

In vitro učinci ekstrakta cvijeta trnine

Negovec, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:296802>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Katarina Negovec, 816/N

***IN VITRO* UČINCI EKSTRAKTA
CVIJETA TRNINE**

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ (2014.-2018.), „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane“ (IP-PE-FF).

Rad je izrađen je u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Kmetič te uz pomoć asistentice dr. sc. Teute Murati i asistentice Marine Miletić, mag. ing.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivani Kmetič na prihvaćanju mentorstva, vodstvu i pruženom znanju pri izradi diplomskog rada. Zahvaljujem i asistenticama dr. sc. Teuti Murati i Marini Miletić, mag. ing., na velikoj podršci i pomoći u izvedbi rada. Osim na izuzetnoj profesionalnoj korektnosti zahvaljujem im na pristupačnosti, susretljivosti, ljubaznosti i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem mojoj obitelji, mami, tati, sestri Kristini i Tomislavu na ohrabrivanju i podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

IN VITRO UČINCI EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE

Katarina Negovec, 816/N

Sažetak: U radu je ispitan učinak etanolnog ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) na vijabilnost i proliferaciju mišjih kancerogenih Hepa 1-6 i nekancerogenih AML 12 stanica jetre, nakon 24 i 72 sata, *Trypan Blue* metodom i protočnom citometrijom. Za tretman Hepa 1-6 stanica korištene su koncentracije ekstrakta cvijeta trnine od 10 do 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a za AML 12 stanice od 5 do 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Utvrđeno je da ekstrakt cvijeta trnine ima statistički značajan inhibicijski učinak na proliferaciju stanica nakon 24-satne inkubacije, kod Hepa 1-6 stanica pri koncentracijama većim od 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a kod AML 12 stanica pri svim ispitanim koncentracijama izuzev 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tijekom perioda od 72 sata kod obje stanične linije pri svim ispitanim koncentracijama utvrđen je inhibitorski učinak ekstrakta cvijeta trnine. Iz izračunatih i uspoređenih IC_{50} vrijednosti, ekstrakt cvijeta trnine pokazao je jači inhibitorski učinak na AML 12 staničnu liniju. Protočnom citometrijom utvrđeno je da ekstrakt cvijeta trnine uzrokuje nekrozu stanica kod obje stanične linije.

Ključne riječi: *Prunus spinosa* L., Hepa 1-6 stanična linija, AML 12 stanična linija, *Trypan Blue* metoda, protočna citometrija

Rad sadrži: 43 stranice, 9 slika, 10 tablica, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič

Pomoć pri izradi: dr.sc. Teuta Murati, asistent
Marina Miletić, mag.ing., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović - Uzelac
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
3. prof. dr. sc. Suzana Rimac Brnčić
4. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjena)

Datum obrane: 21. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

IN VITRO EFFECTS OF BLACKTHORN FLOWER EXTRACT

Katarina Negovec, 816/N

Abstract: In this study effects of the blackthorn flower (*Prunus spinosa* L.) extract on cell proliferation and viability were examined in mouse cancer Hepa 1-6 and normal AML 12 liver cell lines using *Trypan Blue* method and flow cytometry after 24 and 72 hours. Different concentrations of blackthorn flower extract were used in treatment of cells (for Hepa 1-6 10-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and for AML 12 5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Statistically significant decrease of Hepa 1-6 cell proliferation was detected at concentrations greater than 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and AML 12 cell proliferation at all examined concentrations, excluding 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, after 24 hours. Statistically significant decrease of Hepa 1-6 and AML 12 cell proliferation was detected after 72 hours at all concentrations. According to calculated and compared IC_{50} values blackthorn flower extract has shown stronger inhibitory effect on AML 12 cell line. Results obtained with flow cytometry have shown that blackthorn flower extract causes necrosis of both cell lines.

Keywords: *Prunus spinosa* L., Hepa 1-6 cell line, AML 12 cell line, *Trypan Blue* method, flow cytometry

Thesis contains: 43 pages, 9 figures, 10 tables, 39 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor

Technical support and assistance: PhD. Teuta Murati, Scientific Assistant
BSc. Marina Miletić, Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. Verica Dragović - Uzelac, Full Professor
2. PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor
3. PhD. Suzana Rimac Brnčić, Full Professor
4. PhD. Igor Slivac, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 21 July 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BOTANIČKI PODACI O TRNINI (<i>Prunus spinosa</i> L.)	2
2.1.1. TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA	3
2.1.2. KEMIJSKI SASTAV	3
2.1.3. UPOTREBA I ZDRAVSTVENI UTJECAJ	4
2.2. KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA	4
2.2.1. AML 12 (<i>Alpha Mouse Liver</i> 12) STANIČNA LINIJA	6
2.2.2. HEPA 1-6 (<i>Hepatoma</i> 1-6) STANIČNA LINIJA	7
2.3. STANIČNA SMRT	8
2.3.1. RAZLIKE IZMEĐU APOPTOZE I NEKROZE	9
2.4. <i>IN VITRO</i> TESTOVI TOKSIČNOSTI	12
2.4.1. TRIPAN PLAVO (<i>TRYPAN BLUE</i>) METODA	13
2.4.2. PROTOČNA CITOMETRIJA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. BIOLOŠKI MATERIJALI	16
3.1.2. KEMIKALIJE	16
3.1.3. OTOPINE I PUFERI	17
3.1.4. OPREMA I UREĐAJI	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. ODRŽAVANJE Hepa 1-6 I AML 12 STANICA U KULTURI	21
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA METODOM <i>TRYPAN BLUE</i>	22
3.2.3. ODREĐIVANJE UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST HEPA 1-6 STANICA	23
3.2.4. ODREĐIVANJA UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST AML 12 STANICA	23
3.2.5. ODREĐIVANJE UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST HEPA 1-6 I AML 12 STANICA PROTOČNOM CITOMETRIJOM	23
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST HEPA 1-6 STANICA <i>TRYPAN BLUE</i> METODOM	25
4.1.1. IC (<i>Inhibitory Concentration</i>) VRIJEDNOSTI ZA EKSTRAKT CVIJETA TRNINE NA HEPA 1-6 STANIČNOJ LINIJI	26
4.1.2. VIJABILNOST HEPA 1-6 STANICA ODREĐENA METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE NAKON TRETMANA STANICA S EKSTRAKTOM CVIJETA TRNINE	29

4.2. UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST AML 12 STANICA ODREĐEN <i>TRYPAN BLUE</i> METODOM	32
4.2.1. IC (<i>Inhibitory Concentration</i>) VRIJEDNOSTI ZA EKSTRAKT CVIJETA TRNINE NA AML 12 STANIČNOJ LINIJI	33
4.2.2. VIJABILNOST AML 12 STANICA ODREĐENA METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE NAKON TRETMANA STANICA S EKSTRAKTOM CVIJETA TRNINE	35
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je biljka iz porodice ruža (*Rosaceae*), roda *Prunus* (Marakoğlu i sur., 2005). To je višegodišnja biljka koja raste u umjerenoj kontinentalnoj klimi na sjevernoj polutki (Veličković i sur., 2014). Plodovi trnine su okrugle, tamnoplave koštunice (Gelenčir, 1989), ali su unatoč sočnom izgledu, relativno gorki za ljudsku konzumaciju (Baytop, 1984), međutim, mogu se koristiti u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova i različitih napitaka (Veličković i sur., 2014), npr. domaćeg vina, aroma za gin (Janick i Moore, 1996) ili aroma u likerima (Baytop, 1984). Plodovi se mogu sušiti i koristiti kao čaj, prerađivati u sokove, marmelade, ocat itd. (Šilić, 1990). Trnina se koristi u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti (Veličković i sur., 2014). Njezina upotreba može biti dobra u slučajevima ekcema, herpesa, alergije, prehlade, bubrežnih kamenaca, probavnih smetnji te poremećaja kože i mjehura (Radovanović i sur., 2013).

Animalne stanične kulture postale su esencijalne za istraživanje biokemijskih i fizioloških procesa. Danas se kultura uzgoja stanica preferira više od uzgoja čitavih organa. Uvjeti moraju biti kontrolirani kako bi se osigurao stupanj dosljednosti i reproducibilnosti staničnog rasta (Butler, 2004), a testovima je omogućena: kontrola okolišnih uvjeta, karakterizacija i homogenost uzoraka, *in vitro* imitiranje *in vivo* uvjeta te izbjegavanje pokusa na životinjama (Roche Diagnostics GmbH, 2012). *In vitro* toksikološka procjena omogućuje proučavanje učinaka kemikalija uz upotrebu stanica, staničnih komponenti i tkiva, po mogućnosti ljudskog podrijetla (The Academies, 2007). Jedna od metoda koja se uvelike koristi za ispitivanje citotoksičnosti je tripan plavo (*Trypan Blue*) metoda. Metoda se temelji na načelu da se stanična suspenzija pomiješa s bojom i zatim vizualno ispita pod mikroskopom, kako bi se odredilo da li se stanice oboje. Žive stanice ostaju nebojane dok se mrtve stanice oboje plavo (Strober, 2015).

Muse[™] *Annexin V & Dead Cell Assay Kit* omogućuje kvantitativnu analizu živih stanica, stanica u ranoj i u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica na protočnom citometru *Muse*[™] *Cell Analyzer*. Softver pruža rezultat u obliku koncentracije (stanice mL⁻¹) i postotaka (%) živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi i mrtvih stanica (Schmidt i sur., 1992).

Cilj ovog rada je ispitati i usporediti djelovanje etanolnog ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost i proliferaciju kancerogenih stanica jetre (Hepa 1-6) i normalnih stanica jetre (AML 12) miša *Trypan Blue* metodom te odrediti tip stanične smrti upotrebom protočne citometrije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOTANIČKI PODACI O TRNINI (*Prunus spinosa* L.)

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je biljka iz porodice ruža (*Rosaceae*), roda *Prunus* (Marakoğlu i sur., 2005). To je višegodišnja biljka koja raste u umjerenoj kontinentalnoj klimi na sjevernoj polutki (Veličković i sur., 2014). Nalazimo ju na području Europe, zapadne Azije i sjeverozapadne Afrike. Raste u obliku velikog listopadnog grma ili malog stabla do visine od 5 m (Radovanović i sur., 2013) te se može pronaći na obroncima neobrađenih područja, uz ceste, duž kanala i u područjima zaštićenima od vjetra.

Korijen biljke je razvijen, čvrst, dubok i širok. Kora je u početku crvenosmeđa, a kasnije postane tamnosiva. Pupovi su sitni, dugi oko 1-2 mm, prekriveni tamnim sivosmeđim ljuskama. Listovi su naizmjenični, jednostavni, jajasti ili eliptični i nazubljeni na rubovima. Dugački su 2-6 cm, široki 1-3 cm te se nalaze na peteljci dugoj 2-10 mm. U početku su dlakavi, a kasnije ogole. Cvjetovi su dvospolni, jednodomni, te se javljaju u mnoštvu prije listanja, od kraja ožujka do svibnja. Pojedinačni su ili skupljeni po 2-3 te imaju 5 bijelih latica dugih 5-10 mm. Listići čaške dugi su tek 1-2 mm, a prašnici su mnogobrojni. Plodovi dozrijevaju u kolovozu, a na granama ostaju sve do proljeća (Umeljić, 2004). Plodovi (Slika 1) su okrugle, tamnoplave koštunice (Gelenčir, 1989), međutim, unatoč sočnom izgledu relativno su gorki za ljudsku konzumaciju (Baytop, 1984). Grm živi oko 40 godina, a razmnožava se sjemenom i vegetativno. Trnina je medonosna biljka i značajna pčelinja rana paša (Umeljić, 2004).



Slika 1. Plodovi trnine (*Prunus spinosa* L.) (Plantea, 2017)

2.1.1. TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA

Latinski naziv roda *Prunus* dao je otac taksonomije Carl Linnaeus 1737. godine. Porijeklo mu je grčka riječ *prounon* što označava stablo šljive (Quattrocchi, 2012). U Tablici 1 prikazana je taksonomska hijerarhija trnine (*Prunus spinosa* L.) (ITIS, 2017).

Tablica 1. Taksonomska hijerarhija trnine (*Prunus spinosa* L.) (ITIS, 2017)

CARSTVO	<i>Plantae</i>
ODJELJAK	<i>Tracheophyta</i>
RAZRED	<i>Magnoliopsida</i>
PODRAZRED	<i>Rosanae</i>
RED	<i>Rosales</i>
PORODICA	<i>Rosaceae</i>
ROD	<i>Prunus</i>
VRSTA	<i>Prunus spinosa</i>

2.1.2. KEMIJSKI SASTAV

Zreli plodovi trnine sadrže 5-6 % šećera, oko 20 mg vitamina C, pektin i trjeslovinu. Koštice sadrže 2,6 % glikozida amigdalina, koji proizvodi vodikov cijanid, zbog čega su otrovne (Grlić, 1990). Biljka sadrži flavonoide, rutin i hiperozid. Među izoliranim flavonoidima iz cvjetova trnine su: kampferol, kvercetin, kampferol-3-*O*- α -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-*O*- α -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-*O*- α -D-ksilopiranozid, kampferol-3-*O*- α -L-arabinofuranozid-7-*O*- α -ramopiranozid, tanini, 2 % organskih kiselina i voda (Veličković i sur., 2014). U istraživanju Olszewska i Wolbisa (2002) iz cvjetova trnine izolirano je još 7 flavonoida: kampferol 3,7-di-*O*- α -L-ramnopiranozid (kampferitrin), kvercetin 3-*O*- α -L-ramnopiranozid (kvercitrin), kampferol 3-*O*-(4"- β -D-glukopiranozil)- α -L-ramnopiranozid (multiflorin B), kvercetin 3-*O*-(4"- β -D-glukopiranozil)- α -L-ramnopiranozid (multinozid A), kvercetin 3-*O*- β -D-glukopiranozid (izokvercitrin), kvercetin 3-*O*- α -L-arabinopiranozid (guajjaverin), kvercetin 3-*O*- α -D-ksilopiranozid (reinoutrin). Struktura komponenata određena je kemijskim i spektrofotometrijskim metodama. Osim flavonoida, u

cvijeću trnine potvrđena je prisutnost proantocijanidina tipa A i fenolnih kiselina (Olszewska i Wolbis, 2001).

2.1.3. UPOTREBA I ZDRAVSTVENI UTJECAJ

Trnina se koristi u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti povezanih s različitim oblicima kašlja. Biljka ima antiseptički učinak (zbog prisutnosti tanina) te pozitivno djeluje na upalu sluznice probavnog sustava (Veličković i sur., 2014). Njezine pektinske komponente imaju smirujuće i opuštajuće djelovanje na upalu želuca. Trnina je izvrstan astringent. Može se koristiti u tretmanu dijareje i za stimulaciju metabolizma. Njezina upotreba može biti dobra u slučajevima ekcema, herpesa, alergije, prehlade, bubrežnih kamenaca, probavnih smetnji te poremećaja kože i mjehura (Radovanović i sur., 2013). Svježi cvjetovi trnine sadrže cijanogene glikozide, što čini biljku blagim laksativom i diuretikom (Veličković i sur., 2014).

Osim u fitoterapiji trnina se također koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova i različitih napitaka (Veličković i sur., 2014), npr. domaćeg vina, a može se koristiti i kao aroma za gin (Janick i Moore, 1996) ili aroma u likerima (Baytop, 1984). Plodovi se mogu sušiti i koristiti kao čaj, prerađivati u sokove, marmelade, ocat itd. Listovi sadrže oko 200 mg vitamina C te se također koriste kao čaj (Šilić, 1990).

2.2. KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA

Animalne stanične kulture postale su esencijalne za istraživanje biokemijskih i fizioloških procesa. Uzgoj staničnih kultura odvija se *in vitro*, suprotno od *in vivo*. Proces omogućuje svakoj stanici da se ponaša kao nezavisna cjelina poput mikroorganizama kao što su bakterije ili gljivice.

Danas se kultura uzgoja stanica preferira više od uzgoja čitavih organa. Uvjeti moraju biti kontrolirani kako bi se osigurao stupanj dosljednosti i reproducibilnosti staničnog rasta. Glavna prednost korištenja kulture stanica je konzistentnost i ponovljivost rezultata (Butler, 2004), a testovima na staničnim kulturama omogućena je: kontrola okolišnih uvjeta, karakterizacija i homogenost uzoraka, *in vitro* imitiranje *in vivo* uvjeta te izbjegavanje pokusa na životinjama (Roche Diagnostics GmbH, 2012). Korištenje staničnih kultura doprinosi boljem razumijevanju utjecaja pojedinih tvari na specifični tip stanica (npr. stanice jetre). Uz to, rutinski testovi toksičnosti na staničnim kulturama su puno jeftiniji od testova na životinjama.

Glavni nedostatak testova koji se provode na staničnim kulturama je taj da se, nakon perioda kontinuiranog rasta, karakteristike stanica mogu promijeniti i biti drugačije od originalnih. Promjene u rastu i biokemijskim karakteristikama stanične populacije mogu biti problem kada se kultura stanica koristi kako bi se razumijelo ponašanje stanica *in vivo* (Butler, 2004). Kontaminacija mikroorganizmima je velik problem koji se može javiti prilikom uzgoja staničnih kultura. Bakterije, mikoplazme, kvasci i gljivice mogu kontaminirati staničnu kulturu putem mnogih izvora, npr. laboratorijskog osoblja, atmosfere, radne opreme, otopina, instrumenata. Zato se u prostoriji za uzgoj kulture stanica treba nalaziti laminar (komora za sterilan rad), koji se koristiti za sve manipulacije s kulturom stanica. Laminar mora biti smješten daleko od bilo kakvog izvora koji može generirati zračne struje (npr. centrifuga, hladnjaci i zamrzivači). Laminar se treba uvijek pažljivo očistiti prije i nakon manipulacije sa stanicama te održavati urednim (Roche Diagnostics GmbH, 2012).

Stanice se dijele mitozom te mogu nastaviti s rastom sve dok ne budu limitirane nekim parametrom kao što je potrošnja nutrijenata. Stanice u kulturi mogu biti genetski identične (homologne) ili mogu pokazivati genetske varijacije (heterogena populacija). Homogena stanična populacija se dobiva dijeljenjem iz jedne roditeljske stanice (klon), a može biti dobivena kontroliranim rastom kroz nekoliko generacija (Butler, 2004). Stanični ciklus se sastoji od četiri faze. U M-fazi (M = mitoza), kromatin se kondenzira u kromosom i dvije pojedinačne kromatide, koje čine kromosom, a odvojene su za svaku stanicu kćer. U G1 (*Gap 1*) fazi, stanica se priprema za sintezu DNA ili reverzibilno izlazi iz staničnog ciklusa (u G0 fazu) ili se nepovratno „obvezuje“ na diferencijaciju. Tijekom G1 faze stanica prolazi kroz nekoliko tzv. kontrolnih točaka, koje određuju da li će stanica ponovno ući u ciklus, povući se iz njega ili diferencirati. Nakon G1 faze slijedi S-faza, u kojoj se sintetizira DNA. Nakon S-faze slijedi G2-faza (*Gap 2*) u kojoj se stanica priprema za ponovnu mitozu. Kontrolne točke, na početku DNA sinteze i u G2-fazi, određuju integritet DNA i hoće li zaustaviti stanični ciklus kako bi se omogućio popravak DNA ili će stanica ući u apoptozu ako je popravak nemoguć. Apoptoza ili programirana smrt stanica je regulirani fiziološki proces kojim se stanica može ukloniti iz populacije (Roche Diagnostics GmbH, 2012).

Konačan broj staničnih dioba je karakteristika staničnog tipa, starosti i vrste originala te je poznat kao „Hayflickov limit“. Stanice koje su odvojene od embrionalnog tkiva imaju veći kapacitet rasta od onih stanica koje su odvojene od odraslog tkiva. Čini se da svaka stanica ima „biološki sat“ definiran brojem dijeljenja od izvorne matične stanice (Butler, 2004).

2.2.1. AML 12 (*Alpha Mouse Liver 12*) STANIČNA LINIJA

U Tablici 2 prikazane su osnovne informacije o AML 12 (*Alpha Mouse Liver 12*), normalnoj staničnoj liniji jetre miša.

Tablica 2. Opće informacije o AML 12 (ATCC, 2016.):

Organizam	<i>Mus musculus</i> , miš
Tkivo	Jetra
Tip stanica	Hepatociti
Morfologija	Epitelne
Bolest	Normalne
Uvjeti skladištenja	Tekući dušik
Uspostava stanične linije	Stanična linija AML 12 uspostavljena je iz hepatocita miša transgeničnih za humani TGF alfa
Ekspresija gena / stanični produkti	albumin; humani transformirajući faktor rasta alfa (TGF alfa); mišji TGF alfa.
Kancerogenost	Ne
Efekti	Stanice ne tvore kolonije te ne pokazuju tumorigeni potencijal u imunosupresivnim miševima.
Kompletni medij za rast stanica	1:1 <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> : <i>Ham's F12 Medium</i> s 0,005 mg mL ⁻¹ inzulina, 0,005 mg mL ⁻¹ transferina, 5 ng mL ⁻¹ selena i 40 ng mL ⁻¹ deksametazona, 90 %; fetalni goveđi serum, 10%

Uvjeti za rast	Atmosfera: 95 % zrak, 5 % CO ₂ Temperatura: 37 °C
Vrijeme udvostručenja populacije	37 sati

2.2.2. HEPA 1-6 (*Hepatoma 1-6*) STANIČNA LINIJA

U Tablici 3 prikazane su osnovne informacije o Hepa 1-6 (*Hepatoma 1-6*) kancerogenoj staničnoj liniji jetre miša.

Tablica 3. Opće informacije o HEPA 1-6 (ATCC, 2016):

Organizam	<i>Mus musculus</i> , miš
Tkivo	Jetra
Tip stanica	Hepatociti
Morfologija	Epitelne
Bolest	Hepatom
Uvjeti skladištenja	Tekući dušik
Uspostava stanične linije	Ovo je derivat BW7756 mišjeg hepatoma koji je nastao u C57 / L mišu.
Ekspresija gena / stanični produkti	albumin, alfa fetoprotein; albumin; alfa 1 antitripsin; amilaza
Kancerogenost	Da
Kompletni medij za rast stanica	Osnovni medij za ovu staničnu liniju je ATCC- <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> . Kako bi se dobio kompletan medij za rast, dodaje se

	fetalni goveđi serum do konačne koncentracije od 10%.
Uvjeti za rast	Atmosfera: 95 % zrak, 5 % CO ₂ Temperatura: 37 °C Stanice se mogu razmnožavati u mediju bez seruma koji se sastoji od 3 dijela <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium-a</i> , 1 dijela <i>Waymouth-ovog MAB 87/3</i> medija i 30 nM selena.
Vrijeme udvostručenja populacije	18 sati

2.3. STANIČNA SMRT

Proces stanične smrti ima četiri glavne faze:

1. Prva, indukcijska faza, uključuje inhibiciju (i naknadnu reaktivaciju) transporta elektrona, smanjenje ATP-a, smanjenje pH, povećanje koncentracije Ca²⁺ iona u stanicama, oslobađanje glutamata, povećanje arahidonske kiseline, kao i aktivaciju gena koji dovode do sinteze citokina, sinteze enzima uključenih u proizvodnju slobodnih radikala i akumulacije leukocita. Ove promjene dovode do aktivacije nekoliko po stanicu negativnih događaja, a to su: štetno djelovanje slobodnih radikala i njihovih peroksinitritnih produkata, djelovanja Ca²⁺ ovisne kalpain proteaze, aktivnost fosfolipaza, aktivnost poli-ADP-riboza polimeraze (PARP) i aktivacije apoptotičkog puta.
2. Druga faza stanične smrti uključuje dugoročne promjene na makromolekulama ili ključnim metabolitima, koje uzrokuju negativni događaji iz prve faze.
3. Treća faza stanične smrti uključuje dugotrajne štetne učinke promjenama na makromolekulama i u metabolizmu na kritične funkcije stanica i njihovih struktura koje dovode do krajnjih faza oštećenja stanica. Ove ciljane funkcije i strukture uključuju plazma membranu, mitohondrije, citoskelet, sintezu proteina i aktivnosti kinaza.

4. Četvrta faza je napredovanje morfoloških i biokemijskih promjena koje dovode do krajnje faze stanične smrti. Od ove četiri faze, posljednje dvije su najmanje razjašnjene (Lipton, 1999).

2.3.1. RAZLIKE IZMEĐU APOPTOZE I NEKROZE

Stanična smrt se najopćenitije može podijeliti na dva različita mehanizma, apoptozu i nekrozu. Apoptoza, ili programirana smrt stanica, važan je i aktivan regulatorni put rasta i proliferacije stanica. Stanice reagiraju na specifične induksijske signale pokretanjem unutarstaničnih procesa koji rezultiraju karakterističnim fiziološkim promjenama (EMD Millipore Corporation, 2013). Jedna od promjena je aktivacija kaspaza što dovodi do promjene mitohondrijskog membranskog potencijala, praćenog intracelularnim promjenama u koncentraciji Ca^{2+} iona i promjenom pH. Nakon gubitka mitohondrijskog membranskog potencijala, lizosomalne membranske pumpe gube svoju funkciju. U ovoj fazi, kada je stanica prošla tzv. „točku bez povratka“, aktivirane su endonukleaze, što se odražava translokacijom fosfatidilserina (Vermes i sur., 2000) s unutarnje strane membrane na vanjsku, čime on postaje izložen na vanjskoj površini stanice (Vermes i sur., 1995). Fosfatidilserin (PS) je negativno nabijen fosfolipid (Op den Kamp, 1979).

Premještanje PS na vanjsku površinu stanice nije jedinstveno za apoptozu, već se događa i tijekom nekroze stanice. Razlika između ova dva oblika stanične smrti je da tijekom početnih faza apoptoze stanična membrana ostaje netaknuta, dok u trenutku kada se nekroza javlja, stanična membrana gubi svoj integritet i postaje propusna. Stoga mjerenje *Annexina V*, vezanog na staničnu površinu za PS, kao indikatora za apoptozu mora biti provedeno zajedno s ispitivanjem isključenja boje za provjeru cjelovitosti stanične membrane (Vermes i sur., 1995).

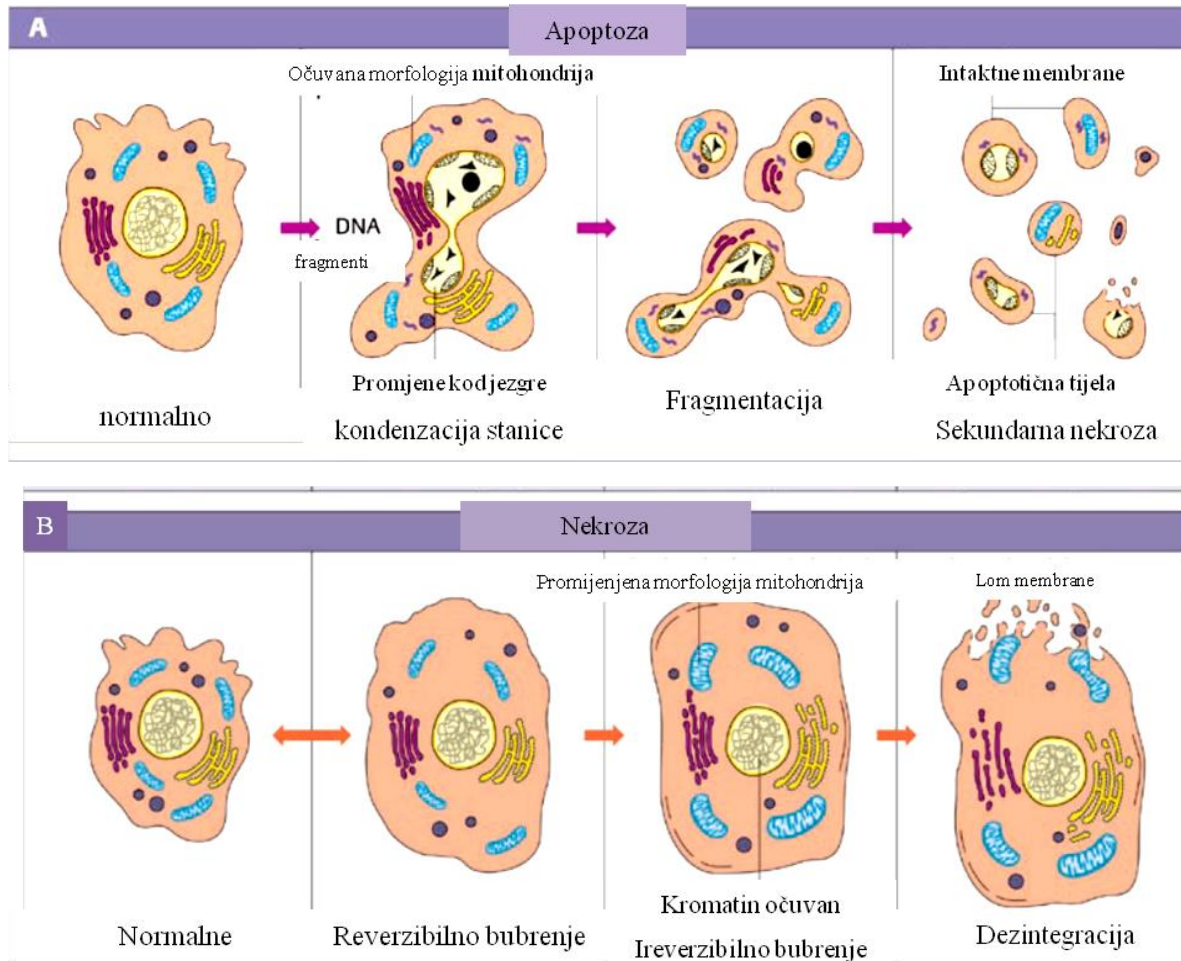
Morfološke i biokemijske karakteristike apoptoze i nekroze te njihov fiziološki značaj prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Usporedba apoptoze i nekroze prema morfološkim i biokemijskim karakteristikama te njihovom fiziološkom značaju (prema Schulze-Osthoff, 2008).

APOPTOZA	NEKROZA
<i>morfološke karakteristike</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ◆ smežurana membrana, ali bez gubitka integriteta ◆ agregacija kromatina prema membrani jezgre ◆ počinje sakupljanjem citoplazme i kondenzacijom jezgre ◆ očuvana ultrastruktura mitohondrija, permeabilizacija vanjske membrane ◆ završava fragmentacijom stanice u apoptotična tjelešca 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ gubitak integriteta membrane ◆ nema kondenzacije kromatina ◆ počinje bubrenjem citoplazme i mitohondrija ◆ dezintegracija organela ◆ završava potpunom lizom stanica
<i>biokemijske karakteristike</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ◆ strogo regulirani proces koji uključuje aktivaciju brojnih medijatora i enzima ◆ ATP-ovisan (aktivan) proces ◆ fragmentacija DNA na oligonukleosomalne fragmente (DNA ljestve nakon gel elektroforeze) ◆ otpuštanje različitih faktora (citokrom c, AIF) u citoplazmu iz mitohondrija ◆ aktivacija kaskade kaspaza ◆ promjene u asimetriji plazma membrane (translokacija fosfatidilserina iz unutrašnje na vanjsku stranu membrane) 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ gubitak regulacije homeostaze iona ◆ pasivni proces, ne zahtjeva energiju ◆ nasumično cijepanje DNA (mrljasta DNA nakon gel elektroforeze) ◆ oksidacijski stres, preopterećenje kalcijem, osiromašenje ATP-om ◆ aktivacija o kalciju ovisnih proteaza
<i>fiziološki značaj</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ◆ služi eliminaciji oštećenih, nefunkcionalnih ili inficiranih stanica; funkcija u razvoju organa i regulaciji imunog odgovora ◆ inducirana fiziološkim faktorima (ligandi smrti), nedostatkom faktora rasta i različitim staničnim stresovima ◆ fagocitoza makrofazima i susjednim stanicama ◆ nema upalnog procesa 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ fiziološka uloga nejasna, potencijalni rezervni mehanizam u slučaju nefunkcioniranja apoptoze ◆ inducirana nizom faktora iz okoline (hipotermija, hipoksija, litički virusi, toksini) ◆ fagocitoza makrofazima ◆ značajan upalni proces

Katkad isti uzrok dovodi do istodobne pojave i nekroze i apoptoze, a koji će oblik stanične smrti prevladavati ovisi o dugotrajnosti i jačini negativnog djelovanja (Schumer i sur., 1992).

Razlike između apoptoze i nekroze shematski su prikazane na Slici 2.



Slika 2. Dva oblika stanične smrti: apoptoza (A) i nekroza (B). Apoptotične stanice pokazuju karakteristične promjene u morfologiji jezgre uključujući kondenzaciju kromatina i fragmentaciju, skupljanje stanične membrane i nastanak apoptotičnih tijela. Morfološke karakteristike nekroze su citoplazmatsko bubrenje i ruptura plazma membrane (prema Schulze-Osthoff, 2008).

Ključni enzimi u procesu apoptoze su kaspaze, skupina cistein ovisnih aspartat-specifičnih proteaza (*Cysteine Aspartate Specific ProteASEs*). Ti enzimi, prisutni u stanici kao inaktivni proenzimi, aktiviraju se kaskadno proteolitičkim cijepanjem, a redosljed njihove aktivacije ovisi o načinu indukcije apoptoze. Trenutno je poznato 14 članova porodice

kaspaza, od kojih 7 sudjeluje u apoptozi (Žlender, 2003). Cistein proteaza iz obitelji kaspaza igra glavnu ulogu u izvršenju apoptoze i u sazrijevanju proinflamatornih citokina. Tijekom apoptotičnog signaliziranja prekursori kaspaza podvrgnuti su brzom proteolitičkom procesiranju i aktiviranju. Aktivirane kaspaze cijepaju aspartatne ostatke različitih staničnih proteina što rezultira smrću stanice. Stoga, mjerenje aktivnosti kaspaze pruža brzu i pouzdanu metodu za procjenu apoptoze (Kumar i Dorstyn, 2009).

Izostankom apoptoze može doći do razvoja malignih bolesti, limfoproliferativnih bolesti, leukemije, rezistentnosti na antikancerogenu terapiju, infekcija ili pojave autoimunih bolesti (Vermes i sur., 2000). Apoptoza ima presudnu ulogu u kontroli broja stanica i eliminiranju štetnih stanica ili stanica zaraženih virusom kako bi se održala stanična homeostaza kroz razvoj (Kumar i Dorstyn, 2009). Proces apoptoze ne traje više od nekoliko sati i odvija se u odsutnosti bilo kakvih upalnih reakcija (Wyllie i sur., 1980).

2.4. IN VITRO TESTOVI TOKSIČNOSTI

Metode koje ne uključuju upotrebu životinja, poput računalnog modeliranja i *in vitro* studija, čine važan alat za poboljšanje našeg razumijevanja opasnih učinaka različitih kemikalija kao i za predviđanje njihovog učinka na ljude (Broadhead i Combes, 2001). *In vitro* toksikološka procjena omogućuje proučavanje učinaka kemikalija uz upotrebu stanica, staničnih komponenti i tkiva, po mogućnosti ljudskog podrijetla. Informacije dobivene testovima toksičnosti, koji se provode za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju štetne učinke na zdravlje, služe kao važan dio osnove za javnozdravstvene i regulatorne odluke koje se odnose na te kemikalije (The Academies, 2007).

In vitro sustavi koriste se prvenstveno u svrhu probira i za generiranje sveobuhvatnijih toksikoloških profila različitih tvari. Oni su, također, od potencijalne koristi za proučavanje lokalnih, tkivnih i ciljanih specifičnih učinaka. Njima se dobivaju informacije o mehanizmu djelovanja ispitivane tvari.

In vitro metode su uobičajene i široko korištene za ispitivanje kemikalija, a uz to se u obzir uzimaju i u svrhu procjene rizika od tvari prisutnih u hrani. *In vitro* sustavi ne koriste se u svrhu ispitivanja potencijalne toksičnosti samo tvari prirodno prisutnih u hrani, nego i tvari koje nastaju pripremom hrane, spojeva koji se formiraju endogeno nakon konzumacije hrane, dopuštenih kemikalija namjerno dodanih u hranu uključujući aditive te ostataka kemikalija iz

prerade, pakiranja i onečišćenja. Upotrebom *in vitro* sustava moguće je dobiti podatke o citotoksičnosti, toksikokinetici, metabolizmu, kancerogenosti i alergenosti ispitivane tvari (Eisenbrand i sur., 2002).

2.4.1. TRIPAN PLAVO (*TRYPAN BLUE*) METODA

Metoda bojanja *Trypan Blue* bojom koristi se za određivanje broja živih stanica prisutnih u staničnoj suspenziji. Temelji se na načelu da žive stanice posjeduju netaknutu staničnu membranu, dok je kod mrtvih stanica ona oštećena. Zbog oštećenja stanične membrane, citoplazma mrtvih stanica obojat će se plavo jer će boja proći kroz takvu membranu, dok će citoplazma živih stanica ostati nebojana (Strober, 2015).

2.4.2. PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočna citometrija je metoda kvantitativne analize pojedinačnih stanica. Protočni citometar razvijen je 1970-ih te je ubrzo postao bitan instrument u staničnoj biologiji i imunologiji. Današnji „najsuvremeniji“ protočni citometri sposobni su analizirati do 13 parametara (11 boja imunofluorescencije, prednje raspršivanje, bočno raspršivanje) po stanici brzinom od 100000 stanica u sekundi. To je široko primjenjiva laserska tehnologija za analizu stanične površine i unutarstaničnih molekula, karakterizaciju i definiranje tipova stanica i čestica u heterogenoj populaciji, procjenu čistoće, veličine i volumena stanica te istodobnu višeparametarsku analizu pojedinačnih stanica (Riley i Idowu, 2017). Metoda je izuzetno osjetljiva i brza te ima niz prednosti, kao što su pouzdana i reproducibilna procjena apoptoze, istovremena analiza parametara u staničnom ciklusu i analiza stanične površine (Riccardi i Nicoletti, 2006).

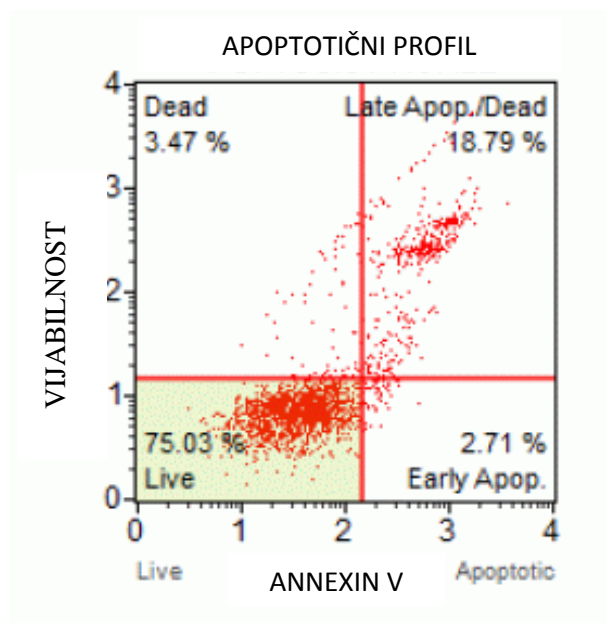
Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit (Slika 3) omogućuje kvantitativnu analizu živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica na protočnom citometru *Muse™ Cell Analyzer*. Softver pruža rezultat u obliku koncentracije (stanice mL⁻¹) i postotaka (%) živih stanica, stanica rane apoptoze, kasne apoptoze, ukupne apoptoze i mrtvih stanica (Schmidt, 1992).



Slika 3. *Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit* (EMD Millipore Corporation, 2013)

Nakon provedene analize moguće je razlikovati četiri populacije stanica: žive stanice, stanice u ranoj fazi apoptoze, stanice u kasnoj fazi apoptoze i mrtve stanice / uglavnom nuklearni otpad. Na Slici 4 prikazan je jedan reprezentativan „dot-plot“ dijagram dobiven primjenom protočne citometrije i *Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit-a*:

- ◆ lijevi donji kvadrant: subpopulacija živih stanica
[*Annexin V*-PS (-) i marker mrtvih stanica (-)]
- ◆ desni donji kvadrant: subpopulacija stanice u ranoj fazi apoptoze
[*Annexin V*-PS (+) i marker mrtvih stanica (-)]
- ◆ desni gornji kvadrant: subpopulacija stanica u kasnoj fazi apoptoze ili mrtve stanice
[*Annexin V*-PS (+) i marker mrtvih stanica (+)]
- ◆ lijevi gornji kvadrant: subpopulacija stanica koje su umrle nekrozom, a ne apoptozom
[*Annexin V*-PS (-) i marker mrtvih stanice (+)]



Slika 4. Reprezentativan „dot – plot“ dijagram dobiven primjenom *Muse*[™] *Annexin V* & *Dead Cell Assay* kit-a (EMD Millipore Corporation, 2013)

Muse[™] *Annexin V* & *Dead Cell Assay Kit* koristi *Annexin V* za otkrivanje PS na vanjskoj membrani apoptotičnih stanica (Schmidt, 1992). *Annexin V* je Ca^{2+} ovisan protein koji ima visoki afinitet za vezanje PS-a, membranske komponente koja je u normalnoj stanici lokalizirana prema unutrašnjosti stanične membrane (EMD Millipore Corporation, 2013). *Annexin V* se stoga može koristiti kao osjetljiv protein za detekciju PS-a na staničnoj membrani.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. BIOLOŠKI MATERIJALI

U radu je korištena stanična linija Hepa 1-6 izolirana od BW7756 hepatoma koji je nastao u C57/L miša (*Mus musculus*) i stanična linija AML 12 izolirana iz hepatocita zdrave jetre miša. Obje stanične linije rastu u monosloju (ATCC, 2016a; ATCC, 2016b).

U radu je korišten etanolni ekstrakt cvijeta trnine koncentracije ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline u rasponu od 5 do 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.1.2. KEMIKALIJE

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- ◆ *Dulbecco's MEM/F12*, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- ◆ *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), ATCC, Manassas, VA, SAD
- ◆ *Fetal Bovine Serum* (FBS-serum goveđeg fetusa), GIBCO, SAD
- ◆ inzulin-transferin-natrij-selenit suplement, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- ◆ dekametazon, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- ◆ tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- ◆ boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- ◆ apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje
- ◆ DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
- ◆ natrijev klorid, Kemika, Zagreb
- ◆ kalijev klorid, Kemika, Zagreb
- ◆ dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- ◆ kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- ◆ kalijev acetat, Kemika, Zagreb
- ◆ destilirana voda (dH_2O)
- ◆ DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit (ab113851, kit za detekciju ROS-a), Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
- ◆ *Muse TM Annexin V & Dead Cell Kit* (Catalog No. MCH100105)

3.1.3. OTOPINE I PUFERI

Dulbecco's MEM/F-12 (GIBCO)

SASTAV MEDIJA:	KONCENTRACIJA
	(mg L ⁻¹)
AMINOKISELINE:	
Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin × H ₂ O	7,45
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid × H ₂ O	17,56
L-Cistein 2 HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid × H ₂ O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,35
L-Metionin	17,24
L-Fenilalanin	35,48
L-Prolin	17,25
L-Serin	26,25
L-Treonin	53,45
L-Triprofan	9,02
L-Tirozin	55,79
L-Valin	25,85
VITAMINI:	
Biotin	0,0035
Kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
Folna kiselina	2,02

Niacinamid (nikotinamid)	2
Piridoksin hidroklorid	0,219
Riboflavin	2,17
Tiamin hidroklorid	0,68
Vitamin B ₁₂	0,68
I-inozitol	12,61

ANORGANSKE SOLI:

CaCl ₂	116,6
CuSO ₄ ×5 H ₂ O	0,0013
Fe(NO ₃) ₃ ×9 H ₂ O	0,05
FeSO ₄ ×7 H ₂ O	0,417
MgCl ₂ ×6 H ₂ O	61
MgSO ₄ ×7 H ₂ O	100
KCl	100
NaHCO ₃	311,8
NaCl	1200
Na ₂ HPO ₄ ×7 H ₂ O	134
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	62,5
ZnSO ₄ ×7 H ₂ O	0,432

OSTALI SASTOJCI:

D-Glukoza	3151
HEPES	3075,4
Hipoksantin Na	2,39
Linolna kiselina	0,042
Lipoična kiselina	0,105
Fenol crvenilo	8,1
Putrescin 2 HCl	0,081
Natrij piruvat	55
Timidin	0,365

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

SASTAV MEDIJA:	KONCENTRACIJA(mg L ⁻¹)
AMINOKISELINE:	
L-Arginin×HCl	84
L-Cistin×2 HCl	62,60
L-Glutamine	584
Glicin	30
L-Histidin×HCl×H ₂ O	42
L-Izoleucin	105
L-Leucin	105
L-Lysine×HCl	146
L -Metionin	30
L -Fenilalanin	66
L -Serin	42
L -Treonin	95
L -Tryptofan	16
L -Tirozin×2 Na×2 H ₂ O	103,79
L -Valin	94
VITAMINI:	
Kolin klorid	4
Folna kiselina	4
myo-Inozitol	7,20
Nikotinamid	4
D-Ca pantotenska kiselina	4
Piridoksin×HCl	4
Riboflavin	0,4
Tiamin×HCl	4
ANORGANSKE SOLI:	
CaCl ₂	200
Fe(NO ₃) ₃ ×9 H ₂ O	0,1
MgSO ₄	97,7

KCl	400
NaHCO ₃	1500
NaCl	6400
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	125

OSTALI SASTOJCI:

D-Glukoza	4500
Fenol crvenilo, natrijeva sol	15
Natrij piruvat	110

PBS (Phosphate-Buffered Saline) PUFER pH=7,4

NaCl	8g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	do 1000 mL

0,4%-tna otopina *Trypan Blue*

<i>Trypan Blue</i>	0,08 g
PBS pufer profiltrirati.	20mL

3.1.4. OPREMA I UREĐAJI

U radu je korištena sljedeća oprema:

- ◆ Inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO₂, Flow laboratories, Velika Britanija
- ◆ Komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- ◆ Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- ◆ svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- ◆ Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- ◆ Precizna vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- ◆ Analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- ◆ Vibracijska mješalica, Technica Železniki, Slovenija
- ◆ MUS (*Muse® Cell Analyzer*), Milipore, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. ODRŽAVANJE HEPA 1-6 I AML 12 STANICA U KULTURI

Uzgoj i održavanje Hepa 1-6 i AML 12 stanica započinje naglim odmrzavanjem smrznutih stanica u inkubatoru, pri temperaturi od 37 °C i atmosferi s 95 % zraka i 5 % CO₂. Nakon odmrzavanja slijedi centrifugiranje stanica pri 1200 okretaja/min u trajanju od 5 minuta te otklanjanje supernatanta. Talog stanica se resuspendira u mediju koji se sastoji od 90 % medija za uzgoj stanica (za Hepa 1-6: DMEM, za AML 12: DMEM/F12 uz dodatak 0,005 mg mL⁻¹ inzulina, 0,005 mg mL⁻¹ transferina, 5 ng mL⁻¹ selena i 40 ng mL⁻¹ deksametazona) i 10 % FBS-a, a zatim se prenese u T-bocu radi daljnje kultivacije.

Optimalni uvjeti za rast i razvoj stanica su temperatura 37 °C te atmosfera s 95 % zraka i 5 % CO₂. Navedeni uvjeti osiguravaju se u inkubatoru u kojem se uzgajaju stanice. Stanicama je, također potrebno periodično mijenjati medij za uzgoj, koji im osigurava sve hranjive tvari potrebne za rast i razvoj. Medij za staničnu kulturu je kompleksna kombinacija soli, ugljikohidrata, vitamina, aminokiselina, metaboličkih prekursora, faktora rasta, hormona i elemenata u tragovima. Potrebe za ovim komponentama variraju ovisno o staničnoj liniji, a to je razlog širokom broju formulacija medija.

Precjepljivanje staničnog monosloja podrazumijeva razaranje unutarstaničnih i izvanstaničnih veza između stanica te površine T-boce. Kod promjene medija i seruma monoslojne stanice u T-boci potrebno je najprije isprati od ostatka iskorištenog seruma i medija, a zatim odvojiti od površine T-boce dodavanjem 1 mL tripsina (proteolitičkog enzima koji je potreban kako bi se stanice odvojile jedna od druge i od površine T-boce). Nakon dodatka tripsina stanice treba inkubirati par minuta. Tripsiniziranim stanicama se potom dodaje svježi medij za uzgoj kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina. Medij za rast se dodaje na način da se isperu zaostale stanice na stijenkama boce, a pomoću mikroskopa se može provjeriti jesu li stanice samostalne ili se nalaze u nakupinama te se prema potrebi stanice laganim pipetiranjem resuspendiraju. Zatim se uzima uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*, kako bi se utvrdila i pratila brzina rasta stanica. Nakon izračunavanja broja stanica u uzorku, stanice se razrjeđuju na koncentraciju 1×10⁵ stanica mL⁻¹ medija za uzgoj.

Kada se ne koriste, stanice se čuvaju u zamrzivaču na -80 °C u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80 % medija za uzgoj, 10 % FBS-a i 10 % DMSO-a.

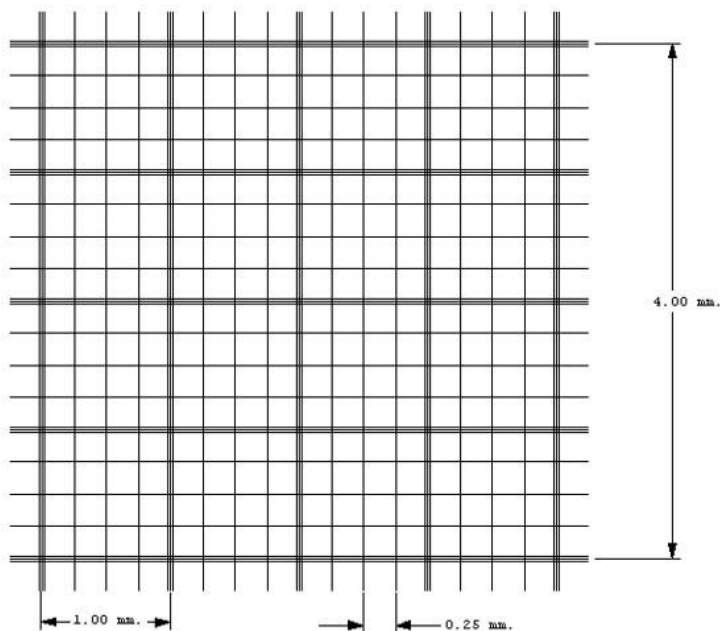
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA METODOM *TRYPAN BLUE*

Trypan Blue metodom se utvrđuje i prati brzina rasta stanica u odnosu na slijepu probu (kontrolu). Metodom se ne može utvrditi jesu li stanice apoptotične ili nekrotične već se može zaključiti jesu li stanice žive ili mrtve.

Uzorak od 20 μL suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica resuspendira se s 20 μL 0,4 %-tne otopine boje *Trypan Blue*. 20 μL dobivene suspenzije nanese se na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica, koja se sastoji od 16 kvadrata, a stanice se broje unutar središnja 4. Stanice brojimo pod svjetlosnim mikroskopom u svakom od središnja 4 kvadrata unutar samih kvadrata te na donjem i desnom rubu kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta. Žive stanice ostaju nebojane, dok su mrtve stanice plavo obojane budući da *Trypan Blue* boja lako prolazi kroz stanične membrane razorenog integriteta.

Fuchs-Rosenthalova komorica (Slika 5) duboka je 0,2 mm, a njezina površina iznosi 0,0625 mm². Broj stanica po mililitru medija za uzgoj određuje se tako da se izračuna srednja vrijednost broja živih stanica izbrojanih u 4 središnja kvadrata i pomnoži s 10⁴, tj. prema jednadžbi:

$$\text{ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} \times 10^4 \text{ (stanica mL}^{-1}\text{)}$$



Slika 5. Fuchs-Rosenthalova komorica (EMS, 2017)

3.2.3. ODREĐIVANJE UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST HEPA 1-6 STANICA

U svaku jažicu na mikrotitarskoj ploči sa 6 jažica otpipetira se po 2 mL suspenzije Hepa 1-6 stanica u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. Jedna od jažica na mikrotitarskoj ploči tretira se s 10 μL etanola i služi kao kontrola, tako da se postigne koncentracija etanola od 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ostale jažice tretiraju se s 10 μL ekstrakta cvijeta trnine koji je pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 10, 50, 100, 150 i 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tretirane stanice se inkubiraju, a nakon 24 i 72 sata provjerava se vijabilnost stanica metodom *Trypan Blue*. Dobiveni podaci se međusobno usporede kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanica ovisno o vremenu.

3.2.4. ODREĐIVANJE UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST AML 12 STANICA

U svaku jažicu na mikrotitarskoj ploči sa 6 jažica otpipetira se 4 mL suspenzije AML 12 stanica u koncentraciji 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. Jedna od jažica na mikrotitarskoj ploči se tretira s 10 μL etanola i služi kao kontrola. Ostale jažice se tretiraju s 10 μL ekstrakta cvijeta trnine koji je pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 5, 10, 30, 50 i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tretirane stanice se inkubiraju, a nakon 24 i 72 sata provjerava se vijabilnost stanica metodom *Trypan Blue*. Dobiveni podaci su međusobno uspoređeni kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanica ovisno o vremenu.

3.2.5 ODREĐIVANJE UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST HEPA 1-6 I AML 12 STANICA PROTOČNOM CITOMETRIJOM

100 μL stanične suspenzije inkubira se s *MuseTM Annexin V & Dead Cell Reagent-om* u trajanju od 20 min pri sobnoj temperaturi u tamnom prostoru. Nakon inkubacije stanična suspenzija se analizira kako bi se dobio „dot-plot“ dijagram.

3.3. STATISTIČKA OBRADA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom izračunavajući t vrijednost prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti najmanje $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem ispitivanja djelovanja ekstrakta cvijeta trnine na kancerozne i normalne stanice, u ovom radu su korištene stanične linije Hepa 1-6, izolirana iz BW7756 hepatoma koji je nastao u C57/L miša (*Mus musculus*) i AML 12, izolirana iz hepatocita zdrave jetre miša. Obje stanične linije rastu u monosloju (ATCC, 2016 a,b).

Etanolni ekstrakt cvijeta trnine ispitan je u koncentracijama od 5 - 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kako bi se isključila potencijalna toksičnost otapala etanola, ispitan je i njegov učinak na stanice (kontrola). Proliferacija i vijabilnost kontrolnih uzoraka Hepa 1-6 i AML 12 staničnih linija te stanica tretiranih različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine određena je nakon 24 sata tretmana i nakon produljenog tretmana u trajanju od 72 sata.

4.1. UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST HEPA 1-6 STANICA *TRYPAN BLUE* METODOM

Hepa 1-6 stanice nacijepnjene su na mikrotitarske ploče sa 6 jažica ($V=2 \text{ mL}$) u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane etanolnim ekstraktima cvijeta trnine tako da su u mediju za uzgoj postignute sljedeće koncentracije: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Stanice koje su tretirane samo etanolom praćene su kao kontrola. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanica određen je nakon 24 i 72 sata tretmana *Trypan Blue* metodom. Rezultati učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost kancerogenih Hepa 1-6 stanica statistički su obrađeni i prikazani u Tablici 5.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da sve ispitane koncentracije ekstrakta cvijeta trnine imaju inhibitorni učinak na Hepa 1-6 staničnu liniju, tj. smanjuju vijabilnost Hepa 1-6 stanica, a inhibitoran učinak povećava se s povećanjem koncentracije ispitivanog ekstrakta.

Tablica 5. Proliferacija Hepa 1-6 stanica netretiranih ili tretiranih s 10 - 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine, nakon 24 i 72 sata inkubacije, određena *Trypan Blue* metodom iz prosječno 10 uzoraka.

Trnina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Broj živih stanica $\cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$	
	24 h	72 h
KEtOH	6,967 \pm 0,358	19,109 \pm 2,279
T10	5,875 \pm 0,467	12,150 \pm 1,073
T50	6,047 \pm 0,424	7,077 \pm 0,318
T100	4,661 \pm 0,536	1,000 \pm 0,304
T150	4,324 \pm 0,866	0,583 \pm 0,333
T200	1,667 \pm 0,821	0,250 \pm 0,000

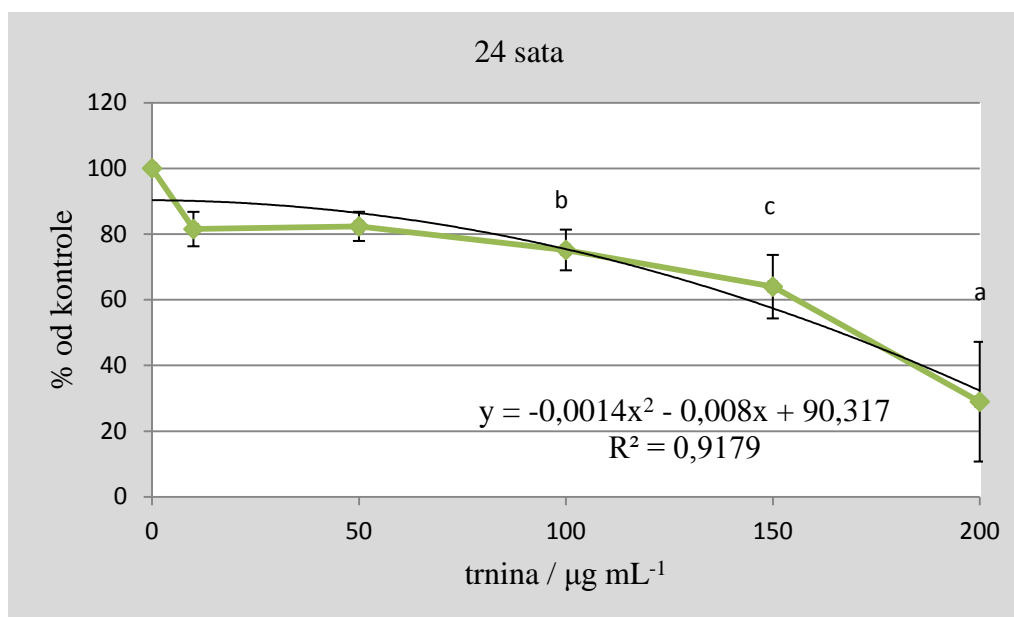
4.1.1. IC (*Inhibitory Concentration*) VRIJEDNOSTI ZA EKSTRAKT CVIJETA TRNINE NA HEPA 1-6 STANIČNOJ LINIJI

IC₂₀, IC₅₀ i IC₈₀ vrijednosti predstavljaju one koncentracije ispitivane tvari koje inhibiraju stanični rast za 20 %, 50 % i 80 %. Iz jednadžbi interpoliranih krivulja (*trend line*) izračunate su vrijednosti inhibitornih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine, IC₂₀, IC₅₀ i IC₈₀, za Hepa 1-6 staničnu liniju.

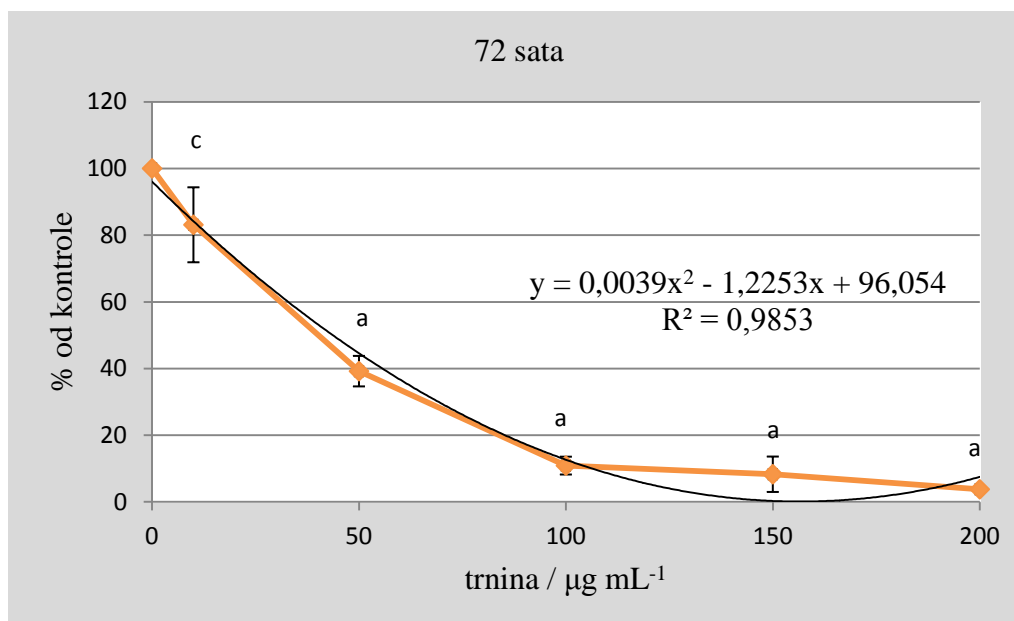
Kod odabira interpolirane krivulje, težilo se da njoj pripadajući koeficijent determinacije R² bude što bliži 1. Vrijednost pripadajućih koeficijenta determinacije R² ukazuju na reprezentativnost regresijskog modela (približavanje R² vrijednosti 1).

Ovisnost preživljavanja Hepa 1-6 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne stanice tretirane samo etanolom određena je nakon 24 i 72 sata i prikazana na Slici 6.

a)



b)



Slika 6. Proliferacija Hepa 1-6 stanica nakon 24 (a) i 72 sata (b) uz tretman s $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Trypan Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška, određenu iz prosječno 10 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,025$.

Tijekom perioda inkubacije od 24 i 72 sata, utvrđena je statistički značajna ($p < 0,001$, $p < 0,005$, $p < 0,025$) inhibicija vijabilnosti stanica tretiranih određenim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. Kod tretmana s dvije najniže koncentracije, 10 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nije utvrđen statistički značajan inhibicijski učinak na staničnu proliferaciju nakon 24 sata inkubacije, dok je za ostale koncentracije, 100, 150 i 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utvrđen statistički značajan inhibični učinak. Nakon 72 sata inkubacije utvrđen je statistički značajan inhibicijski učinak za sve ispitane koncentracije .

IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine, kojim je tretirana Hepa 1-6 stanična linija, određene su nakon 24 i 72 sata. Vrijednosti su izračunate iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja te su prikazane u Tablici 6. IC_{50} vrijednost određena *Trypan Blue* metodom nakon 24 sata iznosi 166,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a nakon 72 sata iznosi 43,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$, iz čega je vidljivo da je inhibični učinak na stanični rast 3,8 puta jači nakon produžene inkubacije u odnosu na 24 sata inkubacije.

Tablica 6. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hepa 1-6 stanica za 20 (IC_{20}), 50 (IC_{50}) i 80 (IC_{80}) % određene metodom *Trypan Blue* nakon 24 i 72 sata.

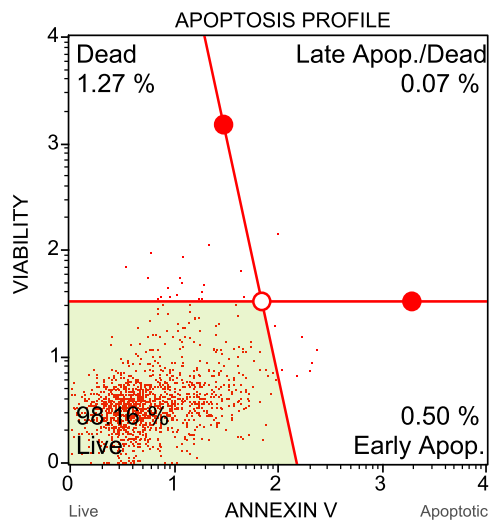
IC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	24h	72h
IC_{20}	83,03	13,69
IC_{50}	166,86	43,65
IC_{80}	221,27	85,14

4.1.2. VIJABILNOST HEPA 1-6 STANICA ODREĐENA METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE NAKON TRETMANA STANICA S EKSTRAKTOM CVIJETA TRNINE

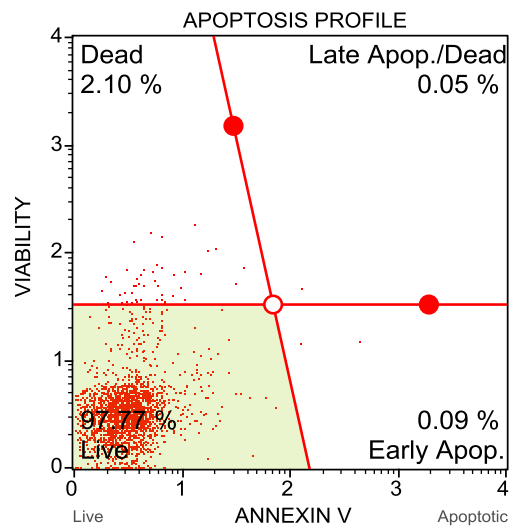
Apoptozu ili programiranu staničnu smrt definira genetski kodirani program smrti stanica, koji je morfološki i biokemijski različit od nekroze ili slučajne stanične smrti. Karakteristični morfološki znakovi apoptoze (stanično skupljanje, membransko bubrenje, nuklearna kondenzacija i fragmentacija) konačni su rezultat složene biokemijske kaskade događaja, koji su sastavni dio fiziološke homeostaze (Vermes i sur., 2000). Apoptoza se razlikuje od nekroze po jedinstvenim događajima koji uključuju degradaciju kromatina u internukleosomnim fragmentima i gubitak staničnog volumena što je povezano s raspadom citoskeleta. Apoptotična i nekrotična smrt su različite s mehanističkog stajališta zato što je nekroza samo pasivni rezultat oštećenja stanice, a apoptoza čini sastavni dio normalnog fiziološkog staničnog procesa (Kerr i sur., 1972).

Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit omogućuje kvantitativnu analizu kojom se mogu razlikovati četiri populacije stanica: žive stanice, stanice rane apoptoze, stanice kasne apoptoze i mrtve stanice / uglavnom nuklearni otpad, na *Muse™ Cell Analyzeru*. Rezultati su prikazani na „*dot-plot*“ dijagramima pri čemu su vidljive subpopulacije živih stanica, rano apoptotičnih, kasno apoptotičnih i mrtvih stanica (Schmidt, 1992).

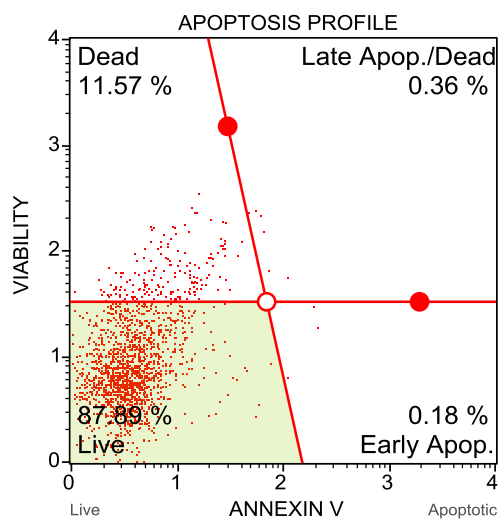
Slijede prikazi reprezentativnih „*dot-plot*“ dijagrama 4 uzorka Hepa 1-6 stanične linije: kontrolnih stanica te stanica tretiranih s 10, 50 i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine (Slika 7).



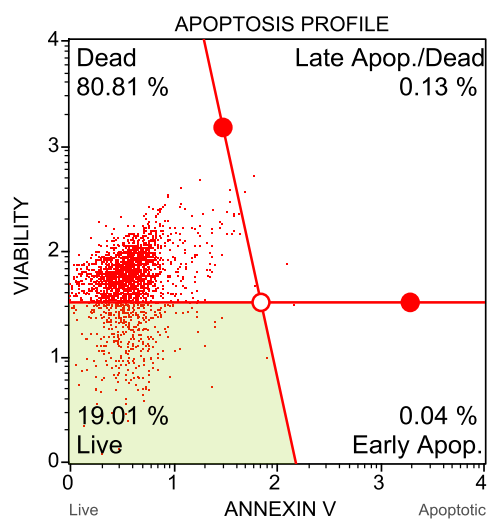
Kontrola



10 µg mL⁻¹ ekstrakta cvijeta trnine



50 µg mL⁻¹ ekstrakta cvijeta trnine



100 µg mL⁻¹ ekstrakta cvijeta trnine

Slika 7. Prikaz reprezentativnih „dot-plot“ dijagrama dobivenih prilikom određivanja tipa stanične smrti primjenom *Muse*TM Annexin V & Dead Cell Kit-a nakon 24-satnog tretmana Hepa 1-6 stanica s različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine.

Iz prikazanih „dot-plot“ dijagrama vidljivo je da se s porastom koncentracije ekstrakta cvijeta trnine smanjuje udio živih stanica u kulturi, tako da je pri najvišoj koncentraciji trnine (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) udio živih stanica svega 19,01 %. Subpopulacija mrtvih – nekrotičnih stanica u tretiranim uzorcima raste s povećanjem doze trnine, dok su frakcije apoptotičnih stanica u svim uzorcima niske. U ispitanim koncentracijama trnina nije inducirala apoptozu, dok bi se u daljnjim istraživanjima trebalo istražiti djelovanje nižih doza ($< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) trnine s ciljem induciranja programirane stanične smrti u kancerogenim stanicama.

Zaključujemo da su ispitane koncentracije ekstrakta cvijeta trnine, kojima su tretirane stanice, imale negativan utjecaj na vijabilnost stanica, da djeluju inhibirajuće na rast stanica ovisno o dozi i uzrokuju primarno nekrozu. To potvrđuje i Tablica 7.

Tablica 7. Postotak živih, ukupno apoptotičnih i mrtvih stanica nakon tretmana različitim koncentracijama trnine. K–kontrolni uzorci stanica; T(10)–trnina u koncentraciji 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T(50)–trnina u koncentraciji 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T(100)–trnina u koncentraciji 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Prikazane su srednje vrijednosti dvaju mjerenja.

(%)	K	T10	T50	T100
Žive stanice	97,94	97,63	88,235	19,315
Ukupne apoptotične stanice	0,56	0,14	0,495	0,16
Mrtve stanice	1,5	2,235	11,265	80,525

4.2. UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST AML 12 STANICA ODREĐEN *TRYPAN BLUE* METODOM

Stanice AML 12 nacijepljene su na mikrotitarske ploče sa 6 jažica ($V=4$ mL) u koncentraciji 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane različitim koncentracijama etanolnih ekstrakata cvijeta trnine. Kao kontrola praćene su stanice koje su tretirane etanolom. Učinak ekstrakta cvijeta trnine, u koncentracijama od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, na vijabilnost AML 12 stanica određen je nakon 24 i 72 sata *Trypan Blue* metodom.

Rezultati učinka ekstrakta cvijeta trnine na proliferaciju nekancerogenih AML-12 stanica statistički su obrađeni i prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Proliferacija AML 12 stanica netretiranih ili tretiranih s $5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine, određena nakon 24 i 72 sata inkubacije, metodom *Trypan Blue* iz prosječno 4 uzorka.

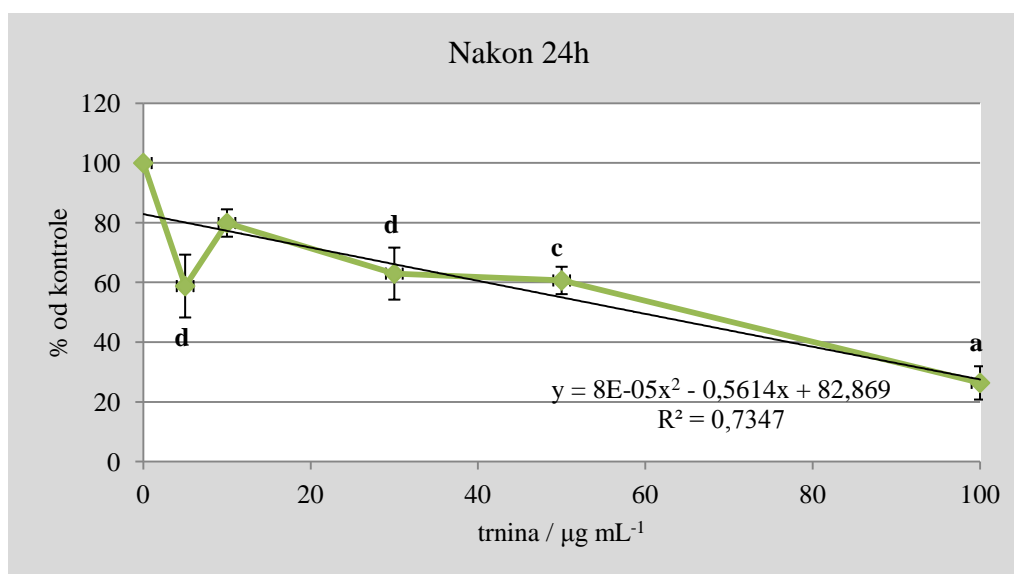
Trnina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Broj živih stanica $\cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$	
	24 h	72 h
KEtOH	$8,333 \pm 0,835$	$18,287 \pm 0,143$
T5	$4,901 \pm 0,876$	$9,011 \pm 0,487$
T10	$6,660 \pm 0,382$	$10,043 \pm 0,495$
T30	$5,249 \pm 0,726$	$12,452 \pm 0,931$
T50	$5,058 \pm 0,382$	$7,625 \pm 0,769$
T100	$2,199 \pm 0,464$	$6,448 \pm 1,361$

Dobiveni rezultati ukazuju na to da sve ispitivane koncentracije ekstrakta cvijeta trnine imaju inhibitorni učinak na AML 12 staničnu liniju, tj. smanjuju vijabilnost AML 12 stanica, a inhibitoran učinak slijedi „*dose - response*“ odnos pri koncentracijama višim od $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

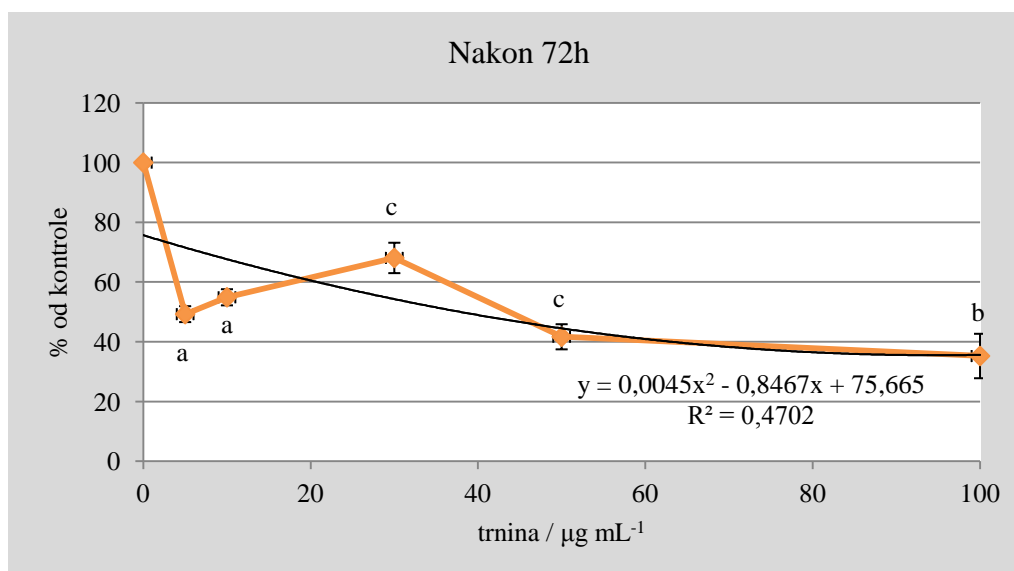
4.2.1. IC (*Inhibitory Concentration*) VRIJEDNOSTI ZA EKSTRAKT CVIJETA TRNINE NA AML 12 STANIČNOJ LINIJI

Ovisnost preživljavanja AML 12 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne stanice tretirane samo etanolom određena je nakon 24 i 72 sata i prikazana je na Slici 8. Ispitane koncentracije ekstrakta cvijeta trnine kretale su se u rasponu od 5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a učinci svake pojedine doze određeni su iz prosječno 4 mjerenja.

a)



b)



Slika 8. Proliferacija AML 12 stanica nakon 24 (a) i 72 sata (b) uz tretman s 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom), praćeno *Trypan Blue* metodom. Podaci

pokazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška, određenu iz prosječno 4 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti. Statistički značajna razlika (Student t -test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$; ^c $p < 0,01$; ^d $p < 0,05$.

Tijekom perioda inkubacije od 24 i 72 sata, utvrđena je statistički značajna (^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$; ^c $p < 0,01$; ^d $p < 0,05$) inhibicija vijabilnosti stanica pri gotovo svim koncentracijama. Statistički značajan inhibicijski učinak na AML 12 stanice nije utvrđen jedino kod koncentracije od $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine nakon 24 sata inkubacije, dok je za sve ostale koncentracije, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, utvrđen.

IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine, kojim je tretirana AML 12 stanična linija, određene su nakon 24 i 72 sata i prikazane u Tablici 9. Vrijednosti su izračunate iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja, na isti način kao i za Hepa 1-6 staničnu liniju, te su izračunate vrijednosti prikazane u Tablici 9. IC_{50} vrijednost određena metodom *Trypan Blue* nakon 24 sata iznosi $59,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, a nakon 72 sata iznosi $37,97 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tablica 9. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju AML 12 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Trypan Blue* nakon 24 i 72 sata.

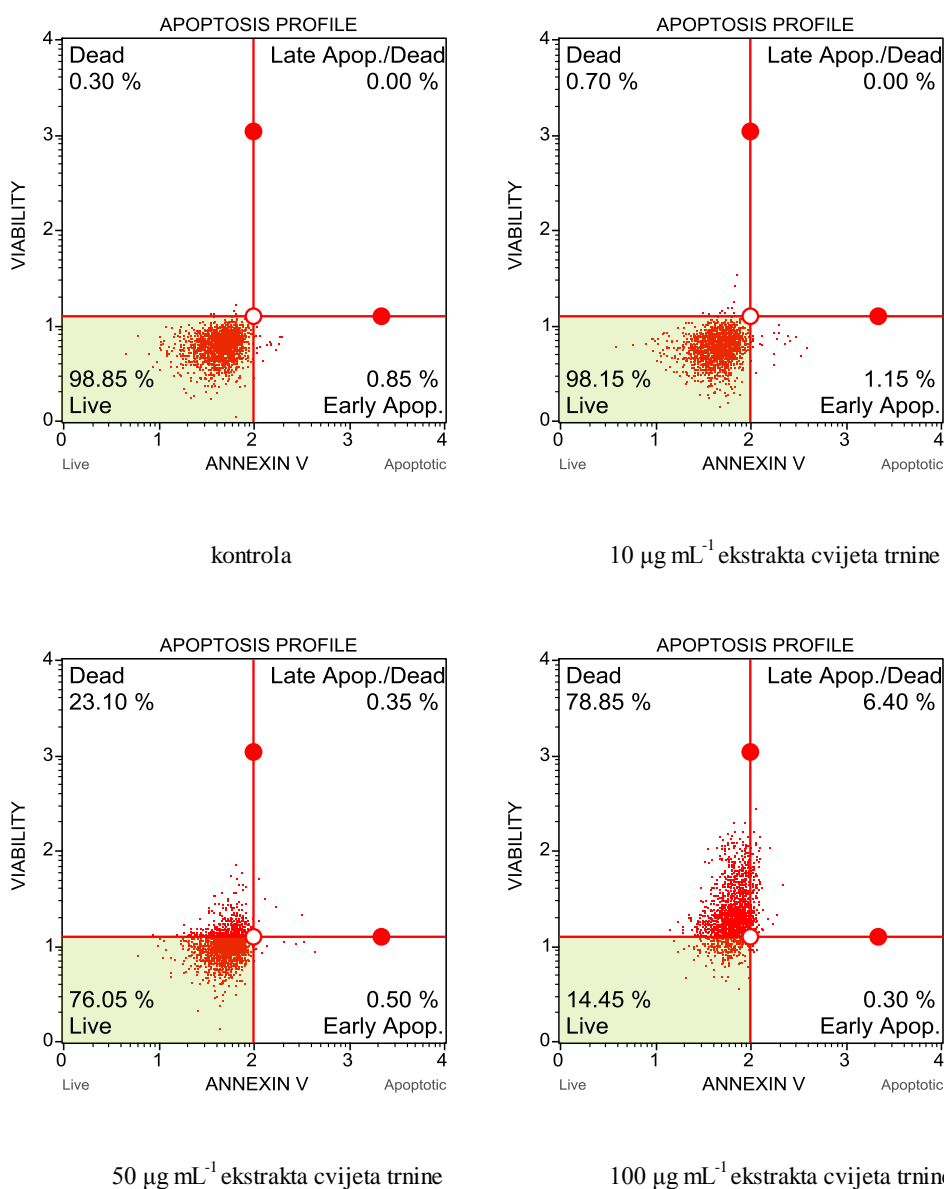
IC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	24h	72h
IC_{20}	5,11	f^*
IC_{50}	59,04	37,97
IC_{80}	113,83	f^*

* IC vrijednosti nije bilo moguće odrediti iz pripadajućih jednadžbi polinomnih krivulja

Iz usporedbe utvrđenih IC_{50} vrijednosti ekstrakta cvijeta trnine, kojim su tretirane Hepa 1-6 i AML 12 stanična linija, nakon 24 i 72 sata inkubacije, vidljivo je da ekstrakt cvijeta trnine nakon kratkog perioda tretmana (24 sata) pokazuje veći toksični učinak na AML12 staničnu liniju. Koncentracija koja inhibira stanični rast za 50% nakon 24 sata inkubacije kod Hepa 1-6 stanica iznosi $166,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tablica 6), a kod AML 12 stanične linije iznosi $59,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tablica 10). Nakon produljenog tretmana stanica (72 sata), toksični učinak ekstrakta cvijeta trnine je podjednak na obje stanične linije (50 %-tna inhibicija vijabilnost Hepa 1-6 stanica postiže se koncentracijom $43,65 \mu\text{g mL}^{-1}$, a kod AML 12 stanica postiže se koncentracijom od $37,97 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.2.2. VIJABILNOST AML 12 STANICA ODREĐENA METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE NAKON TRETMANA STANICA S EKSTRAKTOM CVIJETA TRNINE

Rezultati su prikazani na „*dot-plot*“ dijagramima, kao i kod Hepa 1-6 stanične linije, pri čemu su vidljive subpopulacije živih stanica, rano apoptotičnih stanica, kasno apoptotičnih stanica i mrtvih stanica. Slijede prikazi reprezentativnih „*dot-plot*“ dijagrama 4 uzorka AML 12 stanične linije: kontrolnih stanica te stanica tretiranih s 10, 50 i $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta cvijeta trnine (Slika 9):



Slika 9. Prikaz reprezentativnih „dot-plot“ dijagrama dobivenih prilikom određivanja tipa stanične smrti primjenom *MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit-a* nakon 24-satnog tretmana AML 12 stanica s različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine.

Iz prikazanih „dot-plot“ dijagrama vidljivo je da se s porastom koncentracije ekstrakta cvijeta trnine smanjuje udio živih stanica u kulturi, tako da je pri najvišoj koncentraciji trnine (100 µg mL⁻¹) udio živih stanica svega 14,45 %. Subpopulacija mrtvih – nekrotičnih stanica u tretiranim uzorcima raste s povećanjem doze trnine, dok su frakcije apoptotičnih stanica

relativno niske, no udio stanica u apoptozi (kasna i rana faza) neznatno raste u ovisnosti o dozi ekstrakta cvijeta trnine i doseže vrijednost od 6,7% pri najvišoj ispitanoj koncentraciji ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Zaključujemo da je koncentracija ekstrakta, kojom su tretirane AML 12 stanice, imala negativan utjecaj na vijabilnost stanica, da djeluje inhibirajuće na rast stanica i uzrokuje primarno nekrozu. Navedene rezultate potvrđuje Tablica 10. Iako su doze primjenjene na nekanceroznim stanicama jetre bile niže u odnosu na one primjenjene na stanicama hepatocelularnog karcinoma, još uvijek su pokazale inhibitoran učinak na staničnu proliferaciju i negativan učinak na staničnu vijabilnost. Stoga, u cilju definiranja onih doza trnine koje neće imati citotoksične učinke na zdravim stanicama već potencijalno protektivne, treba ispitati znatno širi raspon koncentracija još nižih od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tablica 10. Postotak živih, ukupno apoptotičnih i mrtvih stanica nakon tretmana različitim koncentracijama trnine. K – kontrolni uzorci stanica; T(10) – trnina u koncentraciji $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; T(50) – trnina u koncentraciji $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; T(100) – trnina u koncentraciji $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Prikazane su srednje vrijednosti dvaju mjerenja.

(%)	K	T10	T50	T100
Žive stanice	98,925	98,15	74,55	16,7
Ukupne apoptotične stanice	0,75	1,125	1,15	5,9
Mrtve stanice	0,325	0,725	24,3	77,4

Literaturni podaci o *in vitro* učincima ekstrakta cvijeta trnine su nedostadni, gotovo da ih i nema. Većinom su dostupni znanstveni radovi o učincima ekstrakta ploda trnine. Tako je na staničnoj liniji humanih promonocita (U937 stanična linija) dokazan antioksidacijski učinak ekstrakta ploda trnine nakon što su stanice bile izložene djelovanju vodikovog peroksida. Antioksidacijska aktivnost korelirala je s udjelom antocijanina u plodovima (Fraternale i sur., 2009). Također, uočen je inhibitorni učinak na HT-29 staničnoj liniji (stanice karcinoma debelog crijeva) s IC_{50} vrijednostima od $159,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon 24 sata tretmana ekstraktom ploda trnine i $123,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon tretmana u trajanju od 48 sati (Qipa i Gökalp, 2017). Navedene vrijednosti korespondiraju rezultatima dobivenim u ovom istraživanju na stanicama hepatocelularnog karcinoma pri čemu je ispitan ekstrakt cvijeta trnine.

5. ZAKLJUČCI

1. *Trypan Blue* metoda i metoda protočne citometrije (*Muse* i *Muse*[™] *Annexin V & Dead Cell Assay Kit*) pokazale su se kao dobre metode za praćenje vijabilnosti Hepa 1-6 i AML 12 stanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine.
2. Statistički značajno ($p < 0,001$ - $p < 0,025$) smanjenje vijabilnosti Hepa 1-6 stanične linije tretirane ekstraktom cvijeta trnine ($10 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$) uočeno je tijekom perioda inkubacije od 24 sata pri koncentracijama višim od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ i pri produljenoj inkubaciji od 72 sata pri svim ispitanim koncentracijama. Smanjenje vijabilnosti povećava se porastom koncentracije i vremena djelovanja ekstrakta.
3. Statistički značajno ($p < 0,001$ - $p < 0,05$) smanjenje vijabilnosti AML 12 stanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine ($5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) uočeno je nakon 24 i 72 sata inkubacije pri svim ispitanim koncentracijama, osim pri koncentraciji od $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon 24 sata.
4. IC_{50} vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji određene metodom *Trypan Blue* nakon 24 sata inkubacije iznose $166,86 \mu\text{g mL}^{-1}$, a nakon 72 sata iznosi 3,8 puta manje, tj. $43,65 \mu\text{g mL}^{-1}$.
5. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine na AML 12 staničnoj liniji određena metodom *Trypan Blue* nakon 24 sata inkubacije iznosi $59,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, a nakon 72 sata iznosi $37,97 \mu\text{g mL}^{-1}$.
6. Iz usporedbe IC_{50} vrijednosti vidljivo je da ekstrakt cvijeta trnine korišten u ovom istraživanju nakon inkubacije u trajanju od 24 sata ima izraženiji inhibitorni učinak na proliferaciju normalne, nekancerogene AML 12 stanične linije jetre miša, u odnosu na kancerogenu Hepa 1-6 staničnu liniju jetre miša. Nakon produljenog tretmana učinak je podjednak.
7. Iz „dot-plot“ dijagrama dobivenih *Muse*[™] *Cell Analyzerom* vidimo da su AML 12 i Hepa 1-6 stanice osjetljive na povećanje koncentracije ekstrakta trnine. Pritom prevladava nekroza, a apoptotičnih stanica ima u zanemarivo malom postotku. Iz toga možemo zaključiti da povećanje koncentracije trnine primarno uzrokuje nekrozu kod AML 12 i Hepa 1-6 stanica.

LITERATURA

ATCC (2016a) AML12 (ATCC[®] CRL-2254[™]) <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2254.aspx?geo_country=hr>. Pristupljeno 30. lipnja 2017.

ATCC (2016b) HEPA 1-6 [HEPA1-6] (ATCC[®] CRL-1830[™]) <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1830.aspx#documentation>>. Pristupljeno 30. lipnja 2017.

Baytop, T. (1984) Treatment with plants in Turkey. *Istanbul Univ. Publ.* **3255/40**, 420.

Broadhead, C.L., Combes, R.D. (2001) The current status for food additives toxicity testing and the potential for application of the Three Rs. *Altern. Lab. Anim.* **29 (4)**, 471–485.

Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology: The Basics*, 2.izd., Bios Scientific Publishers, London / New York.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Bakerc, V., Ballsd, M., Blaauboere, B.J., Boobisf, A., Carereg, A., Kevekordesh, S., Lhuguenoti, J.C., Pieterse, R., Kleinerj, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 193-236.

EMD Millipore Corporation (2013, 06. ožujak) Muse[™] Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide, Merck KgaA. <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Muse-Annexin-V-and-Dead-Cell-Assay-Kit,MM_NF-MCH100105?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.hr%2Furl%3Fsa%3Dt%26rct%3Dj%26q%3D%26src%3Ds%26source%3Dweb%26cd%3D1%26ved%3D0ahUKEwiPvKepzI3VAhXLSRoKHVRID1IQFggfMAA%26url%3Dhttps%253A%252F%252Fwww.emdmillipore.com%252FPR%252Fen%252Fproduct%252FMuse-Annexin-V-and-Dead-Cell-Assay-Kit%252CMM_NF-MCH100105%26usg%3DAFQjCNGH5xYI9LcbBLCK_0XPVX6V_D_-NQ&bd=1>. Pristupljeno 1. srpnja 2017.

EMS (2017) Technical Data Sheets. Fuchs Resenthal Counting Chamber. EMS - Electron Microscopy Science <<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63512-10.aspx>>. Pristupljeno 12. srpnja 2017.

Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Sestili, P., Paolillo, M., Ricci D. (2009) *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Nat. Prod. Commun.* **12**, 1665-1670.

- Gelenčir, N. (1989) Prirodno liječenje biljem i ostalim sredstvima, 14. izd. [online], Znanje, Zagreb <http://www.scribd.com/doc/26696220/Gelencir-Nikola-Prirodno-lije%C4%8Denje-biljem>. Pristupljeno 29. lipnja 2017.
- Grlić, Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2. izd., August Cesarec, Zagreb.
- ITIS (2017, 03. srpnja) *Prunus spinosa* L., Integrated Taxonomic Information System, <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24802#null> Pristupljeno 3. srpnja 2017.
- Janick, J., Moore, I. N. (1996) *Fruit breeding. Tree and tropical fruits*. John Wiley & Sons, New York.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**, 239-257.
- Kumar, S., Dorstyn, L. (2009) Analysing Caspase Activation and Caspase Activity in Apoptotic Cells. U: *Apoptosis; Methods and Protocols*, 2.izd. (Erhardt, P., Toth, A., ured.), Humana Press, New York, **559**, str. 3-17.
- Lipton, P. (1999) Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *American Physiological Society*, **79**, 1431-1568.
- Marakoğlu T., Arslan D., Özcan M., Haciseferoğullari H. (2005) Proximate composition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur)) fruits. *J. Food Eng.* **68**, 137-142.
- Olszewska, M., Wolbis, M.(2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**, 367-372.
- Olszewska, M., Wolbis, M. (2002) Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **59**, 133-137.
- Op den Kamp, J.A.F. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 47.
- Plantea (31. siječnja 2017.) Priroda i biljke. Trnina, *Prunus spinosa*. <http://www.plantea.com.hr/trnina/>>. Pristupljeno 28. lipnja 2017.

Quattrocchi, U. (2012) CRC World Dictionary of Medical and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. Taylor and Francis, Boca Raton, Florida.

Qipa, E., Gökalp, F.D. (2017) Apoptotic effect of *Prunus spinosa* fruit extract on HT-29 colon cancer cell line. *J. Cancer Sci. Ther.* **9**. doi:10.4172/1948-5956-C1-100

Radovanović, B.C., Milenković Anđelković, A.S., Radovanović, A.B., Anđelković, M.Z. (2013) Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 813-819.

Riccardi, C., Nicoletti, I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, London 1.3, 1458-61.

Riley, R., S., Idowu, M. (2017) Principles and Applications of Flow Cytometry. Abcam. <www.flowlab-childrens.harvard.com/yahoo_site_admin/assets/docs/PRINCIPLESANDAPPLICATION.29464931.pdf>. Pristupljeno 6. srpnja 2017.

Roche Diagnostics GmbH (2012) Culture of Animal Cells - Basic Techniques, <https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/X-tremeGENE TT 10.12.pdf>>. Pristupljeno 1. srpnja 2017.

Schmidt, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V. (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*. **13(2)**, 204-8.

Schulze-Osthoff, K. (2008) How cells die: Apoptosis and other cell death pathways. U: Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4. izd. [online] (Rode, H.-J., ured.), Roche Diagnostics GmbH, Frankenthal-Eppstein, str. 1-18, <https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf>. Pristupljeno 1. srpnja 2017.

Schumer, M., Colombel, M.C., Sawczuk, I.S., Gobé, G., Connor, J., O'Toole, K.M., Olsson, C.A., Wise, G.J., Buttyan, R. (1992) Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am. J. Pathol.* **140**, 831-838.

Strober, W. (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. U: *Current Protocols in Immunology*, 3.izd. [online] (Coligan, J. E., Bierer, B. E., ured.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Yersey. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.

Šilić, Č. (1990) *Atlas drveća i grmlja*, Svjetlost, Sarajevo.

The Academies (2007) Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy [online], The National Academies Press, Washington, D.C., <https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=3AWfAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT21&dq=Toxicity+testing+in+the+21st+century:+A+vision+and+a+strategy&ots=UuvqLABfCd&sig=o8Lr_wyntxxrYU97FjDIS8UezJk&redir_esc=y#v=onepage&q=Toxicity%20testing%20in%20the%2021st%20century%3A%20A%20vision%20and%20a%20strategy&f=false>.

Pristupljeno 1. sprnja 2017.

Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitić, M. N., Randelović, S.S., Đorđević, A.S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind.* **68** (3), 297–303.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis; Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *J. Immunol. Methods.* **184**, 39-51.

Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods.* **243**, 167–190.

Umeljić, V. (2004) U svijetu cvijeća i pčela. U: *Atlas medonosog bilja*. (Umeljić, V., ured.) Ilija Borković, Split.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie. A.R. (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251.

Žlender, V. (2003) Apoptoza – programirana smrt stanice. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **54**, 267 – 274.