

# Preživljavanje i morfologija tumorske stanične linije MCF-7 u prisustvu ekstrakata đumbira

---

Stanečić, Željka

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:025799>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Željka Stanečić**

6890/BT

**PREŽIVLJAVANJE I MORFOLOGIJA TUMORSKE STANIČNE  
LINIJE MCF-7 U PRISUSTVU EKSTRAKATA ĐUMBIRA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Tehnologija vitamina i hormona

**Mentor:** Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

**Zagreb, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Preživljavanje i morfologija tumorske stanične linije MCF-7 u prisustvu ekstrakata đumbira

*Željka Stanečić, 0058205063*

**Sažetak:** U suvremenom svijetu primjena biološki aktivnih tvari iz biljaka koje imaju blagotvoran učinak na organizam sve je raširenija. Za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz prirodnih izvora često se koriste *in vitro* testovi koji uključuju uporabu različitih humanih staničnih linija. Pomoću *in vitro* testova najčešće se ispituje tzv. bazalna citotoksičnost kojom se određuje učinak ispitivane tvari na preživljavanje stanica u kulturi. U ovom radu provedeno je *in vitro* ispitivanje učinaka subkritičnih vodenih ekstrakata đumbira na tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 te je određena vijabilnost stanica MTS metodom 48 sati nakon tretmana. Rezultati su pokazali inhibitorno djelovanje ekstrakta na preživljavanje stanica, a maksimalna inhibicija od 61,21% postignuta je tretiranjem stanica sa 100 mg/mL ekstrakta. Morfološke promjene u stanicama nakon tretmana praćene su primjenom svjetlosne i fluorescentne mikroskopije te su u korelaciji s rezultatima određivanja vijabilnosti stanica. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na mogućnost primjene đumbira kao izvora biološki aktivnih spojeva.

**Ključne riječi:** đumbir, ekstrakt, *in vitro* testovi, MCF-7 stanice, vijabilnost

**Rad sadrži:** 26 stranica, 4 slike, 24 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

**Pomoć pri izradi:** -

**Datum obrane:** 19. rujan 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Bioengineering**  
**Laboratory for Cell Technology and Biotransformation**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**The viability and morphology of tumor MCF-7 cells in the presence of ginger extracts**

***Željka Stanečić, 0058205063***

**Abstract:** Nowadays, use of biologically active substances from plant sources with beneficiary effects on human health is increasing. Biological potential of such substances is often studied by *in vitro* tests involving the use of human cell lines. *In vitro* tests are usually assessed basal cytotoxicity by determining the effects of the test substance on cell culture survival. In this study effects of subcritical water extract of ginger has been studied *in vitro* on human tumor cell line MCF-7. Cell viability was determined by MTS method after 48 hours of treatment. The results showed the inhibitory effect of extracts on cell survival, and maximum inhibition of 61,21% was achieved by treatment of cells with 100 mg/mL of extract. Morphological changes in cells after treatment are determined by light and fluorescence microscopy, and correlated to the viability results. The obtained results of this study indicate the possibility of using ginger as a source of biologically active compounds.

**Keywords:** extract, ginger, *in vitro* assays, MCF-7 cells, viability

**Thesis contains:** 26 pages, 4 figures, 24 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ph.D. Višnja Gaurina Srček, Full Professor

**Technical support and assistance:** -

**Defence date:** September 19<sup>th</sup> 2018

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kultura životinjskih stanica .....	2
2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica .....	3
2.1.2. Serum .....	4
2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica .....	5
2.1.4. Primjena <i>in vitro</i> testova .....	6
2.2. Subkrična ekstrakcija vodom .....	7
2.3. Đumbir ( <i>Zingiber officinale</i> ) .....	8
2.3.1. Gospodarski i biološki značaj đumbira .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>10</b>
3.1. Materijali .....	10
3.1.1. Stanična linija MCF-7 .....	10
3.1.2. Kemikalije .....	10
3.1.3. Otopine i puferi .....	11
3.1.4. Uređaji i oprema .....	12
3.2. Metode rada .....	12
3.2.1. Priprema subkričnog vodenog ekstrakta đumbira .....	12
3.2.2. Uzgoj MCF-7 stanica u T-bocama .....	12
3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo .....	13
3.2.4. Ispitivanje učinaka subkričnog vodenog ekstrakta đumbira na MCF-7 staničnoj liniji .....	13
3.2.5. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom .....	14
3.2.6. Morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene bojanjem kristal-ljubičastim .....	14
3.2.7. Morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene fluorescentnom mikroskopijom .....	15
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>16</b>
4.1. Učinak subkričnog vodenog ekstrakta đumbira na vijabilnost MCF-7 stanica .....	16

4.2. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene bojanjem kristal-ljubičastim .....	17
4.3. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene fluorescentnom mikroskopijom.....	17
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>20</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>23</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>24</b>

## 1. UVOD

Đumbir (*Zingiber officinale*), je gomoljasta biljka iz porodice *Zingiberaceae* koja potječe iz jugoistočne Azije. Koristi se kao dodatak prehrani u svježem ili sušenom obliku te u medicinske svrhe za ublažavanje mučnina, kašlja, upala, probavnih smetnji i bolova. Tijekom posljednjih 20 godina sve više se istražuju pozitivni učinci biološki aktivnih spojeva sadržanih u rizomu đumbira koji pokazuju potencijalno antitumorsko, antialergijsko, antibiotsko, antioksidacijsko djelovanje.

U prirodi postoji mnoštvo bioloških aktivnih tvari koje imaju pozitivne učinke na organizam. Stoga se danas sve više ispituje primjena biološki aktivnih tvari iz biljaka kao izvora novih lijekova, pri čemu se često koriste *in vitro* testovi koji uključuju uporabu različitih humanih staničnih linija. Primjenom kultura stanica moguća je analiza velikog broja tvari u širokom rasponu koncentracija u kratkom vremenu, a dobiveni rezultati koriste se kao smjernice za daljnja *in vivo* istraživanja.

Proces ekstrakcije i separacije biološki aktivnih spojeva iz biljaka može biti poprilično kompliciran zbog vrlo složene kemijskog sastava biljaka. Dosad korištene metode nisu pogodne za primjenu u komercijalnoj proizvodnji zbog visokih troškova izvedbe i kompliciranog uklanjanja otapala korištenog za ekstrakciju. Stoga je razvijena subkritična ekstrakcija vodom. Voda je jeftino, dostupno i ekološki prihvatljivo otapalo te omogućava manipulaciju fizikalnim i kemijskim svojstvima promjenom temperature i tlaka čime postaje pogodna i za ekstrakciju pri sobnoj temperaturi nepolarnih fitokemikalija.

Na temelju svega navedenog, cilj ovog rada bio je ispitati učinak subkritičnih vodenih ekstrakata đumbira na morfologiju i preživljavanje humane tumorske stanične linije MCF-7.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kultura životinjskih stanica

Kultura stanica je laboratorijska tehnika uzgoja stanica izoliranih iz životinjskog tkiva uz dodatak potrebnih hranjivih tvari i faktora rasta u *in vitro* sustavima. Pojedinačne stanice izdvojene su iz tkiva ili organa te se mogu održavati u umjetnom okolišu i smatrati se zasebnim organizmom u *in vitro* uvjetima. Takve diferencirane stanice izdvojene su iz kontroliranih uvjeta te se prilagođavaju na nove okolišne uvjete pa posljedično dolazi do gubitka njihovih visokospecijaliziranih funkcija te stanice podliježu dediferencijaciji, degeneraciji ili transformaciji. Stanice izolirane direktno iz tkiva ili organa čine primarnu kulturu. Kultura se smatra primarnom sve dok se višestrukom supkultivacijom ne postignu svojstva stanične linije. Stanične linije se mogu podijeliti na netransformirane (konačne) ili transformirane (kontinuirane) stanične linije. Kontinuirane stanične linije karakterizira promjena morfologije stanica, povećana učinkovitost kloniranja, mogućnost rasta u suspenziji i neograničeni životni vijek. S druge strane, pokazuju kromosomsku nestabilnost, fenotipsku različitost od izvornog tkiva te gubitak specifičnih tkivnih markera (Freshney, 2005).

Glavna prednost primjene kulture stanica je konzistentnost i reproducibilnost rezultata korištenjem istog tipa stanica ili homogene populacije. Osim toga, primjena kultura životinjskih stanica dalje bolji uvid u djelovanje pojedinih spojeva u specifičnim tipovima stanica i omogućuje razumijevanje staničnih procesa za pojedini tip stanica, kao i bolju mogućnost kontrole staničnih uvjeta koji podrazumijevaju kontrolu pH vrijednosti, temperature, koncentracije kisika, hranjivih tvari i sl. Uz sve navedeno, toksikološki testovi primijenjeni u kulturi stanica znatno su jeftiniji od *in vivo* ispitivanja na pokusnim životinjama, a ujedno su i etički opravdani. Glavni nedostatak primjene kulture stanica je promjena karakteristika stanica nakon dužeg razdoblja kontinuiranog *in vitro* rasta stanica pri čemu dolazi do promjena biokemijskih karakteristika i enzimске aktivnosti stanice zbog nedostatka pojedinih nutrijenata u hranjivom mediju ili nakupljanja određenih nusproizvoda. Također, veliki nedostatak su visoki troškovi početnih ulaganja, kao što su nabava medija i seruma za uzgoj. Kako bi rad s kulturama stanica bio uspješan, potrebno je obučeno osoblje s dovoljnom razinom znanja i iskustvom u radu (Butler, 2004).

Spektar primjene kulture životinjskih stanica danas je vrlo širok. Tako se ona može koristiti za istraživanje fiziologije ili biokemijskih procesa u stanicama (različiti metabolički putovi), u proizvodnji umjetnih tkiva (npr. umjetne kože za liječenje opekline visokog stupnja), u proizvodnji različitih visokovrijednih proizvoda (biofarmaceutika) te kod testiranja utjecaja



različitih tvari na specifične tipove stanica, kao što su metaboliti, hormoni, faktori rasta te potencijalno mutageni ili toksični spojevi.

### **2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica**

Stanice se uzgajaju u kemijski složenom tekućem mediju koji potiče rast stanica kroz duže vrijeme. Kako bi uzgoj životinjskih stanica *in vitro* bio uspješan, potrebno je osigurati što sličnije uvjete onima u *in vivo* sustavu iz kojeg su izolirane, a upravo je to funkcija medija. Medij osigurava odgovarajuću pH vrijednost, koncentraciju kisika i CO<sub>2</sub>, osmotski tlak i optimalnu temperaturu potrebnu za preživljavanje i umnažanje stanica te optimalnu koncentraciju svih potrebnih nutrijenata koji su stanicama nužni za rast. Danas su dostupni mnogi standardizirani mediji razvijeni za rast različitih tipova stanica. Najčešće korišteni mediji su BME (Basal Medium Eagles's; oblikovan za rast mišjih L i HeLa stanica), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, poboljšani BME medij koji ima veću količinu aminokiselina), DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, modifikacija BME koja ima četiri puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina) te GMEM (Glasgow's Modification of Eagle's Medium, također modifikacija BME koja ima dva puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina).

Osnovna komponenta medija je voda koja mora biti visoke čistoće jer bi prisutnost elemenata u tragovima i kontaminanata narušila kvalitetu medija za uzgoj. Za pročišćavanje se najčešće primjenjuju procesi reverzne osmoze, filtracije, deionizacije i filtracije kroz mikropore. Od ugljikohidrata je najzastupljenija glukoza koju stanice koriste kao izvor ugljika i energije te kao preteču u biosintezi riboze koja je neophodna za sintezu nukleinskih kiselina, a najčešće se dodaje u koncentraciji 10-25 mM. Aminokiseline su prekursori u sintezi proteina, a u mediju za uzgoj su prisutne u koncentracijama 0,1-0,2 mM. Glutamin se dodaje u znatno višim koncentracijama od ostalih aminokiselina (2-4 mM) jer je njegova prisutnost vrlo važna za većinu stanica. Osim u sintezi proteina, glutamin ima ulogu prekursora za sintezu purina, pirimidina, asparagina te je preteča za intermedijere citratnog ciklusa. Anorganske soli se dodaju u obliku iona Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a djeluju kao koenzimi enzima te su neophodni za održavanje ionske ravnoteže i osmotskog tlaka. Puferski kapacitet medija održava bikarbonat koji s plinovitim CO<sub>2</sub> iz atmosfere inkubatora (5-10%) osigurava održavanje optimalne pH vrijednosti medija (pH=6,9-7,4). Nedostatak korištenja bikarbonata kao pufer je da nakon što se kultura ukloni iz inkubatora, medij ubrzo postaje lužnat.

Vitamini su prisutni u relativno malim koncentracijama i djeluju kao koenzimi enzima važnih u metabolizmu stanica. Mediju za uzgoj najčešće se dodaju vitamini B skupine kao što su biotin

i folna kiselina, a od hormona se dodaju inzulin, glukokortikoidi, trijodtironin i steroidni hormoni. Od elemenata u tragovima posebno važnu ulogu ima selen zbog svojih antioksidacijskih svojstava i uloge u rastu stanica. Indikator fenol-red osjetljiv je na male promjene pH vrijednosti pa pri nižim pH vrijednostima mijenja boju u narančastu (pH=7) ili žutu (pH=6,5) što je pokazatelj pojave kontaminacije. Faktori rasta dodaju se osnovnom mediju s ciljem stimulacije staničnih funkcija i povećanja proliferacije stanica. Prisutnost lipida u mediju je važna jer su lipidi strukturne komponente membrane i koriste se kao izvor i zaliha energije. Najvažnije masne kiseline koje se dodaju u medij su palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska i arahidonska kiselina (Freshney, 2005).

### **2.1.2. Serum**

Serum je bezstanična krvna komponenta koja se dobiva zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla. Glavne komponente seruma su proteini, tvari nužne za proliferaciju stanica i biomolekule koje imaju ulogu u poticanju ili inhibiciji staničnog rasta. Najčešće se koristi fetalni goveđi serum (FBS) jer ima visok udio embrionalnih faktora rasta, a osim njega se koriste teleći serum (NCS) te konjski serum. Serum je izvor osnovnih nutrijenata (poput proteina, minerala, aminokiselina), hormona, faktora prihvaćanja i širenja stanica, faktora rasta, inhibitora proteaza, faktora zaštite od mehaničkog oštećenja i veznih proteina (poput albumina i transferina). Obično se dodaje mediju za uzgoj u koncentracijama 5-10% (v/v) (Slivac i sur., 2016).

Nedostatak seruma je svakako kemijska nedefiniranost, a samim time i nepoznat utjecaj nekih od komponenata seruma na kulturu stanica. Osim toga, proizvodnja seruma za sobom povlači i nepotrebnu patnju životinja čija se krv koristi za proizvodnju. Razlika u kemijskom sastavu između šarži seruma uzrokuje nedosljednost u rezultatima istraživanja. Dodatkom seruma povećava se cijena medija za uzgoj. Serum može biti potencijalni izvor mikrobnih kontaminanata kao što su npr. bakterije, gljivice, mikoplazme, virusi i prioni. Proteini prisutni u serumu mogu ugroziti postupke izolacije i pročišćavanja proizvoda i na taj način otežati biotehnošku proizvodnju (Butler, 2004).

Kako bi se izbjegli spomenuti nedostaci seruma, pristupilo se razvoju medija bez dodatka seruma (*serum-free* mediji). Glavne prednosti koju pružaju mediji bez seruma su selektivnost za određeni tip stanica što omogućuje standardizaciju sastava medija te mogućnost regulacije proliferacije i diferencijacije stanica mijenjanjem koncentracije i vrsta faktora rasta. Osim toga, nedostaci primjene *serum-free* medija su sporija proliferacija stanica, niža maksimalna

koncentracija stanica, manji maksimalni broj generacija kod konačnih staničnih linija, a uz to i visoka cijena tvari koje se moraju naknadno dodavati, kao što su faktori rasta i hormoni (Freshney, 2005).

### **2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica**

Za uspješan uzgoj stanica *in vitro* potrebno je osigurati optimalne vrijednosti različitih fizikalno-kemijskih parametara kao što su temperatura, pH vrijednost, koncentracija kisika i CO<sub>2</sub>, osmolarnost i viskoznost.

Optimalna temperatura za uzgoj životinjskih stanica odgovara fiziološkoj temperaturi organa, odnosno organizma iz kojeg su izolirane. Optimalna temperatura za uzgoj stanica sisavaca i ljudi je 37 °C. Temperaturna odstupanja ne bi smjela biti veća od ±0,5 °C stoga je preporučljivo temperaturu inkubatora podesiti na temperaturu nižu od optimalne da bi se spriječilo pregrijavanje kulture koje bi potencijalno moglo završiti uništavanjem stanica.

Optimalna pH vrijednosti podešava se ovisno o korištenoj staničnoj liniji, ali većini stanica odgovara pH vrijednost oko 7,4. Na promjenu pH vrijednosti utječe i ravnoteža između CO<sub>2</sub> u plinovitoj i tekućoj fazi (CO<sub>2</sub> otopljen u mediju koji je u ravnoteži s HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ionima), a otapanje CO<sub>2</sub> u mediju uzrokuje snižavanje pH vrijednosti. U inkubatorima je najčešće kontrolirana atmosfera od 5% CO<sub>2</sub>.

Za većinu kultura stanica dovoljno je osigurati atmosferski kisik, dok je za kulture tkiva potrebno osigurati do 95% kisika u kontroliranoj atmosferi. Budući da visina medija za uzgoj može utjecati na brzinu prijenosa kisika do stanica, poželjno je održavati visinu medija u rasponu od 2 do 5 mm te tako osigurati optimalnu raspodjelu kisika.

Većina staničnih linija ima visoku toleranciju na promjene osmotskog pritiska pa je optimalan osmotski tlak u rasponu 260-320 mOsm/kg.

Viskoznost medija najčešće ima vrlo mali utjecaj na rast stanica u kulturi, no postaje bitna u sustavima s miješanjem stanica te nakon tripsinizacije kada su stanice disocirane.

#### **2.1.4. Primjena *in vitro* testova**

Prirodni proizvodi sadrže brojne biološki aktivne tvari kao što su fenolni spojevi, glukozinolati, karotenoidi i alkaloidi. Navedeni spojevi, uneseni ili prisutni u organizmu u određenim koncentracijama, mogu imati pozitivan učinak na zdravlje ljudi koji se povezuje s antitumorskim, antialergijskim, antibiotskim, antioksidacijskim i drugim svojstvima koje posjeduju biološki aktivne tvari. Stoga se danas sve više ispituje primjena biološki aktivnih tvari iz biljaka kao izvora novih lijekova, pri čemu se često koriste *in vitro* testovi koji uključuju uporabu različitih humanih staničnih linija (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

*In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. Prilikom provođenja *in vitro* testova najčešće se određuje tzv. bazalna citotoksičnost, kojom se određuje učinak ispitivane tvari na preživljavanje stanica u kulturi, a dobiveni rezultati koriste se kao smjernice za daljnja *in vivo* istraživanja (Kniewald i sur., 2005). *In vitro* testovi citotoksičnosti su brži i jeftiniji u odnosu na *in vivo* testove, imaju visok stupanj standardizacije, nastaje manje toksičnog otpada i očuvana je dobrobit eksperimentalnih životinja. Primjenom kultura stanica moguća je analiza velikog broja tvari u širokom rasponu koncentracija u kratkom vremenu. Budući da su svojstva stanica izmijenjena, u odnosu na ishodne *in vivo* stanice, postoji mogućnost promijenjene metaboličke reakcije na ispitivanu tvar, kao i mogućnost reakcije ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj.

Provode se ispitivanja biljnih ekstrakata, pojedinih frakcija i/ili izoliranih i pročišćenih sastojaka kako bi se odredilo njihovo djelovanje na organizam, a najčešće ispitivana svojstva biološki aktivnih tvari su antitumorski i antioksidacijski učinak. Različite biljke kao i spojevi izolirani iz biljnih vrsta pokazuju *in vitro* antitumorsku aktivnost te sadrže farmakološki aktivne spojeve koji se istražuju i usmjeruju prema razvoju potencijalnih antitumorskih lijekova. Primarni *in vitro* test Nacionalnog instituta za rak (eng. National Cancer Institute, NCI) predložen 1990. godine uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija (Boyd i Paull, 1995). Za ispitivanja se najčešće koriste humane kontinuirane stanične linije koje su dostupne putem banaka stanica, od kojih su dvije najveće: American Type Cell Culture (ATCC) i European Collection of Animal Cell Culture (ECACC). Istraživanja biološke aktivnosti spojeva iz biljaka trebaju uključivati i određivanja drugih tipova bioloških aktivnosti, kao npr. antioksidacijskog kapaciteta. Povezivanje rezultata biološke aktivnosti s kvalitativnim i kvantitativnim analizama biljnih

ekstrakata i proizvoda omogućuje povezivanje zapaženog učinka s količinom i sastavom biološki aktivnih spojeva u uzorku (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Često korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kultura stanica je MTS test koji je primijenjen u provođenju eksperimenta opisanog u ovom radu.

## **2.2. Subkritična ekstrakcija vodom**

Biljni lijekovi, koji se uglavnom dobivaju ekstrakcijom biološki aktivnih spojeva iz biljaka, trenutno čine 30-40% farmaceutske proizvodnje. Prvi, ali i najvažniji korak u razvoju novih lijekova su ekstrakcija i separacija biološki aktivnih spojeva. Zbog vrlo složeno kemijskog sastava biljaka, ovaj proces može biti poprilično kompliciran.

Dosad korištene metode, kao što su ekstrakcija otapalom, ekstrakcija vodenom parom i sublimacija, korisne su za ekstrakciju i pročišćavanje manjih količina fitokemikalija, no zbog visokih troškova izvedbe, kompliciranog uklanjanja otapala korištenog za ekstrakciju i nedovoljne čistoće kemikalija nisu pogodne za primjenu u komercijalnoj proizvodnji. Kako bi se izbjegle neželjene strukturne promjene tijekom ekstrakcije u dobivenim fitokemikalijama, važno je odabrati odgovarajući tip i koncentraciju otapala te tako spriječiti potencijalne negativne učinke na fiziološka, kemijska ili biološka svojstva fitokemikalija.

Posljednjih godina razvijene su nove tehnologije i metode kao što su ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, membranske tehnologije ekstrakcije i subkritična tekućinska ekstrakcija s ciljem što uspješnijeg izdvajanja djelotvornih komponenti iz ljekovitih biljaka. Među navedenim tehnologijama izdvaja se subkritična tekućinska ekstrakcija primjenjiva na toplinski osjetljive materijale zbog visokog stupnja ekstrakcije, uspješnog izdvajanja ostataka otapala te očuvanja okoliša. Međutim, zbog visokih troškova opreme i visokog tlaka koji je potreban za ekstrakciju, primjena ove metode je ograničena, no iz nje je uspješno razvijena subkritična ekstrakcija vodom (Liang, 2013).

Navedena metoda kao ekstrakcijsko sredstvo koristi vodu u temperaturnom rasponu od 100 °C do 374 °C te tlaku dovoljno visokom da se voda održi u tekućem stanju (Ramos i sur., 2002). Voda kao otapalo je vrlo zanimljiva zbog mogućnosti manipulacije fizikalnim i kemijskim svojstvima promjenom temperature i tlaka, a uz to je jeftino, dostupno, netoksično i ekološki prihvatljivo otapalo. Pri temperaturi od 374 °C i tlaku iznad 220 bara voda se nalazi u subkritičnom stanju. Voda je vrlo polarno otapalo kojeg karakterizira dielektrična konstanta od oko 80 i u tom stanju koristi se za ekstrakciju visoko polarnih spojeva. Međutim, pri

temperaturama višim od temperature vrelišta te visokom tlaku, polarnost vode se naglo smanjuje. S obzirom da s povećanjem temperature vrijednost dielektrične konstante pada, voda postaje pogodna i za ekstrakciju nepolarnih otapala. Na primjer, u subkritičnom stanju pri temperaturi od 200 °C dielektrična konstanta vode iznosi oko 33 (Bubalo i sur., 2015). Na temperaturi od 250 °C dielektrična konstanta vode iznosi 27, dok se daljnjim povećanjem temperature do 300 °C vrijednost dielektrične konstante smanjuje na 20 (Jo i sur., 2013). Postizanjem niskih polariteta na povišenoj temperaturi subkritičnom ekstrakcijom vodom može se postići visok stupanj ekstrakcije i postići brzo ekstrakcijsko vrijeme za niz hidrofobnih organskih spojeva (Herrero i sur., 2006).

Danas se subkritična ekstrakcija vodom primjenjuje za ekstrakciju flavonoida, eteričnih ulja, tanina, masnih kiselina, laktone i organskih kiselina (Liang, 2013).

### **2.3. Đumbir (*Zingiber officinale*)**

Đumbir (*Zingiber officinale*), je višegodišnja gomoljasta biljka iz porodice *Zingiberaceae* koja potječe iz jugoistočne Azije (slika 1). Danas se uzgaja u mnogim zemljama diljem svijeta koje imaju tropsku klimu. Ispod zemlje se horizontalno širi u 7-15 cm dugačak, razgranat, blijedo žut i aromatičan rizom, dok se iznad zemlje proteže uspravna stabljika koja može doseći visinu od 1 m. Karakteriziraju ga uski i rebrasti listovi dužine 15-30 cm te cvjetovi nalik na onima kod orhideje.



**Slika 1.** Đumbir, *Zingiber officinale* (prema Anonimus 1, 2010)

### 2.3.1. Gospodarski i biološki značaj đumbira

Đumbir ima dugačku povijest u medicinskoj upotrebi zbog toga što sadrži vrlo širok spektar biološki aktivnih tvari pa je pogodan za liječenje raznih tegoba kao što su mučnine, povraćanje, astma, kašalj, upale, probavne smetnje i bolovi. Također, ekstrakti đumbira sadržavaju mnoga eterična ulja poput terpena, alkohola, ketona, flavonoida, karotenoida i gingerola te stoga pokazuju antimikrobni, antioksidativni, antitumorski učinak te stimulirani učinak na imunološki sustav. Osim toga, đumbir ima široku primjenu u prehrambenoj industriji zahvaljujući hranjivom sastavu i aromatičnim spojevima. Rizomi su vrlo bogat izvor ugljikohidrata, vitamina, minerala i željeza. Uz to, đumbir posjeduje i visoku nutritivnu vrijednost (Dhanik i sur., 2017).

Kemijski sastav đumbira razlikuje se ovisno o zemlji podrijetla te primjenjuje li se rizom đumbira u svježem ili sušenom obliku. Biološki aktivni spojevi sadržani u đumbiru mogu se podijeliti na hlapljiva ulja i oštre fenolne spojeve. Miris đumbira uglavnom ovisi o sadržaju hlapljivih ulja čija zastupljenost varira od 1% do 3%, a sastoje se od monoterpenoida ( $\beta$ -felandren, cineol, geraniol, kurkumin, citral, terpineol, borneol) i seskviterpenoida ( $\alpha$ -zingiberen (30-70%),  $\beta$ -seskvifelandren (15-20%),  $\beta$ -bisabolen (10-15%), zingiberol). Od fenolnih spojeva najzastupljeniji su gingerol, gingeron i šogol. Trpkost svježeg đumbira posljedica je prisutnosti gingerola, od kojih je najzastupljeniji [6]-gingerol, dok trpkost sušenog đumbira potječe od šogaola, dehidriranih oblika gingerola, koji su termolabilni zbog prisutnosti  $\beta$ -hidroksi keto grupe pa se lako podvrgavaju procesu dehidracije s ciljem dobivanja šogaola (Ali i sur., 2008).

Zbog povećane učestalosti obolijevanja od različitih vrsta karcinoma, sve više se koristi funkcionalna hrana koja bi potencijalno mogla usporiti napredovanje bolesti. Mnogi znanstvenici su tijekom posljednjih 20 godina prepoznali pozitivne učinke đumbira i njegovih metabolita prema različitim oblicima karcinoma, kao što su karcinomi dojke, pluća, kože, debelog crijeva, gušterače i dr. Znanstvena istraživanja pokazala su da ekstrakt korijena đumbira i gingerol imaju inhibicijsko djelovanje na rast *Helicobacter pylori* CagA+ sojeva koji sadrže specifični gen odgovoran za razvoj želučanih premalignih i malignih lezija (Dhanik i sur., 2017).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Stanična linija MCF-7**

U ovom radu korištena je MCF-7 tumorska stanična linija nabavljena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) banke stanica. Uspostavljena je 1970. godine na Institutu *Michigan Cancer Foundation* u Detroitu, odakle joj i potječe naziv, a razvijena je iz pleuralne efuzije 69-godišnje žene s metastaziranim rakom dojke. Ova stanična linija morfološki je epitelnog tipa i pripada skupini adherentnih stanica koje formiraju kupolaste monoslojeve. MCF-7 stanična linija je najčešće proučavana stanična linija ljudskog raka dojke u svijetu, a odlikuju je neinvazivnost, slaba agresivnost te niski metastatski potencijal (Comsa i sur., 2015).

Zbog činjenice da je toj staničnoj liniji za rast potreban estrogen te da vezanjem tamoksifena, estrogenog antagonista, dolazi do zastoja rasta stanica, MCF-7 stanična linija predstavlja odličan *in vitro* model za proučavanje mehanizama tumorskih odgovora na endokrinu terapiju (Levenson i sur., 1997).

Uzgoj MCF-7 stanica provodi se u kontroliranim uvjetima u plastičnim T-bocama ravnih stijenki te u pločicama s jažicama u inkubatoru uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub> pri temperaturi od 37 °C, dok se kao medij za rast MCF-7 stanica koristi DMEM uz dodatak 10% FBS (v/v).

##### **3.1.2. Kemikalije**

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH

Fluorescein diacetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Propidijev jodid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH



Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(-3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevasol)), Promega, SAD

Subkritični vodeni ekstrakt đumbira, Tehnološki fakultet, Sveučilište Novi Sad

### 3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

0,4 % otopina tripan-plavo

Boja tripan-plavo	0,08 g
PBS pufer	20 mL

0,2% otopina kristal-ljubičasto

Boja kristal-ljubičasto	0,2 g
2% etanol	10 mL

Otopina fluorescein diacetata

Fluorescein diacetat (FDA)	5 mg
Aceton	1 mL

Otopina propidijevog jodida

Propidijev jodid (PI)	2 mg
PBS pufer	20 mL

### **3.1.4. Uređaji i oprema**

Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Neubarova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Spektrofotometar, Thermo Scientific Genesys 10S UV/VIS, SAD

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Ploče s 6 jažica, Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska

T-boce od 25 cm<sup>2</sup>, Corning, SAD

Laboratorijsko posuđe (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, kivete)

Fluorescentni mikroskop, EVOS Fluid Cell Imaging Station, Invitrogen

## **3.2. Metode rada**

### **3.2.1. Priprema subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira**

Priprava subkritičnog vodenog ekstrakata đumbira korištenog u ovom radu provedena je na Tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Novom Sadu.

### **3.2.2. Uzgoj MCF-7 stanica u T-bocama**

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju na -70 °C u mediju za zamrzavanje na način da se ampule sa stanicama uranjaju u vruću kupelj. Stanice su zamrznute u koncentraciji od oko 1x10<sup>7</sup> stanica/mL. Stanice se nakon odmrzavanja centrifugiraju 3 minute pri 1000 okretaja po minuti, nakon čega se supernatant pažljivo ukloni pipetom, a talog stanica se resuspendira u DMEM mediju za uzgoj koji sadrži 5-10% FBS (v/v). Stanice se nacjepljuju u T-boce u početnoj koncentraciji od 2x10<sup>5</sup> stanica/mL, a zatim stavljaju u inkubator na temperaturu od 37 °C uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub>. Pod inverznim mikroskopom vrši se provjera općeg stanja i brojnosti te morfologije stanica. Kad je pokrivenost površine, odnosno gustoća stanica viša od 80%, potrebno je precjepljivanje stanica kako bi se spriječio ulazak stanica u stacionarnu fazu zbog pojave kontaktne inhibicije. Ovakav način uzgoja omogućava umnožavanje i održavanje biomase stanica za potrebe pojedinačnih pokusa.

Tijekom uzgoja potrebno je obratiti pozornost na eventualnu promjenu boje koja je znak pojave kontaminacije u kulturi.

### **3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo**

Za pripremu uzorka za brojanje stanica potrebna je tripsinizacija stanica kako bi se stanice odvojile od podloge u pojedinačne stanice. Hranjivi medij se iz T-boce uklanja sterilnom pipetom te se dodaje 1mL tripsina. S obzirom da je postupak tripsinizacije brži na višoj temperaturi, T-boca se stavlja u inkubator kroz 3-5 minuta, a sam učinak tripsinizacije može se pratiti pod inverznim mikroskopom. Zaokružene stanice rezultat su uspješnog odvajanja stanica od podloge pa se dodatkom 2 mL medija sa serumom zaustavlja djelovanje tripsina, a stanice se istovremeno resuspendiraju. Alikvot od 20  $\mu$ L suspenzije stanica pomiješa se s 20  $\mu$ L boje tripan-plavo te se 20  $\mu$ L tako pripremljene otopine nanosi u Neubauerovu komoricu za brojanje. Neubauerova komorica za brojanje je podijeljena na 16 kvadratića ukupne površine 1 mm<sup>2</sup>, a broj stanica računa se tako da se srednja vrijednost stanica iz 4 kvadratića pomnoži s  $5 \times 10^3$ . Princip metode je da žive stanice ne propuštaju velike polarne molekule boje tripan-plavo u stanicu te se stoga ne boje, za razliku od mrtvih stanica koje propuštaju molekule boje koje se vežu na unutarstanične proteine te se na taj način boje plavo. Broj stanica po mL suspenzije određuje se iz izraza:

$$\text{Broj stanica / mL suspenzije} = \text{srednja vrijednost broja stanica u 4 kvadratića} \times 5 \times 10^3$$

### **3.2.4. Ispitivanje učinaka subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na MCF-7 staničnoj liniji**

Prethodno uzgojene MCF-7 stanice nacijepljene su u ploče sa 96 jažica. U svaku jažicu nacijepljuje se 100  $\mu$ L suspenzije stanica početne koncentracije  $2 \times 10^4$  stanica/mL. Ploče s nacijepljenim stanicama stavljaju se u inkubator s reguliranom atmosferom od 37 °C. Inverznim mikroskopom prati se njihovo prihvaćanje za podlogu, morfologija, brojnost i opće stanje. Nakon 24 sata od nacijepljivanja stanice su tretirane subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira u koncentracijama od 5, 10, 25, 50 i 100 mg/mL. U kontrolne jažice MCF-7 stanica se ne dodaju ekstrakti. Svaki uzorak postavljen je u pet paralela, a postupak je ponavljan tri puta.

Nakon 48 sati od dodatka ekstrakta MTS metodom određena je vijabilnost stanica koja je izražena kao postotak preživljavanja (%) u odnosu na kontrolne stanice.

### 3.2.5. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

MTS je kolorimetrijska metoda za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevazol)) u obojeni formazanski produkt. U svaku se jažicu dodaje 10 µL MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija te se stanice inkubiraju 3 sata na temperaturi 37 °C pri 95% vlažnosti zraka i 5% CO<sub>2</sub>. Apsorbancija se mjeri na 492 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju netretiranih (kontrolnih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica proglašuje se 100%, a vrijednosti apsorbancija tretiranih uzoraka izraze se kao udio u odnosu na netretirane stanice.

$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ (uzorak)}}{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ (kontrola)}} \times 100$$

### 3.2.6. Morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene bojanjem kristal-ljubičastim

Prethodno uzgojene MCF-7 stanice nacijeppljene su na ploče s jažicama u početnoj koncentraciji od 2x10<sup>4</sup> stanica/mL. Ploče s nacijeppljenim stanicama inkubiraju se 24 sata u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i kontroliranim uvjetima atmosfere, a potom se tretiraju ekstraktom. U prvu jažicu nije dodan ekstrakt te je ona služila za kontrolu, dok su u sljedeće dvije jažice dodani ekstrakti đumbira u koncentracijama od 10 mg/mL i 25 mg/mL. Nakon 48 sati uzgoja, iz jažica je uklonjen medij za uzgoj i stanice su isprane PBS puferom. U svaku jažicu dodano je 0,5 mL boje kristal-ljubičasto te su uzorci ostavljeni 10-15 min u inkubatoru. Nakon toga iz jažica je uklonjena boja, stanice su isprane 2x PBS puferom te su slikane pomoću digitalne kamere na svjetlosnom mikroskopu pod povećanjem od 100x.

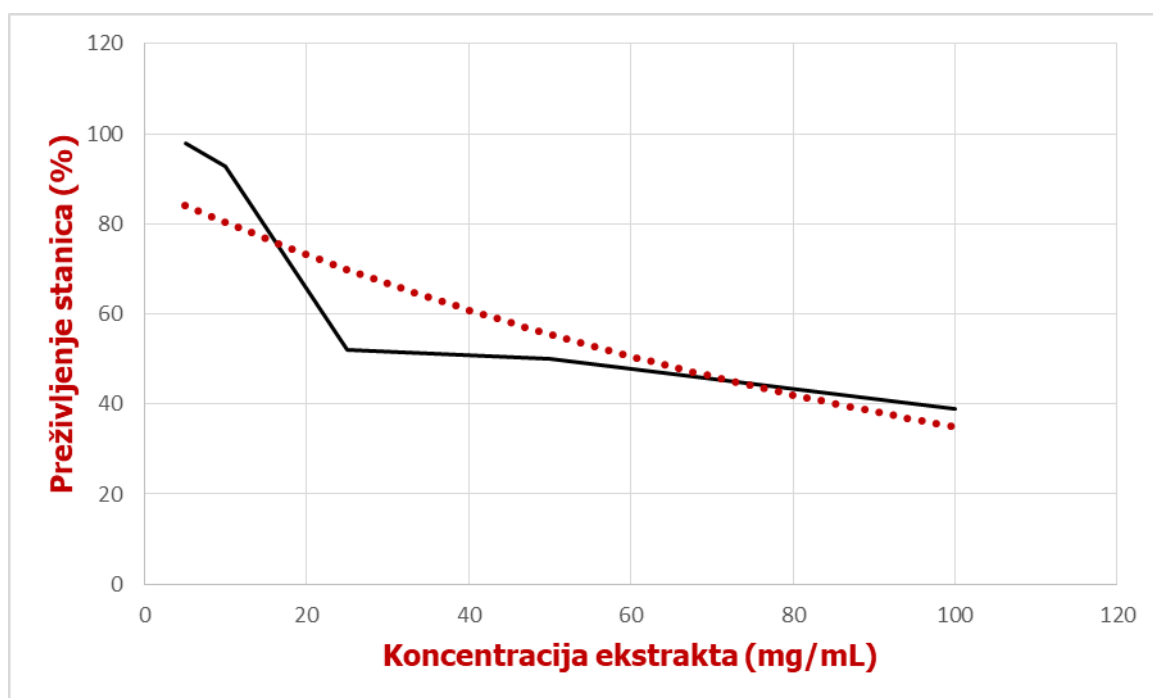
### **3.2.7. Morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene fluorescentnom mikroskopijom**

Metode bazirane na fluorescenciji koriste se za procjenu preživljavanja stanica. Istodobnim korištenjem dviju fluorescentnih boja moguće je razlikovati žive stanice od mrtvih. U jažice na mikrotitarskoj ploči nacijspljena je suspenzija stanica u početnoj koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica/mL. Suspenzija stanica se inkubira kroz 24 sata u pri temperaturi od 37 °C i atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Potom se uklanja medij i dodaju ekstrakti đumbira u koncentracijama od 25 i 50 mg/mL. Mikrotitarska ploča također je sadržavala kontrolnu jažicu u koju nije dodan ekstrakt. Iz stanične kulture se nakon 72 sata uklanja medij i dodaju se pripremljene otopine fluorescentnih boja FDA i PI. Stanice se inkubiraju u mraku na sobnoj temperaturi kroz 4-5 minuta nakon čega se uklanja boja, a potom ispiru PBS-om. Tako pripremljen uzorak je spreman za analizu pod fluorescentnim mikroskopom povezanim s računalom čime je omogućeno snimanje i obrada slike. Pomoću fluorescentnog mikroskopa moguće je pratiti promjene u strukturi stanica nastale uslijed procesa apoptoze i nekroze.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na vijabilnost MCF-7 stanica

MCF-7 stanice su nacijepnjene u ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica/mL i nakon 24 sata tretirane s pet različitih koncentracija subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira u rasponu od 5 do 100 mg/mL. Nakon 48 sati od tretmana MTS metodom je određena vijabilnost stanica. Dobiveni rezultati su izraženi kao postotak preživljenja stanica tretiranih ekstraktom đumbira u odnosu na kontrolne stanice (slika 2).

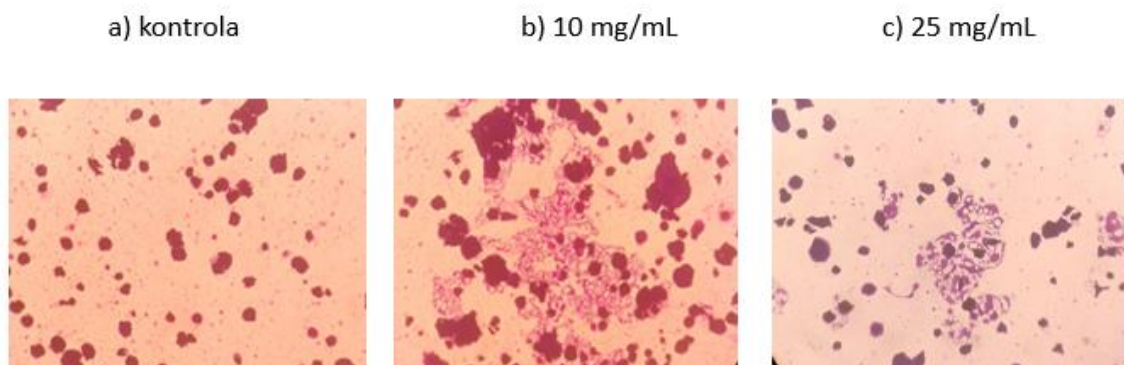


**Slika 2.** Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na MCF-7 stanice

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira djeluje inhibirajuće na rast MCF-7 te je inhibitorni učinak proporcionalan dodanim koncentracijama ekstrakta. Najveći inhibitorni učinak uočen je kod tretiranja stanica koncentracijom ekstrakta od 100 mg/mL i iznosi 61,21%.

#### **4.2. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene bojanjem kristal-ljubičastim**

Tijekom određivanja utjecaja dodatka subkritičnih vodenih ekstrakata đumbira na preživljavanje MCF-7 stanica, svjetlosnom mikroskopijom i bojanjem stanica otopinom kristal-ljubičasto praćene su i promjene unutar stanica, uz dodatak ekstrakata od 10 i 25 mg/mL.

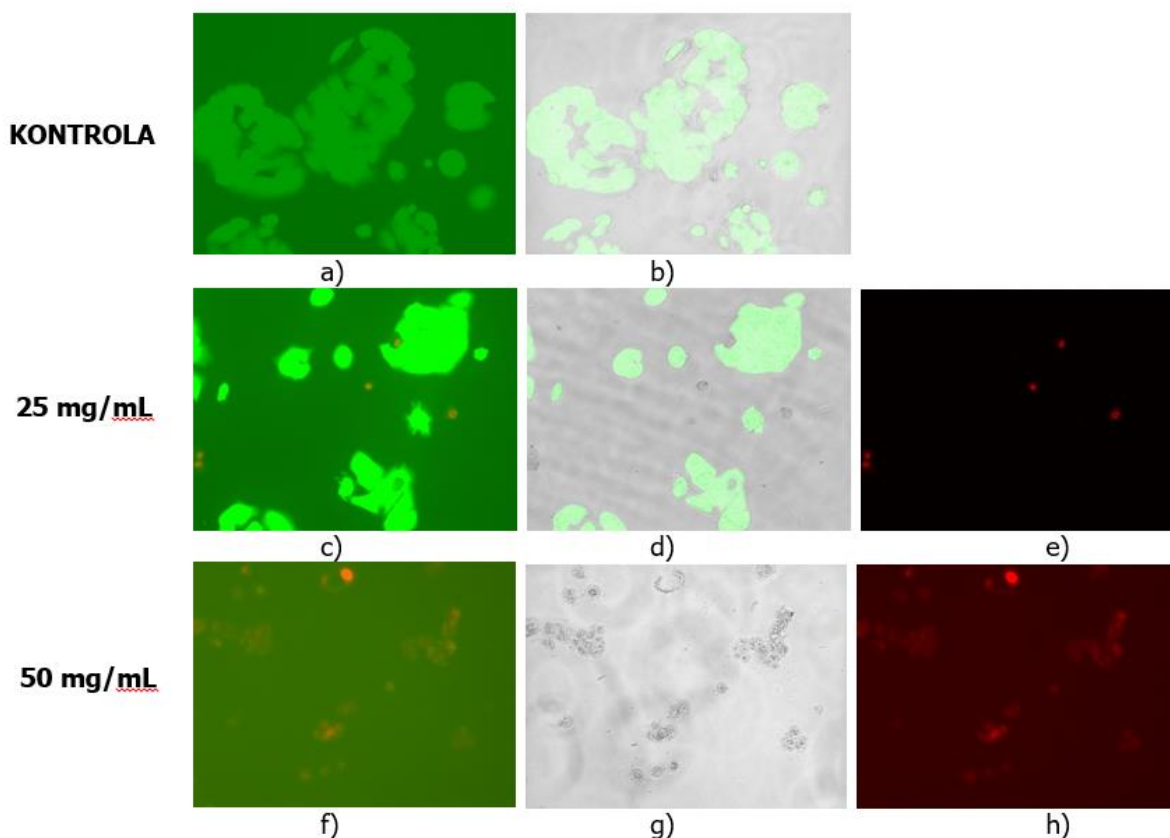


**Slika 3.** Morfološki izgled MCF-7 stanica obojanih otopinom kristal-ljubičasto. Kontrolne (netretirane) stanice prikazane su na slici a), stanice tretirane s 10 mg/mL ekstrakta đumbira na slici b), c) stanice tretirane s 25 mg/mL ekstrakta đumbira

Praćenjem morfologije MCF-7 stanica svjetlosnom mikroskopijom vidljivo je da su kontrolne stanice pravilne morfologije te formiranog monosloja. Stanice tretirane s 25 mg/mL ekstrakta pokazuju manju gustoću i slabije formiran monosloj stanica, što je u korelaciji s rezultatima dobivenih MTS metodom (slika 2).

#### **4.3. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na morfološke promjene u MCF-7 stanicama određene fluorescentnom mikroskopijom**

Nakon tretiranja MCF-7 stanica s odabranim koncentracijama ekstrakta (25 mg/mL i 50 mg/mL) te bojanja fluorescentnim bojama, stanice su snimljene pod fluorescentnim mikroskopom kako bi se utvrdile promjene u morfologiji stanica uslijed procesa apoptoze i nekroze.



**Slika 4.** Morfološki izgled MCF-7 stanica promatranih pod fluorescentnim mikroskopom. Kontrolne (netretirane) stanice prikazane su na slikama a) i b), na slikama c), d) i e) prikazane su stanice tretirane s 25 mg/mL ekstrakta đumbira, dok su stanice tretirane s 50 mg/mL đumbira prikazane na slikama f), g) i h)

Ovisno o dodanoj koncentraciji subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira, uočene su morfološke promjene stanica pod fluorescentnim mikroskopom. Žive stanice imaju sposobnost konverzije nefluorescentnog fluorescein diacetata u zeleni fluorescentni metabolit fluorescein, stoga se žive stanice boje zeleno. Nasuprot tome, propidijev jodid ne može proći kroz održivu staničnu membranu živih stanica, već se koristi kao pokazatelj prisutnosti apoptičnih i nekrotičnih stanica budući da zbog njihovih oštećenja ulazi u jezgru gdje interkalira s DNA pa se posljedično ovakve stanice boje crveno.

Kontrolne, netretirane MCF-7 stanice, kao što je vidljivo na slikama a) i b), formiraju monosloj, veće su gustoće i karakteristične morfologije te obojane zeleno što ukazuje na zdrave, žive stanice. Kod stanica tretiranih s 25 mg/mL ekstrakta koje su prikazane na slikama c), d) i e) uočen je slabije formiran i razrijeđen monosloj te morfološke promjene stanica zbog prelaska u apoptično/nekrotično stanje što se manifestira ugradnjom propidijevog jodida. Nadalje, kod



stanica prikazanih na slikama e), f) i h) koje su tretirane s 50 mg/mL ekstrakta jasno je vidljivo veće razrjeđenje monosloja nego u prethodnom slučaju, kao i smanjenje broja stanica te prisustvo nekrotičkih stanica obojanih crveno zbog ulaska propidijevog jodida u jezgru stanica. Rezultati dobiveni fluorescentnom mikroskopijom su u korelaciji s rezultatima određivanja preživljavanja MCF-7 stanica određenih kolorimetrijskom MTS metodom (slika 2).

## 5. RASPRAVA

Određivanje biološke aktivnosti različitih spojeva primjenom kultura stanica pokazao se kao dobar sustav za preliminarna istraživanja djelovanja spojeva izoliranih iz biljaka te njihovih ekstrakata i proizvoda. *In vitro* testovi toksičnosti omogućavaju predviđanje antitumorske aktivnosti pojedinog spoja te ispitivanje njegovog mogućeg djelovanja na zdravlje ljudi. Pri tome je nužno povezati rezultate biološke aktivnosti s kvalitativnim i kvantitativnim analizama biljnih ekstrakata i proizvoda budući da tek cjelovita istraživanja omogućuju povezivanje zapaženog učinka s količinom i sastavom biološki aktivnih spojeva u pojedinom uzorku (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

*In vitro* testovi toksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama pa se u takvim ispitivanjima često primjenjuju humane tumorske stanične linije. Osim toga, brži su i jeftiniji u odnosu na *in vivo* testove, stvaraju manje toksičnog otpada i omogućuju analizu velikog broja tvari u širokom rasponu koncentracija u kratkom vremenu. Primjena kultura stanica daje konzistentne i reproducibilne rezultate, omogućuje bolje razumijevanje staničnih procesa, kao i bolju mogućnost kontrole staničnih uvjeta koji podrazumijevaju kontrolu pH vrijednosti, temperature, koncentracije kisika i hranjivih tvari. MCF-7 stanična linija uspostavljena je 1970. godine na Institutu Michigan Cancer Foundation u Detroitu. Neinvazivna je i slabo agresivna, ali najčešće proučavana stanična linija ljudskog raka dojke u svijetu (Comsa i sur., 2015).

Đumbir (*Zingiber officinale*), je biljka koja potječe iz jugoistočne Azije gdje se koristila kao dodatak prehrani te za ublažavanje mučnina, kašlja, upala, probavnih smetnji i bolova. Ljekovita svojstva đumbira poznata su već tisućama godina, a značajan broj *in vitro*, *in vivo* i epidemioloških istraživanja daju dodatne dokaze da su đumbir i njegovi biološki aktivni spojevi djelotvorni protiv širokog spektra ljudskih bolesti, no još uvijek postoje nedovoljno istražena područja djelovanja. Dosad provedena znanstvena istraživanja upotrebe ekstrakata đumbira ukazuju na prisutnost različitih fenolnih spojeva i na njihovo antitumorsko (Kirana i sur., 2003), antioksidacijsko, antimikrobno i antibiotsko djelovanje (Ali i sur., 2008). Većina poznatih aktivnosti sastavnih komponenata đumbira temelji se samo na *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, osim u nekoliko kliničkih ispitivanja kod ljudi.

Cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje subkritičnih vodenih ekstrakata đumbira na morfologiju i preživljavanje MCF-7 tumorske stanične linije. Priprava subkritičnog vodenog ekstrakata đumbira korištenog u ovom radu provedena je na Tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Novom Sadu. MCF-7 stanice su naciepljene u ploče s 96 jažica i nakon 24 sata tretirane s pet različitih koncentracija subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira u rasponu od 5 do 100 mg/mL. Nakon

48 sati od tretmana vijabilnost stanica određena je MTS metodom, a dobiveni rezultati prikazani su kao graf ovisnosti postotka preživljenja stanica o koncentraciji korištenog ekstrakta đumbira (slika 2). Tretman subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira pokazao je inhibitorni učinak na rast MCF-7 stanica pri svim ispitanim koncentracijama. Inhibitorni učinak je proporcionalan dodanim koncentracijama ekstrakta, a najveći inhibitorni učinak uočen je kod tretiranja stanica koncentracijom ekstrakta od 100 mg/mL i iznosi 61,21%. Ishiguro i sur. (2007) su istraživanjem dokazali da ekstrakt đumbira posjeduje kemopreventivna svojstva. *In vitro* istraživanjima pokazali su da 6-gingerol inducira apoptozu stanica karcinoma želuca. Indukcija apoptoze pomoću 6-gingerola posredovana je supresijom citosolnog inhibitora apoptoze (cIAP)-1 i inhibicijom supresije transkripcijskog faktora NFκB. Također, istraživanja pokazuju da su biološki aktivni sastojci đumbira učinkoviti i protiv raka jetre. Uočeno je da 6-šogaol inducira apoptotsku staničnu smrt stanica štakora putem kaspazama ovisnog mehanizma posredovanim oksidativnim stresom. Pokazalo se da je iscrpljivanje glutaciona glavni čimbenik koji doprinosi apoptozi stanica štakora induciranoj 6-šogaolom (Chen i sur., 2007).

Kako bi se ispitao učinak ekstrakata đumbira na morfologiju MCF-7 stanica, stanice su tretirane koncentracijama ekstrakata od 10 i 25 mg/mL, a zatim obojane otopinom kristal-ljubičasto i slikane pod inverznim mikroskopom na povećanju od 100x. Kontrolne, netretirane stanice formiraju pravilni monosloj karakteristične epitelne morfologije, dok se nakon tretmana ekstraktima broj stanica smanjuje što se manifestira smanjenim monoslojem stanica. Kako bi se dodatno utvrdile promjene u morfologiji tretiranih i netretiranih MCF-7 stanica, primijenjena je i fluorescentna mikroskopija. Stanice su tretirane s 25 i 50 mg/mL ekstrakta đumbira i nakon tretmana stanice su obojane dvjema fluorescentnim bojama: fluorescein diacetatom i propidijevim jodidom, koje omogućuje razlikovanje žive od mrtvih stanica u kulturi. Žive stanice se boje zeleno jer imaju sposobnost konverzije nefluorescentnog fluorescein diacetata u zeleni fluorescentni metabolit fluorescein. Propidijev jodid ne može proći kroz održivu staničnu membranu živih stanica, već se koristi kao pokazatelj prisutnosti apoptičnih i nekrotičnih stanica s obzirom da zbog njihovih oštećenja ulazi u jezgru gdje interkalira s DNA pa mrtve stanice fluoresciraju crveno. Ovisno o dodanoj koncentraciji subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira, uočene su morfološke promjene stanica pod fluorescentnim mikroskopom. Kontrolne, netretirane MCF-7 stanice formiraju monosloj, veće su gustoće, karakteristične morfologije te fluoresciraju zeleno. Kod stanica tretiranih s 25 mg/mL ekstrakta uočen je slabije formiran i razrijeđen monosloj te morfološke promjene stanica koje zbog prelaska u apoptično/nekrotično stanje fluoresciraju crveno. Nadalje, kod stanica tretiranih s 50 mg/mL ekstrakta vidljivo je još veće razrjeđenje monosloja, smanjenje broja stanica te povećan udio stanica koje fluoresciraju

crveno jer se nalaze u kasnoj fazi apoptoze i nekroze. Rezultati dobiveni nakon praćenja morfoloških promjena stanica bojanjem otopinom kristal-ljubičato i fluorescentnim bojama su u korelaciji s rezultatima preživljavanja stanica određenih kolorimetrijskom MTS metodom.

Iz provedenog istraživanja može se zaključiti da dodatak subkritičnih vodenih ekstrakata đumbira u medij za uzgoj MCF-7 stanica djeluje inhibirajuće na rast tumorskih stanica. Biološki aktivne tvari iz rizoma đumbira pokazuju antitumorski potencijal, a budući da predstavljaju sigurnu i ekonomičnu alternativu u liječenju, potrebna su opsežna i pažljivo kontrolirana ljudska istraživanja kako bi se u potpunosti dokazala njihova učinkovitost kao antikancerogenih sredstava (Prasad i Tyagi K., 2015).

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenog eksperimenta i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira pokazuje inhibitorni učinak na rast i proliferaciju MCF-7 stanica u rasponu koncentracija 5-100 mg/mL, određen MTS metodom.
2. Najizraženiji inhibicijski učinak subkritičnog ekstrakta đumbira zabilježen je pri najvećoj ispitanoj koncentraciji ekstrakta od 100 mg/mL.
3. Svjetlosnom i fluorescentnom mikroskopijom potvrđeno je da dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira uzrokuje morfološke promjene u MCF-7 staničnoj liniji.

## 7. LITERATURA

Ali B. H., Blunden G., Tanira M. O., Nemmar A. (2008) Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 409-420.

Anonimus 1 (2010) Ginger plant is that? Herbs Blog. Information about herbal plants, herbal benefits, treatment of disease, health care, herbal medicines, <<http://myherbsweblog.blogspot.com/2010/11/ginger-plant-is-that.html>> Pristupljeno 25. kolovoza 2018.

Boyd M.R., Paull K.D. (1995) Some practical considerations and applications of the Nacional Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research* **34**: 91-109.

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. (2010) Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. *Altex* **27**: 53-62.

Bubalo Cvjetko M., Vidović S., Radojčić Redovniković I., Jokić S. (2015) Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **90**: 1631-1639.

Butler M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.

Chen C.Y., Liu T.Z., Liu Y.W. et al. (2007) 6-Shogaol (Alkanone from Ginger) induces apoptotic cell death of human hepatoma p53 mutant mahlavu subline via an oxidative stress-mediated caspase-dependent mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 948–954.

Dhanik J., Arya N., Nand V. (2017) A Review on *Zingiber officinale*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **6**: 174-184.

Encyclopedia Britannica (2018) Plant Cultures - Exploring Plants and People – Ginger, <<https://www.britannica.com/plant/ginger>> Pristupljeno 25. kolovoza 2018.

Freshney I.R. (2005) Culture of Animal Cells: A Manual Basic Technique, 5. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 115-128.

Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E. (2006) Sub-and supercriticalfluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry* **98**: 136–148.

Ishiguro K., Ando T., Maeda O. et al. (2007) Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**: 218–223.

Jo Y.T., Nazrul Islam M., Park J.H. (2013) Influence factor of remediation of PAHs-contaminated soil by using flowing subcritical water. *Environment* **18**: 1–7.

Kirana C., Record R. I., McIntosh H. G., Jones P. G. (2003) Screening for antitumor activity of 11 species of Indonesian Zingiberaceae using MCF-7 and HT-29 cancer cells. *Pharmaceutical Biology* **41**: 271–276.

Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Srček V., Kniewald Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **56**: 195-204.

Levenson, A. S., Jordan, V. C. (1997) MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research* **57**: 3071-3078.

Liang, X., Fan, Q. (2013) Application of sub-critical water extraction in pharmaceutical industry. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering* **1**: 1-6.

Plaza M., Turner, C. (2015) Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry* **71**: 39–54.

Prasad S., Amit K. T. (2015) Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology Research and Practice* **2015**: 1-11.

Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 169-175.

Ramos L., Kristenson M.E., Brinkman T.A.U. (2002) Current Use of Pressurised Liquid Extraction and Sub-critical Water Extraction in Environmental Analysis. *Journal of Chromatography A* **975**: 3-29.

Rovio S., Hartonen K., Holm Y., Hiltunen R., Riekkola L.M. (1999) Extraction of Clove Using Pressurized Hot Water. *Flavour and Fragrance Journal* **14**: 399-404.

Serban Comşa, Anca Maria Cîmpean and Marius Raica (2015) The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* **35**: 3147-3154.

Slivac I., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Željka Stanečić

Ime i prezime studenta