

## EVALUACIJA ANTIGENOTOKSIČNOG POTENCIJALA SALVIANOLIČNE KISELINE B U PRISUSTVU VODONIK-PEROKSIDA NA LEUKOCITIMA PERIFERNE KRVI IN VITRO

Milena Janković<sup>1</sup>, Lada Živković<sup>2</sup>, Andrea Pirković<sup>2</sup>, Dijana Topalović<sup>2</sup>,

Dragana Dekanski<sup>3</sup>, Vladan Bajić<sup>4</sup>, Biljana Spremo-Potparević<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za fiziologiju, Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Institut za istraživanje i razvoj, Galenika a. d., Beograd, Srbija

<sup>4</sup>Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearna istraživanja „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

## EVALUATION OF ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF SALVIANOLIC ACID B WITH HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN VITRO

Milena Jankovic<sup>1</sup>, Lada Zivkovic<sup>2</sup>, Andrea Pirkovic<sup>2</sup>, Dijana Topalovic<sup>2</sup>,

Dragana Dekanski<sup>3</sup>, Vladan Bajic<sup>4</sup>, Biljana Spremo-Potparevic<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Institute of Physiology, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Biomedical Research, R&D Institute, Galenika a.d., Belgrade, Serbia

<sup>4</sup>Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, Institute for Nuclear Research "Vinča", University of Belgrade, Belgrade, Serbia

### SAŽETAK

*Cilj.* Oksidativni stres je posledica prekomerne produkcije slobodnih radikala i nastaje usled poremećaja u ravnoteži oksido-redukcionih procesa. Salvianolična kiselina B je polifenolno jedinjenje, poreklom iz biljke *Salvia miltiorrhiza* Bunge, koje je pokazalo značajna antioksidativna svojstva. Cilj rada bio je da se ispita genotoksični potencijal salvianolične kiseline B i izvrši evaluacija njene antigenotoksične aktivnosti na DNK oštećenja indukovana vodonik-peroksidom u leukocitima periferne krvi in vitro, primenom alkalnog Komet testa.

*Materijal i metode.* Procenjena je sposobnost različitih koncentracija salvianolične kiseline B (12,5 µM, 25 µM i 50 µM) da redukuju broj ćelija sa DNK oštećenjem izazvanim vodonik-peroksidom kao oksidansom u okviru dva eksperimentalna protokola: pretretmana i kotretmana radi utvrđivanja antigenotoksičnosti na preventivnom i interventnom nivou.

*Rezultati.* Rezultati su pokazali da salvianolična kiselina B, nakon 30 minuta inkubacije, nije ispoljila genotoksičan efekat u ispitivanim koncentracijama. U pretretmanu, koncentracija od 50 µM pokazala je značajnu redukciju DNK oštećenja indukovanih vodonik-peroksidom. Salvianolična kiselina B bila je efikasnija u redukciji DNK oštećenja u kotretmanu, gde su koncentracije od 25 µM i 50 µM pokazale značajan efekat redukcije nivoa DNK oštećenja. Pokazani protektivni efekat salvianolične kiseline B zavisio je od koncentracije.

*Zaključak.* Dobijeni rezultati pokazali su da salvianolična kiselina B ima izraženiji antigenotoksični efekat na interventnom nivou, što je čini potencijalnim agensom za primenu kod oboljenja u kojima oksidativna DNK oštećenja imaju važnu ulogu.

**Cljučne reči:** salvianolična kiselina B, antigenotoksičnost, oksidativni stres, Komet test, DNK oštećenje.

### ABSTRACT

*Aim.* Oxidative stress is a consequence of the increased production of free radicals that is caused by the disturbance in the balance of oxidation-reduction activity. Salvianolic acid B is a polyphenol compound, derived from the plant *Salvia miltiorrhiza* Bunge, which showed significant antioxidant properties. The aim of this study is the investigation of genotoxic potential of salvianolic acid B and evaluation of its antigenotoxic activity against the DNA damage induced by hydrogen peroxide in peripheral blood leukocytes in vitro, using the alkaline Comet assay.

*Materials and Methods.* The evaluation of the ability of various concentrations of salvianolic acid B (12.5µM, 25µM and 50 µM) to reduce the number of cells with DNA damage caused by hydrogen peroxide as an oxidant was performed under two experimental protocols: pretreatment and cotreatment, in order to determine antigenotoxicity on preventive and intervention levels.

*Results.* Results indicate that the salvianolic acid B did not exhibit a genotoxic effect after 30 minutes of incubation, in the tested concentrations. In the pretreatment, a concentration of 50 µM showed a significant decrease of the hydrogen peroxide induced DNA damage. Salvianolic acid B was more effective in reducing DNA damage in cotreatment, where concentrations of 25 µM and 50 µM demonstrated a significant abrogation of DNA damage. Protective effect of salvianolic acid B was dependent on the concentration.

*Conclusions.* The results showed that salvianolic acid B has pronounced antigenotoxic effect on the intervention level, which makes it a potential agent in treatment of diseases in which oxidative DNA damage plays an important role.

**Keywords:** salvianolic acid B, antigenotoxicity, oxidative stress, Comet assay, DNA damage.

## UVOD

Oksidativni stres nastaje zbog prekomerne produkcije slobodnih radikala koja se javlja usled poremećaja u ravnoteži oksido-redukcionih procesa. Jedan je od uzročnika poremećaja u organizmu koji se nalaze u osnovi oboljenja kao što su kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, infektivne i neurodegenerativne bolesti, dijabetes melitus, autoimune bolesti i neke vrste karcinoma (1, 2). U uslovima povišene koncentracije slobodnih radikala oštećuju se DNK, lipidi i proteini, pri čemu zbog oksidacije dolazi do promene njihovog funkcionalnog stanja. Slobodni radikali mogu da budu uzročnici različitih modifikacija molekula DNK poput oštećenja baza, oštećenja šećera i nastanka DNK-protein adukata (3, 4). Vodonik-peroksid prolazi kroz akvaporine na ćelijskoj membrani (5), zatim dopire do jedra i izaziva oksidativna oštećenja DNK molekula generisanjem slobodnih hidroksilnih radikala (6). Visokoreaktivni slobodni hidroksilni radikali nastaju u reakciji vodonik-peroksida sa slobodnim dvovalentnim jonima gvožđa (7) ili bakra (8).

Koren kineske žalfije (*Salviae miltiorrhizae radix*) koristi se u Kini, Koreji, Japanu u tretmanu kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih i hepatičkih bolesti, pneumonije, hroničnog nefritisa i vaskularnih komplikacija dijabetesa melitusa (9, 10). Godine 1934. prvo je detektovan sastojak tanšinson IIa (11), a od tada je identifikovano i izolovano više od 100 sastojaka (12). Hidrosolubilni sastojci korena dele se na derivate fenola (protokatehuinski aldehid, protokatehuinska kiselina, kofeinska kiselina i 3,4-dihidroksi fenil mlečna kiselina) i derivate polifenola (rozmarinska kiselina, litosperminska kiselina, salvianolična kiselina A, salvianolična kiselina B i ostale salvianolične kiseline). Sastojci lipidne frakcije su tanšinson I, tanšinson IIA, tanšinson IIB, kriptomtanšinson i ostali derivati tanšinsona (10).

Salvianolična kiselina B (Sal B), polifenolno jedinjenje izolovano iz biljke *Salvia miltiorrhiza* Bunge, pokazala je u prethodnim istraživanjima značajna antioksidativna i citoprotektivna svojstva (13,14). Sal B je prisutna kao sastojak i u drugim *Salvia* vrstama koje rastu na području Kine (15), ali je sadrže i neke biljke iz familije Boraginaceae (16). Sal B ima dugogodišnju primenu u kineskoj tradicionalnoj medicini kao hepatoprotektivni i antikancerski agens (18). Međutim, poslednjih nekoliko godina, najveći klinički značaj pokazala je kao snažan antioksidans za kardiovaskularnu zaštitu (17). Sal B pokazuje sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, vodonik-peroksida i superoksidnog anjona u endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene (18). Sal B ima veći kapacitet neutralizacije slobodnih hidroksilnih radikala i aktivnosti vodonik-peroksida od vitamina C (19). Osim što ispoljava protektivni efekat protiv direktnog dejstva

slobodnih radikala, utvrđeno je i da štiti od toksičnih dejstava lekova na kardiomiocitima (20, 21). Pokazano je i da Sal B, zahvaljujući svom antioksidativnom kapacitetu, sprečava oksidativna oštećenja mitohondrijske DNK *in vitro* i *in vivo* u ćelijama bubrega (22).

Cilj rada bila je evaluacija genotoksičnosti Sal B i njenog antigenotoksičnog potencijala u odnosu na oštećenja DNK molekula koja izaziva vodonik-peroksid kao oksidans, na humanim leukocitima periferne krvi *in vitro*, primenom alkalnog Komet testa (engl. *Comet assay*).

## MATERIJAL I METODE

*Uzorci.* Uzorci periferne krvi uzeti od tri zdrava dobrovoljca starosti između 23 i 40 godina sakupljeni su u tube s heparinom. Ispitanici nisu bili pušači, nisu koristili alkohol, lekove i dijetetske suplemente tokom trajanja studije. Protokoli i informisani pristanak dobrovoljaca odobrio je Etički komitet Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

*Salvianolična kiselina B.* Sal B (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) u suvoj formi u vidu praha rastvorena je u fosfatnom puferu da bi se dobile tri različite koncentracije: 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M i 50  $\mu$ M.

Dizajn eksperimenta. Genotoksičnost Sal B evaluirana je u odnosu na poznati oksidans vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS No. 7722-84-1, ZORKA Pharma, Šabac, Srbija) kao pozitivne kontrole i rastvarač – fosfatni pufer (PBS, Institut za imunologiju i virusologiju, Torlak, Beograd, Srbija) kao negativne kontrole. Uzorci leukocita periferne krvi inkubirani su s različitim koncentracijama Sal B na 37°C, tokom 30 minuta, radi procene njihove sposobnosti da izazovu DNK oštećenja. Istovremeno su postavljeni i kontrolni uzorci koji su tretirani PBS-om, kao negativnom kontrolom i 50  $\mu$ M vodonik-peroksidom kao pozitivnom kontrolom. Koncentracija od 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odabrana je kao najmanja koncentracija koja je izazivala značajno visok nivo DNK oštećenja nakon 30 minuta inkubacije na ćelijama u poređenju s netretiranim ćelijama. Antigenotoksični/genoprotektivni potencijal Sal B u odnosu na DNK oštećenja indukovana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u humanim leukocitima periferne krvi evaluiran je u dva eksperimentalna protokola: pretretmana i kotretmana. U pretretmanu, leukociti su tokom 30 minuta inkubirani na 37°C sa Sal B u tri izabrane koncentracije, a zatim tretirani 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 4°C, 20 minuta. U kotretmanu, uzorci su istovremeno tretirani vodonik-peroksidom u koncentraciji od 100  $\mu$ M i Sal B u tri različite koncentracije (12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) na 37°C, 30 minuta.

*Komet test.* Komet test (engl. *Comet assay* ili *single cell gel electrophoresis – SCGE*), tehnika za merenje i analizu DNK oštećenja na pojedinačnim ćelijama, može se primeniti u *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo sistemima*. Metoda se

može sprovesti na gotovo svakom tipu ćelija kao i na leukocitima periferne krvi koji su predmet tretmana u ovom radu. Komet testom se mogu uspešno proceniti interakcije antioksidanasa i genotoksičnih agenasa (23), a pouzdano se koristi i za ispitivanje efekta određenih supstanci na očuvanje integriteta genetičkog materijala (24, 25, 26). Komet test su prvobitno razvili Ostling i Johanson (27) 80-ih godina, a kasnije su Singh i sar. (28) modifikovali protokol i dizajnirali alkalni Komet test, verziju primenjenu u ovom eksperimentalnom radu.

Pre početka eksperimenta, mikroskopske pločice su presvučene slojem 1% agaroze normalne tačke topljenja (engl. *Normal melting point agarose*, *Sigma-Aldrich*, *St. Louis, MO*) i ostavljene tokom tri dana na sobnoj temperaturi da bi se osušile. Uzorci krvi (po 6  $\mu\text{L}$ ) zatim su resuspendovani u 90  $\mu\text{L}$  0,67% agaroze niske tačke topljenja (engl. *Low melting point agarose*) i nanoseni pipetom na prethodno osušene agarozne pločice preko kojih su stavljene staklene ljustice. Posle skidanja ljustica, uzorci su tretirani po dizajniranom eksperimentalnom protokolu (pretretman i kotretman), a zatim su pločice s tretiranim uzorcima prekrivene trećim slojem 0,5% agaroze niske tačke topljenja. Pločice su zatim ohlađene 5 min na 4°C radi stvrdnjavanja agaroze. Nakon učvršćivanja agaroze i skidanja ljustica pločice s uzorcima potopljene su preko noći na 4°C u kivete s prethodno pripremljenim rastvorom za liziranje (2,5 M NaCl, 0,100 mM EDTA, 0,10 mM Tris, 1% Triton X100 i 10% dimetilsulfoksid) koji će ukloniti sve ćelijske strukture i ostaviti jedarnu DNK između slojeva agaroze. Sledećeg dana, uzorci su podvrgnuti elektroforezi (25 V, 300 mA, 30 min) radi razdvajanja negativno naelektrisanih fragmenata DNK. Nakon elektroforeze, uzorci su tri puta ispirani neutrališućim puferom (0,4 M Tris, pH 7,5) u intervalima od po 5 minuta. Zatim, uzorci su obojeni etidijum-bromidom (20  $\mu\text{g/ml}$ ) radi vizuelizacije kometa. Nakon bojenja, uzorci su posmatrani pod mikroskopom (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Germany), koji je opremljen fluorescentnom lampom (HBO 50 W, 516–560 nm, Zeiss), sa objektivom koji uveličava 100 puta.

Stepen DNK oštećenja evaluiran je na osnovu metode Anderson i sar. (29). Naime, fragmenti oštećenog DNK lanca migriraju iz jedra pod uticajem električnog polja i distribuiraju se u vidu „repa“, dobijajući izgled komete. Stepent fragmentacije DNK srazmeran je dužini i gustini materijala u repu komete. Komete su na osnovu vizuelne procene klasifikovane u pet kategorija: (A) bez oštećenja < 5%; (B) nizak nivo oštećenja 5–20%; (C) srednji nivo oštećenja 20–40%; (D) visok nivo oštećenja 40–95%; (E) totalno oštećenje > 95%.

Na svakoj pločici brojano je po 100 kometa koje su klasifikovane u odgovarajuće kategorije prema stepenu oštećenja DNK. Za svaki individualni tretman

pripremljene su pločice sa ćelijama u duplikatu, a ćelije su dobijene iz uzoraka tri različita ispitanika. Vrednosti prikazane u radu izražene su kao zbir broja ćelija sa DNK oštećenjem (kategorije kometa B + C + D + E), koje su izračunate za sva tri ispitanika.

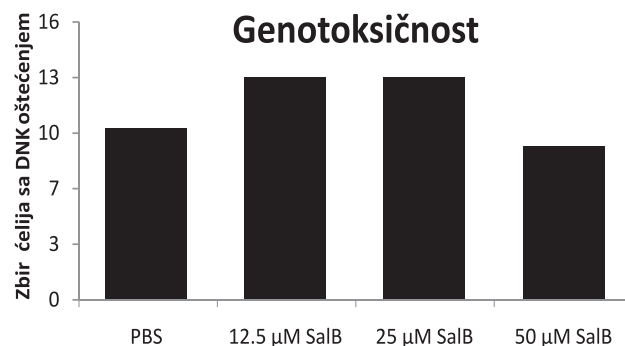
*Statistička analiza.* Dobijeni podaci statistički su obrađeni upotrebom Hi-kvadrat testa ( $\chi^2$ -test). Kao granica statističke značajnosti uzeta je vrednost  $p < 0,05$ .

## REZULTATI

*Genotoksičnost salvianolične kiseline B.* Rezultati ispitivanja genotoksičnosti Sal B prikazani su na Histogramu 1. Ispitana je sposobnost salvianolične kiseline B da u koncentracijama od 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  indukuje DNK oštećenja u leukocitima periferne krvi. Dobijeni rezultati pokazuju da ispitivane koncentracije Sal B nisu značajno povećale ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjem, u poređenju sa negativnom kontrolom tretiranom samo sa PBS-om.

### Histogram 1.

Pretretman protokol. Rezultati dobijeni u pretretmanu prikazani su na Histogramu 2. Ispitan je genoprotektivni efekat Sal B protiv DNK oštećenja koja su indukovana 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u humanim leukocitima periferne krvi. U pretretmanu, pri svim ispitivanim koncentracijama salvianolične kiseline B (12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) nivo ukupnog DNK oštećenja smanjen je u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$ ), ali statistički značajnu redukciju oštećenja pokazuje samo koncentracija Sal B od 50  $\mu\text{M}$ .

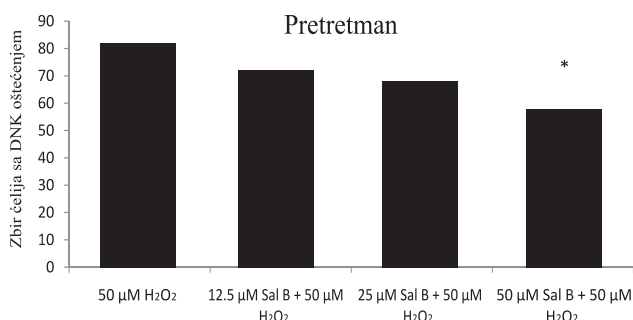


Histogram 1. Genotoksičnost salvianolične kiseline B

### Histogram 2.

*Kotretman protokol.* Rezultati dobijeni u kotretmanu prikazani su na Histogramu 3. U kotretmanu nivo ukupnog DNK oštećenja smanjen je u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ ) pri svim ispitivanim koncentracijama Sal B. Statistički značajnu redukciju oštećenja pokazuje kotretman 100  $\mu\text{M}$  vodonik-peroksida i 25  $\mu\text{M}$  Sal B, kao i 50  $\mu\text{M}$  Sal B.

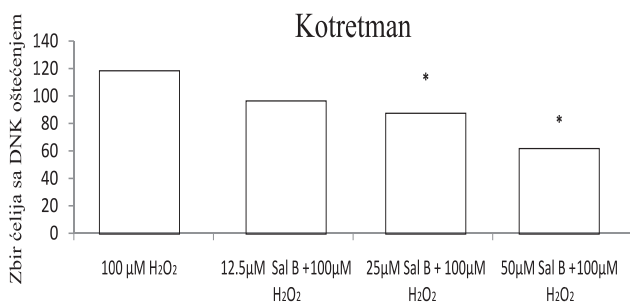




*Histogram 2. Pretretman protokol: zbir ćelija sa DNK oštećenjem koje su prvo tretirane Sal B u tri ispitivane koncentracije, a zatim oksidansom vodonik-peroksidom 50 µM, \*p < 0,05 vs. H2O2*

### Histogram 3.

Sal B efikasnije redukuje DNK oštećenja kada se primenjuje u kotretmanu nego u pretretmanu jer je statistički značajna redukcija oštećenja DNK u kotretmanu pokazana u koncentraciji i od 50 µM i od 25 µM, dok je u pretretmanu statistički značajnu redukciju DNK oštećenja pokazala samo koncentracija Sal B od 50 µM. Postoji koncentraciona zavisnost u odnosu na ispoljeni efekat Sal B i u pretretmanu i u kotretmanu zato što se ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjem smanjuje sa povećanjem koncentracije Sal B.



*Histogram 3. Kotretman protokol: zbir ćelija sa DNK oštećenjem koje su istovremeno tretirane salvianoličnom kiselinom B u tri različite koncentracije i oksidansom vodonik-peroksidom 100 µM, \*p < 0,05 vs. H2O2*

## DISKUSIJA

Na stanje intracelularne oksidativne ravnoteže utiču složeni procesi endogenog i egzogenog oksidativnog stresa i antioksidativnih mehanizama odbrane (30). Ukoliko dođe do oksidativnog disbalansa i povećanja produkcije slobodnih radikala, mogu se javiti oksidativna oštećenja biomolekula u ćelijama i pojave patoloških promena. Radi zaštite od štetnog dejstva oksidativnog stresa u ćeliji je razvijen kompleksan antioksidativni sistem koji uključuje: antioksidativne enzime; proteine koji vezuju metale, slobodno gvožđe i jone bakra koji katalizuju oksidativne reakcije; ćelijske antioksidanse

male molekulske mase. Osim endogenih antioksidanasa, ćelije mogu koristiti i antioksidanse poreklom iz hrane, kao što su vitamin C, vitamin E i polifenoli (31).

Sal B, polifenolno jedinjenje, snažan je antioksidans. Utvrđeno je da Sal B dostiže maksimum koncentracija u plazmi već 0,5–1 sat nakon oralne primene i njeni metaboliti mogu biti prisutni u organizmu i nakon 180 minuta od trenutka primene (17). U dosadašnjim studijama glavni zabeleženi efekti Sal B jesu kardioprotektivna, neuroprotektivna i antitumorska svojstva, zasnovana pre svega na njenom antioksidativnom potencijalu (17, 18, 32, 33, 34). Pokazano je da Sal B štiti ćelije endotela, arterijske glatke mišićne ćelije i kardiomiocite od slobodnih radikala i peroksidacije, tako što redukuje intracelularni oksidativni stres (17). Kardioprotektivnom efektu Sal B ne doprinosi samo to što deluje kao hvatač slobodnih radikala kiseonika, već i to što smanjuje endotelnu adheziju leukocita, inhibira inflamaciju aortalnih glatkih mišićnih ćelija i indirektno reguliše imunološki sastav (16). Utvrđeno je da Sal B ublažava ishemijske povrede mozga tako što smanjuje lipidnu peroksidaciju, neutrališe slobodne radikale i poboljšava energetske metabolizam ćelija (32). Postoje dokazi koji ukazuju na to da Sal B može da smanji oksidativni stres i fibrozu jetre na modelu pacova (35).

U ovoj studiji, pomoću dva eksperimentalna protokola (pretretmana i kotretmana) evaluiran je antigenotoksičan potencijal Sal B u humanim leukocitima periferne krvi *in vitro*. Dizajnom ovih eksperimentalnih protokola moguće je pretpostaviti mehanizme delovanja Sal B na interventnom i preventivnom nivou. Takođe, utvrđen je genotoksični potencijal Sal B u ispitivanim koncentracijama, kako bi se pokazala sigurnost primene na nivou jedarne DNK.

Što se tiče sigurnosti primene Sal B, u ovoj studiji nije pokazana sposobnost Sal B da u ispitivanim koncentracijama indukuje pojavu DNK oštećenja u leukocitima periferne krvi *in vitro*, na osnovu čega se izvodi zaključak da Sal B nije genotoksična. Ovi rezultati su u skladu s podacima studije u kojoj je utvrđeno da u terapijskoj koncentraciji od 50 µg/ml, čak i u dvostruko većoj koncentraciji od terapijske (100 µg/ml), preparati koji sadrže Sal B nisu značajno uticali na normalnu sintezu DNK u kardiomiocitima, dok tek u koncentraciji većoj od 200 µg/ml mogu da dovedu do smanjene sinteze DNK (36). S druge strane, pokazano je da Sal B ima sposobnost da redukuje oksidaciju mitohondrijske DNK i produkciju 8-OHdG u ćelijama bubrega *in vitro* i *in vivo* (22).

Rezultati ove studije pokazuju da Sal B ima izražen antigenotoksični efekat i potencijal redukcije oksidativnih oštećenja jedarne DNK u leukocitima periferne krvi *in*

*vitro*. Kada je Sal B primenjena u pretretmanu, nivo ukupnog DNK oštećenja smanjen je u odnosu na pozitivnu kontrolu (50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pri svim ispitivanim koncentracijama, ali statistički značajnu redukciju DNK oštećenja pokazala je samo koncentracija od 50  $\mu\text{M}$ . I studija rađena na nervnim ćelijama (PC12) dokazuje da tretman Sal B pre izlaganja vodonik-peroksidu može da spreči nastanak oksidativnih oštećenja, što je čini potencijalnim neuroprotektivnim agensom, koji se može koristiti u terapiji Alchajmerove ili Parkinsonove bolesti (37). Pretpostavljeni genoprotektivni mehanizam Sal B u pretretmanu naše studije mogao bi da bude povećanje intracelularnog antioksidativnog enzimskog kapaciteta (38). Upotreba kineske žalfije (*Salvia miltiorrhiza*), koja kao jedan od sastojaka ima Sal B, može da poveća aktivnost katalaze i glutation peroksidaze (39), dva enzima koja su odgovorna za konverziju vodonik-peroksida do vode i kiseonika (40).

Daljim ispitivanjima, u ovoj studiji utvrđeno je da primena Sal B u kotretmanu pokazuje veću efikasnost redukcije DNK oštećenja u odnosu na primenu u pretretmanu. Naime, nivo DNK oštećenja u kotretmanu značajno je smanjen nakon istovremene inkubacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 25  $\mu\text{M}$  Sal B, kao i  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 50  $\mu\text{M}$  salvianolične kiseline B u odnosu na pozitivnu kontrolu (samo  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). S obzirom na to da je i srednja koncentracija Sal B (25  $\mu\text{M}$ ) u kotretmanu pokazala statistički značajnu redukciju DNK oštećenja, za razliku od pretretmana, gde je samo najveća koncentracija (50  $\mu\text{M}$ ) ispoljila značajan efekat, izvodi se zaključak da Sal B ima jači antigenotoksični efekat kada se primeni kao agens na interventnom nego na preventivnom nivou. Takođe, primećena je zavisnost antigenotoksičnog efekta od koncentracije Sal B, tako da su veće koncentracije pokazale efikasniju redukciju oštećenja DNK molekula. Dobijeni rezultati u skladu su s nalazima drugih autora, čija istraživanja pokazuju da primena Sal B može značajno da smanji kardiotoksične posledice primene adriamicina i doksorubicina na dozozavisani način (20, 21). Jači antigenotoksični efekat Sal B u kotretmanu verovatno je rezultat zajedničkog dejstva međusobno nezavisnih mehanizama poput reparacije DNK molekula, hvatanja slobodnih radikala i aktivacije antioksidativnih enzima. Mehanizam DNK reparacije najverovatnije ima manji uticaj jer su prethodne slične studije pokazale da značajna reparacija DNK oštećenja nastaje nakon sat vremena od izlaganja oksidativnom agensu (41), dok je u našoj studiji DNK molekul bio istovremeno izložen oksidansu i antioksidansu 30 minuta.

Veliki broj dosadašnjih studija na Sal B ukazuje na njena antioksidativna, citotoksična i antitumorska svojstva. Salvianolična kiselina B je jedan od glavnih sastojaka ekstrakta korena *S. miltiorrhize*, koji je pokazao citotoksičan efekat i sposobnost inhibicije proliferacije

HepG2 ćelija (42). Preko sledećih pretpostavljenih antikancerskih mehanizama salvianolična kiselina B može da inhibira ili uspori nastanak kancera skvamoznih ćelija glave i vrata: inhibicija COX-2/PGE-2 puta, promocija apoptoze i modulacija angiogeneze (33). Salvianolična kiselina B ima jako hemopreventivno dejstvo koje ostvaruje najverovatnije pomoću antioksidativnih i antiinflamatornih mehanizama. Naime, pretpostavlja se da je modulacija apoptoze preko vodonik-peroksida jedan od glavnih puteva za suzbijanje rasta ćelija kancera (32, 34). Do sada nisu zabeleženi efekti Sal B na integritet jedarne DNK pomoću alkalnog Komet testa i ova studija je po prvi put prikazala odsustvo genotoksičnosti i antigenotoksični potencijal Sal B.

## ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije pokazuju da salvianolična kiselina B u koncentracijama 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  ne indukuje oštećenja DNK molekula u leukocitima periferne krvi *in vitro*, tako da nije pokazano genotoksično dejstvo. U pretretman protokolu, redukcija DNK oštećenja utvrđena je pri svim ispitivanim koncentracijama, ali statistički značajnu redukciju DNK oštećenja pokazuje jedino koncentracija salvianolične kiseline B od 50  $\mu\text{M}$ . U kotretman protokolu, redukcija DNK oštećenja utvrđena je pri svim koncentracijama koje su ispitivane, ali statistički značajnu redukciju DNK oštećenja salvianolična kiselina B pokazuje i u koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$  i u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$ , što je čini pogodnijim agensom za interventni u odnosu na preventivni nivo delovanja. Dobijeni rezultati upućuju na neophodnost daljih ispitivanja mehanizama njenog dejstva.

## PRIZNANJA

Ovo istraživanje podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Srbije (Grant OI 173034) i hCOMET COST akcija (No 15132).

## SKRAĆENICE

Sal B – salvianolična kiselina B

PBS – fosfatni pufer

## LITERATURA

1. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 13–8.
2. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18:872–9.
3. Téoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1987; 51: 573–89.

4. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992; 275: 331–42.
5. Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in chara corallina: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J Exp Bot.* 2000; 51: 2053–66.
6. Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1389–94.
7. Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 1999; 21: 238–46.
8. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, et al. Copper ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1991; 273: 601–4.
9. Pang H, Wu L, Tang Y, et al. Chemical Analysis of the Herbal Medicine *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen). *Molecules* 2016; 21: 51.
10. Han JY, Fan JY, Horie Y, et al. Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 280–95.
11. Nakao M, Fukushima T. On the chemical composition of *Salvia miltiorrhiza* (Chinese drug Tan-shen). *J Pharm Soc Jpn* 1934; 54: 154–62.
12. Su CY, Ming QL, Rahman K, et al. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology. *Chin J Nat Med* 2015; 13: 163–82.
13. Jie Wang J, Xingjiang X, Feng B. Cardiovascular Effects of Salvianolic Acid B. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; Article ID 247948.
14. Lu B, Ye Z, Deng Y, et al. MEK/ERK pathway mediates cytoprotection of salvianolic acid B against oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow stem cells. *Cell Biol Int* 2010; 34: 1063–8.
15. Min-hui LI, Qian-quan LI, Yan-ze LIU et al. Pharmacophylogenetic Study on Plants of Genus *Salvia* L. from China. *Chinese Herbal Medicines*. 2012; 5: 164–81.
16. Bulgakov VP, Inyushkina YV, Fedoreyev SA. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2012; 32: 203–17.
17. Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J Biomed Sci* 2011; 18–30.
18. Lin TH, Hsieh CL. Pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) on cerebral infarction, *Chin Med* 2010; 5–22.
19. Zhao GR, Zhang HM, Ye TX, et al. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 73–81.
20. Lin TJ, Liu GT, Liu Y, et al. Protection by salvianolic acid A against adriamycin toxicity on rat heart mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 347–51.
21. Jiang B, Zhang L, Li M. et al. Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress, *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1510–5.
22. Liu X, Liu Y, Yang Y. et al. Antioxidative Stress Effects of *Salvia przewalskii* Extract and experimentally Injured Podocytes. *Nephron* 2016; 134: 253–71.
23. Gajecka M, Kujawski LM, Gawecki J, et al. The protective effect of vitamins C and E against B(a)P-induced genotoxicity in human lymphocytes, *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1999; 18: 159–67.
24. Anderson D, Phillips BJ, Yu TW, et al. The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with “low” or “high” cholesterol levels, *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 161–74.
25. Heaton PR, Reed CF, Mann SJ, et al. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs, *J Nutr* 2002; 132: 1720S–4S.
26. Novotna B, Topinka J, Solansky I, et al. Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicol Lett* 2007; 172: 37–47.
27. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291–8.
28. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1998; 175: 184–91.
29. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, et al. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat Res* 1994; 307: 261–71.
30. De Rosa S, Cirillo P, Paglia A, et al. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: cardiovascular disease: Does the actual knowledge justify a clinical approach? *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8: 259–75.
31. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem* 2006; 52: 601–23.

32. Liu CL, Xie LX, Li M, et al. Salvianolic acid B inhibits hydrogen peroxide induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling. *PloS One* 2007; 2: e1321.
33. Zhao Y, Guo Y, Gu X. Salvianolic Acid B, a Potential Chemopreventive Agent, for Head and Neck Squamous Cell Cancer. *J Oncol* 2011; Article ID 534548.
34. Zhao Y, Hao Y, Ji H, et al. Combination Effects of Salvianolic Acid B with Low Dose Celecoxib on Inhibition of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Growth in vitro and in vivo, *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 787–96.
35. Tsai MK, Lin YL, Huang YT. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 242: 155–64.
36. Ling S, Luo R, Dai A, et al. A pharmaceutical preparation of *Salvia miltiorrhiza* protects cardiac myocytes from tumor necrosis factor-induced apoptosis and reduces angiotensin II-stimulated collagen synthesis in fibroblasts. *Phytomedicine*. 2009; 16: 56–64.
37. Liu CS, Chen NH, Zhang JT. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *Radix Salviae miltiorrhizae*, *Phytomedicine* 2001; 14: 492–7.
38. Čabarkapa A, Živković L, Žukovec D. et al. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes, *Toxicol in Vitro* 2014; 8: 451–6.
39. Chang CC, Chang YC, Hu WL, et al. Oxidative Stress and *Salvia miltiorrhiza* in Aging-Associated Cardiovascular Disease, *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 4797102.
40. Han J, Shuvaev VV, Muzykantov VR. Catalase and superoxide dismutase conjugated with platelet-endothelial cell adhesion molecule antibody distinctly alleviate abnormal endothelial permeability caused by exogenous reactive oxygen species and vascular endothelial growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338: 82–91.
41. Chiamonte R, Bartolini E, Riso P, et al. Oxidative stress signaling in the apoptosis of Jurkat T-lymphocytes. *J Cell Biochem* 2001; 82: 437–44.
42. Jiang Y, Zhang L, Rupasinghe HP. Antiproliferative effects of extracts from *Salvia officinalis* L. and *Salvia miltiorrhiza* Bunge on hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2017; 85: 57–67.