

# Protektivno djelovanje ekstrakta maslačka (*Taraxacum officinale*) na genetički materijal humanih stanica u kulturi

---

Krizmanić, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:428575>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI RAD**

**PROTEKTIVNO DJELOVANJE  
EKSTRAKTA MASLAČKA  
(*Taraxacum officinale*) NA  
GENETIČKI MATERIJAL  
HUMANE STANIČNE LINIJE  
SKVAMOZNOG EPITELA  
KARCINOMA JEZIKA CAL27**

Rad je izrađen u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod voditeljstvom dr.sc. Mirte Milić, v. zn. sur. i pod mentorstvom dr.sc. Ksenije Durgo, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici dr.sc. Kseniji Durgo na pomoći prilikom izrade ovog rada. Posebno bih se zahvalila dr.sc. Mirti Milić na velikoj pomoći i strpljenju tijekom cijelog razdoblja pripreme i izrade rada. Također, zahvala ide i dr.sc. Dubravki Rašić sa Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada koja je prepoznala moju zainteresiranost ka prirodnim znanostima još u osnovnoj školi.*

*Najveće hvala ide mojim roditeljima, Dubravki i Zdravku, bratu Nikši, bakama Ljubici i Tereziji i dedi Anti koji su uvijek bili tu za mene, tijekom svih godina školovanja.*

*Hvala i mojim prijateljima, koji su ovo razdoblje učinili još boljim i zabavnijim. Grazie anche a voi, Luigi e Luana, per migliori 3 mesi a Napoli.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### PROTEKTIVNO DJELOVANJE EKSTRAKTA MASLAČKA (*Taraxacum officinale*) NA GENETIČKI MATERIJAL HUMANIH STANICA U KULTURI

*Tena Krizmanić, 922/PI*

**Sažetak:** Danas je sve veća primjena biljnih proizvoda te dijelova biljaka u terapijske i medicinske svrhe s obzirom da je uvriježeno mišljenje da tvari iz prirode ne izazivaju štetne učinke na organizam. Obzirom na svoja antibiotska, antitumorska i antioksidativna svojstva sve je veći broj istraživanja na maslačku. Cilj ovog istraživanja bio je testirati utjecaj različitih koncentracija ekstrakta listova maslačka (0,05x, 0,1x, 0,2x, 0,5x, 1x, 2,5x i 5x) na vijabilnost (MTT test), primarna (1h izlaganja-metodom alkalnog komet testa), trajna (4h izlaganja-metodom mikronukleus (MN) *cytome* testa) genomski oštećenja i postojanje zaštitnog učinka od oksidativnog stresa nakon 5-minutnog izlaganja 0,25 i 0,50  $\mu\text{M}$  vodikovom peroksidu (alkalni komet test) u humanoj staničnoj kulturi skvamoznog epitela karcinoma jezika CAL27. Maslačak nije utjecao na vijabilnost stanica osim kod 5x (smanjenje 12%), ubrzao je proliferaciju stanica te je pokazao genotoksični učinak u svim koncentracijama povećavajući MN frekvenciju (tj. lomove kromosoma/kromatida ili gubitka cijelog kromosoma) do koncentracije 0,2x, nakon koje je uslijedio apoptotični učinak). Niže koncentracije ekstrakta maslačka (0,05x i 1x) pokazale su protektivni učinak na djelovanje 0,25  $\mu\text{M}$  vodikovog peroksida. Zaštitni učinak nije uočen prilikom izlaganja stanica višoj koncentraciji vodikovog peroksida.

**Ključne riječi:** maslačak, alkalni komet test, mikronukleus test, oksidativni stres, CAL27 stanična linija

**Rad sadrži:** 47 stranica, 15 slika, 4 tablice, 91 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *prof.dr.sc. Ksenija Durgo*

**Pomoć pri izradi:** *dr.sc. Mirta Milić, v. znan. sur.*

*Ana Huđek, mag.ing.*

*Arijana Martinić, mag.ing.*

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Draženka Komes*
2. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo*
3. Dr.sc. *Mirta Milić*, viši znanstveni suradnik, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb
4. Prof.dr.sc. *Višnja Bačun-Družina* (zamjena)

**Datum obrane:** 1.ožujak 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of biochemical engineering  
Laboratory for biology and genetics of microorganisms

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food technology

### PROTECTIVE EFFECT OF DANDELION EXTRACT (*Taraxacum officinale*) ON GENETIC MATERIAL OF HUMAN CELLS IN CULTURE

*Tena Krizmanić, 922/PI*

**Abstract:** Today, there is an increasing trend of plant parts and products use for therapeutic and medical purposes. It is commonly believed that natural substances do not cause harmful effects on the organism. Dandelion is intensively investigated due to its antibiotic, anticancer and antioxidant activity. The purpose of this study was to test the influence of different concentrations of dandelion leaves extract (0.05x, 0.1x, 0.2x, 0.5x, 1x, 2.5x, 5x) on the viability (MTT assay), primary (1h exposure-alkaline comet assay) and permanent (4h exposure- micronucleus (MN) cytome assay) genomic damage, and the existence of protective effect to oxidative stress after 5-minute exposure to 0.25 and 0.50  $\mu\text{M}$  peroxide (alkaline comet assay) in the human tongue squamous cell carcinoma cell line CAL27. The dandelion didn't affect cell viability except at 5x (12% reduction), has accelerated cell proliferation and caused genotoxic effect at all concentrations while increasing the MN frequency (chromosome/chromatid fractures or the loss of the entire chromosome) up to a concentration of 0.2x, followed by apoptotic effect at higher concentrations). Lower concentrations of dandelion extract (0.05x and 1x) showed protective effect against low concentrations of 0.25  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide. Protective effect was not detected when cell damage was induced by higher concentration of hydrogen peroxide.

**Keywords:** dandelion, alkaline comet assay, micronucleus assay, oxidative stress, CAL27 cell line

**Thesis contains:** 47 pages, 15 figures, 4 tables, 91 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:** *Ksenija Durgo, PhD, Full professor*

**Technical support and assistance:** *Mirta Milić, PhD, Sen. Sci. Assoc.*

*MSc Ana Huđek, Assistant*

*MSc Arijana Martinić, Assistant*

#### Reviewers:

1. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Mirta Milić*, Senior Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb
4. PhD. *Višnja Bačun-Družina*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 1 March 2019

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. MASLAČAK ( <i>Taraxacum officinale</i> L.) .....	3
2.1.1. Opće karakteristike maslačka.....	3
2.1.2. Biološki aktivne komponente maslačka.....	3
2.2. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI I MUTAGENOSTI .....	7
2.2.1. Alkalni komet test – primarna oštećenja DNK .....	9
2.2.2. Mikronukleus <i>cytome</i> test – trajna oštećenja DNK.....	10
2.2.3. MTT test vijabilnosti.....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
3.1. PRIPREMA HUMANIH STANICA, EKSTRAKTA I RADNIH KONCENTRACIJA LISTA MASLAČKA .....	14
3.1.1. Biološki test sustav – stanična linija CAL27 .....	14
3.1.2. Priprema ekstrakta .....	15
3.1.3. Priprema radnih koncentracija ekstrakta lišća maslačka (M) .....	16
3.2. MATERIJALI.....	16
3.2.1. Priprema otopine NMP agaroze.....	16
3.2.2. Priprema otopine LMP agaroze .....	16
3.2.3. Priprema pufera za liziranje .....	16
3.2.4. Priprema pufera za denaturaciju .....	16
3.2.5. Priprema pufera za neutralizaciju .....	16
3.2.6. Priprema vodikovog peroksida .....	17
3.2.7. Kemikalije.....	17
3.2.8. Aparatura.....	18
3.2.9. Posuđe i pribor .....	18
3.3. METODE.....	19
3.3.1. pH metriranje .....	19
3.3.2. MTT test.....	19
3.3.3. Tretman za komet test .....	20
3.3.4. Komet test .....	20



3.3.5. Tretman sa 0,50 $\mu$ M i 0,25 $\mu$ M vodikovim peroksidom.....	21
3.3.6. Tretman za mikronukleus.....	21
3.3.7. Mikronukleus test.....	22
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
4.1. pH VRIJEDNOSTI I MTT TEST .....	24
4.2. UTJECAJ NA PROLIFERACIJU I MITOTIČKI INDEKS .....	28
4.3. PRIMARNA I TRAJNA OŠTEĆENJA MJERENA ALKALNIM KOMET TESTOM I MIKRONUKLEUS <i>CYTOME</i> TESTOM .....	30
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>

## 1. UVOD

Korištenje biljnih proizvoda i dijelova biljaka u terapijske i preventivne svrhe je u stalnom porastu zbog uvriježenog mišljenja da je terapija tvarima iz prirode sigurna i prirodna (bez sintetičkih lijekova-tvari) i da ne izaziva toliko štetnih učinaka kao sama tradicionalna terapija, te da korištenje biljnih proizvoda može ili prevenirati buduću štetu u organizmu ili uz/bez korištenja tradicionalne terapije prevenirati štetne nuspojave ili smanjiti njihov učinak (Cuzzolin i sur., 2006). Biljke su poslužile kao vitalni izvori za razvoj raznih terapija protiv različitih vrsta karcinoma, a poznato je da fitokemikalije i herbalne mješavine mogu djelovati multispecifično-tj. utjecati na više razina ili mjesta u organizmu u isto vrijeme (Efferth i sur., 2017).

Jedna od takvih biljaka je i maslačak koji se koristi već stoljećima (od desetog stoljeća) kao mogući alternativni izvor prirodne gume te u tradicionalnoj medicini za opuštanje i tretman različitih bolesti (Martinez i sur., 2015). U tradicionalnoj medicini, korijen maslačka se prvenstveno koristio za liječenje gastrointestinalnih bolesti, a list kao diuretik i probavni stimulans. Maslačak se koristi u liječenju kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, kao probavni stimulans, stimulans inzulina (Amin Mir i sur., 2013), za liječenje bolesti jetre (Choi i sur., 2010), a pretklinička istraživanja otkrila su njegova brojna svojstva kao što su antiinflamatorna, antireumatska, diuretička, a dokazana su i njegova antikancerogena i antimikrobna svojstva (Jedrejek i sur., 2017; Lis i sur., 2018).

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je trajna zeljasta biljka iz porodice glavočika (*Asteraceae*) koja nastanjuje toplije temperaturne zone sjeverne Zemljine polutke. U svom sastavu ima veliki udio bioaktivnih spojeva, u svim dijelovima biljke, te se primjenjuje kao samostalno jelo (salata-lišće radič), dodatak jelima te kao čajni pripravak napravljen od cvijeta, lišća, korijena ili njihovih kombinacija. Biokemijska karakterizacija spojeva iz maslačka je napravljena i danas se zna koji su razlozi maslačkove učinkovitosti, te moguće primjene pojedinih spojeva u terapijske svrhe.

U Hrvatskoj se najčešće koriste pripravci od lišća maslačka (Martinez i sur., 2015) i postoje uvriježene koncentracije koje bi se trebale koristiti kod pripravka lišća maslačka. Priprema vodenih ekstrakata je slična u cijelom svijetu gdje se maslačak koristi, dok etnički elementi ne

utječu na način pripreme i koncentraciju čaja (Martinez i sur., 2015). No dio koji je nedovoljno istražen jest da li primjenjene koncentracije čaja imaju zaštitni učinak, ili taj učinak više zavisi o dugotrajnoj primjeni.

U ovom radu cilj je ispitati kako koncentracije koje se uobičajeno koriste u pripremi čaja utječu na početni dio gastro-intestinalnog trakta te mogu li korištene koncentracije zaštititi stanice od oksidacijskog stresa - dakle djelovati i zaštitno i protuupalno. U tu svrhu analizirat će se utjecaj liofiliziranog ekstrakta maslačka na primarna i trajna oštećenja stanica humane stanične linije skvamoznog epitelnog karcinoma jezika CAL27 i to metodama alkalnog komet testa (za procjenu primarnih, popravljivih oštećenja) te mikronukleus *cytome* testa (za procjenu trajnih stabilnih genomskih oštećenja stanica). Također, ispitati će se i zaštitni učinak čajnog pripravka lišća maslačka na staničnoj liniji CAL27 nakon 5-minutnog izlaganja stanica različitim koncentracijama vodikovog peroksida (0,25  $\mu\text{M}$  i 0,50  $\mu\text{M}$ ), također metodom alkalnog komet testa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLAČAK (*Taraxacum officinale* L.)

#### 2.1.1. Opće karakteristike maslačka

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) (Slika 1.) je višegodišnja biljka iz porodice *Asteraceae*, rasprostranjena u toplijim temperaturnim zonama sjeverne Zemljine polutke (González-Castejón i sur., 2012). Nalazimo ga na livadama, u parkovima, vrtovima te u ruderalnim područjima. Mlado lišće kultiviranih oblika moguće je svježe konzumirati kao salatu, dok se korijeni mogu pržiti te koristiti kao zamjena za kavu. Također, ekstrakt maslačka može se koristiti kao komponenta okusa u raznim prehrambenim proizvodima, uključujući i alkoholna i bezalkoholna pića, smrznute mliječne slastice, bombone, pudinge i dr. Osim što se konzumira kao hrana, korijen i biljka maslačka koriste se u farmaceutskim pripravcima kao što su čajevi, tinkture, kapsule, tablete i dr. Imaju protuupalno, diuretsko, antireumatsko i laksativno djelovanje te apetit-stimulirajuća svojstva za liječenje poremećaja jetre i žučnog mjehura, probavnih smetnji, artritisa i reumatskih bolesti (Schutz i sur., 2005).



Slika 1. Maslačak *Taraxacum officinale* L. (Anonymus., 1)

#### 2.1.2. Biološki aktivne komponente maslačka

Znanost je danas usredotočena na uporabu maslačka kao komponente funkcionalne hrane ili ljekovitog bilja. Zabilježeno je da ekstrakti maslačaka posjeduju antibiotsku aktivnost,

antioksidativna te antitumorska svojstva. Najviše biološki aktivnih tvari nalazi se u listovima, dok je u cvjetnim i korovnim dijelovima ona nešto manja (Jedrejek i sur., 2017). Zagrijavanje ekstrakta lista maslačka ne utječe na biološku aktivnost, što upućuje na toplinsku stabilnost bioloških spojeva koji su odgovorni za antioksidativne i proliferativne stanične aktivnosti te za inhibiciju rasta tumorskih stanica (Lee i sur., 2005).

U fitokemijskom sastavu maslačka prisutni su seskviterpeni ponajviše u korijenu, triterpenoidi, fitosteroli, flavonoidi koji su najviše zastupljeni u zračnim dijelovima biljke te fenolne kiseline, kumarini i ostali spojevi poput organskih kiselina (oksalna, kvininska, jabučna, citratna, fumarna kiselina), inulina (skladištenje ugljikohidrata u korijenu), vitamina A, B, C i D koji se u visokom udjelu nalaze u u korijenu i listovima, te kalija u korijenu i listovima (Chun, 2018). U Tablici 1. naveden je fitokemijski sastav maslačka.

U sastavu maslačka glavni dio terpenoidnih i sterolnih spojeva čine taraksan i taraksacerin, koji su ravnomjerno raspodijeljeni u korijenu, lišću i cvjetovima. Ostali prisutni terpeni/sterolni spojevi su beta-amirin, taraksaterol, tarakserol, sitosterin, stigmaterin i fitosterin (Lee i sur., 2005).

Cikorična kiselina (dikafeiltartarična kiselina) jedan je od glavnih sastojaka *T. officinale*. Pripada fenilpropanoidima te se nalazi u velikom broju ljekovitih biljaka koje su prepoznate u narodnoj medicini. Ima antiupalna, antibakterijska, antinociceptivna (antidepresivna) i antiangiogena svojstva te inhibira HIV integraciju (Wigg i sur., 2014).

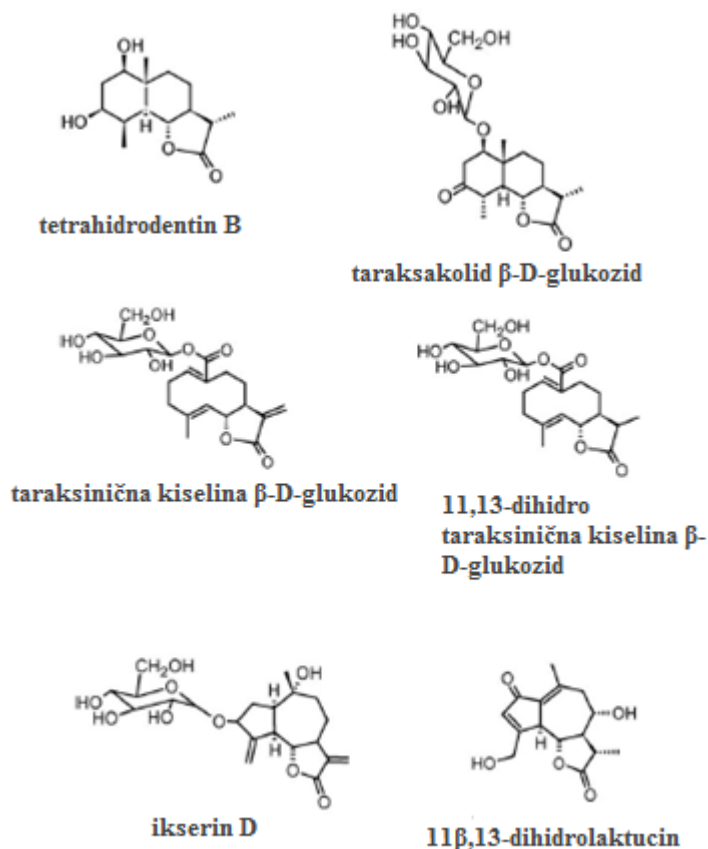
Terapeutska svojstva pripisuju se taraksacinu (spoj odgovoran za gorčinu), terpenoidima te nekristaliziranoj fruktozi kao zamjeni za škrob (Blanchet 1995). Sastojci odgovorni za gorčinu značajni su radi stimulacije probavnog sustava, no i ostala terapeutska djelovanja *Taraxacum* sp. vrsta djelomično se povezuju sa spojevima odgovornima za gorčinu, točnije sa seskviterpenima (Slika 2.) - taraksinična kiselina  $\beta$ -D-glukopiranozidom i 11,13-dihidrotarakisnična kisleina  $\beta$ -D-glukopiranozidom. Ostali sastojci izolirani iz korijena maslačka uključuju triterpene i fitosterole kao što su taraksasterol, te njihovi acetati i 16-hidroksi derivati amidol i faradiol,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glukopiranozid i stigmaterol (Tablica 1.). U odnosu na korijen, u listovima maslačka nalazi se visoki udio polifenola. Najbrojniji fenolni spojevi su derivati hidroksicinaminske kiseline (Schutz i sur., 2006).

Hranjivi sastojci prisutni u maslačku su minerali, proteini, vlakna, vitamini i uravnotežena kombinacija elemenata u tragovima što maslačak čini izvorom mikronutrijenata (González-Castejón i sur., 2012). Listovi su bogati izvor vitamina i minerala, a ponajviše vitamina A kojeg ima u kategoriji svih zelenih biljaka baš u maslačku (14,000 IU / 100 g sirovog lišća). Značajne su količine i vitamina D, kompleksa B vitamina te vitamina C. Bogat je i količinom minerala (željezo, silicij, magnezij, natrij, kalij, cink, mangan, bakar i fosfor) (Blanchet, 1995). Korijen je bogat izvor inulina kojega u korijenu tijekom proljeća ima oko 2%, a tijekom jeseni 40% (Schutz i sur., 2006). Dokazano je da svježi listovi maslačka tijekom trudnoće preveniraju preeklampsiju, te na taj način utječu na smanjenje povišenog krvnog tlaka (hipertenzija) i prisutstvo proteina u urinu. Također, pomažu u prevenciji anemije budući da su bogati željezom (Lans i sur., 2007; Wigg i sur., 2014).

**Tablica 1. Fitokemijski sastav maslačka (prilagođeno iz González-Castejón i sur., 2012)**

<b>KORIJE</b>						
<b>Seskviterpen laktoni</b>		<b>Triterpeni/fitosteroli</b>		<b>Fenolne kiseline</b>		<b>Kumarini</b>
<b>Tetrahidroridentin B</b>		Taraksasterol		Cikorična kiselina		Umbeliferon
<b>Taraksakolid-O-β-glukopiranozid</b>		Faradiol		Kafeinska kiselina		Eskuletin
<b>11,13-dihidrolaktucin</b>		β-sitosterol		Klorogenična kiselina		Skopoletin
<b>Taraksinicna kiselina –glukopiranozid</b>		Ψ-taraksasterol		Ferulična kiselina		
<b>Taraksakozid</b>		α-amirin		ρ-hidroksibenzojeva kiselina		
<b>Acilirani γ-butirolakton glikozid</b>		β-sitosterol- β-D-glukopiranozid		Monokafeoiltartarična kiselina		
<b>11,13-dihidro-taraksinična kiselina β-glukopiranozid</b>		Arnidiol		ρ-hidroksifenilacetična kiselina		
<b>Ikserin D</b>		β-amirin		ρ-kumarična kiselina		
		Stigmasterol		vanilinska kiselina		
<b>LISTOVI I STABLJICA</b>						
<b>Seskviterpen laktoni</b>		<b>Triterpeni/fitosteroli</b>		<b>Fenolne kiseline</b>		<b>Kumarini</b>
Taraksinična kiselina β-D-glukopiranozid		β-sitosterol		Cikorična kiselina		Cikorin
11,13-dihidrotaraksinična kiselina β-glukopiranozid		β-amirin		Monokafeoiltartarična kiselina		Eskulin
		Arnidiol		Kafeinska kiselina		
				Klorogenična kiselina		
				P-hidroksifenilacetična kiselina		
						Izorhamnetin 3-O-glukozid
						Kvercetin 7-O-glukozid
						Apigenin 7-O-glukozid
<b>CVIJET</b>						
<b>Fenolne kiseline</b>			<b>Flavonoidi</b>			
Monokafeoiltartarična kiselina	Klorogenična kiselina	Kafeinska kiselina	Slobodni krizoeriol	Slobodni luteolin	Luteolin 7-O-diglukozid	Luteolin 7-O-glukozid

Seskviterpen laktoni-antiupalna i antimikrobna svojstva; Triterpeni/fitosteroli- pokreću apsorpciju reduciranog kolesterola; Fenolne kiseline-imunostimulativna svojstva; Kumarini-djeluju na kardiovaskularni sustav; Inulin-prebiotička aktivnost



Slika 2. Kemijske strukture karakterističnih *Taraxacum* sp. seskviterpen laktona (Schutz i sur., 2006)

## 2.2. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI I MUTAGENOSTI

Genotoksičnost podrazumijeva svojstvo nekog agensa (kemijskog ili fizikalnog) da uzrokuje promjene na genetičkom materijalu stanice čime se mijenja stabilnost samog genoma i njegova funkcionalnost bilo indirektnim ili direktnim putem (utjecaj na deoksiribonukleinsku kiselinu-DNK, ribonukleinsku kiselinu-RNK, diobeno vreteno, topoizomeraze, sustav DNK popravka i DNK polimeraza) (OECD, 2017). Ta oštećenja mogu biti popravljiva i nenasljedna, ali također mogu uzrokovati da nakupljena nepopravljena oštećenja ili promjene uzrokuju nestabilnost genoma same stanice, ali i novih stanica koje mogu nastati iz takve nestabilne stanice prilikom novih dioba stanica (OECD 2017).

Mutageni su također genotoksični agensi koji mogu, za razliku od genotoksina, uzrokovati nasljedne promjene koje rezultiraju izmijenjenom funkcijom genoma bilo na nivou genskih mutacija (supstitucija parova baza i pomak u okviru čitanja), numeričkih kromosomskih aberacija izazivanja aneuploidije ili poliploidije) ili kromosomskih strukturnih promjena (lomovi, delecije, rearanžmani) (OECD 2017).



Genotoksičnost se često zamijenjuje sa mutagenošću. Svi mutageni su genotoksični, no sve genotoksične tvari nisu ujedno i mutagene (OECD 2017). Ovo je razlog zbog kojeg se u otkrivanju novih mutagena kreće uvijek od genotoksičnih testova (OECD 2017). Oštećenje genetičkog materijala može nastati u somatskim stanicama, ali i u nasljednim spolnim stanicama. Mutacije u somatskim stanicama mogu dovesti do malignih tvorevina u eukariotskom organizmu te do kardiovaskularnih bolesti, dok oštećenja zametnih stanica (gameta) dovode do nasljednih mutacija koje uzrokuju genetičke bolesti (hemofilija, cistična fibroza, srpasta anemija), te do bolesti kao što su dijabetes, psihoze te kardiovaskularne bolesti (OECD, 2017).

Tvari koje uzrokuju izravno ili neizravno oštećenje genetičkog materijala su:

- elektrofilne vrste koje tvore kovalentne veze sa DNK
- reaktivni kisikovi spojevi
- UV/ionizirajuće zračenje
- Analози nukleozida
- Inhibitori topoizomerase
- Inhibitori sinteze proteina
- Biljna vrsta kao što je jedić (*Aconitum napellus* L.)-sadrži alkaloidе odgovorne za oštećenje genetičkog materijala na način da cijepaju ili se vežu za DNK (Phillips i Arlt, 2009; Liu i sur., 2017).

Testovi genotoksičnosti mogu se provoditi u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Turkez i sur., 2017; OECD, 2017). Moguće je identificirati tvari i spojeve koji izazivaju oštećenje genetičkog materijala izravno ili neizravno pomoću različitih mehanizama.

Regulatorna tijela diljem svijeta zahtijevaju informacije o potencijalnoj genotoksičnosti tvari u ljudskoj uporabi, no prilikom procjene sigurnosti potrebno je u obzir uzeti i druge toksikološke učinke (Philomena, 2011).

Testovi genotoksičnosti dijele se na *in vitro* i *in vivo* metode. Od genotoksičnih testova često se koriste: komet test, mikronukleus test, test kromosomskih aberacija te test izmjena sestrinskih kromatida (Saks i sur., 2017; Turkez i sur., 2017).

### 2.2.1. Alkalni komet test – primarna oštećenja DNK

Komet test ili gel elektroforeza pojedinačnih stanica (SCGE, *engl. single-cell gel electrophoresis*) je jednostavna, osjetljiva i brza metoda koja detektira genotoksični učinak (oštećenje DNK na nivou pojedinačne stanice) u gotovo svim vrstama stanica (Saks 2017, OECD 2017; Møller, 2018). Moguća je detekcija jednostrukih DNK lomova, alkalnih labilnih mjesta, DNK-DNK/DNK-protein *crosslink-ova*. (Møller, 2006), ali i dvolančanih DNK lomova. Kao jedan od najčešće korištenih *in vivo*, ali i *in vitro* testova koristi se za procjenu opasnosti spojeva koji imaju potencijalnu genotoksičnost ili mutagenost (industrijske kemikalije, biocidi, agrokemikalije, ili farmaceutici čiji mehanizmi ometaju enzimske sustave ciljnog organizma te djeluju na sustav reprodukcije) (Smith i sur., 2003). Ovim testom otkrivaju se spojevi koji izazivaju oštećenja DNK i nastanak primarnih DNK lezija koje se ne mogu identificirati drugim testovima. Komet test je prikladan za velik broj tkiva i stanica (široka primjena), a kao metoda je jednostavna, relativno jeftina za korištenje, visoko osjetljiva, te zahtjeva malu koncentraciju stanica po uzorku (Azqueta i sur., 2014; Neri i sur., 2015; Saks i sur., 2017; Møller, 2018).

Princip djelovanja komet testa je migracija DNK u agaroznom matriksu u elektroforetskim uvjetima. Gledajući ispod mikroskopa, oštećene stanice izgledaju poput kometa. Sastoje se od glave u kojoj se nalazi jezgra stanice i repa koji sadrži fragmente DNK koji su se tijekom elektroforeze udaljili od jezgre koja se zbog veličine pora gela nije mogla kretati u gelu. Detekcija DNK ovisi o različitim parametrima kao što su koncentracija agaroze u gelu, pH, temperatura, napon i trajanje elektroforeze. Postoje različiti tipovi komet testa, no alkalni (pH>13) omogućuje otkrivanje najšireg spektra oštećenja DNK (Smith i sur., 2003).

Nakon pripreme suspenzije stanica, komet test provodi se u nekoliko koraka: 1) priprema mikroskopskih stakalaca sa stanicama u agarozu, 2) liza stanica (stanične membrane i ostalih membrana u stanici) kojom se oslobađa DNK, 3) izlaganje alkalnim uvjetima (pH>13) u svrhu dobivanja relaksirane DNK bez topoizomeraza i histona, a time i oslobođenih fragmenata oštećene DNK, 4) elektroforeza u alkalnim uvjetima u kojoj dolazi do odvajanja fragmenata oštećenja od jezgre stanice, 5) neutralizacija lužnatog područja radi zaustavljanja daljnje alkalne reakcije, 6) bojanje DNK, 7) vizualizacija kometa i određivanje oštećenja DNK bilo softverskim programom ili vizualno u kategorijama (Tice i sur., 2000). Postoji više parametara koji se mogu mjeriti komet testom ukoliko se koriste softverski programi, a najčešće korišteni parametri su dužina repa kometa (izražena u mikrometrima), te intenzitet ili postotak DNK u repu kometa (izražen u postocima) (Slika 3.). Ako se koristi vizualna kategorizacija, koristi se najčešće podjela u 5 kategorija; prva-stanice bez oštećenja, a u ostale

4 su stanice raspoređene prema stupnju oštećenja. Potrebno je naglasiti da oštećenja mjerena komet testom su primarna oštećenja, tj prva koja nastaju u DNK, te su ta oštećenja podložna i popravku DNK mehanizmima DNK popravka. U OECD pravilima, detalji o izvođenju ovog testa se mogu naći pod brojem OECD 489.



Slika 3. Oštećena DNK u komet testu (Anonymus., 3)

#### 2.2.2. Mikronukleus *cytome* test – trajna oštećenja DNK

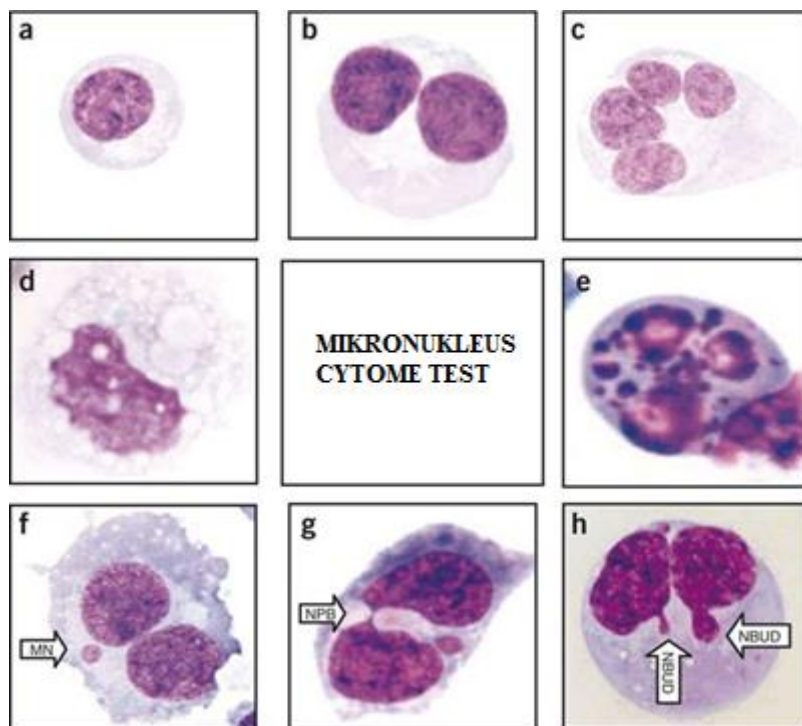
Mikronukleus test je vrsta *in vitro* (OECD 487, 2016) i *in vivo* (OECD 474, 2016) testa genotoksičnosti u kojem se oštećenja DNK mogu detektirati u obliku malih jezgri-mikronukleusa zaostalih u citoplazmi stanica u interfazi, a ne unutar jezgara stanica kćeri. Ova metoda omogućava ispitivanje štetnog potencijala na kromosome budući da je moguće detektirati strukturne promjene kromosomskog materijala i promjene u broju kromosoma u stanicama podvrgnutih diobi tijekom ili nakon izlaganja kemikalijama (OECD 487, 2016).

Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od jezgre. Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri. Promjer mikronukleusa u pravilu je 1/16 ili 1/3 promjera glavnih jezgara. Prisutnost mikronukleusa smatra se kvantitativnim pokazateljem postojanja strukturnih i/ili numeričkih aberacija kromosoma koje su u ciljnim stanicama nastale pod utjecajem različitih genotoksičnih agenasa u uvjetima *in vitro* i/ili *in vivo* (Jedinica za mutagenezu – Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, pristupljeno 23. rujana 2018.).

Mikronukleus *cytome* test je sveobuhvatna metoda koja mjeri oštećenja kromosoma, DNK pogreške, nekrozu, apoptozu te strukturne i numeričke aberacije kromosoma. U njoj se ne mjeri samo frekvencija mikronukleusa već se mjeri i frekvencija nukleoplazmatskih mostova (biomarkera acentričnih kromosoma koji su rezultat telomernih fuzija ili DNK pogrešaka), te nuklearnih pupova (biomarkera genske amplifikacije) (Fenech, 2007).

Pojam *cytome* podrazumijeva da je svaka stanica u ispitivanom sustavu procijenjena citološki vezano uz status vijabilnosti (nekroza, apoptoza), mitotički status (mononuklearna, binuklearna, multinuklearna-tri ili tetra), kromosomsko oštećenje ili status nestabilnosti (prisutnost mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova, nukleoplazmatskih pupova) (Slika 4.) (Fenech, 2007).

Različitim načinima bojanja, stanice se mogu gledati pod svjetlosnim ili fluorescencijskim mikroskopom, a sa pancentromernim ili telomernim probama može se ustanoviti nalazi li se u mikronukleusu samo dio kromosoma ili cijeli kromosom. Iako se test može raditi i bez zaustavljanja citokineze, najčešći oblik mikronukleus testa je s korištenjem kemikalije citohalazin-B koja se dodaje u staničnu kulturu prije početka prve diobe. Tada se kromosomska oštećenja mjere u binuklearnim stanicama sa zajedničkom citoplazmom. Takva binuklearna struktura je znak da su se stanice podijelile samo jednom nakon izlaganja, acilj ove metode je praćenje neoporavljenih-trajnih oštećenja koja ostaju nakon prve diobe u kojoj (diobi) su aktivni mehanizmi popravka trebali popraviti popravljiva oštećenja. Da bi bili sigurni da su se stanice zaustavile u prvoj diobi nakon izlaganja određenom agensu, potrebno je ustanoviti koliko je vremena potrebno da stanica završi jedan stanični ciklus, te se citohalazin B dodaje najčešće 4 sata prije završetka tog staničnog ciklusa (OECD 487, 2016).



Slika 4. Fotografije stanica u mikronukleus *cytome* testu (CBMN)

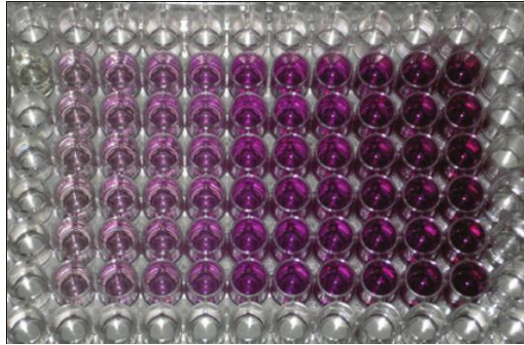
a) mononuklearna stanica, b) binuklearna stanica, c) multinuklearna stanica, d) rana nekroza, e) apoptoza, f) mikronukleus (MN), g) nukleoplazmatski most (NPB), h) nuklearni pupovi (NBUD) (Thomas i Fenech, 2011)

### 2.2.3. MTT test vijabilnosti

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolij bromid) test je kolorimetrijska metoda koja se temelji na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. Budući da se radi o kolorimetrijskoj metodi, uzorcima se mjeri apsorbancija koja je proporcionalna broju živih stanica u uzorku. Omjer apsorbancije tretiranih i kontrolnih stanica daje stopu preživljenja (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Osnovna svrha MTT testa je brojanje živih stanica na ploči od 96 jažica (Slika 5.). Najčešća primjena testa je prilikom određivanja citotoksičnosti nekog spoja pri različitim koncentracijama. Kod MTT analize za većinu održivih stanica mitohondrijska aktivnost je konstantna, a time je i povećanje ili smanjenje broja živih stanica linearno povezano sa mitohondrijskom aktivnošću. Svako povećanje ili smanjenje broja živih stanica može se detektirati mjereći koncentraciju formazana promatranu kao optičku gustoću koristeći čitač ploča pri 540 i 720 nm.

Kod stanica koje se mogu dijeliti (obično kod staničnih linija) tj *in vitro* uvjetima, smanjenje broja stanica odražava inhibiciju rasta stanica. Osjetljivost na istraživani spoj obično je navedena kao koncentracija spoja potrebna da bi se postigla 50%-tna inhibicija rasta u usporedbi sa rastom netretiranih stanica u kontroli. Kada se govori o *in vivo* uvjetima, toksičnost spoja se određuje kao 50%-tna letalna koncentracija ( $LC_{50}$ ) odnosno koncentracija kemikalija koja ubija 50% testiranih životinja tijekom određenog vremena (4 h) (Meerlo i sur., 2011).



Slika 5. Prikaz 96-mikrotitarske pločice u kojoj različiti intenziteti bojanja ukazuju na različitu metaboličku aktivnost stanica

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

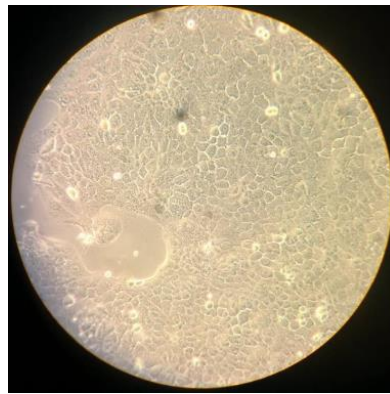
#### 3.1. PRIPREMA HUMANIH STANICA, EKSTRAKTA I RADNIH KONCENTRACIJA LISTA MASLAČKA

##### 3.1.1. Biološki test sustav – stanična linija CAL27

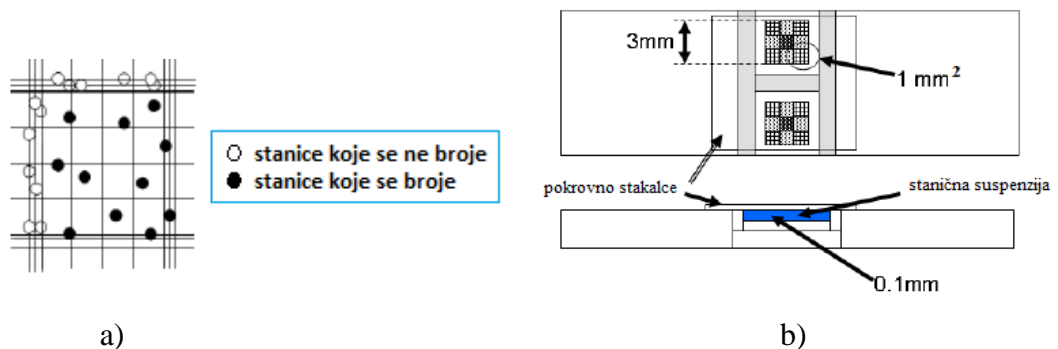
Ljudske stanice skvamoznog karcinoma epitela jezika CAL27 (Slika 6.) uzgajane su u RPMI 1640 mediju (RPMI 1640 *engl. Roswell Park Memorial Institute* stanični medij) s L-glutaminom i 25mM HEPES-om uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (FBS, *engl. fetal bovine serum*) koncentracije 10%, pri temperaturi od 37°C i u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> u CO<sub>2</sub> inkubatoru, bez dodatka antibiotika ili fungicida u staničnom mediju. Uzgajane su u monosloju u T-boci (75cm<sup>2</sup>) u sterilnim uvjetima. Dodavanje medija, seruma, tripsina i sami tretman stanica se također odvijao u sterilnim uvjetima. Sterilni uvjeti postignuti su ozračivanjem prostorije UV lampom, te nakon toga 15 minutnom upaljenom UV lampom u komori za sterilni rad (Iskra, PIO, Hrvatska) u kojoj su već otprije bili postavljeni autoklavirani nastavci (2,10,100,200,1000 µL) za autoklavirane automatske pipete zajedno sa tim pipetama. Vrijeme diobe stanične kulture bilo je između 30-36 sati. Kada bi prerasle 90% površine, zbog svoje adherentnosti, stanice su od podloge odvajane kemijskim djelovanjem enzima tripsina u kontroliranom vremenskom periodu, a zatim je dodatak potpunog medija s FBS-om zaustavio daljnju aktivnost enzima. Kemijsko odvajanje je odabrano umjesto mehaničkog (struganja stanica sterilnom gumenom lopaticom) radi stvaranja što manjih oštećenja stanica

U ovom eksperimentu, odvajanje stanica provodilo se dodatkom 0,25%-tripsina u EDTA otopini. Medij u T-boci je u laminaru uklonjen u staklenu čašu za otpad, stanice su isprane sterilnim RPMI 1640 medijem bez seruma radi uklanjanja ostatka seruma u T-boci koji može deaktivirati djelovanje tripsina, te je dodano 1 mL 0,25%-tripsina u EDTA i pomičući T bocu u svim smjerovima u horizontalnom položaju, stanice su sve došle u kontakt sa tripsinom. Zatim je T boca vraćena u CO<sub>2</sub> inkubator na 10 minuta, tijekom kojih su se stanice zaokružile i odlijepile od podloge. Nakon 5 minuta stanice su bile praćene pod invertnim mikroskopom na 200x povećanju, u sterilnom prostoru da bi se utvrdilo točno vrijeme kada je većina stanica odlijepljena od podloge radi što kraćeg izlaganja djelovanju tripsina. Nakon toga, u T bocu je dodan 1 mL fetalnog telećeg seruma i 5 mL RPMI medija sobne temperature, sav sadržaj je prebačen u tubu za centrifugiranje od 14 mL, te je tuba stavljena u centrifugu na 6 minuta centrifugiranja na 800 okretaja u minuti (*engl. rounds per minute-rpm*). Nakon toga je

supernatant uklonjen, na talog je dodano 1 mL RPMI 1640 medija bez seruma, otopina je suspendirana, te je uzeto 20  $\mu\text{L}$  uzorka otopine radi određivanja broja stanica za eksperimente. Po 10  $\mu\text{L}$  uzorka nanijeto je sa svake strane Bürker-Türkove pločice (Slika 7.a) i 7.b.), te su pod električnim mikroskopom sa 400x povećanjem (40x objektiv x 10x okular) izbrojane stanice koje su bile prisutne u volumenu od 0,1  $\text{mm}^3$  (mrežice na pločici određuju granice) te zatim izračunom (srednji broj dobiven na 4 grupe od po 16 kvadratića se pomnoži sa  $10^4$ ) i dobiven je broj stanica u 1 mL.



Slika 6. Stanična kultura CAL27 pod mikroskopom



Slika 7. a) Mikroskopski prikaz Bürker-Türk komorice, b) Bürker-Türk komorica (preuzeto i prilagođeno) (Web 1)

### 3.1.2. Priprema ekstrakta

10 g lista maslačka preliveno je s 200 mL vruće vode. Nakon pola sata ekstrakcije, dobiveni ekstrakti su upareni i liofilizirani. Pripremljeni liofilizati korišteni su za pripremu ishodišnih i radnih otopina korištenih u eksperimentima. Ekstrakti su izrađeni u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu u Zagrebu.



### 3.1.3. Priprema radnih koncentracija ekstrakta lišća maslačka (M)

Iz dobivenih liofilizata pripremljene su ishodišne otopine deset puta veće koncentracije. Iz tih otopina pripremane su radne otopine u koncentracijama: 0, 0,05x, 0,1x, 0,2x, 0,5x, 1x, 2,5x i 5x. Koncentracija 1x odgovara  $1,79 \text{ mg mL}^{-1}$  suhe tvari te predstavlja sadržaj bioaktivnih tvari prisutnih u uobičajeno pripremljenim napitcima namijenjenim za konzumaciju.

## 3.2. MATERIJALI

### 3.2.1. Priprema otopine NMP agaroze

NMP 0,1% (engl. *normal melting point*) agarosa priprema se otapanjem NMP u destiliranoj vodi zagrijavanjem do potpunog otapanja u mikrovalnoj pećnici.

### 3.2.2. Priprema otopine LMP agaroze

LMP 0,5% otopina (engl. *low melting point*) pripremi se otapanjem 0,05 g LMP agaroze u 10 mL PBS bez kalcija i magnezija.

### 3.2.3. Priprema pufera za liziranje

Pri izradi pufera za liziranje prvo se priredi matična otopina otapanjem 146,4 g NaCl ( $c = 2,5 \text{ M}$ ), 37,2 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $c = 100 \text{ mM}$ ) i 1,2 g Tris pufera ( $c = 10 \text{ mM}$ ). Matičnoj otopini za liziranje se namjesti pH na 10 sa otopinom NaOH ( $c = 1 \text{ M}$ ) na sobnoj temperaturi te doda 10 g natrij-laurilsarkozina i nadomjesti s redestiliranom vodom do 1L. Za neposrednu upotrebu načini se svježa otopina tako da se pomiješa 89 mL matične otopine s 1 mL Triton X-100 ( $w/w = 1\%$ ) i 10 mL DMSO ( $w/w = 10\%$ ). Svježa radna otopina čuva se na  $+4^\circ\text{C}$  do upotrebe.

### 3.2.4. Priprema pufera za denaturaciju

Pufer za denaturaciju izrađuje se miješanjem matične otopine NaOH ( $c = 300 \text{ mM}$ ) s otopinom  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $c = 1 \text{ mM}$ ) u redestiliranoj vodi. Konačni pH otopine je 13.

### 3.2.5. Priprema pufera za neutralizaciju

Pufer za neutralizaciju (Tris) izrađuje se otapanjem Tris-a ( $\gamma = 60,63 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c = 0,4 \text{ M}$ ) u 800 mL redestilirane vode te se nadomjesti pH na 7,5 s koncentriranom HCl ( $c > 10 \text{ M}$ ) i nadopuni se do 1 L.

### 3.2.6. Priprema vodikovog peroksida

Koncentrirani 30%-tni vodikov peroksid je 9,79 M koncentrirana otopina peroksida. Da bi se dobio 0,25  $\mu\text{M}$  i 0,50  $\mu\text{M}$  vodikov peroksid, razrjeđenja su pripremljena od ishodišne otopine 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  razrjeđivanjem u destiliranoj  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.2.7. Kemikalije

- Destilirana voda, Kemika, Hrvatska
- DPX-otopina za uklapanje preparata, Sigma Aldrich, SAD
- Dimetil-sulfoksid DMSO, Kemika, Hrvatska
- 0,25%- tripsin-EDTA-, Imunološki zavod, Hrvatska
- Etanol 96%, Kemika, Hrvatska
- Etidij bromid, Sigma Aldrich, SAD
- FBS serum teleći (engl. *Fetal bovine serum*), Gibco-ThermoFisher, SAD
- Giemsa boja, Merck, Njemačka
- Kalijev klorid, Kemika, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Hrvatska
- LMP agarozna niskog tališta (engl. *Low melting point agarose*), Sigma Aldrich, SAD
- Metanol, Kemika, Hrvatska
- MMC-mitomicin C, Sigma Aldrich, SAD
- MTT reagens, Sigma Aldrich, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Hrvatska
- 0,9% otopina natrijevog klorida, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Kemika, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat, Kemika, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
- Na-laurilsarkozin, Sigma Aldrich, SAD
- NMP agarozna normalnog tališta (engl. *normal melting point agarose*) agarozna, Sigma Aldrich, SAD
- Octena kiselina, Kemika, Hrvatska
- 30% vodikov peroksid, Kemika, Hrvatska
- RPMI 1640 Roswell Park Memorial Institute stanični medij s L-glutaminom i 25mM HEPES-om, Sigma, Gibco, ThermoFisher, SAD
- Triton X100, Sigma Aldrich, SAD
- Trizma baza (Tris-HCl), Sigma Aldrich, SAD

- Ulje za mikroskopiranje, Kemika, Hrvatska

### 3.2.8. Aparatura

- Autoklav, Sutjeska, Jugoslavija
- Automatske pipete za 10 mL, 1 mL, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, Eppendorf, Njemačka
- Burker turk komorica, Optik labor, Njemačka
- CCD kamera, kompjuter sa softverom Instem, Engleska
- CO<sub>2</sub> inkubator Hera cell 240, Heraeus, Njemačka
- Digestor, INAKO, Hrvatska
- Digitalni brojač stanica, Assistent Counter, Njemačka
- Električni mikroskop s povećanjem do 1000X, Olympus, Njemačka
- Grijači stakala na 50°C, INAKO, Hrvatska
- Invertni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Kadice za elektroforezu s napajanjem, Whatmann Horizon 11.4, SAD
- Laminar s UV lampom, Iskra PIO, Hrvatska
- Mikrovalna pećnica, Gorenje, Hrvatska
- Olympus BX 51 fluorescencijski mikroskop sa UV lampom, Njemačka
- pH metar, Mettler Toledo, Švicarska
- Spektrofotometar Victor3 TM, Perkin Elmer, SAD
- Vakuum sisaljka, INAKO, Hrvatska
- Vodena kupelj, INAKO, Hrvatska

### 3.2.9. Posuđe i pribor

- Flaskovi ili T boce od 75 i 25 cm<sup>2</sup>, TPP, Njemačka
- Mikrotitarske pločice s 96 ili 24 jažica, TPP, Njemačka
- Očišćena histološka stakla za komet test Vitrognost, Plus ultra 26x76 mm, Biognost, Hrvatska
- Okrugla stakalca (pokrovnice) promjera 18 mm za nasađivanje stanica, TLOS, Hrvatska
- Plastični nastavci za automatske pipete za 10 mL, 1 mL, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L i 5  $\mu$ L, Eppendorf, Njemačka
- Staklene čašice za ph-metriranje, TLOS, Hrvatska
- Staklene pokrovnice Vitrognost 24x40, Biognost, Hrvatska
- 14 mL-tarske tube za centrifugiranje stanica, TPP, Njemačka
- tubice od 1,5 i 2 mL, Eppendorf, Njemačka

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. pH metriranje

Provjeren je i pH svakog ekstrakta neposredno nakon otapanja, te neposredno prije tretmana stanica. Ekstrakti su kao i tretirane stanice sa ekstraktima držani 1sat na 37°C u inkubatoru. Za pH metriranje su se koristile male staklene čašice od 5 mL, standardi za 4,7 i 9,21 pH te pH metar (Slika 8.). Za čišćenje elektrode između kalibracija i poslije svakog mjerenja koje je provedeno u dvije replike, koristila se destilirana voda, a za brisanje same elektrode staničevina, a isprani otpad se skupljao u staklenu čašu od 250 mL.



Slika 8. pH metar, Mettler Toledo S220, Švicarska

#### 3.3.2. MTT test

Nakon brojanja stanica, od koncentrirane stanične suspenzije napravljena su razrjeđenja stanične suspenzije kako bi u svakoj jažici za MTT test u koju će ići 100  $\mu\text{L}$  medija (RPMI 1640 s 10% FBS serumom) bila koncentracija od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ .

U svaku jažicu mikrotitarske pločice s 96 bunarića se nasađuje 100  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije, pri čemu se za svaku mjerenu koncentraciju te kontrolni uzorak nasađuje 5 ponavljanja, te je 5 jažica bilo još predviđeno za slijepu probu (pozadina boja u MTT testu). Stanice su u sterilnim uvjetima pregledavane pod invertnim mikroskopom, povećanje 20x, i gledalo se kada će dosegnuti 70% pokrivenost podloge (površine).

Stanice za 48 h prekrivaju 70% podloge, medij se uklanja, a stanice se ispiru sa svježim medijem te se vrši tretman stanica sa 100  $\mu\text{L}$  medija s ekstraktom na 37°C. Nakon 1 h medij se ukloni vakuum sisaljkom i ispire se novim medijem. Potrebno je ukloniti sav medij jer uslijed oštećenja plazmatske membrane iz stanica izlazi laktat-dehidrogenaza koja također

može reducirati MTT u formazan tako da i mrtve stanice mogu doprinijeti konačnom obojenju, a i uklanjanjem se ispiru ostatak ekstrakta sa stanica.

Od prethodno pripremljene radne otopine MTT, 40  $\mu\text{L}$  se dodaje u svaku jažicu. Slijedi 3 h inkubacije pri 37°C. U digestoru se zatim dodaje 170  $\mu\text{L}$  DMSO-a u svaku jažicu kako bi se otopio formazan. Inkubacija ploče (30-35 min) se provodi na tresilici da bi se boja ravnomjerno rasporedila i da nestanu mjehurići zraka koji mogu povećati apsorbanciju, nakon čega treba pažljivo baratati pločicom i ne tresti ju. Apsorbancija se mjeri na 570 nm, a od dobivene apsorbancije se oduzima vrijednost slijepe probe (sve otopine osim stanica). Izračunava se relativan broj stanica u odnosu na kontrolu koristeći sljedeću formulu (Čimbora Zovko, 2007).

$$\% \text{ preživljavanja} = \frac{(\text{apsorbancija uzorka} - \text{apsorbancija slijepe probe})}{(\text{apsorbancija kontrole} - \text{apsorbancija slijepe probe})} \times 100$$

### 3.3.3. Tretman za komet test

U svaku jažicu 24-jažične mikrotitarske ploče nasađeno je  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ . Nakon 2 dana, stanice su prekrile više od 70% površine, nakon čega je medij uklonjen, zatim ispran sa novim medijem bez seruma te su stanice u jažicama tretirane sa ekstraktima.

U svaku jažicu je stavljeno 500  $\mu\text{L}$  potpunog medija s ekstraktom i stanice su tretirane 1 h na 37°C u inkubatoru sa  $\text{CO}_2$ .

### 3.3.4. Komet test

U istraživanju je primjenjena metoda alkalnog komet testa. Pripremljeno je 96 predmetnih stakalaca sa 300  $\mu\text{L}$  agaroznog gela (1% *normal melting point*, NMP agaroz) koja su prekrivena pokrovnicom i stavljena na sušenje na 50°C te su osušena stakla spremljena u suhu kutiju.

U svakom bunariću-jažici uklonjen je medij, te su adherirane stanice isprane sa novim toplim RPMI medijem bez seruma da bi se uklonili tragovi seruma prije postupka tripsinizacije. Nakon uklanjanja medija bez seruma, na adherirane stanice nanoseno je 100  $\mu\text{L}$  otopine tripsina. Tripsiniziranje stanica trajalo je 5-10 minuta na 37°C. Na tripsinizirane stanice je stavljena kap (30 $\mu\text{L}$ ) fetalnog seruma radi inaktivacije djelovanja tripsina i nanoseno je 1 mL RPMI medija. Sadržaj svakog bunarčića-jažice prenesen je u 2 mL- litarske tubice i

centrifugiran 1 minutu na 2000 rpm (engl. *Rounds per minute* ili okretaji u minuti) da bi se stanice istaložile i odijelile od ostatka otopine kao talog.

U svaku Eppendorf epruvetu od 2 mL dodaje se 200  $\mu$ L 0,5 % LMP (*low melting point*, LMP) agaroze te se iz te smjese po 100  $\mu$ L prenosi na svako predmetno stakalce za komet koja su od prije presvučena sa osušenim slojem 1% NMP agaroze (300  $\mu$ L 1% NMP agaroze naneseo je dan prije i ostavljeno da se osuši) i prekriva pokrovnicom 24×40 mm te se ostavlja 10 min na ledu radi solidifikacije. Potom se pokrovno stakalce pažljivo uklanja, a predmetno se ispiri vodom i uranja u pufer za lizu u kojem se stanice liziraju pri 4°C tijekom 1 h. Nakon toga, predmetna stakalca vade se iz lize, temeljito ispiru destiliranom vodom, suše se i stavljaju u otopinu za denaturaciju gdje se drže 20 min. Nakon toga stakalca se prenose u horizontalnu kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi novi hladni denaturacijski pufer. Elektroforeza se provodi u alkalnim uvjetima 15 min, pri naponu 21 V. Zatim se predmetna stakalca vade iz kadice za elektroforezu, suše, te se stavljaju vodoravno položena na stalak sa uzorkom usmjerenim prema gore te tretiraju otopinom Tris-HCl-a 3 puta po 5 minuta. U ovom eksperimentu analiza preparata rađena je odmah nakon denaturacije otopinom Tris-HCl-a.

Prilikom analize, na predmetno stakalce pipetira se 50  $\mu$ L otopine etidijevog bromida, stakalca se prekrivaju pokrovnicama te se kometi promatraju pod fluorescencijskim mikroskopom na koji je spojena crno-bijela kamera na softverski sustav Comet assay IV, Perceptive instruments, Instam, Velika Britanija. Na svakom staklu broji se po 100 stanica - kometa kojima se utvrđuju 2 osnovna parametra: dužina repa kometa te intenzitet repa. Budući da je eksperiment rađen u dvije replike, ukupno je po jednoj točki analizirano 200 kometa (Brozović, 2007).

### 3.3.5. Tretman sa 0,50 $\mu$ M i 0,25 $\mu$ M vodikovim peroksidom

Nakon solidifikacije 0,5% LMP agaroznog sloja sa stanicama, na gel se nanosi 100  $\mu$ L otopine vodikovog peroksida. Za svako razrjeđenje i koncentraciju vodikovog peroksida tretiraju se dva stakla na isti način. Radi podjednagog tretmana cijelog stakla, gel se prekriva pokrovnicom. Nakon 5-minutnog tretmana tijekom kojega su stakalca cijelo vrijeme držana iznad leda, pokrovnica se skida, a gel se temeljito i oprezno ispiri destiliranom vodom, te se stakalca uranjaju u otopinu za liziranje, kako je već objašnjeno u komet testu, te je ostatak procedure isti kao i za normalni alkalni komet test.

### 3.3.6. Tretman za mikronukleus

Za mikronukleus test (MN-test) primijenjen je standardni protokol s malim promjenama koje se tiču nasadivanja na mala okrugla stakalca radi izbjegavanja korištenja tripsinske otopine za

pripremu preparata. Okrugla stakalca promjera 18 mm prethodno isprana etanolom te autoklavirana postavljaju se na dno sterilnih 24-jažičnih mikroploča u sterilnim uvjetima. Stanice u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  dodaju se u volumenu od 500  $\mu\text{L}$  u potpunom mediju (RPMI, 10% FBS). Stanice nakon 48 sati popunjavaju više od 50% površine, medij se odsisava, adherirane stanice se ispiru, te se nanosi novi topli medij sa ekstraktima u volumenu od 500  $\mu\text{L}$  te se stanice tretiraju na  $37^\circ\text{C}$  u inkubatoru sa 5%  $\text{CO}_2$  4 h. Nakon toga medij se uklanja, stanice se ispiru od ostataka ekstrakta te se dodaje novi topli medij sa 10%-tnim FBS-om i citohalazinom B ( $3\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Kontrole se obrađuju na isti način, samo bez dodavanja ekstrakata u medij.

### 3.3.7. Mikronukleus test

Nakon 34 sata od tretmana, stanice se ispiru dva puta sterlinim PBS-om na sobnoj temperaturi, a stakalca u jažicama se tretiraju sa 100  $\mu\text{L}$  hladne fiziološke otopine na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta otopina se uklanja i nanosi se 100  $\mu\text{L}$  fiksira (1:3 octena kiselina: metanol) i također se tretira 10 min. Nakon uklanjanja fiksira i sušenja, stanice se bojaju 10 minuta 3%-tnom vodenom otopinom Giemsa. Potom se ispiru destiliranom vodom i nakon sušenja vade se iz bunarića iglicama i pincetom vodeći računa da je strana sa stanicama uvijek okrenuta prema gore. Na tu se stranu nanosi stanično ljepilo DPX (medij za uklapljanje stanica), te se strana sa stanicama na površini okreće prema dolje da bi se zalijepila za predmetno staklo. Na svako predmetno staklo postavljena su po tri stakalca.

Preparati su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom. U svakom uzorku pregledano je 2000 binuklearnih stanica u kojima je određen ukupni broj MN, te je broj izračunat kao frekvencija na 1000 binuklearnih stanica (Bonassi i sur., 2001).

Mitotički indeks ili indeks proliferacije određen je prema autorima Eastmond i Tucker 1989 (Eastmond i Tucker, 1989):

$$\frac{M1 + 2 * M2 + 3 * M3 + 4 * M4}{N}$$

U formuli za NDI (mitotički indeks), M1-M4 je broj mononuklearnih, binuklearnih, trinuklearnih i tetranuklearnih stanica na ukupnom broju izbrojanih stanica na preparatu (N), koji je bio određen pregledom 1000 stanica.

Pozitivna kontrola u mikronukleus *cytome* testu bio je mitomicin C, a tretman je trajao 4 h, sa istim uvjetima. Mitomicin C je klastogen (uzrokuje oštećenja genoma, ali ne utječe na citokinezu stanica) i ne treba metaboličku aktivaciju (OECD 487). Koncentracija u tretmanu je bila  $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Nakon 4 h, jažice s pozitivnom kontrolom su bile isprane 1x PBS-om sobne temperature, te im je dodan novi topli medij sa 10%-tnim FBS-om i citohalazinom B ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### **3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu Statistica 13.2 (DELL, StatSoft, SAD). U deskriptivnoj analizi za svaku točku i metodu određena je srednja vrijednost, standardna devijacija, standardna pogreška, minimum i maksimum, medijan, CI vrijednosti. Za komet test su se rezultati za dužinu repa i intenzitet repa logaritmirali dekadskim logaritmom s bazom 10 i vrijednošću  $v_{i+1}$  radi normalizacije rezultata jer u testu svi rezultati imaju pozitivnu vrijednost zbog prirode samog testa. Korištenjem Analize Varijance ustanovilo se da li postoje razlike među samim promatranim koncentracijama i nakon toga se upotrijebila analiza Break down one way ANOVA test sa post-hoc Scheffé-ovom modifikacijom za usporedbu uzoraka u replikama, i ako nije nađena razlika onda su se uzorci uzimali zajedno kao 200 mjerenja, te je napravljena još jednom Break down one way ANOVA testa sa post-hoc Scheffé-ovom modifikacijom. Za mikronukleus test se koristio t-test i hi kvadrat test. Razina značajnosti je postavljena na  $p < 0,05$ . U istom programu su napravljeni i grafički prikazi rezultata sa srednjim vrijednostima (SV) i standardnim devijacijama ( $\pm 2 \text{ SD}$ ).



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Maslačak je višegodišnja biljka koja se uzgaja diljem mnogih područja sjeverne polutke. Ima široku primjenu u kulinarstvu (lišće i korijeni), kao hrana (Colle i sur., 2012), te kao dodatak koji daje okus hrani (Sweeney i sur., 2005). Također, koristi se i kao komponenta farmaceutskih pripravaka koji se koriste za liječenje mokraćnog mjehura, jetre i slezene budući da je maslačak bogat izvor polifenola, ponajviše derivata cinamične kiseline, flavonoida i triterpenoida koji radi svojih bioaktivnih svojstava djeluju antiupalno, antikancerogeno, antioksidativno te antimikrobno (Lis i sur., 2018). Upravo radi svojih bioaktivnih karakteristika, maslačak se koristi i kao čajni pripravak.

Ovim istraživanjem testirao se utjecaj različitih koncentracija ekstrakta dobivenog od listova maslačka (0,05x, 0,1x, 0,2x, 0,5x, 1x, 2,5x i 5x) na vijabilnost (MTT test), primarna (1h izlaganja-metodom alkalnog komet testa), trajna (4h izlaganja-metodom mikronukleus *cytome* testa) genomska oštećenja i postojanje zaštitnog učinka prilikom izlaganja tretiranih stanica oksidativnom stresu nakon 5-minutnog izlaganja 0,25 i 0,50  $\mu$ M vodikovom peroksidu (alkalni komet test) u humanoj staničnoj kulturi skvamoznog epitela karcinoma jezika CAL27.

### 4.1. pH VRIJEDNOSTI I MTT TEST

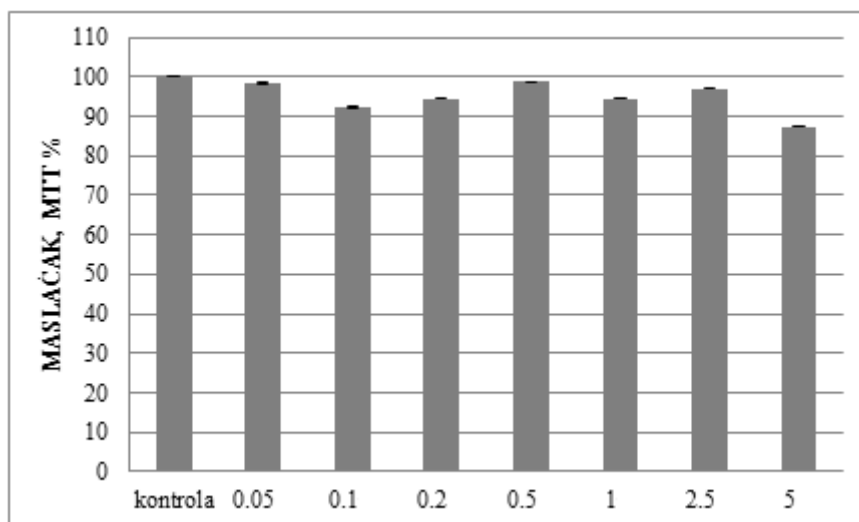
U Tablici 2. nalaze se izmjerene pH vrijednosti različitih koncentracija čaja maslačka otopljene u sterilnom mediju bez dodatka seruma na sobnoj temperaturi i na 37°C.

Tablica 2. Određivanje pH vrijednosti na sobnoj temperaturi i na 37°C

KONCENTRACIJA MASLAČKA	SOBNA TEMPERATURA	37°C
M1	7,50	7,48
M2	7,50	7,48
M3	7,50	7,47
M4	7,49	7,42
M5	7,46	7,41
M6	7,43	7,37
M7	7,40	7,38

Budući da se pH vrijednosti izmjerene na 37°C za sve koncentracije nisu značajno razlikovale (od 7,37 do 7,48), moglo se ići u daljnju analizu podataka.

Na Slici 9. Prikazani su rezultati MTT testa za ekstrakte maslačka (srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama). Rezultati se nisu statistički značajno razlikovali, osim što je za 5x koncentraciju primijećen pad vijabilnosti od 12%. Niti jedna od izmjerenih koncentracija nije pokazivala veći postotak vijabilnosti od kontrolne skupine.



Slika 9. Rezultati MTT testa za ekstrakte maslačka (srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama).

Da bi se rezultati mogli usporediti s drugim autorima, prvo bismo trebali izračunati kojim vrijednostima u  $\text{mg mL}^{-1}$  odgovaraju naše vrijednosti. Preračunavanjem količine otopljenog suhog ekstrakta, došli smo do mjerenja izraženih u Tablici 3.:

Tablica 3. Koncentracije radnih otopina ekstrakta maslačka izražene u  $\text{mg mL}^{-1}$

Koncentracije	$\text{mg mL}^{-1}$
5x	8,95
2,5x	4,475
1x	1,79
0,5x	0,895
0,2x	0,358
0,1x	0,179
0,05x	0,0895

Ovi rezultati su jako bitni s obzirom da su Manach i suradnici (Manach i sur., 2004; Manach i sur., 2005) pokazali da se u ljudskom serumu mogu naći frakcije maslačka u koncentraciji od 0,5 do 50 mg mL<sup>-1</sup>, a u tom rasponu bi bile i koncentracije istraživane u ovom radu, a tri najmanje bi bile i ispod koncentracije od 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

Budući da se smatra da sastojci maslačka nemaju citotoksična svojstva (ili je citotoksično djelovanje jako slabo) naročito zbog zaštitnog učinka fenolnih (polifenolnih) komponenti te zbog nedostatka određenih toksina ili alkaloida, koje sadrže neke druge biljke, nema puno radova o citotoksičnom učinku maslačka. Maslačak je proglašen općenito sigurnom biljkom na listi američke FDA, naročito zbog negativnih rezultata u istraživanjima na toksičnosti na ljudsko zdravlje (Sweeney i sur., 2005). LD<sub>50</sub> akutne toksičnosti kod miševa intraperitonealnom injekcijom je niska i iznosi 36,8 g kg<sup>-1</sup> za korijen maslačka te 28,8 g kg<sup>-1</sup> za biljku maslačka (Sweeney i sur., 2005; RácZ-Kotilla i sur., 1974). Kunići oralno tretirani s 3-6 g ekstrakta maslačka na kilogram tjelesne mase nisu pokazivali vidljive znakove akutne toksičnosti (Akhtar i sur., 1985). Štakori hranjeni svježim maslačkom nekoliko mjeseci u rasponu od 4-33% u ukupnoj prehrani nisu pokazali kancerogene učinke takve prehrane (Hirano i sur., 1978). Čučković (Čučković, 2017) je pokazala da CC<sub>50</sub> tijekom tretmana od jednog sata kod ekstrakta lista maslačka iznosi 52,75 mg mL<sup>-1</sup>, a tijekom dva sata tretmana iznosi 17,05 mg mL<sup>-1</sup>. He i suradnici (He i sur., 2011) pokazali su da je CC<sub>50</sub> ekstrakta maslačka na humanim stanicama A594 ili MDCK (engl. *Maldin-Darby canine kidney*) 8,47 mg mL<sup>-1</sup>. IC<sub>50</sub> kod Menghini i suradnika 2010. (Menghini i sur., 2010) bio je za HepG2 stanice 20,396 mg mL<sup>-1</sup>.

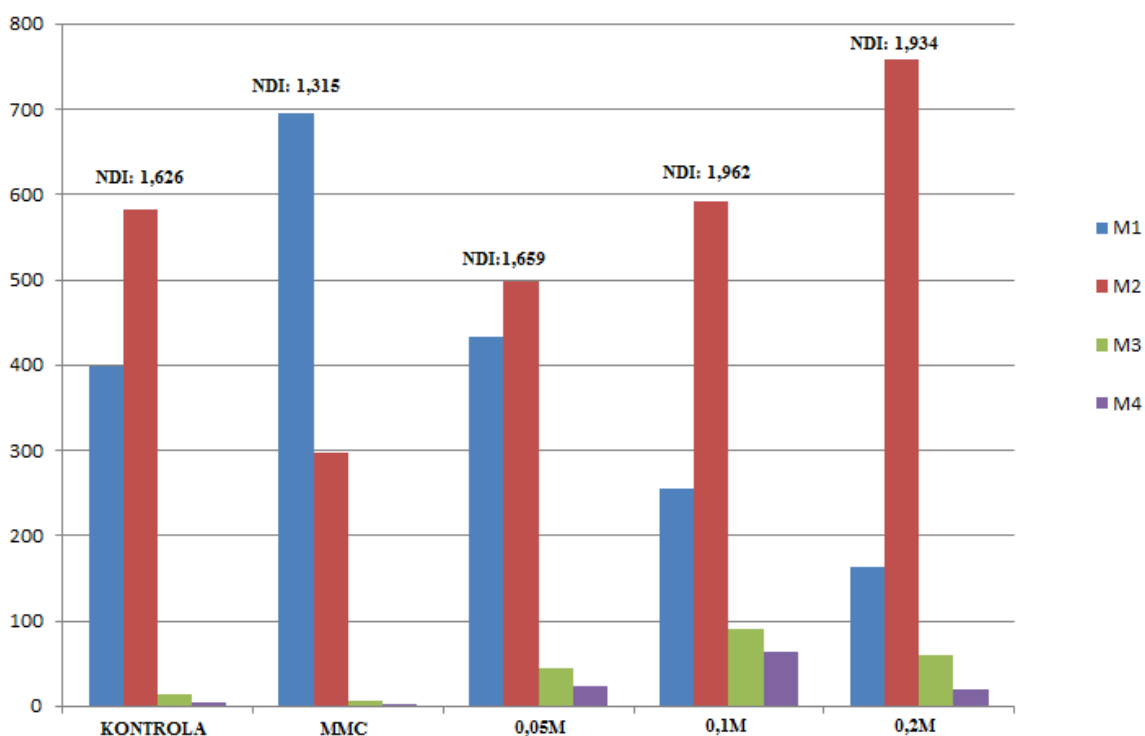
He i suradnici pokazali su da tretiranje dvije stanične humane linije adenokarcinoma pluća A594 i epitelnih stanica bubrežnog tubula MDCK (eng. *Maldin-Darby canine kidney*) 48 sati u koncentracijama od 0,1563 mg mL<sup>-1</sup> do 5 mg mL<sup>-1</sup> nije uzrokovalo promjene u vijabilnosti mjerene CCK testom, ali na 10 mg mL<sup>-1</sup> je vijabilnost pala za 88%, a na 15 i 20 mg mL<sup>-1</sup> za 85 i 90%. Budući da su koncentracije istraživane u ovom radu bile niže od CC<sub>50</sub> kod svih autora, osim kod He i suradnici (He i sur., 2011) za stanične linije A549 i MDCK za najveću koncentraciju, dokazano je da postoje i razlike u osjetljivosti određenih staničnih linija, a i rezultati nisu za potpunu usporedbu jer je njihov tretman trajao 48 sati, a u ovom radu tretman je trajao samo 1 sat. Rezultati ovog istraživanja se razlikuju od rezultata Čučković (Čučković, 2017) koja je u svome radu pokazala citotoksični učinak (metodom Neutral crvenog testa koji mjeri vijabilnost lizosomalnom toksičnošću) ekstrakta cvijeta maslačka na staničnoj liniji CALB1 tek nakon 2 sata tretiranja s 5x koncentracijom (postotak preživljenja od 52, 78 %), dok su jedan i dva sata tretiranja sa sličnim koncentracijama kao i u ovim eksperimentima

pokazali blagu toksičnost na stanice, s postotkom preživljenja od 70-85%. Čučković (Čučković, 2017) je pokazala da 0,5x i 1x nemaju utjecaja na staničnu vijabilnost, tijekom jednog sata izlaganja, dok 2,5x i 5x imaju taj učinak koji se povećava još više nakon dva sata izlaganja kada samo 0,5x nije imala citotoksični učinak na CALB1 stanice. Menghini i suradnici (Menghini i sur., 2010) su kod tumorskih stanica HepG2 pokazali smanjenje vijabilnosti stanica pri koncentracijama od 75 i 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gdje su imali vijabilnost stanica malo veću od 50% pri 48 satnom izlaganju, a malo manju od 50% prilikom 24-satnog izlaganja. Sličan učinak potvrdili su i Koo i suradnici (Koo i sur., 2004) pokazavši da je 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dovoljno za indukciju apoptotičnog učinka u tumorskim stanicama. Najmanja koncentracija istraživana u ovom radu ulazi u rang između 75 i 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ali nije pokazala istu osjetljivost kao i HepG2 stanice u ova dva pokusa. Naprotiv, rezultati ovog rada slični su onima dobivenim u radu Saratale i suradnici i Koo i suradnici (Koo i sur., 2004; Saratale i sur., 2017) koji su pokazali kod HepG2 stanica vijabilnost od 90% u tretmanu s koncentracijama 10-200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a u taj je rang ulazila i najniža koncentracija istraživana u ovom radu. Koo i suradnici (Koo i sur., 2004) su imali takva mjerenja za 24 sata izlaganja, a za 48 sati, vijabilnost je bila između 80 i 70% (0,2 i 2  $\text{mg mL}^{-1}$ ) mjereno protočnom citometrijom, dok je 0,02  $\text{mg mL}^{-1}$  (koncentracija duplo manja od najniže koncentracije istraživane u ovom radu) pokazala vijabilnost istu i blizu kontrolnih vrijednosti i za 24 i 48-satno izlaganje. Mingarro i suradnici (Mingarro i sur., 2015) također nisu uočili utjecaj na vijabilnost kod HeLa, HL-60, HepG2 te Vero E6 kod tretmana sa različitim vrstama maslačka.

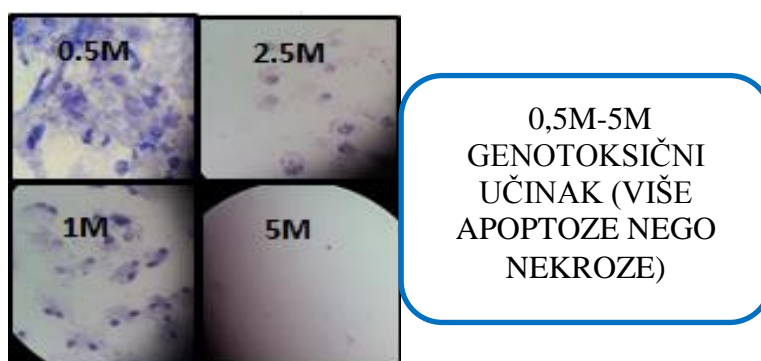
No, budući da se u zadanim ispitivanim koncentracijama pokazalo da neke koncentracije izazivaju samo 60% vijabilnosti (OECD i ECHA uputstva za testiranje kemikalija), mogli smo istraživati daljni utjecaj na genotoksičnost stanica prilikom izlaganja ekstraktima te ekstraktima i vodikovom peroksidu.

## 4.2. UTJECAJ NA PROLIFERACIJU I MITOTIČKI INDEKS

Na Slici 10. prikazani su rezultati mjerenja mitotičkog indeksa u mikronukleus testu (tretman 4 h ekstraktom maslačka)



Slika 10. Mitotički indeks (NDI) i frekvencija stanica u različitim fazama diobe nakon 4h tretmana ekstraktom maslačka mjerena na 1000 stanica, M1- mononuklearne stanice, M2- binuklearne, M3-trinuklearne, M4-tetranuklearne, MMC-mitomycin C (pozitivna kontrola)



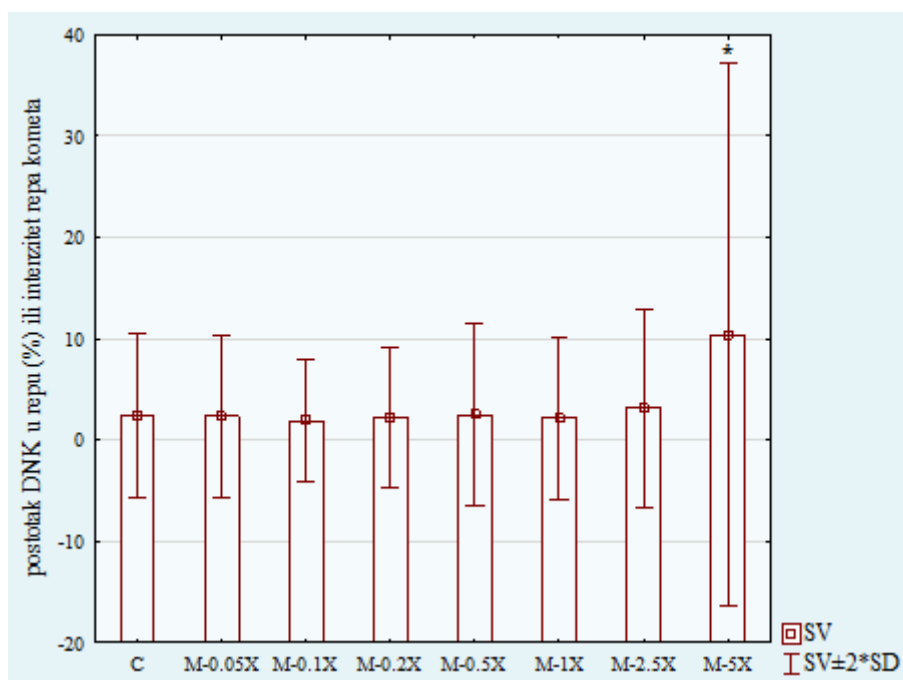
Slika 11. Prikaz izgleda stanica u mikronukleus testu pri višim koncentracijama u kojima su stanice pokazale apoptotični te nekrotični učinak nakon izlaganja (0,5x – 5x)

Rezultati pokazuju da u koncentracijama od 0,05x do 0,2x, ekstrakt lista maslačka ubrzava staničnu proliferaciju, što je vidljivo iz povećanja broja stanica sa 2, 3 i 4 jezgre u istoj citoplazmi, te i iz samog mitotičkog indeksa. Učinak na proliferaciju se mijenja u većim koncentracijama od 0,2x, gdje se nisu mogle izbrojati stanice zbog masivnog odlaska u apoptozu i vidljivog smanjenog broja stanica. Menghini i suradnici (Menghini i sur., 2010)

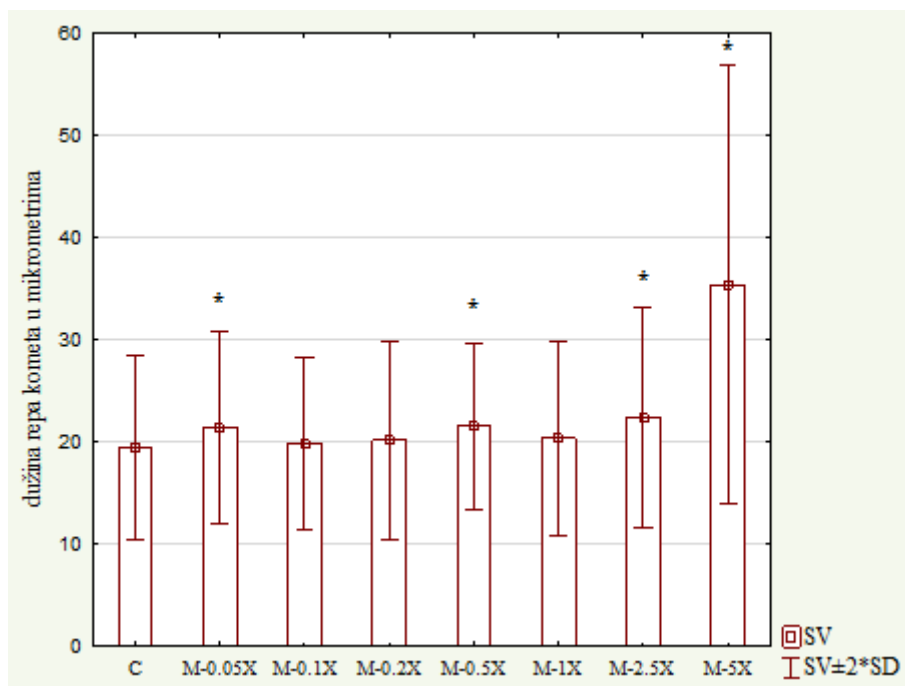
pokazali su da su svi ekstrakti maslačka pokazali antiproliferativnu aktivnost u dozno-ovisnoj vezi kod tumorskih stanica HepG2, ali dok su je oni pokazali u rasponu vrijednosti koje odgovaraju našoj najmanjoj koncentraciji kod koje mi to u našoj staničnoj liniji nismo zabilježili, rezultati od druge grupe znanstvenika odgovaraju našima. Koo i suradnici (Koo i sur., 2004) pokazali su da je  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  dovoljno za indukciju apoptotičnog učinka u tumorskim HepG2 stanicama. Izloženost ekstraktu maslačka od  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  za 24h uzrokovala je povećanje apoptoze za 28,7% a 48 sati za 38,8%. Njihova koncentracija odgovara koncentraciji 0,2x korištenoj u ovom radu nakon koje su stanice ušle u apoptozu. Mjerenjem ekspresije citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\alpha$ , važnih regulatora apoptoze, Koo i suradnici pokazali su da je njihova najveća ekspresija baš pri našoj koncentraciji od 0,2x tj.  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  i pri 24 i pri 48 sati. Ova dva faktora su također važna i u izazivanju citotoksičnosti, ali je u radu od Koo i suradnici (Koo i sur., 2004) pokazano da je i pri 24 i 48 h pri  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  njihovo poticanje citotoksičnosti drastično blokirano (dokaz sa antitijelima – stanice su 1 h predtretirane sa anti-TNF- $\alpha$  citokinetikom te anti-IL-1 $\alpha$  antitijelima te su potom izložene 24 i 48-satnom djelovanju *Taraxacum officinale*). Zbog ovakvog djelovanja maslačka, možemo zaključiti da djeluje kao inhibitor rasta tumorskih stanica, ali samo do 0,2x doze. Proliferativni učinak pri manjim dozama se može pripisati i porastu TNF-alfa faktora koji je u malim dozama i potreban za proliferaciju stanica (Akerman i sur., 1992), dok su visoke doze eksperimentalno dokazane da imaju ulogu u izazivanju hepatotoksičnog učinka (Ostenson i sur., 1987), a također i u toksičnosti CAL27 stanica. Inhibicija citotoksičnosti dodatkom anti TNF i anti IL-1 kod Koo i suradnika, dokazuje da se citotoksičnost maslačka vrši isključivo preko ova dva citokina (Koo i sur., 2004), te samo preko mehanizama aktivacije apoptoze, ne i nekroze.

#### 4.3. PRIMARNA I TRAJNA OŠTEĆENJA MJERENA ALKALNIM KOMET TESTOM I MIKRONUKLEUS *CYTOME* TESTOM

Na Slikama 12. i 13. prikazani su rezultati dva mjerena parametra alkalnog komet testa, a u Tablici 4. i na Slici 11. prikazani su rezultati za parametre oštećenja u mikronukleus *cytome* testu. Rezultati pokazuju da je samo najveća doza od 5x imala značajni učinak na primarna oštećenja DNK i njenu fragmentaciju, dok je mikronukleus test pokazao da nakon prve diobe stanice u kojoj su aktivni enzimi za popravak imali mogućnost popraviti oštećenja, preostala oštećenja pokazuju značajnu razliku u odnosu na kontrolne uzorke i to samo u obliku mikronukleusa, dok nuklearnih pupova i mostova nema u tolikoj količini, pokazujući da je vjerojatno mehanizam djelovanja izazivanje lomova kromosoma ili gubitka cijelog kromosoma, bez stvaranja bicentričnih kromosoma (mostovi) ili ekcesivnog umnožavanja dijelova genomske materijala (pupovi) za koncentracije 0,05x i 0,1x.



Slika 12. Prikaz rezultata parametra alkalnog komet testa - postotak DNK u repu kometa (%) nakon 1 h izlaganja stanica CAL27 ekstraktima maslačka. M-maslačak, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija



Slika 13. Prikaz rezultata parametra alkalnog kometa testa- dužina repa kometa u mikrometrima nakon 1 h izlaganja stanica CAL27 ekstraktima maslačka. M-maslačak, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija

Tablica 4. Frekvencije mikronukleusa, apoptoza, nuklearnih pupova i nukleoplazmatskih mostova u mikronukleus *cytome* testu

	MN	PUP	MOST	AP
kontrola	2	-	-	-
MMC	17	-	-	-
0,05x	7*	1	1	2
0,1x	15*	-	2	-
0,2x	2	-	-	74*
0,5x	apoptoza			
1x				
2,5x	nekroza			
5x				

\*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

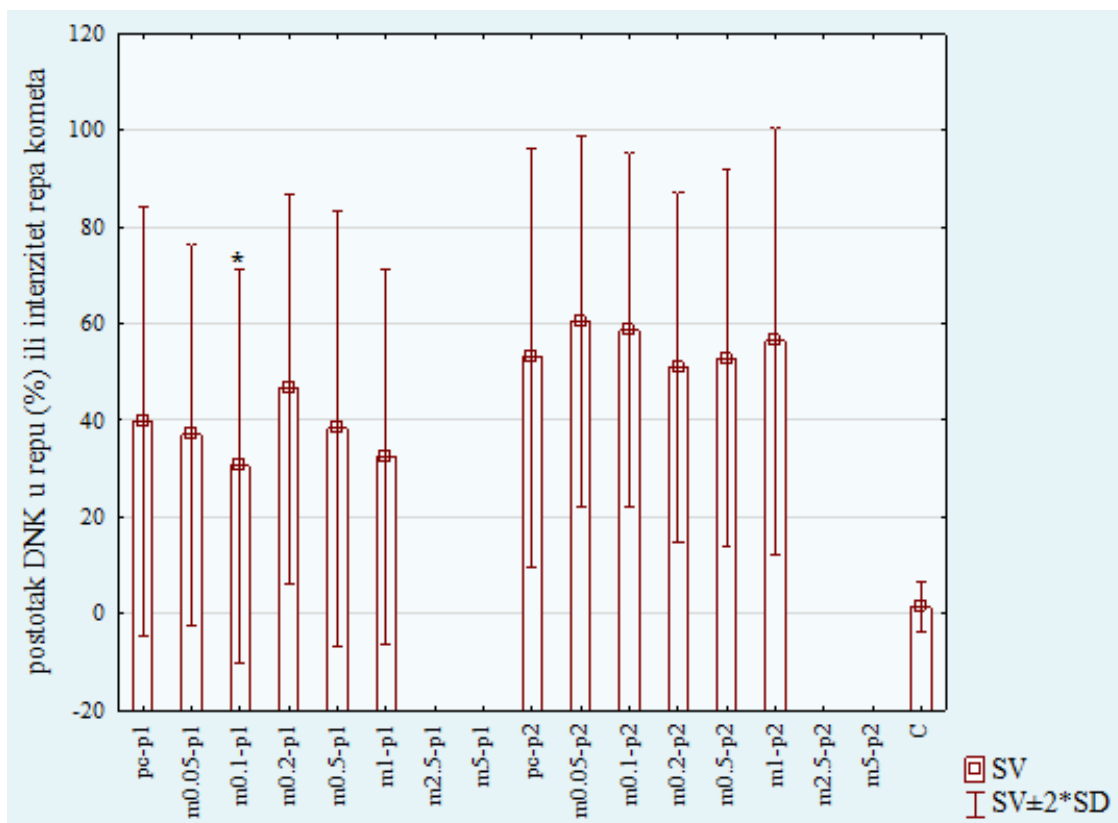
Hidroksilni radikali nastali Fentonovom reakcijom brzo reagiraju sa deoksiribozom (Halliwell i sur., 1987) i sa DNK, utječući tako na fragmentaciju DNK (Halliwell i sur., 1987). Stvaranje hidroksilnih radikala može biti i mjesno specifično i nespecifično (Hu i Kitts, 2003).



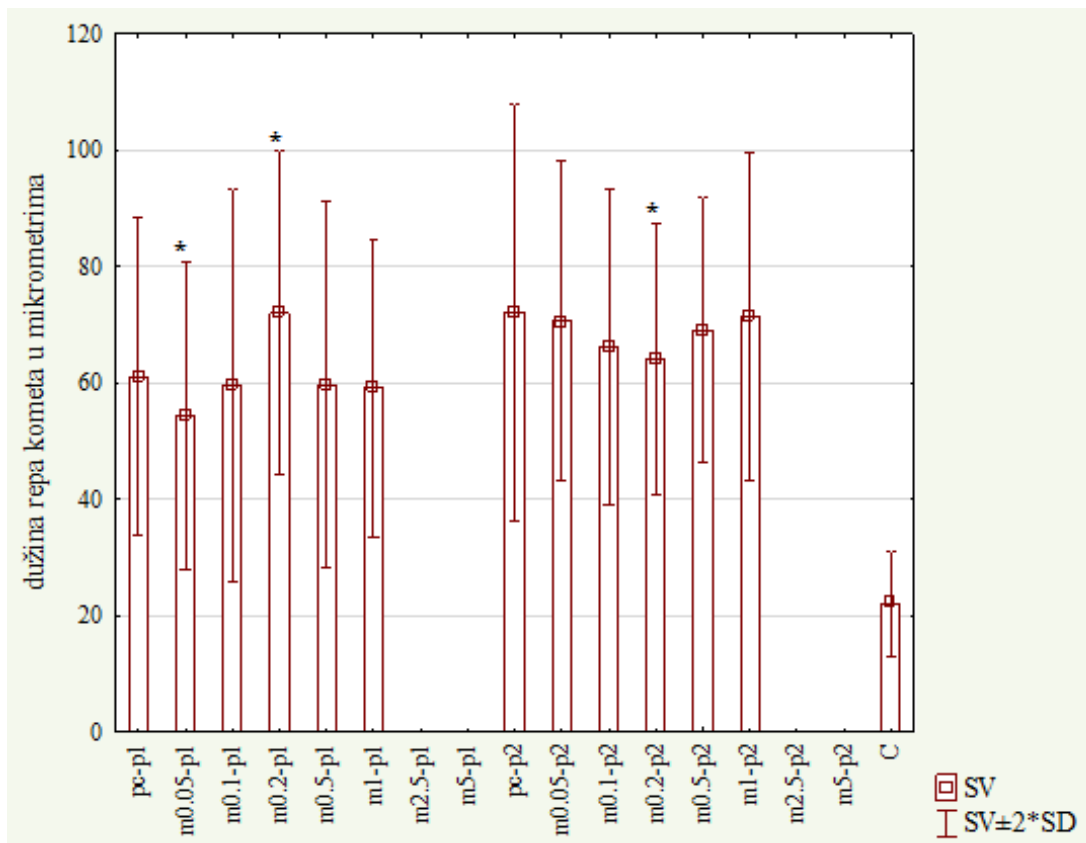
Te Fenton reakcije stvaranja radikala su pokazali Hu i suradnici (Hu i sur., 2003) da uzrokuju nestajanje superzavijene DNK u agaroznim gelovima poslije elektroforeze, a tretmanom i vodenim i etil-acetatnim ekstraktima maslačka superzavijena DNK ostaje djelomično zaštićena od radikala.

Smanjenje broja mikronukleusa nakon tretmana s koncentracijom  $0,358 \text{ mg mL}^{-1}$  rezultiralo je izrazito velikim brojem stanica u apoptozi, koji pokazuju da pri toj koncentraciji maslačak poprima drugi oblik djelovanja na ovu staničnu liniju. Slika 11. može zornije prikazati taj drastični učinak i masovni odlazak stanica u programiranu staničnu smrt sa fragmentiranom jezgrom. Salonen i suradnici i Beretta i suradnici (Beretta i sur., 2005; Salonen i sur., 2017) su mjereći antioksidativne aktivnosti talijanskih vrsta meda od jedne biljke našli IC vrijednosti za maslačak od  $5\text{-}50 \text{ mg mL}^{-1}$ , a u tome rangu bi bila najveća koncentracija od  $5x$ , čiji se učinak istraživao u ovom radu, što potvrđuje i rezultate o oštećenjima i o apoptozi. Hu i Kitts (Hu i Kitts, 2003) su pokazali na  $\text{CaCO}_2$  staničnoj liniji citotoksični učinak i za vodene i za etil-acetat ekstrakte cvijeta maslačka za koje je veći apoptotički učinak izmjeren nakon tretmana stanica s vodenim ekstraktom ( $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$  naspram  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ), i pokazali su da taj učinak proizvode baš luteolin i leuteolin-7-glukozid, za koje su pokazali da su  $\text{LD}_{50}$   $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$  te  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ . Hfaiedh i suradnici (Hfaiedh, 2014) su pokazali da je ekstrakt lišća maslačka u dozi od  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  koji je oralno davan 30 dana štakorima soja Wistar prije nego su tretirani 10 dana intraperitonealno s  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  natrijevim dikromatom koji izaziva DNK fragmentaciju i nekrozu, spriječio DNK fragmentaciju te nekrozni učinak.

Na Slici 14. i 15. prikazani su rezultati dva parametra alkalnog komet testa nakon 5-minutnog izlaganja stanica vodikovom peroksidu u koncentracijama od  $0,25$  i  $0,50 \text{ }\mu\text{M}$ . Izlaganje većoj koncentraciji vodikovog peroksida uzrokuje apoptotične stanice, čime se broj stanica sa fragmentiranom DNK, ali i količina DNK u repu kometa smanjuje čime je samo prividno postignut protektivni učinak, i zbog toga razlike u oštećenju nisu značajno veće od niže koncentracije. Izlaganje nižoj koncentraciji vodikovog peroksida uzrokuje oštećenja, ali ne i apoptoze, dajući vjerodostojnu sliku o nastaloj količini oštećenja, te vjerodostojnu sliku o mogućim posljedicama nakon tretmana ekstraktima maslačka.



Slika 14. Prikaz rezultata parametra alkalnog komet testa - postotka DNK u repu (%) CAL27 stanica nakon 1 satnog tretmana ekstraktima maslačka, te 5 minutnom izlaganju 0,25  $\mu$ M i 0,50  $\mu$ M vodikovom peroksidu. M-maslačak, p1-0,25 $\mu$ M vodikov peroksid, p2-0,50  $\mu$ M vodikov peroksid, \*-statistički značajno različite vrijednosti od kontrole p1 tretirane samo vodikovim peroksidom



Slika 15. Prikaz rezultata parametra alkalnog komet testa– dužina repa kometa CAL27 stanica u mikrometrima nakon 1 h tretmana ekstraktima maslačka te 5 minutnom izlaganju 0,25 $\mu$ M i 0,50  $\mu$ M vodikovom peroksidu. M-maslačak, p1-0,25 $\mu$ M vodikov peroksid, p2-0,50  $\mu$ M vodikov peroksid, \*-statistički značajno različite vrijednosti od kontrole p1 (u p1 tretmanu) ili p2 (u p2 tretmanu) tretirane samo vodikovim peroksidom p1 ili p2

Što se tiče zaštitnog učinka ekstrakta maslačka nakon izlaganja stanica dvijema koncentracijama vodikovog peroksida, maslačak nije pokazao zaštitni učinak, a jedino smanjenje oštećenja primjećeno je kada su stanice tretirane s manjom koncentracijom vodikovog peroksida koja ne izaziva apoptozu već samo oštećenje DNK. Taj učinak je bio vidljiv u stanicama tretiranim s dvije najniže koncentracije, 0,05x i 0,1x, što bi odgovaralo i već objašnjenom mehanizmu djelovanja maslačka kroz citokine. Za veću koncentraciju vodikovog peroksida, maslačak je do 0,2x pokazao i smanjenje fragmentacije DNK. No u usporedbi postotka DNK koji je mjerodavniji parametar od same dužine repa kometa, rezultati nisu pokazali isti učinak, tj. manja fragmentacija DNK nije pratila i manji postotak DNK u repu, tj. manje oštećenja DNK općenito nakon tretmana maslačkom.

Menghini i suradnici (Menghini i sur., 2010) su također pokazali da od svih biljnih ekstrakata u mjerenju zaštitnog učinka izlaganja vodikovom peroksidu (0,5 mM, ili 500  $\mu\text{M}$ ), jedino maslačak nije pokazao nikakav zaštitni učinak i smanjio koncentracije mjerenih prostaglandina u koncentracijama ekstrakta od 75 i 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na staklima sa koncentracijom 2,5x i 5x u gelovima su bile jedino apoptoze koje se nisu mogle mjeriti. Menghini i suradnici (Menghini i sur., 2010) su pokazali kod HepG2 stanica da pretretman s - maslačkom (48 sati) uzrokuje zaštitu od oksidativnog stresa uzrokovanog izlaganju vodikovom peroksidu i smanjenje otpuštanja prostaglandina, ali ne i kraće izlaganje od 48 sati, potičući tvrdnju da kratko izlaganje maslačku može djelovati kao prooksidans, dakle da maslačak potiče oksidativni stres, dok stanice ne metaboliziraju produkte i ne pokrenu zaštitne mehanizme. Menghini i suradnici (Menghini i sur., 2010) predlažu izlaganje maslačku kroz dva tjedna za dokazivanje antioksidativnog učinka. Devaraj i suradnici (Devaraj, 2016) su pokazali da etanolni ekstrakti lišća te korijena maslačka značajno smanjuju koncentracije enzima AST i ALT kao i markere jetrene toksičnosti, lipidnu peroksidaciju (oksidativni stres i oštećenja membrane) te oksidativni stres induciran izlaganjem acetaminofenu kod miševa.

Ekstrakti su pokazali da imaju svojstvo hvatanja slobodnih radikala zbog prisutnosti fenolnih sastojaka u ekstraktima (Colle i sur., 2012). Gulfraz i suradnici (Gulfraz i sur., 2014) su pokazali da etanolni i *n*-heksanski ekstrakti također smanjuju jetrene enzimske markere, superoksid dismutazu, katalazu, lipidnu peroksidaciju i glutation peroksidazu kod štakora koji su tretirani  $\text{CCl}_4$ , s time da su etanolni ekstrakti bili efikasniji nego *n*-heksanski.

Hu i Kitts (Hu i Kitts, 2004) su pokazali u *in vitro* uvjetima da ekstrakti cvijeta maslačka mogu vezati ROS spojeve i spriječiti ROS-uzrokovano oštećenje DNK. Aktivne tvari koje bi mogle spriječiti oštećenje DNK su bile luteolin and luteolin-7-*O*-glukozid. Mingarro i suradnici (Mingarro i sur., 2015) su testirajući više vrsta maslačka pokazali da među njima vrste roda *T. marginellum* su najefikasnije u reduciranju unutarstaničnih razina ROS-ova *in vitro*, a *T. obovatum* kao najefikasniji u hvatanju –vezanju slobodnih radikala.

Omur i suradnici (Ömur Doğan i sur., 2017) su pokazali da 8-dnevni tretman maslačkom u koncentracijama od, 100, 200 i 250  $\text{mg kg}^{-1}$  štakora soja Sprague Dawley uzrokuje smanjenje malondialdehid vrijednosti, GSH vrijednosti su ostale nepromijenjene, i podiže razine CAT, GPx i SOD.

Antioksidacijski učinak maslačka je dokazan u mnogim radovima. Maslačak je povećavao koncentraciju antioksidansa (glutacion i beta-karoten), koncentraciju antioksidacijskih enzima

(superoksid-dismutaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze) i značajno smanjivao lipidnu peroksidaciju u miševa (Kim i sur., 2009), isto tako i u štakora (Ömur Doğan i sur., 2017), u tretmanima i sa korijenom ali i sa lišćem maslačka (Champe i sur., 2008). Antioksidacijski učinak kod štakora su pokazali i etanolni ekstrakti (korijen maslačka, 100 mg kg<sup>-1</sup> oralno, MDA se smanjio, na 50 mg kg<sup>-1</sup>GSH isti, ali se na 100 mg kg<sup>-1</sup>isto povećao) (Sumanth i Rana, 2006), ali i vodeni ekstrakti (smanjenje GSH, lišće maslačka) (Park i sur., 2010). Vodeni ekstrakti su pokazali i veće GSH vrijednosti u krvi i tkivu testisa i sperme Sprague dawley štakora nakon tretmana s 200 mg kg<sup>-1</sup> u odnosu na tretman sa paracetamolom (Ömur Doğan i sur., 2017). Također je pokazano da osim kod paracetamola, koncentracija od 300 mg kg<sup>-1</sup> kod štakora ima zaštitni učinak od oksidativnog stresa kod duže upotrebe nesteroidnog i prtuupalnog lijeka brufena (Hassan i sur., 2015). Alkoholni ekstrakt je povećao i GSHPx vrijednosti, enzima koji ima kritičnu ulogu u smanjenju lipidnih peroksida i vodikovih peroksida (Arthur, 2000). GSHPx je bio povećan i u drugim studijama (Cho i sur., 2010). Aktivnost katalaze kao enzima koji katalizira prijelaz vodikovog peroksida u vodu i kisik (Lushchak, 2011) je bila povećana kod 50 i 100 mg kg<sup>-1</sup> tretmanom alkoholnim ekstraktom (Sumanth i Rana, 2006), te u vodenom ekstaktu (200 i 250 mg kg<sup>-1</sup>) u štakora (Cho i sur., 2003). Aktivnost superoksid dismutaze koja katalizira dismutacijsku reakciju molekule kisika, pretvarajući ga u vodikov peroskid i kisik u obrani protiv ROS-ova (He i sur., 2014; Zelko i sur., 2002) je bila povećana u jetri štakora u tratmanu alkoholnim ekstraktom od 50, 100, 200 i 250 mg kg<sup>-1</sup> (Sumanth i Rana, 2006). Jedrejek i suradnici 2017. (Jedrejek i sur., 2017) su pokazali da su latice cvijeta imaju bolji učinak od listova (koncentracija 10 mg mL<sup>-1</sup>) u plazmi, al ii da njihov zaštitni učinak nije dozno ovisan. Što se tiče mehanizma djelovanja, Hu i Kitts (Hu i Kitts, 2005) su pokazali da ekstrakti cvijeća maslačka sa totalnom koncentracijom fenola od 195 mg mL<sup>-1</sup> suprimiraju ROS-ove i hidroksi radikale koji su stvarani fentonovom reakcijom (Hassan i Yousef, 2010; Hu i Kitts, 2005), te da su ti ekstrakti potencijalni helatori tranziscijskih metala, te da se to događa i u vodenim, ali i u etil-acetatnim ekstaktima (Hu i Kitts, 2003) te da je to doprinos prvenstveno luteolia i luteolin 7-glukozida. No, oni su pokazali da u malim koncentracijama, obje frakcije imaju prooksidirajuće djelovanje kroz oksidaciju kojoj je medijator Cu<sup>2+</sup> ion. Jedrejek i suradnici 2017. (Jedrejek i sur., 2017) su po prvi puta pokazali da u ljudskom serumu iz krvi nakon tretmana ekstraktom maslačka postoji značajna redukcija plazma lipidne peroksidacije, protein karbonilacije i oksidacije tiolnih skupina u plazma proteinima.

Park i suradnici (Park i sur., 2011) su pokazali da metanolski i vodeni ekstrakti maslačka povećavaju razinu antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza u RAW 264.7 stanicama.

Menghini i suradnici (Menghini i sur., 2010) su pokazali da izlaganje vodikovom peroksidu uzrokuje otpuštanje arahidonata i posljedično povećanje razine prostaglandina. Prostaglandin je pokazao svoju važnu ulogu u proesima upale, karcinogenezi i povećeg stvaranja u tkivima tumora (Chan i sur., 1999; Mestre i sur., 1999; Ye i sur., 2002).

Tan i suradnici (Tan i sur., 2017) su pokazali da hranjenjem ribe *Trachinotus ovatus* 8 tjedana koncentracijama od 0, 0,5, 1, 2, 4 i 10 g kg<sup>-1</sup> je pokazalo povećano stvaranje SOD, CAT, T-AOC, povećalo ekspresiju mRNA razina gena CAT i GPX, smanjilo gena KEAP1 i HSP70 (*heat shock protein*), te smanjilo MDA koncentraciju. Antioksidativni učinak maslačka je već pokazan u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Dias i sur., 2014; Hu i Kitts, 2003, 2005; Meera, 2006).

Xue i suradnici (Xue i sur., 2017) su pokazali da ekstrakt lišća maslačka od 400 µg mL<sup>-1</sup> može suprimirati ROS-ove koji bi nastali od izlaganja vodikovom peroksidu u HT-29 staničnoj liniji, a ta koncentracija odgovara učinku koji napravi i izlaganje čistoj cikoričnoj kiselini od 20 µg mL<sup>-1</sup>. Oni su pokazali da i ekstrakt i ova kiselina smanjuju upalne signale NF- $\kappa$ B 65 i ciklooksigenaze-2 koje induciraju lipopolisaharidi, kao i interleukinsku sekreciju IL-1 $\beta$  i IL-18.

Nepostojanje zaštite od izlaganja peroksidom može biti objašnjeno činjenicom da korijen, cvijet i stabljika maslačka imaju veći antioksidativni učinak nego lišće maslačka, kao što su pokazali Hudec i suradnici (Hudec i sur., 2007) na etanolskim ekstraktima korijena, cvijeta i stabljike u usporedbi sa lišćem maslačka.

Mehanizam moguće zaštite maslačka može biti objašnjen ovim razlozima. Hidroksilni i peroksidni radikali uzrokuju lomove superzavijene DNK (Hu i Kitts, 2003). Glavni flavonski glikozid cvijeta maslačka je luteolin 7-glikozid koji sprječava takve lomove i liposomsku peroksidaciju koju uzrokuju peroksidni radikali, pokazujući da je primarni antioksidans u maslačku upravo ovaj spoj. Mehanizmi djelovanja i zaštite flavonoida su otprije poznati (Cai i sur., 1999; Rice-Evans i sur., 1998; van Acker i sur., 1998; Yoshie i Gilibert, 1998). Poznato je da stvaranje medijana reakcije semikinona se događa u redok reakcijama tijekom hvatanja slobodnih radikala od strane flavonoida (Steenken i Neta, 1982). Flavonoidi imaju jednovalentni 1-elektronski potencijal sa 4'-hidroksilnom grupom kao primarnom stranom za stvaranje semikinona (Bors i sur., 1995). Slična situacija je i sa liposomima i peroksidnim radikalima.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakt lišća maslačka nije pokazao zaštitni učinak nakon izlaganja humane epitelne stanične linije skvamoznog karcinoma jezika CAL27 koncentracijama vodikovog peroksida 0,25 i 0,50  $\mu\text{M}$  u trajanju od 5 minuta za koncentracije veće od 0,05x i 0,1x
2. Koncentracije više od 0,2x potiču ulazak CAL27 stanica u apoptozu
3. Ekstrakt maslačka ne utječe na vijabilnost stanica, ali ubrzava proliferaciju do koncentracije 0,2x (do apoptoze)
4. Primarna genomska oštećenja vidljiva su tek nakon tretmana s pet puta većom koncentracijom od uobičajene nakon izlaganja stanica CAL27 ekstraktima tijekom 1 sata
5. Najniže testirane koncentracije, 0,05x i 0,1x, izazivaju trajna genomska oštećenja
6. Izlaganje stanica ekstraktu maslačka uzrokuje nastanak primarnih oštećenja, lomova kromosoma-kromatida ili gubitka cijelog kromosoma, bez pojavnosti bicentrika ili umnoženih dijelova DNK
7. Ekstrakt maslačka je na tumorskoj staničnoj liniji pokazao genotoksični učinak u svim istraživanim koncentracijama

## 6. LITERATURA

Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J., Diehl, A.M. (1992) Antibodies to tumor necrosis factor alpha inhibit induction of hepatocyte and non-parenchymal cell proliferation after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* **263**, 579–585.

Akhtar, M.S., Khan, Q.M., Khaliq, T. (1985) Effects of *Portulaca oleraceae* (kulfa) and *Taraxacum officinale* (dhudhal) in normoglycaemic and alloxantreated hyperglycaemic rabbits. *J. Pak. Med. Assoc.* **35**, 207–210.

Amin Mir, M., Sawhney, S., Jassal, M. (2013) Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. *J. Pharm. Pharmacology* **2(1)**, 1–5.

Arthur, J.R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 1825–1835.

Azqueta, A., Slysikova, J., Langie, S.A.S., Gaivão, I.O.N., Collins, A. (2014) Comet assay to measure DNA repair : approach and applications. *Front. in Genet.* **5**, 1–9.

Beretta, A., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **533(2)**, 185–191.

Blanchet, K.D. (1995) *Focus on Herbs : Dandelion*. *Altern. Complement. Ther.* **1(2)**, 115–117.

Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fučić, A., Garcia Lima, O., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W.U., Odagiri, Y., Scarfo, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. (2001) Human micro nucleus project: International database comparison for results with the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Env Mol Mutagen* **37**, 31–45.

Bors, W., Michel, C., Schikora, S. (1995) Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* **19**, 45–52.



- Brozović, A. (2007) Metoda elektroforeze pojedinačne stanice u agaroznom gelu (Comet assay). U: *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, str. 216–220.
- Cai, Z., Li, X., Katsumura, Y. (1999) Interaction of hydrated electron with dietary flavonoids and phenolic acids: rate constants and transient spectra studied by pulse radiolysis. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 822–929.
- Champe, P., Harvey, R., Ferrier, D. (2007) *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Çeviri: Ulukaya E, Biyokimya*. 3. izd. Istanbul.
- Chan, G., Boyle, J.O., Yang, E.K. (1999) Cyclooxygenase-2 expression up-regulated in squamous cell carcinoma of the head. *Cancer Res.* **59**, 991–994.
- Cho, S.Y., Oh, Y.J., Park, J.Y. (2003) Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2**, 458–463.
- Choi, U., Lee, O., Yim, J., Cho, C., Rhee, Y. (2010) Hypolipidemic and antioxidant effects of dandelion (*Taraxacum officinale*) root and leaf on cholesterol-fed rabbits. *Int. J. Mol. Sci.* **11(1)**, 67–78.
- Chun, H. (2018) *Taraxacum*: Phytochemistry and health benefits. *Chinese Herb. Med.* **10**, 353-361.
- Colle, D., Arantes, L.P., Gubert, P., da Luz, S.C., Athayde, M.L., Teixeira Rocha, J.B., Soares, F.A. (2012) Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* leaf extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *J. Med. Food* **15(6)**, 549–556.
- Cuzzolin, L., Zaffani, S., Benoni, G. (2006) Safety implications regarding use of phytomedicines. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **62(1)**, 37–42.
- Čimbora Zovko, T. (2007) MTT test. U: *Metode u molekularnoj biologiji* (Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., ured.), Institut Ruđer Bošković, Zagreb, str. 98–100.

Čučković, F. (2017) Učinak ekstrakta ružmarina i maslačka na promjenu adhezije mikroflora i patogena za epitelne stanice jezika. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.

Devaraj, E. (2016) Hepatoprotective properties of Dandelion: Recent update. *J. of App. Pharmaceutical Sci.* **6(4)** 202-205.

Dias, M., Barros, L., Alves, R., Oliveira, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. (2014) Nutritional composition, antioxidant activity and phenolic compounds of wild *Taraxacum* sect. *Ruderalia*. *Food Res. Int.* **56**, 266–271.

Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol. Mutagen.* **13(1)**, 34–43.

Efferth, T., Saeed, M.E.M., Mirghani, E., Alim, A. (2017) Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **8(30)**, 50284–50304.

Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* **2(5)**, 1084-1104.

González-Castejón, M., Visioli, F., Rodríguez-Casado, A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Nutr. Rev.* **70(9)**, 534–547.

Gulfraz, M., Ahamd, D., Ahmad, M.S., Qureshi, R., Mahmood, R.T., Jabeen, N., Abbasi, K.S. (2014) Effect of leaf extracts of *Taraxacum officinale* on CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in rats, in vivo study. *Pak J. Pharm. Sci.* **27**, 825–829.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O.I. (1987) The deoxyribose method: a simple assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **165**, 215–219.

Hassan, H.A., Yousef, M.I. (2010) Ameliorating effect of chicory (*Cichorium intybus* L.) - supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2163–2169.

Hassan, H.A., El-Kholy, W.M., Galal, N.A. (2015) Comparative protective effect of moringa and dandelion extracts against hepatic disorders and oxidative stress associated with prolonged use of brufen drug in rats. *J. Hosp. Med.* **60**, 336–346.

He, J.Y., Chi, C.F., Liu, H.H. (2014) Identification and analysis of an intracellular Cu/ Zn superoxide dismutase from *Sepiella maindroni* under stress of *Vibrio harveyi* and Cd<sup>2+</sup>. *Dev. Comp. Immunol.* **47**, 1–5.

He, W., Han, H., Wang, W., Gao, B. (2011) Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. *Viol. J.* **8(1)**, 538-548.

Hfaiedh, M., Brahmi, D., Zourgui, L. (2014) Hepatoprotective effect of *Taraxacum officinale* leaf extract on sodium dichromate-induced liver injury in rats. *Environ. Toxicol.* **31(3)**, 339-49.

Hirano, I., Mori, H., Kato, T., Haga, M. (1978) Safety examination of some edible plants. *J. Enviro. Pathol. Toxicol.* **1 (2)**, 71–74.

Hu, C., Kitts, D.D. (2003) Antioxidant, prooxidant, and cytotoxic activities of solvent fractionated dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **51(1)**, 301–310.

Hu, C., Kitts, D.D. (2004) Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol. Cell Biochem.* **265**, 107–113.

Hu, C., Kitts, D.D. (2005) Dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide and prevents lipid oxidation in vitro. *Phytomed.* **12**, 588–597.

Hudec, J., Burdova, M., Kobida, L., Komora, L., Macho, V., Kogan, G., Chlebo, P. (2007) Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. *J. Agric. Food Chem.* **55(14)**, 5689–5696.

Jedinica za mutagenezu – Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada. <[www.imi.hr/hr/jedinica/jedinica-za-mutagenezu/%0A](http://www.imi.hr/hr/jedinica/jedinica-za-mutagenezu/%0A)> Pristupljeno 23. rujan 2018.

- Jedrejek, D., Kontek, B., Lis, B., Stochmal, A., Olas, B. (2017) Chemico-Biological interactions evaluation of antioxidant activity of phenolic fractions from the leaves and petals of dandelion in human plasma treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Fe. **262**, 29–37.
- Kim, M.Y., Cheong, S., Kim, M.H., Son, C., Yook, H.S., Sok, D.E., Cho, J.H.K., Chun, H., Kim, M.R. (2009) Leafy vegetable mix supplementation improves lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high fat and high cholesterol diet. *J. Med. Food* **12**, 877–884.
- Koo, H.N., Hong, S.H., Song, B.K., Kim, C.H., Yoo, Y.H., Kim, H.M. (2004) *Taraxacum officinale* induces cytotoxicity through TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  secretion in Hep G2 cells. *Life Sci.* **74**, 1149–1157.
- Lans, C., Turner, N., Khan, T., Brauer, G., Boepple, W. (2007) Ethnoveterinary medicines used for ruminants. *J Ethnobiol Ethnomed* **3**, 1–22.
- Lee, S.H., Park, J.B., Park, H.J., Cho, S.M., Park, Y.J., Sin, J.I. (2005) Biological properties of different types and parts of the dandelions: comparisons of anti-oxidative, immune cell proliferative and tumor cell growth inhibitory activities. *J. Food Sci. Nutr.* **10**, 172–178.
- Lis, B., Jedrejek, D., Stochmal, A., Olas, B. (2018) Assessment of effects of phenolic fractions from leaves and petals of dandelion in selected components of hemostasis. *Food Res Int.* **107**, 605-612.
- Liu, F., Tan, X., Han, X., Li, X., Li, N., Kang, W. (2017) Cytotoxicity of *Aconitum* alkaloid and its interaction with calf thymus DNA by multi-spectroscopic techniques. *Sci Rep.* **7**, 14509.
- Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol.* **101**, 13–30.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remsey, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remsey, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 230–242.

- Martinez, M., Poirrier, P., Chamy, R., Prüfer, D., Schulze-Gronover, C., Jorquera, L., Ruiz, G. (2015) *Taraxacum officinale* and related species—An ethnopharmacological review and its potential as a commercial medicinal plant. *J. Ethnopharmacol.* **169**, 244-262.
- Meera, R.A.S. (2006) In vivo antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Taraxacum officinale* roots in rats. *Indian J. Pharmacol.* **38**, 54–55.
- Meerlo, J. V., Cloos, J. (2011) Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol Biol.* **731**, 237-245.
- Menghini, L., Genovese, S., Epifano, F., Tirillini, B., Ferrante, C., Leporini, L. (2010) Antiproliferative, protective and antioxidant effects of artichoke, dandelion, turmeric and rosemary extracts and their formulation. *Int. J. of Immunopath. and Pharmac.* **23(2)**, 601–610.
- Mestre, J.R., Chan, G., Zhang, F. (1999) Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer. *Ann NY Acad. Sci.* **889**, 62–71.
- Mingarro, D.M., Plaza, A., Galán, A., Vicente, J.A., Martínez, M.P., Acero, N. (2015) The effect of five *Taraxacum* species on in vitro and in vivo antioxidant and antiproliferative activity. *Food Funct.* **6**, 2787–2793.
- Møller, P. (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Bas. & Clin. Pharmac. & Toxicol.* **98**, 336–345.
- Møller, P. (2018) The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis* **33(1)**, 1–7.
- Natarajan, A.T.(1993) Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ Health Perspect.* **101(3)**, 225- 229.
- Neri, M., Milazzo, D., Ugolini, D., Milić, M., Campolongo, A., Pasqualetti, P., Bonassi, S. (2015) Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis* **30(1)**, 155-163.
- OECD (2014) *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, OECD Publishing, Paris. < [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test\\_9789264264762-en#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264264762-en#page1)> Pristupljeno 24. rujna 2018.

OECD (2016) Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD Publishing, Paris. <[https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test\\_9789264264861-en#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en#page1)> Pristupljeno 24. rujna 2018.

OECD (2017) Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology overview of the set of OECD genetic, <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO\(2016\)33/rev1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2016)33/rev1&doclanguage=en)> Pristupljeno 23. studenog 2018.

Ömur Doğan, A., Betül, Ö., Yildirim, A., Mehmet, F., Aksu, E.H. (2017) Can *Taraxacum officinale* ( Dandelion ) Extract be an alternative of paracetamol in inflammatory and painful cases? an evaluation with regard to biochemical and reproductive parameters. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **23(1)**, 47–54.

Ostenson, M.E., Thiele, D.L., Lipsky, P.E. (1987) Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* **138**, 4185–4191.

Park, C., Cha, Y., Youn, H.J., Cho, C.W., Song, Y.S. (2010) Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in sprague-dawley rats. *Phytother. Res.* **24**, 1347–1353.

Park, C.M., Park, J.Y., Noh, K.H., Shin, J.H., Song, Y.S. (2011) *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- $\kappa$ B modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133(2)**, 834–842.

Philips, D.H., Arlt, V.M. (2009) Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS.* **99**, 87-110.

Philomena, G. (2011) Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants -An overview. *J. App. Pharmac. Sci.* **1(6)**, 40-44.

Rácz-Kotilla, E., Rácz, G., Solomon, A. (1974) The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animals. *Planta Med.* **26(3)**, 212–217.

- Radojčić Redovniković, I., Bubalo Cvjetko, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants. *Cro. J. of Food Techn., Biotechn. and Nutrit.* **11**, 169–175.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J. (1998) Structure-antioxidant relationship of flavonoids and isoflavonoids. U: *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans C. i Packer L., ured.), Dekker, New York, str. 199–219.
- Saks, M., Upreti, S., Rajendra, S.V., Dang, R. (2017) Pharmacy & pharmaceutical Science Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. *Global J. of Pharm. & pharmaceutical. Sci.* **1(5)**,1–6.
- Salonen, A., Virjamo, V., Tammela, P., Fauch, L., Julkunen-Tiitto, R. (2017) Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. *Food Chem.* **237**, 214-224.
- Saratale, R. G., Benelli, G., Kumar, G., Kim, D. S., Saratale, G. D. (2017) Bio-fabrication of silver nanoparticles using the leaf extract of an ancient herbal medicine, dandelion (*Taraxacum officinale*), evaluation of their antioxidant, anticancer potential, and antimicrobial activity against phytopathogens. *Environ Sci. Pollut. Res.* **25(11)**, 10392-10406.
- Schutz, K., Kammerer, D.R., Carle, R., Schieber, A. (2005) Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion root and herb by high-performance liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 179–186.
- Schutz, K., Carle, R., Schieber, A. (2006) *Taraxacum* - A review on its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 313–323.
- Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **18(1)**, 45–51.
- Steenken, S., Neta, P. (1982) One-electron redox potentials of phenols. Hydroxyl and amino phenols and related compounds of biological interest. *J. Phys. Chem.* **86**, 3661–3667.
- Sumanth, M., Rana, A.C. (2006) In vivo antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Taraxacum officinale* roots in rats. *Indian J. Pharmacol.* **38**, 54–55.
- Sweeney, B., Vora, M., Ulbricht, C., Basch, E. (2005) Evidence-based systematic review of dandelion (*Taraxacum officinale*) by natural standard research collaboration. *J. Herb. Pharmacother.* **5**, 79–93.

Tan, X., Sun, Z., Zhou, C., Huang, Z., Tan, L., Huang, Q., Lin, H., Ye, C., Wang, A. (2017) Effects of dietary dandelion extract on intestinal morphology, antioxidant status, immune function and physical barrier function of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Fish Shellfish Immunol.* **73**, 197-206.

Thomas, P., Fenech, M. (2011) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol. Biol.* **682**, 217–234.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single Cell Gel/Comet Assay : guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol. Mutagen.* **35(3)**, 206–221.

Turkez, H., Arslan, M.E., Ozdemir, O. (2017) Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **13(10)**, 1089-1098

Van Acker S.A., Van den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der Vijgh W.J., Bast A. (1998) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. U: *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans C. i Packer L., ured.), Dekker, New York, str. 221–251.

Web 1: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>> Pristupljeno 28. rujna 2018.

Wigg, F.H., Leaves, D., Ivanov, I.G. (2014) Polyphenols content and antioxidant activities of *Taraxacum*. **6(4)**, 889-893.

Xue, Y., Zhang, S., Du, M., Zhu, M.J. (2017) Dandelion extract suppresses reactive oxidative species and inflammasome in intestinal epithelial cells. *J. Funct. Foods* **29**, 10–18.

Ye, F., Xui, L., Yi, J., Zhang, W., Zhang, D.Y. (2002) Anticancer activity of *Scutellaria baicalensis* and its potential mechanism. *J Altern. Complem .Med.* **8**, 567–572.

Yoshie, O.H., Gilibert, A.S. (1998) Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrite and nitroxyl anion. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 1057–1065.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and ECSOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 337–349.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, TENA KRIZMANIĆ, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Potpis studenta