број летала	3	27	1	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.22	33.33	1.1			
III легло Σ	126	59	73	4.03	0.25	3.7
Број летала	3	15	2	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.38	25.42	2.7			
I+II+III Σ	411	250	244	9.9	0.17	9.7
Број летала	9	79	5	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
% летала	2.19	31.6	2.1			

^а Сахароза; негативна контрола, 1%;

^б ЕМС; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 0.75 ppm;

^в РК; рузмаринска киселина, 100 ppm.

Статистички значајне разлике: $p < 0.001^{***}$

4.2.2. Алкална верзија Комет теста код *Drosophila melanogaster* у *in vivo* условима

Применом алкалне верзије Комет есеја утврђен је степен оштећења ДНК на основу квалитативне анализе дужине репа и квантитативних параметара (% ДНК у репу и дужина репа) у соматским ћелијама ларви врсте *D. melanogaster*.

Расподела комет класа након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. corymbosa* приказана је у Табели 9. У односу на негативну контролу, ларве третиране са ЕМС-ом показују висок ниво генотоксичности са доминацијом класа 2, 3 и 4 (максимум оштећења). Анализирајући расподелу комет класа након третмана са метанолским екстрактом у концентрацији од 1%, евидентно је да су "комете" са оштећењем које се може класификовати

у класе 0 и 1 (врло низак и низак степен оштећења ДНК) најраспрострањеније и да су "комете" са средњим степеном оштећења (класа 2) ретке.

Табела 9. Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом квалитативних параметара

Третман	Ниво ДНК оштећења					Укупан скор ^б
	0	1	2	3	4	
Негативна контрола	92.1±0.72	7.9±0.40	0.00±0.3	0.00±0.00	0.00±0.00	7.9±1.8
ЕМС ^а	5.63±0.31	20.0±0.90	32.1±0.33	27.12±0.50	15.15±1.02	226.16±0.41 [*]
<i>C. coggygria</i> екстракт ^б	85.6±0.20	12.2±1.35	2.2±0.42	0.00±0.00	0.00±0.00	16.6±1.04 ^{**}

^а ЕМС; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 1 mM;

^б *C. coggygria* екстракт, *Cotinus coggygria* екстракт, 1%;

^б Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију три независна експеримента.

*p < 0.05 у поређењу са негативном контролом,

**p < 0.05 у поређењу са ЕМС-ом.

У Табели 10 приказан је ефекат метанолског екстракта биљке *C. coggygria* на основу квантитативних параметара: % ДНК у репу и дужина репа, у ћелијама које су добијене изоловањем предњег дела задњег црева ларви врсте *D. melanogaster*. Статистички значајне разлике у одабраним квантитативним параметрима, у односу на негативну контролу, се могу уочити након третмана са ЕМС-ом. *In vivo* третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygria* у концентрацији од 1% није узроковао статистички значајне промене у односу на негативну контролу.

Табела 10. Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом квантитативних параметара

	Негативна контрола	EMC ^a	<i>C. coggygria</i> екстракт ^b
% ДНК у репу	9.42±0.70	17.3±1.33*	10.17±0.51**
Дужина репа	4.21±0.99	23.1±0.32*	5.04±0.21**

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

^a EMC; етил метаносулфонат, позитивна контрола, 1 mM;

^b *C. coggygria* екстракт, *Cotinus coggygria* екстракт 1%.

* $p < 0.05$ у поређењу са негативном контролом,

** $p < 0.05$ у поређењу са EMC-ом.

4.2.3. Алкална верзија Комет теста код албино пацова соја Wistar у *in vivo* условима

Ефекат метанолског екстракта биљке *C. coggygria* у концентрацији од 500, 1000 и 2000 mg/kg телесне тежине пацова, 2, 12, 24, 48 и 72 сата након третмана, приказан је у Табели 11.

Табела 11. Генотоксичност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом Комет есеја на пацовима соја Wistar

Третман	Репни моменат				
	2	12	24	48	72
Негативна контрола	3.71±2.92	3.67±0.91	2.62±0.25	3.33±1.74	2.75±1.54
<i>C. coggygria</i> екстракт					
500 mg/kg	3.98±2.44	3.32±1.94	3.13±0.11	3.02±2.36	2.84±0.16
1000 mg/kg	17.32±1.16*	15.43±6.03*	11.72±0.13*	8.23±1.14*	6.73±0.15*
2000 mg/kg	23.51±1.08*	19.65±2.61*	17.14±0.38*	13.31±1.22*	9.71±0.32*

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу.

Статистички значајне разлике у репном моменту у односу на негативну контролу се могу уочити након третмана са испитиваном дозом екстракта биљке *C. coggygia* од 2000 mg/kg телесне тежине и са дозом од 1000 mg/kg. Насупрот томе, статистички значајно повећање у репном моменту није примећено након третмана са најнижом дозом од 500 mg/kg телесне масе у свим временским интервалима у односу на негативну контролну групу. Може се приметити да је оштећење ДНК 72 сата након третмана са 500, 1000 и 2000 mg/kg телесне тежине знатно мање него 2 сата након третмана.

Средње вредности репног момента у узорцима јетре и коштане сржи 24 и 72 сата након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500, 1000 и 2000 mg/kg телесне масе приказане су у Табели 12. У групи животиња третираних интраперитонеално са екстрактом у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе није уочена статистички значајна разлика у репном моменту у односу на контролну групу. У односу на негативну контролу, знатно повећање у репном моменту уочено је 24 и 72 сата након третмана са екстрактом у концентрацији од 1000 и 2000 mg/kg телесне масе. Треба истаћи да се 72 сата након третмана уочава благи пад у вредностима репног момента, како у јетри, тако и у коштаном сржи, у односу на репни моменат 24 сата након третмана.

Табела 12. Репни моменат 24 и 72 сата након третмана албино пацова соја Wistar са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*

Третман	Репни моменат			
	Јетра		Коштана срж	
	24	72	24	72
Негативна контрола	2.7±0.2	2.7±0.2	5.4±0.25	5.4±0.25
<i>C. coggygia</i> екстракт				
500 mg/kg	3.1±0.11	2.8±0.16	5.80±0.17	5.6±0.12
1000 mg/kg	11.7±0.13*	6.7±0.15*	16.55±0.43*	13.8±0.40*
2000 mg/kg	17.1±0.38*	9.6±0.32*	20.80±0.63*	17.5±0.36*

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу.

У узорцима јетре животиња третираних са екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе, није уочена статистички значајна разлика у укупном скору између третираних животиња и негативне контроле (Табела 13). Већина "комета" је неоштећена (класа 0), са само неколико ћелија са минималним (класа 1) и средњим оштећењем (класа 2). У узорцима јетре животиња третираних са 1000 и 2000 mg/kg констатовано је оштећење ДНК. У групи животиња третираних са екстрактом у концентрацији од 1000 mg/kg телесне масе, визуелно се може уочити присуство "комета" са знатним оштећењем (класе 3 и 4) у односу на контролну групу. Највиши ниво оштећења ДНК забележен је у групи животиња које су третиране са 2000 mg/kg телесне тежине након оба временска интервала.

Табела 13. Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* у јетри пацова соја Wistar 24 и 72 сата након третмана

Третман	Ниво ДНК оштећења					Укупан скор ^a
	0	1	2	3	4	
Негативна контрола	84.1±1.32	10.6±0.40	6.30±0.3	0.00±0.00	0.00±0.00	23.20±1.10
<i>C. coggygia</i> екстракт	24 сата након третмана					
500 mg/kg	78.8±0.42	15.6±0.44	5.60±0.16	0.00±0.00	0.00±0.00	26.80±2.30
1000 mg/kg	43.8±0.33	32.8±0.20	17.7±0.40	4.70±0.40	1.00±0.21	86.30±0.83*
2000 mg/kg	27.2±0.26	38.8±0.34	25.7±0.39	6.10±0.19	2.01±0.21	116.50±1.14*
<i>C. coggygia</i> екстракт	72 сата након третмана					
500 mg/kg	81.0±0.84	13.4±0.16	5.70±0.84	0.00±0.00	0.00±0.00	24.80±0.45
1000 mg/kg	41.6±0.26	45.0±0.42	10.1±0.18	3.10±0.24	0.00±0.00	74.50±1.14*
2000 mg/kg	30.4±0.32	47.2±0.35	16.6±0.37	2.90±0.24	1.03±0.25	92.10±1.22*

^aРезултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу.

Процент "комета" распоређених у класе, које представљају степен оштећења ДНК у узорцима коштане сржи, 24 и 72 сата након *in vivo* третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*, представљен је у Табели 14. Са доминацијом "комета" у класи 0 и готово без присуства комета у класама 1 и 2, може се констатовати да не постоји статистички значајна разлика између животиња третираних са метанолским екстрактом у концентрацији од 500 mg/kg и нетретираних животиња. Под истим околностима, у групи животиња третираних са 1000 и 2000 mg/kg телесне тежине, уочено је статистички значајно повећање у оштећењу ДНК у односу на контролну групу.

Табела 14. Генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* у коштаном сржи пацова соја Wistar 24 и 72 сата након третмана

Третман	Ниво ДНК оштећења					Укупан скор ^a
	0	1	2	3	4	
Негативна контрола	79.8±0.41	20.2±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	21.0±1.60
<i>C. coggygia</i> екстракт	24 сата након третмана					
500 mg/kg	76.4±0.48	20.4±0.43	3.20±1.51	0.00±0.00	0.00±0.00	26.8±0.24
1000 mg/kg	31.1±0.41	40.2±0.28	19.8±0.38	7.40±0.36	1.50±0.47	108.0±0.65*
2000 mg/kg	27.4±0.48	32.1±0.27	30.2±0.33	6.60±0.20	3.80±0.42	127.5±0.43*
<i>C. coggygia</i> екстракт	72 сата након третмана					
500 mg/kg	72.2±0.58	27.7±0.47	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	25.2±1.90
1000 mg/kg	42.3±0.42	47.3±0.43	8.70±0.40	1.90±0.42	0.00±0.00	70.4±1.50*
2000 mg/kg	27.2±0.40	49.5±0.45	19.10±0.2	3.20±0.23	1.01±0.26	101.3±3.60*

^aРезултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу.

Антигенотоксична активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* и мирицетина, главне компоненте екстракта, испитивана је на пацовима третираним пирогалолом, индуктором акутног оштећења јетре, у концентрацији од 100 mg/kg телесне тежине. Имајући

у виду да је применом Комет теста утврђено да доза од 500 mg/kg телесне тежине не показује генотоксичну активност, метанолски екстракт биљке *C. coggygia*, у поменутој концентрацији, аплициран је 2 и 12 сати пре третмана са пирогалолом. Мирицетин, у концентрацији која одговара концентрацији у поменутој дози екстракта, аплициран је 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом. Један сат након аплицирања пирогалолола, животиње су жртвоване.

Расподела комет класа након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* и мирицетином 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом приказана је у Табели 15. У односу на негативну контролу, у групи животиња третираних са пирогалолом уочен је висок ниво генотоксичности са доминацијом класе 3 и 4 (максимум оштећења). Анализирајући расподелу комет класа након третмана са метанолским екстрактом у концентрацији од 500 mg/kg телесне тежине и мирицетином, засебно, 2 сата пре третмана са пирогалолом, евидентно је да су "комете" са оштећењем које се може сврстати у класе 0, 1 и 2 (врло низак, низак и средњи степен оштећења ДНК, респективно) најраспрострањеније и да су "комете" са максималним оштећењем (класе 3 и 4) ретке. Након третмана са истом дозом метанолског екстракта или са мирицетином 12 сати пре третмана са пирогалолом већина комета се може сврстати у две класе: 0 (неоштећене "комете") и 1 (минимално оштећење ДНК). Укупан скор у групи животиња које су третиране само са екстрактом или само са мирицетином статистички се не разликује од укупног скорa негативне контроле.

Табела 15. Антигенотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* и мирицетина 2 и 12 сати након третмана са пирогалолом применом алкалне верзије Комет теста у *in vivo* условима

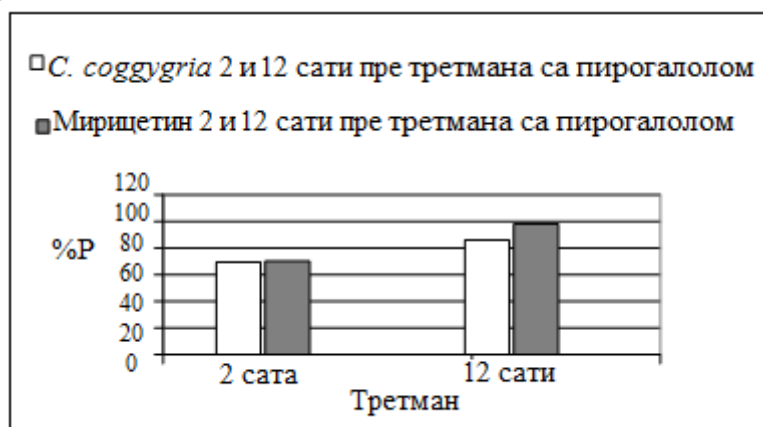
Третман	Степен ДНК оштећења					Укупан скор ^a
	0	1	2	3	4	
Негативна контрола	73.53±0.02	26.50±0.12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	26.50±0.14**
Пирогалол	0.00±0.00	3.44±0.40	4.62±0.43	44.53±0.43	47.53±0.62	336.40±4.71*
<i>C. coggygria</i> 2 сата пре пирогалола	14.09±0.72	57.64±1.11	21.04±0.72	4.28±0.82	2.16±0.43	121.20±2.65**
<i>C. coggygria</i> 12 сати пре пирогалола	42.22±0.87	47.72±0.87	8.66±0.44	1.48±0.71	0.00±0.00	69.50±1.22**
Мирицетин 2 сата пре пирогалола	12.90±1.02	58.10±1.04	25.81±0.51	3.22±0.04	0.00±0.00	119.40±0.02**
Мирицетин 12 сати пре пирогалола	66.70±0.32	33.33±0.27	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	33.33±1.23**
Мирицетин 2 сата	78.05±1.21	27.96±0.60	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	27.96±1.02**
Мирицетин 12 сати	74.50±0.05	25.53±1.32	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	25.53±0.12**
<i>C. coggygria</i> 2 сата	73.30±0.21	24.40±1.04	2.32±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	29.04±1.20**
<i>C. coggygria</i> 12 сати	72.2±0.43	26.70±0.00	1.11±0.14	0.00±0.00	0.00±0.00	28.90±0.61**

^aРезултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом животиња,

** $p < 0.05$ у поређењу са групом животиња третираним са пирогалолом.

Процент редукције (%P) у укупном скору је знатно експресивнијег карактера (86.1 и 97.8%) у групи животиња изложених пирогалолу 12 сати након третмана са метанолским екстрактом или мирицетином и мање експресивног (69.3 и 70.1%) за експерименталне групе третиране пирогалолом 2 сата након аплицирања метанолског екстракта биљке *C. coggygria* или мирицетина (Слика 10).



Слика 10. Процент редукције (%P) ДНК оштећења након третмана са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia* и мирицетином 2 и 12 сати пре третмана са пирогалолом

Применом алкалне верзије Комет есеја и квантитативних параметара утврђено је да ли претретман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* може довести до редукције у ДНК оштећењу након аплицирања пирогалолола.

У Табели 16 приказан је ефекат метанолског екстракта биљке *C. coggygia* након третмана са 500 mg/kg телесне тежине 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом на основу квантитативних параметара: % ДНК у репу и дужина репа у ћелијама јетре пацова соја Wistar. Аплицирање пирогалолола у концентрацији од 100 mg/kg телесне тежине условила је статистички значајно повећање у квантитативним параметрима у односу на негативну контролу. Значајно смањење је примећено код животиња третираних са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 или 12 сати пре аплицирања пирогалолола. *In vivo* третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 mg/kg није узроковао статистички значајне промене у односу на негативну контролу.

Табела 16. Ефекат пирогалола и претретмана са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygria* на степен ДНК оштећења у јетри пацова соја Wistar

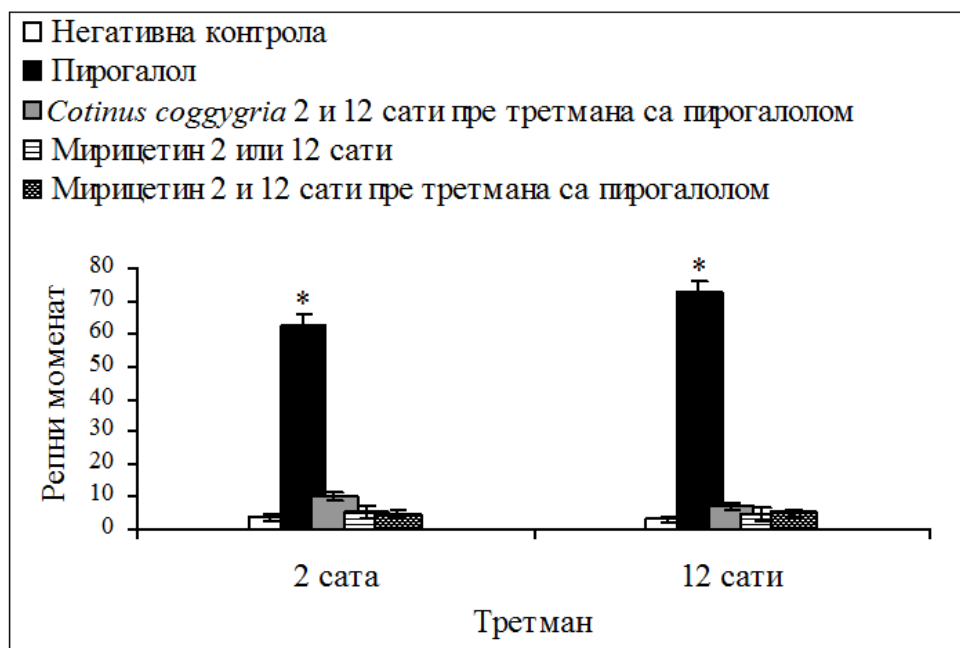
	Негативна контрола	Пирогалол 100 mg/kg телесне тежине	<i>C. coggygria</i> екстракт 2 сата пре третмана са пирогалолом	<i>C. coggygria</i> екстракт 12 сати пре третмана са пирогалолом	<i>C. coggygria</i> екстракт 500 mg/kg телесне тежине
% ДНК у репу ^a	7.43±0.26	51.3±1.01 *	26.8±0.66**	12.9±0.54**	8.67±0.26**
Дужина репа	12.8±0.25	105.2±2.01 *	46.4±0.33**	22.2±1.42**	13.4±0.32**

^aРезултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у поређењу са негативном контролом,

** $p < 0.05$ у поређењу са групом животиња третираних са пирогалолом.

Применом још једног квантитативног параметра, репног момента, утврђено је да претретман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygria* и пре-третман са мирицетином може да заштити ДНК од оштећења након аплицирања пирогалола (Слика 11).



Слика 11. Детекција ДНК оштећења у јетри пацова применом репног момента након третмана са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia* и мирицетином 2 и 12 сати пре третмана са пирогалолом
* $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на негативну контролу.

Третман са пирогалолом индукује статистички значајан пораст вредности репног момента у односу на негативну контролу. Значајно смањење је примећено у експерименталним групама третираних са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* и мирицетином, 2 или 12 сати пре апликације пирогалола. *In vivo* третман са мирицетином није узроковао статистички значајне промене у односу на негативну контролу.

4.3. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria*

Због резистентности бактерија на велики број антибиотика, али и способности биљака да синтетишу биолошки активне материје, све већи значај добија примена препарата биљног порекла у контроли и сузбијању бактерија.

Антимикробна активност метанолског екстракта биљке *C. coggygria*, применом методе дифузије са цилиндрима и макро дилуционе методе на изабране културе бактерија и гљива, приказана је у Табелама 17 и 18.

4.3.1. Антимикробна активност екстракта биљке *Cotinus coggygria* применом дифузионе методе

Метанолски екстракт биљке *C. coggygria* у концентracији од 500 μg показао је активност према свим испитиваним патогеним и фитопатогеним бактеријама и гљивама *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *P. cyclospium* и *T. viride* са зоном инхибиције у интервалу од 8 до 18 mm.

Табела 17. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Микроорганизми	Зоне инхибиције (mm) ^{а,б,в}				
	Концентрација екстракта (µg)				Стандард ^г (µg)
	150	300	500	1000	
Бактерије					
<i>S. aureus</i> (ИНР)	14±1.0	6±0.5	9±0.5		26.0±1
<i>B. subtilis</i> (ИНР)	0	8±1	9±0.5		30.0±1
<i>K. pneumoniae</i> (B 26)	0	0	10±0.5		31±0.5
<i>E. coli</i> (ATCC 25923)	29±1.0	15±0.5	17±0.5		36±0.1
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	15±0.5	19±0.5	10±0.5		32±1.0
<i>M. lysodeikticus</i> (ATCC 4698)	20±0.5	8±0.5	18±0.5		40±0.5
<i>P. fluorescens</i> (B 28)	0	9±1.0	10±1.0	14±1.0	20±0.5
<i>P. glycinea</i> (B 40)	0	8±0.5	9±0.5	11±0.5	24±0.5
<i>B. mycoides</i> (B 1)	0	8±0.1	10±0.1	15±0.2	25±0.1
<i>E. carotovora</i> (B 31)	0	8±0.2	9±0.2	14±0.1	22±0.1
<i>A. tumefaciens</i> (B 11)	0	8±0.5	10±0.5	13±0.5	26±0.1
<i>A. chlorococcum</i> (B 14)	0	9±1.0	9±0.5	13±0.5	20±0.5
<i>E. cloacae</i> (B 22)	0	8±0.2	11±0.1	13±0.1	23±0.1
Гљиве					
<i>C. albicans</i> (ATCC 10259)	0	0	0		
<i>T. viride</i> (SB11)	0	0	16±0.2	0	32±0.5
<i>T. harzianum</i> (SB12)	0	0	0	14±0.5	26±0.1
<i>P. chrysogenum</i> (SB22)	0	0	0	9±0.5	20±0.5
<i>P. cyclopium</i> (SB23)	0	0	9±0.5	14±0.5	28±0.5
<i>A. glaucus</i> (SB32)	0	0	8±0.4	10±0.4	27±0.5
<i>F. oxysporum</i> (SB91)	0	9±0.5	12±0.5	13±0.5	29±0.5

^а Резултати представљају средњу вредност три мерења;

^б "0" одсуство антимикробне активности;

^в Негативна контрола (5% DMSO);

^г Стандард: Амрацин, 100 µg за бактерије и Нистатин 100 µg за гљиве.

Значајну осетљивост према дејству метанолског екстракта показала је Грам негативна бактерија *E. coli* (при концентрацији екстракта од 150 и 500 μg зоне инхибиције су износиле 29 и 17 mm, респективно) и *M. lysodeikticus* (при концентрацији екстракта од 150 и 500 μg зоне инхибиције су износиле 20 и 18 mm, респективно). Све фитопатогене бактерије су осетљиве на присуство екстракта у концентрацији од 300 до 1000 μg . Највећа концентрација метанолског екстракта (1000 μg) показала је зону инхибиције у интервалу од 11 до 15 mm.

Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 μg показао је антифунгалну активност са зонама инхибиције у интервалу од 8 mm (за *A. glaucus*) до 16 mm (за *T. viride*). При концентрацији екстракта од 1000 μg зоне инхибиције су биле у интервалу од 9 mm (за *P. chrysogenum*) до 14 mm (за *T. harzianum* и *P. cyclopium*). *C. albicans* је у потпуности отпорана на присуство свих испитиваних концентрација екстракта биљке *C. coggygia*.

4.3.2. Антимикробна активност екстракта биљке *Cotinus coggygia* применом дилуционе методе

Минималне инхибиторне концентрације (MIC) одређене су за седам одабраних индикаторских сојева које су показале осетљивост у претходном испитивању. Из резултата приказаних у Табели 18 уочава се да метанолски екстракт биљке *C. coggygia* показује антимикробну активност у опсегу концентрација од 125 до 250 $\mu\text{g/mL}$. Највећу осетљивост према метанолском екстракту биљке *C. coggygia* показала је бактерија *B. subtilis* и гљива *T. viride* (MIC = 125 $\mu\text{g/mL}$), док су најмању осетљивост показале бактерије *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* и *M. lysodeikticus* (MIC = 250 $\mu\text{g/mL}$).

Табела 18. Минималне инхибиторне концентрације (МИС, $\mu\text{g/ml}$) метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* у *in vitro* условима

Микроорганизми	МИС ^а ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>C. coggygia</i> екстракт	Стандард ^б
Бактерије		
<i>S. aureus</i> (ИНР)	250	2.5
<i>B. subtilis</i> (ИНР)	125	1.25
<i>K. pneumonia</i> (В 26)	250	0.625
<i>E. coli</i> (АТСС 25923)	250	0.625
<i>S. aureus</i> (АТСС 25923)	250	1.25
<i>M. lysodeikticus</i> (АТСС 4698)	250	1.25
Гљива		
<i>T. viride</i> (SB 11)	125	5

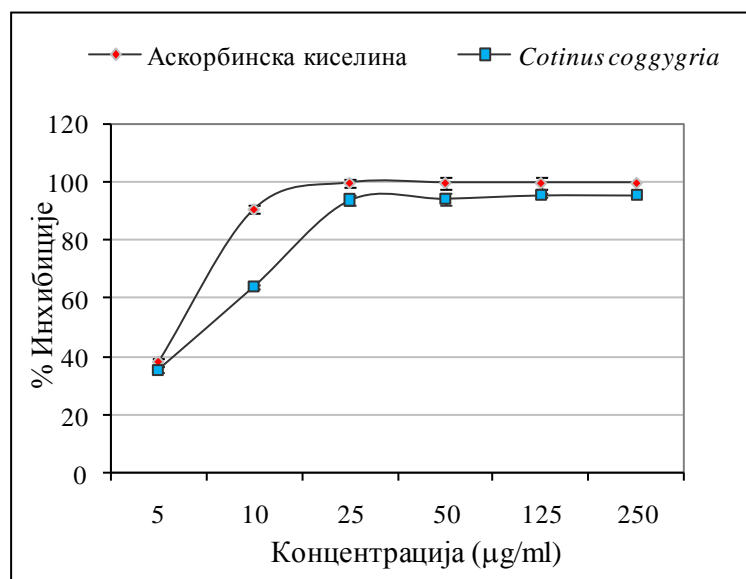
^а МИС - минимална инхибиторна концентрација,

^б Стандард - Амрацин за бактерије и Нистатин за гљиве, 5 $\mu\text{g/mL}$.

4.4. Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

4.4.1. Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* применом DPPH методе *in vitro*

Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* испитивана је методом неутрализације DPPH радикала. Одређивање капацитета неутрализације DPPH радикала је метода која због своје тачности, брзине и комерцијалне доступности DPPH реагенса има широку примену у испитивањима антиоксидативног потенцијала природних производа.

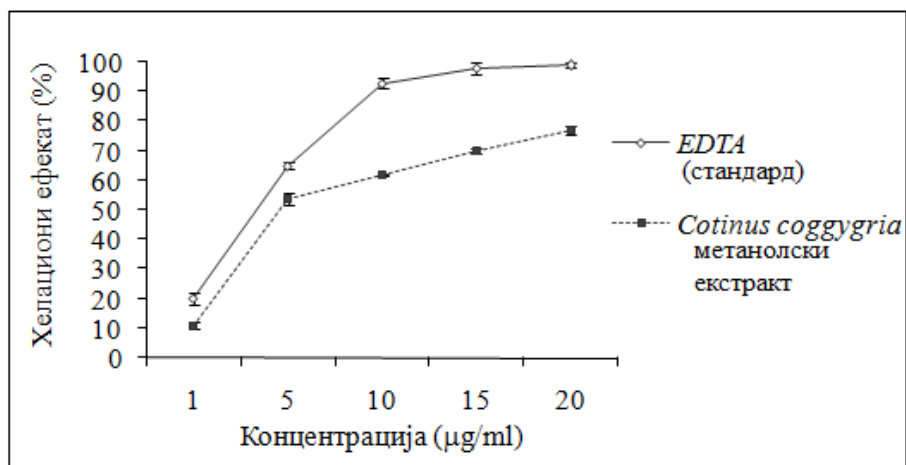


Слика 12. Утицај метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* на трансформацију DPPH• радикала

Максималан ефекат инхибиције метанолског екстракта биљке *C. coggygia* на DPPH радикале је око 95%, док је максимална концентрација инхибиције око 125 µg/ml (Слика 12).

4.4.2. *In vitro* хелациона активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

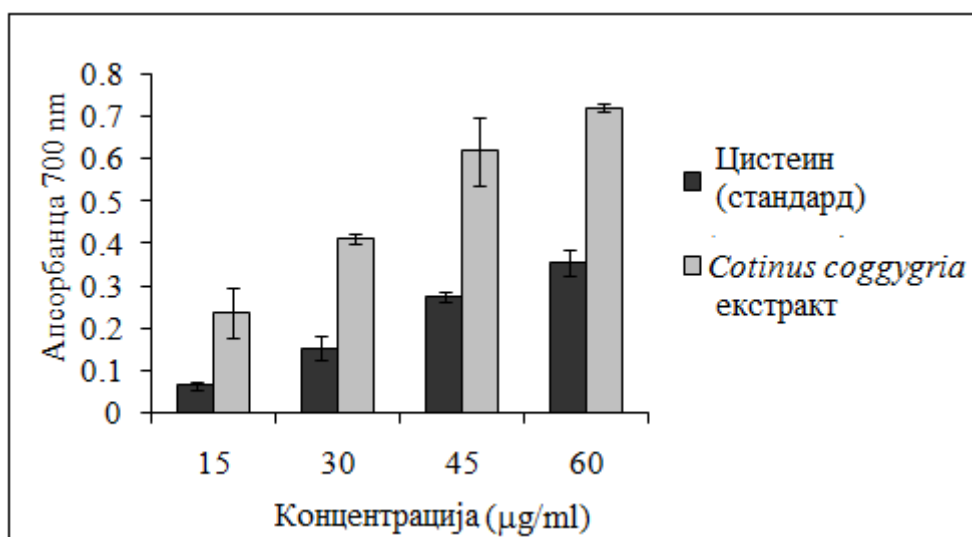
Јони Fe^{2+} могу да иницирају реакцију липидне пероксидације Фентоновом реакцијом ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$), као и да убрзају разградњу липидних пероксида, у правцу стварања перокси и алкокси радикала који даље врше пропацију (151). Стога се сматра да је хелација један од значајних механизма антиоксидативне активности (152). У циљу утврђивања потенцијалне способности сакупљања слободних радикала испитивана је хелациона активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia*. Хелациона активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* се повећава са порастом концентрације до 20 µg/ml, при овој концентрацији хелациона активност екстракта износи 78% (Слика 13).



Слика 13. Хелациона активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

4.4.3. *In vitro* редуктивна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Редуктивна способност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* је од великог значаја за антиоксидативно функционисање у *in vivo* условима. Способност екстракта да трансформише Fe^{2+} у Fe^{3+} у поређењу са цистеином, који поседује значајну антиоксидативну активност, приказана је на Слици 14. Са порастом концентрације повећава се и редуктивна активност екстракта у поређењу са цистеином, као стандардом. При концентрацији од 60 µg/ml, метанолски екстракт биљке *C. coggygia* показује скоро дупло већу редукциону активност у односу на цистеин.



Слика 14. Редуктивна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

4.5. Механизми хепатопротективне активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

У циљу утврђивања потенцијалних механизма хепатопротективне активности метанолског екстракта биљке *C. coggygia*, након оштећења јетре насталог третманом са пирогалолом, мерена је активност ензима маркера хепатотоксичности; концентрација билирубина и гвожђа у крвном серуму; интензитет оксидативног стреса (мереног кроз ниво липидне пероксидације и антиоксидативних ензима) и експресија акутно фазних протеина (Нр и $\alpha_2\text{M}$) и транскрипционих фактора NF κ B и Akt.

4.5.1. Биохемијски параметри у серуму пацова *in vivo*

У циљу сагледавања оштећења ћелија јетре након третмана са пирогалолом, праћена је активност хепатичних ензима (аспартат аминотрансаминазе – AST, аланин аминотрансаминазе – ALT и алкалне фосфатазе - ALP) и концентрација укупног и феро гвожђа, док је хепатобилијарна функција јетре праћена преко промена у концентрацији укупних билирубина у серуму.

Значајно повећање у концентрацији укупног и феро гвожђа у серуму пацова (1.58 и 1.52 пута, респективно) уочено је након администрације пирогалолола у концентрацији од 100 mg/kg

(Табела 19). Интраперитонеална апликација метанолског екстракта биљке *C. coggygia* пре третмана са пирогалолом статистички значајно је редуковала вредности серумског гвожђа: концентрације укупног и фери гвожђа у серуму су, респективно, 1.07- и 1.33- пута (пре-третман 2 сата пре третмана са пирогалолом) и 1.05- и 1.15- пута (пре-третман 12 сати пре третмана са пирогалолом) изнад контролне вредности. Администрација само метанолског екстракта биљке *C. coggygia* не доводи до значајних промена у концентрацији укупног или фери гвожђа у серуму у односу на негативну контролу.

Табела 19. Укупно и фери гвожђе у серуму пацова третираних екстрактом биљке *Cotinus coggygia* и пирогалолом

	Укупно гвожђе ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Fe^{2+} ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
Негативна контрола	172.65 \pm 0.50	52.33 \pm 0.23
Пирогалол	273.40 \pm 1.08*	79.70 \pm 0.30*
<i>C. coggygia</i> 2 сата пре пирогалола	184.80 \pm 0.43**	68.90 \pm 0.16**
<i>C. coggygia</i> 12 сати пре пирогалола	181.10 \pm 0.40**	60.20 \pm 0.53**
<i>C. coggygia</i> екстракт	173.60 \pm 1.70**	53.60 \pm 0.73**

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу,

** $p < 0.05$ у односу на пирогалол.

Хепатопротективна активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* и мирицетина приказана је у Табели 20. Анализа биохемијских параметара у серуму код експерименталне групе пацова третираних пирогалолом показује статистички значајне повишене вредности AST, ALT, ALP и укупног билирубина за 1.53-, 2.4-, 1.9- и 3.2-пута изнад базалне вредности истих параметара код контролне групе пацова ($p < 0.05$). У серуму пацова третираних са метанолским екстрактом 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом, уочено је значајно смањење у вредностима трансминаза, алкалне фосфатазе и укупног билирубина 1.2-, 1.61-, 1.60- и 1.71-пута (у групи третираној 2 сата пре третмана са пирогалолом) и 1.04-, 1.06-, 1.48- и 1.01-пута (у групи третираној 12 сати пре третмана са пирогалолом) изнад контролних

вредности. Третман само са екстрактом није довео да значајних промена у вредностима серумских ензима. Третман са мирицетином пре апликације пирогалола статистички значајно је смањио вредности AST, ALT, ALP и укупних билирубина: 1.08-, 1.48-, 1.41- и 1.08-пута (у групи третираној 2 сата пре третмана са пирогалолом) и 1.05-, 1.25-, 1.32- и 1.04-пута (у групи третираној 12 сати пре третмана са пирогалолом) у односу на контролне вредности. Анализа биохемијских параметара у серуму код групе пацова третираних само са мирицетином показује вредности AST, ALT, ALP и укупног билирубина које се статистички не разликују од негативне контроле.

Табела 20. AST, ALT, ALP и укупни билирубин у серуму пацова третираних екстрактом биљке *Cotinus coggygia* и мирицетином

	AST (U/L) ^a	ALT (U/L) ^b	ALP (U/L) ^b	UB (μ mol/l) ^г
Негативна контрола	164.9 \pm 4.20**	39.4 \pm 0.91**	233.2 \pm 0.86**	2.18 \pm 0.24**
Пирогалол	252.2 \pm 6.74*	93.6 \pm 0.86*	442.0 \pm 0.65*	6.91 \pm 1.05*
<i>C. coggygia</i> 2 сата пре пирогалола	192.5 \pm 1.41**	63.9 \pm 0.62**	373.3 \pm 0.53**	3.74 \pm 0.33**
<i>C. coggygia</i> 12 сати пре пирогалола	171.6 \pm 5.51**	41.9 \pm 0.81**	347.1 \pm 1.21**	2.20 \pm 0.47**
Мирицетин 2 сата пре пирогалола	178.2 \pm 0.65**	58.2 \pm 1.02**	327.9 \pm 1.25**	2.37 \pm 0.24**
Мирицетин 12 сати пре пирогалола	173.7 \pm 3.44**	49.1 \pm 0.54**	307.1 \pm 0.79**	2.26 \pm 1.02**
Мирицетин 2 сата	169.3 \pm 0.53**	50.2 \pm 0.23**	241.2 \pm 0.48**	2.08 \pm 1.57**
Мирицетин 12 сати	165.4 \pm 0.79**	41.0 \pm 1.50**	251.9 \pm 1.40**	2.24 \pm 0.64**
<i>C. coggygia</i> 2 сата	171.5 \pm 1.02**	51.2 \pm 1.27**	261.0 \pm 0.26**	3.01 \pm 1.12**
<i>C. coggygia</i> 12 сати	170.6 \pm 1.26**	37.8 \pm 2.47**	269.9 \pm 0.66**	2.40 \pm 0.28**

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

^a AST; аспартат аминотрасфераза;

^b ALT; аланин аминотрансфераза;

^b ALP; алкалне фосфатаза;

^г UB; укупни билирубини.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу,

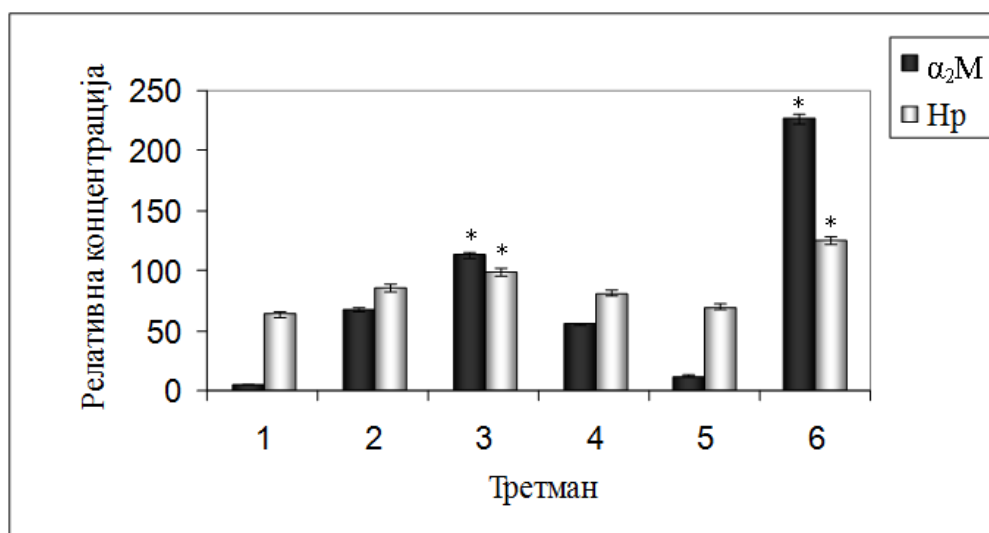
** $p < 0.05$ у односу на пирогалол.

4.5.2. Релативна концентрација и експресија акутно фазних протеина у серуму и јетри пацова

У одговору на инфламацију, као саставни део одбрамбених механизма у организму, покреће се след догађаја познат као акутно-фазни одговор у оквиру кога се у јетри синтетише

група протеина означена као акутно фазни протеини. Студије показују да се све промене у хепатоцитима, током акутно фазног одговора, односе на промене нивоа синтезе протеина, са једне стране, док се са друге, мењају нивои протеина који су, иначе, нормално присутни у овом органу, као структурно-функционалне компоненте хепатоцита.

Применом једнодимензионалне имуноелектрофорезе на серуму пацова детектован је највећи пораст два важна акутно фазна реактанта, хаптоглобина и α_2 -макроглобулина, 24 сата након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (Слика 15), што кореспондира са највишом вредношћу хаптоглобина и α_2 -макроглобулина у јетри (Слика 16). Ниво испитиваних акутно фазних протеина се вратио на базални ниво 72 сата након третмана са екстрактом. Вредности хаптоглобина и α_2 -макроглобулина биле су ниже од вредности након третмана са терпентином, стандардним индуктором акутно фазног одговора.



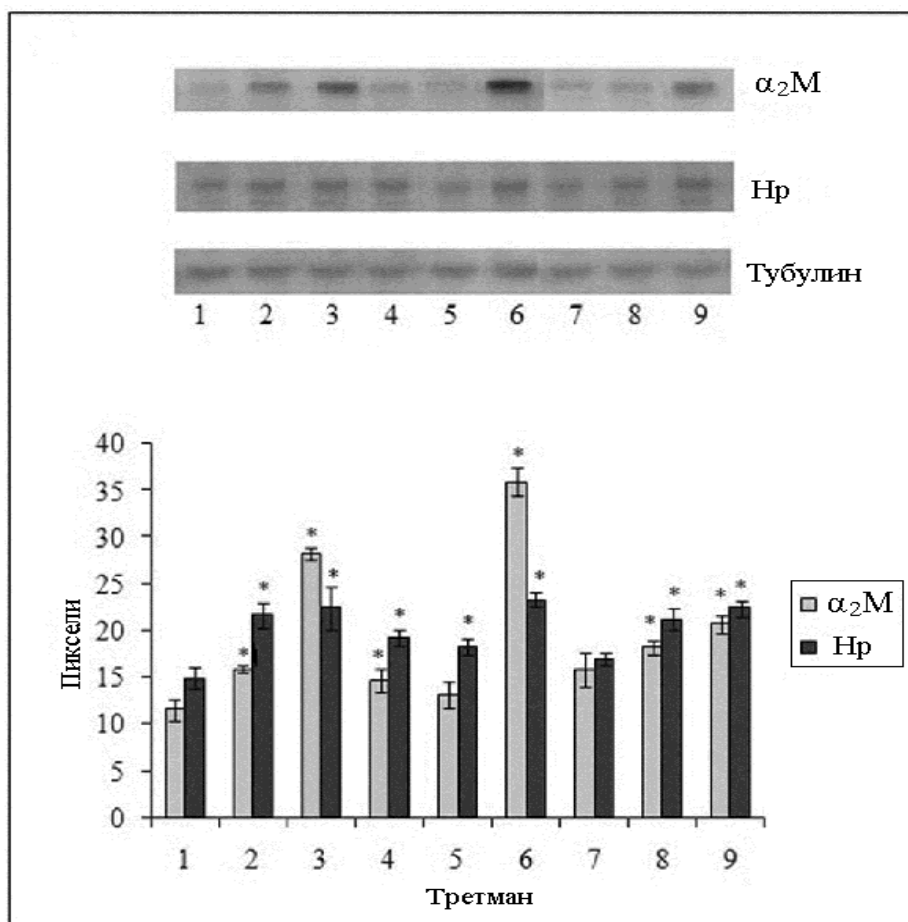
Слика 15. Релативна концентрација хаптоглобина (Hp) и α_2 -макроглобулина (α_2 М) у серуму пацова третираних са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*

Rocket имуноелектрофореза са анти-хаптоглобин и анти- α_2 -макроглобулин антителима. Колона 1: негативна контрола; колоне 2, 3, 4 и 5: 12, 24, 48 и 72 сата након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*, респективно; колона 6: 24 сата након апликације терпентина.

* $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на негативну контролу.

Имуноблот анализа јетре са анти-хаптоглобин и анти- α_2 -макроглобулин антителима, након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*, приказана је на Слици 16. Третман

са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* довео је до пораста у нивоу оба акутно-фазна протеина. Највиша вредност је детектована 24 сата након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* (линија 3, ред Нр и α_2 М, респективно). Након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом, пораст у нивоу хаптоглобина и α_2 -макроглобулина је забележен након третмана са екстрактом 12 сати пре третмана са пирогалолом (линија 9, ред Нр и α_2 М, респективно).



Слика 16. Експресија хаптоглобина и α_2 -макроглобулина у јетри пацова третитраних са метанолским екстрактом биљке *Cotinus coggygia*

Western блот анализа хомогената јетре пацова са анти- α_2 -макроглобулин, анти-хаптоглобин и анти-тубулин антителима.

Линија 1 - негативана контрола; линија 2, 3, 4 и 5: 12, 24, 48 и 72 сата након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*, респективно; линија 6: 24 сата након апликације терпентина; линија 7: третман пирогалолом; линија 8: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 сата пре третмана са пирогалолом; линија 9: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре третмана са пирогалолом. Тубулин је коришћен као интерна контрола. Western блот анализа је квантификована применом TotalLab (Phoretix) софтвера (вер. 1.10) у односу на тубулин и приказана је на графиконима. Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

* $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на негативну контролу.

4.5.3. Концентрација липидних пероксида у серуму и јетри пацова у *in vivo* условима

Липидна пероксидација незасићених масних киселина, деловањем слободних радикала, неповољан је и негативан процес који је праћен масивним оштећењем липидних мембрана ћелија. Ефекат администрације метанолског екстракта биљке *C. coggygia* процењен је мерењем ниво TBARS-а, општим индикатором оксидативног стреса (153).

Један сат након третмана са пирогалолом, ниво липидне пероксидације у серуму био је 1.81-пута изнад вредности измерене у негативној контроли. Након 12 сати претретмана са метанолским екстрактом, ниво липидне пероксидације је 1.19-пута изнад основне вредности. Третман са метанолским екстрактом 12 сати пре третмана са пирогалолом је био нешто ефикаснији од третмана 2 сата пре третмана са пирогалолом (1.43-пута) у односу на негативну контролу (Табела 21). Администрација метанолског екстракта биљке *C. coggygia* није изазвала значајан пораст вредности TBARS-а.

Табела 21. Ефекат екстракта биљке *Cotinus coggygia* на TBARS у серуму и јетри пацова соја Wistar

	TBARS (nmol/ml) ^a	TBARS (nmol/mg) ^b
Негативна контрола	2.54±0.26	1.35±0.12
Пирогалол	4.61±0.07*	4.37±1.04*
<i>C. coggygia</i> 2 сата пре пирогалолола	3.63±0.12**	1.70±2.06**
<i>C. coggygia</i> 12 сати пре пирогалолола	3.02±0.05**	1.36±0.03**
<i>C. coggygia</i> екстракт	2.61±1.03**	1.31±0.01**

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

^a TBARS у серуму;

^b TBARS у јетри.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу,

** $p < 0.05$ у односу на пирогалол.

Значајно повећање у нивоу TBARS-а у јетри уочено је након третмана са пирогалолом, 3.23-пута у односу на негативну контролу, и потпуно слабљење овог ефекта након третмана са

метанолским екстрактом 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом. Третман само са екстрактом није условио пораст у нивоу TBARS-а у јетри пацова (Табела 21).

4.5.4. Активност антиоксидативних ензима у јетри пацова у *in vivo* условима

Пораст реактивних врста кисеоника директно је повезана са индукцијом прекида ДНК молекула (154). Антиоксидативни ензими представљају прву линију одбране од оксидативног оштећења и имају важну улогу у очувању интегритета ДНК, а њихова активност представља важан маркер оксидативног статуса организма.

Резултати испитивања активности антиоксидативних ензима у јетри пацова приказани су у Табели 22. Након третмана са пирогалолом активност укупне SOD била је 71.38% од базалне вредности (у односу на негативну контролну групу, која представља 100%). Код животиња претретираних са екстрактом биљке *C. coggyria* 2 сата пре третмана са пирогалолом, активност укупне SOD била је 88.62% од контролне вредности. Третман са екстрактом 12 сати пре третмана са пирогалолом, није условио статистички значајне промене у активности укупне SOD (96.51% од основне вредности). Након аплицирања пирогалолола активност MnSOD је износила 49.15% од базалног нивоа, док је код пацова који су претретирани са екстрактом 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом, активност MnSOD била 81.81 и 92.73% од базалног нивоа, респективно. Активност CuZnSOD након третмана са пирогалолом износила је 62.53% од базалне вредности док је након претретмана са екстрактом уочено побољшање у ензимској активности, 87.5 и 95.32% од базалне вредности, респективно. Третман са екстрактом биљке *C. coggyria* није довео до сигнификантне промене у активности антиоксидативних ензима SOD, MnSOD и CuZnSOD (98.72, 98.79 и 98.62%, респективно).

Табела 22. Ефекат екстракта биљке *Cotinus coggygria* на активност антиоксидативних ензима у јетри пацова соја Wistar

	Негативна контрола	Пирогалол	<i>C. coggygria</i> екстракт 2 сата пре пирогалола	<i>C. coggygria</i> екстракт 12 сати пре пирогалола	<i>C. coggygria</i> екстракт
SOD ^а	54.5±0.31	38.9±0.32*	48.3±0.31**	52.6±0.33**	53.8±1.35**
MnSOD ^б	16.5±0.24	8.11±0.07*	13.5±0.16**	15.3±0.22**	16.3±1.25**
CuZnSOD ^в	36.3±0.24	22.7±0.60*	31.6±0.33**	34.6±0.23**	35.8±0.27**
CAT ^г	30.5±0.68	9.70±0.42*	14.5±0.27**	24.9±0.25**	27.7±0.27**
GST ^д	533.4±2.21	429.1±2.90*	488.4±3.73**	526.5±0.84**	528.5±2.92**

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

^а SOD; супероксид-дизмутаза, U/mg протеина;

^б MnSOD; манган-супероксид-дизмутаза, U/mg протеина;

^в CuZnSOD; бакар-цинк- супероксид-дизмутаза, U/mg протеина;

^г CAT; каталаза, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ мин/mg/протеина;

^д GST; глутатион-С-трансфераза, nmol/мин/mg протеина.

* $p < 0.05$ у односу на негативну контролу,

** $p < 0.05$ у односу на пирогалол.

Интраперитонеално аплицирање пирогалола довела је до смањења активности ензима CAT за 31.80% од базалног нивоа. Након третмана са екстрактом 2 сата пре третмана са пирогалолом, ензимска активност је била релативно ниска, 47.54% од базалног нивоа. Третман са екстрактом 12 сати пре третмана са пирогалолом износио је 1.64% од базалне активности ензима CAT. Третман са метанолским екстрактом изазвао је благи пад у активности ензима CAT за 90.82%.

Испитивање активности ензима GST показало је да пирогалол индукује пад ензимске активности за 80.45%, док је третман са екстрактом 2, а посебно 12 сати пре третмана са пирогалолом ублажио ово смањење за 91.56 и 98.71%, респективно, у односу на базалну ензимску активност. Третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygria* изазвао је благо смањење активности ензима GST (99.08%) у односу на базалну вредност.

4.5.6. Квантитативна анализа експресије транскрипционих фактора NF-κB и Akt

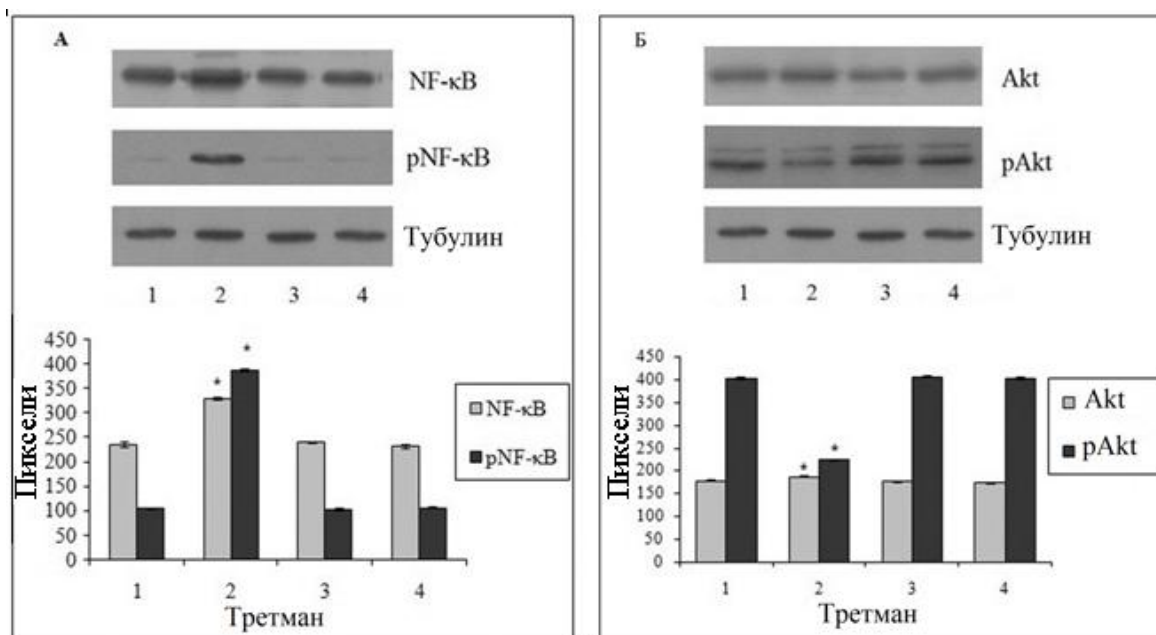
Применом алкалне верзије Комет есеја утврђено је да је пирогалол, индуктор акутног оштећења јетре, у концентрацији од 100 mg/kg телесне тежине, условио висок ниво генотоксичности. Имајући у виду антиоксидативну активност метанолског екстракта и да претретман са метанолским екстрактом биљке *C. coggyria* штити ДНК од оштећења након аплицирања пирогалола, испитиване су две важне компоненте комплексног целуларног одговора на факторе стреса.

Слободни радикали стимулишу експресију транскрипционог фактора NF-κB (енг. *Nuclear factor-κB*), који контролише многе гене који учествују у инфламаторном одговору. Насупрот томе, антиоксиданти са анти-инфламаторном активношћу генерално спречавају експресију NF-κB (155).

Транскрипциони фактор NF-κB је регулаторни протеин који контролише експресију многих индуцибилних и ткивно специфичних гена, учествујући на тај начин у регулацији проинфламаторних и имуних одговора ћелије, ћелијске пролиферације и апоптозе.

Квантитативна анализа експресије транскрипционих фактора NF-κB и Akt извршена је применом Western блот анализе хомогената јетре уз примену специфичних антитела.

Пирогалол, у дози од 100 mg/kg телесне тежине животиња, је индуковао експресију NF-κB (линија 2, ред NF-κB, Слика 17А) и статистички значајну активацију (линија 2, ред pNF-κB, Слика 17А) 1.40- и 3.72-пута, респективно, у односу на контролну вредност. Метанолски екстракт биљке *C. coggyria* 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом (линија 3 и 4, респективно, Слика 17А) статистички значајно је смањив експресију и активацију NF-κB у поређењу са пирогалолом.



Слика 17. Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* пре апликације пирогалолоа на релативни ниво протеина NF-κB (p65) (А) и Akt (Б).

Western блот анализа хомогената јетре пацова је урађена са анти-NF-κB p65, анти-фосфорилисаним NF-κB p65 (pNF-κB) антителима (А), са анти-Akt и анти-фосфорилисаним Akt (pAkt) антителима (Б). Тубулин је коришћен као интерна контрола.

Линија 1: негативна контрола; линија 2: третман са пирогалолом; линија 3: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 сата пре третмана са пирогалолом; линија 4: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре третмана са пирогалолом.

Western блот анализа је квантификована применом TotalLab (Phoretix) софтвера (вер. 1.10) у односу на тубулин, и приказана је на графиконима.

Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

* $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на негативну контролу.

Серин-треонин киназа Akt (позната и као протеин киназа Б) је од велике важности за контролу ћелијског циклуса. Akt сигнални пут у ћелији регулише бројне критичне ћелијске путеве, укључујући оне које воде ка пролиферацији и инхибицији апоптозе (156, 157).

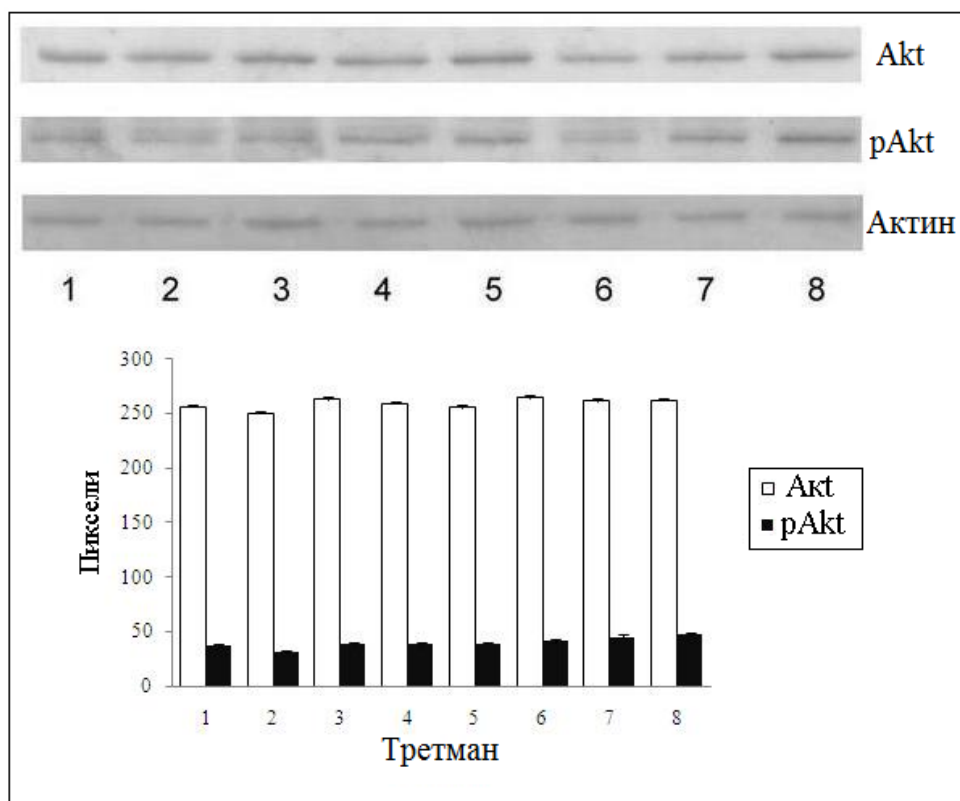
Квантификација нивоа експресије и активације (фосфорилације) интрацелуларног протеина Akt праћена је применом Western имуно-блот методе.

Western блот анализа хомогената јетре показала је да третман са пирогалолом условљава благо смањење Akt активности, посматрано као смањење у нивоу pAkt (Слика 17 Б, линија 2, ред pAkt). У узорцима јетре добијених након жртвовања животиња које су третиране са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом (Слика 17 Б, линије 3 и 4, респективно), ниво активне Akt киназе је повећан.

Имајући у виду да је квалитативном HPLC анализом метанолског екстракта детектовано да се мирицетин, у поређењу са осталим квантификованим једињењима, издваја својим садржајем, испитиван је Akt статус у хомогенатима јетре животиња пре-третираних са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* и мирицетином применом имуноблот анализе.

Третман са пирогалолом узрокује незнатну редукују у експресији Akt протеина, око 1.01-пута изнад базалне вредности измерене у негативној контроли (Слика 18, линија 2, ред Akt).

Интраперитонеално иницирање метанолског екстракта узрокује незнатно повећање Akt вредност, око 1.03-пута изнад негативне вредности (линија 3, ред Akt). Третман са екстрактом 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом, узрокује пораст вредност Akt киназе (линије 4 и 5, појединачно). Третман са мирицетином изазива несигнификантно повећање вредности Akt киназе, око 1.03-пута (линија 6, ред Akt) изнад базалне вредности. У узорцима експерименталних животиња третираних са мирицетином 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом (линије 7 и 8), уочен је пораст вредности активне Akt киназе.



Слика 18. Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* и мирицетина пре апликације пирогалолоа на релативни ниво протеина Akt

Western блот анализа хомогената јетре пацова урађена је са анти-Akt и анти-фосфорилисаним Akt (pAkt) антителима. Актин је коришћен као интерна контрола.

Линија 1: негативна контрола; линија 2: третман са пирогалолом; линија 3: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*; линија 4: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 сата пре третмана са пирогалолом; линија 5: третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре третмана са пирогалолом; линија 6: третман са мирицетином; линија 7: третман са мирицетином 2 сата пре третмана са пирогалолом; линија 8: третман са мирицетином 12 сати пре третмана са пирогалолом. Western блот анализа је квантификована применом TotalLab (Phoretix) софтвера (вер. 1.10) у односу на актин и приказана је на графикану. Резултати представљају средњу вредност и стандардну девијацију из три независна експеримента.

* $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на негативну контролу.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Хемијски састав метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Лековите биљке се због своје благотворности и ефикасности вековима примењују у профилакси и лечењу многих болести. Захваљујући развоју експерименталне фармакогнозије, препарати на бази лековитих биљака добијају научну потврду о својој делотворности.

Биолошка активност биљака и биљних екстраката превасходно зависи од заступљености различитих секундарних метаболита. Полифенолна једињења, осим што показују антиканцерогени ефекат, могу се применити и у превенцији кардиоваскуларних и цереброваскуларних болести. Флавоноиди показују широк спектар биолошких активности као што је антиканцерогена (158), антиоксидативна (159), цитопротективна и анти-инфламаторна (160). Fedeli и сарадници (161) су показали да танини имају способност да при ниским концентрацијама штите ДНК од оштећења, док при високим концентрацијама могу да показују генотоксичан ефекат.

Имајући у виду да су фенолна једињења, посебно флавоноиди, група природних производа који су изузетно потентни агенси, детерминисан је њихов укупни садржај у испитиваном метанолском екстракту биљке *C. coggygia*.

Садржај укупних фенола износио је 3.78 mg еквивалената галне киселине по граму сувог биљног материјала, укупних флавоноида 8.29 mg еквивалената рутина по граму сувог биљног материјала, док је садржај кондензованих танина и галотанина 1.24 mg еквивалената галне киселине по граму сувог биљног материјала и 0.53 mg еквивалената танинске киселине по граму сувог биљног материјала. Добијени резултати су у складу са студијом Simić и сарадника (17) за садржај тоталних фенола, танина и флавоноида, имајући у виду да је ова група аутора поменуте компоненте детектовала у етил-ацетатној фракцији биљке *C. coggygia*.

Скрининг одабраних полифенолних компоненти екстракта врсте *C. coggygia* показао је да се по количини једино издваја мирицетин са 511.5 $\mu\text{g/g}$ екстракта, и у знатно мањој мери кверцетин са 69.8 $\mu\text{g/g}$.

Преглед доступне литературе показује да о фенолном саставу ове биљне врсте постоје наводи (13, 14). Valianou и сарадници (15) и Antal и сарадници (16) су у метанолском екстракту добијеног из стабла ове биљне врсте утврдили присуство кверцетина. Са друге стране, резултати Westenburg и сарадника (13) и Stathopoulou и сарадника (14) нису у складу са добијеним резултатима за присуство мирицетина, будући да ова група аутора поменути флавоноид није ни детектовала.

Чињеница да се садржај фенолних једињења исте врсте са различитих локалитета може значајно разликовати и у квалитативном и у квантитативном смислу, може бити показатељ да

фенолни профил није у потпуности контролисан на нивоу гена, него да делимично зависи и од других, а посебно еколошких фактора.

Уопштено, добијени резултати фенолног скрининга могу да буду од велике користи у процени лековитости врсте *C. coggygia*, имајући у виду широку примену у традиционалној медицини. Ова биљна врста се може сматрати потенцијалним извором одређених фенолних једињења и може бити искоришћена као сировина за њихово добијање.

5.2. Ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia* на функцију генетичког материјала код различитих модел организама

Ефекат екстракта биљке *C. coggygia* утврђен је применом SLRL и Комент теста користећи као модел организме *D. melanogaster* и пацове соја Wistar у *in vivo* условима.

Различити механизми су укључени у ова два вида генотоксичног тестирање. SLRL тест се користи за детекцију генских мутација, како тачкастих мутација тако и малих делеција, у герминативним ћелијама. Мутације на X хромозому код *D. melanogaster* су фенотипски изражене код мужјака који носе мутирани ген. Тест за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код *D. melanogaster* се показао као одличан тест за откривање природних биљних мутагена (62).

Насупрот SLRL тесту, Комент тест се не користи за откривање мутација, већ геномских лезија које би могле да доведу до мутација (162). Током последњих деценија алкална верзија Комент теста у *in vivo* условима, поред широке примене у разним областима, представља и стандардну методу у фармацеутској индустрији за процену безбедности нових лекова и, све више, као средство за утврђивање генотоксичног ефекта како природних тако и вештачких агенаса (69, 70, 71).

Применом SLRL теста утврђено је да је учесталост герминативних мутација изазваних метанолским екстрактом биљке *C. coggygia*, у концентрацији од 5%, већа од учесталости мутација изазваних сахарозом као негативном контролом у сперматозоидима и сперматоцитама, док су се сперматиде показале као отпорније. Етил метаносулфонат, у концентрацији од 0.75 ppm, индуковао је рецесивне леталне мутације у сва три легла, што је уједно и јасан показатељ његовог мутагеног ефекта. У односу на групу мужјака третираних само са ЕМС-ом, пост-третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 2% након третмана са ЕМС-ом, довео је до статистички значајног смањења у фреквенцији мутација у две герминативне ћелијске линије, код сперматозоида и сперматиде. Мирицетин, као најзаступљенија компонента екстракта, кверцетин и рузмаринска киселина у концентрацији од 100 ppm статистички значајно су редуковали стопу мутација индукованих након третмана са ЕМС-ом.

Према Hung и сарадницима (163) и Kuroda и сарадницима (164) постоје две главне групе ДНК заштитних механизма: дезмутагени, у коме тестиране супстанце делују директно на мутаген или га инактивирају спречавајући настанак ДНК оштећења, и биоантимутагени, у коме тестиране супстанце или делују на процес мутагенезе или поправљају ДНК оштећења смањујући фреквенцу мутација. Дезмутагени могу да се детектују након пре-третмана, док се

биоантимутагени детектују након пост-третмана (165). Имајући у виду да су јединке врсте *D. melanogaster* третиране са ЕМС-ом пре третмана са екстрактом, антимутагени присутни у екстракту се "понашају" као биоантимутагени, односно утичу на репарацију претходно индукованих ДНК оштећења.

Алкилирајући агенси реагују са нуклеотидима нападајући њихова нуклеофилна места (N и O атом унутар структуре), условљавајући ковалентно повезивање са ДНК молекулом. Они могу да изазову широк спектар ДНК адуката, укључујући *N*-алкиловане: *N*⁷-метилгуанин (*N*⁷MeG), *N*³-метиладенин (*N*³MeA) и *N*³-метилгуанин (*N*³MeG); и *O*-алкиловане адукте: *O*⁶-метилгуанин (*O*⁶MeG) и *O*⁴-метилтимин (*O*⁴MeT). *N*-алкиловани адукти чине више од 80% алкилованих база и показују различиту стабилност, док *O*-алкиловани адукти представљају мање од 10% од укупних алкилованих база. У принципу, *O*-алкиловање је мутагено и генотоксично, док је *N*-алкиловање цитотоксично, али мање мутагено (166, 167).

Литературни подаци указују да је мутагена активност алкилирајућих агенаса у вези са њиховом способношћу да формирају *O*⁶-метилгуанин (*O*⁶MeG) (168). Протеин *O*⁶-метилгуанин ДНК метилтрансфераза (MGMT) (169) поправља *O*⁶MeG преношењем етил групе од основне лезије на цистеински остатак, обнављајући интегритет ДНК, без стварања додатног оштећења (170).

ЕМС је монофункционални алкилирајући агенс који углавном изазива тачкасте мутације (измена само једне базе) које ремете функцију гена изазивајући мутације промењеног смисла ("*мисенс*") или бесмислене мутације ("*нонсенс*") (171). Овај алкилирајући агенс се не инкорпорира у ДНК молекул, већ замењује постојећу базу изазивајући погрешно спаривање. ЕМС додаје етил групу на *O*⁶ атом гуанина, формирајући абнормалну базу *O*⁶-етилгуанин (172). Током репликације ДНК, ДНК полимеразе чешће постави тимин, уместо цитозина, насупрот *O*⁶-етилгуанин (Схема 3). Након наредне репликације, оригинални G:C базни пар може постати A:T пар (C_G:T_A транзиција). ЕМС додаје етил групу и на позицији 4 тимина стварајући *O*⁴-етилтимин који се спарује са гуанином, условљавајући T_A:C_G транзициону мутацију (173).

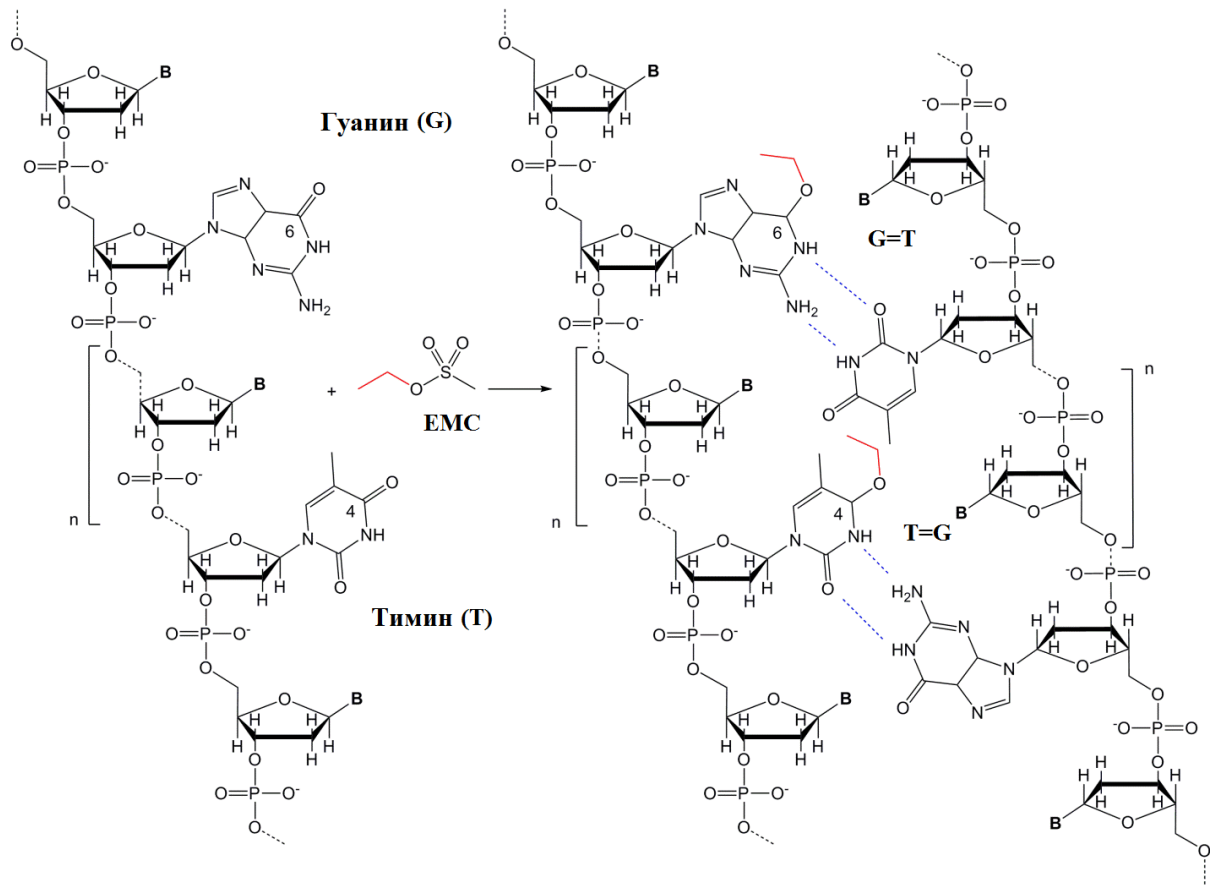


Схема 3. Алкилација ДНК секвенце ЕМС-ом, формирање O^6 -етилгуанина и O^4 -етилтимиона

Екстракт биљке *C. coggygia* има способност анти-алкиловања и утиче на активност O^6 -метилгуанин ДНК метилтрансферазе. У сагласности са овом чињеницом је и студија De Flora и Ferguson-a (174), у којој су аутори дошли до закључка да биоантимутагени агенси делују на физиолошке механизме заштите и поправке ДНК, да "опозивају" мутагене ефекте и спречавају фиксацију мутација.

Недавна студија Mladenović и сарадника (175) пружила је потпуно нови приступ и увид у механизам антигенотоксичне активности природних ароматичних једињења. Како се генотоксичност карактерише као хемијски изазвано оштећење физиолошких форми нуклеотида, односно њихово алкиловање, студијом се наводи да постоји каскадни механизам деловања генотоксичних и антигенотоксичних агенаса, а да спрегу у механизму чини сама деалкилација оштећених нуклеотида. Механизам протекције ДНК испитиваним једињима дефинисан је методом молекулског доковања. Након алкилације, која чини први корак у каскадном механизму, ензим O^6 -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза врши репарацију оштећених нуклеотида, O^6 -етилгуанина и O^6 -етилтимиона, прихватањем етил групе са лезија.

По деалкилацији констатована су два различита механизма антигенотоксичне активности за флавоноиде (мирицетин и кверцетин) и за фенолну киселину (рузмаринска киселина). Мирицетин и кверцетин врше протекцију нуклеотида од поновног оштећења формирањем јаке водоничне везе са O^6 атомом гунанина односно O^4 атомом тимина, који су и реакциони центри и акцептори етил групе алкилирајућег агенса. Донор водоничне везе је хидроксилна група са Б прстена флавоноида. Како је јачина формираних водоничних веза велика и може се поредити са јачином ковалентне везе, обзиром на то да је дужина везе мања од 2.5 Å (Å - Ангстрем), у нормалним физиолошким условима не постоји могућност нарушавања исте, и тиме је спречена поновна алкилација нуклеотида. Са друге стране, рузмаринска киселина штити нуклеотиде блокирањем приступа алкилирајућем агенсу, заузимајући простор око нуклеотида који нормално окупира алкилирајући агенс непосредно пре алкилације. Таква структура је стабилизована остваривањем хидрофобних интеракција између фенил остатака рузмаринске киселине и језгра нуклеотида.

Степен оштећења ДНК након третмана са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* одређен је и квалитативном анализом дистрибуције "комета" и применом одабраних квантитативних параметара код *D. melanogaster* и пацова соја Wistar.

Анализирајући расподелу комет класа у групи ларви *D. melanogaster* третираних са метанолским екстрактом евидентно је одсуство комета са максималним оштећењем (класе 3 и 4), и да су "комете" са ниским степеном оштећења (класе 0 и 1) најраспрострањеније. *In vivo* третман са екстрактом није узроковао статистички значајне промене у одабраним квантитативним параметрима, у односу на негативну контролу.

Процена генотоксичности метанолског екстракта биљке *C. coggygia* применом Комет теста показала је да је екстракт изазвао умерено оштећење ДНК код пацова соја Wistar. Након третмана са екстрактом у концентрацији од 1000 и 2000 mg/kg телесне масе животиња уочен је низак ниво генотоксичности, док третман са екстрактом у концентрацији од 500 mg/kg телесне тежине не показује генотоксични потенцијал. У узорку јетре и коштане сржи животиња третираних са 500 mg/kg телесне масе, није уочена статистички значајна разлика у укупном скору у односу на контролну групу. Већина "комета" је неоштећена, а само неколико "комета" је са минималним (класа 1) и средњим оштећењем (класа 2).

Имајући у виду да третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 mg/kg није довео до ДНК оштећења и да је квалитативном HPLC анализом екстракта детектовано да се мирицетин, у поређењу са осталим квантификованим једињењима, издваја својим садржајем, применом пирогалола испитивана је потенцијална антигенотоксична активност екстракта и мирицетина. Након третмана са пирогалолом

утврђен је пораст у фреквенци репног момента, дужине репа и % ДНК у комет репу у односу на негативну контролу. Третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом узроковао је статистички значајно смањење у оштећењу ДНК, исказаног преко процента редукције (%P) ДНК оштећења. Треба истаћи да се третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре третмана са пирогалолом показао ефикаснијим у односу на третман 2 сата пре третмана са пирогалолом. Третман са мирицетином у концентрацији која је еквивалентна концентрацији мирицетина у испитиваној дози екстракта, показао је исти ефекат као и третман са екстрактом 2 или 12 сати пре апликације пирогалола. Може се закључити да је за антигенотоксични потенцијал екстракта одговоран секундарни метаболит мирицетин који се у поређењу са осталим компонентама екстракта издваја својим садржајем.

5.3. Антимикробна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Обимна потрошња антибиотика, која је довела до резистенције бактерија на велики број лекова, подстакла је испитивања антибактеријског деловања супстанци, које нису антибиотици, укључујући и биљне екстракте. У циљу проналажења нових средстава у борби против инфекција изазваних мултирезистентним сојевима бактерија, етарска уља и екстракти лековитих и зачинских биљака су предмет испитивања антибактеријске активности.

Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* је показао значајан степен антимикробне активности на тестиране микроорганизме применом диск дифузионе методе са зонама инхибиције које су се кретале од 6 до 29 mm. Максималну активност екстракт је испољио према Грам негативној бактерији *E. coli* и Грам-позитивној бактерији *M. lysodeikticus*, док је умерену активност испољио према Грам-позитивној бактерији *S. aureus*. Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* је показао најјачу антифугалну активност у концентрацији од 500 µg и то према *T. viride*. Слично резултатима испитивања диск-дифузионом методом, највећу активност екстракт је показао према гљиви *T. viride* и на основу МИС вредности.

Имајући у виду резистентност бактерија на синтетичка антибиотска средства, и честе инфекције, попут уринарних инфекција, изазваних бактеријама као што је *E. coli*, јавља се све већа потреба за природним препаратима којима треба дати предност у односу на синтетичке који могу да имају и негативне ефекте. На основу добијених резултата може се закључити да се метанолски екстракт биљке *C. coggygia* може применити у лечењу инфекција изазваних *E. coli*, *M. lysodeikticus*, *S. aureus* и *T. viride*.

Borchardt и сарадници (176) су утврдили да екстракт добијен из лишћа ове биљне врсте показује зону инхибиције од 13 до 10 mm према *S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, али да према *C. albicans* не показује активност.

Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* показао је значајнији антимикробни потенцијал према сојевима Грам-позитивних бактерија, у односу на Грам-негативне, што се може објаснити присуством спољашње и плазмалне мембране код Грам-негативних бактерија које представљају баријеру за испољавање антимикробног ефекта испитиваног екстракта.

Иако је активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* слабија у поређењу са стандардима, антибиотцима, не треба заборавити да је у питању смеша са могућим садржајем микробиолошки инактивних супстанци, као и чињеница да су испитивања вршена у *in vitro* условима.

Квалитативном HPLC анализом екстракта утврђено је да се мирицетин, у поређењу са осталим квантификованим једињењима, издваја својим садржајем. Преглед доступне

литературе показује да о антимикробној активности мирицетина постоје наводи (177, 178). Две врсте рода *Bacillus*, *B. subtilis* и *B. cereus* показале су приближно исту осетљивост према мирицетину, док је врста *B. poylumxa* показала значајну отпорност током периода инкубације (178). Након третмана сојева *Listeria* (LM1, LM2 и LM3) са мирицетином утврђен је висок степен антимикробне резистентности током периода инкубације од 60 часова (179). Насупрот овим резултатима, Уао и сарадници (180) су указали да мирицетин естрахован из биљке *Murica rubra* показује антимикробну активност према неким сојевима врсте *L. monocytogenes*. Demetzos и сарадници (181) испитујући антимикробну активност мирицетина и његових деривата дошли су до закључка да мирицетин са већом значајношћу инхибира Грам-позитивне у поређењу са Грам-негативним бактеријама.

5.4. Антиоксидативна активност метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygia*

Многе лековите биљке садрже велике количине антиоксиданата, као што су секундарни метаболити, који могу да играју важну улогу у адсорбцији и неутрализацији слободних радикала (182).

Способност сакупљања слободних радикала одређена је применом DPPH есеја, једном од најефикаснијих, поузданих и једноставних *in vitro* метода за процену ове важне активности (183, 184). Метода на DPPH радикале се широко примењује при одређивању "скевинџер" активности према дугоживећим радикалима. Антиоксиданти реагују са стабилним DPPH радикалима и трансформишу их у *1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразин*. Ниво деколорације раствора DPPH радикала указује на "скевинџер" потенцијал антиоксидантних једињења (185).

Слободни DPPH радикали се најчешће употребљавају у антиоксидативним тестовима за одређивање способности природних секундарних метаболита, присутних у биљним екстрактима, да предају лабилан водоников атом слободним радикалима. Иако је DPPH азотов радикал, што значи да се неспарени електрон налази на азотовом атому, константе брзине реакција антиоксиданата са овим радикалом се могу апроксимирати са константама за реакције са липидним пероксил радикалима (186, 187, 188). То значи да резултати добијени применом овог антирадикалског теста дају информацију и о заштитном ефекту антиоксиданата током оксидације липида.

Резултати добијени применом ове методе указују да метанолски екстракт биљке *C. coggygia* испољава значајну способност сакупљања слободних радикала и могу се упоредити са вредностима Westenburg и сарадника (13) и Šavikin и сарадника (23). Овакви резултати указују да би се метанолски екстракт биљке *C. coggygia* могао применити као инхибитор или сакупљач слободних радикала.

Активност неутрализације DPPH радикала је добро корелисана са садржајем полифенола у испитиваном узорку. Значајна способност сакупљања слободних радикала метанолског екстракта биљке *C. coggygia* може се приписати присуству полифенолних компоненти. Ови резултати су у сагласности са студијама Katalinić и сарадника (183), Mahakunakorn и сарадника (189) и Ороки и сарадника (190) у којима је уочено да се бројна фенолна једињења, широко распрострањена у биљном свету, понашају као редукујући агенси са антиоксидативном активношћу и способношћу сакупљања слободних радикала.

Ако се има у виду да јони Fe^{2+} могу да иницирају реакцију липидне пероксидације, хелација је један од значајних механизма антиоксидативне активности. Хелациони агенси делују као секундарни антиоксиданти, јер смањују редокс потенцијал стабилизујући

оксидативну форму металног јона (191). Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* показује значајну *in vitro* хелациону и редукциону способност према феро јонима.

Неколико студија је показало да Fe-хелациона активност зависи од структуре флавоноида; само флавоноиди који поседују катехол групу на Б-прстену и 3-хидроксил групу на С-прстену имају Fe³⁺-редукујућу активност и тада се везују за гвожђе (192). Мирицетин (3,3',4',5,5',7-хексахидроксифлавоон), је флавоноид по наведеном принципу. Неколико студија је показало да мирицетин има разнолик терапеутски потенцијал као што је анти-оксидативан, анти-канцероген и анти-инфламаторан (193, 194). Abalea и сарадници (195) су показали да мирицетин штити од оштећења индукованог гвожђем у примарним културама хепатоцита код пацова.

5.5. Механизми хепатопротективне активности метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria*

Третман пацова соја Wistar са метанолским екстрактом биљке *C. coggygria* у концентрацији од 500 mg/kg није довео до ДНК оштећења. Применом Комет есеја утврђена је и антигенотоксична активност метанолског екстракта исте концентрације. Са циљем да се утврде потенцијални механизми хепатопротективне активности дозе која није показала генотоксичан ефекат, пацови соја Wistar су третирани са метанолским екстрактом биљке *C. coggygria* 2 или 12 сати пре аплицирања пирогалола у концентрацији од 100 mg/kg телесне тежине пацова. Спроведено је тестирање активности ензима маркера хепатотоксичности; концентрације билирубина и гвожђа у крвном серуму; интензитета оксидативног стреса и експресије акутно фазних протеина (Hр и α_2M) и транскрипционих фактора (NF κ B и Akt).

Најчешће коришћени биохемијски параметри за детектовање оштећења јетре су аминотрансферазе: аспартат аминотрасфераза (AST) и аланин аминотрансфераза (ALT) и алкална фосфатаза (ALP) као хепатоцелуларни маркери, и укупни билирубин, као хепатобилијарни маркери (196). Статус јетре такође се може пратити и преко концентрације серумског гвожђа (197).

ALT, AST и ALP су осетљиви показатељи акутног оштећења јетре и анализа ових ензима у поремећајима који нису везани за оштећење јетре је неуобичајена (198). У хепатологији се најчешће одређују вредности трансаминаза, и њихова повећана активност представља врло осетљив показатељ оштећења хепатоцита. ALT је билокуларни ензим присутан у цитоплазми и митохондријама хепатоцита, док је AST унилокуларни ензим и налази се у цитозолу хепатоцита (199). Пораст у нивоу AST-а и ALT-а у серуму се приписује оштећењу структуралног интегритета јетре, јер су ови ензими локализовани у цитоплазми и ослобађају се у крв након оштећења ћелија (200). Активност ALT је највећа у хепатоцитима те се може сматрати специфичним параметром хепатоцелуларног оштећења, док се израженији пораст AST-а јавља код тежих и дубљих оштећења хепатоцита. Нешто већи пораст ALT-а се објашњава чињеницом да је ALT специфичнији ензим јетре, јер га у осталим органима има релативно мало, за разлику од AST-а. ALT је цитозоларни ензим хепатоцита, који и код мањих оштећења јетре излази у циркулацију, док је AST присутан у митохондријама (60-70%) и цитозолу (30-40%) хепатоцита и потребно је веће оштећење хепатоцита да би се испољио пораст овог ензима у плазми (201). Оштећења јетре и жучних канала праћена су порастом каталитичке активности алкалне фосфатазе (197). Код свих патолошких процеса који доводе до сметњи у протоку жучи, долази до изражаја солубиларно дејство жучних соли који

изазивају ослобађање ALP са спољашње стране ћелијске мембране. Билирубин је један од најкориснијих клиничких индиција на озбиљност некрозе и његова акумулација је мера коњугације и екскреторног капацитета хепатоцита (202). Метаболише се у јетри и излучује у жучи, акумулира се у крви када постоји оштећење јетре и запушење жучних путева. Повишена концентрација билирубина у серуму је један од клиничких показатеља оштећења жучи, а такође указује и на измењену функцију јетре (197).

Повишене вредности трансминаза и алкалне фосфатазе као и вредности укупног билирубина у серуму експерименталне групе животиња третираних са пирогалолом су статистички сигнификантне у односу на вредности контролне групе пацова, и уједно представљају меру оштећења ћелија јетре код ове експерименталне групе. Повишене вредности наведених биохемијских параметара указују на функционално оштећење јетре пацова, изазвано интраперитонеалним аплицирањем пирогалола, које је код ове експерименталне групе евидентно. Пирогалол, услед стварања слободних радикала, изазива значајно оштећење мембрана хепатоцита и ослобађање цитозолне ALT и AST у циркулацију, што је у корелацији са студијом Gupta и сарадника (116, 117). У експерименталној групи животиња третираних са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе пре третмана са пирогалолом уочено је статистички значајно смањење вредности трансминаза и алкалне фосфатазе, као и вредности укупног билирубина, у односу на групу животиња третираних само са пирогалолом. Смањене вредности ALT, AST, ALP и укупног билирубина, као резултат аплицирања метанолског екстракта биљке *C. coggygia* пре третмана са пирогалолом, може бити последица присуства структурно различитих фенолних једињења, као што су фенолне киселине, флавоноиди и танини (203, 204, 205). Имајући у виду да је HPLC анализом екстракта утврђено да се мирицетин, у поређењу са осталим квантификованим једињењима, издваја својим садржајем, применом пирогалола испитивана је улога мирицетина, као главне компоненте екстракта, у редукцији вредности ALT, AST, ALP и укупног билирубина. Интраперитонеално аплицирање мирицетина значајно је смањило пирогалолом индуковано повећање вредности ALT, AST, ALP и укупног билирубина у серуму.

Интраперитонеално аплицирање пирогалола узроковало је пораст нивоа гвожђа у серуму пацова. Акумулација гвожђа је штетна јер промовише сакупљање високо реактивних хидрокси радикала који су способни да уклоне атом водоника од полинезасићених масних киселина и тиме иницирају липидну пероксидацију (206). Agrawal и сарадници (207) су указали да гвожђе ослобођено од феритина након третмана са пирогалолом катализира пероксидацију ћелијских мембрана. Генерисани липидни хидропероксиди могу изазвати

значајне промене у структури и функцији мембране. Третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом утицао је на статистички значајно смањење нивоа гвожђа у односу на третман само са пирогалолом.

Одговор организма на трауму је полигено детерминисан, али вероватно неки ген или група гена доприносе више него други, у смислу веће отпорности организма на траума. Различите врсте траума, као што су инфламације и инфекције, изазивају акутно фазни одговор, неспецифичну, системску реакцију која има важну заштитну улогу (208, 209, 210, 211). Улога акутно фазног одговора је да спречи даље оштећење ткива које је настало услед запаљења, да изолује и уништи инфективне микроорганизме и да активира процесе одговорне за репарацију оштећеног ткива, односно врати организам у нормално стање - хомеостазу (212). Акутно фазни одговор обухвата специфичне промене у кардиоваскуларном, неуроендокрином и метаболичком систему (208). У протеинском систему долази до *de novo* синтезе такозваних протеина акутне фазе, специфичних за акутно фазни одговор (213, 214). Ови протеини се убрајају у компоненте урођеног (неспецифичног) имунитета укљученог у успостављање хомеостазе и ограничавање размножавања микроорганизма пре него што се развије стечени (специфични) имунитет.

Протеини акутне фазе могу да се поделе на "позитивне" и "негативне" у односу на то да ли им се концентрација повећава или смањује током одговора организма на неки стимулус. У позитивне акутно фазне протеине убрајају се протеини чија се концентрација увећава и до неколико стотина пута у току акутно фазног одговора као што је то случај са хаптоглобином, С-реактивним протеинима, серум амилоид А, церулоплазмином, фибриногеном, α_1 -ацид гликопротеином итд. Ове гликопротеине синтетишу хепатоците након стимулације проинфламаторним цитокинима, а затим их ослобађају у крв. У негативне акутно фазне протеине убрајају се албумин и трансферин који се такође синтетишу у јетри, али у мањем обиму у тим условима него када је у стању хомеостазе (215). Промене у концентрацији ових протеина доводе и до промена у целом протеинском систему тј. одражавају се на концентрацију укупних протеина.

Третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* индукује акутно фазни одговор у смислу повећања концентрације два испитивана акутно фазна протеина, хаптоглобина (Hr) и α_2 -макроглобулина (α_2M).

Основна улога хаптоглобина је да везује слободни хемоглобин који је токсичан и медијатор је инфламације (216, 217). Поред биолошких функција хаптоглобина као што су стимулација ангиогенезе (218), улога у метаболизму масти (219), имуномодулаторни ефекат

(220), инхибиција нагомилавања неутрофила у респираторном тракту (221), примарна улога је да спречи губитак гвожђа формирањем стабилног комплекса са слободним хемоглобином у крви (222). Сматра се да хаптоглобин има и бактериостатски ефекат ограничавајући доступност гвожђа у крви које је неопходно за раст бактерија (222).

$\alpha_2\text{M}$ је тетрамерни гликопротеин који функционише као неселективни инхибитор различитих врста неспецифичних протеаза са важном улогом у успостављању нарушене хомеостазе олакшавајући транспорт цитокина и хормона (223). Ранија истраживања су показала да аплицирање пречишћеног пацовског $\alpha_2\text{M}$ експерименталним животињама у траумама, типа опекотина или озрачивања целог организма, значајно повећава њихову стопу преживљавања (224).

Иако је метанолски екстракт биљке *C. coggygia* индуковао пораст нивоа два акутно фазна протеина, вредности су биле статистички ниже у односу на акутно фазну реакцију након аплицирања терпентина, индуктора акутно фазног одговора. Јасно је да је овај процес имао значајну улогу у слабљењу ефекта пирогалола, с обзиром да је третман након 12 сати, који је омогућио развој акутно фазне реакције, био ефикаснији од третмана након 2 сата, када је акутно фазна реакција била у својој раној фази. Акутни одговор организма, односно његови медијатори, могу да се докажу неколико дана од стимулуса, али кинетика одговора зависи од врсте и од степена оштећења ткива (225). Максимална концентрација протеина акутне фазе у серуму се углавном постиже након 24 до 48 часова од стимулуса. Може се закључити да је третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре аплицирања пирогалола ефикасно заштитио јетру пацова од накнадног, пирогалолом индукованог прекида хомеостазе. Самим тим резултати показују значајни превентивни потенцијал екстракта биљке *C. coggygia* према акутној хепатотоксичности.

Настанак слободних радикала је у сталној равнотежи са антиоксидативним одбрамбеним системом. Иако слободни радикали имају значајну улогу у низу физиолошких процеса, поремећај баланса између ових реактивних врста и антиоксидативног система може да доведе до озбиљног нарушавања нормалне хомеостазе ћелије. Нарушавање оксидо-редуктивне равнотеже услед повишеног нивоа слободних радикала, уз висок степен њихове неселективне реактивности и нестабилности, доводи до стања оксидативног стреса. Као последица оксидативног стреса јављају се тзв. оксидативна оштећења, која се изражавају кроз различита патолошка стања. Уопштено, оксидативни стрес може да буде проузрокован повишеним нивоом слободних радикала као последица излагања кисеонику, присуства токсина, инфламаторних процеса и слично, или инхибиране функције антиоксидантног система, који

се јавља при смањењу активности ензима антиоксидативне заштите (супероксид дизмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза...).

Имајући у виду да су антиоксиданси синтетичког порекла (бутилирани хидрокситолуен и бутилирани хидроксианизол), са једне стране познати по својој способности да заустављају ланчану реакцију липидне пероксидације, док је са друге доказана њихова канцерогена активност и способност изазивања оштећења јетре (92), све је већа тежња у примени антиоксиданаса природног порекла. За процену нарушене прооксидативно-антиоксидативне равнотеже код експерименталних животиња третираних са пирогалолом и са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* од посебног значаја је испитивање липидних пероксида.

Липидна пероксидација, као најчешћи феномен деловања слободних радикала, представља оксидативно оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротеине и друге молекуле који садрже липиде, у условима постојања оксидативног стреса. Најчешће се одређује концентрација малоналдехида који настаје из липидних пероксида у процесу липидне пероксидације. Липидна пероксидација и продукти слични малондиалдехиду испитивани су као индикатори оксидативног стреса, јер слободни радикали и/или реактивни оксигени метаболити директно могу узроковати оксидативно оштећење, а њихов серумски ниво исказује постојање оксидативног стреса (226, 227).

Крајњи продукт липидне пероксидације након третмана са пирогалолом детектован је индиректним путем – мерењем TBARS-а у серуму и јетри експерименталних животиња. Пораст концентрације TBARS-а, индекса липидне пероксидације, у серуму и јетри пацова третираних са пирогалолом указује на присуство оксидативног стреса. Повећан ниво липидне пероксидације у јетри животиња третираних са пирогалолом указује на значајну липидну пероксидацију.

Агравал и сарадници (207) у својој студији су указали да гвожђе ослобођено из феритина након третмана са пирогалолом катализује пероксидацију ћелијских мембрана. Липидни хидропероксици изазивају значајну штету у структури и функцији мембране. Ови налази су у сагласности са чињеницом да администрација метанолског екстракта биљке *C. coggygia* доводи до смањења пирогалолом изазваног повећања нивоа TBARS-а скоро до базалног нивоа. Чињеница да претретман са екстрактом спречава липидну пероксидацију индуковану пирогалолом указује да метанолски екстракт биљке *C. coggygia* има важну улогу у заштити мембрана од оштећења.

Оксидативни стрес представља дисбаланс између прооксиданаса (слободних радикала) и система антиоксидативне заштите у корист прооксиданаса, који потенцијално води ка

оштећењу. Антиоксидативна заштита као физиолошки процес функционише непрестано у здравом организму и има за циљ да спречи штетно деловање прооксидативних фактора.

Ензими антиоксидативне заштите имају главну улогу у ендогеној заштити ћелија од оксидативног оштећења путем утицаја на инхибицију ћелијске пролиферације, мутације и геномске нестабилности (228).

Претретман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* условљава статистички значајно повећање активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT и GST) у јетри експерименталних животиња. Активност антиоксидативних ензима у јетри пацова третираних само са пирогалолом је знатно испод базалног нивоа активности ензима у контролној групи животиња. Овакви резултати јасно указују на ефикасну заштиту екстракта биљке *C. coggygia* од пирогалолом изазваног преоптерећења слободним радикалима. Како су нус-производи липидне пероксидације узрок ковалентних модификација GST (229), смањење активности GST након изложености животиња пирогалолу је вероватно последица повећане липидне пероксидације, док је код пацова третираних са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* пре третмана са пирогалолом GST активност делимично повећана као резултат способности екстракта да сузбије пероксидацију липида.

Сигналом индукована фосфорилација је од необичне важности за модулацију активности многих транскрипционих фактора. Најизразитији пример оваквог механизма активације транскрипционих фактора је активација NF-κB транскрипционог фактора. Транскрипциони фактор NF-κB (енг. *Nuclear Factor-kappa B*) је регулаторни протеин који контролише експресију многих индуцибилних и ткивно специфичних гена, учествујући на тај начин у регулацији проинфламаторних и имуних одговора ћелије, ћелијске пролиферације и апоптозе. Овај транскрипциони фактор координира и активира одбрану организма или директним одговором на патогене и стресогене стимулусе, или индиректним одговором на сигналне молекуле ослобођене из других инфицираних или оштећених ћелија и ткива.

Међу бројним сигналним молекулима који активирају NF-κB спадају и агенси који узрокују оксидациони стрес (230). Реактивни кисеонички метаболити, који настају у респираторном ланцу митохондрија у улози секундарних гласника, посредују у активацији NF-κB. Да активност NF-κB директно зависи од редокс стања ћелија показују резултати позитивне регулације активности овог фактора при ниској концентрацији тиолних једињења (глутатион) и инхибиције његове активације при високим концентрацијама истих. Регулација интраћелијског глутатиона директно регулише експресију гена који поседују NF-κB-везујуће

место у промотору (231). И док, са једне стране, реактивне врсте кисеоника активирају NF-κB, различита антиоксидативна једињења инхибирају његову активацију (232, 233).

Велики број агенаса природног и синтетичког порекла су тестирана у циљу утврђивања потенцијалне инхибиторне активности транскрипционог фактора NF-κB (234, 235, 236).

У пирогалол третираној групи животиња ниво експресије NF-κB је изнад базалног нивоа, док је код пацова претретираних са метанолским екстрактом биљке *C. coggyria* уочен знатно нижи ниво експресије NF-κB. Очигледно је да претретман са метанолским екстрактом ефикасно уклања реактивне врсте кисеоника, ублажава последице оксидативног стреса и уклања стимулусе активације транскрипционог фактора NF-κB.

До сличног закључка се долази и након праћења експресије серин-треонин киназе Б познате и као Akt. Akt функционише као централни интегрисани модул *фосфатидилинозитол 3-киназе* – Akt сигналног пута у ћелији и регулише бројне критичне путева, укључујући и оне који доводе до ћелијске пролиферације и инхибиције апоптозе (156, 157). Akt игра важну улогу у одржавању ћелијског опстанка (237, 238, 239). Док администрација пирогалола резултира смањену Akt фосфорилацију и активност, претретмани са метанолским екстрактом биљке *C. coggyria* или са мирицетином очигледно обезбеђује параметар који дозвољава функционисање Akt, неопходног за правилно функционисање ћелија.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Иако досадашња испитивања биолошких активности екстракта бројних биљних врста указују на њихову антимикуробну, анти-инфламаторну, антиоксидативну, антимуtagenу и антиканцерогену активност, мали број студија обједињује све ове биолошке активности. Мултидисциплинарни приступ је примењен са циљем да се обједини неколико биолошких активности метанолског екстракта биљке *C. coggygria*, ради утврђивања терапеутског потенцијала.

На темељу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. У погледу квантитативног садржаја укупних фенола, флавоноида, кондензованих танина и галотанина у екстракту је детектована значајна количина флавоноида и укупних фенола.

2. Квантитативном анализом састава фенолних једињења метанолног екстракта биљке утврђено је присуство кафење киселине, хлорогенске киселине, кумаринске киселине, ферулне киселине, рузмаринске киселине и флавоноида мирицетина, кверцетина, кемпферола, резвератрола и рутина.

3. У погледу идентификације конституената, на основу ретенционих времена и њиховим поређењем са стандардима и квантитативне анализе HPLC методом, утврђено је да су најзаступљенији флавоноиди мирицетин са 511.50 $\mu\text{g/g}$ екстракта и кверцетин са 69.80 $\mu\text{g/g}$ екстракта. У поређењу са осталим детектованим једињењима из групе фенолних киселина својим садржајем се истиче рузмаринска киселина са 18.55 $\mu\text{g/g}$ екстракта.

4. Применом теста за детекцију полно везаних рецесивно леталних мутација код еукариотског модел организма *D. melanogaster* утврђено је да је екстракт биљке *C. coggygria* при концентрацији од 5% индуковао рецесивне леталне X-везане мутације у две герминативне ћелијске линије, на нивоу сперматозоида и сперматоцита, док су се сперматиде показале као отпорније. Иако екстракт показује одређен ниво генотоксичног потенцијала, он је још увек далеко од мутагености добијене за позитивну контролу. Пост-третман са метанолским екстрактом у концентрацији од 2% утицао је на смањење генотоксичности ЕМС-а у две герминативне ћелијске линије (сперматозоиди и сперматиде) у односу на позитивну контролну групу. Пост-третмани са мирицетином, који се у поређењу са осталим квантификованим једињењима издваја својим садржајем, кверцетином и рузмаринском

киселином, који се по садржају издвајају у односу на остале идентификоване флавоноиде и фенолне киселине у екстракту, драстично су редуковали фреквенцу рецесивно леталних Х-везаних мутација, како у премејјотским, тако и у постмејјотским герминативним ћелијским линијама.

5. Применом алкалне верзије Комет есеја на модел организму *D. melanogaster* није утврђена статистички значајна разлика у третману са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* у концентрацији од 1% у односу на негативну контролу. На основу расподела комет класа и одабраних квантитативних параметара може се закључити да метанолски екстракт добијен из стабла биљке *C. coggygia* у концентрацији од 1% не показује генотоксичну активност.

6. Применом Комет теста код пацова соја Wistar у *in vivo* условима испитана је потенцијална генотоксична активност метанолског екстракта у концентрацији од 500, 1000 и 2000 mg/kg телесне тежине пацова. Статистички значајне разлике у квалитативним и квантитативним параметрима у односу на негативну контролу се могу уочити након третмана са највишом испитиваном дозом екстракта биљке *C. coggygia* од 2000 mg/kg и са дозом од 1000 mg/kg телесне тежине. У узорцима јетре и коштане сржи животиња третираних са екстрактом у концентрацији од 500 mg/kg телесне масе, није уочена статистички значајна разлика у квалитативним и квантитативним параметрима у односу на негативну контролу. Иако екстракт при концентрацијама од 1000 и 2000 mg/kg телесне тежине пацова показује одређен ниво генотоксичног потенцијала, он је још увек далеко од мутагености добијене за позитивну контролу. Концентрација од 500 mg/kg телесне масе (или нижа) се може сматрати безбедном концентрацијом у погледу продуковања генотоксичног ефекта.

7. Антигенотоксична активност метанолског екстракта биљке *C. coggygia* и мирицетина, главне компоненте екстракта, испитивана је на пацовима третираним пирогалолом, у концентрацији од 100 mg/kg телесне тежине. На основу расподеле комет класа и одабраних квантитативних параметара може се уочити знатан степен редукције ДНК оштећења након претретмана са екстрактом и са мирицетином 2 и 12 сати пре пирогалола. Процент редукције у укупном скору знатно је експресивнијег карактера у групи животиња изложених пирогалолу 12 сати након третмана са метанолским екстрактом или мирицетином.

8. Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* у концентracији од 500 μg показао је активност према свим испитиваним патогеним и фитопатогеним бактеријама и гљивама са зоном инхибиције у интервалу од 8 до 18 mm. Значајну осетљивост према дејству метанолског екстракта показале су Грам-негативна бактерија *E. coli* (при концентрацији екстракта од 150 и 500 μg зоне инхибиције су износиле 29 и 17 mm, респективно) и *M. lysodeikticus* (при концентрацији екстракта од 150 и 500 μg зоне инхибиције су износиле 20 и 18 mm, респективно). Резултати антимикробног потенцијала метанолског екстракта су у опсегу концентрација од 125 $\mu\text{g/ml}$ до 250 $\mu\text{g/ml}$, што представља веома добру антимикробну активност. Екстракт је показао најјачу осетљивост на бактерију *B. subtilis* и гљиву *T. viride* са MIC = 125 $\mu\text{g/ml}$, а најмању осетљивост према бактеријама *S. aureus*, *K. pneumonia*, *E. coli* и *M. lysodeikticus* (MIC = 250 $\mu\text{g/mL}$).

9. Метанолски екстракт биљке *C. coggygia* поседује значајну антиоксидативну активност. Резултати добијени применом DPPH методе *in vitro* указују да екстракт испољава значајну способност сакупљања слободних радикала, и да би се могао применити као инхибитор слободних радикала. Резултати указују на значајну *in vitro* хелациону и редукциону способност метанолског екстракта према феро јонима. Са порастом концентрације повећава се и редуктивна и хелациона активност екстракта у поређењу са стандардима.

10. Са циљем да се утврде потенцијални механизми хепатопротективне активности дозе која није показала генотоксичан ефекат, пацови соја Wistar су третирани са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 2 или 12 сати пре аплицирања пирогалолу у концентрацији од 100 mg/kg. У циљу сагледавања оштећења ћелија јетре након третмана са пирогалолом, праћена је активност хепатичних ензима (AST, ALT и ALP) и концентрација укупног и феро гвожђа, док је хепатобилијарна функција јетре праћена преко промена у концентрацији укупног билирубина у серуму. Статистички значајна редукција у концентрацији укупног и феро гвожђа, и у вредностима трансминаза, алкалне фосфатазе и укупног билирубина уочена је серуму пацова третираних са метанолским екстрактом или са мирицетином 2 или 12 сати пре третмана са пирогалолом. Резултати показују значајни превентивни потенцијал екстракта биљке *C. coggygia* према акутној хепатотоксичности.

11. Третман пацова соја Wistar са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* индуковао је акутно фазни одговор у виду повећања концентрације два испитивана акутно фазна

протеина, Нр и $\alpha_2\text{M}$. Иако је екстракт узроковао раст нивоа два акутно фазна протеина, вредности су биле статистички ниже у односу на акутно фазну реакцију након аплицирања терпентина, индуктора акутно фазног одговора. Јасно је да је овај процес имао значајну улогу у слабљењу ефекта пирогалолола, с обзиром да је третман након 12 сати, који је омогућио развој акутно фазне реакције, био ефикаснији од третмана након 2 сата, када је акутно фазна реакција била у својој раној фази. Може се закључити да је третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* 12 сати пре аплицирања пирогалолола ефикасно заштитио јетру пацова од накнадног, пирогалолом индукованог прекида хомеостазе.

12. Липидна пероксидација, као најчешћи феномен деловања слободних радикала, представља оксидативно оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротеине и друге молекуле који садрже липиде, у условима постојања оксидативног стреса. Третман са метанолским екстрактом биљке *C. coggygia* доводи до смањења пирогалолом изазваног повећања липидне пероксидације скоро до базалног нива. Чињеница да претретман са екстрактом спречава липидну пероксидацију индуковану пирогалолом указује да метанолски екстракт биљке *C. coggygia* има важну улогу у заштити мембрана од оштећења.

13. Ензими антиоксидативне заштите имају главну улогу у ендогеној заштити ћелија од оксидативног оштећења путем утицаја на инхибицију ћелијске пролиферације, мутације и геномске нестабилности. Претретман са метанолским екстрактом доводи до статистички значајног пораста у активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT и GST) у јетри експерименталних животиња. Резултати јасно указују на ефикасну заштиту екстракта од пирогалолом изазваног преоптерећења слободним радикалима.

14. У групи животиња третираних са пирогалолом ниво експресије NF- κ B је изнад базалног нивоа, док је код пацова претретираних са метанолским екстрактом уочен знатно нижи ниво експресије NF- κ B. Очигледно је да претретман са метанолским екстрактом ефикасно уклања реактивне врсте кисеоника, ублажава последице оксидативног стреса и уклања стимулусе активације транскрипционог фактора NF- κ B. До сличног закључка се долази и након праћења експресије транскрипционог фактора Akt. Док третман са пирогалолом условљава смањену Akt фосфорилацију и активност, претретман са метанолским екстрактом или са мирицетином очигледно обезбеђује параметар који дозвољава функционисање транскрипционог фактора Akt, неопходног за правилно функционисање ћелија.

Значај ове докторске дисертације огледа се у откривању, тестирању и препоруци за потенцијалну примену екстракта богатог фенолним једињењима који показују значајну биолошку и фармаколошку активност у хемији хране, медицини, козметици и фармацији. Резултати су дефинисали фармаколошку активност испитиване биљке и јасно указали да метанолски екстракт биљке *C. coggygia* има све предуслове за примену у фармацеутске сврхе и за даља испитивања у циљу дефинисања начина и дозне примене.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Gajić M. (1973). Anacardiaceae. In: Josifović M. (ed.) The Flora of Serbia. Belgrade: Serbian Academy of Science and Arts, 63-65.
2. Barkley FA. (1963). A criticism of the traditional concept of the genus *Rhus*. *Prospects of Iraq Biology*, 3:52-58.
3. Jovanović B. (1973). Genus *Cotinus*. In: Josifović M. (ed.) The Flora of Serbia. Belgrade: Serbian Academy of Science and Arts.
4. Rayne S, Mazza G. (2007). Biological activities of extracts from Sumac (*Rhus spp.*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 62:165-175.
5. Grieve M. (1971). A modern herbal. New York: Dover Publication Inc.
6. Mitchell JD. (2004). Anacardiaceae. In: Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Heald SV. (eds.) Flowering Plants of the Neotropics. Princeton University Press, Princeton, USA, 14-16.
7. Demirci B, Demirci F, Baser KH. (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* (Scop.) from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 18:43-44.
8. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96:145-150.
9. She Q, Shang D, Ma F, Zhang Z. (1991). Pharmacological study on anti-hepatitis effect of *Cotinus coggygia* Scop. syrup. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 16:746 (Abstract).
10. Johnson T. (1999). CRC ethnobotany desk reference. Boca Raton, Fla: CRC Press, 708.
11. Plants for a Future (PFAF). (2004). Online database *Cotinus coggygia*. Available from: <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Cotinus+coggygia> [Accessed 9 April 2007].
12. Kišgeci J. (2002). Lekovito bilje - Gajenje, sakupljanje, upotreba. Partenon, Beograd.
13. Westenburg HE, Lee KJ, Lee SK, Fong HHS, van Breemen RB, Pezzuto JM, Kinghorn AD. (2000). Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygia*. *Journal of Natural Product*, 63:1696-1698.
14. Stathopoulou K, Magiatis P, Karapanagiotis I, Valianou L, Chryssoulakis Y. (2007). Phytochemical analysis of *Cotinus coggygia* heartwood. Identification of isolated colorants in historical art objects. *Planta Medica*, 73:P163.
15. Valianou L, Stathopoulou K, Karapanagiotis I, Magiatis P, Pavlidou E, Skaltsounis AL, Chryssoulakis Y. (2009). Phytochemical analysis of young fustic (*Cotinus coggygia* heartwood) and identification of isolated colourants in historical textiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394:871-882.

16. Antal DS, Schwaiger S, Ellmerer-Müller EP, Stuppner H. (2010). *Cotinus coggygia* wood: novel flavanone dimer and development of an HPLC/UV/MS method for the simultaneous determination of fourteen phenolic constituents. *Planta Medica*, 76:1765-1772.
17. Simić M, Vučićević D, Milenković M, Kovačević N. (2008). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Cotinus coggygia* extracts. *Planta Medica*, 74:PA63
18. Milošević T, Nićiforović N, Mihailović V, Solujić S, Vuković N. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of flowers, leaves and stems of *Cotinus coggygia*. *Planta Medica*, 74:PI23
19. Novaković M, Vučković I, Janković P, Soković M, Filipović A, Tešević V, Milosavljević S. (2007). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygia* from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72:1045-1051.
20. Tsankova ET, Dyulgerov AS, Milenkov BK. (1993). Chemical composition of the Bulgarian sumac oil. *Journal of Essential Oil Research*, 5:205-207.
21. Hethelyi I, Domokos J, Lemberkovics E, Verzar-Petri G. (1986). Analysis of the essential oil of *Cotinus coggygia* by means of mass spectrometry. *Herba Hungarica*, 25:135-48.
22. Tzakou O, Bazos I, Yannitsaros A. (2005). Essential oils of leaves, inflorescences and infructescences of spontaneous *Cotinus coggygia* Scop. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 20:531-533.
23. Šavikin K, Zdunić G, Janković T, Stanojković T, Juranić Z, Menković N. (2009). *In vitro* cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygia*. *Natural Products Research*, 23:1731-1739.
24. Antal DS, Schwaiger S, Hornick A, Rollinger JM, Prast H, Stuppner H. (2008). *Cotinus coggygia* heartwood: a new source of acetylcholinesterase inhibiting compounds. *Planta Medica*, 74:PA194.
25. Zdunić G, Stević T, Šavikin K, Menković N, Janković T. (2007). Antimicrobial activity of some medicinal plants growing in Serbia and Montenegro. *Planta Medica*, 73:P150.
26. Gurib-Fakim A. (2006) Review: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:2-93.
27. Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, La Voie EJ, Huang T, Ho C. (1998). Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:4869-4873.
28. Yen GC, Hsieh CL. (1998). Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:3952-3957.

29. Shan B, Cai JZ, Brooks JD, Corke H. (2008). Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry*, 109:530-537.
30. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66:401-436.
31. Parr AJ, Bolwell GP. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:985-1012.
32. Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. (1990). *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
33. Ochir G, Budesinsky M, Motl O. (1991). New sesquiterpene lactones from the *Achillea* genus. *Planta Medica*, 2:57.
34. Greger H, Hofer O. (1990). Alkamides and plicacetylenes two different biogenetic trends in the European *Achillea millefolium* group. *Planta Medica*, 56:531.
35. Della LR, Sosa S, Kastner U. (1992). Anti-inflammatory principles from *Achillea aspenifolia* and *Achillea pratensis*. *Planta Medica*, 58:641.
36. Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliövaara M, Järvinen R, Häkkinen S, Aromaa A, Reunanen A. (2000). Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54:415-417.
37. Hirvonen T, Virtamo J, Korhonen P, Albanes D, Pietinen P. (2000). Intake of flavonoids, carotenoids, vitamins C and E, and risk of stroke in male smokers. *Stroke*, 31:2301-2306.
38. Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. (1999). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes and Control*, 10:71-75.
39. le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92:154-160.
40. Bosnić T. (1990). Farmakognoksijsko ispitivanje talije (*Pamassia palustris*). Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Sarajevo, 21-38.
41. Fukuchi K, Sakagami H, Okuda T, Hatano T, Tanuma S, Kitajima K, Inoue Y, Inoue S, Ichikawa S, Nonoyama M, Konno K. (1989). Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Research*, 11:285-298.
42. Rodu B, Russel CM, Marfiglu G. (1991). Determining therapeutic efficacy in recurrent *Herpes labialis* by lesion size analysis. *Oral Surgery*, 72:178-183.
43. Zhang J, Zhan B, Yao X, Gao X, Shong I. (1995). Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital herpes virus *in vitro*. *Zhanguo-Zhogiao-Zazhi*, 20:556-558.

44. Mirković S, Rakočević S. (1997). Effect of hydrolyzable tannins on HSV-Type 1 *in vitro* conditions. *Balkan Journal of Stomatology*, 1:102-104.
45. Zimonjić DB, Savković N, Anđelković M. (1990). Genotoksični agensi: efekti, principi i metodologija detekcije. Beograd: Naučna knjiga.
46. Erickson RP. (2010). Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutation Research*, 705:96-106.
47. De Flora S, Izzotti A. (2007). Mutagenesis and cardiovascular diseases: molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutation Research*, 621:5–17.
48. Hoeijmakers JH. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361:1475-1485.
49. Slatter MA, Gennery AR. (2010). Primary immunodeficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12:e9.
50. Frank SA. (2010). Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:1725-1730.
51. Kim BS, Margolin BH. (1999). Prediction of rodent carcinogenicity utilizing a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34:297-304.
52. Center for Drug Evaluation and Research (U.S.) and International Conference on Harmonisation. (2008). S2(R1) Guidance genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use [electronic resource]. U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD. Available from:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074931.pdf> [Accessed 26 January 2009].
53. Matsuyama R, Ogata K, Kitamoto S, Oota M. (2009). Comet assay, a new *in vivo* mutagenicity test-regulatory significance and scientific development. *Sumitomo Chemical*, 2009-II:48-56.
54. Vogel E. (1984). A comparison of genotoxic activity in somatic tissue and in germ cells of *Drosophila melanogaster*. In: Mutation, cancer and malformation. Chy EHY, Generoso WM. (eds.) Plenum Press, New York, 233-255.
55. Abrahamson S, Würgler FE, Dejongh C, Unger Meyer H. (1980). How many loci on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* can mutate to recessive lethals? *Environmental Mutagenesis*, 2:447-453.

56. Rodriguez-Arnaiz R, Ramos PM. (1986). Mutagenicity of nickel sulphate in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research, 170:115-117.
57. Andrade HHR, Reguly ML. (1993). The induction of sex-linked recessive lethals by formaldehyde in two strains of *Drosophila melanogaster*. Revista Brasileira de Genetica, 16:819-823.
58. Fourcman P, Mason JM, Valencia R, Zimmering S. (1994). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IX. Results of 50 coded compounds tested for the national toxicology program. Environmental and Molecular Mutagenesis, 23:51-63.
59. Stanić S. (2008). Genotoxic effect of fungicide copper oxychloride on *Drosophila melanogaster*. Periodicum biologorum, 110:347-349.
60. Palermo AM, Mudry MD. (2011). Genotoxic damage induced by isopropanol in germinal and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 726:215-221.
61. Matića S, Stanić S, Solujić S, Mladenović M, Mihailović V. (2012). *In vivo* antigenotoxic potential and possible mechanism of action of selected 4-hydroxy-2H-chromen-2-one derivatives. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 26:322-330.
62. Stanić S, Pavlović-Muratspahić D, Solujić S, Čomić Lj, Milošević T, Sukdolak S. (2008). Preliminary results on biological activity of a pollen extract of *Ambrosia artemisifolia* L. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 9:45-53.
63. Matić S, Stanić S, Solujić S, Milošević T, Nićiforović N. (2011). Biological properties of the *Cotinus coggygia* methanol extract. Periodicum Biologorum, 113:87-92.
64. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. (1995). The Comet assay: a comprehensive review. Mutation Resesearch, 339:37-59.
65. Anderson D, Yu TW, McGregor DB. (1998). Comet assay as indicator of carcinogen exposure. Mutagenesis, 13:539-555.
66. EFSA, European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. EFSA Journal, 9:2379.
67. Olive P, Banáth JP, Durand RE. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay". Radiation Research, 122:86-94.
68. Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175:184-191.
69. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). The single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35:206-221.

70. Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus HJ, Fjällman A, Frieauff W, Suter W. (2001). Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: Comparative investigation with the micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 39:843-858.
71. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G. (2005). The *in vivo* comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20:245-254.
72. Okemo PO, Bais HP, Vivanco JM. (2003). *In vitro* activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens. *Fitoterapia*, 74:312-316.
73. Russell AD. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases*, 3:794-803.
74. Burt S. (2004). Essential oils- their antimicrobial properties and potential application in foods. *The International Journal of Food Microbiology*, 94:223-53.
75. Ríos JL, Recio MC. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:80-84.
76. Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A, Jana M. (2006). Antimicrobial activities of the leaf extract of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:104-107.
77. Glišić S, Mišić D, Stamenić M, Žižović I, Ašanin R, Skala D. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil – chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 105:346-52.
78. Tomlinson S, Palombo EA. (2005). Characterisation of antibacterial Australian medicinal plant extracts by investigation of the mechanism of action and the effect of interfering substances. *Journal of Basic Microbiology*, 45:363-370.
79. Oladunmoyem MK, Akinyosoye FA, Adetuyi FC. (2006). Release of sodium and potassium ions by aqueous and ethanolic extract of *Cassia occidentalis* on some selected bacteria. *Trends in Applied Sciences Research*, 2:33-35.
80. Delamare APL, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100:603-608.
81. Samy RP, Ignacimuthu S. (2000). Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 69:63-71.
82. Walsh SE, Maillard JY, Russel AD, Catrenich C.E, Charbonneau AL, Bartolo RG. (2003). Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on gram -positive and –negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94:240-247.
83. Jawetz E, Melnick J, Adelberg EA. (2004). *Medical microbiology*. 23rd Edition. McGraw-Hill Company, 764.

84. Lahlou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18:435-448.
85. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42:321-324.
86. Janković S. (2009). Rational use of antibiotics in clinical practice. *Racionalna terapija*, 1:1-6.
87. Gupta J, Siddique YH, Ara G, Beg T, Afzal M. (2009). Protective role of tea polyphenol, EGCG, against genotoxic damage induced by anticancer drugs and steroid compounds in cultured human lymphocytes. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 7(1).
88. Kaur P, Walia A, Kumar S, Kaur S. (2009). Antigenotoxic activity of polyphenolic rich extracts from *Aegle marmelos* (L.) Correa in human blood lymphocytes and *E.coli* PQ 37. *Records of Natural Products*, 3:68-75.
89. Sreeranjini S, Siril EA. (2011). Evaluation of anti-genotoxicity of the leaf extracts of *Morinda citrifolia* Linn. *Plant, Soil and Environment*, 57:222-227.
90. Krishnaveni M, Mirunalini S. (2011). AMLA—the rile of ayurvedic therapeutic herb in cancer. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4:13-17.
91. Xavier CPR, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis* and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and Cancer*, 61:564-571.
92. Nobuyuki I, Shoji F, Hiroyuki T. (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *Critical Reviews Toxicology*, 15:109-150.
93. Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Raical Research Communications*, 9:1-32.
94. Halliwell B, Gutteridge J. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. New York, Oxford University Press Inc.
95. Aruoma OI. (1996) Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology and Medicine*, 20:675-705.
96. Evereklioglu C, Hamdi E, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. (2003). Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Documenta Ophthalmologica*, 106:129-136.
97. Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A. (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *Journal of American College of Nutrition*, 22:147-56.

98. Brigelius R. (1985). Mixed disulfides: biological functions and Increase in oxidative stress. In: Oxidative stress. Sies H. (ed.) Academic Press, London, 243-272.
99. Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. The Annual Review of Biochemistry, 58:79-110.
100. Pietta P, Simonetti P, Mauri P. (1998). Antioxidant activity of selected medical plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:4487-4490.
101. Benzi G. (1993). Aerobic performance and oxygen free-radicals. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness, 33:205-222.
102. Fridovich I. (1975). Superoxide dismutases. The Annual Review of Biochemistry, 44:147-159.
103. Weydert CJ, Waugh TA, Ritchie JM, Iyer KS, Smith JL, Li L, Spitz DR, Oberley LW. (2006). Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. Free Radical Biology and Medicine, 41:226-237.
104. Guntupalli M, Chandana V, Palpu P, Shirwaikar AI. (2006). Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn. Journal of Ethnopharmacology, 103:484-490.
105. Chatterjee TK. (2000). Medicinal plants with hepatoprotective properties. In: Herbal opinions. 3rd ed. Books and allied (P) Ltd, 35.
106. Gupta RK, Kesari AN, Murthy PS, Chandra R, Tandon V, Watal G. (2005). Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology, 99:75-81.
107. Stickel F, Schuppan D. (2007). Herbal medicine in the treatment of liver diseases. Digestive and liver Disease, 39:293-304.
108. Punitha SC, Rajasekaran M. (2011). Antioxidant mediated defense role of *Wedelia calendulacea* herbal extract against CCl₄ induced toxic hepatitis. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1:111-115.
109. Sharma SK, Ali M, Gupta J. (2002). Plants having hepatoprotective activity. Phytochemistry and Pharmacology, 2:253-70.
110. Dianzani MU, Muzia G, Biocca ME, Canuto RA. (1991). Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. International Journal of Tissue Reaction, 13:79-85.
111. Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. (2004). Dietary antioxidant compounds and liver health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44:575-586.
112. Vuillaume M. (1987). Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. Mutation Research, 186:43-72.

113. Montesano R, Kirby GM. (1994). Chemical carcinogens in human liver cancer. In: Primary liver cancer-Etiological and progression factors. Brechot C. (ed) CRC, Boca Raton, 57-77.
114. DeLeve LD, Kaplowitz N. (1995). Mechanisms of drug induced liver disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 24:787-810.
115. Sil PC, Manna P, Sinha M. (2006). Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:33.
116. Gupta YK, Sharma M, Chaudhary G, Katiyar CK. (2004). Hepatoprotective effect of New Livfit, a polyherbal formulation, is mediated through its free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 18:362-364.
117. Gupta YK, Sharma M, Chaudhary G. (2002). Pyrogallol-induced hepatotoxicity in rats: A model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 24:497.
118. Mohan H. (2000). Text book of pathology. 4th ed. Jaypee Brother Medical Publishers Ltd, New Delhi.
119. Dey NC, Dey TK. (2002). A text book of pathology. 15th ed. New Central Book Agency (P) Ltd, Calcutta.
120. Thapa BR, Walia A. (2007). Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*, 74:663-671.
121. Bringhente IMC, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45:156-161.
122. Verrmeris W, Nicholson R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Netherlands: Springer.
123. Lewis EB, Bacher F. (1968). Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Information Service*, 48:193.
124. Würgler FE, Graf U. (1985). Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster*. In: Basic and applied mutagenesis. Muhammed A, Von Borster RC. (eds). Plenum Press, New York, 343-372.
125. Howell, SL, Taylor KW. (1968). Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated *in vitro*. *Biochemical Journal*, 108:17-24.
126. Mukhopadhyay I, Kar CD, Bajpayee M, Dhawan A. (2004). Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19:85-90.
127. Collins AR. (2004). Comet assay for DNA damage and repair: Principles applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26:249-261.

128. Manoharan K, Banerjee MR. (1985). β -carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, 9:783-789.
129. Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. (1990). Antimutagenicity profiles for some models compounds. *Mutations Research*, 628:57-85.
130. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 14th Int. Supplement M100-S14. Wayne, PA, USA, 2003.
131. Punitha IS, Rajendran K, Shirwaiker A. (2005). Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2:375-381.
132. Umesha S, Richardson PA, Kong P, Hong CX. (2008). A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 72:95-97.
133. NCCLS document M38-A 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungii. Approved Standard. ISBN 1-56238-470-8. Pennsylvania, USA.
134. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15:127-130.
135. Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. (2008). Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cell and C57 BL/6J mice. *Europe Journal of Pharmacology*, 578:159-170.
136. Decker EA, Welch B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:674-677.
137. Oyaizu M. (1986). Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44:307-315.
138. Bergmeyer HU, Bowers GN, Hørdler M, Moss DW. (1976). IFCC method for aspartat aminotransferase. *Clinica Chimica Acta*, 70:19-42.
139. Bergmeyer HU. (1980). IFCC method for alanin aminotransferase. *Clinica Chimica Acta*, 105:147-172.
140. Walters MI, Gerarde HW. (1970). An ultramicromethod for the determination of conjugated and total bilirubin in serum or plasma. *Microchemical Journal*, 15:231-243.
141. Jendrassik L, Gróf P. (1938). Vereinfachte photometrische methoden zur bestimmung des blutbilirubins. *Biochemische Zeitschrift*, 297:81-89.

142. Laurell CB. (1972). Electroimmuno assay. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 124:21-37.
143. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95:351-358.
144. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RI. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
145. Misra HP, Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247:3170-3175.
146. Beutler, E. (1982). Catalase. In: *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Beutler E. (ed.), Grune and Stratton Inc., New York. 105-106.
147. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathione Stransferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249:7130-7139.
148. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227:680-685.
149. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76:4350-4354.
150. Petz B (1985) Basic statistical method for non-mathematical use. SNL Zagreb, Croatia, 153.
151. Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, 91:14S-22S.
152. Duh PD, Tu YY, Yen GC. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 32:269-277.
153. Armstrong D, Browne R. (1994). The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 366:43-58.
154. Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. (2003). Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research*, 539:19-28.
155. Li Y, Glauert HP, Spear BT. (2000). Activation of nuclear factor- κ B by the peroxisome proliferator ciprofibrate in H4IIEC3 rat hepatoma cells and its inhibition by the antioxidants Nacetylcysteine and vitamin E. *Biochemical Pharmacology*, 59:27-434.
156. Li L, Ittmann MM, Ayala G, Tsai MJ, Amato RJ, Wheeler TM, Miles BJ, Kadmon D, Thompson TC. (2005). The emerging role of the PI-K-Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 8:108-118.

157. Miyamoto H, Altuwaijri S, Cai Y, Messing EM, Chang C. (2005). Inhibition of the Akt, cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 pathways in combination with androgen deprivation therapy: potential therapeutic approaches for cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 44:1-10.
158. Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19:895-909.
159. Pietta PG. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63:1035-42.
160. Tuñón MJ, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. (2009). Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current Drug Metabolism*, 10:256-271.
161. Fedeli D, Berrettini M, Gabryelak T, Falcioni G. (2004). The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutation Research*, 563:89-96.
162. Gontijo AMMC, Tice R. (2003). Comet Assay: Detection of DNA damage and DNA repair in individual cells. In: *Mutagenese Ambiental*. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. (eds.). ULBRA Inc, Canoas, 247-275.
163. Hung YH, Wang YJ, Chou CC. (2009). Antimutagenic activity of *Aspergillus awamori-fermented* black soyabean response to stimulated digestive juice treatments and its antimutagenic mechanisms. *LWT - Food Science and Technology*, 42:56-62.
164. Kuroda Y, Shima N, Yazawa K, Kaji K. (2001). Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research*, 497:123-130.
165. De Flora S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402:151-158.
166. Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Díaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst.)*, 3:1389-13407.
167. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids*, 2010:543531.
168. Stephanou G, Vlastos D, Vlachodimitropoulos D, Demopoulos NA. (1996). A comparative study on the effect of MNU on human lymphocyte cultures in vitro evaluated by 06-mdG formation, micronuclei and sister chromatid exchanges induction. *Cancer Letters*, 109:109-114.
169. Margison GP, Santibáñez-Koref MF. (2002). O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenicity and chemotherapy. *Bioessays*, 24:255-266.

170. Kaina B, Christmann M. (2002). DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40:354-367.
171. Johnston DS. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 3:176-188.
172. Jacinto FV, Esteller M. (2007). MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst.)*, 6:1155-1160.
173. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. (1999). *Modern genetic analysis*. New York: W. H. Freeman.
174. De Flora S, Ferguson LR. (2005) Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, 591:8-15.
175. Mladenović M, Matić S, Stanić S, Solujić S, Mihailović V, Stanković N, Katanića J. Combining molecular docking and 3-D pharmacophore generation to enclose the *in vivo* antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid. *Biochemical Pharmacology*, *in press*.
176. Borchardt JP, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NJ, Biesboer DD, Bey RF. (2008). Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(5):98-110.
177. Tsai T, Tsai T, Chien Y, Lee C, Tsai P. (2008). *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*, 110(4):859-864.
178. Freeman B, Eggett D, Parker T. (2010). Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *Journal of Food Science*, 75(6):C570-C576.
179. Cetin-Karaca H. (2011). Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogenesis. *University of Kentucky Master's Theses*, 89-90.
180. Yao W, Wang H, Wang S, Sun S, Zhou J, Luan Y. (2011). Assessment of the antibacterial activity and the antidiarrheal function of flavonoids from bayberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10):5312-5317.
181. Demetzos C, Angelopoulou D, Kolocouris A, Daliani I, Mavromoustakos T. (2001). Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative. *The Journal of Heterocyclic Chemistry*, 38:703-710.
182. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. (2007). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22:375-383.

183. Katalinić V, Miloš M, Kulisić T, Jukić M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94:550-557.
184. Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13:8-17.
185. Liu JK, Hu L, Dong ZJ, Hu Q. (2004). DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chemistry and Biodiversity*, 1:601-605.
186. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28:25-30.
187. Foti M, Piatelli M, Baratta MT, Ruberto G. (1996). Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:497-501.
188. Gregor W, Grabner G, Adelwohrer C, Rosenau T, Gille L. (2005). Antioxidant properties of natural and synthetic chromanol derivatives: study by fast kinetics and electron spin resonance spectroscopy. *Journal of Organic Chemistry*, 70:3472-3483.
189. Mahakunakorn P, Tohda M, Murakami Y, Matsumoto K, Wanatabe H. (2004). Antioxidant and free radical-scavenging activity of choto-san and its related constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27:38-46.
190. Opoku AR, Masek NF, Terblanche SE. (2002). The *in vitro* antioxidative activity of some traditional Zulu medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 16:51-56.
191. Gordon MH. (1990). The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: Antioxidants. Hudson B.J.F. (ed.). Elsevier, Applied Science, New York, 1-18.
192. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36:1199-1208.
193. Ribeiro de Lima MT, Waffo-Téguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vercauteren J, Cabanis JC, Mérillon JM. (1999). Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:2666-2670.
194. Surh YJ. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nature Reviews Cancer*, 3:768-780.

195. Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergent O, Cillard P, Morel I. (1999). Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1457-1466.
196. Tennant BC. (1999). Assessment of hepatic function. In: *Clinical biochemistry of laboratory animals*. Loeb WF, Quimby FW. (eds.). London: Taylor and Francis, 501-517.
197. Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. (2006). *Biohemija*, 4. izdanje, Savremena administracija, Beograd.
198. Shah M, Patel P, Phadke M, Menon S, Mary F, Saner T. (2002). Evaluation of the effect of aqueous extract from powders of root, stem, leaves and whole plant of *Phyllanthus debilis* against CCl₄ induced rat liver dysfunction. *Indian Drugs*, 39:333-337.
199. Perišić V. (1988). *Jetra*. U: *Specijalna klinička fiziologija*. Stefanović S. (ed.). Beograd; Medicinska knjiga. 394-423.
200. Janbas KH, Gilani AH. (2000). Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 71:25-33.
201. Koraćević D. (1996). *Enzimi*. U: *Biohemija*. Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G. (eds.). Savremena administracija, Beograd, 1-162.
202. Manokaran S, Jaswanth A, Sengottuvelu S, Nandhakumar J, Duraisamy R, Karthikeyan D, Mallegaswari R. (2008). Hepatoprotective activity of *Aerva lanata* Linn. against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Research Journal of Pharmaceutical and Technology*, 1:398-401.
203. Koga T, Meydani M. (2001). Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quecetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73:941-948.
204. Cooper KA, Chopra H, Thurnham DI. (2004). Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Reviews*, 17:111-129.
205. Palmerini CA, Carlini E, Saccardi C, Servili M, Montedoro G, Arienti G. (2005). Activity of olive oil phenols on lymphomonocyte cytosolic calcium. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:109-113.
206. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. (2001). Iron metabolism, free radicals and oxidative injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 55:333-339.
207. Agrawal R, Sharma PK, Rao GS. (2001). Release of iron from ferritin by metabolites of benzene and superoxide radical generating agents. *Toxicology*, 168:223-230.
208. Gabay MD, Kushner I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340:448-54.

209. Noursadeghi M, Bickerstaff MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. (2002). Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *The Journal of Immunology*, 169:913-919.
210. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 6:1045-1056.
211. Leendertse M, Willems RJL, Giebelen IAJ, van den Pangaart PS, Bonten MJM, van der Poll T. (2009). The acute-phase response impairs host defence against *Enterococcus faecium* peritonitis. *Immunology*, 128:e335-e342.
212. Baumann H, Gauldie J. (1994). The acute phase response. *Immunology*, 15:74-80.
213. Heinrich PC, Castell TA, Andus T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265:621-636.
214. Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM. (1994). Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Veterinary Bulletin*, 64:1009-1018.
215. Čvor-Zečević Lj. (1997). Proteini akutne faze. *Vojnosanitetski Pregled*, 54:237-48.
216. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, Van Kooyk Y, De Witte T, Figdor CG. (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 98:1802-1811.
217. Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC, Mao SJ. (2004). Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics*, 4:2221-2228.
218. Cid MC, Grant DS, Hoffmann GS, Auerbach R, Fauci AS, Kleinman HK. (1993). Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *Journal of Clinical Investigation*, 91:977-985.
219. Katoh N, Nakagawa H. (1999). Detection of haptoglobin in the high-density lipoprotein and the very high-density lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 61:119-124.
220. El Ghmati SM, Van Hoeyveld EM, Van Strijp JAG, Ceuppens JL, Stevens EAM. (1996). Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *The Journal of Immunology*, 156:2542-2552.
221. Oh SK, Pavlotsky N, Tauber AI. (1990). Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *Journal of Leukocyte Biology*, 47:142-148.
222. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35:163-187.

223. Borth W. (1992). α_2 -macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB Journal*, 6:3345-3353.
224. Mihailović M, Dobrić S, Poznanović G, Petrović M, Uskoković A, Arambasić J, Bogojević D. (2009). The acute-phase protein α_2 -macroglobulin plays an important role in radioprotection in the rat. *Shock*, 31:607-614.
225. Kushner I, Mackiewicz A. (1987). Acute phase proteins as disease markers. *Disease Markers*, 5:1-11.
226. Gürler B, Vural H, Yilmaz N, Oguz H, Satıcı A, Aksoy N. (2000). The role of oxidative stress in diabetic retinopathy. *Eye*, 14:730-735.
227. Yildiz G, Ayse B, Tansu UC, Filiz C, Ozgür C. (2004). Serum malondiladehyde levels and superoxide dismutase activities in pulmona- ry tuberculosis and lung cancers. Ankara: Üniversitesi Dikimevi Sa- ğlık Hizmetleri. Meslek Yüksekokulu Dergisi, Cilt 6, Sayt 2.
228. Kinnula V, Crapo JD. (2004). Superoxide dismutases in malignnant cells and human tumors. *Free Radical Biology and Medicine*, 6:718-744.
229. Harris CM, Stone WL. (1988). The effect of *in vitro* lipid peroxidation on the activity of rat liver microsomal glutathione S transferase from rats supplemented or deficient in antioxidants. *Life Science*, 42:415-420.
230. Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. (1994). Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chemico-Biological Interactions*, 91:91-100.
231. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. (2000). Biohemija slobodnih radikala, Medicinski fakultet, Niš.
232. Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. (1997). Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 22:1115-1126.
233. Li Y, Glauert HP, Spear BT. (2000). Activation of nuclear factor- κ B by the peroxisome proliferator ciprofibrate in H4IIEC3 rat hepatoma cells and its inhibition by the antioxidants Nacetylcysteine and vitamin E. *Biochemical Pharmacology*, 59:427-434.
234. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: downregulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research*, 480:243-268.
235. Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF- κ B activation, inhibition of expression of cyclooxygenase- 2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*, 23:9247-9258.

236. Lin BR, Yu CJ, Chen WC, Lee HS, Chang HM, Lee YC, Chien CT, Chen CF. (2009). Green tea extract supplement reduces D-galactosamine-induced acute liver injury by inhibition of apoptotic and proinflammatory signalling. *Journal of Biomedical Science*, 16(1): 35.
237. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes and Development*, 13:2905-2927.
238. Kandel ES, Hay N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research*, 253:210-229.
239. Downward J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15:177-182.

8. ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Састав и поступак припреме супстрата за одржавање линија *Drosophila melanogaster*

Различити типови супстрата за одржавање линија *Drosophila* се користе у зависности од експеримента, већина садржи квасац као фактор неопходан за нормално развиће. Најчешће се користи супстрат са кукурузним гризом: 400 ml воде, 40 g кукурузног гриза, 4 g агара, 5 g квасца, 50 g шећера и 2 g нипагина.

Припрема супстрата

Вода се помеша са кукурузним брашном, агаром и квасцом и кува у посуди од 2 L на умереној ватри и уз стално мешање 15 минута. Затим се додаје шећер и кува се још 5 минута. Посуда се скида са ватре и додаје се, уз стално мешање, раствор нипагина (2 g нипагина се раствори у 10 ml 96% етанола). Нипагин се додаје да би се спречило развиће плесни. Супстрат се затим разлива у стерилне теглице, обично до висине од око 1.5 cm. Чим се подлога охлади са зидова теглица се обришу кондензоване капљице воде и теглице се затварају са тупферима направљеним од вате. Овако припремљене теглице са супстратом се могу чувати у фрижидеру, а могу се и одмах користити.

Уколико се подлога од кукурузног брашна припрема без квасца, неопходно је да се пре уношења мушица у теглице на површину храњиве подлоге ставе 1-2 капи густог воденог раствора пекарског квасца.

Прилог 2. Поступак пребацивања и одвајања мужјака од женки *Drosophila melanogaster***Поступак пребацивања**

Пребацивање мушица из једне теглице у другу врши се тако што се теглицом, у којој су мушице, лупи неколико пита по подлози да би се мушице потиснуле на дно. Затим се обе теглице приљубе отворима и мушице се истресу у нову теглицу са свеже припремљеним супстратом. Пребацивење може да се врши и аспиратором који се пре свега користи за одвајање мужјака од неоплођених женки. Аспиратор је стаклена цевчица дужине око 20 cm и унутрашњим пречником око 3 mm. На око 5 cm од једног краја се налази трбушасто испупчење у које се кроз отвор цевчице убацују комадићи сунђера. На крај који је ближи испупчењу навлачи се гумено црево дужине око 40 cm. Пребацивање се врши тако што се у чеп од сунђера, којим се затвори теглица, увлачи врх аспиратора и усисавањем се прикупљају мушице у аспиратор, а издувавањем се избацују из аспиратора у нову теглицу.

Поступак одвајања

Одвајање мужјака од женки треба урадити у првих 12 до 15 часова по излегању из стадијума лутке. У супротном, само једно парење је довољно да се већина јаја женки оплоди и тада се не могу вршити наменска укрштања. Приликом раздвајања треба имати у виду разлику између полова: мужјаци су ситнији и код њих је крај абдомена заобљен док је код женки шиљат; у абдоминалном региону код женки се могу уочити пруге, а код мужјака затамљен врх јер су задњи абдоминални стернити црно обојени; мужјаци, за разлику од женки, на првом пару ногу имају у низ постављене црне хитинске длачице, које граде тзв. полни чешаљ.

Прилог 3. Поступак припреме узорака за Комет тест са *Drosophila melanogaster*

За утврђивање генотоксичног ефекта метанолског екстракта биљке *C. coggygia* користи се предњи део задњег црева ларви на трећем ступњу развића лабораторијске линије "Canton S". У циљу добијања што крупнијих ларви културе се гаје на нешто нижим температурама и у некомпетативним условима (са довољно хране и простора).

Поступак дисекције

Дисекција се обавља уз помоћ бинокуларног стереомикроскопа у капи физиолошког раствора (0.67% NaCl) или тзв. Рингеровог раствора, који садржи 0.65 g NaCl, 0.025 g KCl и дестиловану воду.

Помоћу две анатомске игле ларва се ставља на микроскопску плочицу у кап раствора и развлачењем игала (једна се поставља на главени регион, а другом се придржава задња трећина ларве) тело ларве се прекида у пределу задњег црева, и извлачи се његов предњи део. Након одстрањивања предњи део задњег црева се пребаци у епендорф са 50 mM PSS и припреми се ћелијска суспензија.

Прилог 4. Врсте, састав и поступак припреме хранљивих подлога

Хранљиви агар у праху се користи за засејавање бактерија док се кромпир-глукозни агар користи за засејавање гљива. У фази испитивања потенцијалног антибиотика, као течне подлоге у дилуционој техници се користе: Милер-Хинтон-ова (Müller-Hinton) подлога за бактерије и сабора (Sabouraud) течна подлога за гљиве (Институт за имунологију и вирусологију Торлак, Београд).

Припрема хранљивог агара

Суспендује се 43.1 g праха састава: 15 g пептон-1 "Торлак"; 3 g месни екстракт "Торлак"; 5 g натријум-хлорид; 0.3 g калијум-фосфат; 18 g агар; рН 7.3; раствори у 1000 mL хладне воде и остави да стоји 15 минута. Највећи број микроорганизама се добро размножава у области оптималног рН између 6.5 и 7.5. Потом се раствор пажљиво загрева до кључања, уз стално мешање стакленим штапићем, да би се прах у потпуности растворио. Уз интензивно мешање током кључања, боја раствора треба да постане светло жута и бистра, што се постиже у периоду од 5 до 15 минута. Раствор се потом пребацује у ерленмајер, затвара и стерилише 20 минута на 120°C. Након хлађења се припремљени агар разлива у епрувете и формира коси агар, епрувете се затворе и оставе да се охладе. Пресејавање се врши након 24 часа.

Припрема Милер-Хинтон-овог бујона (П29)–течна подлога

Одмери се 17.5 g казеин-хидролизата, 3 g месног екстракта и 1.5 g скроба (подлога Института за имунологију и вирусологију Торлак, Београд) и раствори у 1000 mL дестиловане хладне воде. Након растварања се подлога загрева до кључања, уз стално мешање, до појаве бистре боје раствора, а потом пребаци у ерленмајер и стерилише 20 минута на 120°C.

Припрема кромпир-глукозног агара

Очишћени кромпир исече се на ситне комадиће и 250 g сипа у 1 L воде. Кромпир се кува док не омекша, затим се процеди, а вода од цеђења се допуни свежеом количином воде, до запремине од 1 L. По додатку воде, додаје се 17 g агара (15-20%), а када се агар отопи и 20 g глукозе. Након корекције рН до 6.5 подлога се стерилише 20 минута на 120°C и разлива у епрувете формирајући коси агар.

Припрема Sabouraud течне подлоге

Раствори се 30 g праха Sabouraud течне подлоге (Торлак, Београд), састава 10 g пептона и 20 g декстрозе, у 1000 mL дестиловане воде и пажљиво загрева до кључања и потпуног растварања. По пребацивању у одговарајући суд, врши се стерилизација у аутоклаву 20 минута на 120°C.

Прилог 5. Публиковане референце у којима су објављени резултати докторске дисертације

Биографија са подацима о досадашњем раду

Сања Матић рођена је 09.07.1981. године у Крагујевцу, Република Србија, где је завршила основну и средњу школу са одличним успехом. На Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, студијска група-биологија, смер-екологија, уписала се школске 2000/01. године. Дипломирала је 2006. године са постигнутом просечном оценом 9.17, одбранила је дипломски рад са оценом 10 и тиме стекла звање дипломирани биолог-еколог. Докторске студије биологије на Природно-математичком факултету, смер Генетика, уписала је школске 2007/2008. године на Институту за биологију и екологију, под менторством проф. др Снежане Станић, ванредног професора Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

По упису на докторске студије, у периоду од фебруара 2008. године до јануара 2011. године била је ангажована као стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије за област Биологија, број уговора **231**, на пројекту евиденциони број 143008. Одлуком Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Крагујевцу од 13.05.2009. године изабрана је у истраживачко звање истраживач-приправник за ужу научну област Биологија у Институту за биологију и екологију.

Од 01.01.2011. године Сања Матић је засновала радни однос са Природно-математичким факултетом у Крагујевцу као истраживач-приправник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, евиденциони број ИИИ43004. На седници Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Крагујевцу одржаној 13.04.2011. године изабрана је у научно звање истраживач-сарадник за ужу научну област Биологија у Институту за биологију и екологију.

Ангажована је на извођењу практичне наставе на предметима: Еволуциона биологија за студенте прве године Дипломских академских студија Биологије и Екологије - мастер и Генетика за студенте треће године Основних академских студија Биологије у Институту за биологију и екологију Природно математичког факултета у Крагујевцу.

Сања Матић је у току досадашњих студија и рада показала изразити смисао за бављење научно-истраживачким радом из области Генетике.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)
**Mutation Research/Genetic Toxicology and
 Environmental Mutagenesis**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genetox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygia* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury



Sanja Matić^{a,*}, Snežana Stanić^a, Desanka Bogojević^b, Melita Vidaković^b,
 Nevena Grdović^b, Svetlana Dinić^b, Slavica Solujić^c, Milan Mladenović^c,
 Nevena Stanković^c, Mirjana Mihailović^b

^a Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Serbia

^b Department of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, Serbia

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2012

Received in revised form 28 January 2013

Accepted 25 March 2013

Available online 2 July 2013

Keywords:

Cotinus coggygia extract

Myricetin

Pyrogallol

Hepatoprotection

Akt

STAT3

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate the hepatoprotective effect of the methanol extract of *Cotinus coggygia* Scop. in rats exposed to the hepatotoxic compound pyrogallol. Assessed with the alkaline version of the comet assay, 1000 and 2000 mg/kg body weight (bw) of the extract showed a low level of genotoxicity, while 500 mg/kg bw of the extract showed no genotoxic potential. Quantitative HPLC analysis of phenolic acids and flavonoids in the methanol extract of *C. coggygia* showed that myricetin was a major component. To test the hepatoprotective effect, a non-genotoxic dose of the *C. coggygia* extract and an equivalent amount of synthetic myricetin, as present in the extract, were applied either 2 or 12 h prior to administration of 100 mg/kg bw of pyrogallol. The extract and myricetin promoted restoration of hepatic function by significantly reducing pyrogallol-induced elevation in the serum enzymes AST, ALT, ALP and in total bilirubin. As measured by the decrease in total score and tail moment, the DNA damage in liver was also reduced by the extract and by myricetin. Our results suggest that pro-surviving Akt activity and STAT3 protein expression play important roles in decreasing DNA damage and in mediating hepatic protection by the extract. These results suggest that myricetin, as a major component in the extract, is responsible for the antigenotoxic and hepatoprotective properties of the methanol extract of *C. coggygia* against pyrogallol-induced toxicity.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The search for medical treatments based on alternative medicine has increased significantly, making knowledge of the plants commonly used as folk medicines extremely important. Some substances produced by plants have been studied and characterized [1], but insufficient toxicological and genotoxicological studies have been done. However, there has recently been growing interest in the possible toxic, genotoxic and mutagenic effects of those plant metabolites that are used therapeutically [2].

The family of the *Anacardiaceae* includes approximately 800 species in 82 genera. Members of the family are cultivated throughout the world for their edible fruits and seeds, medicinal compounds, valuable timber and landscape appeal. The plant

Cotinus coggygia Scop. is a small genus of the family *Anacardiaceae* with two species: *C. coggygia* Scop. and *Cotinus obovatus* Raf. The flora of Serbia defines two varieties of *C. coggygia*: var. *laevis* and var. *arenaria* [3]. Plants in the family *Anacardiaceae* have a long history of use by peoples in traditional medicine for the treatment of various illnesses due to their reputed pharmacological effects. *Rhus glabra* is traditionally used in the treatment of bacterial diseases such as syphilis, gonoorrhoea, dysentery and gangrene. *Rhus coriaria* is commonly used as a spice by grinding the dried fruits with salt and is also widely used as a medicinal herb particularly for wound healing [4]. *Toxicodendron* species have been used in the treatment of herpes eruptions, acute rheumatism and articular stiffness and in various forms of chronic and absterbate eruptive diseases [5].

Published information indicates that *C. coggygia* has anti-haemorrhagic and wound-healing effects, anti-inflammatory and antimicrobial activity [6]. This plant is frequently used for the treatment of various illnesses such as diarrhoea, paradontosis, gastric and duodenal ulcer [7]. It has been previously shown that the

* Corresponding author. Tel.: +381 34 336 223; fax: +381 34 335 400.
 E-mail address: sanjamatic@kg.ac.rs (S. Matić).

C. coggygia syrup has the effect of protecting the liver from chemical damage [8].

Previous phytochemical investigations on *C. coggygia* heartwood resulted in the isolation of several phenolic compounds, mainly auronones, chalcones, dihydroflavones and dihydroflavonols. Among them, the most abundant were sulphuretin and 7,3',4'-trihydroxy-dihydroflavone, 5,7,4'-trihydroxy-dihydroflavone, 4,2',4'-trihydroxychalcone, 3,7,3',4'-tetrahydroxy-dihydroflavone, 3,5,7,3',4'-pentahydroxy-dihydroflavone, fisetin and methyl galate [9]. Westenburg et al. [10] isolated auronones, gallic acid and its derivatives from the whole plant of *C. coggygia*, while gallic acid and its derivatives were found to be dominant compounds in the leaves and flowers of this species [11].

In an increasing number of studies, many naturally occurring phytochemicals have been recommended as potential hepatoprotective agents [12], but the search for novel natural agents and the determination of novel targets for hepatoprotection is challenging. Flavonoids are plant polyphenolic compounds that can protect against oxidative stress by scavenging free radicals [13,14] and by chelating iron [15]. Several studies have shown that the iron-chelating ability is dependent on the flavonoid structures; only flavonoids that have the catechol group in the B-ring and the 3-hydroxyl group in the C-ring have Fe³⁺-reducing activity and then bind iron [16]. Myricetin (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavone), a naturally occurring phytochemical, is one of such flavonoids. Some studies have shown that myricetin has diverse therapeutic potential such as anti-oxidant, anti-tumour, and anti-inflammatory [17,18]. Myricetin has been suggested to inhibit cellular proliferation and to induce apoptosis in tumour cells [18]. It has been reported that myricetin protects against iron-induced damage in primary rat hepatocyte cultures [19].

Extract of the stem of *C. coggygia* was evaluated against pyrogallol-induced hepatic damage in rats with the aim of developing a natural hepatoprotective drug [20]. Pyrogallol showed mutagenic effect, and its cytotoxicity and mutagenicity seem to be attributable to formation of reactive oxygen species [21]. According to Gupta et al. [22,23] and Upadhyay et al. [24,25], pyrogallol induced hepatotoxicity in experimental animals through generation of free radicals and, therefore, pyrogallol-induced hepatotoxicity could be used as an appropriate model to evaluate hepatoprotective agents that have free radical-scavenging properties.

In traditional medicine, whole plants or mixtures of plants are used rather than isolated compounds. Also, crude plant extracts often have greater *in vitro* or/and *in vivo* activity than isolated constituents at an equivalent dose [26]. The objective of this study was to evaluate the antigenotoxic potential of a methanolic extract of *C. coggygia* and its main flavonoid compound, myricetin, and their possible hepatoprotective effects on Wistar rats exposed to pyrogallol. Biochemical parameters of hepatic damage such as serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin concentration were determined. A further attempt has been made to study the potential effects of *C. coggygia* extract on signal transduction and activation of the transcription 3 (STAT3) signalling pathway, as well as the activation of the Akt signalling pathway that mediates cellular survival signals.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

SYBR® GREEN I (CAS no. S9430), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (CAS no. D9132) and myricetin (CAS no. M6760) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pyrogallol (Sigma–Aldrich, CAS no. 254002-50) was diluted in saline solution and used as a positive control and as the damage-inducing agent in the tests concerning possible protective effects.

2.2. Plant material and extraction procedure

C. coggygia plants were collected in southern Serbia (in the village of Rujište, Mt. Rogozna), in May–June 2007. The species was identified and the voucher specimen was deposited (16178, BEOU) at the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade.

The air-dried sample of *C. coggygia* stem (1.2 kg) was broken into small pieces 2–6 mm with a cylindrical crusher and extracted with methanol in a Soxhlet apparatus. The extract was filtered through paper filter (Whatman, No. 1) and evaporated to dryness under vacuum to remove the solvent (methanol). The residue (32 g) was stored in a dark glass bottle for further processing.

2.3. Phytochemical analysis of the methanol extract from *C. coggygia*

2.3.1. Total phenolic content

Total soluble phenolic compound in the methanol extract of *C. coggygia* was determined with the Folin–Ciocalteu reagent [27] and with gallic acid as a standard. The extract was diluted to a concentration of 500 µg/ml and 0.5 ml of the diluted extract was mixed with 2.5 ml of Folin–Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and 2 ml of NaHCO₃ (7.5%). After 15 min of incubation at 45 °C, the absorbance was measured at 765 nm vs a blank sample with a spectrophotometer (ISKRA, MA9523-SPEKOL 211).

2.3.2. Total flavonoid content

The total flavonoid compound in the extract was determined spectrophotometrically according to Bringham et al. [27]. Briefly, 0.5 ml of 2% solution of AlCl₃ in ethanol was mixed with the same volume of extract (500 µg/ml). Absorption readings at 415 nm were taken after 1 h against a blank (ethanol). The total flavonoid content was determined by use of a standard curve with rutin (0–50 mg/l).

All the values were uniformly expressed as the corresponding dry weight of plant (1 g). All measures were repeated three times.

2.3.3. HPLC of the *C. coggygia* methanolic extract

Quantification of individual phenolic compounds was done by reversed-phase HPLC analysis. Samples were injected onto a Waters HPLC system consisting of a 1525 binary pumps, a thermostat and a 717+ autosampler connected to a Waters 2996 diode-array detector (Waters, Milford, MA, USA). Separation of phenolics was achieved on a Symmetry C-18 RP column of 125 mm × 4 mm size with 5-µm particle diameter (Waters, Milford, MA, USA) connected to an appropriate guard column. Prior to injection, all samples were filtered through 0.22-µm pore size nylon syringe filters (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Two mobile phases, A (0.1% phosphoric acid) and B (acetonitrile) were used at a flow rate of 1 ml/min with the following gradient profile: the first 20 min from 10 to 22% B; next 20 min of linear increase up to 40% B, followed by 5 min decrease to 10% B, and an additional 5 min of equilibration time. The data acquisition and spectral evaluation for peak confirmation were done by use of the Waters Empower 2 Software (Waters, Milford, MA, USA).

2.4. DPPH radical-scavenging assay

The free radical-scavenging activity of the *C. coggygia* methanolic extract was determined by use of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), which is a stable free radical with a maximal absorbance at 517 nm [28]; it has been widely used as a substrate to evaluate the antioxidative activity of samples [29–31]. Sample stock solutions (1.0 mg/ml) were diluted to final concentrations of 5, 10, 25, 50, 125 and 250 µg/ml, in ethanol. One milliliter of a 0.3 mM DPPH ethanolic solution was added to 2.5 ml of sample solutions of different concentrations and allowed to react at room temperature. After 30 min the absorbance values were measured spectrophotometrically at 517 nm. Ascorbic acid was used as a standard. All tests were performed in triplicate. The inhibitory percentage of DPPH was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

where A_{blanc} is the absorbance of the DPPH in solution without the test sample and A_{test} is the absorbance of DPPH in the solution with the test sample.

2.5. Animals

Male albino Wistar rats (2–2.5 months old and weighing 220–250 g) were used in the experiments. All rats were caged at 24 °C, with a 12-h light–dark cycle, and allowed free access to food and water. Animal studies were approved by the Committee for Ethical Animal Care and Use of the Institute for Biological Research, Belgrade, which acts in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85/23, revised in 1986).

2.6. Experimental design

To evaluate the genotoxicity by use of the comet assay, the methanolic extract of *C. coggygia* was tested at three different doses, *i.e.* 500, 1000, and 2000 mg/kg

Table 1
Phytochemical constituents of the *Cotinus coggygria* methanol extract.

	Total phenolics (mg GA/g) ^a	Total flavonoids (mg RU/g) ^b
<i>Cotinus coggygria</i> methanol extract	3.78 ± 0.19	8.29 ± 0.37

Data are presented as means ± SD; all measures were repeated three times.

^a Expressed as milligrams of gallic acid (GA) per gram of dry plant material.

^b Expressed as milligrams of rutin (RU) per gram of dry plant material.

bw. These concentrations were based on the solubility limit of the extract in saline solution. The rats were divided into four main groups. The first group served as the negative control group and received an intraperitoneal (ip) injection of saline solution (0.9% NaCl). The other three groups of animals received a single ip dose of 500, 1000, or 2000 mg/kg bw, respectively, of the *C. coggygria* extract. The animals (25 in each group; 5 for each time point) were sacrificed by decapitation at 2, 12, 24, 48 or 72 h after treatment, and liver tissue was obtained from each group of animals for analysis in the comet assay. Three totally independent experiments were performed.

To assess the antigenotoxic activity of the methanolic extract of *C. coggygria*, only one dose, i.e. 500 mg/kg bw, which was found to display no genotoxic activity, was evaluated. Fifty rats were divided into ten equal experimental groups. The first group, referred as the negative control, received only saline (0.9% NaCl; ip). The second group received (ip) 100 mg/kg bw of pyrogallol dissolved in saline. The third group received a single ip dose of 500 mg/kg bw of the *C. coggygria* extract at 2 h before the pyrogallol injection. The fourth group received a single ip dose of the *C. coggygria* extract at 12 h before the pyrogallol injection. The fifth and the sixth groups of five male Wistar rats received a single ip dose of myricetin, in equivalent concentration as that present in the extract. After 2 h, the fifth group, and after 12 h, the sixth group of rats, received in a single intraperitoneally dose 100 mg/kg bw of pyrogallol dissolved in saline solution. One hour after pyrogallol administration animals were sacrificed by decapitation. The seventh and the eighth groups of five male Wistar rats received a single ip dose of myricetin dissolved in saline. The ninth and the tenth groups received a single ip dose (500 mg/kg bw) of the *C. coggygria* extract dissolved in saline. Three separate experiments were performed. The animals were killed by decapitation, and the livers from both controls and test animals were quickly removed and separated into 2 parts. One part was used for the comet assay and another part was frozen in liquid nitrogen and subsequently used for protein immunoblotting. Blood samples were collected to obtain serum for analysis of blood chemistry.

2.7. Determination of DNA damage by the comet assay

The alkaline version of the comet assay was carried out by the standard procedure originally described by Singh et al. [32]. Slides were stained with 90 µl of SYBR GREEN I just before the analysis. Comets were visualized and captured with the 40× objective lens of the fluorescence microscope Leica DMLB (Meyer Instruments, Inc., Langham Creek, Houston, TX, USA) attached to CCD camera. One hundred comet images per slide were randomly captured and only cells that did not overlap and had a clear margin around them were scored.

The extent of DNA damage was measured by means of two complementary methods, a tail moment quantitative method and a qualitative method of damage distribution.

The comets were analyzed by a visual scoring method as described by Collins [33] and classified into five categories, defined as types 0, 1, 2, 3 and 4, where 0 indicated no or very low damage; 1, 2 and 3 indicate low, medium and high DNA migration, respectively, and 4 indicated highest level of degradation, i.e. comets with a very small head and a long tail. The total comet score was calculated by the following equation modified of Manoharan and Banerjee [34]: (% of cells in class 0 × 0) + (% of cells in class 1 × 1) + (% of cells in class 2 × 2) + (% of cells in class 3 × 3) + (% of cells in class 4 × 4). Consequently, the total score was in the range from 0 (all undamaged) to 400 (all maximally damaged).

The percentage reduction (%R) in the comet score in the treatments with *C. coggygria* extract showing antigenotoxicity was calculated according to the formula of Manoharan and Banerjee [34] and Waters et al. [35] with the following formula:

$$(\%) R = \frac{\text{mean total score in A} - \text{mean total score in B}}{\text{mean total score in A} - \text{mean total score in C}} \times 100$$

where A is the positive control (pyrogallol), B is pretreatment with *C. coggygria* extract plus pyrogallol or pretreatment with myricetin prior to pyrogallol, and C is the negative control.

2.8. Blood chemistry

After decapitation of the animals, whole blood was collected and allowed to clot for 45 min at room temperature and centrifuged at 2000 × g for 10 min at 4 °C in a Sorval SS-34 rotor (DJB Labace Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, UK) to obtain serum. Serum was separated from clot into sterile-serum sample tubes for

the measurement of serum hepatospecific markers such as aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin, by use of BioSystems commercial available test kits (S.A., Barcelona, Spain) and a Roche/Cobas Mira automated analyzer.

2.9. Western immunoblot analysis

About 200–400 mg of frozen rat liver tissue was homogenized at 4 °C in 2 ml ice-cold homogenization buffer (10 mmol/L Tris (pH 7.6), 1 mmol/L EDTA, 250 mmol/L sucrose) containing a mixture of protease inhibitors (Protease inhibitor, Mix G; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Samples were centrifuged at 9700 × g for 20 min at 4 °C in an Eppendorf centrifuge. Supernatants were aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C. A 20-µg sample of whole-liver homogenate was loaded onto 4% stacking –12% separating slab gels as described by Laemmli [36]. After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Schenectady, NY, USA). Western immunoblot analysis was performed according to the procedure of Towbin et al. [37] with polyclonal antibodies to rat STAT3, pSTAT3 (Tyr 705), Akt 1/2/3, phosphorylated Akt 1/2/3 (Ser 473) (pAkt) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After incubation with blocking solution (0.05% Tween 20, 50 mmol/L Tris–HCl (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 3% nonfat condensed milk), the membranes were incubated with antibody for 2 h at room temperature. After rinsing, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h. Immunoreactive bands were identified by an enhanced chemiluminescence detection system (Santa Cruz Biotechnology) according to the manufacturer's instructions. The bands were visualized and quantified with TotalLab (Phoretix) electrophoresis software (v 1.10) relative to tubulin.

2.10. Statistical analysis

The experimental results were expressed as mean ± SEM (standard error of the mean) and statistical evaluation of data was performed with one-way analysis (ANOVA). Variance homogeneity and data distribution was determined with the Levene and Kolmogorov–Smirnov tests, respectively. *Post hoc* comparison between control and treated groups was performed with the T3 Dunnett test or with the Bonferroni test when the variance was not homogeneous. Statistical analysis was performed with the SPSS statistical software package, version 13.0 for Windows. The results were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Phytochemical analysis of the methanolic extract of *C. coggygria*

The total phenolics in the *C. coggygria* extract were determined as gallic acid-equivalents by use of Folin–Ciocalteu's reagent, while the spectrophotometric method with aluminium chloride was used for the determination of total flavonoids. According to these analyses (Table 1) the methanolic extract of *C. coggygria* contained 3.78 mg gallic acid per gram of dry plant material in total phenolics, while the content of flavonoids was 8.29 mg rutin per gram of dry plant material.

Based on these results, HPLC analysis was used to define – qualitatively and quantitatively – the contents of phenolic acids and flavonoids in the *C. coggygria* methanolic extract. The results of quantitative HPLC analysis (Table 2) showed that myricetin was a major component in the extract (511.5 µg/g). Also, hydroxyl derivatives of cinnamic acids (chlorogenic, caffeic, coumaric, ferulic and rosmarinic acid) were identified in the extract in various amounts. Rosmarinic acid (18.55 µg/g) was the major phenolic acid in the extract, while the other phenolic acids were present in lower amounts.

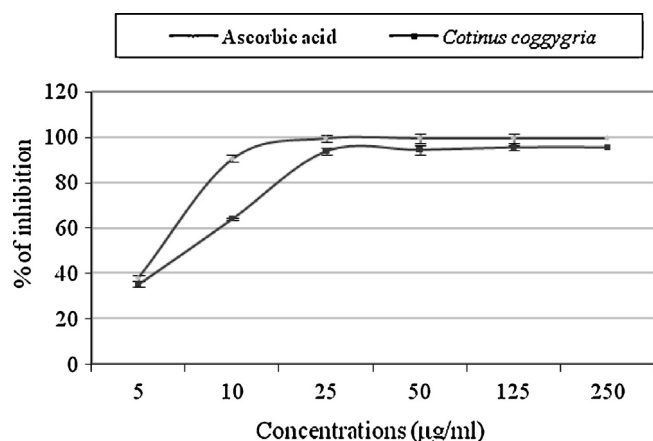


Fig. 1. The free-radical-scavenging activity of the *Cotinus coggygia* methanolic extract.

3.2. The free radical-scavenging activity of the methanolic extract of *C. coggygia*

Proton-radical scavenging capacity is an important attribute of antioxidants. The free-radical-scavenging activity of the methanolic extract of *C. coggygia* was quantitatively determined with the DPPH radical-scavenging assay. According to Fig. 1, the maximum inhibiting effect of the *C. coggygia* extract on DPPH radicals was about 95%, while the maximum inhibitory concentration is approximately 125 µg/ml.

3.3. Genotoxic activity of the methanolic extract of *C. coggygia*

Scientific information regarding plants used in folk medicine, and their effects on human health or on the genetic material have been the subject of many different types of investigation. The genotoxic activity was studied of *C. coggygia*, rich in compounds of the

Table 2
Quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids in *Cotinus coggygia* methanolic extract.

<i>Cotinus coggygia</i> methanol extract	Content (µg/g of extract) ^a
Rosmaric acid	18.55 ± 0.50
Coumaric acid	1.75 ± 0.51
Chlorogenic acid	1.55 ± 0.04
Ferulic acid	1.15 ± 0.36
Caffeic acid	0.75 ± 0.32
Myricetin	511.50 ± 0.50
Quercetine	69.80 ± 0.44
Kaempferol	8.90 ± 0.15
Resveratrol	2.65 ± 0.11
Rutine	0.25 ± 1.05

^a Each value represents the mean ± SD of three experiments.

Table 3
Evaluation of genotoxicity by the tail moment in the comet assay for Wistar rats treated with three different concentrations of *Cotinus coggygia* methanol extract.

Treatments	Tail moment at different sampling times				
	2 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Negative control	3.71 ± 2.92	3.67 ± 0.91	2.62 ± 0.25	3.33 ± 1.74	2.75 ± 1.54
<i>C. coggygia</i>					
500 mg/kg	3.98 ± 2.44	3.32 ± 1.94	3.13 ± 0.11	3.02 ± 2.36	2.84 ± 0.16
1000 mg/kg	17.32 ± 1.16 ^a	15.43 ± 6.03 ^a	11.72 ± 0.13 ^a	8.23 ± 1.14 ^a	6.73 ± 0.15 ^a
2000 mg/kg	23.51 ± 1.08 ^a	19.65 ± 2.61 ^a	17.14 ± 0.38 ^a	13.31 ± 1.22 ^a	9.71 ± 0.32 ^a

Data are presented as the means ± SEM from three independent experiments. n = 20 rats per group, of which 5 rats per each time point.

^a Values with the same superscripts represent means that are significantly different from the negative control ($p < 0.05$).

group of flavonoids and phenolics and frequently employed in folk medicine.

Table 3 shows the comet assay results obtained after exposure of rats to 500, 1000 and 2000 mg/kg bw of the methanolic extract of *C. coggygia*, at 2, 12, 24, 48 and 72 h after ip injection. Statistically significant differences in tail moment were seen in groups of animals at all time intervals after treatment with highest dose (2000 mg/kg bw, ip). At all time points, the groups of animals treated with 1000 mg/kg bw of the extract also showed a statistically significant enhancement in tail moment. In contrast, no significant increase was observed after treatment with 500 mg/kg bw of the extract sampled at all time intervals compared with the negative control group. It should be noted that the DNA damage at 72 h was less than that at 2 h after treatment.

3.4. Hepatoprotective effect of the methanolic extract of *C. coggygia*

Based on the results mentioned above, we evaluated the ability of the *C. coggygia* methanolic extract to counteract the toxic effects of pyrogallol. The hepatoprotective effect of the *C. coggygia* extract and of myricetin, a major constituent of the extract, was studied on rats treated with an inducer of acute liver damage, i.e. pyrogallol (100 mg/kg bw). The methanolic extract at a dose of 500 mg/kg bw, which displays no genotoxic activity, and myricetin in an equivalent concentration as that present in the extract, were administered at 2 or 12 h before pyrogallol. One hour after treatment with pyrogallol the rats were sacrificed.

The measurement of the activities of marker enzymes or diagnostic enzymes plays a significant and well-known role in diagnosis, disease investigation and assessment of drug or plant extracts with respect to safety/toxicity risk. The enzymes considered in this study are useful markers of liver cytolysis and damage to the plasma membrane of liver cells [38]. The changes of serum AST, ALT, ALP and total bilirubin levels in the various groups of rats are shown in Table 4. The administration of pyrogallol produced a significant increase in the serum AST, ALT, ALP levels and in total bilirubin (1.5-, 2.4-, 1.9-, and 3.2-fold, respectively) above the basal value measured in the negative control. The *C. coggygia* extract significantly reversed the pyrogallol-induced rise in the levels of AST, ALT, ALP and total bilirubin when compared with rats treated with pyrogallol alone. The levels of AST, ALT, ALP and total bilirubin in the serum were, respectively, 1.2-, 1.6-, 1.6-, and 1.7-fold (in rats pretreated 2 before) and 1.0-, 1.1-, 1.5-, and 1.0-fold (in rats pretreated 12 h before) above the control values. Administration of the extract alone did not produce significant alterations in the serum enzymes. In comparison, administration of the myricetin before the pyrogallol treatment prevented the increase in serum AST, ALT, ALP levels and total bilirubin: 1.1-, 1.5-, 1.4-, and 1.1-fold (in rats pretreated 2 h before), respectively, and 1.1-, 1.3-, 1.3-, and 1.0-fold (in 12 h pretreated rats), respectively, above the control values. *In vivo* exposure to myricetin did not induce significant increases in serum

Table 4
Effect of *Cotinus coggygia* methanol extract on serum AST, ALT, ALP and total bilirubin of pyrogallol induced hepatotoxicity in Wistar rats.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Total bilirubin (μmol/l)
Negative control	164.9 ± 4.20 ^b	39.4 ± 0.91 ^b	233.2 ± 0.86 ^b	2.18 ± 0.24 ^b
Pyrogallol	252.2 ± 6.74 ^a	93.6 ± 0.86 ^a	442.0 ± 0.65 ^a	6.91 ± 1.05 ^a
<i>C. coggygia</i> 2 h prior to pyrogallol	192.5 ± 1.41 ^b	63.9 ± 0.62 ^b	373.3 ± 0.53 ^b	3.74 ± 0.33 ^b
<i>C. coggygia</i> 12 h prior to pyrogallol	171.6 ± 5.51 ^b	41.9 ± 0.81 ^b	347.1 ± 1.21 ^b	2.20 ± 0.47 ^b
Myricetin 2 h prior to pyrogallol	178.2 ± 0.65 ^b	58.2 ± 1.02 ^b	327.9 ± 1.25 ^b	2.37 ± 0.24 ^b
Myricetin 12 h prior to pyrogallol	173.7 ± 3.44 ^b	49.1 ± 0.54 ^b	307.1 ± 0.79 ^b	2.26 ± 1.02 ^b
Myricetin 2 h	169.3 ± 0.53 ^b	50.2 ± 0.23 ^b	241.2 ± 0.48 ^b	2.08 ± 1.57 ^b
Myricetin 12 h	165.4 ± 0.79 ^b	41.0 ± 1.50 ^b	251.9 ± 1.40 ^b	2.24 ± 0.64 ^b
<i>C. coggygia</i> 2 h	171.5 ± 1.02 ^b	51.2 ± 1.27 ^b	261.0 ± 0.26 ^b	3.01 ± 1.12 ^b
<i>C. coggygia</i> 12 h	170.6 ± 1.26 ^b	37.8 ± 2.47 ^b	269.9 ± 0.66 ^b	2.40 ± 0.28 ^b

Values represented mean ± SEM from three independent experiments.
n = 5 rats per group.

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

^a p < 0.05 when compared with the negative control group.

^b p < 0.05 when compared with the pyrogallol control group.

Table 5
Evaluation of antigenotoxicity by use of the comet assay, based on the percentage of comets assigned to damage categories and total comet score, induced by the *Cotinus coggygia* methanol extract and myricetin, at 2 or 12 h prior to pyrogallol.

Treatments	Levels of damage					Total score (mean ± SEM)
	0	1	2	3	4	
Negative control	73.53 ± 0.02	26.50 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	26.50 ± 0.14 ^b
Pyrogallol	0.00 ± 0.00	3.44 ± 0.40	4.62 ± 0.43	44.53 ± 0.43	47.53 ± 0.62	336.40 ± 4.71 ^a
<i>C. coggygia</i> 2 h prior to pyrogallol	14.09 ± 0.72	57.64 ± 1.11	21.04 ± 0.72	4.28 ± 0.82	2.16 ± 0.43	121.20 ± 2.65 ^b
<i>C. coggygia</i> 12 h prior to pyrogallol	42.22 ± 0.87	47.72 ± 0.87	8.66 ± 0.44	1.48 ± 0.71	0.00 ± 0.00	69.50 ± 1.22 ^b
Myricetin 2 h prior to pyrogallol	12.90 ± 1.02	58.10 ± 1.04	25.81 ± 0.51	3.22 ± 0.04	0.00 ± 0.00	119.40 ± 0.02 ^b
Myricetin 12 h prior to pyrogallol	66.70 ± 0.32	33.33 ± 0.27	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	33.33 ± 1.23 ^b
Myricetin 2 h	78.05 ± 1.21	27.96 ± 0.60	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	27.96 ± 1.02 ^b
Myricetin 12 h	74.50 ± 0.05	25.53 ± 1.32	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	25.53 ± 0.12 ^b
<i>C. coggygia</i> 2 h	73.30 ± 0.21	24.40 ± 1.04	2.32 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	29.04 ± 1.20 ^b
<i>C. coggygia</i> 12 h	72.2 ± 0.43	26.70 ± 0.00	1.11 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	28.90 ± 0.61 ^b

Values represented mean ± SEM from three independent experiments.
n = 5 rats per group.

^a p < 0.05 when compared with the negative control group.

^b p < 0.05 when compared with the pyrogallol control group.

AST, ALT and ALP levels and total bilirubin compared with those of the negative control.

The extract of *C. coggygia* and myricetin were evaluated separately for protection against DNA damage induced by pyrogallol. The comet class-distribution is shown in Table 5. In contrast to the negative control group, the pyrogallol-treated group showed high levels of genotoxicity according to the comet classes detected, with a predominance of damage classes 3 and 4 (maximum damage). Analyzing the comet class-distribution for the pretreatments with 500 mg/kg bw of the *C. coggygia* methanolic extract and with myricetin, respectively, administered 2 h before pyrogallol, it is evident that comets with damage classes 0, 1 and 2 (very low, low and medium damage, respectively) were most prevalent and that comets with damage classes 3 and 4 (maximum damage) were rare. Moreover, after treatment with the same doses of *C. coggygia* extract and of myricetin at 12 h prior to pyrogallol, respectively, most of the comets were in classes 0 (undamaged) and 1 (minimum damage). *In vivo* exposure to the *C. coggygia* extract itself did not induce DNA damage. The levels of DNA damage in the liver in the control group did not differ from those observed in animals treated with myricetin alone.

Fig. 2 shows the percentage reduction (%R) in the comet score obtained in the comet assay after pretreatments with the *C. coggygia* methanol extract and with myricetin, respectively, at 2 or 12 h before pyrogallol. The percentage reduction in the total comet score was more pronounced in the group of rats exposed to pyrogallol 12 h after treatment with 500 mg/kg bw of *C. coggygia* extract and myricetin (86.1 and 97.8%, respectively) and less strong for the

groups of rats exposed to pyrogallol 2 h after pretreatment with the *C. coggygia* extract and myricetin (69.4 and 70.1%, respectively).

Fig. 3 shows the effects of 2-h or 12-h treatments with 500 mg/kg bw of the methanolic extract of *C. coggygia* and of myricetin, respectively, prior to treatment with pyrogallol on the comet tail moment in liver cells from Wistar rats. As expected, 100 mg/kg bw of pyrogallol led to a significant increase in tail moment compared with the negative control. A significant reduction of the tail moment was observed in rats pretreated with 500 mg/kg bw *C. coggygia* extract and myricetin, respectively, either 2 or 12 h before pyrogallol.

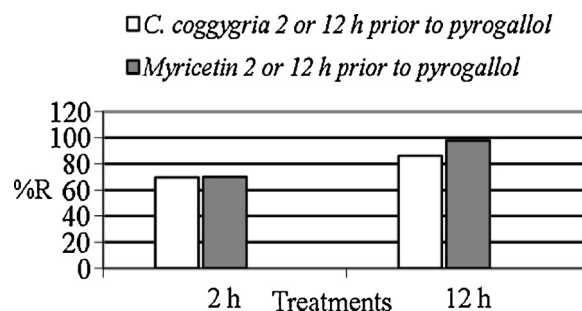


Fig. 2. Percentage of damage reduction (%R) promoted by the *Cotinus coggygia* methanolic extract and by myricetin at 2 h or 12 h prior to treatment with pyrogallol.

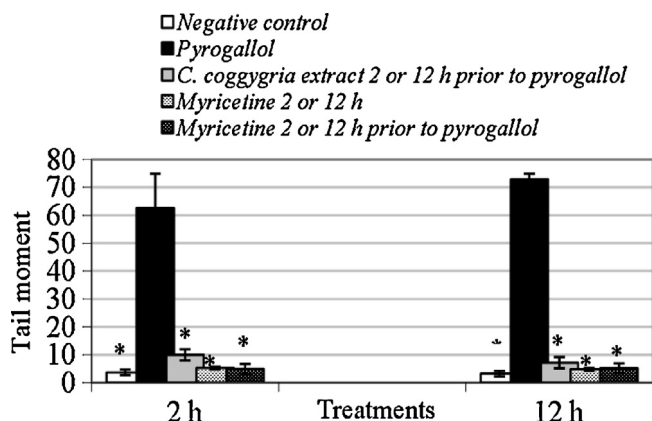


Fig. 3. Detection of DNA damage in rat liver by use of the comet tail moment after pretreatments with *Cotinus coggygria* methanolic extract and myricetin at 2 h or 12 h before exposure to pyrogallol; * $p < 0.05$: statistically significant difference compared with pyrogallol.

3.5. Relative changes in Akt and STAT3 activities in the liver

Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) have been linked to a diverse group of cellular functions that relate to their ability to activate Akt or protein kinase B, the general mediator of cellular survival signals. Activation of the PI3K/Akt signalling pathway is critical for hepatic regeneration [39]. Since myricetin is a major constituent of the *C. coggygria* methanolic extract, we examined the status of Akt in whole-liver homogenates of rats pretreated with *C. coggygria* extract and with myricetin by means of immunoblot analysis. As can be seen from Fig. 4A, pyrogallol treatment induced a slight reduction of Akt protein expression (Fig. 4A, lane 2, row Akt). Administration of the *C. coggygria* extract alone caused a slight increase in level of Akt (lane 3, row Akt).

Administration of the *C. coggygria* methanolic extract, either 2 h or 12 h before the pyrogallol treatment, causes a pronounced increase in the levels of active Akt kinase (lanes 4 and 5, respectively). These findings are in agreement with our previous work and with the observation that administration of the *C. coggygria* extract clearly provided a setting that allowed for the functioning of Akt, which is essential for proper cell functioning [20].

Administration of the myricetin alone caused no increase in the level of active Akt kinase (about 1.03-fold change; lane 6, row Akt). In samples obtained from rats given myricetin either 2 or 12 h before the pyrogallol treatment (lanes 7 and 8, respectively), the levels of active Akt kinase were increased.

The JAK–STAT signalling pathway is a major cascade associated with signal transduction during hepatic injury [40]. To examine the level of STAT3 protein, we performed Western blot analysis of whole-liver homogenates with antibodies raised against transcription factor STAT3 and the activated, phosphorylated protein STAT3 at Tyr705 (designated as pSTAT3). As can be seen from Fig. 4B, pyrogallol administration induced a slight reduction of STAT3 activity (lane 2, row STAT3). In samples obtained from rats that were given the *C. coggygria* extract or myricetin either 2 or 12 h before the pyrogallol treatment (lanes 4, 5, 7, and 8, respectively), the levels of STAT3 were increased. As can be seen from Fig. 4B, the *C. coggygria* methanolic extract or myricetin alone induced STAT3 protein expression (lanes 3 and 6, respectively, row STAT3) and activation (lanes 3 and 6, respectively, row pSTAT3).

4. Discussion

The growing interest in herbal medicine demands information on toxicity risk-assessment of the various plant preparations used in the management of diseases. Numerous plants and their constituents have been shown to possess beneficial therapeutic effects for various diseases [41]. In view of this, the present study was set out to provide information on the safety of the methanolic extract of the *C. coggygria* stem and of myricetin, one of the most abundant secondary metabolites in the extract, tested on the liver of Wistar albino rats.

Antimutagenic activities have been correlated with the presence of certain phytochemical substances, such as compounds of the flavonoid group [42–45]. A relationship has been reported between structure and activity, both for mutagenic activity [44] and for protection of the genetic material [42]. Flavonoids have numerous physiological health benefits, covering protection from cardiovascular disease and cancer. Most of these health-beneficial effects are thought to derive from effective anti-oxidant and free-radical-scavenging properties, as well as the ability to regulate many cellular enzymic functions [46]. In fact, many flavonoids

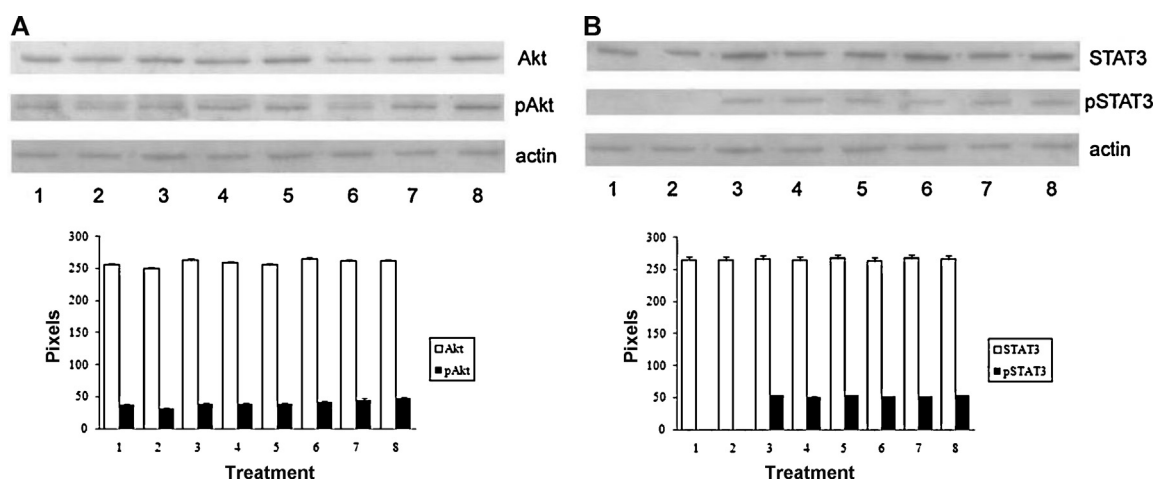


Fig. 4. The effects of the *Cotinus coggygria* methanolic extract and myricetin prior to pyrogallol administration on the relative protein levels of Akt (A) and STAT3 (B). Western-blot analysis of the rat-liver homogenate was performed with anti-Akt and anti-phosphorylated Akt (pAkt) antibodies (A) and with anti-STAT3 and anti-pSTAT3 antibodies (B). Actin was used as the internal control. Lane 1: negative control; lane 2: treatment with pyrogallol; lane 3: treatment with *C. coggygria* extract; lane 4: pretreated with the *C. coggygria* extract 2 h before pyrogallol administration; lane 5: pretreated with the *C. coggygria* extract 12 h before pyrogallol administration; lane 6: treatment with myricetin; lane 7: pretreated with myricetin 2 h before pyrogallol administration; lane 8: pretreated with myricetin 12 h before pyrogallol administration. Western-immunoblot analysis was performed by use of TotalLab (Phoretix) electrophoresis software (version 1.10) to quantify protein levels relative to actin levels and is presented in the graphs. The values are means \pm SEM from three separate experiments.

act directly as anti-oxidants, compensating the toxic reactive oxygen species by donation of hydrogen ions, or by modulation of cell-signalling pathways [47]. Also, a number of scientific reports indicated that flavonoids have protective effect on liver due to their antioxidant properties [48,49]. Myricetin has important pharmacological properties. In early studies anti-oxidant [50] and antigenotoxic [51] properties have been described for this type of compound. The results of HPLC analysis showed that the methanolic extract of *C. coggygia* is a rich source of the important biologically active flavonoid, myricetin. Myricetin (511.5 µg/g) was shown to be the major component in the *C. coggygia* extract, while the phenolic acids were present in lower amounts. Rosmaric acid (18.55 µg/g) was present in substantial quantities whereas caffeic acid was found in trace amounts (Table 2).

The composition of plant extracts that apparently exhibit only beneficial properties may nonetheless include chemical components with mutagenic, teratogenic and/or carcinogenic activity. If a genotoxic compound is present it can interact with DNA, leading to genetic damage. Thus, it is very important to include a genotoxic approach in toxicological evaluation of these plant extracts and their major constituent(s). In the present study, the antigenotoxic potential of the *C. coggygia* methanol extract and of myricetin were observed *in vivo* via the alkaline version of the comet assay. The results obtained in relation to genotoxicity of the methanol extracts of *C. coggygia* in the comet assay demonstrated that these extracts cause moderate damage, since the tail moment obtained after the treatments with 1000 and 2000 mg/kg bw of the extract showed a low level of genotoxicity and treatment with 500 mg/kg bw of the *C. coggygia* methanol extract revealed no genotoxic potential. Pretreatment with *C. coggygia* methanol extract either 2 h or 12 h before treatment with 100 mg/kg bw of pyrogallol revealed a significant protective effect, as was evident from the percentage reduction in comet score (%R). This result led us to evaluate hepatoprotection of the abovementioned effective dose (500 mg/kg) of the plant extract, and of myricetin in an equivalent amount as present in the extract, against pyrogallol-induced hepatotoxicity. Pyrogallol, as a free-radical generator, induces hepatotoxicity in experimental animals [22,24]. Gupta et al. [23] tested New Livfit® (a polyherbal formulation containing the extracts of 11 medicinal plants; Courtesy, Dabur India Ltd.) administered 1 h before pyrogallol injection, similar to the experimental design in our study. Pyrogallol caused hepatic damage due to free radicals that produced significant liver damage as indicated by a marked increase in serum AST and ALT levels in the study of Gupta et al. [22,23]. In the present study, the most commonly used biochemical parameters to detect liver damage, ALT, AST and ALP as hepatocellular markers, and bilirubin as hepatobiliary marker [52], were measured. ALT and AST are sensitive indicators of acute liver damage, and elevation of these enzymes in non-hepatic diseases is unusual [53]. The rise in serum levels of AST and ALT has been attributed to the damaged structural integrity of the liver, since these enzymes are cytoplasmically located and released into the blood after cell damage [54]. ALP, a marker of obstructive jaundice and intrahepatic cholestasis, is produced by osteoblasts in the bone, by the intestinal mucosa and by epithelial cells of the biliary canaliculi. Obstruction of bile with consequent irritation of epithelial cells leads to secretion of ALP into serum. It is often employed to assess the integrity of the plasma membrane [55], since it is localized predominantly in the microvilli of the bile canaliculi, located in the plasma membrane [56]. Bilirubin is one of the most useful clinical clues to assess the severity of necrosis, and its accumulation is a measure of binding, conjugation and excretory capacity of hepatocytes [57]. Serum AST, ALT and ALP levels and total bilirubin content were markedly elevated in the group of animals treated with pyrogallol alone. Treatment with the methanol extract of *C. coggygia* significantly altered these changes to almost normal

values. Intraperitoneal administration of myricetin provided significant protection from pyrogallol-induced elevation in AST, ALT, ALP and bilirubin in serum. Rats receiving myricetin or extract alone showed less elevation of AST, ALT and total bilirubin than rats receiving pyrogallol alone.

Antioxidants constitute a range of substances that play a role in protecting biological systems against the deleterious effects of oxidative processes on macromolecules, such as proteins, lipids, carbohydrates, and DNA [58]. Many of those substances are plant-derived natural molecules that contribute to the prevention and treatment of diseases in which reactive oxygen species are involved. This protection can be explained by antioxidant capacity of the plants to scavenge free radicals [59,60]. In this study the effect on the free-radical-scavenging ability was determined by means of the DPPH assay as one of the most effective, reactive, reliable, simple and reproducible *in vitro* methods for evaluating this important activity of single compounds as well as plant extracts [61,62]. The result obtained with the *C. coggygia* methanolic extract revealed relatively strong radical-scavenging activity, which is comparable with the values reported by Westenburg et al. [10] and Savikin et al. [11]. Taken together, these results indicate that the *C. coggygia* methanolic extracts could serve as free-radical inhibitors or scavengers, acting possibly as primary antioxidants.

One of the most actively studied kinase pathways in basic research and drug development includes the serine–threonine kinase Akt, also known as protein kinase B. The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K)/Akt signalling pathway has been identified as having a key role in mediating signals for cell growth, cell survival [63,64], cell-cycle progression, differentiation, transcription, translation, glucose metabolism [65], and hepatic regeneration [39]. Whereas administration of pyrogallol resulted in decreased Akt activity and phosphorylation, we report here that the separate pretreatments with the *C. coggygia* extract and with myricetin clearly provided a setting that allowed for the functioning of Akt, which is essential for proper cell functioning.

The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), initially named acute-phase response factor, belongs to the family of STAT transcription factors that consists of at least seven members in mammals [66], which mediate the cellular response to a variety of cytokines and growth factors [67]. STAT3 is one of the most important transcription factors involved in the initiation of liver development and regeneration [68]. In the liver, activation of STAT3 by IL-6, its related cytokines, and IL-22, plays an important role in acute-phase response and hepatoprotection [69–71]. The physiological functions of STAT3 have been extensively studied, and it is known to play an essential role in the development of various organs and in cell proliferation [72], survival, and differentiation [73]. Activated STAT3 is phosphorylated at Tyr705 (designated as pSTAT3) and was decreased to above the basal level after treatment with pyrogallol. Since activation of hepatocyte STAT3 protects against hepatocellular damage, we observed increased STAT3 phosphorylation in rats pretreated either with *C. coggygia* extract or myricetin at 2 h or 12 h prior to administration of pyrogallol.

5. Conclusions

The antigenotoxic and hepatoprotective properties elucidated in this study suggest that the methanolic extract of *C. coggygia* shows medicinal potential as an antigenotoxic and antihepatotoxic natural agent, modulating the genotoxicity and hepatotoxicity caused by pyrogallol, in a mammalian model. The secondary metabolite myricetin, its main flavonoid constituent, could be responsible for their antigenotoxic, antihepatotoxic and free-radical-scavenging activity.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgement

This study was financially supported by the Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant Nos. III43004, OI173020 and III41010.

References

- [1] G.R.M. Barcelos, D. Grotto, J.P.F. Angeli, J.M. Serpeloni, B.A. Rocha, J.K. Bastos, F. Barbosa, Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells, *Phytother. Res.* 25 (2011) 1381–1388.
- [2] D. Sarkar, A. Sharma, G. Talukder, Plant extracts as modulators of genotoxic effects, *Bot. Rev.* 62 (1996) 275–300.
- [3] M. Gajić, Anacardiaceae, in: M. Josifović (Ed.), *The Flora of Serbia*, Serbian Academy of Science and Arts, Belgrade, 1973, pp. 63–65.
- [4] S. Rayne, G. Mazza, Biological activities of extracts from Sumac (*Rhus* spp.): a review, *Plant Food Hum. Nutr.* 62 (2007) 165–175.
- [5] M. Grieve, *A Modern Herbal*, Dover Publication Inc., New York, 1971.
- [6] B. Demirci, F. Demirci, K.H.C. Başer, Composition of the essential oil of *Cotinus coggygria* (Scop.) from Turkey, *Flavour Frag. J.* 18 (2003) 43–44.
- [7] D. Ivanova, D. Gerova, T. Chervenkov, T. Yankova, Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* 96 (2005) 145–150.
- [8] Q. She, D. Shang, F. Ma, Z. Zhang, Pharmacological study on anti-hepatitis effect of *Cotinus coggygria* Scop. syrup, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 16 (1991) 746 (Abstract).
- [9] K. Stathopoulou, P. Magiatis, I. Karapanagiotis, L. Valianou, Y. Chryssoulakis, Phytochemical analysis of *Cotinus coggygria* heartwood. Identification of isolated colorants in historical art objects, *Planta Med.* 73 (2007) P163.
- [10] H.E. Westenburg, K.J. Lee, S.K. Lee, H.H. Fong, R.B. van Breemen, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygria*, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1696–1698.
- [11] K. Savikin, G. Zdunić, T. Janković, T. Stanojković, Z. Juranić, N. Menković, In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*, *Nat. Prod. Res.* 23 (2009) 1731–1739.
- [12] R.A. Khan, M.R. Khan, S. Sahreen, CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat, *BMC Complement. Altern. Med.* 12 (2012) 178.
- [13] R.A. Khan, M.R. Khan, S. Sahreen, M. Ahmed, Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 12.
- [14] R.A. Khan, Evaluation of flavonoids and diverse antioxidant activities of *Sonchus arvensis*, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 126.
- [15] L. Mira, M.T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M.H. Florêncio, K.R. Jennings, Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 1199–1208.
- [16] M.T. Ribeiro de Lima, P. Waffo-Tégou, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis, J.M. Mérillon, Determination of stilbenes (*trans*-astralin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2666–2670.
- [17] V.J. Surh, Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 768–780.
- [18] X. Zhang, Y. Ling, H. Yu, Y. Ji, Studies on mechanism of myricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 35 (2010) 1046–1050 (in Chinese).
- [19] V. Abalea, J. Cillard, M.P. Dubos, O. Sergent, P. Cillard, I. Morel, Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1457–1466.
- [20] S. Matić, S. Stanić, D. Bogojević, M. Vidaković, N. Grdović, J. Arambašić, S. Dinić, A. Uskoković, G. Poznanović, S. Solujić, M. Mladenović, J. Marković, M. Mihailović, Extract of the plant *Cotinus coggygria* Scop. attenuates pyrogallol-induced hepatic oxidative stress in Wistar rats, *Can. J. Physiol. Pharm.* 89 (2011) 401–411.
- [21] Y. Takemura, D.H. Wang, R. Sauriasari, M. Horita, K. Tsutsui, K. Sano, N. Masuoka, T. Takigawa, J. Takaki, K. Ogino, Evaluation of pyrogallol-induced cytotoxicity in catalase-mutant *Escherichia coli* and mutagenicity in *Salmonella typhimurium*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84 (2010) 347–350.
- [22] Y.K. Gupta, M. Sharma, G. Chaudhary, Pyrogallol induced hepatotoxicity in rats: a model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 24 (2002) 497–500.
- [23] Y.K. Gupta, M. Sharma, G. Chaudhary, C.K. Katiyar, Hepatoprotective effect of New Livfit®, a polyherbal formulation, is mediated through its free radical scavenging activity, *Phytother. Res.* 18 (2004) 362–364.
- [24] G. Upadhyay, A. Kumar, M.P. Singh, Effect of silymarin on pyrogallol- and rifampicin-induced hepatotoxicity in mouse, *Eur. J. Pharmacol.* 565 (2007) 190–201.
- [25] G. Upadhyay, A.K. Singh, A. Kumar, O. Prakash, M.P. Singh, Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress, *Eur. J. Pharmacol.* 596 (2008) 146–152.
- [26] P. Rasoanaivo, W.C. Wright, M.L. Willcox, B. Gilbert, Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions, *Malar. J.* 10 (2011) 54.
- [27] I.M.C. Brighente, M. Dias, L.G. Verdi, M.G. Pizzolatti, Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species, *Pharm. Biol.* 45 (2007) 156–161.
- [28] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, T.C. dos Santos, C.S. Coube, S.G. Leitão, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.* 15 (2001) 127–130.
- [29] M.J. Chung, A.Y. Kang, S.O. Park, K.W. Park, H.J. Jun, S.J. Lee, The effect of essential oils of dietary wormwood (*Artemisia princeps*), with and without added vitamin E, on oxidative stress and some genes involved in cholesterol metabolism, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 1400–1409.
- [30] M.J. Chung, N.J. Sung, C.S. Park, D.K. Kweon, A. Mantovani, T.W. Moon, S.J. Lee, K.H. Park, Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cell and C57 BL/6j mice, *Eur. J. Pharmacol.* 578 (2008) 159–170.
- [31] R.A. Khan, M.R. Khan, S. Sahreen, M. Ahmed, Assessment of flavonoids contents and *in vitro* antioxidant activity of *Launaea procumbens*, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 43.
- [32] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [33] A.R. Collins, Comet assay for DNA damage and repair: principles applications and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [34] K. Manoharan, M.R. Banerjee, beta-Carotene reduces sister chromatid exchange induce by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture, *Cell Biol. Int. Rep.* 9 (1985) 783–789.
- [35] M.D. Waters, A.L. Brady, H.F. Stack, H.E. Brockman, Antimutagenicity profiles for some models compounds, *Mutat. Res.* 238 (1990) 57–85.
- [36] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of heat of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [37] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 4350–4354.
- [38] M. Shahjahan, K.E. Sabitha, M. Jainu, C.S. Shyamala-Devi, Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats, *Indian J. Med. Res.* 120 (2004) 194–198.
- [39] L.N. Jackson, S.D. Larson, S.R. Silva, P.G. Rychahou, L.A. Chen, S. Qui, S. Rajaraman, B.M. Evers, PI3K/Akt activation is critical for early hepatic regeneration after partial hepatectomy, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294 (2008) 1401–1410.
- [40] J.L. Leu, M.A. Crissey, J.P. Leu, G. Ciliberto, R. Taub, Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 414–424.
- [41] M.R. Khan, W. Rizvi, G.N. Khan, R.A. Khan, S. Shaheen, Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: protective role of *Digera muricata*, *J. Ethnopharmacol.* 122 (2009) 91–99.
- [42] R. Edenharder, I. van Petersdorff, R. Rauscher, Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food, *Mutat. Res.* 287 (1993) 261–274.
- [43] A.L. Mitscher, H. Telikepalli, E. McGhee, D.M. Shankel, Natural antimutagenic agents, *Mutat. Res.* 350 (1996) 143–152.
- [44] C. Beudot, M.P. De Méo, D. Dauzonne, R. Elias, M. Laget, H. Guiraud, G. Balasard, G. Duménil, Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test, *Mutat. Res.* 417 (1998) 141–153.
- [45] I.C. de Sá Ferreira, V.M. Ferrão Vargas, Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay, *Phytother. Res.* 13 (1999) 397–400.
- [46] E.J. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 673–751.
- [47] R.J. Williams, J.P.E. Spencer, C. Rice-Evans, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 838–849.
- [48] K.K. Das, S. Dasgupta, Influence of ascorbic acid on acid and alkaline phosphatase activities in some metabolically active tissues of aspirin treated rats, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 41 (1997) 421–423.
- [49] E.O. Farombi, O.A. Adaramoye, G.O. Emerole, Influence of chloramphenicol on rat hepatic microsomal components and biomarkers of oxidative stress: protective role of antioxidants, *Pharmacol. Toxicol.* 91 (2002) 129–134.
- [50] V. Chobot, F. Hadacek, Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin, *Redox Rep.* 16 (2011) 242–247.
- [51] A.I. Haza, A.L. Coto, P. Morales, Comparison of the ability of myricetin and quercetin to modulate the oxidative DNA damage induced by heterocyclic amines, *Food Nutr. Sci.* 2 (2011) 356–365.
- [52] B.C. Tennant, Assessment of hepatic function, in: W.F. Loeb, W.F. Quimby (Eds.), *Clinical Biochemistry of Laboratory Animals*, Taylor and Francis, London, 1999, pp. 501–517.
- [53] M. Shah, P. Patel, M. Phadke, S. Menon, M. Francis, R.T. Sane, Evaluation of the effect of aqueous extract from powders of root, stem, leaves and whole plant of *Phyllanthus debilis* against CCl₄ induced rat liver dysfunction, *Indian Drugs* 39 (2002) 333–337.

- [54] K.H. Janbaz, A.H. Gilani, Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents, *Fitoterapia* 71 (2000) 25–33.
- [55] M.A. Akanji, O.A. Olagoke, O.B. Oloyede, Effect of chronic consumption of metabisulphite on the integrity of the kidney cellular system, *Toxicology* 81 (1993) 173–179.
- [56] M.T. Yakubu, O.J. Adebayo, E.C. Egwim, V.B. Owoyele, Increased liver alkaline phosphatase and aminotransferase activities following administration of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* stem bark to rats, *Biokemistri* 17 (2005) 27–32.
- [57] S. Manokaran, A. Jaswanth, S. Sengottuvelu, J. Nandhakumar, R. Duraisamy, D. Karthikeyan, R. Mallegaswari, Hepatoprotective activity of *Aerva lanata* Linn. against paracetamol induced hepatotoxicity in rats, *Res. J. Pharm. Technol.* 1 (2008) 398–400.
- [58] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Lipid peroxidation: a radical chain reaction, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radical in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, UK, 1989, pp. 189–267.
- [59] B. Tepe, M. Sokmen, H.A. Akpulat, A. Sokmen, In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey, *Food Chem.* 90 (2005) 685–689.
- [60] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radic. Res.* 22 (1995) 375–383.
- [61] V. Katalinić, M. Miloš, T. Kulisić, M. Jukić, Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food Chem.* 94 (2006) 550–557.
- [62] I.I. Koleva, T.A. Van Beek, J.P. Linssen, A. De Groot, L.N. Evstatieva, Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 8–17.
- [63] J. Downward, PI 3-kinase, Akt and cell survival, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 177–182.
- [64] J.A. Engelman, J. Luo, L.C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 606–619.
- [65] E.S. Kandel, N. Hay, The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 210–229.
- [66] T. Kishimoto, Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 1–21.
- [67] N.J. Kang, S.K. Jung, K.W. Lee, H.J. Lee, Myricetin is a potent chemopreventive phytochemical in skin carcinogenesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1229 (2011) 124–132.
- [68] S. Haga, K. Terui, H.Q. Zhang, S. Enosawa, W. Ogawa, H. Inoue, T. Okuyama, K. Takeda, S. Akira, T. Ogino, K. Irani, M. Ozaki, Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 989–998.
- [69] C. Klein, T. Wustefeld, U. Assmus, T. Roskams, S. Rose-John, M. Müller, M.P. Manns, M. Ernst, C. Trautwein, The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 860–869.
- [70] R. Taub, Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 978–980.
- [71] S. Radaeva, R. Sun, H.N. Pan, F. Hong, B. Gao, Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation, *Hepatology* 39 (2004) 1332–1342.
- [72] D.E. Levy, C.K. Lee, What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1143–1148.
- [73] W.Y. Wu, J. Li, Z.S. Wu, C.L. Zhang, X.L. Meng, STAT3 activation in monocytes accelerates liver cancer progression, *BMC Cancer* 11 (2011) 506.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Combining molecular docking and 3-D pharmacophore generation to enclose the *in vivo* antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: Myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid

Milan Mladenović^{a,*}, Sanja Matić^b, Snežana Stanić^b, Slavica Solujić^a,
Vladimir Mihailović^a, Nevena Stanković^a, Jelena Katanić^a

^a Kragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2013

Received in revised form 12 August 2013

Accepted 12 August 2013

Available online xxx

Keywords:

Antigenotoxicity
Phenolic compounds
SLRL test
Molecular docking

ABSTRACT

Considering the controversial results concerning the antimutagenicity of some phenolic compounds recorded in the literature, the antigenotoxic effects of four selected phenolic compounds, myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid, against DNA damage induced by alkylation with ethyl methanesulfonate (EMS), were evaluated in *Drosophila melanogaster* males using the sex-linked recessive lethal (SLRL) test. To assess the protective effects against DNA damage, *D. melanogaster* males were exposed to a monofunctional alkylating agent EMS in concentration of 0.75 ppm, 24 h prior to one of the selected phenolic compounds in the concentration of 100 ppm. The possible differences in mechanisms of protection by selected compounds were determined by molecular docking, after which structure-based 3-D pharmacophore models were generated. EMS induced considerable DNA damage as shown by significant increase in the frequency of germinative mutations. The frequency decreased with high significance ($p < 0.001^{***}$) after post-treatments with all selected phenolic compounds. Further, docking analysis revealed EMS pre-bond conformations against guanine and thymine as a necessary condition for alkylation, after which resulting O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine were docked into the active site of O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase to confirm that particular lesions are going to be repaired. Finally, myricetin and quercetin protected dealkylated nucleotides from further EMS alkylation by forming the strong hydrogen bonds with O^6 -guanine and O^4 -thymine via B ring hydroxyl group (bond lengths lower than 2.5 Å). On the other side, rutin and rosmarinic acid encircled nucleotides and by fulfilling the EMS binding space they made an impermeable barrier for the EMS molecule and prevented further alkylation.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The search for effective and non-toxic bioactive products in the interest of prevention and/or treatment of diseases is an important research line. Available epidemiologic evidence is exceptionally strong and consistent that the consumption of high amounts of fruits and vegetables reduces the risk of human diseases [1]. Therefore, efforts were directed towards the determination of antigenotoxic effects of fruits, vegetables, and natural compounds

from dietary plants, including mechanisms of action [2]. Many of the known protective effects have been attributed to plant secondary metabolites, *i.e.* natural aromatic compounds, terpenes, and alkaloids [1].

Aromatic compounds constitute one of the most numerous and ubiquitous group of plants secondary metabolites. Within the class, flavonoids are the most common and widely distributed subgroup [3]. In addition to known activity [4], they have been tested extensively under *in vitro* and *in vivo* experimental conditions in order to assess their mutagenic and genotoxic potential. Nevertheless, the data on antigenotoxicity and genotoxicity of flavonoids are incomplete and contradictory. Complementary studies of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity indicated that the majority of flavonoids like catechins, genistein, daizein, and rutin, among others, are not genotoxic but instead provide considerable protection against mutagens [5,6]. Furthermore, genistein [7],

* Corresponding author. Tel.: +381 34 336 223; fax: +381 34 335 040.

E-mail addresses: mmladenovic@kg.ac.rs (M. Mladenović), sanjamatic@kg.ac.rs (S. Matić), stanic@kg.ac.rs (S. Stanić), ssolujic@kg.ac.rs (S. Solujić), vladam@kg.ac.rs (V. Mihailović), nevenas@kg.ac.rs (N. Stanković), elenakatani@gmail.com (J. Katanić).

catechin, epicatechin [8], and luteolin [9] showed antigenotoxic effects against oxidative DNA damage in several cell models. However, other investigations have demonstrated that some flavonoids possess toxic and genotoxic effects [10,11], and some have been shown to be mutagenic in bacteria and mammalian test systems [12–14].

The protective effects of myricetin and quercetin on hydrogen peroxide-mediated DNA damage in human lymphocytes were determined using the comet assay [15]. In contrast, myricetin and quercetin showed no protection against DNA strand breaks in human hepatoma cells induced by heterocyclic amines (HCAs) [16].

Early studies documented the mutagenicity of quercetin and its capacity to induce chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in CHO cells [13], but opposite results were obtained by using the micronucleus test [17]. The *in vitro* protection against DNA damage in human lymphocytes after quercetin pre-treatment in Caco-2 and HepG2 cells has been also described [18,19].

The protective activity of quercetin and rutin presented in human hepatoma HepG2 cells against the genotoxicity induced by Aflatoxin B1, methyl methanesulfonate or doxorubicin [20] was confirmed by comet assay. Rutin shows various beneficial properties for human health and there are few studies on its cytotoxic and genotoxic potential in which conflicting results are reported depending on the utilized test system [17,21]. According to Marcarini et al. [22] rutin exhibited the protective effect against benzo[a]pyrene in HTC cells using the MNCTb assay. The *in vivo* study by Silva et al. [10] demonstrated the lack of micronucleus induction in mouse bone marrow upon the rutin consumption.

On the other hand, phenolic acids have also attracted considerable interest owing to their potential health benefits reflected in antiallergenic, anti-inflammatory, antioxidant, cardioprotective, and vasodilatory effects [23,24]. Based on the literature reported so far, the results concerning the genotoxic effect of phenolic acids are however contradictory. Maistro et al. [25] reported the genotoxic potential of caffeic, cinnamic and ferulic acids using the *in vitro* micronucleus assays in drug-metabolizing rat hepatoma tissue cells (HTCs). Similar, an adverse effect has been reported for gallic acid by El Hajjoui et al. [26]. Among well documented activity of rosmarinic acid [27,28], as a class representative, Vattem et al. [29] demonstrated that compound inhibited the mutagenic potential of sodium azide and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in the Ames test. Alike results [30,31] showed that rosmarinic acid reduced the frequency of micronuclei, induced by gamma irradiation of human lymphocytes. Furthermore, rosmarinic acid decreased the level of DNA damage induced by ethanol in mice peripheral blood and brain cells [32]. Rosmarinic acid reduced the frequency of micronuclei and the extent of DNA damage induced by doxorubicin in V79 cells [33]. Pereira et al. [34] also found no DNA damage induced by rosmarinic acid in Wistar rat brain tissue or peripheral blood using the comet assay.

Due to the inconsistent results regarding the adverse properties of flavonoids and phenolic acids, studies on the level of safety are of extreme importance. Against this background, the present paper summarizes the effort to evaluate the capacity of myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid to prevent the DNA damage induced by the alkylation with ethyl methanesulfonate (EMS) using the sex-linked recessive lethal (SLRL) test. In addition, molecular docking studies enclosed diverse mechanisms of antigenotoxic behaviour of tested compounds, while 3-D pharmacophore generation confirmed their crucial interactions with DNA. Since EMS alkylation results with the formation of O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine and consequent mispairing [35] that induces mutations, docking assessment elucidated protective mode of tested compounds upon O^6 -alkylguanine-DNA

alkyltransferase catalyzed dealkylation of lesions. The binding of examined compounds into DNA prevents further DNA damage brought on by EMS. To the best of our knowledge, no study so far employed molecular docking and generation of structure-based pharmacophores to regard the *in vivo* antigenotoxic potential of selected naturally occurring phenolic compounds.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Myricetin (CAS No. M6760, $\geq 96\%$), rutin (CAS No. 207671, $\geq 94\%$, HPLC grade), sucrose (CAS No. 57-50-1), and nipagin (CAS No. H5501) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Quercetin hydrate (CAS 849061-97-8, $\geq 95\%$ HPLC grade) was obtained from TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgium. Rosmarinic acid (CAS No. 20283-92-5) was supplied by ChromaDex[®], Irvine, CA, USA. The particular compounds were chosen as test substances due to their wide availability and to extend the list of their known health benefits.

The ethyl methanesulfonate (EMS, CAS No. 62-50-0, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in sucrose (1%) and used as a positive control, *i.e.* the DNA damage-inducing agent, in final concentration of 0.75 ppm. The particular EMS concentration was considered as an optimal since any increase in the dosage would be lethal for this model of organism [36]. The choice of using EMS as the positive control is related with the fact that alkylating agents are widely used in chemistry since the alkyl group is probably the most common group encountered in organic molecules. Many biological target molecules or their synthetic precursors are composed of an alkyl chain with specific functional groups in a specific order. Selective alkylation, or adding parts to the chain with the desired functional groups, is used especially if there is no commonly available biological precursor [37]. In medicine, alkylation of DNA is used in chemotherapy to damage the DNA of cancer cells [38].

Test substances (Fig. 1) were each dissolved in 1% sucrose at room temperature and solutions in concentration of 100 ppm were used immediately in the treatments. The higher dose of tested compounds was applied according to requirements that the concentration of antigenotoxic agent must be significantly higher than the concentration of genotoxic one [39].

2.2. Treatments

The SLRL test was conducted on stock of *Drosophila melanogaster* (obtained from Bloomington Stock Centre, IN, USA). Males of well-defined *Canton S* stock and appropriately marked balancer females of *Basc* stock, with multiple inverted X-chromosomes, were used for the experiment. The stocks were maintained and all experiments were performed under the optimal conditions ($t = 25^\circ\text{C}$, relative humidity = 60%, 12/12 h of light/dark regime) on a standard nutritive medium for *Drosophila* (corn flour, yeast, agar, sugar, and nipagin to prevent mold and infection).

In order to evaluate the antigenotoxicity of four selected phenolic compounds, three days old *Canton S* males were divided into six groups, each consisted of fifteen males, and starved in empty bottles for 5 h prior to treatments. For the first group of males, treatment was performed by exposing them to acute 24 h feeding in bottles containing the filter paper soaked with 1% sucrose solution, and that group was referred as the negative control [36]. The second experimental group was treated for 24 h with 0.75 ppm of EMS, strong mutagen used as the positive control. For the remaining four groups (one group for each phenolic compound), post-treatment was performed by feeding *Drosophila* males with EMS in concentration of 0.75 ppm 24 h prior to a single

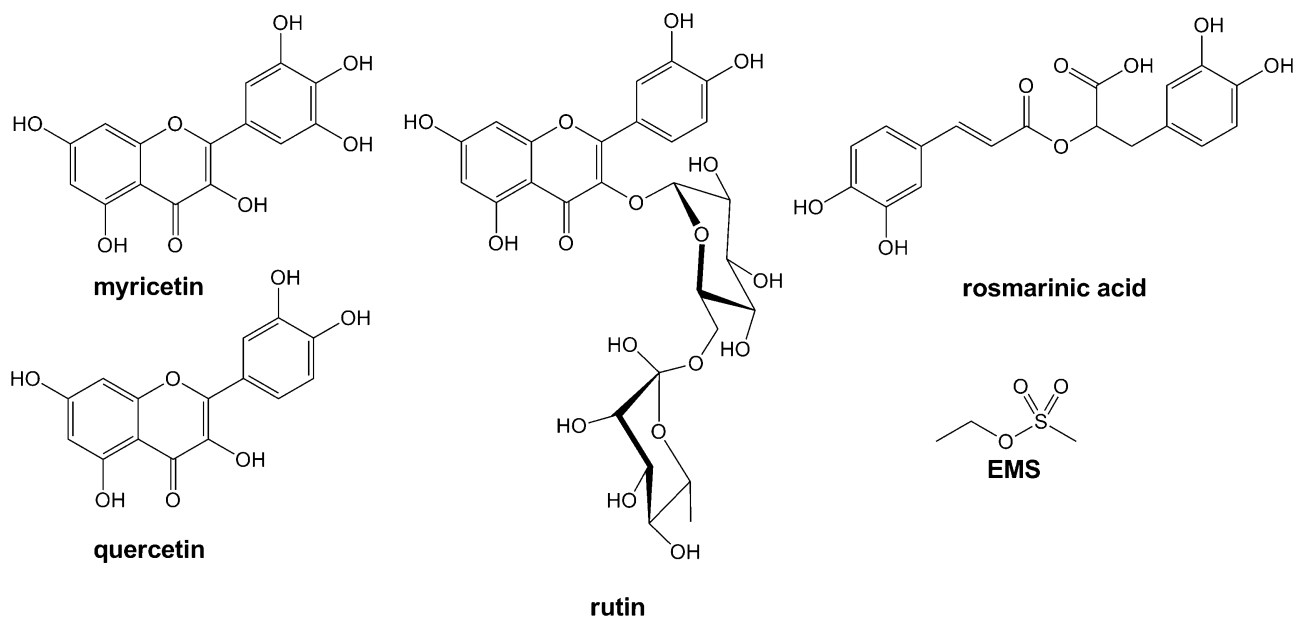


Fig. 1. Chemical structures of myricetin, quercetin, rutin, rosmarinic acid, and EMS.

dose of one of the four compounds in concentration of 100 ppm dissolved in 1% sucrose.

2.3. Test procedure

The standard procedure for the detection of sex linked recessive lethal mutations on *D. melanogaster* was applied [40]. After 24 h, the treated males were individually crossed with virgin females from *Basc* stock, after which the brood I was created and further used to test all germ-cell stages for the presence of mutations. Two days after, the males were transferred to new vials containing three virgins of *Basc* line, which resulted in the genesis of brood II. After another three days the males were transferred into fresh vials with three *Basc* virgins and thus formed the brood III. These males stayed with females for three days and were removed afterwards. Females were left alone for five days to lay eggs and then removed.

When flies emerged in the first generation (F_1) in all test groups, brother–sister mating was allowed for several days, whereupon ten pairs from each vial were individually placed together into new vials. Each vial would give the progeny of one treated X-chromosome.

The frequency of sex linked recessive lethal mutations was detected by examining males in the second generation (F_2). Phenotypes were scored according to the eye colour and shape. All wild type males in the second generation possessed the same treated X-chromosome in a hemizygous condition (males have only one X chromosome and thus only one copy of each X-linked gene – in contrast to females, who carry two copies of the X chromosome [41]). The outcome of the experiment is that any recessive lethal mutation is expressed before the adult stage. Thus, the absence of wild type males in the second generation indicates the occurrence of such mutations.

2.4. Statistical evaluations

The frequency of sex-linked recessive lethal cultures was calculated according to the ratio between the number of lethal cultures and the total number of treated X-chromosomes. The total number of treated X-chromosomes is equal to the sum of lethal and non-lethal cultures. The significance of percentage differences in lethal cultures was achieved by testing for large or small

independent samples, and then by testing the difference between proportions [42].

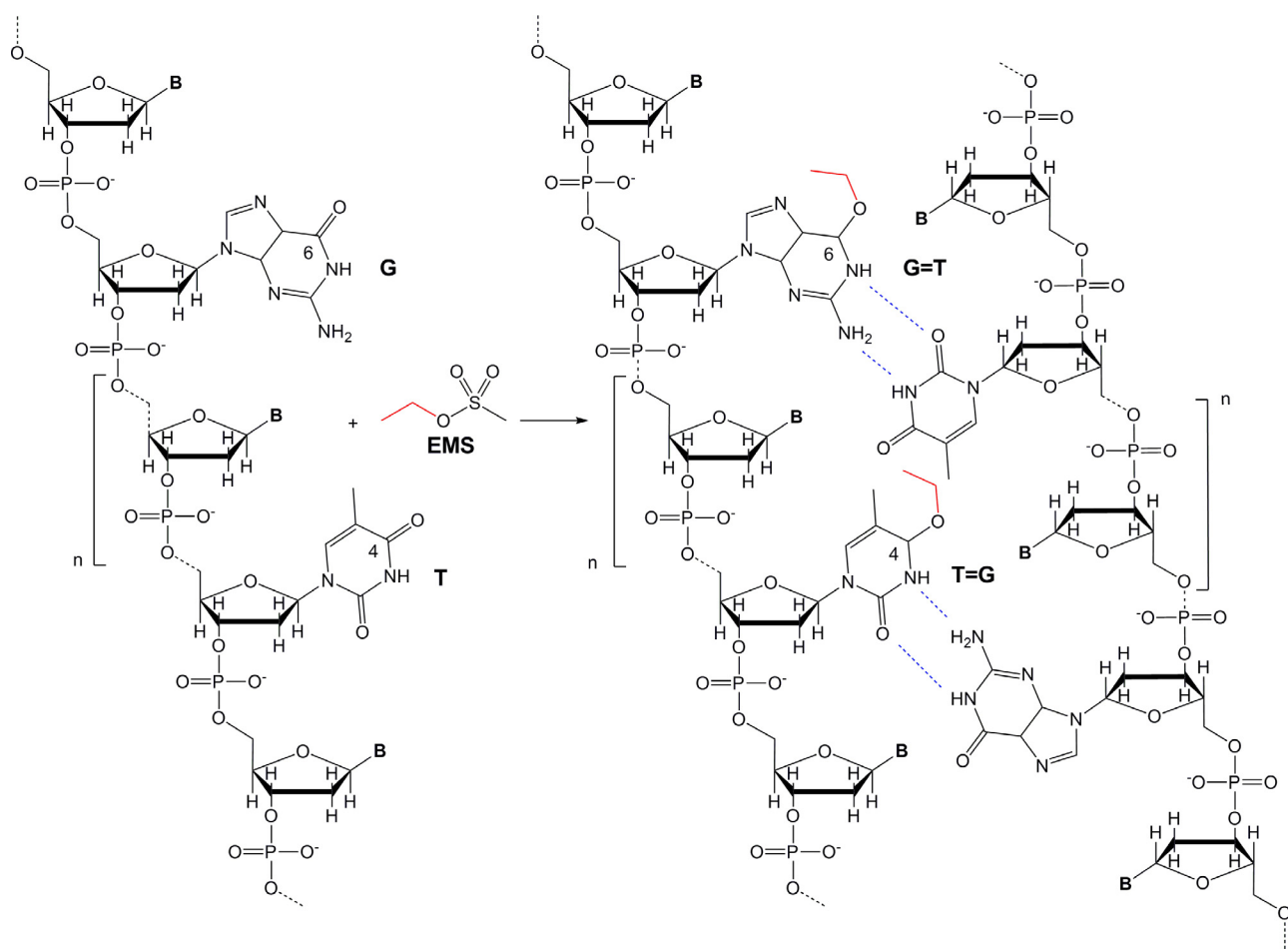
2.5. Computational procedures

Since EMS mutagenic behaviour is related with the alkylation of guanine and thymine as DNA constituents, antigenotoxic activity of tested natural aromatic compounds is expressed after the dealkylation of nucleotides and must be a consequence of non-covalent interactions with particular nucleotides. The ultimate task of the present work was to enclose those interactions and to find the correlation between the antigenotoxic activity of myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid, and their DNA-bound conformations, which will confer structure-based antigenotoxic mechanism of action. Therefore, we considered the alkylation of nucleotides by positioning of EMS narrow to O^6 or O^4 oxygen atoms [35] of guanine and thymine, respectively, using the molecular docking simulations. The repair of guanine and thymine was examined by docking of alkylated lesions into the active site of O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT). Finally, the docking of naturally occurring compounds, myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid on repaired nucleotides was performed to outline the mechanism of GO^6 or TO^4 oxygen atoms protection. The crucial interactions within the proposed mechanism were confirmed by the generation of structure-based 3-D pharmacophore models.

2.5.1. Molecular docking and energy minimization of EMS–DNA complex

The O^6 -alkylguanine and O^4 -alkylthymine lesions in DNA, which result from the endogenous source like EMS, are carcinogenic and mutagenic and cause unnatural GT and TG transition mutations [35]. Since those lesions arise after the direct transfer of EMS ethyl group towards O^6 and O^4 atoms of guanine and thymine (Scheme 1), respectively, we were interested at the beginning of molecular modelling studies to determine the most conceivable conformations of EMS in which the ethyl group transfer occurs easily. Hence, following procedure was utilized.

The EMS–DNA complex generated in an environment without solvent was obtained from the experimental part of our previous article [39]. The DNA structure (PDB: 1DSC), as a molecular target for docking simulations was initially obtained by cleaning the



Scheme 1. The alkylation of random DNA sequence with EMS, formation of O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine, and consequent mispairing of guanine and thymine.

macromolecule from Actinomycin D as inhibitor [43]. The EMS–DNA complex was loaded into UCSF Chimera software [44] and further improved by adding hydrogen atoms using the leap module of Amber 12 suite [45], upon which the correct protonation at pH 7.4 was assigned to each nucleic acid residue by means of Antechamber module of Amber 12 suite. The complex was then solvated (SOLVATEOCT command) in a box entering 5 Å with water molecules (TIP3 model) and neutralized with Na^+ and Cl^- ions. Since water molecules at the surface of DNA are critical to its equilibrium structure, DNA–protein function, and DNA–ligand recognition [46], the exact purpose of solvation was to provide the environment for as much as possible realistic docking into the DNA, which is described further in the text. Afterwards, the solvated complex was refined by a single point minimization using the Sander module of AMBER suite. As a final step, both EMS and solvated DNA were saved separately and imported in AutoDockTools [47] for docking experiment.

The rigid root and rotatable bonds were defined using AutoDockTools. The 3-D structure of DNA was further manipulated by removing nonpolar hydrogen atoms, while Gasteiger charges and solvent parameters were assigned by default. The docking was performed with AutoDock 4.2 [47]. To explore the binding of EMS to both guanine and thymine, two region-focused molecular docking analyses were conducted. For binding to arbitrarily selected guanine the dimension of the grid was $18 \text{ \AA} \times 18 \text{ \AA} \times 24 \text{ \AA}$, Å, with a spacing of 0.375 Å between the grid points while the centre grid box coordinates were $x = 10.647$, $y = 1.848$, $z = 0.714$. Binding to arbitrarily chosen thymine required following setup: the dimension of the grid was $18 \text{ \AA} \times 12 \text{ \AA} \times 24 \text{ \AA}$, 0.375 Å spacing

between the grid points, centre grid box coordinates equal to $x = 13.117$, $y = 7.155$, $z = -2.819$. The Lamarckian Genetic Algorithm was used to generate conformations of ligands within the binding site. The global optimization started with a population of 200 randomly positioned individuals, a maximum of 1.0×10^6 energy evaluations and a maximum of 27,000 generations. A total of 100 runs were performed with RMS Cluster Tolerance of 0.5 Å.

Finally, a molecular mechanics approach was applied to refine the Autodock output. The computational protocol consisted the application of 10,000 steps of the steepest descent algorithm until the derivative convergence was 0.01 kcal/Å mol. The AMBER force field with the continuum GB/SA salvation model (water as solvent) implemented in MacroModel [48], via graphical interface Maestro 9.0, was used during minimization.

2.5.2. Covalent molecular docking and energy minimization of EMS–DNA complex

The alkylated guanine and thymine residues were further subjected to the flexible molecular docking protocol. The aim of this procedure was to obtain the lowest energy poses of O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine residues upon the alkylation.

To the best of our knowledge, no docking programme is able to simulate the direct transfer of particular functional group towards the molecular target residues. Therefore, we decided to manually build alkylated guanine and thymine residues. Thus, O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine were formed by the extension of original residues using the Build Structure function implemented in UCSF Chimera. Double bonds connecting the O^6 and O^4 atoms of guanine and thymine, respectively, were converted into single

ones by changing the hybridization from sp^2 to sp^3 of carbon and oxygen atoms involved in the formation of target bonds. Following, sp^3 O^6 and O^4 atoms were substituted with ethyl groups, to simulate the EMS induced alkylation. Newly formed O^6 -ethylguanine-DNA and O^4 -ethylthymine-DNA macromolecules were protonated at pH 7.4, solvated and neutralized, by respecting the above described procedure, after which the complexes were refined.

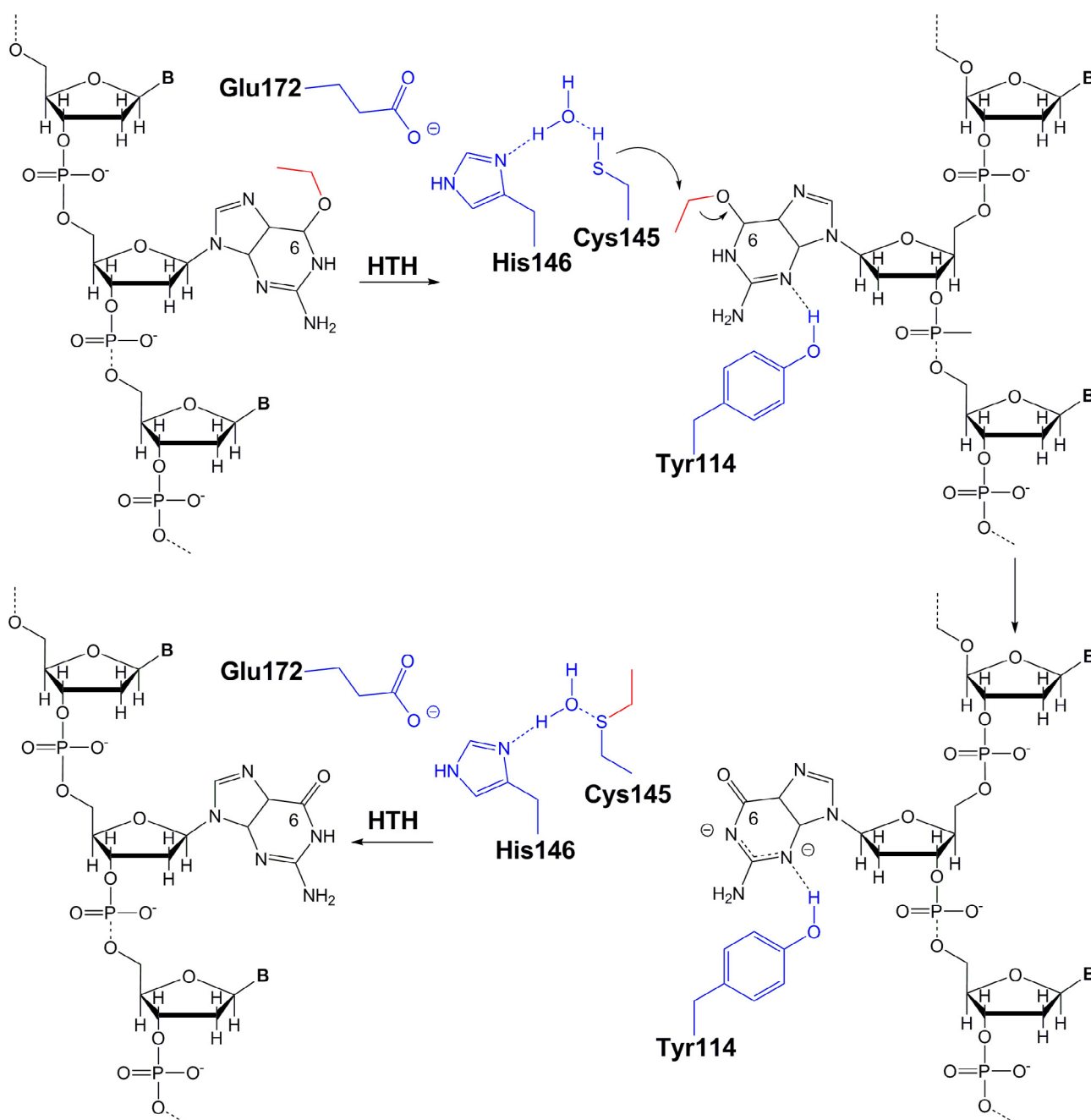
Finally, alkylated macromolecules were imported in AutoDockTools where O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine were treated as flexible residues, thus allowing as much as possible free rotation within the corresponding macromolecule. Still, the most important step in this procedure was the selection of ligand. Therefore, as all calculations were performed in water, one arbitrarily selected water molecule proximal to alkylated residues was saved and prepared as the ligand. The outcome of such

procedure was actually not docking of O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine residues but in fact the docking of particular water molecule, during which the free rotation of alkylated residues and their exploration of binding space was allowed. Generated flexible docking poses were further prepared for interaction with O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase.

At the end of this stage, previously described molecular mechanics approach was applied to refine the Autodock output.

2.5.3. Docking of alkylated DNA macromolecules into active site of AGT

Upon the alkylation, AGT repairs alkyl lesions in modified oligodeoxynucleotides by transferring the O^6 -alkyl and O^4 -alkyl group towards the active site cysteine (Cys145) in an irreversible and stoichiometric reaction [49]. Prior to dealkylation reaction,



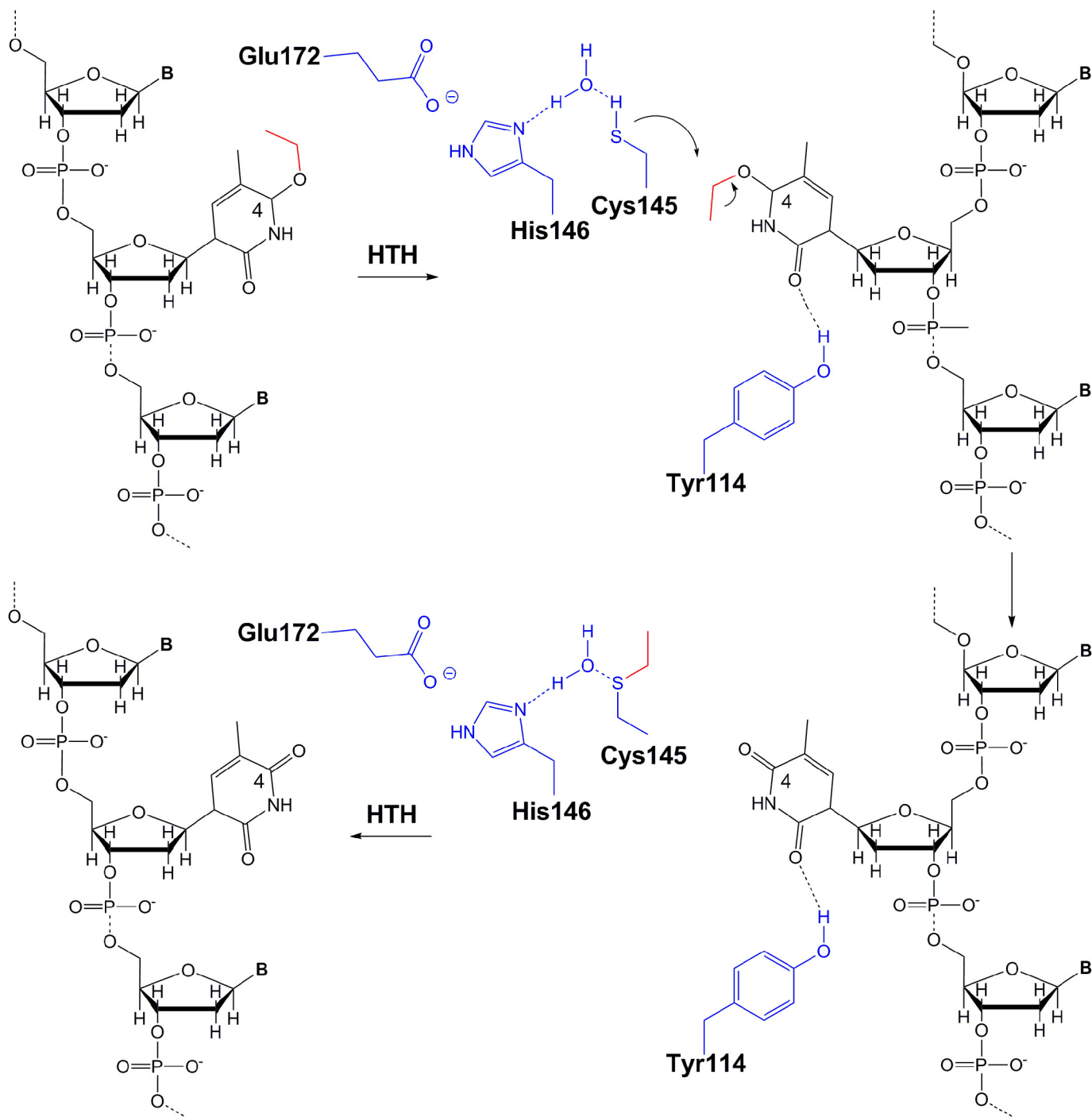
Scheme 2. The proposed mechanism for helix-turn-helix mediated dealkylation of O^6 -ethylguanine within the active site of O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase.

flipping of damaged nucleotide, facilitated by an arginine finger within the helix–turn–helix (HTH) motif, is required to stabilize the extrahelical O^6 -alkylguanine and O^4 -ethylthymine into the reactive cysteine environment without the protein conformational change [49]. In that sense, the aim of the next docking experiment was to explore how the ethyl derivatives of guanine (Scheme 2) and thymine (Scheme 3) are going to be recognized by AGT, after which the enzyme will catalyze dealkylation.

The molecular docking of O^6 -ethylguanine-DNA and O^4 -ethylthymine-DNA macromolecules into the active site of AGT was the most challenging step in the presented computational procedure. Ability of AGT to catalyze dealkylation of methyl [50] and benzyl [51] derivatives was confirmed by crystallography data.

It is a general opinion that O^6 -ethylguanine is repaired by AGT [52,53] but there is a lack of knowledge whether or not O^4 -ethylthymine is a convenient substrate for dealkylation reaction. The necessary step in the planned procedure was the manual emulation of HTH conformational change [49] within the structure of best-docked O^6 -ethylguanine-DNA and O^4 -ethylthymine-DNA macromolecules. Macromolecules were thus loaded into UCSF Chimera after which O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine were selected and flipped out of DNA using Structure Editing/Adjust Torsions tool.

The docking setup is further presented. Since there is no available tridimensional structure of *D. melanogaster* O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase, non-alkylated human O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase (PDB: 1EH6) was chosen as a



Scheme 3. The proposed mechanism for helix–turn–helix mediated dealkylation of O^4 -ethylthymine within the active site of O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase.

receptor, due to the high similarity between the sequences [51]. The receptor was further prepared by adding hydrogen atoms. All amino acids in the protein were additionally individually inspected and correct protonation states at pH 7.4 were considered: *i.e.* lysines, arginines, aspartates and glutamates were assumed to be in the ionized form. Complex was further solvated in a box entering 10 Å with water molecules, neutralized with Na⁺ and Cl⁻ ions, and refined. Considering the fact that planned experiment was macromolecule-macromolecule docking, additional effort was conducted to obtain the correct starting coordinates for docking experiment for both receptor and ligand. The crystal structure of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in complex with DNA containing O⁶-methylguanine (PDB: 1T38) [50] was chosen as a template for the preparation of correct coordinates for the docking of O⁶-ethylguanine. Similarly, the crystal structure of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in complex with O⁴-methylcytosine (PDB: 1YFH) [54] was chosen as template for preparing the correct coordinates for the docking of O⁶-ethylthymine. Therefore, the receptor structure was prepared by superimposition of templates to protein part by utilizing the MatchMaker. The correct orientation of flipped alkylated DNA macromolecules was obtained by the alignment to crystal DNA. The final step was to insert the generated complexes into AutoDockTools and to set up properties for Lamarckian Genetic Algorithm guided docking. For ligands, *i.e.* alkylated nucleotides, maximum number of torsions was allowed. Grid box was manually centred on active site of AGT, using 40 Å × 40 Å × 40 Å grid dimensions and 0.375 Å space between the grid points, with centre grid box coordinates $x = 13.246$, $y = 7.224$, $z = -2.532$.

2.5.4. The preparation of structures of antigenotoxic agents

When endogenous alkylation is directly reversed by AGT, HTH motif returns DNA molecule into its native state [49]. Afterwards, natural aromatic compounds, myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid, express antigenotoxic activity through the interactions with O⁶-guanine and O⁴-thymine residues and thus they protect residues of renewed exposure to EMS. In the following lines there is a detailed description of protocols used to reveal those interactions, after which possible mechanisms of action were proposed.

The crystal structures of chosen natural occurring compounds were downloaded from the Brookhaven Protein Data Bank, as all compounds were co-crystallized as inhibitors of corresponding enzymes. In such manner, all of the compounds were obtained in their physiological state by which any geometric inaccuracy caused by manual drawing was avoided. The compounds were extracted using the UCSF Chimera and the maintenance of coordinates was used as obtained for the generation of geometries in experimental environment of performed antigenotoxic assay. Therefore, the structure of myricetin was extracted as inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PDB: 1E90) [55], quercetin was saved from transcriptional regulator TtgR complex (PDB: 2UXH, chain B) [56], rutin was collected from prostaglandin F synthase complex (PDB: 1RY8, chain B) [57], while rosmarinic acid was kept from complex with a Bothropic Myotoxin (PDB: 3QNL) [58]. Hydrogen atoms were added afterwards to all saved PDB structures, upon which all molecules were additionally individually inspected and protonated correctly at pH 7.4 by means of Antechamber module of Amber suite.

2.5.5. Monte Carlo molecular modelling simulations of ligands

After the initial preparation, all tested compounds were subjected to molecular modelling protocol to determine conformations in experimental environment prior to DNA binding. The structures were imported into MacroModel 9.5 [48] via graphical interface Maestro 9.0. The conformations were obtained by using

Monte Carlo simulated annealing molecular dynamics procedure implemented in MacroModel [59]. Each structure was energy minimized to a low gradient. The non-bonded cutoff distances for van der Waals interactions were set to 8 Å while distances for the electrostatic ones were set to 20 Å. An initial random velocity to all atoms corresponding to 310.15 K was applied. Molecular dynamics was carried out for 10 ps with a 1.5 fs time-step and simulation time of 10.0 ps, at a constant temperature of 310.15 K for equilibration purposes. The minimizations and molecular dynamics were performed by implicit solvation in simulated water solution ($\epsilon = 80.3$) using GB/SA (Generalized Born solvent accessible surface area) keyword and the OPLS2005 force field.

2.5.6. Molecular docking and energy minimization of ligand-DNA complexes

Modelled flavonoid and phenolic compounds were further subjected to the same docking protocol as described for EMS. The lowest energy conformations were obtained in both regions occupied by arbitrarily chosen guanine and thymine residues. Revealed docking poses provided insight into the mechanism of antigenotoxic behaviour of tested compounds.

2.5.7. The generation 3-D pharmacophore models

The best docked structures of examined natural occurring compounds in complex with DNA were used as starting structures for the generation of 3-D pharmacophore models in the present study. The software LigandScout 3.1 [60] was applied for the detection and interpretation of crucial interaction patterns between DNA and ligands. LigandScout extracts and interprets the ligand and the macromolecular environment from PDB file, then automatically creates and visualizes an advanced pharmacophore model. The pharmacophores were exported as Hypoedit scripts and converted into Discovery Studio 2.1 [61] format with Hypoedit tool. The bound ligands were converted to shape query and was merged with the pharmacophore model to give a combined feature-shape query.

3. Results

3.1. Antigenotoxic activity of tested natural aromatic compounds

The assay for induction of sex-linked recessive lethal mutations in germ cells of male *D. melanogaster* detects chemicals that are capable of inducing heritable lethal mutations, which may range from changes in only one base of the DNA, that is point mutation, to small deletions or chromosome aberrations, which are lethal in hemizygous and homozygous conditions before the adult stage [40]. This test is a forward mutation assay capable of screening for mutations at about 800 loci on the X-chromosome; this represents about 80% of all X-chromosomal loci.

In this study we evaluated the antigenotoxic effects of natural aromatic compounds common in fruits and vegetables, myricetin, quercetin, and rutin, as structurally related flavonoids, as well as the rosmarinic acid, a phenolic acid representative, against the DNA damage induced by EMS, a well-established chemical mutagen. The protection against EMS-induced DNA damage, conferred by a 24 h of post-treatment with selected phenolic compounds, is shown in Tables 1–4.

The frequency of germinative mutations induced by EMS is significantly higher ($p < 0.001$) than the one induced by sucrose (S) as the negative control (Tables 1–4), serving as a clear indicator of its mutagenic effect. Compared with the sucrose, myricetin decreased ($p > 0.05$) the genotoxicity of EMS in postmeiotic germinative cell line – at spermatozooids and spermatids, and in premeiotic line – spermatocytes (Table 1).

Table 1
Frequencies of sex linked recessive lethal mutations in the *Drosophila melanogaster* after the treatment with EMS and the post-treatment with myricetin.

Broods		Treatments					
		S ^a	EMS ^b	EMS + M ^c	t _{S/EMS}	t _{S/EMS + M}	t _{EMS/EMS + M}
I	No of crosses	150	110	92	6.9	0.13	6.7
	No of lethal	3	37	2	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.0	33.03	2.2			
II	No of crosses	135	81	61	6.2	0.23	5.8
	No of lethal	3	27	1	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.2	33.3	1.64			
III	No of crosses	126	59	49	4.03	0.16	3.8
	No of lethal	3	15	1	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.4	25.4	2.04			
I + II + III	No of crosses	411	250	202	9.9	0.17	9.9
	No of lethal	9	79	4	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.2	31.6	1.98			

The results are analysed by the test for difference in proportions, by simultaneous comparison with the positive and negative controls. Triple asterix indicates significantly higher frequency compared to EMS as positive control or to sucrose as negative control.

^a S; sucrose; negative control, 1%.

^b EMS; ethyl methanesulfonate, positive control, 0.75 ppm.

^c M; myricetin, 100 ppm.

Table 2
Frequencies of sex linked recessive lethal mutations in the *Drosophila melanogaster* after the treatment with and EMS and the post-treatment with quercetin.

Broods		Treatments					
		S ^a	EMS ^b	EMS + Q ^c	t _{S/EMS}	t _{S/EMS + Q}	t _{EMS/EMS + Q}
I	No of crosses	150	110	89	6.9	1.52	5.2
	No of lethal	3	37	6	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.0	33.03	6.7			
II	No of crosses	135	81	72	6.2	0.8	5.1
	No of lethal	3	27	3	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.2	33.3	4.2			
III	No of crosses	126	59	72	4.03	0.6	3.5
	No of lethal	3	15	3	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.4	25.4	4.2			
I + II + III	No of crosses	411	250	233	9.9	1.5	10.0
	No of lethal	9	79	12	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.2	31.6	5.2			

The results are analysed by the test for difference in proportions, by simultaneous comparison with the positive and negative controls. Triple asterix indicates significantly higher frequency compared to EMS as positive control or to sucrose as negative control.

^a S; sucrose; negative control, 1%.

^b EMS; ethyl methanesulfonate, positive control, 0.75 ppm.

^c Q; quercetin, 100 ppm.

Table 3
Frequencies of sex linked recessive lethal mutations in the *Drosophila melanogaster* after the treatment with EMS and the post-treatment with rutin.

Broods		Treatments					
		S ^a	EMS ^b	EMS + R ^c	t _{S/EMS}	t _{S/EMS + R}	t _{EMS/EMS + R}
I	No of crosses	150	110	91	6.9	0.62	5.4
	No of lethal	3	37	3	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.0	33.03	3.3			
II	No of crosses	135	81	92	6.2	0.11	5.7
	No of lethal	3	27	2	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.2	33.3	2.2			
III	No of crosses	126	59	59	4.03	0.84	3.3
	No of lethal	3	15	3	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.4	25.4	5.1			
I + II + III	No of crosses	411	250	242	9.9	0.62	9.7
	No of lethal	9	79	8	p < 0.001***	p > 0.05	p < 0.001***
	% of lethal	2.2	31.6	3.3			

The results are analysed by the test for difference in proportions, by simultaneous comparison with the positive and negative controls. Triple asterix indicates significantly higher frequency compared to EMS as positive control or to sucrose as negative control.

^a S; sucrose; negative control, 1%.

^b EMS; ethyl methanesulfonate, positive control, 0.75 ppm.

^c R; rutin, 100 ppm.

Table 4Frequencies of sex linked recessive lethal mutations in the *Drosophila melanogaster* after the treatment with EMS and the post-treatment with rosmarinic acid.

Broods		Treatments					
		S ^a	EMS ^b	EMS + RA ^c	t _{S/EMS}	t _{S/EMS + RA}	t _{EMS/EMS + RA}
I	No of crosses	150	110	80	6.9	0.24	6.6
	No of lethal	3	37	2	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
	% of lethal	2.0	33.03	2.5			
II	No of crosses	135	81	91	6.2	0.65	6.4
	No of lethal	3	27	1	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
	% of lethal	2.2	33.3	1.1			
III	No of crosses	126	59	73	4.03	0.25	3.7
	No of lethal	3	15	2	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
	% of lethal	2.4	25.4	2.7			
I + II + III	No of crosses	411	250	244	9.9	0.17	9.7
	No of lethal	9	79	5	$p < 0.001^{***}$	$p > 0.05$	$p < 0.001^{***}$
	% of lethal	2.2	31.6	2.1			

The results are analysed by the test for difference in proportions, by simultaneous comparison with the positive and negative controls; Triple asterix indicates significantly higher frequency compared to EMS as positive control or to sucrose as negative control.

^a Sucrose; negative control, 1%.

^b EMS; ethyl methanesulfonate, positive control, 0.75 ppm.

^c RA; rosmarinic acid, 100 ppm.

The post-treatments with quercetin in concentration of 100 ppm drastically reduced the frequency of sex linked recessive lethal mutations induced by EMS in comparison with the negative control value (Table 2).

As shown in Table 3, post-treatment with rutin caused a statistically significant reduction in frequency ($p < 0.001^{***}$) of sex linked recessive lethal mutations in all three broods, related to the EMS, as a positive control ($p < 0.001$).

As can be seen from Table 4, the treatment with rosmarinic acid, 24 h after the application of EMS, revealed that phenolic acid decreased the frequency of sex-linked recessive lethal mutations of EMS with high significance in all broods ($p < 0.001^{***}$). Compared with the sucrose, rosmarinic acid decreased ($p > 0.05$) the genotoxicity of EMS in postmeiotic and in premeiotic germinative cell lines.

The average values of frequencies of germinative mutations for all three broods indicate that all selected phenolic compounds in concentration of 100 ppm exhibit antigenotoxic effect, as they significantly reduce the rate of mutation induced by a proven mutagen EMS, thus revealing a potential antigenotoxic activity.

Results obtained from the negative control and selected phenolic compounds in broods I, II and III, did not differ from each other. These data suggest that the protection of DNA damaging is stirred up in haploid and in diploid stages of the gametogenesis. By taking into account the fact that some flavonoids show genotoxic potential on bacteria [14], we still think that all tested compounds can be successfully applied as human antigenotoxic agents according to the results of this experiment since the assays performed on *D. melanogaster* can be considered as relevant due to the similarity of metabolic pathways between *Drosophila* and mammals [62].

The rate of O⁶-ethylguanine repair by AGT *in vivo* is already known [52,53], but to the best of our knowledge there are no assays developed to outline the repair of O⁴-ethylthymine. Moreover, there are no crystallography studies dealing with the mechanism of repair of neither corresponding ethyl lesions, O⁶-ethylguanine or O⁴-ethylthymine. Therefore, to explain the exceptional activity of all examined compounds, consideration of results was transposed on the molecular level, seeking for mechanisms of actions that provide DNA protection.

3.2. Insight into EMS interactions with DNA

The harmful effect of EMS against fly DNA (Tables 1–4) is seen upon the electrophilic alkylation of O⁶ atom of guanine and O⁴ atom

of thymine (Scheme 1) [35]. The consequence of such alkylation is the formation of O⁶-ethylguanine and O⁴-ethylthymine, adducts that are unable to form physiologically normal nucleotide pairs, but instead can produce unnatural G=T and T=G hydrogen bonding associated to mutagenic, toxic and carcinogenic effects [35]. Using the Lamarckian Genetic Algorithm we were able to propose EMS physiological conformations during EMS–DNA counteract, immediately before the alkylation of guanine and thymine residues.

To the best of our knowledge there is no available co-crystallized structure of EMS–DNA complex. In our previous study some docking experiments were conducted with the aim to outline the EMS binding to DNA in solventless environment [39]. Significant improvement in the accuracy of the procedure was achieved during this experiment, as water molecules that naturally encircle DNA macromolecule were included in modelling procedures. Although the crystallographic orientation of water is unknown, docking simulation in water environment was directed towards the prediction of the lowest energy pose of EMS in physiological conditions, *i.e.* the conformation of the molecule in which it acts as an electrophilic alkylation agent. AutoDock algorithm does not have the ability to simulate the alkylation of guanine and thymine but it can predict the best possible orientation of EMS towards the O⁶ oxygen atom of guanine or O⁴ oxygen atom of thymine.

Therefore, as presented by Fig. 2A, EMS molecule is fitted below the G^{O⁶} and occupies the region around guanine residue in such manner that EMS ethyl group (carbon atoms are coloured in grey) is within the C–O covalent bond distance ($d = 1.397 \text{ \AA}$) from the O⁶ of guanine (carbon atoms are depicted in purple). This suggests that, in such orientation of EMS towards DNA, alkylation occurs easy and results with the formation of O⁶-ethylguanine. The low value of EMS binding energy to DNA ($\Delta G = -7.34 \text{ kcal/mol}$) confirmed that the docked conformation is in fact the bioactive one. The inspection of EMS binding mode in the proximity of thymine (Fig. 2B), revealed that EMS is placed above the T^{O⁴} and that the ethyl group is within the C–O covalent bond distance ($d = 1.567 \text{ \AA}$) from the O⁴ of thymine. Still, the binding of EMS to thymine is more energetically expensive ($\Delta G = -6.24 \text{ kcal/mol}$). By matching two EMS geometries, it was determined that the EMS bonded to thymine is flipped horizontally in comparison with EMS narrowed to guanine, but the relative orientations of the ethyl groups are quite similar indicating that the transfer of ethyl group towards nucleotides occurs in the same manner.

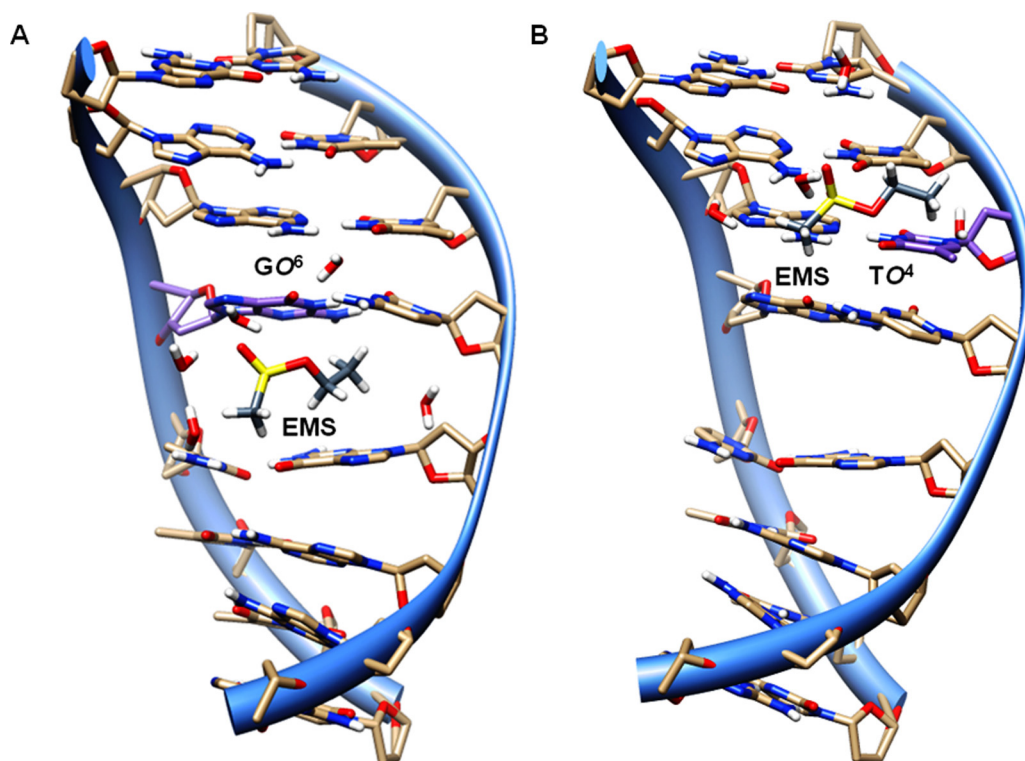


Fig. 2. The EMS conformation that is about to release ethyl group towards (A) guanine and (B) thymine. Target nucleotide cores are depicted by medium purple while EMS ethyl residues are coloured by slate grey (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

3.3. Effect of EMS alkylation on nucleotide mispairing

Molecular docking simulations provided significant insight how ethyl group, originating from EMS, may influence the future incorporation of base pairs during the mispairing stage. Therefore, O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine are nucleotide analogues that have pairing properties unlike those of the normal bases. Since they cannot form regular hydrogen bonds with complementary nucleotides, mutations are produced as they stipulate incorrect nucleotides to be inserted opposite to them in the replication. As they exist only in a single DNA strand, they can cause a nucleotide-pair substitution that is replicated in all DNA copies descended from the original strand [35]. The addition of EMS ethyl group to guanine leads to direct mispairing with thymine, and *vice versa* (Scheme 1), and would result in GC \rightarrow AT transitions at the next round of replication [35]. As expected, determinations of mutagenic specificity for EMS show a strong preference for GC \rightarrow AT transitions.

What was unseen and un contemplated so far is readily expected conformational change of O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine in comparison with the unchanged guanine and thymine, which must occur due to the steric hindrance between alkylated bases and opposite corresponding nucleotides, caused by voluminous ethyl group. Those conformational changes may occur just before the beginning of replication phase. Indeed, altered guanine ring is slightly rotated out-of-plane for -12° related to the unchanged guanine, determined by measuring the angle formed between the N^9 atom of guanine core as root atom and both amino groups at position C-2 (Fig. 3A). The distance between two amino groups is 1.236 \AA , with root mean square deviation (rmsd) between normal and altered guanine ring of 1.743 \AA . Also, there is a conformational clash between the ethyl group and amino group of complementary cytosine at position C-4 of pyrimidine core. This particular conformational twist is the reason why the formation of O^6 -ethylguanine is energetically less favourable

($\Delta G = -1.72 \text{ kcal/mol}$) than actual positioning of EMS before the alkylation ($\Delta G = -7.34 \text{ kcal/mol}$). The corresponding steric effect of ethyl group was also determined for conformation of O^4 -ethylthymine (Fig. 3B). Hence, O^4 -ethylthymine is even more rotated, for -26° , referring to unaltered base. For two considered conformations, the carbonyl group at position C-2 of pyrimidine core was used as a reference functional group, where the distance between two carbonyl oxygen atoms is 1.674 \AA and consequent rmsd value between two rings amounts 1.978 \AA . In addition, ethyl group pressures the amino group at position C-6 of purine core of complementary adenine. As described for guanine, the formation of O^4 -ethylthymine is energetically more unfavourable process ($\Delta G = -1.87 \text{ kcal/mol}$) than EMS pre-bond interaction with the base ($\Delta G = -6.24 \text{ kcal/mol}$).

3.4. The O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine dealkylation

To be recognized as targets for dealkylation catalyzed by AGT both O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine must be aligned in the active site of AGT in the same region as O^6 -methylguanine [50] and O^4 -methylthymine [54,63], after which similar interactions must be established between the lesions and the active site residues. The O^6 -ethylguanine can be catalyzed *in vivo* [64] but there are still no available crystallographic data to describe the reaction. For the O^4 -ethylthymine, there is lack of experimental evidence that this lesion is a substrate for AGT, but recent docking study that described binding of O^4 -methylthymine into AGT [63] assured immediate breakthrough in the fortune of O^4 -ethylthymine. Guided by the fact that there is no crystallographic structure of *D. melanogaster* AGT, molecular docking of O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine into human AGT was a reasonable decision since AGT contains a highly conserved sequence of $-(I/V)PCHR(V/I)-$ within the active site [49,65] across numerous species, with Cys145 as an exclusive catalytic amino acid available to receive alkyl group in suicide reaction without inducing DNA stand breaks

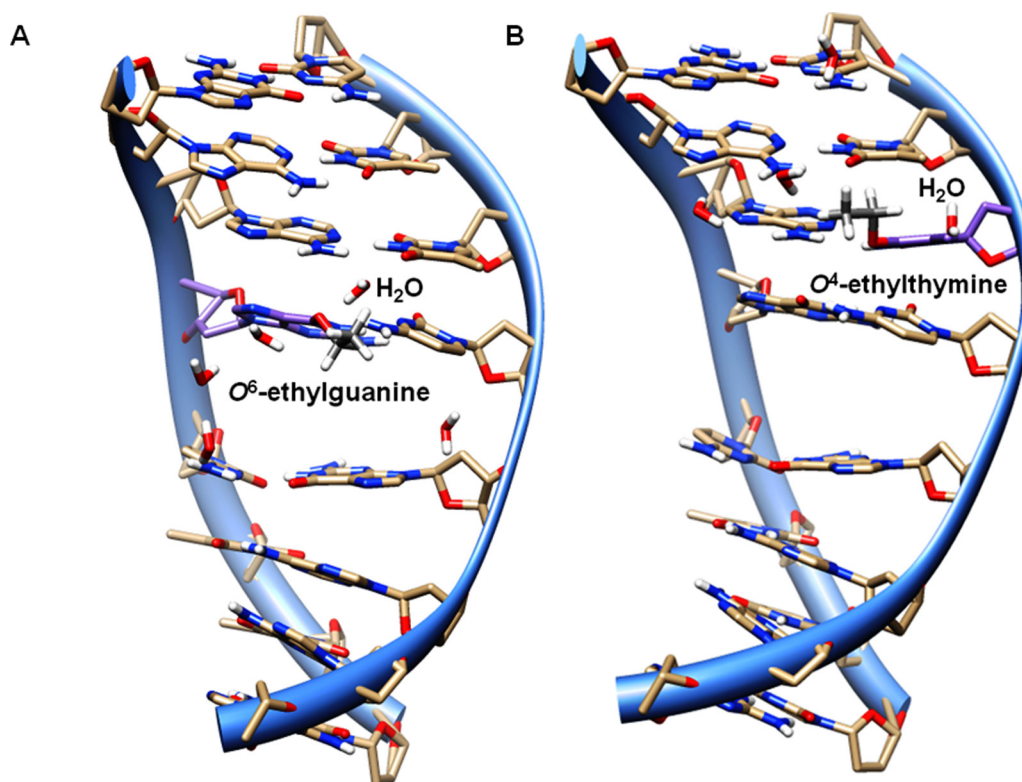


Fig. 3. The best docked poses of (A) O^6 -ethylguanine and (B) O^4 -ethylthymine. Alkylated nucleotide cores are depicted by medium purple, ethyl residues by slate grey, while docked water molecules are especially marked (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

[49]. Due to the high sequence similarity [51,65], it is assumed that *D. melanogaster* AGT is of the very similar tertiary structure to human enzyme, *i.e.* it is consisted of non-catalytically N-terminal domain and C-terminal domain that bears catalytic activity. The N-terminal seems to provide proper orientation of C-terminal for dealkylation [65].

The topology of the C-terminal domain is absolutely conserved for all known AGT structures, and it is consisted of the active site cysteine motif (PCHR), the O^6 -alkylguanine binding channel, and an Arg128 mediated HTH DNA-binding motif that actually inverts lesion towards the active site by forcing a mechanism of 3'-phosphate rotation [50]. To repair DNA, AGT must first bind to DNA to detect the alkyl lesion. According to the accepted mechanism [66], EMS induced lesions can be detected during AGT migration along the DNA, after which they are going to be flipped into the active site. Due to the great structural similarities with O^6 -methylguanine and O^4 -methylthymine, O^6 -ethylguanine (Scheme 2) and O^4 -ethylthymine (Scheme 3) are most likely favourable lesions for flipping. Docking experiments that lead towards O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine recognition by AGT active site were conducted by respecting above described reaction rules.

When alkyl groups of both O^6 -ethylguanine and O^4 -ethylthymine are placed in close proximity to the Cys145 acceptor site, a Glu172-His146-water-Cys145 hydrogen bond network increases the reactivity of Cys145 in AGT [49]. It is thought that the low pK_a and high reactivity of Cys145 is due to generation of thiolate anion *via* proton transfer through the network. According to well accepted mechanism of the dealkylation reaction, His146 acts as a water-mediated base while Cys145 acts as the nucleophile.

The Cys145 and Val148 carbonyls accept hydrogen bonds from guanine's exocyclic amine of O^6 -benzylguanine [51] and O^6 -methylguanine [49,50] whereas the Tyr114 hydroxyl oxygen and Ser159 backbone nitrogen donate hydrogen bonds to guanine N^3 and O^6 atoms, respectively. Reactivity may also be promoted by the

reduction of negative charge on the repaired guanine through the donation of a hydrogen bond by Tyr114 to N^3 of guanine core [49].

Molecular interactions in the generated O^6 -ethylguanine-DNA complex (Fig. 4A) position the lesion nearly ideally for the ethyl transfer reaction (Fig. 4B) [49]. The O^6 -ethylguanine centres itself in the 8 Å groove defined by the backbone of Asn147/Tyr158 and recognition helix, and is packed between the main chain of Asn157, Tyr158, Glu131, and the side chain of Met134. This arrangement brings the guanine N^3 within the hydrogen-bond distance of the Tyr114 and positions the exocyclic amino group for hydrogen bonding ($d = 1.784$ Å) with the peptide bond carbonyl of Val148. The Tyr114 hydroxyl donates moderate hydrogen bond ($d = 2.691$ Å) to N^3 of O^6 -ethylguanine. The ethoxyl group oxygen is narrow to weak hydrogen bond ($d = 3.796$ Å) with the Ser159 backbone nitrogen. Described structure-based alignment of O^6 -ethylguanine in the active site of AGT assures that the damaged nucleotide is recognized by catalytic amino acid Cys145 as a target for dealkylation. The Cys145 side chain lies 1.556 Å away from the ethyl lesion. The conformation and slightly longer carbon-sulfur bond length of Cys145 in the native structure are consisted with a distance lower than 3 Å between the sulfur nucleophile and ethyl lesion in the reactive complex that is required for the transfer of alkyl group to occur easily [49–54]. Additionally, the conformation of Cys145 places the thiolate nearly opposite to the O^6 -CH₂-CH₃ bond for in-line displacement. Upon the transfer, the S-CH₂-CH₃ adduct of Cys145 is stabilized with Pro140 in hydrophobic interaction [49–54].

AGTs are also known to be able to repair methyl adduct at the O^4 -position of thymine (m^4T), although the rate of reaction is much lower in comparison with guanine dealkylation. The m^4T is more potent inducer of mutations than O^6 -methylguanine (m^6G) [67]. The ability of AGT to repair m^4T varies widely. The *in vitro* efficiency is low and can be increased using mutant AGTs [63], but human AGT expressed from *D. melanogaster* or rat is able to reduce

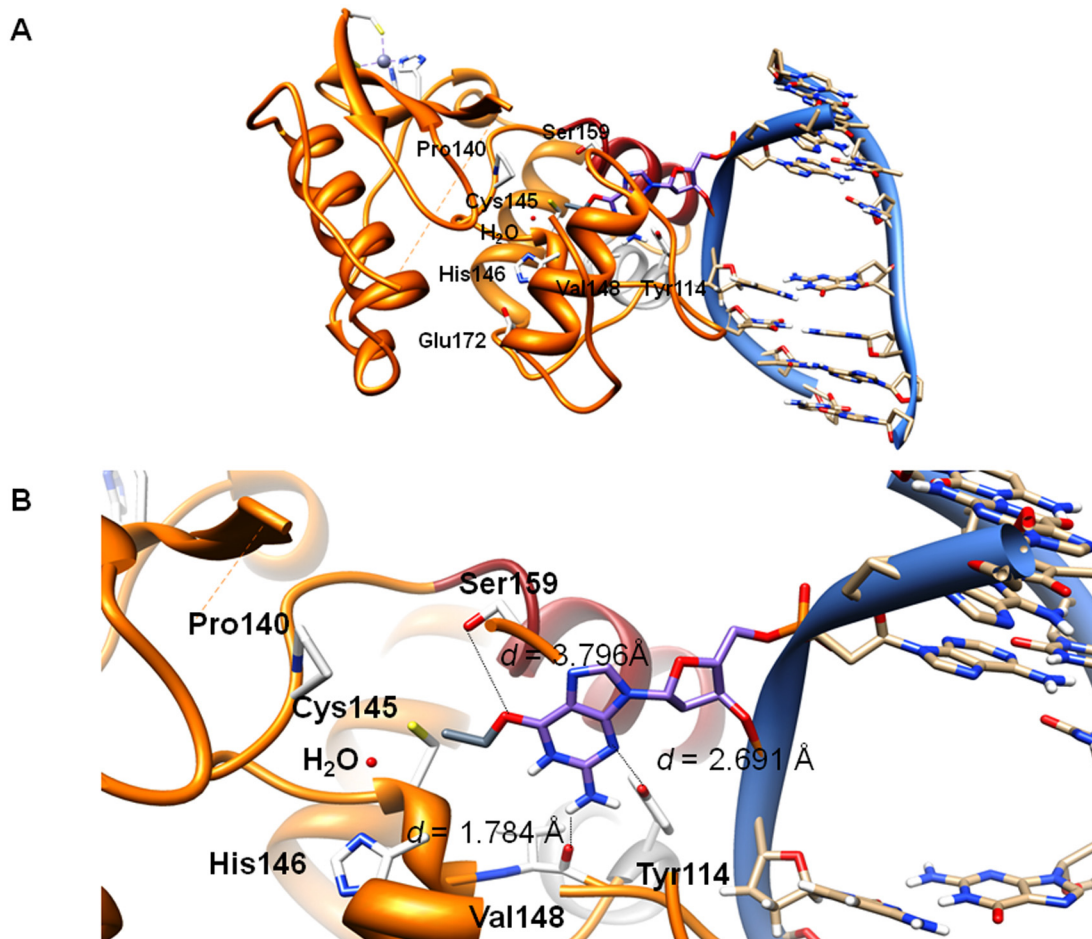


Fig. 4. (A) The predicted interaction between the AGT and O^6 -ethylguanine-DNA macromolecule. AGT ribbon is coloured in orange while first helix and second (recognition) helix in helix-turn-helix motif are depicted by dark grey and dark red, respectively; (B) The binding of O^6 -ethylguanine into AGT active site. For the clarity of presentation only catalytic amino acids are conserved and they are coloured in white. Only important hydrogen atoms were preserved (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

the amount of mT^4 and incidence of T:A to G:G transition mutations [68]. However, it remains unclear whether those base lesions are actually repaired inside living cells.

To determine how AGT might repair thymine lesion formed upon the EMS alkylation, the O^4 -ethylthymine-DNA macromolecule was docked into the active site of the enzyme (Fig. 5A). The close examination of docked conformation reveals that the extrahelical thymine is not fully inserted [63] into the active site and is far from the Cys145 (Fig. 5B). But, the elongation of nucleotide by the ethyl group brings the lesion close enough to Cys145 in a way that the Cys145 side chain is 1.584 Å away from the ethyl lesion. More, the ethoxyl group oxygen is narrow to weak hydrogen bond ($d = 3.026$ Å) with the Ser159 backbone nitrogen. The distance between the Cys145 and thymine O^4 -ethyl scaffold implies that O^4 -ethylthymine can be recognized as a lesion for AGT and that the dealkylation can occur. In the active site, the Tyr114 forms a very weak hydrogen bond to O^2 of the thymine. Since Tyr114 bonds with the guanine lesion *via* N^3 atom, the establishment of hydrogen bond with oxygen atom suggests that this particular amino acid cannot play the stabilization role in the same manner because it is too far from thymine N^3 [63]. This might be one of the reasons why O^4 -ethylthymine is repaired less efficiently than guanine lesion. The damaged nucleotide is indeed stabilized within the active site ($\Delta G = -3.46$ kcal/mol) but in much lower rate than the guanine lesion ($\Delta G = -4.76$ kcal/mol). The 5-methyl group of the thymine base packs with the side chain portion of Ser159 side chain.

3.5. Antigenotoxic activity of natural aromatic compounds

The inspection of binding modes of myricetin (Fig. 6A), quercetin (Fig. 6B), rutin (Fig. 6C), and rosmarinic acid (Fig. 6D), in the guanine region revealed several positive interactions and provided insight into the most favourable mechanism of compounds action. Therefore, it was concluded that compounds can be separated into two sub-groups due to their mode of DNA protection. Structure-activity relationships by which myricetin and quercetin are placed into first group while rutin and rosmarinic acid are constituents of the second group are described further in the text.

Guided by the understanding of docking results, the conclusion is that myricetin (M, Fig. 6A) and quercetin (Q, Fig. 6B) both express the antigenotoxic activity by forming the hydrogen bond with guanine O^6 atom. Both molecules occupy the region that is filled up with EMS in the stage before the alkylation, and therefore the second level of DNA defence is demonstrated through the blocking of EMS approach near the target guanine residue. The myricetin and quercetin flavonoid cores are placed in almost parallel orientation relative to the guanine residue. As a consequence of such positioning, the hydroxyl group of the B ring of flavonoid core of both compounds is within hydrogen-bonding distance with O^6 of guanine. Myricetin itself forms stronger hydrogen bond ($d = 2.307$ Å) than quercetin ($d = 2.437$ Å). Therefore, the formation of those particular hydrogen bonds is crucial for the protection of guanine O^6 by myricetin and quercetin. By the establishment of

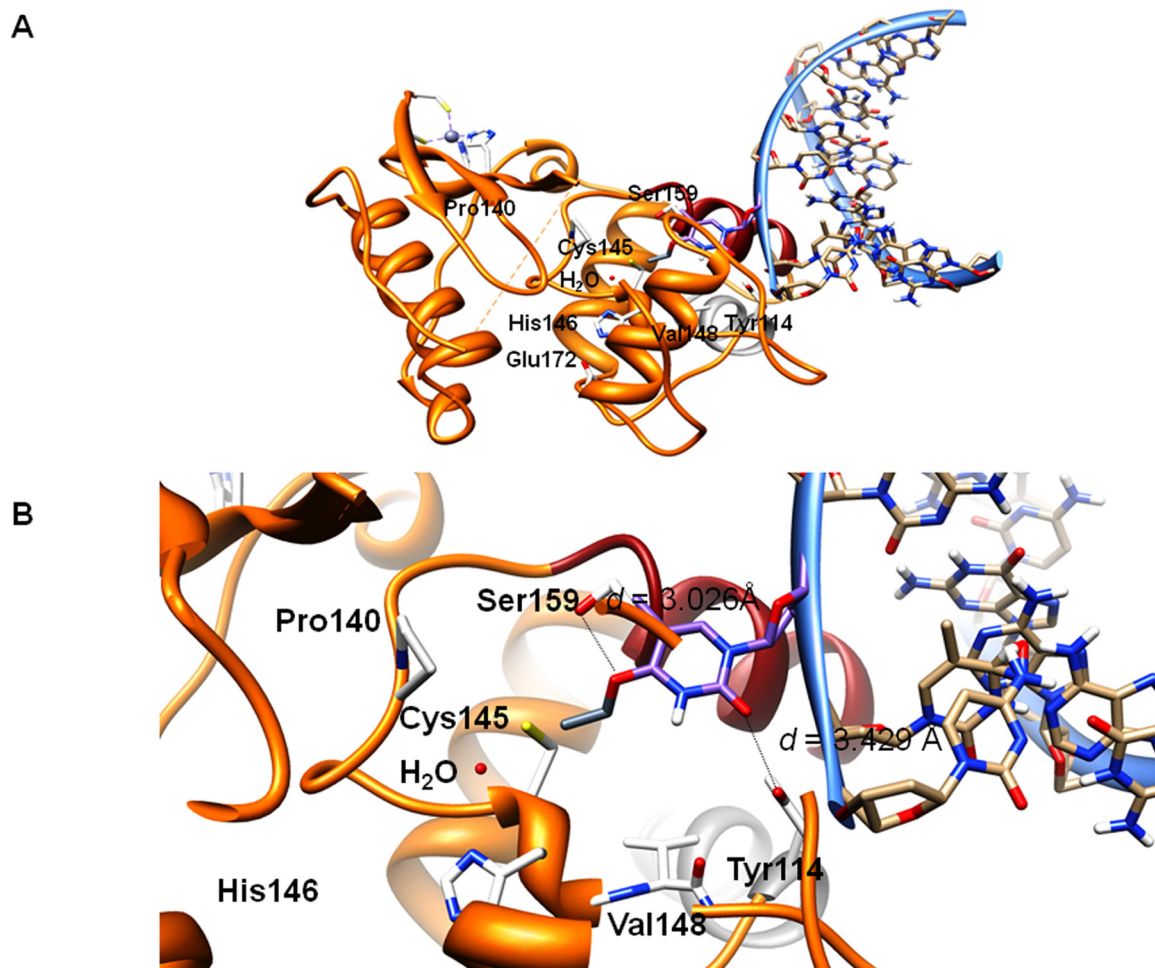


Fig. 5. (A) The predicted interaction between AGT X-ray and O^4 -ethylthymine-DNA macromolecule. AGT ribbon is coloured in orange while first helix and second (recognition) helix in helix-turn-helix motif are depicted by dark grey and dark red, respectively; (B) The binding of O^4 -ethylthymine into AGT active site. For the clarity of presentation only catalytic amino acids are conserved and they are coloured in white. Only important hydrogen atoms were preserved (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

this interaction O^6 is no longer available to receive the ethyl group from EMS. Flavonoid molecules are additionally stabilized near guanine by forming the hydrophobic and electrostatic interactions. In resulting geometry, the B rings are placed in nonplanar orientation by the formation of hydrophobic interactions with carbon atoms that constitute the pyrimidine ring, integral part of purine core. The ring-ring bonding provides proper myricetin geometry for the formation of electrostatic interactions between the amino group at position 1 of guanine core on one side and the carbonyl group of ring B and vicinal hydroxyl group of ring A on the other. Quercetin does not form the corresponding interaction between guanine amino and flavonoid hydroxyl group. The ring C of both compounds is displaced from double helix plane. The binding energies of myricetin and quercetin amount $E = -10.74$ kcal/mol and $E = -9.81$ kcal/mol, respectively, which suggests that DNA protection occurs easily. The lower values of binding energy of myricetin and quercetin in comparison with EMS are additional contribution to the protective role of compounds, making their substitution by EMS and new alkylation reaction energetically less favourable.

The consideration of rutin docking results opened the great interest in the activity of the compound. Since rutin is quercetin analogue, i.e. quercetin-3-O-rutinoside, it was expected to express the activity in similar manner as myricetin and quercetin. Instead, the presence of disaccharide rutinose, α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose, within the structure, causes completely

different mechanism of antigenotoxic activity. Therefore, rutin (Fig. 6C) interacts with DNA in comprehensively different way in comparison with myricetin and quercetin. The lowest energy docked conformation is oriented in the way that molecule encircles the guanine moiety by filling up the large region in space around the nucleotide. The structure of rutin itself determines its mechanism of action. Hence, hydroxyl group of myricetin and quercetin that forms hydrogen bond with O^6 is in the structure of rutin substituted with rutinose and, therefore, rutin does not possess the potential to protect DNA likewise myricetin and quercetin. In other words, there is no plausibility for rutin to form hydrogen bond with guanine O^6 which further means that antigenotoxic activity of rutin is only reflected by the prevention of EMS binding. This is supported by thorough analysis of rutin binding mode. The flavonoid part of molecule conquers the region below guanine that is in precedence of alkylation taken by EMS. The flavonoid core is no longer parallel with the guanine; it is slightly rotated for -15° in comparison with myricetin and quercetin and displaced (rmsd = 2.6 Å) towards the aqueous region. The glycoside bond determines the rutin binding geometry. The rutinose moiety is positioned in almost right angle with respect to flavonoid core, which is the consequence of glycoside bond conformation ($C_{\text{flavonoid}}-O-C_{\text{rutinose}}$ angle = 81.90°). Hence, rutinose residue is blocking the EMS entering pathway and prevents any interaction between the alkylating agent and nucleotide. In more detail, rutinose is placed in front of the imidazole part of guanine moiety, where α -L-rhamnopyranose faces outer DNA region

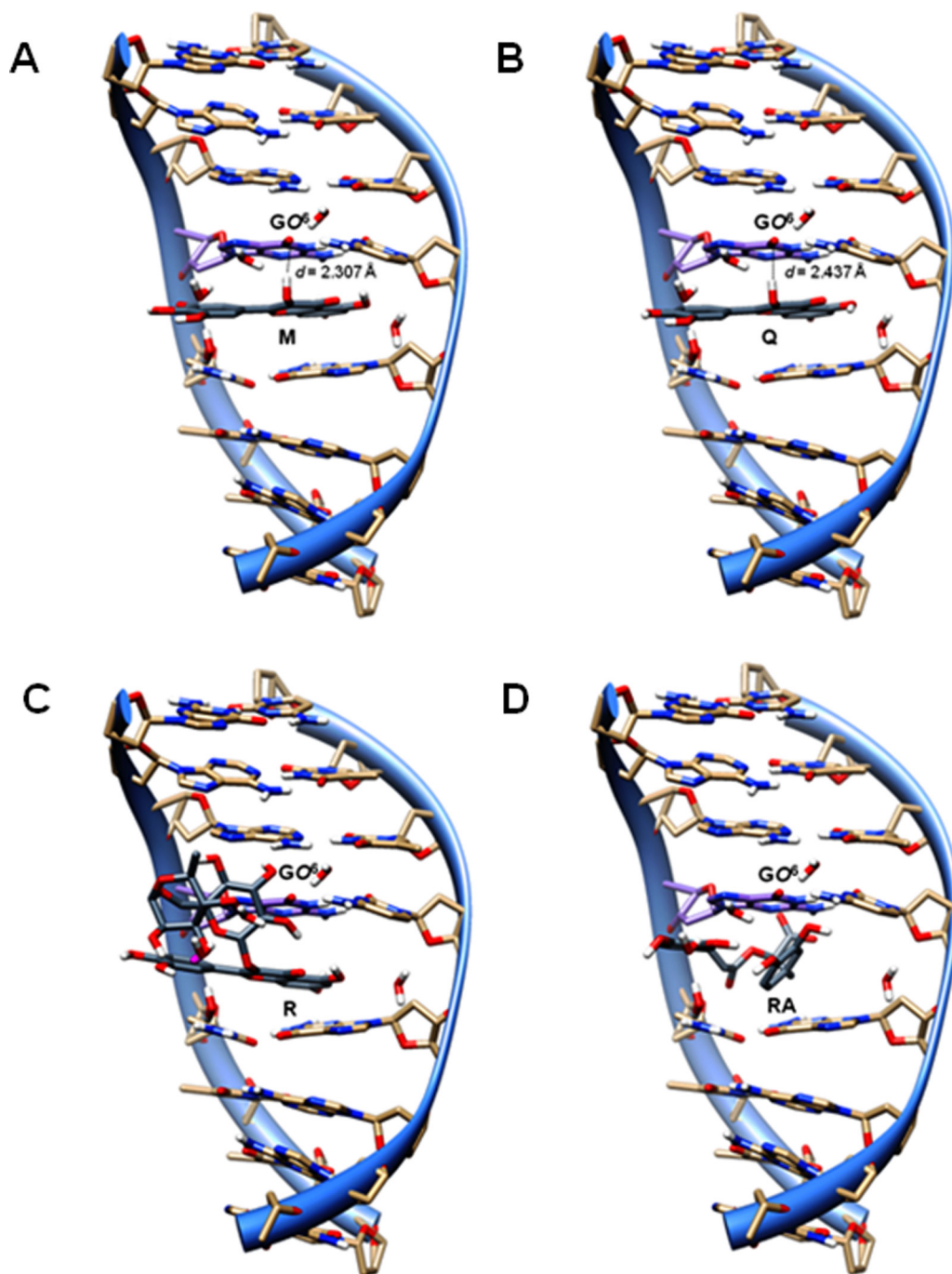


Fig. 6. The bioactive conformations of (A) myricetin, (B) quercetin, (C) rutin, and (D) rosmarinic acid during prevention of guanine alkylation. (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

while two hydroxyl groups at position C-4 and C-5 of β -D-glucopyranose establish electrostatic interactions with guanine O^6 . The binding energy of rutin amounts $E = -10.96$ kcal/mol thus assuring compound's high efficiency as antigenotoxic agent.

Similarly to rutin, rosmarinic acid (Fig. 6D) also expresses protection of DNA molecule by the obstruction of EMS interaction with macromolecule. Both caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid, as integral constituents of rosmarinic acid, have significant role in the antigenotoxic activity. Thus, the complete 3,4-dihydroxy-*trans*-cinamate scaffold is directed perpendicularly related to guanine and makes a spatial barrier for entering of EMS molecule. The phenyl ring of caffeic acid (the first ring) is in almost parallel orientation with the guanine core but does not interfere

with it by means of hydrophobic interactions. Hydroxyl groups at positions 3 and 4 interact with water molecules. Nevertheless, hydroxyl group at position 3 is involved in the electrostatic interaction with hydroxyl group at position 4 of 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid moiety. The coupling of two hydroxyl groups determines the orientation of phenyl group that originates from 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid (the second ring), and therefore, two phenyl residues are positioned against each other by the angle of $\sim 120^\circ$. Consequently, the hydroxyl group at position 3 of 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid forms strong repulsing electrostatic interaction with guanine O^6 oxygen. In addition, the second ring traverses trough the EMS binding area, thus making the guanine residue inaccessible for any interaction with alkylating agent. The

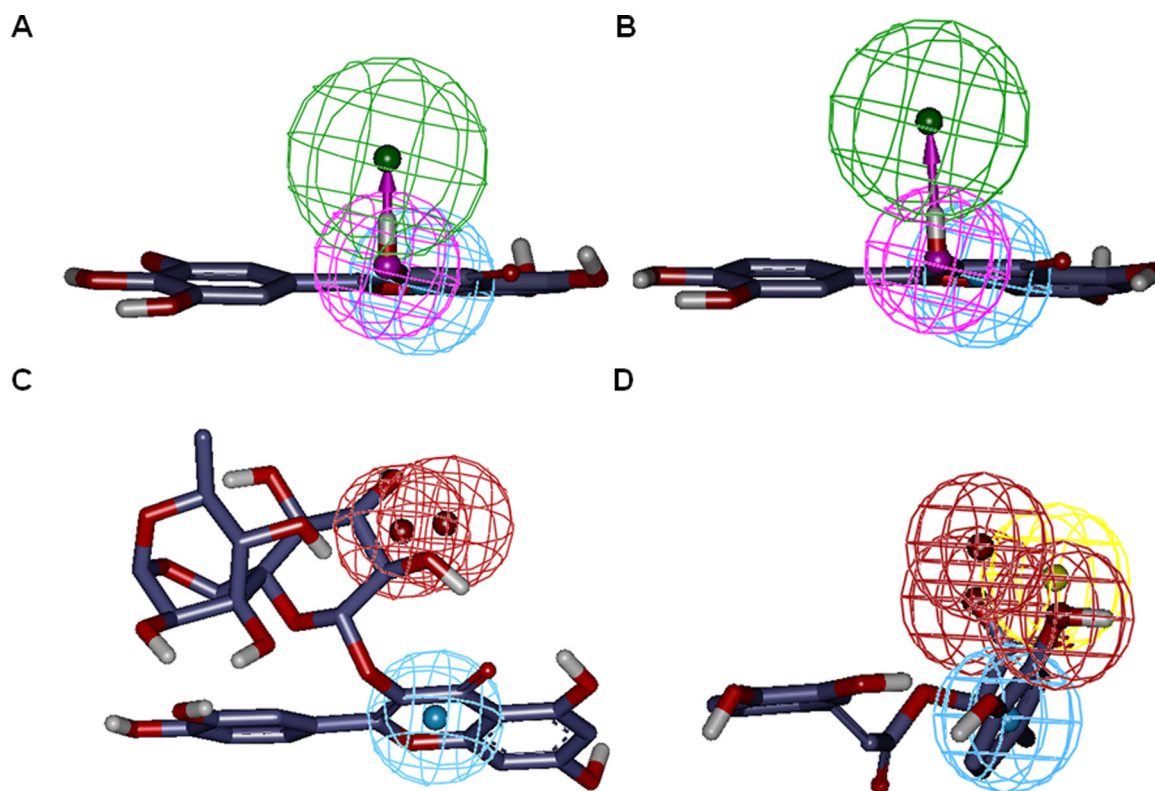


Fig. 7. The 3-D pharmacophore models aligned against bioactive conformations of (A) myricetin, (B) quercetin, (C) rutin, and (D) rosmarinic acid as inhibitors of guanine alkylation. The pharmacophore features are colour coded; green: hydrogen-bond acceptor, magenta: hydrogen-bond donor, blue: hydrophobic aromatic, yellow: positive charge, red: negative charge (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

role of carboxyl group from 3,4-dihydroxyphenyl lactic is also remarkable. The carboxyl group is placed behind the guanine and forms electrostatic bonds with the amino group at position 1 of guanine core. In that sense, the whole alkyl residue of caffeic acid is the backbone for a sort of a chair conformation of the molecule which rounds the guanine. The binding energy of such tight conformation amounts $E = -8.43$ kcal/mol thus confirming antigenotoxic potential of compound.

The generated structure-based pharmacophore models used to further describe the guanine protection by natural compounds (Fig. 7) confirmed all significant interactions established in the compound-guanine interaction modes. The best pharmacophore hypothesis emphasizes a series of excluded volumes in the model related to hydrophobic aromatic (HA) interactions near the guanine moiety. Those HA interactions (blue spheres) are common pharmacophore features for all compounds and are the consequence of stabilizations provided by aromatic scaffolds during the interaction with the guanine ring. More, myricetin (Fig. 7A) and quercetin (Fig. 7B) modes of action are characterized by mutual hydrogen-bond donor (HBD, magenta spheres) features placed on hydroxyl group of the B ring. The prediction of those properties highlights the extreme importance of formation of hydrogen bond between the flavonoid and G^6 , especially following the fact that G^6 oxygen is specified as hydrogen-bond acceptor (HBA, green spheres). The interactions of rutin and rosmarinic acid are additionally explained by the recognition of corresponding electrostatic features. Thus, regarding the rutin, the pharmacophore model describes electrostatic interaction (NC, red spheres) between two hydroxyl groups at positions C-4 and C-5 of β -D-glucopyranose and guanine O^6 oxygen. In the case of rosmarinic acid, electrostatic interaction between the hydroxyl group at position 3 of 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid and guanine O^6 oxygen is described by the negative charge features (NC), while the

attraction between the 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid carboxyl group and guanine amino group at position 1 is seen through the corresponding negative (NC) and positive charge (PC, yellow sphere) features, respectively.

In general, analogous mechanism of antigenotoxic activity as described for guanine is concluded upon the inquest of docked conformations of myricetin (Fig. 8A), quercetin (Fig. 8B), rutin (Fig. 8C), and rosmarinic acid (Fig. 8D) within the thymine region.

In bound conformations of myricetin (Fig. 8A) and quercetin (Fig. 8B), the hydroxyl group of B ring is the reaction centre involved in hydrogen bonding with thymine O^4 oxygen atom. By this bond thymine is hereinafter protected from any mutagenic effect of EMS molecule. In particular, hydroxyl group portion of myricetin donates a strong hydrogen bond ($d = 1.764$ Å). The quercetin hydroxyl group is narrower to thymine ($d = 1.760$ Å) resulting in the low increment of hydrogen bond strength, by comparing the two compounds. Further inspection of the spatial arrangement revealed particularities in the myricetin/quercetin-thymine interactions. Thus, the bioactive conformations of myricetin and quercetin are superimposed one to another but while interacting with thymine they do not occupy spatial region that is filled up with EMS in the stage before the alkylation. They are in fact positioned below the nucleotide. Accordingly, blocking of EMS approach near the target residue is not necessary for the protection of thymine residue, and, therefore, DNA defence is demonstrated only through the formation of hydrogen bond with B ring hydroxyl group. This simply means that the formation of crucial hydrogen bond is dependless on relative flavonoid conformation, *i.e.* it will be formed irrespective whether or not myricetin or quercetin occupy region filled up with EMS. This remarkable conclusion puts a new light on the overall mechanism of antigenotoxic activity of myricetin and quercetin in which the formation of hydrogen bond is enough for the protection of both

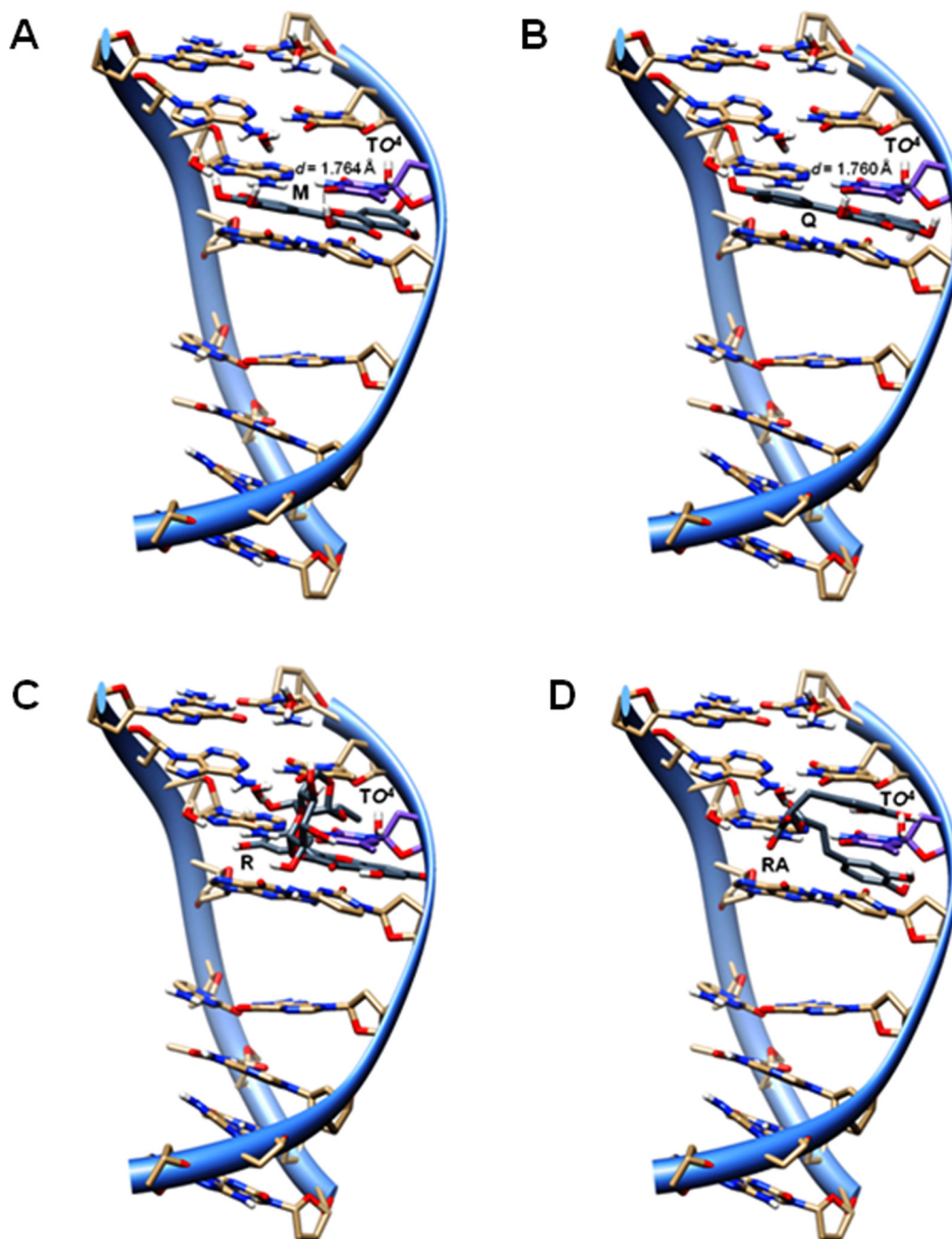


Fig. 8. The bioactive conformations of (A) myricetin, (B) quercetin, (C) rutin, and (D) rosmarinic acid during prevention of thymine alkylation. (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

guanine and thymine while additional interference of EMS interaction with DNA is desirable but not a decisive factor for the activity. The complete flavonoid core of both myricetin and quercetin is as for guanine placed in almost parallel orientation related to the thymine residue. Flavonoid geometries are in great manner conditioned by the interaction with complementary base adenine where mutual *m*-OH group of C ring forms electrostatic interactions with the NH_2 group at position C-6 of adenine, while shared *p*-OH groups are electrostatically bonded to the nitrogen at position 9. The C ring is also involved in hydrophobic interactions with pyrimidine ring inside the purine core of adenine. Both myricetin and quercetin traverse horizontally DNA double helix. The binding energies of myricetin and quercetin amount $E = -10.25$ kcal/mol and $E = -10.14$ kcal/mol, respectively, which suggests that the interaction with thymine occurs easily. The lower

value of binding energy of myricetin and quercetin in comparison with EMS is the additional contribution to the protective role of compounds, making their substitution by EMS and new thymine alkylation energetically less favourable.

The rutin interference with thymine is accompanied with the fact that the EMS entrance into the binding site is physically restricted by the rutinose moiety, *i.e.* disaccharide occupies equivalent position to that of EMS which is found in the thymine O^4 domain (Fig. 8C). As a reminder, the EMS positioning near guanine is prevented by rutin flavonoid core. This difference still does not have a particular influence on rutin mode of action. Since the B ring hydroxyl group is substituted with sugar residue, it cannot be involved in hydrogen bonding with thymine O^4 oxygen and rutin antigenotoxic activity is related only with the prevention of further EMS binding to DNA. Thus, the complete thymine moiety

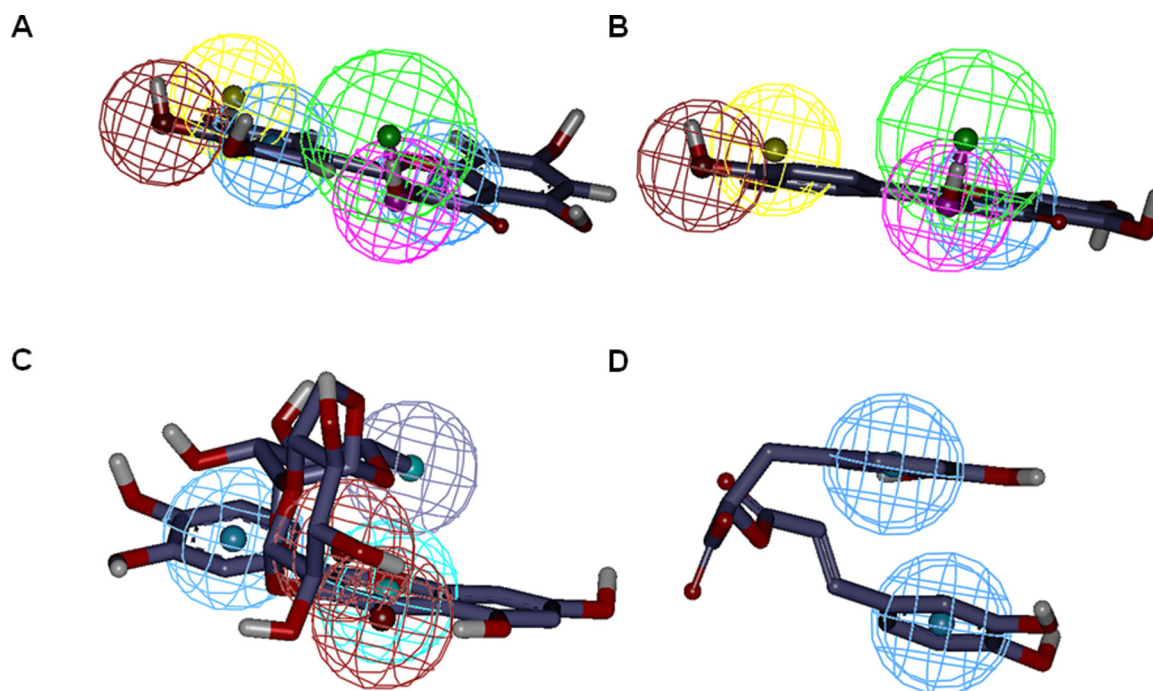


Fig. 9. The 3-D pharmacophore models aligned against bioactive conformations of (A) myricetin, (B) quercetin, (C) rutin, and (D) rosmarinic acid as inhibitors of thymine alkylation. The pharmacophore features are colour coded; green: hydrogen-bond acceptor, magenta: hydrogen-bond donor, blue: hydrophobic aromatic, dark blue: hydrophobic aliphatic, yellow: positive charge, red: negative charge (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

is trapped within rutin molecule, the natural compound carbon skeleton rounds nucleotide and makes the impermeable barrier for the alkylation agent. Interactions that support rutin activity are listed. The presence of rutinose moiety forces in-plane rotation of flavonoid core towards the inside of DNA double helix for 45° , measured by the position of B ring carbonyl group of quercetin and rutin, and also quantified by rmsd of 3.141 Å. Due to this shift there is a strong electrostatic bonding between the outlined carbonyl rutin group and O^4 atom of thymine. The thymine purine ring is parallel with the B ring. The sandwich-like conformation is formed since the glycoside bond ($C_{\text{flavonoid}}-O-C_{\text{rutinose}}$ angle = 87.42°) completes the spatial pocket around TO^4 . As a consequence of such spatial arrangement rutinose scaffold is positioned normal to flavonoid core. The β -D-glucopyranose lies ahead of thymine O^4 while α -L-rhamnopyranose is suited up above the nucleotide, where the methyl group of sugar moiety is in direct contact with thymine C-2 carbon. There are no significant electrostatic interactions between the rutinose and thymine. The binding energy of rutin amounts $E = -11.43$ kcal/mol, emphasizing the extreme level of DNA protection by the molecule.

The antigenotoxic activity of rosmarinic acid (Fig. 8D) is reflected in a way that two constituting fragments, caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid, are integrated below and above the thymine region, respectively. This particular conformation has a relevant effect on the prevention of further EMS binding. The 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid invade the EMS binding space, while carbon linker of two phenyl rings is a spatial gate that forbids the access towards the O^4 atom portion of thymine moiety. In the same time this conformational bridge does not establish any interaction with the target oxygen atom. The first phenyl ring that originates from caffeic acid forms weak hydrophobic interactions with nucleotide methyl group while the second ring is bonded to thymine core. The binding energy of such tight conformation amounts $E = -8.22$ kcal/mol thus confirming the antigenotoxic potential of compound.

The enclosure of antigenotoxic activity on thymine level is completed by taking into account the generated corresponding 3-D

pharmacophores (Fig. 9). Beside the mandatory hydrophobic interactions of B flavonoid ring, the importance of the formation of hydrogen bond between the myricetin (Fig. 9A), quercetin (Fig. 9B) and TO^4 for the protection of thymine is shown by corresponding hydrogen-bond donor features placed on hydroxyl group of B ring. Some additional electrostatic interactions related to complementary helix were included in the pharmacophoric model of myricetin but they are not common feature for both flavonoids. The rutin pharmacophore (Fig. 9C), related with the protection of thymine, emphasizes the importance of electrostatic interactions around thymine O^4 . The hydrophobic aromatic and hydrophobic aliphatic (HAL, dark blue spheres) interactions provide spatial arrangement of rutin around the thymine moiety. Rosmarinic acid protects thymine mainly due to the establishment of hydrophobic aromatic features (Fig. 9D).

The general conclusion is that tested compounds provide DNA protection against EMS-induced alkylation in two different ways: myricetin and quercetin establish crucial hydrogen bond with O^6 or O^4 atom of guanine and thymine (Fig. 10A and C), respectively, while rutin and rosmarinic acid physically prevent (Fig. 10B and D) the EMS interference with DNA. All compounds are exceptional antigenotoxic agents. Furthermore, the discovered rule by which myricetin and quercetin exert antigenotoxic activity by protecting the nucleotide trough the formation of the hydrogen bond can be most certainly applied on other similar flavanols, flavonols, flavanonols, and even anthocyanidins since they all contain the hydroxyl group within the B ring. Stilbens and chalcones will demonstrate their activity similarly to rosmarinic acid or rutin.

4. Discussion

The aim of the present study was to evaluate the ability of four selected phenolic compounds to modulate the DNA damage induced by the alkylation with EMS in *D. melanogaster* males using the SLRL test. This *in vivo* model is often used to study genotoxic and antigenotoxic properties of various compounds and mixtures

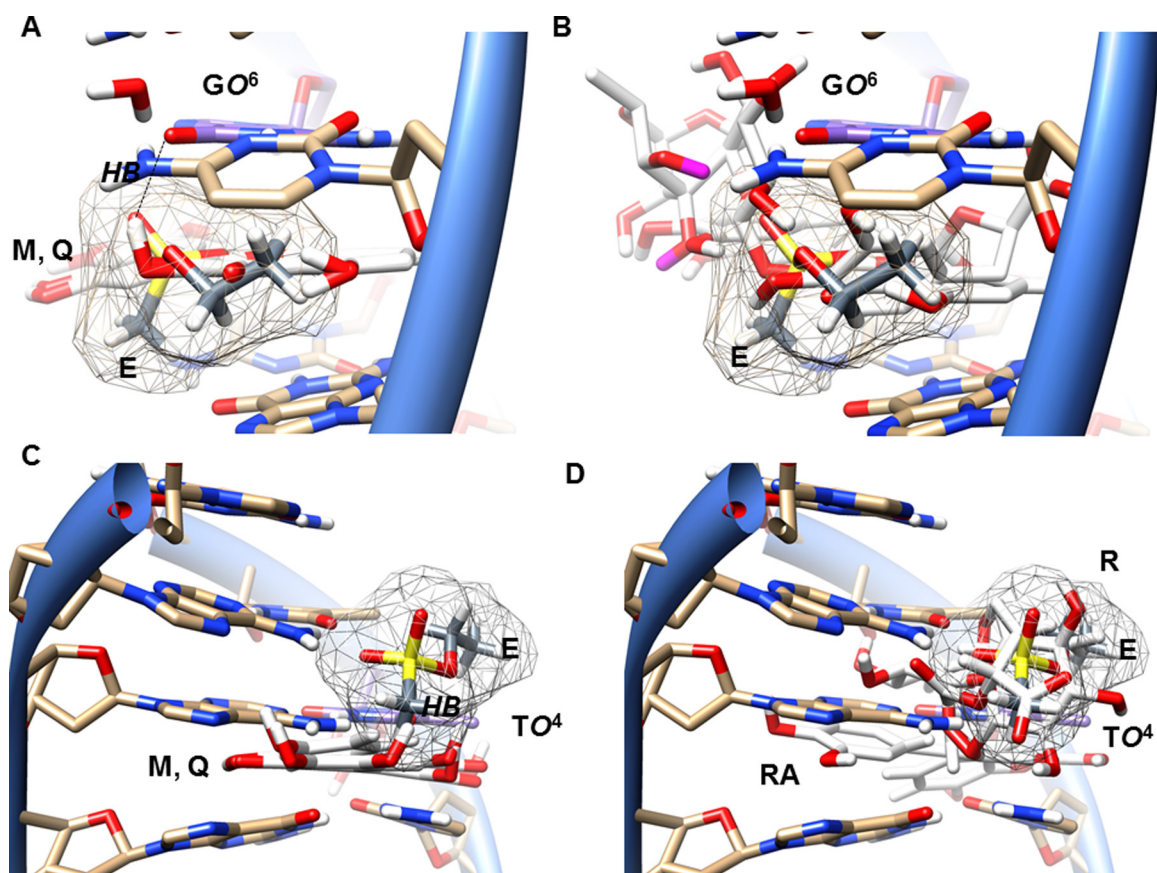


Fig. 10. The imagined superimposition of EMS with myricetin and quercetin in guanine (A) and thymine (C) region, and of EMS with rutin and rosmarinic acid in guanine (B) and (D) thymine region, presented in side view, that shows virtual spatial interactions between the compounds. The EMS molecule is encircled with mesh surface while natural compounds are depicted in white. Picture abbreviations: EMS (E), myricetin (M), quercetin (Q), rutin (R), rosmarinic acid (RA), and hydrogen bond (HB). (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

[39,69]. The similarity of metabolic pathways between *Drosophila* and mammals makes the results of this test widely applicable and gives the possibility to utilize active compounds in the prevention and treatment of human health [62].

It is well known that the germ-cell stages differ in sensitivity to potential mutagens and promutagens [40], and that chemical mutagens often exhibit stage specificity, *i.e.* show more or less pronounced mutagenic effects at different stages in germ-cell development. Therefore, it is essential to analyse the progeny from treated spermatozooids, late and early spermatids, and spermatoocytes. An important feature of SLRL test is that the treated males are successively mated with marker stock females, so the effect of selected phenolic compounds on frequency of mutations is assayed at each of the germ-line stages [40]. According to the test procedure, cells were exposed in successive spermatogenetic stages (three broods): the first brood gives the effect of treated postmeiotic stages, spermatozooids, the second brood on spermatids, and the third brood reveals the effect of the tested agents on the premeiotic stage (spermatoocytes).

The DNA damage is accumulated in cells over time as a result of the exposure to a variety of exogenous and endogenous agents. This damage, if not repaired properly, can generate mutations in somatic or germ-line cells, which are involved in the pathogenesis of many diseases [70]. Considering the continuous human exposure to genotoxic agents from different sources [71], such as alkylating agents, the prevention of DNA damage and modulation of DNA repair by dietary phytochemicals represents a relevant contribution for human health.

Epidemiological studies as well as laboratory data strongly suggest that long term consumption of diets rich in plant

polyphenols reduced risk of developing a wide range of diseases. Flavonoids are present in almost all dietary and medicinal plants consumed by humans, including tea, fruits, vegetables, and wine. Myricetin is widely distributed in berries, fruit, vegetables, and medicinal herbs. This flavanols found in grapes [72], guava, black tea, broccoli, cabbage, green and red chilli, bell pepper, garlic, bean, and peas [73]. Quercetin is found in a variety of foods including capers, apples, tea, red grapes, onions [74], leafy green vegetables, citrus fruits, cherries, raspberries, green and black tea [75]. Rutin is found in many vegetables and fruits, such as buckwheat [76], asparagus, red pepper, chillies pepper, cherry, aronia, grape seeds, green tea [77], citrus fruits, berries, apricot [78], red apples and their peels, black currants, and cantaloupe [79]. Rosmarinic acid, found in oregano [80], sage [81], lemon balm, marjoram, wild mint, hyssop, comfrey and in high concentration in rosemary [82].

Alkylating agents represent the largest group of cancer chemotherapeutic agents that play an important role in the treatment of several types of cancers [83]. Despite the progress made in the development of potent chemotherapy drugs, their toxicity to normal tissues and adverse side effects in multiple organ systems have remained the major obstacles for the successful clinical use. Supplementing or supporting the body with natural phytochemicals cannot only reduce adverse side effects but also improve the effectiveness of chemotherapeutics. Dietary agents may play an important role in chemotherapy when they used in combination with alkylating agents. Different natural compounds can improve efficiency of chemotherapeutic agents, decrease the resistance of chemotherapeutic drugs, lower and alleviate the adverse side effects of chemotherapy, and detoxify the body of chemotherapeutics. Therefore, it is recommended that diet

of cancer patients treated with chemotherapy should be rich in herbal constituents (including quercetin, kaempferol, naringenin, silymarin, catechins), fruits and berries (e.g., grapefruit, orange, apricot, strawberry), and spices (mint, rosemary, curcumin, garlic, ginseng, piper nigrum, onion) [84].

Alkylating agents are able to react with nucleotides by attacking their nucleophilic sites (N and O atoms within the structure) which results in covalent binding with DNA. They can cause a wide spectrum of DNA adducts, including *N*-alkylated ones, like *N*⁷-methylguanine (*N*⁷MeG), *N*³-methyladenine (*N*³MeA), and *N*³-methylguanine (*N*³MeG), as well as *O*-alkylated adducts, such as *O*⁶-methylguanine (*O*⁶MeG) and *O*⁴-methylthymine (*O*⁴MeT). The *N*-alkylated adducts comprise more than 80% of alkylated bases and exhibit different stabilities, while *O*-alkylated adducts correspond to less than 10% of total alkylated bases. In general, *O*-alkylations are highly mutagenic and genotoxic, whereas *N*-alkylations are cytotoxic, but less mutagenic [85,86].

To assess the protective effects of selected phenolic compounds against DNA damage induced by the alkylation, EMS, a direct alkylating agent, was used. EMS is a monofunctional electrophilic alkylating agent that has been found to be mutagenic in a wide variety of genetic test systems. It mainly induces single-base changes (point mutations), which disrupt gene function by causing missense or nonsense mutations [87]. This alkylating agent is not incorporated into the DNA, but instead alters the existing bases, causing specific mispairing. EMS is able to produce significant levels of alkylation at *O*⁶ oxygen atom of guanine, by forming the abnormal base *O*⁶-ethylguanine [88], as well as at the position 4 of thymine, after which *O*⁴-ethylthymine is generated [89]. On the other side, other alkylating agents such as *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), methyl methanesulfonate (MMS), and methyl-lexitropsin (Me-lex), are all monofunctional agents and their activity is related to the transfer of methyl group towards target nucleotides. In that manner, the reparation of methyl lesion is going to be performed according to the mechanism that is already known [50], so their mutagenic potential was not considered in this study. Since EMS induces *O*-alkylations, their prevention and repair are of extreme importance. Therefore, our efforts were directed towards the discovery of compounds acting like powerful antimutagens that are going to prevent the formation of *O*-lesions.

The present work demonstrates that all tested phenolic compounds (myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid), in described experimental conditions, possess protective effects against damage DNA induced by EMS alkylation. Results show clear induction of harmful effects on DNA and demonstrate that those effects can be reduced by the post-treatment with selected compounds. A post-treatment revealed that all compounds drastically reduced the frequency of sex-linked recessive lethal mutations induced by EMS towards the negative control value, with high significance at each of the germ-line stages: spermatoids-spermatids-spermatocytes ($p < 0.001^{***}$).

To the best of our knowledge, no study so far evaluated the capacity of myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid to prevent the DNA damage induced by the alkylation with EMS using the SLRL test. Only several studies have been reported genotoxic activity of flavonoid and phenolic acid using the same *Drosophila* assay. MacGregor and Curd [90] and Watson [91] reported that quercetin and kaempferol increase the frequency of sex-linked recessive mutations in *D. melanogaster* SLRL test. In our previous study gallic acid in concentration of 5% was shown to be clearly genotoxic, inducing significant increases in the frequency of mutants in both post-meiotic (spermatids and spermatozooids) and pre-meiotic (spermatocytes) germ-cell lines of the eukaryotic species *D. melanogaster* [92]. The wing spot test of *D. melanogaster* was used to evaluate the genotoxicity and antigenotoxicity of the

three phenols, protocatechuic acid, apigenin, and bisabolol, that did not exhibit any genotoxic effect [93]. Flavonoids kaempferol, quercetin, and quercetin 3 β -*D*-glycoside were investigated for genotoxicity using the wing somatic mutation and recombination test (SMART). The data obtained in this study showed that the tested flavonoids did not induce somatic mutations or recombination in *D. melanogaster* [94].

The exploration of interactions between the EMS and DNA on molecular level on one side, and naturally occurring aromatic compounds and DNA on the other, revealed the mechanisms of frequency reductions of sex-linked recessive lethal mutations. Thus, antigenotoxic activity of myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid depends on co-operation with AGT enzyme that accepts the ethyl group from *O*⁶-ethylguanine and *O*⁴-ethylthymine, respectively, and neutralizes EMS harmful effect at the first stage. By the comparison with available co-crystallized structure that described the *O*⁶-methylguanine dealkylation by AGT, and molecular docking study that presented the potential for *O*⁴-methylthymine dealkylation by the same enzyme, we have demonstrated that AGT can successfully recognize *O*⁶-ethylguanine and *O*⁴-ethylthymine as lesions and that may perform dealkylation of residues. By using molecular docking technique, we have concluded that there is a high level of probability for recognition, since *O*⁶-ethylguanine and *O*⁴-ethylthymine establish the same crucial interactions within the AGT active site as their template analogues. Successful dealkylation of EMS induced lesions is a necessary condition for the post-treatment with aromatic compounds. Only when damaged nucleotides are correctly repaired, myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid can express their antigenotoxic potential. To elucidate the mechanism of antigenotoxic action of four selected phenolic compounds we performed another molecular docking study. According to the results, compounds can be separated into two sub-groups due to their DNA protective mode. Thus, myricetin and quercetin form the crucial strong hydrogen bonds with *O*⁶ oxygen of guanine and *O*⁴ oxygen of thymine via the mutual ring B hydroxyl group. In that way, they prevent further modification of oxygen atoms in the sense of receiving EMS ethyl group. The strength of the hydrogen bonds governs the level of nucleotides protection established by aromatic compounds. Since all the measured lengths are below the 2.5 Å, the strength of the formed hydrogen bonds is nearly equal to the strength of covalent bond [95], suggesting that bonds formed between the myricetin and quercetin and nucleotides cannot be easily broken and that the protection of nucleotides is assured. The extreme importance of this hydrogen-bond formation was confirmed by 3-D pharmacophore models containing hydrogen-bond donor features of reactive flavonoid hydroxyl group. Another factor, spatial restriction of EMS interference with DNA caused by conformation of myricetin and quercetin is desirable but not a decisive. But, this physical prevention of EMS–DNA interaction is in fact the mode of action for rutin and rosmarinic acid, since those molecules round the guanine and thymine residues and make an impermeable barrier for the EMS molecule. Rutin and rosmarinic acid are inserted around guanine and thymine by favour of hydrophobic and electrostatic interactions, which are often considered as the most important ones in any ligand–receptor binding [96] since they actually provide strong conformational stabilization. Therefore, both compounds are “sealed” for nucleotides and establish barrier that cannot be overcome by EMS.

5. Conclusion

Our results showed that rutin, quercetin, myricetin, and rosmarinic acid are able to protect DNA from alkylating damage induced by EMS. Upon the successful dealkylation of lesions,

myricetin and quercetin donate hydrogen bond to repaired oxygen atoms to protect the DNA from further alkylation, while rutin and rosmarinic acid restrict EMS approach to DNA. This protective effect of the selected phenolic compounds against DNA damage induced by EMS, well-established chemical mutagen, suggests an important biological activity for these compounds, which can contribute to human health through diet.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgement

This study was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grants No. III43004 and III41010.

References

- [1] Barth SW, Fährdrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, et al. Cloudy apple juice decreases DNA damage hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 2005;26:1414–21.
- [2] Edenharter R, Frangart J, Hager M, Hofmann P, Rauscher R. Protective effects of fruits and vegetables against *in vivo* clastogenicity of cyclophosphamide or benzo[a]pyrene in mice. *Food Chem Toxicol* 1998;36:637–45.
- [3] Bravo L. Polyphenols: chemistry dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56:317–33.
- [4] Harborne JB, Williams CA. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* 2000;55:481–504.
- [5] Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1140–6.
- [6] Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, et al. Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. *Mutat Res* 2008;654:38–44.
- [7] Cai Q, Rahn RO, Zhang R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* 1997;119:99–107.
- [8] Dipti KP, Sharma SK, Sairam M, Ilavazhagan G, Sawhney RC, Banerjee PK. Flavonoids protect U-937 macrophages against tert-butylhydroperoxide induced oxidative injury. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1024–30.
- [9] Ramos AA, Pereira-Wilson C, Collins AR. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutat Res* 2010;692:6–11.
- [10] Silva J, Hermann SM, Heuser W, Marroni N, González-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2002;40:941–7.
- [11] Soares VCG, Varanda EA, Raddi MCG. *In vitro* basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chem Toxicol* 2006;44:835–8.
- [12] Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* 1996;104:193–6.
- [13] Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biol Med* 2000;29:375–83.
- [14] Silva ID, Gaspar J, Rodrigues A, Gomes da Costa G, Laires A, Rueff J. Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: involvement of radical species. *Teratogen Carcin Mut* 1996;16:253–68.
- [15] Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res* 1997;393(3):223–31.
- [16] Haza AI, Coto AL, Morales P. Comparison of the ability of myricetin and quercetin to modulate the oxidative DNA damage induced by heterocyclic amines. *Food Nutr Sci* 2011;2:356–65.
- [17] Das A, Wang JH, Lien EJ. Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Prog Drug Res* 1994;42:133–66.
- [18] Ramos AA, Lima CF, Pereira ML, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicol Lett* 2008;177:66–73.
- [19] O'Brien NM, Woods JA, Aherne SA, O'Callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans* 2000;28:22–6.
- [20] Barcelos GRM, Grotto D, Angeli JPF, Serpeloni JM, Rocha BA, Bastos JK, et al. Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. *Phytother Res* 2011;25:1381–8.
- [21] Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* 1996;57:43–6.
- [22] Marcarini JC, Tsuboy MSF, Luiz RC, Ribeiro LR, Hoffmann-Campo CB, Mantovani MS. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Toxicol Pathol* 2011;63(5):459–65.
- [23] Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673–751.
- [24] Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies^{1–4}. *Am J Clin Nutr* 2005;81:243S–255S.
- [25] Maistro EL, Angeli JP, Andrade SF, Mantovani MS. *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. *Genet Mol Res* 2011;10(2):1130–40.
- [26] El Hajjouji H, Pinelli E, Guisresse M, Merlina G, Revel JC, Hafidi M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat Res* 2007;634:25–31.
- [27] Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology* 2008;250:109–15.
- [28] Dubois M, Bailly F, Mbemba G, Mouscadet JF, Debysse Z, Witvrouw M, et al. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitro-rosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. *J Med Chem* 2008;51:2575–9.
- [29] Vatted DA, Jang HD, Levin R, Shetty K. Synergism of cranberry phenolics with ellagic acid and rosmarinic acid for antimutagenic and DNA protection functions. *J Food Biochem* 2006;30:98–116.
- [30] Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, Acevedo C, et al. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J Agric Food Chem* 2006;54:2064–8.
- [31] Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol* 2009;47:386–92.
- [32] De Oliveira NC, Sarmento MS, Nunes EA, Porto CM, Rosa DP, Bona SR, et al. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food Chem Toxicol* 2012;50:1208–14.
- [33] Furtado RA, de Araújo FR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J Appl Toxicol* 2010;30:254–9.
- [34] Pereira P, Tysca D, Oliveira P, da Silva Brum LF, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res* 2005;52:199–203.
- [35] Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *An introduction to genetic analysis*. 7th ed. New York: W. H. Freeman; 2000.
- [36] Lewis EB, Bacher F. Method of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros Inf Serv* 1968;43:193.
- [37] Chandramohan S, Anand T, Abirami L, Divya KS, Jagan G, Dinakar S. Synthesis and characterization of some novel trans-cyclohexanol derivatives. *Int J Pharm Sci Health Care* 2012;2:87–97.
- [38] Takimoto CH, Calvo E. Principles of oncologic pharmacotherapy. In: Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ, editors. *Cancer management: a multidisciplinary approach*. Lawrence, KS: CMPMedica; 2008. p. 23–42.
- [39] Matic S, Stanić S, Solujić S, Mladenović M, Mihailović V. *In vivo* antigenotoxic potential and possible mechanism of action of selected 4-hydroxy-2H-chromen-2-one derivatives. *J Biochem Mol Toxicol* 2012;26:322–30.
- [40] Würgler FE, Graf U. Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster*. In: Muhammed A, Von Borster RC, editors. *Basic and applied mutagenesis*. New York: Plenum Press; 1985. p. 343–72.
- [41] Lall S. X chromosome exposé. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:794.
- [42] Petz B. Basic statistical method for non-mathematical use. Croatia: SNL Zagreb; 1985.
- [43] Lian C, Robinson H, Wang AHJ. Structure of actinomycin D bound with (GAAGCTC)₂ and (GATGCTC)₂ and its binding to the (CAG)_n-(CTG)_n triplet sequence by NMR analysis. *J Am Chem Soc* 1996;118:8791–801.
- [44] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25(13):1605–12.
- [45] Case DA, Darden TA, Cheatham III TE, Simmerling C, Wang J, Duke RE, et al. AMBER, vol. 12. San Francisco: University of California; 2012.
- [46] Pal SK, Zhao L, Zewail AH. Water at DNA surfaces: ultrafast dynamics in minor groove recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8113–8.
- [47] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30:2785–91.
- [48] Mohamadi F, Richards N, Guida W, Liskamp R, Lipton M, Caulfield C, et al. MacroModel—an integrated software system for modelling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J Comput Chem* 1990;11:440–67.
- [49] Wibley JEA, Pegg AE, Moody PCE. Crystal structure of the human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2000;28:393–401.
- [50] Daniels DS, Woo TT, Luu KX, Noll DM, Clarke ND, Pegg AE, et al. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(8):714–20.
- [51] Daniels DS, Mol CD, Arvai AS, Kanugula S, Pegg AE, Tainer JA. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J* 2000;19:1719–30.

- [52] Bender K, Federwisch M, Loggen U, Nehls P, Rajewsky MF. Binding and repair of *O*⁶-ethylguanine in double-stranded oligodeoxynucleotides by recombinant human *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase do not exhibit significant dependence on sequence context. *Nucleic Acids Res* 1996;24(11):2087–124.
- [53] Engelbergs J, Thomale J, Galhoff A, Rajewsky MF. Fast repair of *O*⁶-ethylguanine, but not *O*⁶-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(4):1635–40.
- [54] Duguid EM, Rice PA, He C. The structure of the human AGT protein bound to DNA and its implications for damage detection. *J Mol Biol* 2005;350:657–66.
- [55] Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 2000;6:909–19.
- [56] Alguel Y, Meng C, Terán W, Krell T, Ramos JL, Gallegos MT, et al. Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J Mol Biol* 2007;369(3):829–40.
- [57] Komoto J, Yamada T, Watanabe K, Takusagawa F. Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry* 2004;43:2188–98.
- [58] Dos Santos JI, Cardoso FF, Soares AM, Dal Pai Silva M, Gallacci M, Fontes MR. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. *PLoS One* 2011;6(12):e28521.
- [59] Ragno R, Simeoni S, Rotili D, Caroli A, Botta G, Brosch G, et al. Class II-selective histone deacetylase inhibitors. Part 2: alignment-independent GRIND 3-D QSAR, homology and docking studies. *Eur J Med Chem* 2008;43:621–32.
- [60] Wolber G, Langer T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J Chem Inf Model* 2005;45(1):160–9.
- [61] Accelrys Software Inc.. Discovery studio modeling environment, release 3.5. San Diego: Accelrys Software Inc.; 2012.
- [62] Apidianakis Y, Rahme LG. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis Model Mech* 2011;4(1):21–30.
- [63] Fang Q, Kanugula S, Tubbs JL, Tainer JA, Pegg AE. Repair of *O*⁶-alkylthymine by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *J Biol Chem* 2010;285:8185–95.
- [64] Preston BD, Singer B, Loeb LA. Mutagenic potential of *O*⁴-methylthymine *in vivo* determined by an enzymatic approach to site-specific mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(22):8501–5.
- [65] Tubbs JL, Pegg AE, Tainer JA. DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:1100–15.
- [66] Duguid EM, Mishina Y, He C. How do DNA repair proteins locate potential base lesions? A chemical crosslinking method to investigate *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Chem Biol* 2003;10:827–35.
- [67] Dossanjh MK, Essigmann JM, Goodman MF, Singer B. Comparative efficiency of forming m4T.cntdot.G versus m4T.cntdot.A base pairs at a unique site by use of *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) and *Drosophila melanogaster* polymerase .alpha.-primase complex. *Biochemistry* 1990;29:4698–703.
- [68] Kooistra R, Zonneveld JB, Watson AJ, Margison GP, Lohman PH, Pastink A. Identification and characterisation of the *Drosophila melanogaster* *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase cDNA. *Nucleic Acids Res* 1999;27(8):1795–801.
- [69] Stanić S, Matic S, Delić G, Mihailović M, Bogojević D, Solujić S. Study of genotoxicity and antigenotoxicity of the *Cotinus coggygria* Scop. methanol extract by *Drosophila melanogaster* sex-linked recessive lethal test. *Russ J Genet* 2011;47:770–4.
- [70] De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004;19:169–85.
- [71] Povey AC. DNA adducts: endogenous and induced. *Toxicol Pathol* 2000;28:405–14.
- [72] Maggiolini M, Recchia AG, Bonofiglio D, Catalano S, Vivacqua A, Carpino A, et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2005;35(2):269–81.
- [73] Miesan KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem* 2001;49(6):3106–12.
- [74] Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2004;52:4360–7.
- [75] Wascher AR. A cancer prevention guide for the human race. Indianapolis, IN, USA: Dog Ear Publishing; 2010.
- [76] Sikora E, Cieřlik E, Topolska K. The sources of natural antioxidants. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2008;7(1):5–17.
- [77] Atanassova M, Bagdassarian V. Rutin content in plant productions. *J Chem Technol Metall* 2009;44:201–3.
- [78] Stojković D, Petrović J, Soković M, Glamočlija J, Kukić-Marković J, Petrović S. *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid, and rutin, using food systems. *J Sci Food Agric* 2013 (ahead of Print).
- [79] Vainio H, Bianchini F. Fruits and vegetables. Lyon: France International Agency for Research on Cancer; 2003.
- [80] Exarchou V, Godejohann M, Van Beek TA, Gerothanassis IP, Vervoort J. LC-UV-solids-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. *Anal Chem* 2003;75:6288–94.
- [81] Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 2001;49:5165–70.
- [82] Ibanez E, Kubatova A, Senorans FJ, Cervero S, Regiero G, Hawthorn SB. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem* 2003;51:375–82.
- [83] Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1346–60.
- [84] Bansal T, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. *J Pharm Pharm Sci* 2009;12:46–78.
- [85] Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1389–407.
- [86] Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids* 2010;2010:543531.
- [87] Johnston DS. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 2002;3:176–88.
- [88] Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:1155–60.
- [89] Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. Modern genetic analysis. New York: W. H. Freeman; 1999.
- [90] MacGregor JT, Curd L. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1979;54:297.
- [91] Watson WAF. The mutagenic activity of quercetin and kaempferol in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1982;103:145–7.
- [92] Stanić S, Matic S, Solujić S, Milošević T. Genotoxicity testing of the methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* and gallic acid on *Drosophila melanogaster*. *Arch Biol Sci* 2009;61(2):261–6.
- [93] Anter J, Romero-Jiménez M, Fernández-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Analla M, Alonso-Moraga A, et al. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J Med Food* 2011;14(3):276–83.
- [94] Sotibrán ANC, Ordaz-Téllez MG, Rodríguez-Arnaiz R. Flavonoids and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 2011;726(1):60–5.
- [95] Jeffrey GA. An introduction to hydrogen bonding. New York: Oxford University Press, USA; 1997.
- [96] Patrick GL. An introduction to medicinal chemistry. 4th ed. New York: Oxford University Press, USA; 2009.



Short Communication

Genotoxic potential of *Cotinus coggygria* Scop. (Anacardiaceae) stem extract *in vivo*

Sanja Matic¹, Snezana Stanic¹, Desanka Bogojevic², Slavica Solujic³, Nevena Grdovic², Melita Vidakovic² and Mirjana Mihailovic²

¹Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia.

²Department of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Serbia.

³Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia.

Abstract

The intention was to evaluate the possible *in vivo* genotoxic potential in different cell-types, of a methanol extract obtained from the plant stem of *Cotinus coggygria* Scop., using the sex-linked recessive lethal (or SLRL) test and alkaline comet assay. The SLRL test, revealed the genotoxic effect of this extract in postmeiotic and premeiotic germ-cell lines. The comet assay was carried out on rat liver and bone marrow at 24 and 72 h after intraperitoneal administration. For genotoxic evaluation, three concentrations of the extract were tested, viz., 500, 1000 and 2000 mg/kg body weight (bw), based on the solubility limit of the extract in saline. Comet tail moment and total scores in the group treated with 500 mg/kg bw, 24 and 72 h after treatment, were not significantly different from the control group, whereas in the groups of animals, under the same conditions, but with 1000 and 2000 mg/kg bw of the extract, scores were statistically so. A slight decrease in the comet score and tail moment observed in all the doses in the 72 h treatment, gave to understand that DNA damage induced by *Cotinus coggygria* extract decreased with time. The results of both tests revealed the genotoxic effect of *Cotinus coggygria* under our experimental conditions.

Key words: comet assay, *Cotinus coggygria*, extract, genotoxic effect, SLRL.

Received: July 7, 2010; Accepted: November 12, 2010.

Many plant extracts have been used as sources of medicinal agents, in the cure of urinary tract infections, cervicitis vaginitis, gastrointestinal disorders, respiratory diseases, cutaneous affections, helminthic infections and inflammatory processes (Brantner and Grein, 1994; Meyer *et al.*, 1996). Nevertheless, of late, the safeness of their use has been questioned in view of the reports of illness and fatalities (Stewart *et al.*, 1999; Ernst, 2002; Veiga-Junior *et al.*, 2005). Considering the complexity of herbs in general and their inherent biological variation, it is now necessary to evaluate their safety, efficacy and quality (WHO, 2002).

Cotinus coggygria is one of two species constituting a minor genus of the family Anacardiaceae, viz., *Cotinus coggygria* Scop. (syn.: *Rhus cotinus* L.) itself and *Cotinus obovatus* Raf., the American smoketree. Its wide distribution extends from southern Europe, the Mediterranean, Moldova and the Caucasus, to central China and the Himalayas (Novakovic *et al.*, 2007). Plants of the family Anacardiaceae have a long history of use by various peoples for medicinal and other purposes. *Rhus glabra* is traditionally used in the treatment of bacterial diseases such as

syphilis, gonorrhoea, dysentery and gangrene, while *R. coriaria*, besides its common use as a spice consisting of ground dried fruits with salt, is also widely used as a medicinal herb, particularly for wound healing (Rayne and Mazza, 2007). In folk medicine, *Cotinus coggygria* is routinely used as an antiseptic, anti-inflammatory, antimicrobial and antihemorrhagic agent in wound-healing (Demirci *et al.*, 2003), as well as for countering diarrhea, parodontosis, and gastric and duodenal ulcers (Ivanova *et al.*, 2005).

This study was undertaken with the aim of determining, by way of SLRL testing and comet assay, the *in vivo* genotoxic effects of acute administration of a *Cotinus coggygria* stem extract on different models of eukaryotic organisms.

Cotinus coggygria plants were collected at a place called Rujiste, in the Rogozna mountain, in northern Kosovo, during the period May to June 2007. The species was identified and a voucher specimen (16178, BEOU) deposited at the Department of Botany, the Faculty of Biology, University of Belgrade. The extract was obtained, first by breaking air-dried stem (1.157 g) into small pieces (2-6 mm) with a cylindrical crusher, and then by applying the Soxhlet procedure using methanol (500 mL) as solvent. The extract, first filtered through a paper filter (Whatman,

No. 1), was then evaporated so as to remove the solvent. The residue (32 g) was stored in a dark glass bottle for further processing.

The sex-linked recessive lethal test for mutagenicity (SLRL test) was carried out with laboratory stocks of *Drosophila melanogaster* (obtained from the Umea Stock Centre, Sweden). The stocks were maintained and all experiments performed under optimal conditions (25 °C, 60% relative humidity and a 12/12 h light/dark regime) on a standard nutritive medium for *Drosophila*, (corn flour, yeast, agar, sugar and nipagin to prevent the occurrence of mould and infections).

Three-to-four-days-old wild type males of *Drosophila melanogaster* (test group 1, N = 30) were left to starve in empty bottles for 5 h and then transferred and exposed to a 1% sucrose (as negative control), according to the method of Lewis and Bacher (1968). The second group (test group 2, N = 15) was treated with 0.75 ppm ethyl-methane sulfonate (EMS) in 1% sucrose (positive control). The third group (test group 3, N = 15) was treated with a 5% plant extract dissolved in sucrose. After 24 h of treatment and a further 24 h resting on fresh medium, males were individually mated to two-to-five-days-old virgin *Basc* females (brood I). The males were then remated in fresh vials with three other virgin *Basc* females at two-to-three-days intervals (brood II), so as to test all germ-cell stages for the presence of mutations. Once again, the males were then transferred to fresh vials containing three *Basc* virgins (brood III). These males remained with the females for three days, to then be removed. The females were left alone for five days to lay eggs, and then removed. When the F₁ flies emerged, brother-sister mating was allowed, whereupon ten pairs from each progeny were individually placed together, from the same number. The F₂ generation was examined for the presence or absence of wild-type males. It was noted that, when this was so, these all contained the same treated X-chromosome in hemizygous condition. Any recessive lethal therein would be expressed before the adult stage, whereat males would not emerge. Cells exposed in successive spermatogenesis stages were tested for induced mutations, to thus check the effects on postmeiotic (spermatozoa, spermatids), meiotic (spermatocytes) and premeiotic (spermatogonia) cells (Würgler and Graf, 1985).

Two to two-and-half-months-old male albino rats of the Wistar strain (*Rattus norvegicus*), each weighing 220-250 g, were used for the comet assay. The rats were kept in an experimental room under controlled conditions of temperature and humidity, with food and water available *ad libitum*. Lighting was controlled to provide 12 h artificial light followed by 12 h darkness. All animal procedures had been previously approved by the Ethical Animal Care and Use Committee of the Institute for Biological Research, Belgrade, which acts in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by

the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85/23, revised 1986).

In order to evaluate the genotoxicity of the *Cotinus coggygia* stem extract, rats were divided into four groups of five animals each. For three of the groups, each received (i.p.) a single dose of different concentrations of extract dissolved in saline solution: 500, 1000 and 2000 mg/kg bw. These concentrations were based on the solubility limit of the methanol extract of *Cotinus coggygia* in saline solution. The fourth group (control), received a saline solution. Four separate experiments were carried out. The animals were sacrificed by decapitation 24 and 72 h after treatment. Liver and femur bone marrow, obtained from each group of animals, was quickly removed and separately processed, so as to obtain cell suspensions.

The alkaline version of the comet assay was carried out by the standard procedure originally described by Singh *et al.* (1988). Immediately prior to analysis, the slides were stained with 90 µL of SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich, S 9430). Comets were visualized and captured with the 40x objective lens of a Leica DMLB fluorescence microscope, attached to a CCD camera. One hundred comet images per slide were randomly captured and analyzed. The extent of DNA damage was measured by means of two complementary methods, the tail moment quantitative method and a qualitative method of damage distribution. Comets, first analyzed by the visual scoring method, as described by Collins (2004), were then classified into five categories, defined as types 0, 1, 2, 3 and 4, where 0 indicates no or very low damage, and 1, 2 and 3 low, medium and long DNA migration, respectively, with 4 as the highest level of degradation, viz., comets with very small heads and long tails. The total score was calculated by the following equation modified from Manoharan and Banerjee (1985): (% cells in class 0 x 0) + (% cells in class 1 x 1) + (% cells in class 2 x 2) + (% cells in class 3 x 3) + (% cells in class 4 x 4), to finally appear in a 0 (all undamaged) to 400 (all maximally damaged) range. Images were analyzed with software TriTekCometScore Freeware v1.5 available at web page AutoComet.com.

For SLRL testing, the frequency of sex-linked recessive lethal cultures was calculated according to the ratio between the numbers of lethal cultures and the total number of treated X-chromosomes. The total number of treated X-chromosomes is equal to the sum of lethal and non-lethal cultures. The significance of percentual differences in lethal cultures was arrived at by testing for large independent samples, and then testing the difference between proportions (Petz, 1985). For comet analysis, average tail moment and standard deviation per treatment were obtained. Variance analysis was performed by using one-way analysis (ANOVA). Variance homogeneity and data distribution were determined with the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Post-hoc comparison between control and treated groups was performed with a T3 Dunnett or

Bonferroni test when variance was not homogeneous. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical software package, version 10.0 for Windows. The results were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

From a phytomedicinal point of view, the evaluation of genotoxicity is of particular importance, since the genotoxic effects of chemicals or complex mixtures may be crucially important at the population level.

In the present study, the genotoxic effect of a *Cotinus coggygria* extract was observed via SLRL test and comet assay using *Drosophila melanogaster* as an insect and Wistar rats as a mammal model.

Various mechanisms are involved in this form of genotoxicity testing. Essentially, the SLRL test is used for detecting the occurrence of mutations, both point mutations and small deletions, in the germ line. Mutations in the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* are phenotypically expressed (presence or absence of white-eyed) in males carrying the mutant gene. The sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster* has been proved to be an excellent screening test for the detection of natural plant mutagens (Stanic *et al.*, 2008). Over several decades, *Drosophila* has been widely used as an insect model, due to its well-elucidated genetics and developmental biology. In the present study, the genotoxicity of a methanol extract of *Cotinus coggygria* was examined, using a short test for the detection of mutagenicity under *in vivo* conditions. The frequency of germinative mutations induced by the *Cotinus coggygria* extract in SLRL test is significantly higher than that induced by sucrose as negative control (Table 1), this being a clear indication of its mutagenic effect. Ethylmethane sulfonate in a concentration of 0.75 ppm was shown to be clearly genotoxic, by inducing significant increases in the frequency of mutants in all the three broods. On the other hand, and in comparison, the *Cotinus*

coggygria extract induced recessive lethal X-linked mutations in premeiotic germinative cell lines, *i.e.* spermatozooids and others of this line, as well as spermatocytes, while spermatids proved to be more resistant to the genotoxic effects of the extract.

Over the last decade, *in vivo* alkaline comet assay, besides gaining widespread use in various areas, has emerged as a standard tool in the pharmaceutical industry for assessing the safety of new drugs and, increasingly, as a means of evaluating genotoxicity testing (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2001; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005). In the present study we evaluated the extent of DNA damage by determining average tail moment and by analyzing qualitative tail length distribution in comet images. In the liver sample from animals treated with 500 mg/kg bw of the extract, no statistically significant difference in total score between treated animals and control was observed at 24 and 72 h after treatment (Table 2). Most of the comets remained undamaged, with only a few cells denoting minor damage (class 1), and less still medium (class 2). However, this was not the case with animals treated with 1000 and 2000 mg/kg, where significant differences were noted (Table 2). In the case of rats exposed to 1000 mg/kg bw, this was apparent in comet tails being longer (classes 3 and 4) when compared to the control group. The highest level of DNA damage was observed in the group treated with 2000 mg/kg bw of the extract after 24 and 72 h.

The percentage of comets assigned to damage categories in bone marrow, at 24 and 72 h after *in vivo* exposure to 500 mg/kg bw of the extract, are presented in Table 3. With a predominance of comet class 0 and almost no presence of classes 1 and 2, no statistically significant difference between treated and untreated animals could be observed. Under the same circumstances, this was not the case in the groups treated with 1000 and 2000 mg/kg bw of the extract,

Table 1 - Frequencies of SLRL mutations after treatment of *Drosophila melanogaster* males with a methanol extract from *Cotinus coggygria* plants

	Sucrose negative control	EMS positive control	<i>Cotinus coggygria</i> extract	$t_{\text{sucrose/EMS}}$	$t_{\text{sucrose/extract}}$	$t_{\text{EMS/extract}}$
I broods S	300	221	269	9.51	5.45	5.26
No of lethals	5	73	34	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
% of lethals	1.67	33.03	12.64			
II brood S	269	161	284	8.38	2.57	7.04
No of lethals	5	54	17	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.05^*$	$p < 0.001^{***}$
% of lethals	1.86	33.54	5.99			
III broods S	252	117	252	5.85	5.72	1.92
No of lethals	6	30	43	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.1$
% of lethals	2.38	25.64	17.06			
I+II+III S	821	499	805	13.81	8.15	7.92
No of lethals	16	157	94	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
% of lethal	1.95	31.46	11.67			

Statistically significant difference: $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$

Table 2 - DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Cotinus coggygria* extract in the livers of albino wistar rats, 24 and 72 h after treatment.

Treatments	Levels of damage					Total score (mean \pm SD)
	0	1	2	3	4	
Negative control	84.1 \pm 1.32	10.6 \pm 0.40	6.30 \pm 0.3	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	23.20 \pm 1.10
<i>C. coggygria</i> 24 h						
500 mg/kg	78.8 \pm 0.42	15.6 \pm 0.44	5.60 \pm 0.16	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	26.80 \pm 2.30
1000 mg/kg	43.8 \pm 0.33	32.8 \pm 0.20	17.7 \pm 0.40	4.70 \pm 0.40	1.00 \pm 0.21	86.30 \pm 0.83*
2000 mg/kg	27.2 \pm 0.26	38.8 \pm 0.34	25.7 \pm 0.39	6.10 \pm 0.19	2.01 \pm 0.21	116.50 \pm 1.14*
<i>C. coggygria</i> 72 h						
500 mg/kg	81.0 \pm 0.84	13.4 \pm 0.16	5.70 \pm 0.84	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	24.80 \pm 0.45
1000 mg/kg	41.6 \pm 0.26	45.0 \pm 0.42	10.1 \pm 0.18	3.10 \pm 0.24	0.00 \pm 0.00	74.50 \pm 1.14*
2000 mg/kg	30.4 \pm 0.32	47.2 \pm 0.35	16.6 \pm 0.37	2.90 \pm 0.24	1.03 \pm 0.25	92.10 \pm 1.22*

*Significantly different from the negative control $p < 0.05$.

Table 3 - DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Cotinus coggygria* extract in bone marrow of albino wistar rats, 24 and 72 h after treatment.

Treatments	Levels of damage					Total score (mean \pm SD)
	0	1	2	3	4	
Negative control	79.8 \pm 0.41	20.2 \pm 0.35	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	21.0 \pm 1.60
<i>C. coggygria</i> 24 h						
500 mg/kg	76.4 \pm 0.48	20.4 \pm 0.43	3.20 \pm 1.51	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	26.8 \pm 0.24
1000 mg/kg	31.1 \pm 0.41	40.2 \pm 0.28	19.8 \pm 0.38	7.40 \pm 0.36	1.50 \pm 0.47	108.0 \pm 0.65*
2000 mg/kg	27.4 \pm 0.48	32.1 \pm 0.27	30.2 \pm 0.33	6.60 \pm 0.20	3.80 \pm 0.42	127.5 \pm 0.43*
<i>C. coggygria</i> 72 h						
500 mg/kg	72.2 \pm 0.58	27.7 \pm 0.47	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	25.2 \pm 1.90
1000 mg/kg	42.3 \pm 0.42	47.3 \pm 0.43	8.70 \pm 0.40	1.90 \pm 0.42	0.00 \pm 0.00	70.4 \pm 1.50*
2000 mg/kg	27.2 \pm 0.40	49.5 \pm 0.45	19.10 \pm 0.2	3.20 \pm 0.23	1.01 \pm 0.26	101.3 \pm 3.60*

*Significantly different from the negative control $p < 0.05$.

where there was a significant increase in damages, when compared to the control group.

The average values of comet tail moment in liver and bone marrow are shown in Table 4. Comet tail moment in the group treated with 500 mg/kg bw of the extract was not significantly different from the control group. Nevertheless, when compared to the control, there was a significant increase in tail moment at both 24 and 72 h after treatments with 1000 and 2000 mg/kg bw. It should be pointed out, however, that after 72 h, a slight decrease in tail moment, both in the liver and bone marrow, was detected when compared to the 24 h time point.

This difference in the response seen in the comet assay and SLRL test is not surprising, since the comet assay is a rapid, simple and highly sensitive method for detecting single and double DNA strand breaks and alkali-labile sites. In contrast, the comet assay is not used to detect muta-

tions, but rather to detect genomic lesions that could lead to a mutation (Gontijo and Tice, 2003).

The fact that certain plants may have genotoxic effects depends on the various compounds present in their extracts. The partial chemical analysis of the methanol extract of *Cotinus coggygria*, showed flavonoids, tannins and phenolic compounds to be the main compounds (Stanic *et al.*, 2009). In a previous study, total soluble phenolic compounds in the methanol extract of *Cotinus coggygria* stems were determined with the Folin-Ciocalteu reagent, using pyrocatechol as a standard. In the methanol extract of *C. coggygria* (1 g), 62.50 mg pyrocatechol equivalent of phenols was detected, while 46.76 mg of flavonoids and 15.75 mg of nonflavonoids were detected in 1 g of dry weight (Stanic *et al.*, 2009).

Fractionation of the methanol extract from *Cotinus coggygria* performed by Stathopoulou *et al.* (2007), led to the isolation of sulfuretin, fisetin, 7,3',4'-trihydroxy-fla-

Table 4 - Average comet tail moment and standard deviation, 24 and 72 h after *in vivo* exposure of albino wistar rats to *Cotinus coggygria* methanol extract.

Treatments	Tail moment - liver		Tail moment - bone marrow	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Negative control	2.7 ± 0.2		5.4 ± 0.25	
<i>C. coggygria</i>				
500 mg/kg	3.1 ± 0.11	2.8 ± 0.16	5.80 ± 0.17	5.6 ± 0.12
1000 mg/kg	11.7 ± 0.13 ^a	6.7 ± 0.15 ^a	16.55 ± 0.43 ^a	13.8 ± 0.40 ^a
2000 mg/kg	17.1 ± 0.38 ^a	9.6 ± 0.32 ^a	20.80 ± 0.63 ^a	17.5 ± 0.36 ^a

^aSignificantly different from the negative control $p < 0.05$ (multiple comparisons T3 Dunnett test), $n = 5$ rats per group.

vanone, 5,7,4'-trihydroxy-flavanone, 4,2',4'-trihydroxy-chalcone, 2,3-dihydro-fisetin, 2,3-dihydro-quercetin, methyl gallate, 3,4,2',4'-tetrahydroxy-chalcone, quercetin, 4',7-dihydroxy-flavanone and 4',7-dihydroxy-2,3-dihydroflavonol. Dominant compounds in the ethyl acetate partition of *Cotinus coggygria* were disulfuretin, sulfuretin, sulfurein, gallic acid, methyl gallate and pentagalloyl glucose (Westenburg *et al.*, 2000).

It has been suggested that polyphenolic compounds, besides having been shown to exert anticarcinogenic effects, are potential preventives against cardiovascular and cerebrovascular diseases. Gallic acid and its derivatives are biologically active compounds which are present in several plants. This polyhydroxyphenolic acid has been reported to be a free radical scavenger, as well as an inducer of differentiation and apoptosis in leukemia, lung cancer, colon adenocarcinoma cell lines, and normal lymphocyte cells (Kawada *et al.*, 2001; Sohi *et al.*, 2003).

Flavonoids, such as fisetin, are naturally occurring molecules with antioxidant, cytoprotective and anti-inflammatory actions. Tannins, as one such class of compounds, are suspected of possessing protective properties. Fedeli *et al.* (2004) showed that they are capable of protecting against DNA breakage at low concentrations, although at high levels they could be genotoxic.

The results in this study imply that the methanol extract from *Cotinus coggygria* plant stems is capable of giving rise to genotoxic effects *in vivo* under our experimental conditions, thereby indicating caution in its use. The fact that 500 mg/kg body weight of the *Cotinus* extract was not genotoxic in the alkaline comet assay, and that the manifest antigenotoxic activity might be attributed to the presence of polyphenolic constituents, indicates that further studies are required, in order to evaluate antigenotoxic activity *in vivo*, and to isolate these constituents and decipher their mode of action.

Acknowledgments

This study was financially supported by grants n. 143008 and n. 143002 from the Serbian Ministry of Science.

References

- Brantner A and Grein E (1994) Antibacterial activity of plant extract used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 44:35-40.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S and Speit G (2005) The *in vivo* comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20:245-254.
- Collins AR (2004) Comet assay for DNA damage and repair: Principles applications and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261.
- Demirci B, Demirci F and Baser KH (2003) Composition of the essential oil of *Cotinus coggygria* (Scop.) from Turkey. *Flavour Fragr J* 18:43-44.
- Ernst E (2002) Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Trends Pharmacol Sci* 23:136-139.
- Fedeli D, Berrettini M, Gabryelak T and Falcioni G (2004) The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutat Res* 563:89-96.
- Gontijo AMMC and Tice R (2003) Comet Assay: Detection of DNA damage and DNA repair in individual cells. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF and Marques EK (eds) *Mutagenese Ambiental*. ULBRA Inc, Canoas, pp 247-275.
- Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus HJ, Fjällman A, Friauff W and Suter W (2001) Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: Comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 39:843-858.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T and Yankova T (2005) Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 96:145-150.
- Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuugetu H and Asai T (2001) Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 12:847-852.
- Lewis EB and Bacher F (1968) Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Inf Service* 48:193.
- Manoharan K and Banerjee MR (1985) β -carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol Int Rep* 9:783-789.
- Meyer JJM, Afolayan AJ, Taylor MB and Engelbrecht L (1996) Inhibition of herpes simplex virus type 1 by aqueous extract from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 52:41-43.
- Novakovic M, VuCkovic I, Janackovic P, Sokovic M, Tesevic V and Milosavljevic S (2007) Chemical composition, antibac-

- terial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygria* from Serbia. *J Serb Chem Soc* 72:1045-1051.
- Petz B (1985) *Basic Statistical Method for Non-mathematical Use*. SNL Zagreb, Croatia, 153 pp.
- Rayne S and Mazza G (2007) Biological activities of extracts from Sumac (*Rhus spp.*). *Plant Foods Hum Nutr* 62:165-175.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Sohi KK, Mittal N, Hundal MK and Khanduja KL (2003) Gallic acid, an antioxidant, exhibits anti apoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism. *J Nutr Sci Vitaminol* 49:221-227.
- Stanic S, Muratspahic-Pavlovic D, Solujic S, Comic LJ and Milosevic T (2008) Preliminary results on biological activity of pollen extract of *Ambrosia artemisiifolia* L. *J Biol Res* 9:45-53.
- Stanic S, Matic S, Solujic S and Milosevic T (2009) Genotoxicity testing of the methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* and gallic acid on *Drosophila melanogaster*. *Arch Biol Sci* 61:261-266.
- Stathopoulou K, Magitis P, Karapanagiotis I, Valianou L and Chrysosoulakis Y (2007) Phytochemical analysis of *Cotinus coggygria* heartwood. Identification of isolated colorants in historical art objects. *Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Austria, Planta Med*, pp 163.
- Stewart MJ, Moar JJ, Steenkamp P and Kokot M (1999) Findings in fatal cases of poisoning attributed to traditional remedies in South Africa. *Forensic Sci Int* 101:177-183.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000) The single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.
- Veiga-Junior VF, Pinto AC and Maciel MAM (2005) Medicinal plants: Safe cure? *Quim Nova* 28:519-528.
- Westenburg HE, Lee KJ, Lee SK, Fong HHS, Breemen RBV, Pezzuto JM and Kinghorn AD (2000) Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *C. coggygria*. *J Nat Prod* 63:1696-1698.
- Würgler FE and Graf U (1985) Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster*. In: Muhammed A and Von Borster RC (eds) *Basic and Applied Mutagenesis*. Plenum Press, New York, pp 343-372.

Internet Resources

- WHO (2002) *Drug Information Herbal Medicines*. v. 16. World Health Organization, Geneva.
<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4950e/> (July 22, 2008).

Associate Editor: Catarina S. Takahashi

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extract of the plant *Cotinus coggygia* Scop. attenuates pyrogallol-induced hepatic oxidative stress in Wistar rats

Sanja Matić, Snežana Stanić, Desanka Bogojević, Melita Vidaković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić, Svetlana Dinić, Aleksandra Uskoković, Goran Poznanović, Slavica Solujić, Milan Mladenović, Jelena Marković, and Mirjana Mihailović

Abstract: To examine the protective potential of the *Cotinus coggygia* Scop. methanol extract, Wistar rats were treated with the hepatotoxic compound pyrogallol, which possesses a potent ability to generate free radicals and induce oxidative stress. The ability of the extract to counteract the oxidative stress was examined in rats that were injected with the extract intraperitoneally (500 mg·(kg body weight)⁻¹) either 2 or 12 h before the pyrogallol treatment. The extract possesses a reducing activity in vitro and an ability to chelate the ferrous ion both in vivo and in vitro. Application of the extract prior to pyrogallol treatment led to a decrease in the levels of thiobarbituric acid-reactive substances, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase, increased activities of antioxidant enzymes and attenuation of DNA damage, as well as increased Akt activity and inhibition of NF-κB protein expression. Treatment with the extract 12 h prior to pyrogallol administration was more effective in suppressing pyrogallol-induced oxidative damage than the 2 h pretreatment. Extract administration promoted an increase in acute phase reactants haptoglobin and α₂-macroglobulin that was short of a full-fledged acute phase response. Administration of the extract considerably improved the markers of oxidative stress, thus revealing a potential hepatoprotective activity. Our results suggest that Akt activation, NF-κB inhibition, and induction of the acute phase play important roles in mediating hepatic protection by the extract. The greater effectiveness of the 12 h pretreatment with extract points to the important role that preconditioning assumes in improving resistance to subsequent exposure to oxidative stress.

Key words: Akt, *Cotinus coggygia*, hepatotoxicity, NF-κB, pyrogallol.

Résumé : Pour examiner le potentiel protecteur de l'extrait méthanolique *Cotinus coggygia* Scop., nous avons traité des rats Wistar avec le composé hépatotoxique pyrogallol, qui a une très forte capacité à produire des radicaux libres et à induire un stress oxydatif. Nous avons examiné la capacité de l'extrait à contrebalancer le stress oxydatif chez des rats, après une injection par voie intrapéritonéale (500 mg·(kg de poids corporel⁻¹)) soit 2 ou 12 h avant le traitement au pyrogallol. L'extrait possède une activité de réduction in vitro et une capacité de chélation de l'ion ferreux tant in vivo qu'in vitro. L'application de l'extrait avant le traitement au pyrogallol a mené à une diminution des taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique, aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase, augmenté les activités des enzymes antioxydantes et l'atténuation du dommage à l'ADN, et augmenté l'activité Akt et l'inhibition de l'expression de la protéine NF-κB. L'application 12 h avant l'administration de pyrogallol a supprimé plus efficacement le dommage oxydatif induit par le pyrogallol que le prétraitement de 2 h. L'administration de l'extrait a favorisé une augmentation des protéines de phase aiguë, Hp et α₂M, sans véritable réponse de phase aiguë. Elle a aussi considérablement amélioré les marqueurs de stress oxydatif, révélant ainsi une activité hépatoprotectrice potentielle. Nos résultats donnent à penser que l'activation d'Akt, l'inhibition de NF-κB et l'induction de phase aiguë jouent des rôles importants dans la protection hépatique induite par l'extrait. La plus grande efficacité du prétraitement de 12 h souligne le rôle essentiel du préconditionnement dans l'augmentation de la résistance à une exposition subséquente à un stress oxydatif.

Mots-clés : Akt, *Cotinus coggygia*, hépatotoxicité, NF-κB, pyrogallol.

[Traduit par la Rédaction]

Received 31 January 2011. Accepted 6 June 2011. Published at www.nrcresearchpress.com/cjpp on 19 July 2011.

S. Matić and S. Stanić. Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia.
D. Bogojević, M. Vidaković, N. Grdović, J. Arambašić, S. Dinić, A. Uskoković, G. Poznanović, J. Marković, and M. Mihailović. Department of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Serbia.
S. Solujić and M. Mladenović. Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia.

Corresponding author: Sanja Matić (e-mail: msmaticsanja@yahoo.com).

Introduction

The past two decades have witnessed a tremendous resurgence in interest and analysis of different plants and plant extracts for their potential medicinal qualities. Of the many bioactive properties, the ability of a plant preparation to exert antioxidant and related effects assumes a central place. This particular feature is seen as capable of attenuating complications associated with a variety of inflammatory diseases, improving defences against exposure to xenobiotics, irradiation, and even delaying tumour development. The antioxidant activity of an applied substance, seen as its ability to inhibit the generation of free radicals and either directly or indirectly improve their clearance rate, is important in providing protection against hepatic damage. Many plant extracts have been shown to possess a hepatoprotective property that is to a greater or lesser extent accomplished through an improvement of antioxidant status (Chang et al. 2008; Esmaeili et al. 2009).

The plant *Cotinus coggygria* Scop. belongs to the family Anacardiaceae. It is commonly used in folk medicine for the treatment of various illnesses, such as diarrhoea, paradontosis, and gastric and duodenal ulcers (Ivanova et al. 2005), while the dried leaves and twigs of *C. coggygria* are used in Chinese traditional medicine for their antipyretic properties (Huang 1999). Different parts of this plant have been subjected to pharmacological evaluation for their potential antihaemorrhagic, wound-healing, anti-inflammatory effects, as well as antimicrobial activity (Demirci et al. 2003). Phytochemical investigation of the plant has resulted in the isolation of gallic acid and their derivatives, methyl gallate and pentagalloyl glucose. In addition, 3 active auronones — sulfuretin, sulfurein, and disulfuretin — have been identified (Westenburg et al. 2000). The *in vivo* antioxidant activity of *C. coggygria*, the focus of our present work, has not been addressed before.

To prevent damage by oxygen free radicals, the liver and other tissues have developed a highly complex protection system essentially consisting of 3 main groups of antioxidants. The primary antioxidants that constitute the first line of defence work by preventing the formation of new free-radical species and include the superoxide dismutase (SOD) enzymes, a sensitive index of hepatocellular damage; catalase (CAT), which is regarded as a major determinant of hepatic and cardiac antioxidant status (Manonmani et al. 2002); glutathione *S*-transferase (GST); as well as metal-binding proteins such as ferritin and ceruloplasmin. The secondary antioxidants trap radicals, thereby preventing chain reactions, and include the vitamins E and C, β -carotene, uric acid, bilirubin, and albumin, whereas the tertiary antioxidants repair biomolecules damaged by free radicals, notably DNA, the damage of which is one of the most deleterious effects of free radicals (Wang et al. 1998). Liver injury caused by pyrogallol is based on its potent ability to generate highly reactive free radicals and induce oxidative stress (Torii et al. 1994; Gupta et al. 2002; Upadhyay et al. 2008). Recently, a number of studies have shown that various herbal extracts protect against pyrogallol-induced oxidative stress by enhancing the decreased activities of SOD, CAT, and GST and by altering the levels of lipid peroxidation (Gupta et al. 2004; Joharapurkar et al. 2004; Upadhyay et al. 2007; Upadhyay et al. 2008).

Consequently, it can be expected that the level of DNA damage will be lower and the outlook for long-term liver damage better in proportion to the increase in effectiveness of the downstream lines of antioxidant defences.

NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor that functions as a sensor for oxidative stress and is rapidly induced after initial exposure (Martindale and Holbrook 2002). The role of NF- κ B in the transcriptional control of many inflammatory genes and the involvement of reactive oxygen species in its activation has made NF- κ B a preferred target for inhibition by various reagents. A large number of natural and synthetic compounds are currently being investigated for NF- κ B inhibitory activity (Surh et al. 2001; Takada et al. 2004; Lin et al. 2009). One of the most actively studied kinase pathways in basic research and drug development includes the serine–threonine kinase Akt, also known as protein kinase B. Activated Akt plays a key role in mediating signals for cell growth, cell survival, cell-cycle progression, differentiation, transcription, translation, and glucose metabolism (Kandel and Hay 1999).

This work was undertaken to assess the antioxidant potential of the *C. coggygria* methanol extract in a biological context against pyrogallol-induced toxic oxidative processes in Wistar rats. We examined the effect of extract administration on the markers of oxidative stress — the levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and the activities of antioxidant enzymes (SOD, MnSOD, CuZnSOD, CAT, and GST) — on the degree of DNA damage, the expression of hepatic NF- κ B and Akt, the effect of preconditioning by acute-phase proteins, as well as changes in aminotransferase levels, an established indicator of hepatic damage.

Materials and methods

Chemicals

Pyrogallol (CAS No. 254002-50), SYBR Green I (CAS No. S9430), thiobarbituric acid (TBA), and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, Mo., USA). All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Preparation of the extract of the stem of *Cotinus coggygria*

Cotinus coggygria plants were collected in southern Serbia (in the village of Rujište, Mt. Rogozna), in May–June 2007. The species was identified and the voucher specimen deposited (16178, BEOU) at the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade. The air-dried *C. coggygria* stem (1.2 kg) was broken into small pieces (2–6 mm) using a cylindrical crusher and extracted with methanol using a Soxhlet extractor. The extract was filtered through Whatman No. 1 filter paper and evaporated to dryness under vacuum to remove the solvent (methanol). The residue (32 g) was stored in a dark glass bottle until further processing.

Evaluation of antioxidant activities *in vitro*

Measurement of the reducing activity of the *Cotinus coggygria* extract

The reducing power of the plant extract was determined by the method of Oyaizu (1986). The *C. coggygria* extract

(0.3 mL) was mixed with 0.3 mL 1% potassium ferricyanide and 0.3 mL 200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.6). The mixture was placed in a water bath for 20 min at 50 °C. The resulting solution was cooled, mixed with 0.3 mL 10% trichloroacetic acid, and centrifuged at 1000g for 10 min. A 0.6 mL fraction from the supernatant was mixed with 0.12 mL 0.1% ferric chloride and 0.6 mL deionized water. Absorbance of the resulting mixture was measured at 700 nm after 10 min. The reducing activity of a cysteine solution was used as the standard. A higher absorbance value indicates a stronger reducing power. All the experiments were done in triplicate. The values are given as means \pm SD.

Measurement of ferrous ion chelating ability

The ferrous ion chelating ability of the *C. coggygia* extract was determined according to the method of Decker and Welch (1990). One millilitre samples of different dilutions of the extract were mixed with 3.7 mL methanol, 0.1 mL of 2 mmol/L FeCl₂ solution, and 0.2 mL of 5 mmol/L ferrozine solution. The absorbance at 562 nm was measured after 10 min. A lower absorbance indicates a stronger ferrous ion chelating ability. The ability to chelate the ferrous ion was calculated as follows:

$$\text{Chelating effect (\%)} = \frac{1 - \text{absorbance}_{\text{sample}}}{\text{absorbance}_{\text{control}}} \times 100\%$$

The ferrous ion chelating ability of an EDTA solution was used as the standard.

Evaluation of the biological effects of the *Cotinus coggygia* extract in vivo

Treatment of animals

Animal studies were approved by the Committee for Ethical Animal Care and Use of the Institute for Biological Research, Belgrade, which acts in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (Institute for Laboratory Animal Research 1996). Ten-week-old male albino Wistar rats weighing 220–250 g were used. The animals were maintained under standard laboratory conditions of constant temperature (24 \pm 1 °C), relative humidity (50% \pm 15%), 12 h light: 12 h dark cycle, and allowed free access to food and water.

Twenty-five rats were divided into 5 experimental groups, with 5 rats in each group. The first group of animals, referred to as the negative control, received only saline. The second experimental group received intraperitoneally 100 mg·(kg body weight)⁻¹ of pyrogallol dissolved in saline. The third experimental group received intraperitoneally a single dose of 500 mg·(kg body weight)⁻¹ of the *C. coggygia* extract 2 h before the pyrogallol injection and is referred to as the 2 h pretreated group. The fourth experimental group received intraperitoneally a single dose of 500 mg·(kg body weight)⁻¹ of the *C. coggygia* extract 12 h before the pyrogallol injection and is referred to as the 12 h pretreated group. As a follow-up to our previous study on the genotoxic effect of 3 doses (500, 1000, and 2000 mg·(kg body weight)⁻¹) of *C. coggygia* extract (Matić et al. 2011), here we studied only the dose of 500 mg·(kg body weight)⁻¹, which was found to display no genotoxic potential. The fifth experimental group

received intraperitoneally a single dose (500 mg·(kg body weight)⁻¹) of the *C. coggygia* extract dissolved in saline.

Three separate experiments were performed. The animals were killed by decapitation, and the livers were quickly removed and separated into 4 parts. One part was placed in an ice-cold buffer for analysis of antioxidant enzyme activities; one part was placed in 0.15 mol/L KCl for the TBARS assay; one part was used for the Comet assay; and another part was frozen in liquid nitrogen and subsequently used for protein immunoblotting. Blood samples were collected and allowed to clot for 45 min at room temperature and centrifuged at 2000g for 10 min at 4 °C in a Sorval SS-34 rotor (DJB Lab-ace Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, UK) to obtain the serum.

To measure acute phase (AP) protein levels in the serum and AP protein expression in the liver, 30 rats were divided into 6 groups, with 5 rats in each group. One group of rats received saline and served as the control. One group of rats received intraperitoneally 1 μ L·(g body weight)⁻¹ turpentine oil, causing a sterile-tissue injury and induction of the AP response. The remaining 4 groups of rats each received a single intraperitoneal injection of 500 mg·(kg body weight)⁻¹ of the *C. coggygia* extract. The animals were killed by decapitation at different times postinjection. The control and turpentine-treated groups were killed 24 h posttreatment, and the 4 *C. coggygia* extract-treated groups were killed 12, 24, 48, and 72 h posttreatment. Blood serum and liver were collected from each rat.

Determination of the serum iron content

The serum iron content was measured by the Ferrimat kit (bioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, France), which allows for the colorimetric determination of iron in the serum and plasma without deproteinization. The method is based on the dissociation of the ferric iron from its carrier protein, transferrin, in an acid medium and its reduction to the ferrous form. The ferrous iron then forms a coloured complex with the iron chelator ferrozine. The intensity of the colour, measured at 590 nm, is directly proportional to the iron concentration in the sample. The iron concentration in the experimental samples was determined by comparison of the optical density at 590 nm with the standard curve. Since the ferric iron in the sample is reduced to the ferrous iron, we measured the total iron concentration. To determine the concentration of the free ferrous iron (vs. total iron) in the serum, we conducted the same procedure as for total iron determination except that the reductant (hydroxylamine) was excluded from the assay procedure.

Determination of serum aminotransferases

Serum was used to estimate the hepatospecific markers aspartate aminotransferase (AST) (Bergmeyer et al. 1976) and alanine aminotransferase (ALT) (Bergmeyer 1980).

Thiobarbituric acid-reactive substance assay

The TBARS assay is based on the reaction of malondialdehyde with TBA at 95 °C. The level of TBARS was determined in liver homogenates and serum according to the method of Ohkawa et al. (1979). Briefly, 0.1 mL aliquots of the liver homogenates or serum were mixed with 0.2 mL of 8.1% SDS, 1.5 mL of 20% acetic acid (pH 3.5), 1.5 mL of

0.8% TBA, and 0.7 mL water and heated at 95 °C for 60 min. After cooling samples to room temperature, 1 mL of water and 5 mL of *n*-butanol–pyridine (15:1, *v/v*) were added, and the samples were mixed and centrifuged at 3000g for 10 min. The absorbance of the red colour in the supernatants was measured at 532 nm. A calibration curve was prepared with malondialdehyde as the standard (malondialdehyde concentrations ranged from 25 nmol/mL to 1 µmol/mL).

Estimation of antioxidant enzyme activities

About 200–400 mg of liver was excised and homogenized in 0.25 mol/L sucrose, 0.1 mol/L EDTA, and 0.05 mol/L Tris–HCl, pH 7.4. After sonification, the samples were centrifuged for 90 min at 100 000g in a Beckman Ti 50 rotor (Beckman Coulter, Inc., Miami, Fla., USA). Aliquots of the supernatants were stored at –80 °C. To express the antioxidant enzyme activities per milligram of protein, the protein concentrations were determined colorimetrically according to Lowry et al. (1951). Total SOD activity, based on the capacity of SOD to inhibit the autooxidation of epinephrine to adrenochrome (expressed as U·(mg of protein)⁻¹), was measured by the epinephrine method described by Misra and Fridovich (1972). Manganese SOD (MnSOD) activity was determined after preincubation with 8 mmol/L KCN. Copper–zinc SOD (CuZnSOD) activity was calculated from the difference between total SOD and MnSOD activities. CAT activity was measured by the rate of hydrogen peroxide decomposition and expressed as µmol H₂O₂·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (Beutler 1982). GST activity was determined by the method of Habig et al. (1974), which is based on the reaction of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with the -SH groups of glutathione catalyzed by GST and contained in the samples. The activity was expressed as nmol GSH·min⁻¹·(mg protein)⁻¹.

Determination of DNA damage by the alkaline Comet assay

The alkaline Comet assay was carried out according to the standard procedure originally described by Singh et al. (1988). The slides were stained with 90 µL of SYBR Green I before analysis. Comets were visualized and captured with a 40× objective lens of a fluorescence microscope (Leica DMLB, Meyer Instruments, Inc., Langham Creek, Houston, Tex., USA) with an attached charge-coupled device camera. One hundred comet images per slide were randomly captured. Comets without heads and those with almost all the DNA in the tail or with a very wide tail were excluded from the analysis, since they could represent dead cells. Only cells that did not overlap and had a clear margin surrounding them were scored (Hartmann and Speit 1997). Two parameters were considered to indicate DNA migration: tail length (distance from the head center to the end of the tail) and the percentage of DNA in the tail.

Western immunoblot analysis

About 200–400 mg of frozen rat liver tissue was homogenized at 4 °C in 2 mL ice-cold homogenization buffer (10 mmol/L Tris (pH 7.6), 1 mmol/L EDTA, 250 mmol/L sucrose) containing a mixture of protease inhibitors (Protease inhibitor, Mix G; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Samples were centrifuged at 9700g for 20 min at 4 °C in an Eppendorf centrifuge. Supernatants

were aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C. A 20 µg sample of whole-liver homogenate was loaded onto 4% stacking – 12% separating slab gels as described by Laemmli (1970). After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Schenectady, N.Y., USA). Western immunoblot analysis was performed according to the procedure of Towbin et al. (1979) using polyclonal antibodies to rat NF-κB p65, phosphorylated NF-κB p65 (Ser311) (pNF-κB), Akt 1/2/3, phosphorylated Akt 1/2/3 (Ser 473) (pAkt), α₂-macroglobulin (α₂M), tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA), and haptoglobin (Hp) (Sigma–Aldrich Inc., Milwaukee, Wis., USA). After incubation with blocking solution (0.05% Tween 20, 50 mmol/L Tris–HCl (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 3% nonfat condensed milk), the membranes were incubated with antibody for 2 h at room temperature. After rinsing, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h. Immunoreactive bands were identified by an enhanced chemiluminescence detection system (Santa Cruz Biotechnology) according to the manufacturer's instructions. The bands were visualized and quantified with TotalLab (Phoretix) electrophoresis software (v 1.10) relative to tubulin.

Measurement of acute-phase protein concentrations in the serum

The concentrations of Hp and α₂M were determined by rocket immunoelectrophoresis with anti-human Hp and α₂M antibodies (Sigma–Aldrich Inc., Milwaukee, Wis., USA) according to Laurell (1972). The method is based on the immunoprecipitation reaction between the antigen (Hp or α₂M) present in the serum and anti-Hp or anti-α₂M antibodies incorporated in the agarose gel at the points of their optimal concentration, characterized by the formation of immunoprecipitation peaks, or “rockets”. The concentration of the antigen in the serum is proportional to the area under the formed precipitation peak. The area was used to quantify the antigen in the serum, i.e., to determine its relative concentration. Every “rocket”, corresponding to the control and indicated times after turpentine injection, was drawn on tracing paper and the areas were integrated. The values obtained after quantification were expressed as the means ± SE from 3 separate experiments.

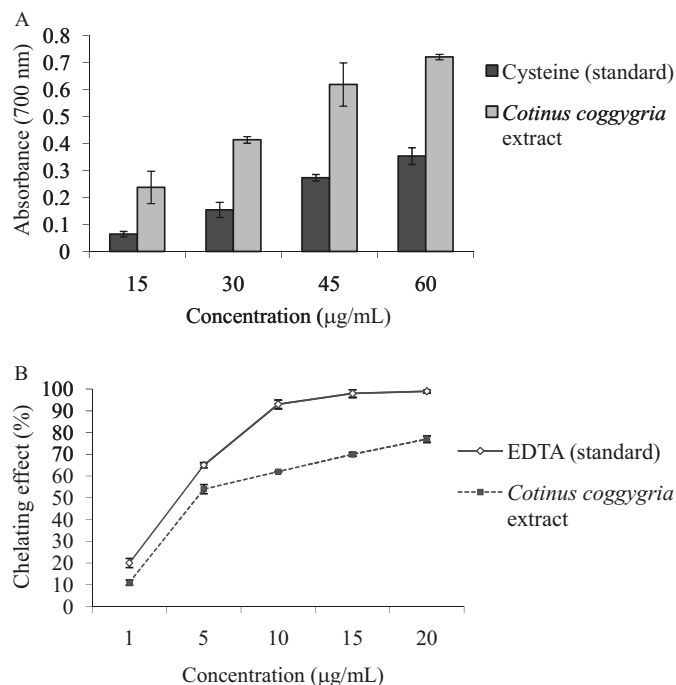
Statistical evaluations

Statistical evaluation of the data was performed by 1-way analysis (ANOVA). Variance homogeneity and data distribution were determined with the Levene and Kolmogorov–Smirnov tests, respectively. Post-hoc comparison between control and treated groups was performed with the T3 Dunnett's test or with the Bonferroni test when the variance was not homogeneous. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical software package, version 13.0 for Windows. The results were considered to be statistically significant at *p* < 0.05.

Results

In the present study we examined the capability of the methanol extract of the plant *C. coggygia* to counteract oxidative stress induced in Wistar rats by the administration of

Fig. 1. Reducing power (A) and ability to chelate ferrous ion (B) of increasing concentrations of *Cotinus coggygia* extract. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). Cysteine and EDTA were used as the standards.



pyrogallol, which causes liver injury through generation of highly reactive free radicals.

In vitro antioxidant potential of the *Cotinus coggygia* methanol extract

A fundamental property of the extract, its reducing power — which is expected to be of major importance to its antioxidant functioning in vivo — was examined. Its ability to transform the ferric to ferrous ion was compared with that of cysteine, which has marked antioxidant properties. As can be seen from Fig. 1A, the reducing power of the extract increased in a concentration-dependent manner and was consistently greater than that of cysteine, which was used as the standard. At 60 µg/mL, the extract exhibited an almost two-fold higher reducing power than cysteine. To elucidate the potential free-radical scavenging property of the *C. coggygia* extract, we examined its ability to chelate ferrous ion, a powerful hydroxyl radical promoting agent that can engage in lipid peroxidation, leading to organelle and cell damage. As shown in Fig. 1B, the ferrous chelating activity of the *C. coggygia* extract increased with increasing concentration up to 20 µg/mL, at which concentration the extract possessed a 78% chelating effect. EDTA was used as the standard.

Serum iron, thiobarbituric acid-reactive substances, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase contents

Iron is essential for many physiological processes; however, iron overload is toxic, since it leads to tissue damage through generation of reactive oxygen species. As can be seen from Table 1, the concentrations of total and ferrous iron in the serum were significantly increased (1.58- and 1.52-fold, respectively) after pyrogallol administration. In

comparison, administration of the *C. coggygia* extract before the pyrogallol treatment prevented the increase in serum iron: the total and ferrous iron concentrations in the serum were, respectively, 1.07- and 1.33-fold (in 2 h pretreated rats) and 1.05- and 1.15-fold (in 12 h pretreated rats) above the control values. Administration of the extract alone did not produce significant alterations in either total or ferrous iron concentrations in the serum.

The effect of extract administration was assessed by measuring the level of TBARS, which is considered to be a general indicator of oxidative stress (Armstrong and Browne 1994). One hour after treatment with pyrogallol, the serum level of TBARS was 1.81-fold above the basal value measured in the negative control. Administration of the extract prior to the pyrogallol treatment attenuated the rise in TBARS. After the 12 h pretreatment with the extract, a 1.19-fold increase in TBARS above the basal value was observed; this pretreatment was slightly more effective than the 2 h pretreatment after which a 1.43-fold increase was observed (Table 1). Administration of the extract alone did not induce a significant increase in TBARS.

Assessment of liver injury can be made by estimating the activities of serum AST and ALT, as they are the most sensitive markers employed in the diagnosis of hepatic damage. The hepatoprotective activity of the *C. coggygia* extract on pyrogallol-treated rats is shown in Table 1. Levels of the hepatic enzymes ALT and AST were significantly increased in the serum of pyrogallol-treated animals. The *C. coggygia* extract significantly reversed the pyrogallol-induced rise in the levels of AST and ALT when compared with rats treated with pyrogallol alone. The *C. coggygia* extract did not produce any significant alterations in the serum AST and ALT activities.

Levels of thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activities in the liver

Examination of the liver TBARS levels revealed its significant increase above the basal value (3.23-fold) after pyrogallol treatment and complete attenuation of this effect by both 2 and 12 h pretreatments with the *C. coggygia* extracts. Administration of the extract alone did not induce a rise in liver TBARS levels.

Antioxidant enzymes constitute the first line of defence against reactive oxygen species, and their activities represent important markers of the oxidative status of an organism. Results of the examination of liver antioxidant enzyme activities are presented in Table 2. Pyrogallol administration caused a decline of the total liver SOD activity to 71.38% of the basal value (relative to the negative control group, which was assumed to be 100% and as will be presented throughout this section). In animals pretreated with the *C. coggygia* extract 2 h before pyrogallol administration, the total SOD activity was 88.62% of the control level; however, when the extract was administered 12 h before the pyrogallol treatment, total SOD activity was practically unchanged at 96.51% of the basal value. The activity of MnSOD exhibited a sharp decrease to 49.15% of the basal level after pyrogallol administration, while in rats that were pretreated with the extract either 2 or 12 h before the pyrogallol treatment, MnSOD activity was at 81.81% and 92.73% of the basal level, respectively. A comparable effect on CuZnSOD activity was

Table 1. Total iron, free ferrous iron, TBARS, AST, and ALT contents in the serum of rats treated with *Cotinus coggygia* methanol extract and pyrogallol.

	Negative control	Pyrogallol, 100 mg·(kg BW) ⁻¹	<i>C. coggygia</i> extract 2 h prior to pyrogallol	<i>C. coggygia</i> extract 12 h prior to pyrogallol	<i>C. coggygia</i> extract, 500 mg·(kg BW) ⁻¹
Total iron, µg/dL	172.65±0.50	273.4±1.08*	184.8±0.43 [†]	181.1±0.40 [†]	173.6±1.70 [†]
Ferrous iron, µg/dL	52.33±0.23	79.7±0.30*	68.9±0.16 [†]	60.2±0.53 [†]	53.6±0.73 [†]
TBARS, nmol/mL	2.54±0.26	4.61±0.07*	3.63±0.12 [†]	3.02±0.05 [†]	2.61±1.03 [†]
AST, U/L	169.9±4.20	252.2±6.74*	192.5±1.41 [†]	171.6±5.51 [†]	37.08±2.47 [†]
ALT, U/L	39.4±0.91	93.6±0.86*	63.9±0.62 [†]	41.9±0.81 [†]	170.6±1.26 [†]

Note: The values are presented as the means ± SD obtained from 3 independent experiments. *n* = 25 rats; 5 rats/group. Rats were treated with saline (negative control), either with pyrogallol alone or with the *C. coggygia* methanol extracts 2 or 12 h before pyrogallol administration, as well as with the extract alone as indicated. BW, body weight; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

**p* < 0.05 when compared with the negative control group.

[†]*p* < 0.05 when compared with the pyrogallol group.

Table 2. The effects of the *Cotinus coggygia* extract on the levels of TBARS and activities of antioxidant enzymes in the liver of rats.

	Negative control	Pyrogallol, 100 mg·(kg BW) ⁻¹	<i>C. coggygia</i> extract 2 h prior to pyrogallol	<i>C. coggygia</i> extract 12 h prior to pyrogallol	<i>C. coggygia</i> extract, 500 mg·(kg BW) ⁻¹
TBARS, nmol/mg	1.35±0.12	4.37±1.04*	1.70±2.06 [†]	1.36±0.03 [†]	1.31±0.01 [†]
TotSOD, U·(mg protein) ⁻¹	54.5±0.31	38.9±0.32*	48.3±0.31 [†]	52.6±0.33 [†]	53.8±1.35 [†]
MnSOD, U·(mg protein) ⁻¹	16.5±0.24	8.11±0.07*	13.5±0.16 [†]	15.3±0.22 [†]	16.3±1.25 [†]
CuZnSOD, U·(mg protein) ⁻¹	36.3±0.24	22.7±0.60*	31.6±0.33 [†]	34.6±0.23 [†]	35.8±0.27 [†]
CAT, µmol H ₂ O ₂ ·min ⁻¹ ·(mg protein) ⁻¹	30.5±0.68	9.70±0.42*	14.5±0.27 [†]	24.9±0.25 [†]	27.7±0.27 [†]
GST, nmol·min ⁻¹ ·(mg protein) ⁻¹	533.4±2.21	429.1±2.90*	488.4±3.73 [†]	526.5±0.84 [†]	528.5±2.92 [†]

Note: Data are presented as the means ± SD obtained from 3 independent experiments. *n* = 25 rats; 5 rats/group. Rats were treated with saline (negative control), either with pyrogallol alone or with the *C. coggygia* methanol extracts 2 or 12 h before pyrogallol administration, as well as with the extract alone as indicated. BW, body weight; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; TotSOD, total superoxide dismutase; MnSOD, manganese SOD; CuZnSOD, copper–zinc SOD; CAT, catalase; GST, glutathione *S*-transferase.

**p* < 0.05 when compared with the negative control group.

[†]*p* < 0.05 when compared with the pyrogallol group.

Table 3. The effects of pyrogallol administration and pretreatment with *Cotinus coggygia* extract on the level of DNA damage in the liver of rats.

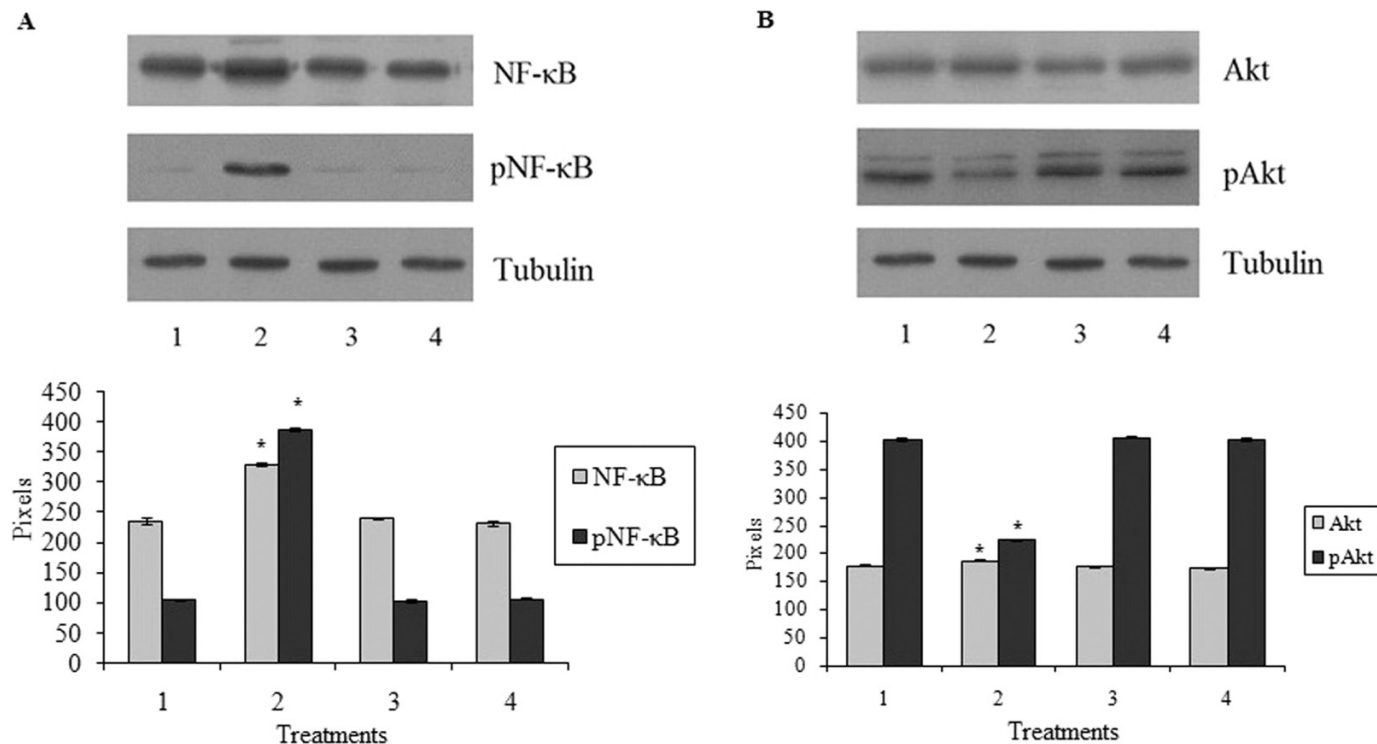
	Negative control	Pyrogallol, 100 mg·(kg BW) ⁻¹	<i>C. coggygia</i> extract 2 h prior to pyrogallol	<i>C. coggygia</i> extract 12 h prior to pyrogallol	<i>C. coggygia</i> extract, 500 mg·(kg BW) ⁻¹
% DNA in tail	7.43±0.26	51.3±1.01*	26.8±0.66 [†]	12.9±0.54 [†]	8.67±0.26 [†]
Tail length	12.8±0.25	105.2±2.01*	46.4±0.33 [†]	22.2±1.42 [†]	13.4±0.32 [†]

Note: Data are presented as the means ± SD obtained from 3 independent experiments. *n* = 25 rats; 5 rats/group. Rats were treated with saline (negative control), either with pyrogallol alone or with the *C. coggygia* methanol extracts 2 or 12 h before pyrogallol administration, as well as with the extract alone as indicated.

**p* < 0.05 when compared with the negative control group.

[†]*p* < 0.05 when compared with the pyrogallol group.

Fig. 2. The effects of the *Cotinus coggygia* extract before pyrogallol administration on the relative protein levels of NF- κ B (p65) (A) and Akt (B). Western blot analysis of the rat liver homogenate was performed with anti-NF- κ B p65 and antiphosphorylated NF- κ B p65 (pNF- κ B) antibodies (A) and with anti-Akt and antiphosphorylated Akt (pAkt) antibodies (B). Tubulin was used as the internal control. Lane 1: negative control; lane 2: pyrogallol treated; lane 3: pretreated with the *C. coggygia* extract 2 h before pyrogallol administration; lane 4: pretreated with the *C. coggygia* extract 12 h before pyrogallol administration. Western immunoblot analysis was performed using TotalLab (Phoretix) electrophoresis software (version 1.10) to quantify protein levels relative to tubulin levels and is presented on the graphs. The values are means \pm SE from 3 separate experiments. *, $p < 0.05$, statistically significant difference versus negative control.



observed: decreased activity (to 62.53% of the basal activity) after pyrogallol treatment and improved enzymatic activity as a consequence of the pretreatments with the *C. coggygia* extract 2 or 12 h before pyrogallol administration (to 87.5% and 95.32% of the basal activity, respectively). Administration of the *C. coggygia* extract alone caused nonsignificant changes in total SOD, MnSOD, and CuZnSOD activities (98.72%, 98.79, and 98.62%, respectively).

Pyrogallol administration induced a pronounced decline in CAT activity to 31.80% of the basal level. As a result, after the 2 h pretreatment with the *C. coggygia* extract, enzymatic activity remained comparatively low, at 47.54% of the basal level. However, the 12 h pretreatment enabled 81.64% of basal CAT activity. Administration of the extract alone caused a slight decrease in CAT activity to 90.82%.

Examination of GST activity showed that pyrogallol induced a decline in enzymatic activity to 80.45%, while the 2 h and in particular the 12 h pretreatment alleviated this decrease, allowing for 91.56% and 98.71% of the basal enzymatic activities, respectively. Administration of the extract alone caused a nonsignificant decrease in GST activity (99.08%).

DNA damage in the liver

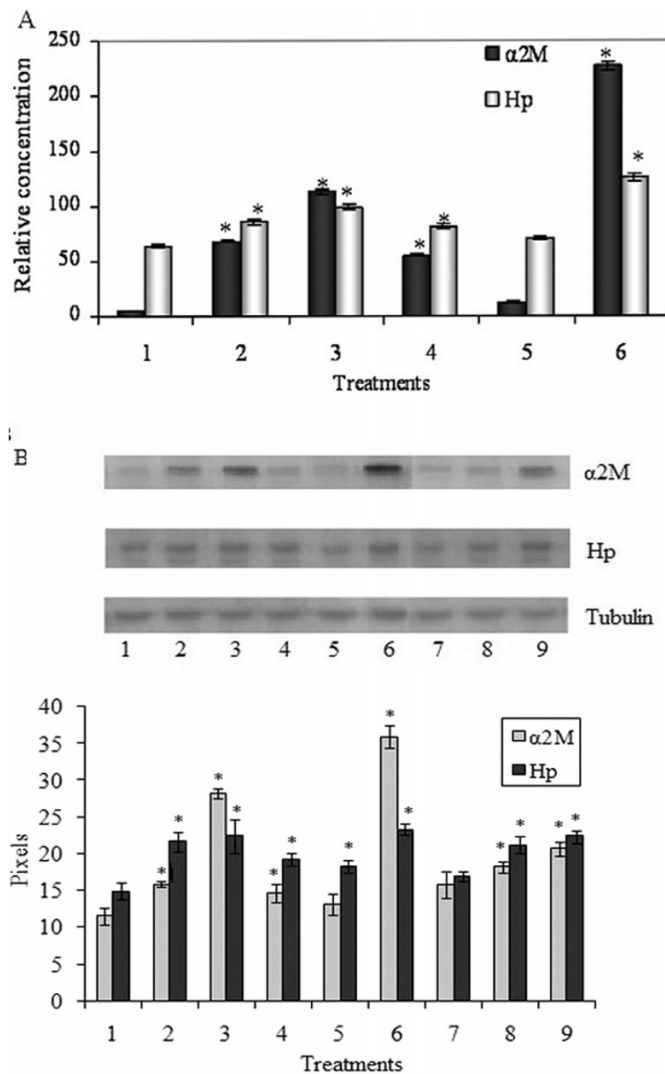
The alkaline Comet assay of liver cells was performed to assess whether pretreatment with the *C. coggygia* extract can improve DNA damage resulting from pyrogallol administration. Pyrogallol caused a statistically significant rise in

DNA damage, observed as an increase in comet tail length and percentage of DNA in the tail compared with the negative control group (Table 3). Decreased DNA damage, observed as a decreased frequency of tail length and lower percentage of DNA in the tail, was observed after pretreatments with the *C. coggygia* extracts. In vivo exposure to the *C. coggygia* extract did not induce DNA damage.

Relative changes in NF- κ B and Akt activities in the liver

In the next set of experiments we examined 2 important components of the complex cellular response to stress factors. Stimuli such as free radicals stimulate the expression of the transcription factor NF- κ B, which controls many genes that participate in the inflammatory response. In contrast, antioxidants with anti-inflammatory activities generally inhibit NF- κ B expression. To examine NF- κ B expression, we performed Western blot analysis of whole-liver homogenates using antibodies raised against transcription factor NF- κ B p65 and the activated, phosphorylated protein NF- κ B p65 (pNF- κ B). As can be seen from Fig. 2A, pyrogallol administration induced NF- κ B protein expression (lane 2, row NF- κ B) and significant activation (lane 2, row pNF- κ B), 1.40- and 3.72-fold, respectively, above the control values. Administration of the *C. coggygia* extract either 2 or 12 h before the pyrogallol treatment (lanes 3 and 4, respectively) effectively prevented the increase of NF- κ B and appearance of pNF- κ B protein species.

Fig. 3. Relative serum concentrations of haptoglobin (Hp) and α_2 -macroglobulin (α_2 M) (A) and the expression of Hp and α_2 M in the liver (B) in rats treated with *Cotinus coggygia* methanol extract. (A) Rocket immunoelectrophoresis was performed using anti-Hp and anti- α_2 M antibodies. Column 1: negative control; columns 2, 3, 4, and 5: 12, 24, 48, and 72 h after *C. coggygia* extract administration, respectively; column 6: 24 h after turpentine administration. (B) Western blot analysis of the rat liver homogenate was performed with anti- α_2 M, anti-Hp, and anti-tubulin antibodies. Lane 1: negative control; lanes 2, 3, 4, and 5: 12, 24, 48, and 72 h after *C. coggygia* extract administration, respectively; lane 6: 24 h after turpentine administration; lane 7: pyrogallol treated; lane 8: pretreated with *C. coggygia* extract 2 h before pyrogallol administration; lane 9: pretreated with *C. coggygia* extract 12 h before pyrogallol administration. Tubulin was used as the internal control. Western immunoblot analysis was performed using TotalLab (Phoretix) electrophoresis software (version 1.10) to quantify protein levels relative to tubulin levels and is presented on the graph. The values are means \pm SE from 3 separate experiments. *, $p < 0.05$, statistically significant difference versus negative control.



In the complex protective biological responses to harmful stimuli, Akt kinase functions as the central integrating module of the stress-signaling machinery in the cell. As it is in-

involved in cellular survival pathways that promote cell survival, it can serve as an indicator of cell viability. Western blot analysis revealed that pyrogallol treatment promoted a slight reduction of Akt activity, observed as a decrease (about twofold) in the level of pAkt (Fig. 2B, lane 2, row pAkt). In samples obtained from rats that were administered the *C. coggygia* extract either 2 or 12 h before the pyrogallol treatment (lanes 3 and 4, respectively), the levels of active Akt kinase were increased.

Changes in acute-phase protein levels in the serum and liver

An aspect of the molecular response of the liver in the context of its role as a principal participant of the anti-inflammatory reaction was examined. In the course of inflammation, the liver produces a class of proteins referred to as the AP reactants, which play important protective roles in host defence against tissue damage and whose plasma concentrations reach a maximal increase by 24 h after initial stimulation. Rocket immunoelectrophoresis of the serum revealed the highest increase of 2 important AP reactants, Hp and α_2 M, 24 h after treatment with the *C. coggygia* extract (Fig. 3A). The level of the examined AP proteins returned to the basal level 72 h after treatment with the extract. The levels of Hp and α_2 M were lower than those during the full-fledged AP response observed after treatment with turpentine, the standard laboratory inducer of the AP response (Turnbull et al. 1994). Immunoblot analysis of the total liver extract with anti-Hp and anti- α_2 M antibodies after *C. coggygia* extract administration is presented in Fig. 3B. Treatment with the extract promoted a rise in the levels of both AP proteins. The highest Hp and α_2 M levels were detected 12 and 24 h after extract administration (lanes 2 and 3, rows designated Hp and α_2 M, respectively); they corresponded with the highest levels of Hp and α_2 M in the serum (Fig. 3A). When the *C. coggygia* extract was administered 2 and 12 h before pyrogallol, increased levels of Hp and α_2 M were detected 12 h before pyrogallol administration (lane 9, rows Hp and α_2 M, respectively).

Discussion

During states of oxidative stress, highly reactive oxygen species bring about a broad range of molecular rearrangements (Halliwell and Gutteridge 1986; Toyokuni 1996) that lead to membrane, DNA, and organelle damage, cellular dysfunction, and eventual cell death. Therefore, reactive oxygen species are at the root of a variety of tissue and organ disorders and disease progression in different pathological states. Much attention is focused on the identification of natural and synthetic antioxidant compounds that could attenuate the cytotoxic events that take place during oxidative stress.

The present study was undertaken to assess the efficacy of the methanol extract of the plant *C. coggygia* in alleviating oxidative stress in the liver induced by the administration of the hepatotoxic compound pyrogallol. The free-radical generator pyrogallol (100 mg/kg, intraperitoneally) caused significant hepatic damage, observed as increased levels of AST and ALT, malondialdehyde, and GSH. Histological examination has also revealed that pyrogallol administration leads to

infiltration of liver tissue with white blood cells (Gupta et al. 2002). We report that the *C. coggygia* extract was effective in protecting the liver against injury induced by pyrogallol in rats. This was evident from the significant reduction in levels of hepatic damage markers, serum ALT and AST. The increase in TBARS concentration in the serum and liver observed after pyrogallol treatment revealed the presence of oxidative stress. The elevated concentration of hepatic TBARS in pyrogallol-treated rats indicates that significant lipid peroxidation took place in the liver. We also observed that pyrogallol administration led to an increase in iron levels in the serum. The accumulation of iron is injurious, since it promotes the generation of highly reactive hydroxyl radicals, which are capable of removing a hydrogen atom from polyunsaturated fatty acids and initiating lipid peroxidation (Emerit et al. 2001). Agrawal et al. (2001) suggested that the iron released from ferritin after pyrogallol treatment can catalyze the peroxidation of cell membranes. The generated lipid hydroperoxides cause considerable damage to membrane structure and function. These processes can be delayed by iron chelation and its resulting deactivation. Thus chelating agents are effective as secondary antioxidants because they reduce the redox potential by stabilizing the oxidized form of a metal ion (Gordon 1990). Our results revealed a marked in vitro ability of the *C. coggygia* extract to reduce and chelate ferrous ion, as well as a significant decrease in the levels of circulating iron after extract administration to rats. These findings are in agreement with the observation that administration of the extract resulted in a lowering of the pyrogallol-induced increase in TBARS level almost to the basal level. The observation that pretreatment with the extract prevented pyrogallol-induced lipid peroxidation suggests that the extract could play an important role in protection against membrane damage.

Increased levels of reactive oxygen species are directly associated with the induction of DNA strand breaks (Labiencic et al. 2003). The antioxidant enzymes as the first line of cellular defense against oxidative damage thus assume an important role in preserving DNA integrity. Using the Comet assay to determine the presence of DNA damage, we observed an increase in the frequency of tail length and percentage of DNA in the comet tail after treatment with pyrogallol. Pretreatments with the *C. coggygia* extract 2 or 12 h prior to pyrogallol administration resulted in a statistically significant decrease in DNA damage. In agreement with this result, we observed that the pretreatments with the extract promoted significant increases in hepatic antioxidative enzyme (SOD, CAT, and GST) activities that were considerably below their respective basal levels in the pyrogallol-treated rats. Together, these results clearly illustrate the efficient clearance of the pyrogallol-induced overload with free radical species by the *C. coggygia* extract. For instance, as lipid peroxidation by-products cause covalent modification of GST (Harris and Stone 1988), the decrease in GST activity following pyrogallol exposure was probably due to increased lipid peroxidation, while in rats pretreated with the extract prior to pyrogallol administration, GST activity was in part increased as a result of the ability of the extract to suppress lipid peroxidation.

Transcription factor NF- κ B has been described as a redox-sensitive nuclear transcription factor, since its activation is modulated by the cell's redox status (Meyer et al. 1994), and

while reactive oxygen species increase NF- κ B activation, a variety of antioxidant compounds have been shown to inhibit it (Flohé et al. 1997; Li et al. 2000). Since the production of reactive oxygen species is a key factor in NF- κ B activation, it has been proposed that strategies that enhance the antioxidant status are beneficial in inhibiting NF- κ B activation, which, when inappropriate and (or) sustained, plays a central role in different downstream pathological events. In pyrogallol-treated rats, the expression level of NF- κ B was above the basal level, whereas rats pretreated with the *C. coggygia* exhibited considerably lower levels of NF- κ B expression. We assume that the latter result revealed the efficient clearance of reactive oxygen species, alleviation of oxidative stress, and resulting removal of NF- κ B-inducing stimuli by the pretreatments with the *C. coggygia* extract.

In effect, we arrived at a similar conclusion after examination of the expression of the serine–threonine kinase Akt. Akt functions as the central integrating module of the phosphatidylinositol 3-kinase – Akt signalling pathway in the cell and regulates a number of critical cellular pathways, including those leading to cellular proliferation and inhibition of apoptosis (Li et al. 2005; Miyamoto et al. 2005). Thus Akt plays an important role in maintaining cell survival (Datta, et al. 1999; Kandel and Hay 1999; Downward 2004). Whereas administration of pyrogallol resulted in decreased Akt phosphorylation and activity, the pretreatments with the *C. coggygia* extract clearly provided a setting that allowed for the functioning of Akt, which was essential for proper cell functioning.

We consistently observed that exposure to a single dose of the *C. coggygia* extract 12 h prior to pyrogallol administration was more effective in suppressing the negative effects of pyrogallol than when the extract was administered 2 h before pyrogallol treatment. Different types of trauma such as tissue injury and infections induce the AP response, a nonspecific, systemic reaction that plays an important protective role (Gabay and Kushner 1999; Noursadeghi et al. 2002; Gruys et al. 2005; Leendertse et al. 2009) and is characterized by liver production of a set of AP proteins (Heinrich et al. 1990; Gruys et al. 1994). The administration of the *C. coggygia* extract induced an AP response-like increase in the concentration of the 2 examined AP proteins, Hp and α_2 M. Hp is a haemoglobin-binding protein whose protective role is provided by restriction of oxidation through interaction with free hemoglobin (Tseng et al. 2004), iron recycling, cathepsin inhibition, regulation of the immune cell response, and role as a chaperone (Huntoon et al. 2008). α_2 M is a tetrameric, disulfide-rich plasma glycoprotein that functions as a nonselective inhibitor of different types of nonspecific proteases and as a carrier of cytokines, growth factors, and hormones (Borth 1992). Previous studies have demonstrated certain survival benefits of a pretreatment with turpentine prior to subsequent application of semilethal or lethal stimuli (Noursadeghi and Cohen 1999; Hochepped et al. 2000; Noursadeghi et al. 2002). Also, we have documented the complete survival and improved recovery of rats that were exposed to a lethal dose of ionizing radiation, if they were pretreated with purified rat α_2 M prior to irradiation (Mihailović et al. 2009). While the *C. coggygia* extract-induced increase in at least 2 studied AP proteins was lower than that during the full-fledged AP reaction (turpentine-treated rats), it is clear that

this process had an important role in attenuating the effects of pyrogallol, since the 12 h pretreatment, which allowed for the development of the AP reaction, was more effective than the 2 h pretreatment, when the AP reaction was in its early stage. We thus conclude that the pretreatment with the *C. coggygia* extract 12 h before pyrogallol administration effectively preconditioned the rat liver against the subsequent pyrogallol-induced disruption of liver homeostasis. Our results illustrate the considerable preemptive potential of the *C. coggygia* extract to attenuate acute hepatotoxicity.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Serbian Ministry of Science and Technological Development (grant Nos. III43004, 173020, and 41010).

References

- Agrawal, R., Sharma, P.K., and Rao, G.S. 2001. Release of iron from ferritin by metabolites of benzene and superoxide radical generating agents. *Toxicology*, **168**(3): 223–230. doi:10.1016/S0300-483X(01)00412-7. PMID:11684319.
- Armstrong, D., and Browne, R. 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv. Exp. Med. Biol.* **366**: 43–58. PMID:7771281.
- Bergmeyer, H.U. 1980. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes: Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *Clin. Chim. Acta*, **105**(1): 147–154. doi:10.1016/0009-8981(80)90105-9.
- Bergmeyer, H.U., Bowers, G.N., Jr, Hørdler, M., and Moss, D.W. 1976. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin. Chim. Acta*, **70**(2): F19–F42. doi:10.1016/0009-8981(76)90437-X. PMID:954207.
- Beutler, E. 1982. Catalase. *In* Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Edited by E. Beutler. Grune and Stratton Inc., New York. pp. 105–106.
- Borth, W. 1992. α_2 -macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J.* **6**(15): 3345–3353. PMID:1281457.
- Chang, J.C., Lin, C.C., Wu, S.J., Lin, D.L., Wang, S.S., Miaw, C.L., and Ng, L.T. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Physalis peruviana* extract against acetaminophen-induced liver injury in rats. *Pharm. Biol.* **46**(10–11): 724–731. doi:10.1080/13880200802215768.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* **13**(22): 2905–2927. doi:10.1101/gad.13.22.2905. PMID:10579998.
- Decker, E.A., and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* **38**(3): 674–677. doi:10.1021/jf00093a019.
- Demirci, B., Demirci, F., and Başer, K.H. 2003. Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* (Scop.) from Turkey. *Flavour Frag. J.* **18**: 43–44. doi:10.1002/ffj.1149.
- Downward, J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**(2): 177–182. doi:10.1016/j.semcdb.2004.01.002. PMID:15209377.
- Emerit, J., Beaumont, C., and Trivin, F. 2001. Iron metabolism, free radicals and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.* **55**(6): 333–339. doi:10.1016/S0753-3322(01)00068-3. PMID:11478586.
- Esmaili, A.M., Sonboli, A., Kanani, R.M., and Sadeghi, H. 2009. *Salvia sahendica* prevents tissue damages induced by alcohol in oxidative stress conditions: effect on liver and kidney oxidative parameters. *J. Med. Plants Res.* **3**: 276–283.
- Flohé, L., Brigelius-Flohé, R., Saliou, C., Traber, M.G., and Packer, L. 1997. Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radic. Biol. Med.* **22**(6): 1115–1126. doi:10.1016/S0891-5849(96)00501-1. PMID:9034250.
- Gabay, C., and Kushner, I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**(6): 448–454. doi:10.1056/NEJM199902113400607. PMID:9971870.
- Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. *In* Antioxidants. Edited by B.J.F. Hudson. Elsevier, Applied Science, New York. pp. 1–18.
- Gruys, E., Obwolo, M.J., and Toussaint, M.J.M. 1994. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.* **64**: 1009–1018.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., and Koopmans, S.J. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **6**(11): 1045–1056. doi:10.1631/jzus.2005.B1045. PMID:16252337.
- Gupta, Y.K., Sharma, M., and Chaudhary, G. 2002. Pyrogallol-induced hepatotoxicity in rats: a model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **24**(8): 497–500. doi:10.1358/mf.2002.24.8.705070. PMID:12500429.
- Gupta, Y.K., Sharma, M., Chaudhary, G., and Katiyar, C.K. 2004. Hepatoprotective effect of New Livfit, a polyherbal formulation, is mediated through its free radical scavenging activity. *Phytother. Res.* **18**(5): 362–364. doi:10.1002/ptr.1272. PMID:15173993.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**(22): 7130–7139. PMID:4436300.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**(2): 501–514. doi:10.1016/0003-9861(86)90305-X. PMID:3010861.
- Harris, C.M., and Stone, W.L. 1988. The effect of *in vitro* lipid peroxidation on the activity of rat liver microsomal glutathione S-transferase from rats supplemented or deficient in antioxidants. *Life Sci.* **42**(4): 415–420. doi:10.1016/0024-3205(88)90079-3. PMID:3339944.
- Hartmann, A., and Speit, G. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (Comet assay). *Toxicol. Lett.* **90**(2–3): 183–188. doi:10.1016/S0378-4274(96)03847-7.
- Heinrich, P.C., Castell, T.A., and Andus, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**(3): 621–636. PMID:1689567.
- Hochepled, T., Van Molle, W., Berger, F.G., Baumann, H., and Libert, C. 2000. Involvement of the acute phase protein α 1-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J. Biol. Chem.* **275**(20): 14903–14909. doi:10.1074/jbc.275.20.14903. PMID:10809735.
- Huang, K.C. 1999. The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Huntoon, K.M., Wang, Y., Eppolito, C.A., Barbour, K.W., Berger, F. G., Shrikant, P.A., and Baumann, H. 2008. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J. Leukoc. Biol.* **84**(1): 170–181. doi:10.1189/jlb.0208100. PMID:18436583.
- Institute for Laboratory Animal Research. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., and Yankova, T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **96**(1–2): 145–150. doi:10.1016/j.jep.2004.08.033. PMID:15588663.
- Joharapurkar, A.A., Wanjari, M.M., Dixit, P.V., Zambad, S.P., and

- Umathe, S.N. 2004. Pyrogallol: a novel tool for screening immunomodulators. *Indian J. Pharmacol.* **36**: 355–359.
- Kandel, E.S., and Hay, N. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* **253**(1): 210–229. doi:10.1006/excr.1999.4690. PMID:10579924.
- Labieniec, M., Gabryelak, T., and Falcioni, G. 2003. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutat. Res.* **539**(1–2): 19–28. PMID:12948811.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of heat of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, **227**(5259): 680–685. doi:10.1038/227680a0. PMID:5432063.
- Laurell, C.B. 1972. Electroimmuno assay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **124**: 21–37. doi:10.3109/00365517209102748. PMID:4114358.
- Leendertse, M., Willems, R.J.L., Giebelen, I.A.J., van den Pangaart, P.S., Bonten, M.J.M., and van der Poll, T. 2009. The acute-phase response impairs host defence against *Enterococcus faecium* peritonitis. *Immunology*, **128**(1 Pt. 2 Suppl.): e335–e342. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02967.x. PMID:19175794.
- Li, Y., Glauert, H.P., and Spear, B.T. 2000. Activation of nuclear factor- κ B by the peroxisome proliferator ciprofibrate in H4IIEC3 rat hepatoma cells and its inhibition by the antioxidants *N*-acetylcysteine and vitamin E. *Biochem. Pharmacol.* **59**(4): 427–434. doi:10.1016/S0006-2952(99)00339-1. PMID:10644051.
- Li, L., Ittmann, M.M., Ayala, G., Tsai, M.J., Amato, R.J., Wheeler, T. M., et al. 2005. The emerging role of the PI–K–Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **8**(2): 108–118. doi:10.1038/sj.pcan.4500776. PMID:15724144.
- Lin, B.R., Yu, C.J., Chen, W.C., Lee, H.S., Chang, H.M., Lee, Y.C., et al. 2009. Green tea extract supplement reduces D-galactosamine-induced acute liver injury by inhibition of apoptotic and proinflammatory signalling. *J. Biomed. Sci.* **16**(1): 35. doi:10.1186/1423-0127-16-35. PMID:19317920.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.L., Farr, A.L., and Randall, R.I. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265–275. PMID:14907713.
- Manonmani, G., Anbarasi, K., Balakrishna, K., Veluchamy, G., and Shyamala, D.C.S. 2002. Effect of *Terminalia arjuna* on the antioxidant defense system in alloxan induced diabetes in rats. *Biomedicine*, **22**: 52–61.
- Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* **192**(1): 1–15. doi:10.1002/jcp.10119. PMID:12115731.
- Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Solujić, S., Grdović, N., Vidaković, M., and Mihailović, M. 2011. Genotoxic potential of *Cotinus coggygia* Scop. (Anacardiaceae) stem extract in vivo. *Genet. Mol. Biol.* **34**(2): 298–303. doi:10.1590/S1415-47572011005000001.
- Meyer, M., Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. 1994. Regulation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 by redox changes. *Chem. Biol. Interact.* **91**(2–3): 91–100. doi:10.1016/0009-2797(94)90029-9. PMID:8194138.
- Mihailović, M., Dobrić, S., Poznanović, G., Petrović, M., Uskoković, A., Arambasić, J., and Bogojević, D. 2009. The acute-phase protein α_2 -macroglobulin plays an important role in radioprotection in the rat. *Shock*, **31**(6): 607–614. doi:10.1097/SHK.0b013e31818bb625. PMID:18838941.
- Misra, H.P., and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**(10): 3170–3175. PMID:4623845.
- Miyamoto, H., Altuwajri, S., Cai, Y., Messing, E.M., and Chang, C. 2005. Inhibition of the Akt, cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 pathways in combination with androgen deprivation therapy: potential therapeutic approaches for prostate cancer. *Mol. Carcinog.* **44**(1): 1–10. doi:10.1002/mc.20121. PMID:16044418.
- Noursadeghi, M., and Cohen, J. 1999. The acute phase response and enhancing resistance to bacterial infection. In *Update in intensive care and emergency medicine*. Edited by J.L. Vincente. Springer, Berlin. pp. 116–139.
- Noursadeghi, M., Bickerstaff, M.C.M., Herbert, J., Moyes, D., Cohen, J., and Pepys, M.B. 2002. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J. Immunol.* **169**(2): 913–919. PMID:12097396.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**(2): 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3. PMID:36810.
- Oyaizu, M. 1986. Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**: 307–315.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**(1): 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0. PMID:3345800.
- Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., and Lee, S.S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480–481**: 243–268. PMID:11506818.
- Takada, Y., Bhardwaj, A., Potdar, P., and Aggarwal, B.B. 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF- κ B activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*, **23**(57): 9247–9258. PMID:15489888.
- Torii, Y., Saito, H., and Matsuki, N. 1994. Induction of emesis in *Suncus murinus* by pyrogallol, a generator of free radicals. *Br. J. Pharmacol.* **111**(2): 431–434. PMID:8004387.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**(9): 4350–4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350. PMID:388439.
- Toyokuni, S. 1996. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **20**(4): 553–566. doi:10.1016/0891-5849(95)02111-6. PMID:8904296.
- Tseng, C.F., Lin, C.C., Huang, H.Y., Liu, H.C., and Mao, S.J. 2004. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics*, **4**(8): 2221–2228. doi:10.1002/pmic.200300787. PMID:15274115.
- Turnbull, A.V., Dow, R.C., Hopkins, S.J., White, A., Fink, G., and Rothwell, N.J. 1994. Mechanisms of activation of the pituitary–adrenal axis by tissue injury in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, **19**(2): 165–178. doi:10.1016/0306-4530(94)90006-X. PMID:8190836.
- Upadhyay, G., Kumar, A., and Singh, M.P. 2007. Effect of silymarin on pyrogallol and rifampicin induced hepatotoxicity in mouse. *Eur. J. Pharmacol.* **565**(1–3): 190–201. doi:10.1016/j.ejphar.2007.03.004. PMID:17434476.
- Upadhyay, G., Singh, A.K., Kumar, A., Prakash, O., and Singh, M.P. 2008. Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **596**(1–3): 146–152. doi:10.1016/j.ejphar.2008.08.019. PMID:18789925.
- Wang, D., Kreutzer, D.A., and Essigmann, J.M. 1998. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.* **400**(1–2): 99–115. PMID:9685598.
- Westenburg, H.E., Lee, K.J., Lee, S.K., Fong, H.H.S., van Breemen, R.B., Pezzuto, J.M., and Kinghorn, A.D. 2000. Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygia*. *J. Nat. Prod.* **63**(12): 1696–1698. doi:10.1021/np000292h. PMID:11141121.



Biological properties of the *Cotinus coggygia* methanol extract

SANJA MATIĆ¹
SNEŽANA STANIĆ¹
SLAVICA SOLUJIĆ²
TANJA MILOŠEVIĆ²
NEDA NICIFOROVIĆ²

¹Institute of Biology and Ecology,
Faculty of Science, University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, Serbia

²Institute of Chemistry, Faculty of Science
University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, Serbia

Correspondence:

Dr. Snežana Stanić
Institute of Biology and Ecology,
Faculty of Science
University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, Serbia
E-mail: stanic@kg.ac.rs

Abstract

Background and Purpose: The purpose of this study was to determine the possible antimicrobial and genotoxic effect of the methanol extract obtained from the stem of the plant *Cotinus coggygia* Scop. (Anacardiaceae).

Subjects and Method: The *in vitro* antimicrobial activity of the methanol extract of *C. coggygia* and gallic acid was examined on six different bacterial species and *Candida albicans*, using the cylinder plate and macro broth dilution method. The genotoxicity of the 5% methanol extract from the stem of *C. coggygia* and synthetic gallic acid in a concentration of 5% was tested on the eukaryotic model system *Drosophila melanogaster* using the sex-linked recessive lethal (SLRL) test.

Results and Conclusions: The results suggest that the methanol extract from *C. coggygia* showed antimicrobial activity against all test microorganisms, on the other hand, synthetic gallic acid exhibited less antimicrobial activity than methanol extract. Under our experimental conditions, the synthetic gallic acid and methanol extract of the plant *C. coggygia* showed genotoxic effects inducing increases in the frequency of mutants in both postmeiotic (spermatids and spermatozooids) and premeiotic (spermatocytes) germ cell lines of eukaryotic species *Drosophila melanogaster*.

INTRODUCTION

Plants are not only important to the millions of people to whom traditional medicine serves as the only opportunity for health care and to those who use plants for various purposes in their daily lives, but also as a source of new pharmaceuticals (1). So far the extracts of many plant species have been examined for a number of biological activities, and their antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, antimutagenic and cancer preventive effect have been partially described (2, 3, 4, 5).

Cotinus is a small genus of the family Anacardiaceae with two species: *C. coggygia* Scop. (syn.: *Rhus cotinus* L.) and *C. obovatus* Raf., American smoketree. *C. coggygia* is usually either considered large shrubs or small trees. It has a wide distribution from southern Europe, the Mediterranean, Moldova and the Caucasus to central China and the Himalayas (6). The flora of Serbia defines two varieties of *C. coggygia*: var. *laevis* and var. *arenaria* (7). In folk medicine the plant is used for its antiseptic, anti-inflammatory, antimicrobial, antihemorrhagic, anti-diarrhea and wound healing properties (8).

It has been suggested that gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) and its derivatives are biologically active compounds which are present in several plants. According to Westenburg *et al.* (9), Stathopoulou *et al.*

(10) and Antal *et al.* (11) gallic acid had been previously isolated from this species. This polyhydroxyphenolic acid has been reported to be a free radical scavenger, as well as an inducer of differentiation and apoptosis in leukemia, lung cancer, colon adenocarcinoma cell lines and normal lymphocyte cells (12, 13).

The objective of this study was to compare selected biological activities of *C. coggygria* methanol extract with natural polyphenols as dominant constituents, versus the biological activities of gallic acid.

MATERIAL AND METHODS

Plant methanol extraction

The plant material was collected from Rujšće on Rogozna mountain in the North of Kosovo, in May-June 2007. The species was identified and the voucher specimen deposited (16178, BEOU) in the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade.

The air-dried *C. coggygria* stem (170 g) was broken into small pieces 2–6 mm by using a cylindrical crusher and extracted with methanol (500 mL) using Soxhlet apparatus. The extract was filtered through a paper filter (Whatman, No. 1) and solvent was evaporated. Dry extract (4.7 g) was stored in a dark glass bottle for further processing.

Identification of methanol extracts

Total soluble phenolics compounds in the methanol extract of *C. coggygria* stem were determined with Folin-Ciocalteu reagent (14) using pyrocatechol as a standard. Methanol extract was soluted to a concentration of 0.02 g/mL. Of the soluted extract 0.5 mL was mixed with 2.5 mL of FC reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and 2 mL of NaHCO₃ (7.5%). After 15 min of stirring at 45°C the absorbance was measured at 765 nm on a spectrophotometer (ISKRA, MA9523-SPEKOL 211).

The concentration of total phenolics compounds in the *C. coggygria* stem was determined as mg of pyrocatechol equivalent g dry weight of extract, by using an equation that was obtained from the standard pyrocatechol graph (15, 16). All samples were analyzed in triplicate.

Flavonoids fraction was precipitated according to Alberto *et al.* (17) by mixing 10 mL of the extract dissolved in methanol (0.02 g/mL) with 10 mL HCl (1:3) and 5 mL of HCHO (8 mg/mL). After 24 h the mixture was filtered through a filter paper (Whatman No.5). Nonflavonoid components were determined from the filtrate with Folin-Ciocalteu reagent, by using the same spectrophotometric method as for determining total phenolics concentration, absorbance was measured at 765 nm on the spectrophotometer. Nonflavonoid content was expressed as mg of pyrocatechol per g of dry weight through the calibration curve with pyrocatechol. All samples were analyzed in triplicate.

Flavonoids content was determined from residuum of the total phenolics and nonflavonoid content. Flavono-

ids content was expressed as mg of pyrocatechol per g of extract. All samples were analyzed in triplicate.

For the purpose of comparative analysis synthetic gallic acid (Sigma-Aldrich) was used.

Microorganisms

Bacterial strains and yeast used in these experiments were: *Staphylococcus aureus* (IPH), *Bacillus subtilis* (IPH), *Klebsiella pneumoniae* (B26), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) and yeast *Candida albicans* (ATCC 10259).

All of the tested bacteria cultures were obtained from the Institute for Health Protection (IPH) in Kragujevac and the Faculty of Science, University of Belgrade, Serbia. The identity of the bacterial strains and yeast was confirmed in the Laboratory for Microbiology at the Department of Biology (B), Faculty of Science, University of Kragujevac and University of Belgrade, Serbia.

Antimicrobial activity determined by the cylinder plate method

Petri dishes containing 10 mL Muller Hinton Agar (for bacteria) and Sabouraud dextrose agar (for yeast) with 1 mL volume of microbial suspension. For bacteria, 24 h old culture and for yeast, 72 h old, were adjusted with sterile water to 6.5×10^6 CFU/mL for bacteria and 3×10^4 CFU/mL for yeast. The plates incubated at 37°C for approximately 20 min until microbial overlay had dried on the surface. Then sterile vertical cylinders were placed alternatively on the Petri plates and samples of methanol extract and gallic acid, respectively (150, 300 and 500 µg) were aseptically poured into the vertical cylinder using micropipettes (18). The plates were subsequently incubated for 24 h at 37°C for bacteria and 48 h at 28°C for yeast. Negative controls were prepared using the same solvents (5% DMSO) employed to dissolve the extract. Amracin (100 µg for bacteria) and Nistatin (100 µg for yeast) were used as positive controls. The diameter of zones of inhibition was measured in mm. All experiments were performed in duplicate.

Antimicrobial activity determined by the macro broth dilution method

The minimal inhibitory concentration (MIC) (19, 20) of the methanol extract was determined by the macro broth two-fold serial technique. A series of two-fold dilutions of the gallic acid and extract, ranging from 7.8 µg/mL to 500 µg/mL (in 5% solution of DMSO) was prepared in Mueller-Hinton broth with the addition 0.1 mL of a suspension of the microbial spores (5.4×10^6 CFU/mL for bacteria and 3×10^4 CFU/mL for yeast). The MIC values were determined after 24 h as the lowest concentration of the extract, which inhibited visible growth of each organism. Amracin and Nystatin were chosen as the positive control drugs for bacteria and *C. albicans*, respectively. Negative control contained only 5% solution of DMSO.

Genotoxicity determination by sex-linked recessive lethal (SLRL) test

The sex-linked recessive lethal test for mutagenicity was carried out by the standard procedure (21) with laboratory stocks of *Drosophila melanogaster* (obtained from the Umea Stock Centre, Sweden).

The stocks were maintained and all experiments were performed under optimal conditions ($t = 25^{\circ}\text{C}$, relative humidity = 60%, 12/12 h light/dark regime) on a standard nutritive medium for *Drosophila* (corn flour, yeast, agar, sugar and nipagin to prevent the occurrence of mould and infections).

Three to four day old wild type males of *Drosophila melanogaster* (test group 1, $N = 30$) were starved in empty bottles for 5 h and then transferred and exposed to the 1% sucrose by methods of Lewis and Bacher (22) and served as the negative control group. The other group of individuals (test group 2, $N = 30$) was treated with 0.75 ppm ethyl-methane sulfonate (EMS) dissolved in 1% sucrose and served as the positive control group. The third group of individuals (test group 3, $N = 30$ males) was exposed to the methanol extract dissolved in 1% sucrose, while the fourth group of individuals (test group 2, $N = 15$ males) was treated with 5% synthetic gallic acid dissolved in 1% sucrose.

After 24 h treatment and further 24 h resting on the fresh medium, males were individually mated to two-five day old virgin *Basc* females (which made brood I). The males were then remated in new vials with three new virgins *Basc* females at two-three day intervals (thus creating brood II), to test all germ cell stages for the presence of mutations. Males were then transferred again to the fresh vials containing three *Basc* virgins (brood III).

The F_2 generation was examined for the presence or absence of *wild* type males. All *wild* type males in this

generation contained the same treated X-chromosome in hemizygous condition. Any recessive lethal on it will be expressed before the adult stage and such males will not emerge. Cells exposed in successive spermatogenesis stages, were tested for induced mutations (23).

Statistical analysis

Statistical evaluation of the antimicrobial data was performed by Student's t-test. The results are expressed as mean \pm standard deviation. The frequency of sex-linked recessive lethal cultures was calculated according the ratio between the numbers of lethal cultures to the total number of treated X-chromosomes. The total number of treated X-chromosomes is equal to the sum of lethal and non-lethal cultures. The significance of the percentage difference regarding lethal cultures was examined by testing for big independent samples – testing the difference between proportions (24).

RESULTS

In the methanol extract of *C. coggygia* (1 g), 62.50 mg pyrocatechol equivalent of phenols was detected. Also, 46.76 mg flavonoids and 15.75 mg nonflavonoids were

TABLE 1

Total phenolics, flavonoids and nonflavonoid content of the *Cotinus coggygia* methanol extract determined spectrophotometrically with Folin-Ciocalteu reagent.

<i>C. coggygia</i> methanol extract	Total phenolics mg/g extract	Flavonoids mg/g extract	Nonflavonoids mg/g extract
	62.50 \pm 2.55 ^a	46.75 \pm 3.05 ^a	15.75 \pm 1.50 ^a

^aExpressed as mg of pyrocatechol equivalent per g dry weight of extract

All measurements were repeated three times

TABLE 2

Antimicrobial activity of the methanol extract of *C. coggygia* stem and synthetic gallic acid by cylinder plate method.

Microorganism	Zones of inhibition (mm) ^{a,b,c}						
	<i>C. coggygia</i> extract			Gallic acid			Standard ^d
	150 μg	300 μg	500 μg	150 μg	300 μg	500 μg	100 μg
Bacteria							
<i>S. aureus</i> (IHP)	14 \pm 1.0	6 \pm 0.5	9 \pm 0.5	0	0	0	26 \pm 1.0
<i>B. subtilis</i>	0	8 \pm 1.0	9 \pm 0.5	0	0	0	30 \pm 1.0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	10 \pm 0.5	10 \pm 1.0	13 \pm 0.5	0	31 \pm 0.5
<i>E. coli</i>	29 \pm 1.0	15 \pm 0.5	17 \pm 0.5	29 \pm 0.5	31 \pm 0.2	30 \pm 0.5	36 \pm 0.1
<i>S. aureus</i>	15 \pm 0.5	19 \pm 0.5	10 \pm 0.5	9 \pm 0.5	9 \pm 1.0	10 \pm 0.1	32 \pm 0.5
<i>M. lysodeikticus</i>	20 \pm 0.5	8 \pm 0.5	18 \pm 0.5	18 \pm 0.3	19 \pm 0.5	0	40 \pm 0.5
Yeast							
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	32 \pm 0.5

^a Values are mean \pm S.E based on two replicates, zone of inhibition in mm

^b "O" absence of antimicrobial activity

^c Negative control (DMSO) was negative

^d Positive control: Amracin 100 μg for the bacteria and Nistatine 100 μg for the yeast

detected in 1 g of dry weight of extract. Results of the determination of total phenolics, flavonoid and nonflavonoid contents are given in Table 1.

The antimicrobial activities by cylinder plate method of the methanol extract of *C. coggygia* stem and synthetic gallic acid against the test bacteria and *C. albicans* are

TABLE 3

Antimicrobial activity of the methanol extract of *C. coggygia* stem and synthetic gallic acid by macro broth dilution method.

Microorganism	Minimal inhibitory concentration (µg/mL)		
	<i>C. coggygia</i> extract	Synthetic gallic acid	Standard ^a
Bacteria			
<i>S. aureus</i> (IHP)	250	0	2.500
<i>B. subtilis</i>	125	0	1.250
<i>K. pneumoniae</i>	250	500	0.625
<i>E. coli</i>	250	0	0.625
<i>S. aureus</i>	250	500	1.250
<i>M. lysodeikticus</i>	250	0	1.250
Yeast			
<i>C. albicans</i>	125	500	5

^a Standard: Amracin 5 µg/mL for the bacteria and Nistatine 5 µg/mL for the yeast

^b"O" absence of antimicrobial activity

presented in Table 2, while the data of antimicrobial activities by macro broth dilution method of the methanol extract of *C. coggygia* stem and synthetic gallic acid were given in Table 3. These results showed that the methanol extract has higher antimicrobial activity than synthetic gallic acid.

The genotoxic effect of *C. coggygia* methanol extract (test group 3) and synthetic gallic acid (test group 4) are shown in Table 4. Ethyl-methane sulfonate in a concentration of 0.75 ppm (test group 2) was shown to be clearly genotoxic, inducing significant increases in the frequency of mutations in all the three broods. The frequency of germinative mutations induced by the *C. coggygia* extract in SLRL test is significantly higher than that induced by sucrose as negative control (Table 4). Compared to the EMS as a positive control group, the extract induced recessive lethal X-linked mutations in all three stage of spermatogenesis. On the other hand, the synthetic gallic acid in the concentration of 5% induced significant increases in the frequency of mutations in III brood compared to the EMS, based on which we may conclude that spermatocytes fall into and represent a sensitive stage of spermatogenesis.

DISCUSSION

The use of a natural product with therapeutical properties has a long history. Plants are invaluable sources of pharmaceutical products (25). Many plant extracts have been used as a source of medicinal agents to cure urinary

TABLE 4

Frequencies of SLRL mutations after treatment of *Drosophila melanogaster* males with methanol extract of plant *C. coggygia* and synthetic gallic acid.

Treatment	I brood Σ No of lethal % of lethal	II brood Σ No of lethal % of lethal	III broods Σ No of lethal % of lethal	I+II+III Σ No of lethal % of lethal
Test group 1	300	269	252	821
1% Sucrose	5	5	6	16
negative control	1.67	1.86	2.38	1.95
Test group 2	265	193	140	598
0.75 ppm EMS	88	65	36	189
positive control	32.21	33.68	25.71	31.61
Test group 3	269	284	252	805
5% <i>C. coggygia</i>	34	17	43	94
extract	12.64	5.99	17.06	11.67
Test group 4	134	130	96	360
5% Synthetic	13	12	16	41
gallic acid	9.7	9.2	16.6	11.4
t _{sucrose/extract}	5.45***	2.57*	5.72***	8.15***
t _{sucrose/gallic acid}	3.02**	2.76**	3.65***	5.42***
t _{EMS/extract}	5.71***	7.57***	2.25*	9.09***
t _{EMS/gallic acid}	6.13***	6.25***	1.70 [#]	8.4***

Statistically significant difference: p < 0.05*; p < 0.01**; p < 0.001***

Frequencies that are not significantly different: p > 0.05[#]

tract infections, cervicitis vaginitis, gastrointestinal disorders, respiratory diseases, cutaneous affections, helminthic infections and inflammatory process (26, 27).

Phytochemical investigation of the methanol extract of plant *C. coggygria* led to the isolation of several phenolic compounds (10, 28). Polyphenolic compounds are known to have antioxidant activity and it is likely that the activity of the extracts is due to these compounds. It is suggested that polyphenolic compounds have shown anti-carcinogenic effects and potential to prevent cardiovascular and cerebrovascular diseases (29). Our results demonstrate (Table 1) that in the methanol extract of *C. coggygria* (1 g), 62.50 mg of pyrocatechol equivalent of phenols are detected.

Many efforts have been made to discover new antimicrobial compounds from various sources such as animals, microorganisms and plants. Plants possess antimicrobial natural products to protect themselves (30, 31). Antimicrobial activities of various herbs and spices in plant leaves, flowers, stems, roots or fruits have been reported (32, 33, 34, 35).

The results obtained regarding the antimicrobial activity of the methanol extract and synthetic gallic acid, as evident from Table 2 and Table 3, showed that synthetic gallic acid demonstrated lower antimicrobial activity than methanol extract. In an amount of 500 µg, extract was active against all examined pathogenic and phytopathogenic bacteria with the inhibition zones ranging from 9 to 18 mm (Table 2). Very sensitive bacteria toward methanol extract are *E. coli* (in amounts of 150 µg and 300 µg inhibition zones are 29 and 17 mm, respectively) and *M. lysodeikticus* (150 and 300 µg of extracts produced inhibition zones of 20 and 18 mm, respectively). All phytopathogenic bacteria were sensitive in the presence of the extract in an amount of 300 µg to 500 µg. The highest concentration of the methanol extract of *C. coggygria* (500 µg) showed the highest inhibition zones (ranging from 9 to 18 mm). *C. albicans* was completely resistant in the presence of all examined concentration of the plant methanol extract.

Based on MIC values, the tested extract shows antibacterial activity between 125 and 250 µg/mL against all tested pathogenic bacteria (Table 3). Although the MICs obtained with the methanol extracts are high compared with those of Amracine, in general between 125–250 µg/mL, these results are of interest since they have been obtained with methanol extracts and are not a pure product and could be considered to have good potency level. Based on these results, it is possible to conclude that methanol extract of *C. coggygria* has stronger antibacterial activity.

In general, pure gallic acid showed lower antimicrobial activities than the methanol extract. From six investigated bacteria gallic acid showed activity on four bacteria species. Gallic acid (the concentrations are 150, 300, 500 µg/disc) showed strong antibacterial activity against *E. coli* (36) with inhibition zones from 29–31 mm respectively. For *S. aureus* the effect of gallic acid is 40–50% less

than methanol extract. The examined concentration of gallic acid does not demonstrate inhibition effect on the growth of *S. aureus* (isolate), *B. subtilis* and *C. albicans*.

The sex-linked recessive lethal test on *Drosophila melanogaster* has been proved to be an excellent screening test for the detection of natural plant's mutagens (37). In the present study, we examined the genotoxicity of the methanol extract of plant *C. coggygria* and synthetic gallic acid using a short test for the detection of mutagenicity *in vivo* conditions. According to the results, methanol extract of plant *C. coggygria* in a concentration of 5% induced sex-linked recessive lethal mutations on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* (test group 3, Table 4) in both postmeiotic (spermatids and spermatozooids) and premeiotic (spermatocytes) germ cell lines. For the purpose of comparative analysis we used synthetic gallic acid (test group 4). Compared to the EMS as positive control group, this polyphenolic acid induced significant increases in the frequency of mutations in III brood (Table 4), based on which we may conclude that spermatocytes represent a sensitive stage of spermatogenesis.

The antimicrobial studies revealed that methanol extract of *C. coggygria* is more effective against all tested microorganisms than gallic acid. Therefore, the extract can be used as an effective and safe source of antibacterial agent. On the other hand, the results obtained in the investigation of genotoxicity showed the genotoxic effect of the extract.

Reviewing the literature we found an increasing number of articles showing adverse effects of the drug. For example, two antibacterial compounds, metronidazole and furazolidone, were tested for their genotoxic effects in somatic and male germ line cells of *Drosophila melanogaster*. The results show that metronidazole is only genotoxic at the highest concentration (100 mM) both in the somatic and germ line cells, whereas furazolidone is genotoxic even at lower concentrations (38). Another example is Ciprofloxacin, one of the best known drugs for the treatment of many bacterial infections and widely used in medicine. Ciprofloxacin is highly active *in vitro* against a broad spectrum of Gram-negative and Gram-positive organisms (39). On the other hand, *in vitro* genotoxicity of Ciprofloxacin has been demonstrated with sister chromatid exchange and unscheduled DNA synthesis (40) and *in vivo* genotoxicity with the micronucleus test (41) and chromosomal aberrations (42) in lymphocytes of humans.

In conclusion, the results of this research showed that total phenolics are important components of this plant, and some of the pharmacological effects could be attributed to the presence of these valuable constituents. Further work is required to establish if any other components of this plant have any role in the activity of the *C. coggygria* extracts. Also, further *in vitro* and *in vivo* studies are needed before definitive conclusions about the mutagenic potential of *C. coggygria* can be drawn.

Acknowledgements: This study was financially supported by the grant numbers 43004 and 41010 from the Serbian Ministry of Science and Technological Development.

REFERENCES

- DE BOER H J, KOOL A, BROBERG A, MZIRAY W R, HEDBERG I, LEVENFORTS J J 2005 Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *J Ethnopharmacol* 96 (3): 461–469
- BARICEVIS D, BARTOL T 2000 The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. In: Kintzois S E (ed) *Pharmacology*. Sage. The Genus *Salvia*. Haewood Academic Publishers, Amsterdam, p 143–184
- MITIĆ D, VUKICEVIĆ-GAČIĆ B, KNEZEVIĆ-VUKCEVIĆ J, BERIĆ T, NIKOLIĆ B, STANKOVIĆ S, SIMIĆ D 2001 Natural antioxidants and their mechanisms in inhibition of mutagenesis. In: Kreft M, Škrbanja V (eds) *Molecular and Genetic Interactions Involving Phytochemicals*. Univ. Ljubljana and Slovenian, Academy of Sciences and Arts. Ljubljana, p 67–74
- VUJOŠEVIĆ M, BLAGOJEVIĆ J 2004 Antimutagenic effect of extract from sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system in vivo. *Acta Vet Hung* 52: 439–443
- FARIED A, KURNIA D, FARIED L S, USMAN N, MIYAZAKI T, KATOV H, KUWANO H 2007 Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl on human cancer cell lines. *Int J Oncol* 30: 605–613
- NOVAKOVIĆ M, VUCKOVIĆ I, JANACKOVIĆ P, SOKOVIĆ M, TESEVIĆ V, MILOSAVLJEVIĆ S 2007 Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygria* from Serbia. *J Serb Chem Soc* 72: 1045–1051
- GAJIĆ M 1973 Asteraceae. In: Josifović M (ed) *The flora of Serbia*. Serbian Academy of Science and Arts. Department of Natural and Mathematical Sciences, Belgrade, p 63–65
- DEMIRCI B, DEMIRCI F, BASER K H 2003 Composition of the essential oil of *Cotinus coggygria* (Scop.) from Turkey. *Flavour Fragr J* 18: 43–44
- WESTENBURG H E, LEE K J, LEE S K, FONG H H S, BREEMER B V, PEZZUYO J M, KINGHORN A D 2000 Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *C. coggygria*. *J Nat Prod* 63: 1696–1698
- STATHOPOULOU K, MAGITIS P, KARAPANIGIOTIS I, VALIANOUL, CHRYSOULAKIS Y 2007 Phytochemical analysis of *Cotinus coggygria* heartwood. Identification of isolated colorants in historical art objects. In: Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Austria. *Planta Med* 73: 163
- ANTAL S D, 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 Med* 76: 1765–1772
- KAWADA M, OHNO Y, RI Y, IKOMA T, YUUGETU H, ASAI T 2001 Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 12: 847–852
- SOHI K K, MITTAL N, HUNDAL M K, KHANDUJA K L 2003 Gallic acid, an antioxidant, exhibits anti apoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism. *J Nutr Sci Vitaminol* 49: 221–227
- SINGLETON V L, ROSSI J A 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144–158
- SLINKARD K, SINGLETON V L 1977 Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic* 28: 49–55
- GULCIN I, OKTAY M, KUFREVIĞLU I, ASLAN A 2002 Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach. *J Ethnopharmacol* 79: 325–329
- ALBERTO M R, CANAVOSIO M A R, MANCA D E, NADRA M C 2006 Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. *Elect J Biotechnol* 9: 205–209
- PUNITHA I S, RAJENDRAN K, SHIRWAIKER A 2005 Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 375–381
- UMESHA S, RICHARDSON P A, KONG P, HONG C X 2008 A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. *J Microbiol Meth* 72: 95–97
- NCCLS document M38-A 2002 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungii. Approved Standard. ISBN 1-56238-470-8. Pennsylvania, USA.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 1984 Genetic Toxicology: Sex-linked Recessive Lethal Test in *Drosophila melanogaster* No. 404: 1–6. Available on: http://ccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf/ (July 4, 2006)
- LEWIS E B, BACHER F 1968 Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Inf Service* 48: 193
- WIIRGLER F E, GRAF U 1985 Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster*. In: Muhammed A, Von Borster RC (eds) *Basic and Applied Mutagenesis*. Plenum Press, New York, p 343–372
- PETZ B 1985 Basic statistical method for non-mathematical use. SNL Zagreb, Croatia, p 153–155
- OLALDE R J A 2005 The systemic theory of living systems and relevance to CAM. Part I: the theory. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 13–18
- BRATNER A, GREIN E 1994 Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 44: 35–40
- MEYER J J M, AFOLAYAN A J, TAYLOR M B, ENGELBRECHT L 1996 Inhibition of herpes simplex virus type 1 by aqueous extract from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 52: 41–43
- ZDUNIĆ G, STEVIĆ T, ŠAVIKIN K, MENKOVIĆ N, JANKOVIĆ T 2007 Antimicrobial activity of some medicinal plants growing in Serbia and Montenegro. In: Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Austria. *Planta Med* 73: 150
- KONDRATYUK P, PEZZUTO J M 2004 Natural product polyphenols of relevance to human health. *Pharm Biol* 42: 46–63
- COWAN M M 1999 Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564–582
- TOMOKO N, TABASHI A, HIROMU T, YUKA I, HIROKO M, MUNEKAJU I, TOTSHIYKI T, TETSURO I, FUJIO A, IRIYA I, TSUTOMU N, KAZUHITO W 2002 Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Health Sci* 48: 273–276
- RAJEH M A B, ZURAINI Z, SASIDHARAN S, LATHA Y L, AMUTHA S 2010 Assessment of *Euphorbia hirta* L. leaf, flower, stem and root extracts for their antibacterial and antifungal activity and brine shrimp lethality. *Molecules* 15(9): 6008–6018
- WAMIDH H T, ADEL M M 2010 Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules* 15(3): 1811–1824
- SUMATHI P, PARVATHI A 2010 Antimicrobial activity of some traditional medicinal plants. *J Med Plants Res* 4(4): 316–321
- AFOLABI M O, ADEGOKE G O, MATHOOKO F M 2011 Phytochemical characterization of the extracts of *Aframomum daniellii* flower, leaf, stem and root. *Afr J Agr Res* 6(1): 97–101
- CHAUWITHEESUK A, TEERAWUTGULRAG A, KILBURN J D, RAKARIYATHAM N 2007 Antimicrobial gallic acid from *C. mimiasoides* Lamk. *Food Chemistry* 100: 1044–1048
- STANIĆ S, MURATSPAHIĆ-PAVLOVIĆ D, SOLUJIĆ S, ČOMIĆ L J, MILOŠEVIĆ T 2008 Preliminary results on biological activity of pollen extract of *Ambrosia artemisiifolia* L. *J Biol Res* 9: 45–53
- TFUPATHY N K, SAHU G P, ANANDKUMAR A, SAHOO U R 1996 Studies on the genotoxicity of two antiprotozoal and antibacterial agents in somatic and germ line cells of *Drosophila*. *Rev Int Contam Ambient* 12 (2): 83–88
- REEVES D S, BYWATER M J, HOLT H A, WHITE L O 1994 *In vitro* studies with ciprofloxacin a new 4-quinolone compound. *J Antimicrob Chemother* 13: 333–346
- TAKAYAMA S, HIROHASHI M, KATO M, SHIMADA H 1995 Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *J Toxicol Environ Health* 45: 1–45
- PINO A 1995 Induction of sperm abnormalities and dominant lethal effects in mice treated with ciprofloxacin. *Med Sci Res* 23: 321–322
- GORLA N, OVANDO H G, LARRIPA I 1999 Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed *in vitro* to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicol Lett* 104: 43–48

Study of Genotoxicity and Antigenotoxicity of the *Cotinus coggygria* Scop. Methanol Extract by *Drosophila melanogaster* Sex-Linked Recessive Lethal Test¹

S. Stanić^a, S. Matic^a, G. Delić^a, M. Mihailović^b, D. Bogojević^b, and S. Solujić^c

^aDepartment of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000, Serbia

^bDepartment of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Serbia

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia

e-mail: stanic@kg.ac.rs

Received October 29, 2010

Abstract—The genotoxic and antigenotoxic effects of *Cotinus coggygria* Scop. methanol extract was investigated using the *Drosophila* sex-linked recessive lethal (or SLRL) test. The results presented here show that the methanol extract of *Cotinus coggygria* in a concentration of 5% and artificial chemical agent ethyl methane-sulfonate EMS (0.75 ppm) induce recessive lethal mutations on X-chromosome on *Drosophila melanogaster* in all broods (I, II and III). Post-treatment with lower concentration of the methanol extract of *Cotinus coggygria* (2%) was effective in reducing genotoxicity of mutagen.

DOI: 10.1134/S1022795411070167

The existence of experimental evidence about diversity of chemical substances that are of natural origin and their capability to achieve (realize) different biological effects, because they can serve as a raw material in pharmaceutical industry, are the reasons for more studious approach in research of consequences of herbal metabolite interaction with hereditary material.

The *Cotinus coggygria* plant is a small genus of the family Anacardiaceae with two species: *Cotinus coggygria* Scop. (syn.: *Rhus cotinus* L.) and *Cotinus obovatus* Raf., American smoketree. Smoketree comes from southern Europe, central China and Himalayas. Plants in the family Anacardiaceae have a long history of use by peoples for medicinal and other uses. *Cotinus coggygria* it traditionally believed to be useful as an antimicrobial treatment, used in the form of external washes [1]. In the folk medicine *Cotinus coggygria* is used as antiseptic, anti-inflammatory, antimicrobial, antihemorrhagic effects, wound-healing [2], against diarrhoea, paradontosis, gastric and duodenal ulcer [3]. Extract of *Cotinus coggygria* is effective for enhancing the elasticity of the skin and/or treating wounds, including the inhibition of the appearance of scars [4]. A yellow/orange dye can be obtained from the root and stem and can be used for fabric dyeing. The leaves and bark are a good source of tannins [5], which can have influence on DNA function [6].

Chemical analyses of the plant *Cotinus coggygria*, which is often used in traditional medicine, show that is rich with polyphenols, flavonoids and tannins [7, 8]

and it is established that they can influence on biochemical and physiological functions of living systems that are on different levels of complexity [9, 10]. Scientific data confirm that this metabolites have antioxidative, antiphungal and anti-inflammatory capability [11, 12], but there is little information about genotoxicity and/or antigenotoxicity of the extract of this plant [6].

Test for sex linked lethals (sex-linked recessive lethal test—SLRL) is short-termed, highly sensitive and is used for detection of mutations on X chromosome in germinative cell lines of pre-meiotic (spermatocytes) and post-meiotic degress (spermatides and spermatozoides) in the conditions of *in vivo* [13]. The high correlation between carcinogenic and mutagenic activity in SLRL test is the reason of its frequent using in genotoxicity research. Hereditary changes are measured on non-treated offsprings (posterity) so that we get a real hereditary effect, and microsome enzyme reactions of the used model system, enable results extrapolation that is danger estimation on man [14].

We have used SLRL test on *Drosophila melanogaster* for evaluation *in vivo* genotoxicity and antigenotoxicity of *Cotinus coggygria* extract, prepared in two concentrations. For positive control and post-treatment we used 0.75 ppm of EMS which is a proven mutagene from alkylating agents class [15].

In this study we show results of investigations of genotoxic and antigenotoxic effects of *Cotinus coggygria* methanol extract on mutagenicity induced with EMS on X chromosome on *Drosophila melanogaster* males.

¹ The article is published in the original.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The mutagen used in this study was EMS—ethyl methanesulfonate in a concentration of 0.75 ppm and 1% sucrose was used as a negative control (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Plant Material and Extract Preparation

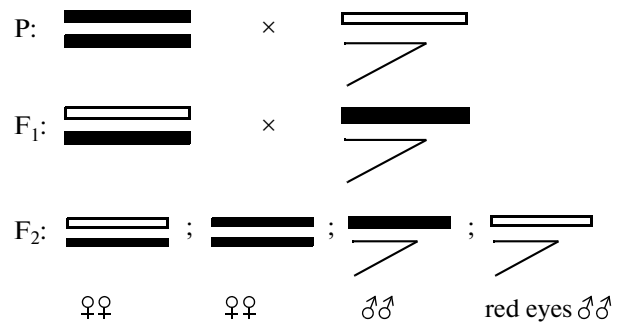
The *Cotinus coggygia* plants were collected from the place Rujiste from mountain Rogozna in the North of Kosovo, in May–June 2007. The species was identified and the voucher specimen was deposited (16178, BEOU) at the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade.

The air-dried of *Cotinus coggygia* stem (1157 g) was broken in the small pieces 2–6 mm by using a cylindrical crusher and extracted with methanol (500 ml) using Soxhlet apparatus. The extract was filtered through a paper filter (Whatman, no. 1) and evaporated. The residue (32 g) was stored in a dark glass bottle for further processing.

The sex-linked recessive lethal test was done with laboratory stocks of *Drosophila melanogaster* (obtained from Bloomington Stock Center, Indiana). One is *Canton S* whose individuals have normal phenotype (wild type), while *Basc* line flies are characterized with individuals homozygous for a balancer X-chromosome which carries two genetic markers: *Bar* (*B*) which produces a narrow eye shape in homo- and hemizygous conditions and a kidney shaped eye when heterozygous in females. Eye restricted to a narrow vertical bar about 80 facets appear in males and about 70 facets in homozygous females. Heterozygous female has intermediate number of facets (about 360) between homozygous females (about 70) and *wild*-type (about 780). The character can be regarded as partially dominant; *white-apricot* (*w^a*)—changes the red eye color into a light orange and is expressed only in homozygous females and hemizygous males; *scute* (*sc*)—recessive mutation that reduces the number of thoracic bristles. This mutation is linked with the long inversion on X-chromosome, which is necessary for suppression of crossing-over that could change the existing gene combinations on the treated chromosome [14].

Text Procedure

Three days old *Canton S* males were starved in empty bottles for 5 hours prior to treatment and then transferred and fed in bottles with filter paper soaked with solution of 0.75 ppm ethyl methanesulfonate for 24 h (positive control). After another 24 h of recovery on the standard medium, each male was mated individually to three *Basc* females, in 30 bottles, which made I brood. After two days, males were transferred to the new vials with three virgins of *Basc* line (II brood), and after three days males were transferred again to the fresh vials with three *Basc* virgins



Illustracion of crosses *Drosophiles* through generations.

(III brood). These males stayed with females for three days and were removed afterwards. Females were left for five days to lay eggs and then they were removed.

The same procedure was used to solvent, 1% sucrose that served as the negative control [15], while 0.75 ppm of EMS 24 hours prior to 2% methanolic extract of *Cotinus coggygia* in the relaxation period (within following 24 hours) was the test group for antigenotoxicity (post-treatment). Another group of 30 males was treated with 5% extract of *Cotinus coggygia* dissolved in sucrose.

After F₁ emerged, brother-sister matings were allowed for several days and 10 pairs from each vial were placed individually into the new vials. Each vial would give the progeny of one treated X-chromosome.

In F₂ the phenotypes were scored according to the eye color and shape. Absence of the *wild* type males indicated the presence of recessive lethal induced by the test substance (Figure).

The stocks were maintained and all the experiments were done under optimal conditions ($t = 25^{\circ}\text{C}$, relative humidity = 60%, 12/12 h of light/dark regime) on a standard nutritive medium for *Drosophila* (corn flour, yeast, agar, sugar and nipagin to prevent mold and infection).

The total number of treated X-chromosomes is equal to the sum of lethal and nonlethal cultures, and the frequency of sex-linked recessive lethal was calculated by the ratio of the number of lethal to the total number of treated X-chromosomes. Testing of significance of difference in percentage of lethals was done by test for big independent samples (testing of difference between proportions [16]).

RESULTS

The results obtained for SLRL test are presented in Table. The 0.75 ppm of EMS and 5% methanolic extract of *Cotinus coggygia* induced significant mutations in X chromosome of *Drosophila melanogaster* males. The frequency of germinative mutations induced by those chemical agents is significantly higher than the frequency of mutations induced by sucrose (negative control).

Frequencies of SLRL mutations after treatment of *Drosophila melanogaster* males with EMS and methanol extract of plant *Cotinus coggygia* (post-treatment)

Treatment	I brood Σ No of lethal % of lethal	II brood Σ No of lethal % of lethal	III broods Σ No of lethal % of lethal	I + II + III Σ No of lethal % of lethal
Sucrose	300	269	252	821
negative control (1%)	5 1.67	5 1.86	6 2.38	16 1.95
<i>Cotinus</i> <i>coggygia</i> extract (5%)	269 34 12.64	284 17 5.99	252 43 17.06	805 94 11.67
EMS	276	201	146	623
positive control (0.75 ppm)	91 32.97	67 33.33	37 25.34	195 31.30
EMS (0.75 ppm) + <i>C. coggygia</i> (2%) post-treatment	214 52 24.30	123 16 13.01	107 22 20.56	444 90 20.27
$t_{\text{sucrose/EMS}}$	10.79 $p < 0.001^{***}$	9.10 $p < 0.001^{***}$	6.11 $p < 0.001^{***}$	14.50 $p < 0.001^{***}$
$t_{\text{sucrose/extract}}$	5.45 $p < 0.001^{***}$	2.53 $p < 0.05^*$	5.73 $p < 0.001^{***}$	8.61 $p < 0.001^{***}$
$t_{\text{sucrose/post-treatment}}$	7.53 $p < 0.001^{***}$	3.55 $p < 0.001^{***}$	4.52 $p < 0.001^{***}$	9.23 $p < 0.001^{***}$
$t_{\text{EMS/extract}}$	5.84 $p < 0.001^{***}$	7.50 $p < 0.001^{***}$	2.00 $p < 0.05^*$	9.05 $p < 0.001^{***}$
$t_{\text{EMS/post-treatment}}$	2.17 $p < 0.05^*$	4.45 $p < 0.001^{***}$	0.84 $p > 0.5$	4.15 $p < 0.001^{***}$

Note: Statistically significant difference: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Therefore, 2% methanolic extract of *Cotinus coggygia* reduced the genotoxicity of EMS in two germ cell lines (spermatozoides and spermatides) compared to the positive control. The results shown in table suggest that the components that containing *Cotinus coggygia* (probably the combination of phenoles and flavonoides) and promoting anti-genotoxic activity in *in vivo* system of *Drosophila melanogaster* and might be considered as potential agents for chemoprevention, as well as for fertility improvement of the individuals.

DISCUSSION

Studies that are dealing with biological effects estimation of chemical substances that are of natural origin, confirm that some of them are strong natural antioxidants, that can have antigenotoxic and anticancerogenic capability [17] or to induce apoptosis which can be important in the treatment of various diseases. That is important to study their possible hemopreventive potentials.

In this study, methanol extract of *Cotinus coggygia* stem was investigated for genotoxicity and anti-genotoxicity in males *Drosophila melanogaster* treated with 0.75 ppm of EMS. By phytochemical analysis, in the methanol extract of *Cotinus coggygia* 62.50 mg of pyrocatechol equivalent of phenols was detected, also, 46.76 mg of flavonoids and 15.75 mg of nonflavonoids were observed in 1 g of dry weight of extract [18]. Westenburg et al. [11] also shows that dominant compounds in the ethyl acetate partition of *Cotinus coggygia* were disulfuretin, sulfuretin, sulfurein, gallic acid, methyl gallate and pentagalloyl glucose. Fractionation of the methanolic extract from *Cotinus coggygia* was performed by Stathopoulou et al. [7] and led to the isolation of the sulfuretin, fisetin, 7,3',4'-trihydroxyflavanone, 5,7,4'-trihydroxyflavanone, 4,2',4'-trihydroxychalcone, 2,3-dihydrofisetin, 2,3-dihydroquercetin, methyl gallate, 3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone, quercetin, 4',7-dihydroxyflavanone and 4',7-dihydroxy-2,3-dihydroflavonol. Polyphenoles and flavonoids are the key extract components of this plant, and scientists

experimentally confirm that gallic acid, that is found free or in tannin in numerous herbal species, can have influence on the structure and the function of the hereditary material [19]. Two phenols, gallic acid and oleuropein induced a significant increase in micronucleus frequency in *Vicia faba* while the four other phenols (4-hydroxyphenyl acetic acid, caffeic acid, paracoumaric acid and xeratric acid) had no significant genotoxic effect. Olive mill waste water (OMWW) genotoxicity was associated with galic acid and oleuropein [20].

Our results confirm that methanol extract of *Cotinus coggygria*, in a concentration of 5%, were shown to be clearly genotoxic, induced sex-linked recessive lethal mutations on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* males in all three broods (Table). Since one of the aims of this research was to testing the antigenotoxic potential of the mentioned extract, the proven mutagen was used for positive control ethyl methanesulfonate. The alkylating agent EMS is a very powerful mutagen in almost all biological systems. Mutagenic activity of EMS is proven for bacteriophages [21], bacteria [22], *Arabidopsis* [23] and *Vicia* [24].

Alkylating agents can induce mutations of different types: transition, transversion and chromosome aberrations. They belong to a group of chemical mutagens which induce direct changes on DNA because they react directly with the definite bases on it. This reaction does not require an active DNA synthesis to occur, but it requires DNA synthesis to be "fixed" [25]. It is established with the precise methods of molecular biology that EMS changes guanine into ethyl-guanine (adds ethyl $-\text{CH}_3-\text{CH}_2$ -group), causing mutations of the substitution type. Because of this, instead of G-C pair, there is a A-T pair bases on the DNA. Besides modification, they can "cut" few bases from desoxy-ribosophosphate skeleton DNA—they have clastogenic effect. They react with purines, pyrimidines and phosphates [26].

The results from the Table clearly point out that EMS, in concentration of 0.75 ppm, increases the frequency of X-linked lethal recessive mutations in *Drosophila melanogaster* in the all three broods, on all three stages of gametogenesis.

Post-treatment results show that methanol extract of *Cotinus coggygria*, applied after the acting of EMS (in relaxation period), in lower concentration (2%) can have inhibitory effect on mutagenesis of this alkylating agent. Antigenotoxicity, probably of polyphenol constituents, appears in I and II brood because the lower rate mutation, in relation to positive control, is noticed in post-meiotic stages: at spermatozooids and spermatides. These data suggest that the reparation of DNA damages, with the help of this extract, is stirred up in haploid stages of the gametogenesis. Also, it can be concluded that this effect is temporarily (5 days from use). Fedeli et al. [27] showed that tannins are capable of protecting against DNA breakage at low concentrations, while at high concentrations they

could be genotoxic. Also, Birosová et al. [19] showed that gallic acid inhibits mutagenic effect of sodium azide in the concentration of 500 mg/plat.

Since the high level of damage in the DNA sequences can have harmful consequences on organism, it is important to keep both the exact mechanism of DNA replication and the normal function of enzyme complex for reparation changes that appear in DNA spontaneously or inductively with various agents [28, 29]. Based on our results, we can conclude that methanol extract of *Cotinus coggygria*, applied in lower concentration, can be important for keeping the genetic stability of the organism, as well as for fertility improvement of the individuals. The phytopreparation with low concentrations had an antimutagenic effect.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the Grant no. 41010, Grant no. 43004 and Grant no. 173020 from the Serbian Ministry of Science.

REFERENCES

1. Compositions and Methods of Inducing Hair Growth Utilizing *Cotinus coggygria*, Patent Application Publication US 2010/0221364 A1.
2. Demirci, B., Demirci, F., and Baser, K.H., Composition of the Essential Oil of *Cotinus coggygria* (Scop.) from Turkey, *Flavour. Fragr. J.*, 2003, vol. 18, pp. 43–44.
3. Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., and Yankova, T., Polyphenols and Antioxidant Capacity of Bulgarian Medicinal Plants, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, vol. 96, pp. 145–150.
4. Ingestible Compositions Containing Extract, Patent No. US 7,754,248 B2.
5. Grieve, M.A., *Modern Herbal*, New York: Dover, 1971.
6. Cunha, K.S., Campesato, V.R., Reguly, M.L., et al., Tannic Acid is not Mutagenic in Germ Cells but Weakly Genotoxic in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis*, 1995, vol. 10, no. 4, pp. 291–295.
7. Stathopoulou, K., Magitis, P., Karapanigiotis, I., et al., Phytochemical Analysis of *Cotinus coggygria* Heartwood: Identification of Isolated Colorants in Historical Art Objects, (Proc. of the 55th Int. Congress and Annu. Meeting of the Soc. for Med. Plant Res., Austria), *Planta Med.*, 2007, vol. 73, p. 163.
8. Valianou, L., Stathopoulou, K., Karapanigiotis, I., et al., Phytochemical Analysis of Young Fustic (*Cotinus coggygria* Heartwood) and Identification of Isolated Colourants in Historical Textiles, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, vol. 394, no. 3, pp. 871–872.
9. Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., et al., Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds from Berries, *J. Appl. Microbiol.*, 2001, vol. 90, no. 4, pp. 494–507.
10. Novaković, M., Vuković, I., Janacković, P., et al., Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Cotinus coggygria* from Serbia, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2007, vol. 72, no. 11, pp. 1045–1051.

11. Westenburg, H.E., Lee, K.J., Lee, S.K., et al., Activity-Guided Isolation of Antioxidative Constituents of *Cotinus coggygria*, *J. Nat. Prod.*, 2000, vol. 63, no. 12, pp. 1696–1698.
12. Borchardt, J.R., Wyse, D.L., Sheaffer, C.C., et al., Antimicrobial Activity of Native and Naturalized Plants of Minnesota and Wisconsin, *J. Med. Plants Res.*, 2008, vol. 2, no. 5, pp. 98–110.
13. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., and Ramel, C., *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Amsterdam: Elsevier, 1984.
14. Lee, W.R., Abrahamson, S., Valencie, R., et al., The Sex-Linked Recessive Lethal Test for Mutagenesis in *Drosophila melanogaster*: A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, 1983, vol. 123, pp. 183–279.
15. Lewis, E.B. and Bacher, F., Method of Feeding Ethyl Methane Sulfonate (EMS) to *Drosophila* Males, *Drosophila Inform. Serv.*, 1968, vol. 43, p. 193.
16. Petz, B., *Basic Statistical Method for Non-Mathematical Use*, Zagreb: SNL, 1985.
17. Daur, A., Hensel, A., Lhoste, E., et al., Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Catechin and Tannins from the Bark of *Hamamelis virginiana* L. in Metabolically Component, Human Hepatoma Cells (Hep G2) Using Single Cell Gel Electrophoresis, *Phytochemistry*, 2003, vol. 63, pp. 199–207.
18. Stanić, S., Matić, S., Solujić, S., and Miloević, T., Genotoxicity Testing of the Methanol Extract of the Plant *Cotinus coggygria* and Gallic Acid on *Drosophila melanogaster*, *Arch. Biol. Sci.*, 2009, vol. 61, no. 2, pp. 261–266.
19. Birosová, L., Mikulasová, M., and Vaverková, S., Antimutagenic Effect of Phenolic Acids, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, 2005, vol. 149, no. 2, pp. 489–491.
20. Hajjouji, H.E., Pinelli, E., Guiresse, M., et al., Assesment of the Genotoxicity of Olive Mill Waste Water (OMWW) with the *Vicia faba* Micronucleus Test, *Mutat. Res.-Gen. Toxicol. Environ Mutagen.*, 2007, vol. 634, nos. 1–2, pp. 25–31.
21. Loveless, A., Increased Rate of Plaque-Type and Host-Range Mutation Following Treatment of Bacteriophage *in vitro* with Ethyl Methanesulphonate, *Nature*, 1958, vol. 181, pp. 1212–1213.
22. Schwartz, N.M., Nature of Ethyl Methanesulphonate Induced Reversions of *Lac*-Mutants of *Escherichia coli*, *Genetics*, 1963, vol. 48, pp. 1357–1375.
23. Roebelen, G., Wirkungsvergleich zwischen Thylmethansulfonat und Roentgenstrahlen im Mutationsversuch mit *Arabidopsis thaliana*, *Naturwissenschaften*, 1962, vol. 49, no. 3, p. 65.
24. Ghatnekar, M.R., Primary Effects of Different Mutagens and the Disturbances Induced in the Meiosis of X and X2 of *Vicia faba*, *Caryologia*, 1964, vol. 17, pp. 219–244.
25. Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.M., et al., Alkylation Damage in DNA and RNA-Repair Mechanisms and Medical Significance, *DNA Rep.*, 2004, vol. 3, pp. 1389–1407.
26. Veld, C.W.O., Zdzienicka, M.Z., Vrieling, H., et al., Molecular Analysis of Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutations at the *hprt* Gene in the Ethyl Methanesulfonate-Sensitive Chinese Hamster Cell Line EM-CI and Its Parental Line CHO9, *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, pp. 3001–3006.
27. Fedeli, D., Berrettini, M., Gabryelak, T., and Falcioni, G., The Effect of Some Tannins on Trout Erythrocytes Exposed to Oxidative Stress, *Mutat. Res.*, 2004, vol. 563, pp. 89–96.
28. Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J., and Wuergler, F.E., Antigenotoxicity Studies in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.*, 1998, vol. 402, pp. 203–209.
29. Ishaq, G.M., Shah, M.Y., and Tanki, S.A., Cancer Chemoprevention through Natural Antimutagenic Agents, *JK-Practitioner. Internat. J. Cur. Med. Sci. and Practice*, 2003, vol. 10, no. 2, pp. 101–106.

GENOTOXICITY TESTING OF THE METHANOL EXTRACT OF THE PLANT *COTINUS COGGYGRIA* AND GALLIC ACID ON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

SNEŽANA STANIĆ¹, SANJA MATIĆ¹, SLAVICA SOLUJIĆ², and TANJA MILOŠEVIĆ²

¹*Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

²*Institute of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

Abstract — The genotoxic activity of methanol extract obtained from the stem of *Cotinus coggygia* Scop. and synthetic gallic acid were investigated using the *Drosophila* sex-linked recessive lethal test (or SLRL test). In the tested methanol extract of *C. coggygia* (1 g), 62.50 mg of pyrocatechol equivalent of phenols was detected. Also, 46.76 mg of flavonoids and 15.75 mg of nonflavonoids were observed in 1 g of dry weight of extract. Methanol extract of *C. coggygia* in a concentration of 5% and 5% synthetic gallic acid were shown to be clearly genotoxic, inducing sex-linked recessive lethal mutations on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* males in all three broods.

Key words: *Cotinus coggygia*, genotoxic activity, methanol extract, gallic acid, *Drosophila melanogaster*

UDC 595.773.4:575:577.2

INTRODUCTION

Cotinus is a small genus of the family Anacardiaceae with two species: *Cotinus coggygia* Scop. (syn.: *Rhus cotinus* L.) and *Cotinus obovatus* Raf., American smoketree. *Cotinus coggygia* is a deciduous, polygamous shrub or little tree up to 7 m tall. It has a wide distribution from Southern Europe, the Mediterranean, Moldova, and the Caucasus to Central China and the Himalayas (Novaković et al., 2007). *Flora of Serbia* defines two varieties of *Cotinus coggygia*: var. *laevis* with form *atropurpurea* and var. *arenaria* (Josifović et al., 1973).

Leaves and young branches are utilized for the production of essential oil with a terpenic scent for use in perfumery (Tsankova et al., 1993). Yellow/orange color can be obtained from the root and stem of *Cotinus coggygia* and can be used for fabric coloring. Leaves and bark are a good source of tannins (Grieve, 1971).

In folk medicine, the plant is used for its anti-septic, anti-inflammatory, antimicrobial, antihemorrhagic, and wound-healing effects and against diarrhoea (Demirci et al., 2003). The dried leaf and

twig of *C. coggygia* are used in Chinese traditional medicine to eliminate «dampness» and «heat», and as an antipyretic (Huang, 1999).

Extracts of aromatic plants obtained using organic solvents or fluidized gasses, essential oils, fractions and isolates of extracts, and essential oils are utilized in flavor and fragrance, food, perfumery, cosmetics and toiletries, fine chemicals, and the pharmaceutical industry and in therapy. They are used as such or in diluted forms in the budding aromatherapy sector.

The objectives of this study were to identify chemical components and investigate the genotoxicity of methanol extract of the plant *Cotinus coggygia* and to investigate the genetic effects of synthetic gallic acid using the SLRL test.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

Cotinus coggygia plants were collected from the Rujšće locality on Mt. Rogozna in Northern Kosovo during May-June 2007. The species was identified

and the voucher specimen was deposited (16178, BEOU) at the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade.

Chemicals

Total soluble phenolic compounds in methanol extract of *C. coggygria* stem were determined with Folin-Ciocalteu reagent (FC) using pyrocatechol as a standard. Methanol extract was soluted to a concentration of 0.02 g/mL. Of the soluted extract, 0.5 mL was mixed with 2.5 mL of FC reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and 2 mL of NaHCO₃ (7.5%). After 15 min of stirring at 45°C, the absorbance was measured at 765 nm on a spectrophotometer (ISKRA, MA9523-SPEKOL 211).

The concentration of total phenolic compounds in the *C. coggygria* stem was determined as mg of pyrocatechol equivalent/g of dry weight of extract using an equation obtained from the standard pyrocatechol graph. All samples were analyzed in three replications.

The flavonoid fraction was precipitated by mixing 10 mL of the extract dissolved in methanol (0.02 g/mL) with 10 mL of HCl (1: 3) and 5 mL of HCHO (8 mg/mL). After 24 h, the mixture was filtered through filter paper (Whatman No. 5). Nonflavonoid components were determined from the filtrate with Folin-Ciocalteu reagent using the same spectrophotometric method as for determining total phenolic concentration; absorbance was measured at 765 nm on a spectrophotometer. Nonflavonoid content was expressed as milligrams of pyrocatechol per gram

of dry weight through the calibration curve with pyrocatechol. All samples were analyzed in three replications.

Flavonoid content was determined from the residium of total phenolic and nonflavonoid content. Flavonoid content was expressed as milligrams of pyrocatechol per mg of extract. All samples were analyzed in three replications.

Synthetic gallic acid (SIGMA ALDRICH) was used for comparative analysis (Fig. 1).

Genotoxicity

The sex-linked recessive lethal test for mutagenicity (SLRL test) was performed with laboratory stocks of *Drosophila melanogaster* (obtained from the Umea Stock Center, Sweden). *Canton-S* line flies had a normal phenotype (*wild type*), while *Basc* line flies were characterized by individuals homozygous for an X-chromosome balancer carrying three genetic markers: *Bar* (*B*), which produces a narrow eye shape in homo- and hemizygous conditions and a kidney-shaped eye when heterozygous in females (the character can be regarded as partially dominant); *white-apricot* (*w^a*), which alters the red eye color to light-orange and is expressed only in homozygous females and hemizygous males; and *scute* (*sc*), which is a recessive mutation that reduces the number of thoracic bristles [the given mutation is linked with a long inversion on the X-chromosome, necessary for suppression of crossover that could potentially change the existing gene combinations on the treated chromosome (Lee et al., 1983)].

The stocks were maintained and all experiments performed under optimal conditions ($t = 25^{\circ}\text{C}$, relative humidity = 60%, 12/12 h light/dark regime) on a standard nutritive medium for *Drosophila* (corn flour, yeast, agar, sugar, and nipagin to prevent the occurrence of mold and infections).

Test procedure

Three-day-old *Canton-S* males (test group 1, $N = 30$) were starved in empty bottles for 5 h prior to the treatment, then transferred and fed in bottles containing filter paper soaked with 5% methanol

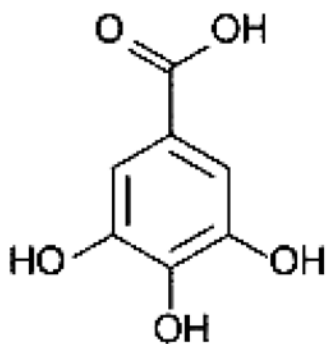


Fig 1. C₆H₂(OH)₃COOH; MW 170.12; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid).

extract for 24 h. After another 24 h of recovery on a standard medium, each male was mated individually to three *Basc* females in bottles, which yielded brood I. Two days later, males were transferred to new set of vials containing three virgins of the *Basc* line (thus creating brood II). After three days, males were transferred again to fresh vials containing three *Basc* virgins (brood III). These males stayed with females for three days and were removed afterwards. Females were left alone for five days to lay eggs, and then removed.

Another group of individuals of the same age (test group 2, N = 15 males) was treated with 5% synthetic gallic acid, the solvent 1% sucrose (test group 3, N = 30 males) serving as a negative control (Lewis and Bacher, 1968).

After F₁ emerged in all three-test groups, brother-sister mating was allowed for several days, and 10 females from each vial were put individually into new vials. Each vial would give the progeny of one treated X-chromosome. In F₂, the phenotypes were scored according to eye color and shape. The absence of *wild* type males indicated the presence of a recessive lethal agent induced by the test substance.

The total number of treated X-chromosomes is equal to the sum of lethal and non-lethal cultures, and the frequency of sex-linked recessive lethal cultures was calculated from the ratio between the number of lethal cultures to the total number of treated X-chromosomes. Significance of the percentage difference of lethal cultures was determined through testing for large independent samples by testing the difference between proportions (Petz, 1985).

RESULTS

In methanol extract of *C. coggygria* (1 g), 62.50 mg of pyrocatechol equivalent of phenols was detected.

Also, 46.76 mg of flavonoids and 15.75 mg of nonflavonoids were detected in 1 g of dry weight of extract. Results of determining total phenolic, flavonoid, and nonflavonoid content are given in Table 1.

The results of testing the genotoxic effect of methanol extract (test group 1) and synthetic gallic acid (test group 2) are shown in Table 2. In our experiment, a 5% concentration of methanol extract was shown to be clearly genotoxic, inducing significant increases in the frequency of mutants in all three broods (I, II, and III). Also, 5% synthetic gallic acid induced sex-linked recessive lethal mutations on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* males in all three stages of spermatogenesis.

DISCUSSION

Plant extracts and essential oils, as well as their constituents, are used in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries (Stammati et al., 1999). Extracts of many plant species have been examined for a number of biological activities so far, and their antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anti-mutagenic, and cancer-preventive effects have been partially described (Baricevic and Bartol, 2000; Mitić et al., 2001; Vujošević and Blagojević, 2004; Faried et al., 2007).

Phytochemical investigation of methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* led to the isolation of several phenolic compounds (Stathopoulou et al., 2007; Zdunić et al., 2007). Our results demonstrate that in methanol extract of *C. coggygria* (1 g), 62.50 mg of pyrocatechol equivalent of phenols are detected.

Phenols are very important plant constituents because of their scavenging ability due to their hydroxyl groups (Hatano et al., 1989). Phenolic compounds may contribute directly to antioxidative action (Duh et al., 1999). It is suggested that

Table 1. Total phenolics, flavonoids, and nonflavonoid content of *C. coggygria* stem methanol extract.

Extract (MeOH)	Total phenolics mg/g of extract	Flavonoids mg/g of extract	Nonflavonoids mg/g of extract
	62.50 ± 2.55 mg	46.75 ± 3.05 mg	15.75 ± 1.50 mg

Table 2. Frequencies of SLRL mutations after treatment of *Drosophila melanogaster* males with methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* and synthetic gallic acid (statistically significant differences: $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$).

	Methanol extract of <i>Cotinus coggygria</i>	Synthetic gallic acid	Sucrose-negative control		
	(Test group 1)	(Test group 2)	(Test group 3)	$t_{\text{sucrose/extract}}$	$t_{\text{sucrose/gallic acid}}$
I brood Σ	269	134	300	5.45	3.02
No. of lethal	34	13	5	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.01^{**}$
% of lethal	12.64	9.7	1.67		
II brood Σ	284	130	269	2.57	2.76
No. of lethal	17	12	5	$p < 0.05^*$	$p < 0.01^{**}$
% of lethal	5.99	9.2	1.86		
III brood Σ	252	96	252	5.72	3.65
No. of lethal	43	16	6	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
% of lethal	17.06	16.6	2.38		
I + II + III Σ	805	360	821	8.15	5.42
No. of lethal	94	41	16	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
% of lethal	11.67	11.4	1.95		

polyphenolic compounds have inhibitory effects on mutagenesis and carcinogenesis in humans when up to 1.0 g is ingested daily from a diet rich in fruits and vegetables (Tanaka et al., 1998; Yoshida et al., 2000; Tsuda et al., 2004).

From alcoholic extract of *C. coggygria*, gallic acid and its derivatives methyl gallate and pentagalloyl glucose were isolated (Westenburg et al., 2000). Polyphenolic gallic acid and its derivatives are biologically active compounds present in many plants (Kahkonen et al., 1999; Lee et al., 2000). They are widespread in plant foods and beverages such as tea and wine and are present in *Cotinus coggygria*, both in the free state and as part of the tannin molecule (Trpinac et al., 1983).

Many plants and herbs have potential antioxidant activity. Gallic acid is a strong natural antioxidant (Aruoma et al., 1993; Heinonen et al., 1998; Khan et al., 2000; Zheng and Wang, 2001). It was reported as a free radical scavenger and as an inducer of differentiation and apoptosis in leukemia, lung cancer, and colon adenocarcinoma cell lines, as well as in normal lymphocyte cells (Inoue et al., 1994; Kawada et al., 2001; Salucci et al., 2002; Sohi

et al., 2003). Several plant species with anti-cancer activity have already been discovered, one of them being *Cotinus coggygria*. Gallic acid from this plant has been shown to display selective cytotoxicity against tumor cells and to induce apoptosis in tumor cells (Isuzugawa et al., 2001).

In the present study, we examined the genotoxicity of methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* and synthetic gallic acid using a short test for detection of mutagenicity under *in vivo* conditions. Our results suggest, as evident from Table 2, that the components of methanol extract of *Cotinus coggygria* in a concentration of 5% induced sex-linked recessive lethal mutations on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* (test group 1) in all three broods (I, II, and III). We used synthetic gallic acid for comparative analysis (test group 2). This polyphenolic acid was shown to be clearly genotoxic, inducing significant increases in the frequency of mutants in both post-meiotic (spermatids and spermatozooids) and pre-meiotic (spermatocytes) germ cell lines of the eukaryotic species *Drosophila melanogaster*.

Employing *in vivo* experimental methods, the

present study showed a significant genotoxic effect of gallic acid on *Drosophila melanogaster*. Also, methanol extract of the plant *Cotinus coggygia* induced mutations in male germinative cells of this eukaryotic species, while certain chemical components (except gallic acid) in methanol extract manifested a genotoxic effect. Further studies are needed to prove the genotoxicity of these chemical substances.

Acknowledgments — This study was financially supported by Grants Nos. 142025 and 143008 from the Serbian Ministry of Science.

REFERENCES

- Aruoma, O. I., Murcie, A., Butler, J., and B. Halliwell (1993). Antioxidant and pro-oxidant properties of herbs. *J. Agr. Food Chem.* **41**, 1880-1885.
- Baricevic, D., and T. Bartol (2000). The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. In: *Pharmacology. Sage. The Genus Salvia* (Ed. S. E. Kintzios), 143-184. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Demirci, B., Demirci, F., and K. H. Baser (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* Scop. from Turkey. *Flavor Fragr. J.* **18**, 43-44.
- Duh, P. D., Tu, Y. Y., and C. G. Yen (1999). Antioxidant activity of aqueous extract of harn jury (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittelwiss. Technol.* **32**, 269-277.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., and H. Kuwano (2007). Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Intern. J. Oncol.* **30**, 605-613.
- Grieve, M. A. (1971). *Modern Herbal*, 779-781. Dover Publications Inc., NY.
- Hatano, T., Redamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., and E. Yasuhara (1989). Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016-2021.
- Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J., and A. I. Hopia (1998). Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 25-31.
- Huang, K. C. (1999). *The Pharmacology of Chinese Herbs*, 193-194. CRC Press.
- Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihara, Y., and Y. Yabu (1994). Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 898-904.
- Isuzugawa, K., Ogihara, Y., and M. Inoue (2001). Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 249-253.
- Josifović, M., Stjepanović, L., Janković, M. M., Gajić, M., Kojić, M., and M. Diklić (1973). *Flora of Serbia*, 58. Serbian Academy of Sciences, Belgrade.
- Kahkonen, P. M., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., and M. Heinonen (1999). Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 3954-3962.
- Kawada, M., Ohno, Y., and Y. Ri (2001). Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* **12**, 847-852.
- Khan, N. S., Ahmad, A., and S. M. Hadi (2000). Antioxidant pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem. Biol. Interact.* **125**, 177-189.
- Lee, M. W., Lee, Y. A., Park, H. M., Toh, S. H., Lee, E. J., Jang, H. D., and Y. H. Kim (2000). Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 455-458.
- Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Halle, E. S., Wurgler, F. E., and S. Zimmering (1983). The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*: a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* **123**, 183-297.
- Lewis, E. B., and F. Bacher (1968). Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Inform. Serv.* **48**, 193.
- Mitić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Berić, T., Nikolić, B., Stanković, S., and D. Simić (2001). Natural antioxidants and their mechanisms in inhibition of mutagenesis. In: *Molecular and Genetic Interactions Involving Phytochemicals* (Eds. M. Kreft and V. Škrabanja), 67-74. Univ. Ljubljana and Slovenian Academy of Sciences and Arts, Ljubljana.
- Novaković, M., Vučković, I., Janačković, P., Soković, M., Tešević, V., and S. Milosavljević (2007). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygia* from Serbia. *J. Serb. Chem. Soc.* **72**, 1045-1051.
- Petz, B. (1985). *Osnovne statističke metode za nematematičare*. SNL, Zagreb, Croatia.
- Salucci, M., Stivala, L. A., Maiani, G., Bugianesi, R., and V. Vanini (2002). Flavoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *Br. J. Cancer* **86**, 1645-1651.
- Sohi, K. K., Mittal, N., Hundal, M. K., and K. L. Khanduja (2003). Gallic acid an antioxidant, exhibits anti-apoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **49**, 221-227.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H. L., and A. von Wright (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assay. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 813-823.

- Stathopoulou, K., Magitis, P., Karapanagiotis, I., Valianou, L., and Y. Chrysoulakis (2007). Phytochemical analysis of *Cotinus coggygria* heartwood. Identification of isolated colorants in historical art objects. *Planta Med.* **73**.
- Tanaka, M., Kuei, C. W., Nagashima, Y., and T. Taguchi (1998). Application of antioxidative millirad reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**, 1409-1414.
- Trpinac P., Rotović, B., and O. Stefanović (1983). *Osnovi organske hemije*, 195 pp. Medicinska knjiga, Zagreb.
- Tsankova, E. T., Dyulgerov, A. S., and B. K. Milenkov (1993). Chemical composition of the Bulgarian sumac oil. *J. Essent. Oil Res.* **5**, 205-207.
- Tsuda, H., Ohshima, Y., and H. Nomoto (2004). Cancer prevention by natural compounds. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **19**, 245-263.
- Vujošević, M., and J. Blagojević (2004). Antimutagenic effect of extract from sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system *in vivo*. *Acta Vet. Hung.* **52**, 439-443.
- Westenburg, H. E., Lee, K. J., Lee, S. K., Fong, H. H. S., Breemen, R. B. V., Pezzuto, J. M., and A. D. Kinghorn (2000). Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *C. coggygria*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1696-1698.
- Yoshida, T., Hatano, T., and H. Ito (2000). Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. *Biofactors* **13**, 121-125.
- Zdunić, G., Stević, T., Šavikin, K., Menković, N., and T. Janković (2007). Antimicrobial activity of some medicinal plants growing in Serbia and Montenegro. *Planta Med.* **73**.
- Zheng, W., and S. Y. Wang (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 5165-5170.

ГЕНОТОКСИЧНО ТЕСТИРАЊЕ МЕТАНОЛСКОГ ЕКСТРАКТА БИЉКЕ *COTINUS COGGYGRIA* И ГАЛНЕ КИСЕЛИНЕ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

СНЕЖАНА СТАНИЋ¹, САЊА МАТИЋ¹, СЛАВИЦА СОЛУЈИЋ², И ТАЊА МИЛОШЕВИЋ²

¹Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу,
34000 Крагујевац, Србија

²Институт за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија

Испитиван је генотоксични ефекат метанолског екстракта биљке *Cotinus coggygria* и галне киселине вештачког порекла коришћењем SLRL теста. Повећање фреквенције полно везаних рецесивних летала код тестираних група мужјака еукариотске врсте *Drosophila melanogaster*, у односу на

негативну контролу представља позитиван резултат. Статистички значајне разлике установљене за I, II и III легло указују на подједнаку осетљивост ћелија премејотичког и постмејотичког ступња сперматогенезе на компоненте метанолског екстракта и галну киселину вештачког порекла.