

Utjecaj vodenog ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) na genomsku stabilnost, vijabilnost i proliferaciju tumorskih stanica epitela jezika

Ledenko, Ivana

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:159:631964>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 1.ožujka 2019.

Ivana Ledenko, 923/PI

**UTJECAJ VODENOG
EKSTRAKTA RUŽMARINA
(*Rosmarinus officinalis* L.) NA
GENOMSKU STABILNOST,
VIJABILNOST I PROLIFERACIJU
TUMORSKIH STANICA EPITELA
JEZIKA**

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 mentorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo na stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada te dr.sc. Mirti Milić, v.znan.sur. na nesebičnoj pomoći, savjetima i strpljenju prilikom izrade rada. Veliko hvala dr.sc. Maji Peraici i dr.sc. Dubravki Rašić na pomoći bez koje sve ovo ne bi bilo moguće.

Neopisivo hvala mojoj obitelji, posebno mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi i potpori.

I za kraj, hvala mojim prijateljima na nezaboravnim iskustvima tijekom studiranja.

Alcuni amici non saranno mai distanti, come le stelle, non puoi vederle sempre ma sai che sono lì! Grazie Lu & Lu per tutto!

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

UTJECAJ VODENOG EKSTRAKTA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) NA GENOMSKU STABILNOST, VIJABILNOST I PROLIFERACIJU TUMORSKIH STANICA EPITELA JEZIKA

Ivana Ledenko, 923/PI

Sažetak: Ružmarin se istražuje zbog antibakterijskih, antioksidativnih, antiupalnih te antitumorskih svojstava. Cilj ovog istraživanja bio je testirati utjecaj različitih netoksičnih koncentracija vodenog ekstrakta listova ružmarina (0,05x, 0,1x, 0,2x, 0,5x, 1x, 2,5x i 5x) na vijabilnost, primarna i trajna genomska oštećenja humane stanične kulture skvamoznog epitela jezika CAL27 te istražiti postojanje zaštitnog učinka prilikom izlaganja tretiranih stanica oksidativnom stresu. Primarna oštećenja analizirana su alkalnim komet testom nakon 1-satnog tretmana stanica, a zaštitni učinak ispitan je nakon što su oksidacijska oštećenja genoma izazvana 5-minutnim izlaganjem 0,25 i 0,50 μM vodikovom peroksidu. Nakon 4-satnog izlaganja ekstraktu ružmarina različitih koncentracija, nastala trajna oštećenja te utjecaj na proliferaciju analizirani su mikronukleus *cytome* testom. Ružmarin nije imao utjecaja na vijabilnost stanica, ubrzao je proliferaciju stanica te povećao frekvenciju mikronukleusa u koncentracijama do 1x. Od 0,5x i 1x naviše je uzrokovao značajna primarna oštećenja DNK, povećao apoptotični, a zatim nekrotični učinak, ali je u svim koncentracijama pokazao zaštitni učinak od oksidativnog oštećenja. Rezultati ukazuju na to da bi se dosad prihvaćena koncentracija ekstrakta lišća ružmarina u jednoj šalici čaja trebala smanjiti za pola.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 16 slika, 5 tablica, 125 literaturnih navoda

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* (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo* (mentor)
3. Dr.sc. *Mirta Milić*, viši znanstveni suradnik (član)
4. Prof.dr.sc. *Višnja Bačun-Družina* (zamjena)

Datum obrane: 1. ožujka 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

THE INFLUENCE OF WATER EXTRACT OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) ON GENOMICAL STABILITY, VIABILITY AND PROLIFERATION OF THE CELL CULTURE OF THE TONGUE EPITHELIUM

Ivana Ledenko, 923/PI

Abstract: Rosemary is investigated due to its antibacterial, antioxidative, anti-inflammatory and anti-tumor properties. The aim of this study was to test the influence of different non-toxic concentrations of the tea extract extracted from rosemary leaves (0,05x, 0,1x, 0,2x, 0,5x, 1x, 2,5x and 5x) on the viability, primary and permanent genomic damage of squamous tongue epithelium CAL27 human cell culture and to detect protective effect while exposing treated cells to oxidative stress. Primary lesions were analyzed by alkaline comet assay 1 hour after cells treatment and the protective effect was tested after 5-minute exposure to 25 and 50 μ M peroxide. After 4-hour exposure to the different concentrations of rosemary extract, permanent damage and the effect on proliferation were analyzed by micronucleus *cytome* test. Rosemary had no effect on cell viability, but accelerated cell proliferation and increased micronucleus frequency in doses up to 1x. From 0,5x and 1x upwards, it has caused significant primary DNA damage, increased apoptotic and then necrotic effect, but showed at all concentrations the protective effect of oxidative damage. The results suggest that the concentrations of rosemary leaves used in a single cup of tea should be reduced by half.

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

Thesis contains: 60 pages, 16 figures, 5 tables, 125 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD, *Ksenija Durgo*, Full professor

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

MSc Ana Huđek, Assistant,

MSc Arijana Martinić, Assistant

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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
4. PhD. *Višnja Bačun-Družina*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 1 March, 2019

Sadržaj	Stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1 RUŽMARIN (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	3
2.1.1. Opće karakteristike ružmarina	3
2.1.2. Kemijski sastav i biološki aktivne komponente ružmarina	5
2.2. PROCJENA GENOMSKE STABILNOSTI TESTOVIMA GENOTOKSIČNOSTI I MUTAGENOSTI	8
2.2.1. Alkalni komet test – primarna oštećenja DNK.....	10
2.2.2. Mikronukleus <i>cytome</i> test – trajna oštećenja DNK.....	12
2.2.3. MTT test – vijabilnost.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Biološki testni sustav-stanična linija CAL27	16
3.1.2. Opis pripreme stanica CAL 27 za eksperimente.....	17
3.1.3. Priprema ekstrakta lišća ružmarina	18
3.1.4. Kemikalije	19
3.1.5. Priprema otopina za eksperimente	20
3.1.6. Laboratorijska oprema	21
3.1.7. Posuđe i pribor	21
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Određivanje pH vrijednosti radnih koncentracija na sobnoj temperaturi i na 37°C.....	22
3.2.2. MTT test – Tretman i protokol	22
3.2.2.1. <i>Nasađivanje stanica</i>	22
3.2.2.2. <i>Tretman stanica za MTT test</i>	23
3.2.2.3. <i>Priprema mikrotitarske pločice za MTT i mjerenje apsorbancije</i>	23
3.2.3. Priprema radnih koncentracija vodenih otopina peroksida.....	24
3.3. ALKALNI KOMET TEST	24
3.3.1. <i>Nasađivanje stanica</i>	24
3.3.2. <i>Tretman stanica</i>	24
3.3.3. Priprema stakla i gelova za komet test.....	24
3.3.4. Priprema stanica za alkalni komet test sa i bez prethodnog tretmana vodikovim peroksidom.....	25

3.3.5. Tretman 0,50 μM i 0,25 μM vodikovim peroksidom	25
3.3.6. Priprema otopine za lizu	26
3.3.7. Priprema otopine za denaturaciju, denaturacija i elektroforeza stakalaca	26
3.3.8. Neutralizacija	26
3.3.9. Bojanje i analiziranje gelova	26
3.4. MIKRONUKLEUS TEST	27
3.4.1. Nasađivanje stanica	27
3.4.2. Tretman stanica	27
3.4.3. Izrada preparata	27
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. pH VRIJEDNOSTI EKSTRAKATA NA SOBNOJ TEMPERATURI I NA 37°C	29
4.2. VIJABILNOST, PROLIFERACIJA I MITOTIČKI INDEKS	30
4.3. UTJECAJ NA GENOMSKI MATERIJAL, APOPTOZA I NEKROZA	34
4.4. ZAŠTITNI UČINAK RUŽMARINA	39
4.5. MEHANIZAM DJELOVANJA	44
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Od antičkih vremena, poznato je da začinsko bilje i začini, kao i njihova eterična ulja imaju različiti stupanj antimikrobne aktivnosti. Biljni ekstrakti imaju široki spektar bioloških aktivnosti, kao što su: antibakterijska, antifungalna, antivirusna i antitumorska zbog čega su privukli značajnu pažnju među stručnjacima i potrošačima hrane radi pretpostavljene sigurnosti i potencijalne terapijske vrijednosti (Dorman i Deans, 2000). Među biljkama i začинима, od posebnog interesa je ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), terapijski značajna ljekovita biljka koja se uzgaja u mnogim dijelovima svijeta.

Ružmarin se tradicionalno koristi u mediteranskoj prehrani uglavnom kao začín, a zbog svojih antibakterijskih, protuupalnih i zaštitnih svojstava sve se više upotrebljava i kao napitak za prevenciju različitih bolesti i ublažavanja simptoma već postojećih bolesti. Prilikom pripreme čaja, postoji preporučena količina lista ružmarina koja bi trebala biti dovoljna za jednu dozu i šalicu, no same koncentracije ekstrakta ružmarina nisu bile definirane da bi se postigao željeni zaštitni učinak.

Čovjek je prvenstveno ekstraktu ružmarina izložen na početku svog gastrointestinalnog puta, u ustima, a zbog samih svojstava ružmarina, antibakterijska, antiupalna i zaštitna svojstva se uočavaju već u ustima. Bukalne stanice tj. stanice usne šupljine tvore prvu barijeru za dišni i probavni sustav te mogu metabolizirati potencijalne kancerogene na reaktivne produkte. Većina ljudskih karcinoma je epitelne prirode pa se može tvrditi da su oralne epitelne stanice poželjne ciljne lokacije za rane genotoksične učinke uzrokovane kancerogenim sredstvima koja ulaze u tijelo putem udisanja i gutanja (Kashyap i Reddy, 2012).

Zbog toga je korištenje humanih staničnih linija čije je podrijetlo iz usne šupljine pogodno za proučavanje samog učinka ekstrakta ružmarina. Humana stanična linija skvamoznog epitela jezika za tu svrhu bi bila idealna, a s obzirom da ju nije teško uzgojiti i da joj je vrijeme udvostručavanja relativno kratko, pouzdani i reproducibilni rezultati mogu se dobiti u kraćem eksperimentalnom periodu.

Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj različitih koncentracija ekstrakta lista ružmarina na vijabilnost, primarna i trajna genomska oštećenja humane stanične linije skvamoznog epitela jezika CAL27 metodama alkalnog komet testa i mikronukleus *cytome* testa te utvrditi antioksidacijsko djelovanje ekstrakta ružmarina u stanicama u kojima je izazvan oksidacijski stres nakon 5-minutnog izlaganja stanica vodikovom peroksidu u koncentracijama od 0,25

μM i $0,50 \mu\text{M}$. Za navedene je koncentracije dokazano da uzrokuju velika primarna oštećenja, koja su na granici apoptotičnog učinka.

Koncentracije ekstrakta lista ružmarina koje će se koristiti u eksperimentu odgovaraju koncentracijama koje se koriste u napicima pripremljenim od listova navedene biljke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 RUŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

2.1.1. Opće karakteristike ružmarina

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L., obitelj *Lamiaceae*) (Slika 1.) je vazdazeleno razgranata biljka koja prirodno raste duž obala Mediterana, sa sjedećim, nasuprotnim, čvrstim, kožastim i vrlo uskim listovima (2-3 cm) svinutima prema dolje koji su s gornje strane tamnozeleni goli i sjajni, a s donje strane sivo bijeli i dlakavi (Al-Sereiti i sur., 1999). Sama biljka najčešće ima grmolik oblik iako može biti i puzeća, te imati cvjetove različitih boja-svijetloplave, intenzivno plave, ljubičaste, ružičaste te bijele. Ružmarin cvate od ožujka do svibnja, a vrlo često cvate ponovno u rujnu. Iako postoji više vrsta ružmarina, većina ih pripada vrsti *Rosmarinus officinalis*. Zbog svoje raznovrsne primjene, ova biljka se uzgaja od doba Egipćana (nađena u grobnicama), Rimljani su je nazivali i morska rosa, te su je kao svetu biljku koja tjera zle duhove posvetili božici ljepote i ljubavi – Afroditi. U današnje vrijeme može se iskoristiti cijela biljka, cvijet i list ružmarina (svježi ili sušeni) te eterično ulje koje se može naći u listu, cvijetu ili u stabljici (Napoli i sur., 2010).

Zbog svog ugodnog i intenzivnog mirisa te pikantno ljutog, oporog i gorkog okusa, najčešću primjenu od pamtivijeka ružmarin ima kao neizostavan začim mediteranske kuhinje. Eterično ulje ružmarina upotrebljava se u kozmetičkoj industriji u proizvodnji kolonjskih voda, parfema, sapuna, kupki i šampona za kosu (Al-Sereiti i sur., 1999). Zbog svoje inherentne visoke antioksidacijske aktivnosti, ekstrakt lišća često se koristi u prehrambenoj industriji kao konzervans odnosno antioksidans (Angioni i sur., 2004; Santoyo i sur., 2005). Europska unija je odobrila ekstrakt ružmarina (E392) kao siguran i učinkovit prirodni antioksidans za očuvanje hrane (EFSA, 2015). Ekstrakt lista ružmarina koristi se za opuštanje mišića, poboljšanje rada i čišćenja žučnog mjehura i jetre, te u ublažavanju ili sprječavanju pojave simptoma kašlja te astme (Khan i Mukhtar, 2013).



Slika 1. Prikaz prirodnog izgleda grančice ružmarina (lat.*Rosmarinus officinalis* s listovima u cvjetnoj fazi (Anonymus., 1)

Osim u prehrambene i kozmetičke svrhe, ružmarin se često koristi i u terapijske i preventivne svrhe protiv mnogih bolesti zbog dokazanih bioloških svojstava kao što su: hepatoprotektivna (Rašković i sur., 2014), antimikrobna (Bozin i sur., 2007), antitrombotička (Yamamoto i sur., 2005), diuretička (Haloui i sur., 2000), antidijabetička (Bakirel i sur., 2008), protuupalna (Juhás i sur., 2009), antioksidativna (Haloui i sur., 2000; Wang i sur., 2008) i antikancerogena (Cheng i sur., 2011; Huang i sur., 1994; Offord i sur., 1997; Salih i sur., 2015). Posljednjih godina, u pojedinim radovima je dokazan antiproliferativan učinak ekstrakta ružmarina i njegovih izoliranih komponenti na rast stanica raka dojke, jetre, kože, prostate, pluća, intestinalnog trakta (Bakirel i sur., 2008; Cattaneo i sur., 2015; Petiwala i Johnson, 2015; Valdés i sur., 2013; Yesil-Celiktas i sur., 2010). Ljekoviti pripravci ružmarina mogu se koristiti kao napitak, tinktura, tonik, ulje, vino, mast, kupelj, prašak ili krema.

2.1.2. Kemijski sastav i biološki aktivne komponente ružmarina

U Tablici 1. prikazane su bioaktivne komponente ružmarina.

Tablica 1. Bioaktivni sastav ružmarina

POLIFENOLNI SPOJEVI			AROMATSKI SPOJEVI
TERPENOIDI	FENOLNE KISELINE	FLAVONOIDI	ETERIČNA ULJA
Karnozol	Ružmarinska	Homoplantagin	1,8-cineol
Karnozinska kiselina	Kafeinska	Genkvanin	£-terpineol
Rozmanol	Klorogenična	Hesperidin	Kamfen
Epirozmanol	Neoklorogenična	Cirsimaritin	Borneol
Izorozmanol	Labiatska	Galokatehin	£-pinen
		Derivati luteolina	
		Nepterin	

Biljke proizvode veliku, raznoliku paletu organskih spojeva koji nemaju izravnu funkciju u rastu i razvoju biljaka. Te tvari poznate su pod nazivom sekundarni metaboliti te imaju različite funkcije u biljci. Uključeni su u obranu biljaka kroz citotoksičnost prema mikrobiološkim patogenima, a mogu se pokazati korisnima i kao antimikrobni lijekovi u ljudskoj i veterinarskoj medicini (Briskin, 2000).

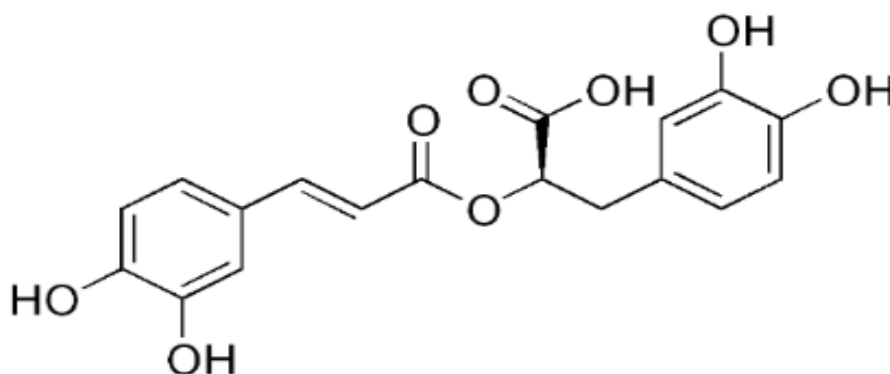
Jedno od najistraženijih svojstava ekstrakta ružmarina je njegov antioksidacijski kapacitet koji je povezan s prisutnošću antioksidativnih fenolnih tvari - terpenoida, fenolnih kiselina, flavonoida te eteričnih ulja. Antioksidacijska svojstva se manifestiraju kroz svojstvo keliranja sa željezom, uklanjanja slobodnih radikala i inhibicije lipidne peroksidacije (Petiwala i sur., 2013). Postoje mnoga izvješća o antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata ružmarina i njegovih spojeva koja je određena raznim metodama u različitim lipidnim i vodenim sustavima. U lipidnim sustavima, ekstrakti s višim sadržajem fenolnih diterpena su učinkovitiji dok u vodenim sustavima ružmarinska kiselina pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost (Bourgaud i sur., 2001).

Pojam fenolnih spojeva obuhvaća širok raspon biljnih spojeva koje zajednički imaju aromatski prsten koji nosi jedan ili više hidroksilni supstituent. Većina fenolnih tvari je topljiva u vodi, neki su topljivi samo u organskim otapalima, a nekolicina spojeva nije topljiva niti u vodi niti u organskim otapalima (Harborne, 1984).

Fenolni metaboliti štite biljke od biološkog i okolišnog stresa te su stoga sintetizirani kao odgovor na patogeni napad, poput gljivične ili bakterijske infekcije ili kao rezultat visoke izloženosti zračenju (Briskin, 2000).

List ružmarina sadrži 2-3% fenolnih kiselina kao što su kafeinska, klorogenična, neoklorogenična, labiatska i ružmarinska kiselina.

Ružmarinska kiselina (Slika 2.) difenolni je spoj tj. ester kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenilne mliječne kiseline. Obično se nalazi u vrstama obitelji *Lamiaceae*. Mnogo je radova posvećeno ružmarinskoj kiselini upravo zbog njenih antioksidacijskih svojstava, pa se u novije vrijeme piše o njevoj ulozi u sprječavanju lipidne peroksidacije (Fadel i sur., 2011), o povezanosti njene koncentracije i antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti u ružmarinu te o njenim antitumorskim svojstvima (Jordán i sur., 2012).



Slika 2. Prikaz kemijske strukture ružmarinske kiseline (Almela i sur., 2006)

Terpenoidi ili terpeni prepoznati su zbog svojih različitih učinaka na zdravlje, posebice u sprječavanju i liječenju različitih vrsta raka. Trenutno se najviše pažnje pridaje fenolnim diterpenima kao što su karnozol, karnozinska kiselina, rosmanol, epirosmanol i izorosmanol. Karnozinska kiselina i karnozol pridonose antioksidativnoj aktivnosti ružmarina više od 90%, za koje se navodi da ima široka antikancerogena svojstva u nekoliko modela stanične linije, uključujući staničnu liniju karcinoma prostate, dojke, leukemiju i druge (Proestos i Komaitis, 2008; Yesil-Celiktas i sur., 2010). Također, dokazano je da ovi spojevi sudjeluju u inhibiciji

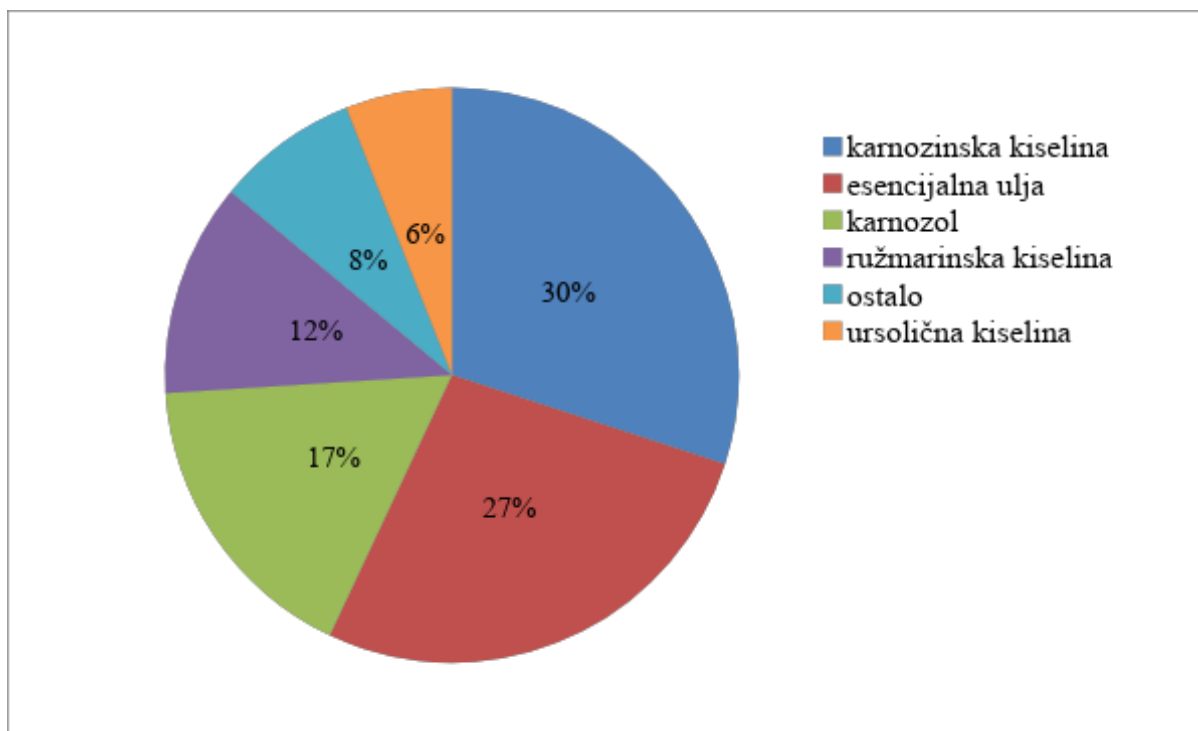
rasta tumorskih stanica te induciraju apoptozu u određenim tipovima tumorskih stanica (Petiwala i Johnson, 2015).

Flavonoidi u ružmarinu uključuju homoplantagin, genkvanin, hesperidin, cirsimaritin, galokatehin, derivate luteolina te nepetrin. Uloga ove skupine polifenolnih spojeva je da djeluju kao antioksidansi, fotoreceptori te učinkoviti antimikrobni lijekovi (Pietta, 2000).

Aromatski spojevi ružmarina tj. njegova eterična ulja također pripadaju grupi sekundarnih metabolita. Najznačajniji spojevi ove skupine su 1, 8-cineol, β -terpineol, kamfen, borneol te β -pinen. Osim svojih mirisnih svojstava, ova grupa spojeva se također odlikuje svojim antioksidacijskim i antimikrobnim svojstvima (Bozin i sur., 2007).

Bioaktivni spojevi kao što su flavonoidi, fenolni diterpeni i triterpeni iz biljnih izvora tradicionalno su ekstrahirani uobičajenom ekstrakcijom kruto-tekuće (SLE). Ipak, ova tehnika ekstrakcije ima nekoliko nedostataka, uglavnom zbog toga što taj proces zahtijeva mnogo vremena te veliku potrošnju otapala. Iz tog razloga, posljednjih godina se uvode nove obećavajuće metode ekstrakcije kojima se omogućuje brži postupak i smanjena potrošnja otapala (Bourgauđ i sur., 2001). U tom smislu mikrovalno zračenje (MAE) predstavlja alternativu konvencionalnom SLE, a istodobno poboljšava brzinu i učinkovitost procesa ekstrakcije i smanjuje potrošnju otapala (Taamalli i sur., 2012). MAE se uspješno koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva iz različitih biljnih materijala, a u slučaju ružmarinskih fenolnih spojeva, mikrovalovi se također koriste za dobivanje eteričnog ulja u destilaciji parom (Proestos i Komaitis, 2008).

Slika 3. prikazuje udio najbitnijih bioaktivnih sastojaka u ružmarinu.



Slika 3. Prikaz udjela (u postocima) najbitnijih bioaktivnih sastojaka u ružmarinu

2.2. PROCJENA GENOMSKE STABILNOSTI TESTOVIMA GENOTOKSIČNOSTI I MUTAGENOSTI

Genotoksičnost je pojam u genetici definiran kao destruktivno djelovanje na genetički materijal stanice izravno ili neizravno (DNK, RNK, topoizomeraze, utjecaj na diobeno vreteno, enzime DNK popravka) koji utječu na njezin integritet. Tvar koja ima svojstvo genotoksičnosti poznata je kao genotoksin (Shah, 2012).

Svrha testiranja genotoksičnosti je identificirati tvari koje mogu uzrokovati genetičke promjene u somatskim i / ili zametnim stanicama i koristiti te informacije u različitim regulatornim odlukama. U usporedbi s većinom drugih vrsta toksičnosti, genetičke promjene mogu rezultirati učincima koji se javljaju nakon dugog razdoblja od izlaganja. Nadalje, krajnja točka bolesti može biti uzrokovana oštećenjem DNK koja se pojavljuje u jednoj ili više stanica (u tkivu ili organu) pri niskim izlaganjima različitim fizikalnim ili kemijskim agensima. Umjesto uništavanja te stanice programiranom staničnom smrću (apoptozom) ili staničnim starenjem (nekrozom), genetička promjena može rezultirati promijenjenim fenotipom koja svojim opstankom može utjecati na disfunkcionalnost ostalih okolnih stanica unutar tkiva ili organa (OECD, 2015).

Genetičke promjene u somatskim stanicama mogu uzrokovati nastanak tumora ako se pojave u genima kao što su: protoonkogeni, geni za suzbijanje tumora i / ili geni odgovorni za popravak oštećene DNK; alternativno, oni mogu biti odgovorni za niz drugih genetičkih bolesti (bez pojave karcinoma) (Erickson, 2010). Akumulacija oštećenja DNK u somatskim stanicama također je povezana s degenerativnim uvjetima kao što su ubrzano starenje, imunološka disfunkcija, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Cortopassi i sur., 1992; Slatter i Gennery, 2018).

U zametnim stanicama, oštećenje DNK povezano je s spontanim pobačajima, neplodnošću ili nasljednim oštećenjem u potomstvu i / ili naknadnim generacijama, što rezultira genetičkim oboljenjima.

Dvije vrste istraživanja genetičke toksikologije smatraju se važnima: 1) one koje mjere izravnu, nepovratnu štetu DNK koja je prenosiva na sljedeću generaciju stanica (mutagenost); i 2) one koji mjere rane (potencijalno reverzibilne) učinke na DNK ili na mehanizme koji su uključeni u očuvanje cjelovitosti genoma (genotoksičnost) (Brusick, 1980).

Mutagenost je sastavni dio genotoksičnosti. Mutagenost rezultira događajima koji mijenjaju DNK i / ili kromosomsku strukturu i koji se prenose na sljedeće generacije (trajne promjene). Tako mutacije uključuju sljedeće: promjene u pojedinačnim parovima baza, djelomičnim, jednostrukim ili višestrukim genima ili kromosomima; prekide u kromosomima koji rezultiraju stabilnim (prenosivim) delecijama, dupliciranjem ili preuređivanjem segmenata kromosoma; promjena (dobitak ili gubitak) u broju kromosoma (tj. aneuploidija) što rezultira nastankom stanica koje nemaju točan višekratnik haploidnog broja; mitotičku rekombinaciju (Vanparys i sur., 1996).

Genotoksičnost je širi pojam nego mutagenost. Uključuje i mutagenost, a i oštećenja DNK, koja mogu ili ne moraju rezultirati stalnim promjenama u strukturi ili sadržaju informacija u stanici ili njenom potomstvu. Stoga, testovi za genotoksičnost također uključuju one testove koji procjenjuju induciranu štetu na DNK (ali ne izravni dokaz mutacije) putem učinaka kao što su neplanirana sinteza DNK (engl. *Unscheduled DNA Synthesis*-UDS), prekid jednog ili oba DNK lanca i stvaranje DNK adukata.

Istraživanje utjecaja ružmarina na stanice može se ispitati na više razina. Prva je sama vijabilnost, a zatim i mogući utjecaj na stabilnost genoma stanica. U propisanim odrednicama OECD (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) objašnjene su metode koje se mogu koristiti za procjenu nastajanja primarnih tj. popravljivih oštećenja a

zatim i trajnijih oštećenja kao što su komet test (prvi slučaj) i mikronukleus test (trajna oštećenja). Osim komet testa i mikronukleus testa, najčešće korišteni testovi genotoksičnosti u *in vitro* uvjetima su analiza strukturnih aberacija te izmjena sestrinskih kromatida (SCE).

2.2.1. Alkalni komet test – primarna oštećenja DNK

Alkalni komet test ili gel elektroforeza pojedinačnih stanica (*engl. single cell gel electrophoresis assay* - SCGE) je tehnika kojom se analiziraju primarna oštećenja u DNK molekulima. Ovom se tehnikom detektira nastajanje jednolančanih i dvolančanih lomova DNK, alkalna labilna mjesta koja mogu prijeći u lomove te mjesta na kojima je odgođen popravak DNK. Uz navedeno, ovim testom se može pratiti popravak DNK, te se mogu identificirati stanice u stanju apoptoze odnosno stanične smrti.

Tehnika je dobila naziv prema obliku kometa kojeg poprima oštećena fluorescirajuća DNK uronjena u elektroforezni agarozni gel. Činilo se da je ta izvorna neutralna metoda bila osjetljiva za mjerenje promjena u superzavijenoj DNK nastaloj iz jednolančanih lomova, ali uvjeti za lizu (pri neutralnom pH) su bili nedjelotvorni u uklanjanju svih proteina, pa su 1988. godine Singh i suradnici prilagodili ovaj postupak alkalnim uvjetima (liza pH 10, denaturacija i elektroforeza u alkalnim uvjetima pH>13) kako bi omogućili detekciju dvostrukih lomova, ali i jednolančanih lomova (Singh i sur., 1988).

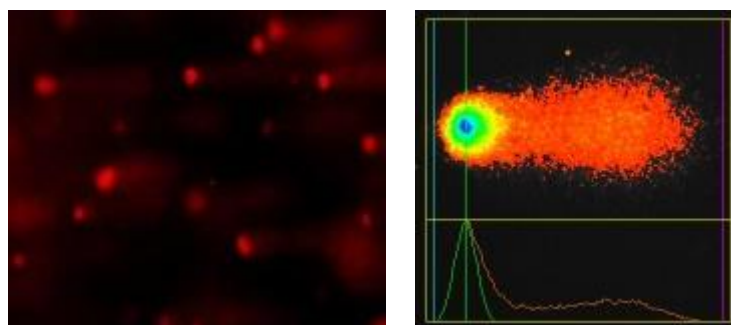
Danas, sustavi za analizu slike mogu mjeriti denzitometrijske i geometrijske parametre. Komet test je u stanju detektirati oštećenje DNK inducirano alkilirajućim sredstvima, interkalirajućim sredstvima i oksidativnim oštećenjima. Unatoč činjenici da ova tehnika zahtijeva izolirane stanice istog tipa, u posljednjih je godina sve veći interes za ovaj test, uglavnom zbog glavnih prednosti, osjetljivosti metode i brzine (Collins i sur., 1997), ali i jednostavnosti (Neri i sur., 2015).

Komet test se teoretski može primijeniti na svaki tip eukariotske stanice (Tice i sur., 2000) uključujući i biljne stanice. To su pokazali Cerda i suradnici detektiranjem DNK fragmenata u ozračenju hrani, uključujući povrće (Cerda i sur., 1997). Sama metoda (Slika 4.) započinje pripremom stanične suspenzije koja se zatim miješa sa agarozom i zajedno se nanose na mikroskopska stakalca otprije prevučena agaroznim slojem. Stakalca sa staničnom suspenzijom u agaroznom geliranom sloju izlažu se otopini za liziranje staničnih membrana pri čemu se oslobađa DNK. Zatim se izlažu denaturacijskoj otopini kako bi se dobila relaksirana DNK bez histona, topoizomeraza te oslobođenih fragmenata oštećene DNK. Metoda se nastavlja elektroforezom u alkalnim uvjetima (pH>13) gdje se fragmenti oštećenja odvajaju od jezgre stanice. Oštećeni fragmenti mogu putovati kroz gel zbog svoje nabijenosti

dok sama neoštećena DNK ne može putovati zbog veličine pora gela, te oštećena DNK nakon elektroforeze dobiva oblik kometa, po čemu je sama metoda dobila ime. Kako bi se zaustavila daljnja alkalna reakcija, nakon elektroforeze slijedi neutralizacija pomoću 0,4M Tris pufera (pH~7,5). Nakon toga slijedi bojanje koje nam omogućuje da vizualiziramo i analiziramo nastale fragmente. Neoštećena DNK zadržava svoj okruglasti oblik. DNK lomovi su prikazani na Slikama 5. i 6. Kao priznati test genotoksičnosti, komet test je dobio svoj službeni OECD (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) broj 489 kao službeni test za određivanje genotoksičnosti u procjeni izlaganja kemikalijama (OECD, 2016b).



Slika 4. Shematski prikaz protokola za Komet test



Slika 5. i 6. Slike lomova DNK pod komet testom

Korištenjem softverskih programa kao što je Comet IV (Perceptive Instruments-Instem, Velika Britanija), genetički materijal tj. "kometi" nastali djelovanjem istosmjerne struje se mogu analizirati za više parametara. Najčešće upotrebljavani parametri su: dužina repa (*engl. tail length-TL*) kometa koja se izražava u mikrometrima i mjeri od početka glave pa do kraja kometa odnosno oštećene DNK; intenzitet DNK u repu kometa ili postotak DNK u repu kometa koji se izračunava u postocima (*engl. tail DNA*) te repni moment koji je kombinacija ova dva prethodna parametra i čini njihov umnožak (*engl. tail moment-TM*) ($TM = tail\ length \times tail\ DNA$). Među njima najviše zastupljen i prihvaćen je postotak DNK u repu kometa jer kometi stanica u apoptozi imaju male glave dok im je većina DNK raspršena u obliku repa (Choucroun i sur., 2001).

2.2.2. Mikronukleus *cytome* test – trajna oštećenja DNK

Mikronukleus test spada u kategoriju testova genotoksičnosti za detekciju mikronukleusa u citoplazmi stanica tijekom interfaze stanične diobe. Mikronukleusom se smatraju samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od jezgre. Mogu potjecati iz acentričnih fragmenata kromosoma (tj. bez centromera) ili cijelih kromosoma koji ne mogu migrirati na polove stanice tijekom anafaze stanične diobe. Stoga ova metoda omogućuje opsežnu osnovu za ispitivanje potencijala oštećenja kromosoma *in vitro* jer se njome mogu detektirati klastogeni i aneugeni učinci u stanicama koje su podvrgnute diobi tijekom ili nakon izlaganja kemijskoj tvari (Luzhna i sur., 2013). Pošto se učinak analizira nakon prve diobe od izlaganja kemikaliji, koristi se i kemikalija citohalazin B koja zaustavlja citokinezu i omogućava da se nepodijeljeni genetički materijal između dvije stanice kćeri detektira u zajedničkoj citoplazmi. Oštećenja se najčešće gledaju u takvim binuklearnim stanicama, a vrijeme zaustavljanja staničnog ciklusa ovisi o vrsti stanice u staničnoj kulturi i njenom ciklusu dijeljenja.

Fragmenti kromosoma bez centromera, koji mogu nastati iz lomova kromosoma, nalaze se izvan jezgara stanica kćeri budući da ti fragmenti nemaju mjesto vezivanja za mikrotubule. Nakon završetka staničnog ciklusa, ekstranuklearni DNK fragment se dekondezira i tvori takozvani mikronukleus. Broj mikronukleusa na 1000 pregledanih binuklearnih interfaznih stanica je mjera za inducirano genotoksično oštećenje (Vanparys i sur., 1996), iako je za *cytome* test prema Fenech i suradnicima i Bonassi i suradnicima (Bonassi i sur., 2006; Fenech, 2007) potrebno izbrojati 2000 binuklearnih stanica te izraziti potom frekvenciju na 1000 binuklearnih stanica.

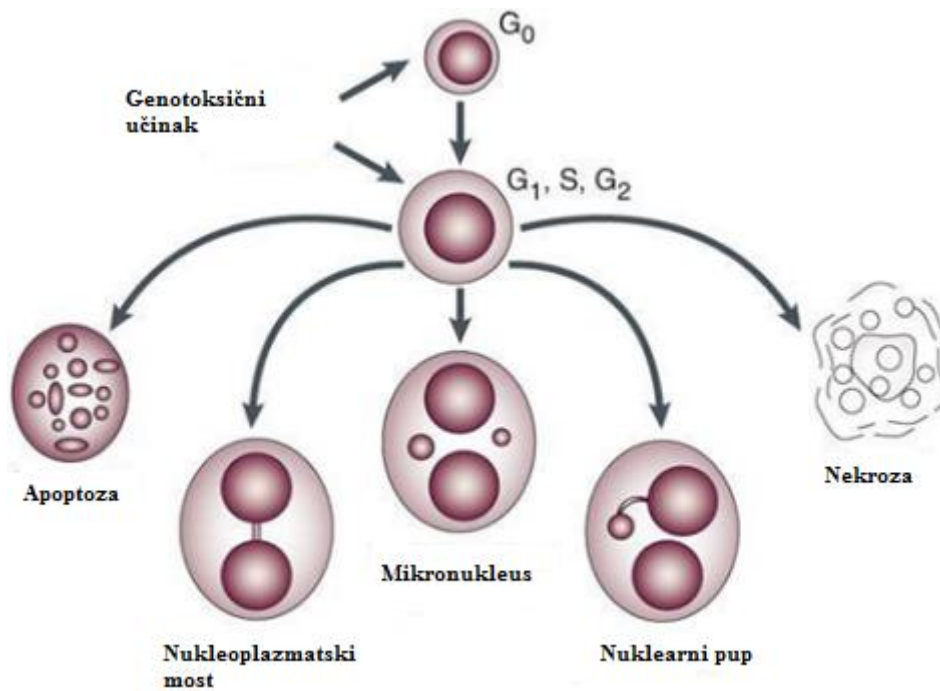
Test mikronukleusa sa blokiranjem citokineze je sveobuhvatni sustav za mjerenje oštećenja DNK, inhibicije rasta stanice i citotoksičnosti. Oštećenja DNK boduju se specifično u

binuklearnim stanicama (nastalima nakon prve diobe od izlaganja kemikaliji čija je citokineza zaustavljena citohalazinom B) i uključuju mikronukleus (biomarker lomova kromosoma i / ili gubitak cijelog kromosoma), nastanak nukleoplazmatskih mostova (pokazatelj postojanja bicentričnih kromosoma između stanica kćeri), nuklearnih pupova (čije podrijetlo također može biti kao i od mikronukleusa samo što se tvorevina još nije odvojila od jedne stanice kćeri ili može biti biomarker za uklanjanje umnoženog suvišnog DNK materijala u slučajevima kada je jedna stanica kćer dobila obje kopije gena i dodatni dupli genetički materijal). Citostatički učinci određuju se udjelom mono-, bi- i multinuklearnih stanica i citotoksičnosti putem omjera pojavnosti nekrotičkih i / ili apoptotičkih stanica izbrojanih u 1000 stanica.

Pojam "*cytome*" podrazumijeva da je svaka stanica u istraživanom sustavu citološki ocijenjena s obzirom na vijabilnost (nekroza, apoptoza), mitotički status (mononuklearna, binuklearna, multinuklearna) i stupanj kromosomskog oštećenja odnosno status nestabilnosti (prisutnost mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova, nuklearnih pupova) (Slika 7.) (Thomas i Fenech, 2011).

Test se uspješno primjenjuje za biomonitoring *in vivo* genotoksičnosti, *in vitro* testiranja genotoksičnosti i na različitim područjima istraživanja kao što su nutrigenomika i farmakogenomika.

Kao priznati test genotoksičnosti, mikronukleus test *in vitro* dobio je svoj službeni OECD (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) broj 487 kao službeni test za određivanje genotoksičnosti u procjeni izlaganja kemikalijama (OECD, 2016).



Slika 7. Shema mikronukleus *cytome* testa (Thomas i Fenech, 2011)

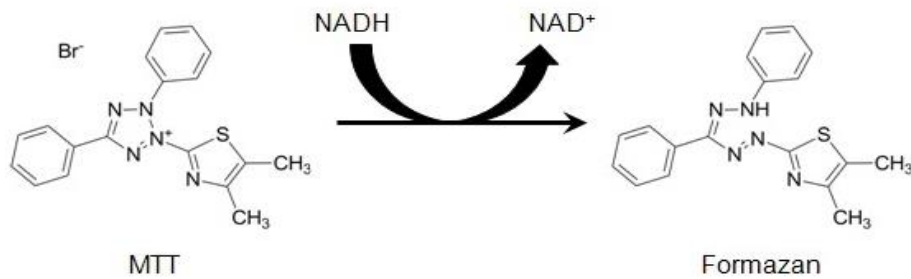
2.2.3. MTT test – vijabilnost

Testovi vijabilnosti stanica često se koriste za „screening“ spojeva kako bi se utvrdilo da li određeni spoj ima učinak na proliferaciju stanica ili izazivaju citotoksični učinak koji na kraju dovodi do smrti stanice odnosno apoptoze. Postoje različite metode koje se mogu koristiti za određivanje broja živih eukariotskih stanica.

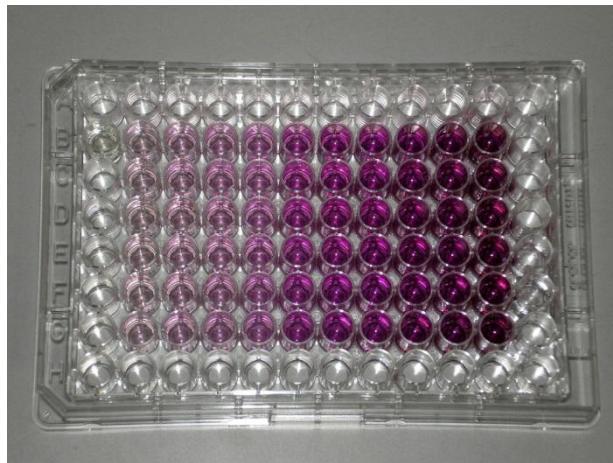
Za određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta ružmarina, u ovom je radu korišten MTT test vijabilnosti. To je kolorimetrijska metoda koja se koristi za mjerenje *in vitro* citotoksičnosti i stanične proliferacije uz korištenje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid) boje, a temelji se na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica. Uz prisustvo staničnih dehidrogenaza, u živim stanicama dolazi do reakcije redukcije, pri kojoj se tetrazolijeva sol (MTT) (Slika 8.) reducira u ljubičasto obojeni oblik kristala formazana. Kada dođe do smrti stanice, stanice ne mogu metabolizirati MTT u formazan, stoga nastanak ljubičasto obojenog formazana služi kao koristan i prikladan marker samo za žive stanice. Na Slici 9. je prikazana 96-mikrotitarska ploča gdje se jasno vidi razlika u obojenju što ukazuje na različitu metaboličku aktivnost stanica; što je ljubičasta boja izraženija, metabolička aktivnost stanica je veća dok nebojane jažice predstavljaju stanice u kojima je došlo do smrti. Formazanski produkt se akumulira kao netopljivi talog unutar stanica, kao i u blizini površine stanice i u mediju za kulturu pa se mora u potpunosti otopiti prije određivanja apsorbancije. Koriste se različite metode za otapanje formazanskog produkta a koje uključuju upotrebu zakiseljenog izopropanola,

DMSO, dimetilformamida, SDS i kombinacija deterdženta i organskog otapala (Mosmann, 1983).

Rezultati se kvantificiraju spektrofotometrijski očitavanjem apsorbancije pri 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče koji nudi velike prednosti kao što su brzina, jednostavnost, ekonomičnost i sigurnost (Wan i sur., 1994).



Slika 8. Kemijska struktura MTT-a te obojanog produkta formazana



Slika 9. Prikaz mikrotitarske pločice s obojanim produktom formazanom

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki testni sustav-stanična linija CAL27

Staničnu liniju CAL27 1982.godine (ATCC broj CRL-2095) izolirao je J. Gioanni sa suradnicima (Center Antoine Lacassagne, Nice Cedex, Francuska) iz tkiva uzetog od 56-godišnjeg bijelca, s lezijom sredine jezika, prije bilo kakve terapije. Fragment je uklonjen kirurški i kultiviran u laboratorijskim uvjetima u sterilnoj tikvici za kulturu u obliku adherentne stanične linije tj. u monosloju. Stanice ne rastu dobro u polukrutom mediju.

Stanična linija raste eksponencijalno sve do 8. dana, dok ne započne stacionarna faza rasta. Vrijeme udvostručenja mjereno je tijekom faze eksponencijalnog rasta, te iznosi 35 sati.

Kako bi se omogućilo kvalitetnije skladištenje, stanice su zamrznute u tekućem dušiku. Medij za zamrzavanje sadrži 95% kompletnog medija za rast, 5% DMSO, a temperatura pohrane je temperatura pare tekućeg dušika (-195,8°C).

Za ove epitelne, poligonalne stanice, s vrlo granuliranom citoplazmom, imunocitokemijske studije pokazuju snažno pozitivno bojenje s anti-keratin antitijelima koja su inače vrlo korisna u dijagnozi epitelnih tumora. Označena inhibicija inkorporacije timidina uočena je u prisustvu VP16 (etopozida), CCNU (1- [2-kloretil] -3-cikloheksil-1-nitrozouree), VM26 (tenipozid), ADM (adriamicin), CPA (ciklofosfamid) i MTX (metotreksat).

Stanice CAL 27 bile su otporne na liječenje VDS-om (vindesin sulfat), CDP (cisplatinom) ili ACTD (aktinomicin D).

Bazni medij za ovu staničnu liniju je prema preporuci ATCC (engl. *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, SAD) formulirani Dulbecco modificirani Eagle medij, kataloški broj 30-2002. Medij sadrži 4 mM L-glutamina, 4500 mg L⁻¹ glukoze, 1 mM natrij piruvata i 1500 mg L⁻¹ natrijevog bikarbonata. Da bi se postigli uvjeti za rast, u osnovni medij se dodaje fetalni goveđi serum do konačne koncentracije od 10%. Stanice također mogu rasti i u RPMI 1640 mediju s dodatkom glutamina (Chen i sur., 2017).

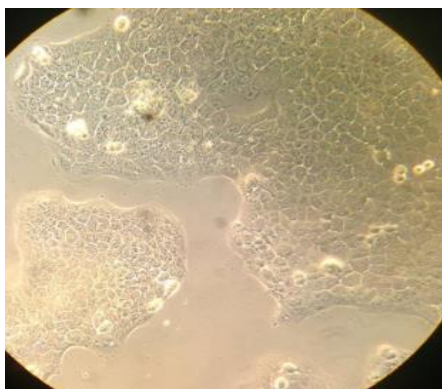
Klasifikacija biološke sigurnosti temelji se na smjernicama Ureda za javno zdravstvo u SAD-u (U.S. Public Health Service Guidelines), prema kojem ova kultura ima nivo sigurnosti 1, što bi značilo da je izrazito sigurna za manipulaciju i rad u laboratorijskim uvjetima (Gioanni i sur., 1988).

Da bi se stanice odvojile od podloge, koriste se mehanički ili kemijski postupak. Mehanički podrazumijeva struganje pri čemu se može oštetiti i sama stanica, a kemijskim postupkom, koji se koristio u ovom eksperimentu, stanice se odvajaju djelovanjem enzima tripsina.

3.1.2. Opis pripreme stanica CAL 27 za eksperimente

U ovom eksperimentu korištene su ljudske stanice karcinoma epitela jezika CAL27 (Slika 10.) koje su kupljene od ATCC-a i primarno uzgajane na Institutu Ruđer Bošković te Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Stanična kultura uzgajana je u RPMI 1640 mediju uz dodatak fetalnog telećeg seruma do konačne koncentracije od 10% u monosloju u CO₂ inkubatoru pri temperaturi od 37°C koristeći sterilnu T-bocu. Praćenjem promjene broja stanica tijekom rasta, određeno je da se stanice udvostruče tijekom 30-36 sati. Nakon što su stanice prekrile površinu velike T boce površine 75 cm², uklonjen je medij te je površina adherentnih stanica isprana s 10 mL čistog RPMI 1640 medija bez seruma radi uklanjanja ostatka seruma iz T boce koji bi blokirao djelovanje tripsina. Nakon uklanjanja i ovog medija, u T-bocu je dodano 1 mL 0,25%-tne EDTA otopine tripsina.

T-boca je vraćena u CO₂ inkubator na 37°C na 5 minuta tijekom kojih je tripsin uzrokovao odvajanje stanica od podloge pri čemu je došlo do morfološke promjene samih stanica koje su poprimile sferični oblik. Nakon provjere pod invertnim mikroskopom, stanice su nakon 10 minuta djelovanja tripsina bile zaokružene i odvojene od podloge. Nakon toga dodan je 1 mL fetalnog telećeg seruma i 5 mililitara RPMI 1640 medija te je napravljena stanična suspenzija i sadržaj T boce je prenesen u 14 mililitarsku tubu za centrifugiranje te je ona uz taru centrifugirana na 800 rpm 6 minuta. Nakon toga je uklonjen supernatant sve do 1 mL, uzeto je 20 µL preostale stanične suspenzije, po 10 µL je nanijeto na svaku stranu Burker-Turk komorice koja je bila prekrivena pokrovnicom, te su stanice izbrojane pod električnim mikroskopom na povećanju od 20x. Na taj način se odredio broj stanica u volumenu od 0,1 mm³ te se iz toga konačno izračunao broj stanica u 1 cm³ odnosno u 1 mL.



Slika 10. Prikaz humane stanične linije skvamoznog epitela jezika CAL27 pod konfokalnim mikroskopom

3.1.3. Priprema ekstrakta lišća ružmarina

10 g lista ružmarina 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-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu.

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 predstavlja sadržaj bioaktivnih tvari prisutnih u uobičajeno pripremljenim napitcima namijenjenim za konzumaciju.

Tablica 2. Prikaz razrjeđenja radnih koncentracija ekstrakta lišća ružmarina

koncentracija	Suha tvar (mg mL ⁻¹)
5x	6,925
2,5x	3,4625
1x	1,385
0,5x	0,6925
0,2x	0,277
0,1x	0,1385
0,05x	0,06925

3.1.4. Kemikalije

- Destilirana voda, Kemika, Hrvatska
- Dimetil-sulfoksid DMSO, Kemika, Hrvatska
- DPX-otopina za uklapanje preparata, Sigma Aldrich, SAD
- 0,25%-EDTA-tripsin, Imunološki zavod, Hrvatska
- Etanol 96%, Kemika, Hrvatska
- 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-mitomycin C, Sigma Aldrich, SAD
- MTT reagens, Sigma Aldrich, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Hrvatska
- 0,9% otopina natrijevog klorida, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat, 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
- Etidij bromid, Sigma Aldrich, SAD

3.1.5. Priprema otopina za eksperimente

- Otopina vodikovog peroksida

Koncentracija radnih otopina je bila 0,25 i 0,50 μM H_2O_2 te su pripravljene od ishodišne otopine 200 mM H_2O_2 razrjeđivanjem u destiliranoj H_2O .

- Otopina LMP i NMP

NMP 1% otopina je pripravljena otapanjem NMP (engl. *normal melting point*) agaroze u destiliranoj vodi zagrijavanjem do potpunog otapanja u mikrovalnoj pećnici. LMP 0,5% otopina (engl. *low melting point*) pripremi se otapanjem LMP agaroze u fosfatnom puferu PBS bez kalcija i magnezija.

- Otopina za lizu

Otopina je pripravljena od 2,5M NaCl, 100mM Na_2EDTA , 10mM Trizma baze, 1% natrij-laurilsarkozinata. pH je podešen na 10, a zatim je još u radnu otopinu na licu mjesta dodan 1% Triton X-100 te 10% DMSO.

- Otopina za denaturaciju

Otopina je pripravljena tako da sadrži 1mM Na_2EDTA i 300mM NaOH, te je imala pH 13.

- Otopina za neutralizaciju

Otopina je pripravljena tako da sadrži 0,4M Tris-HCl otopinu s pH 7,5 na sobnoj temperaturi u mraku.

- Otopina fiksativa

Otopina je pripremljena tako da se pomiješaju octena kiselina: metanol u omjeru 1:3 te se drži 4 sata u frižideru da bi bila hladna.

3.1.6. Laboratorijska oprema

- Autoklav, Sutjeska, Jugoslavija
- Automatske pipete za 10 mL, 1 mL, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L, 5 μ L, Eppendorf, Njemačka
- Burker turk komorica, Optik labor, Njemačka
- CCD kamera, kompjuter sa softverom Instem, Engleska
- CO₂ 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

3.1.7. Posuđe i pribor

- Flaskovi ili T boce od 75 i 25 cm², 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 μ L, 100 μ L, 10 μ L i 5 μ L, Eppendorf, Njemačka
- Staklene čašice za ph-metriranje, TLOS, Hrvatska

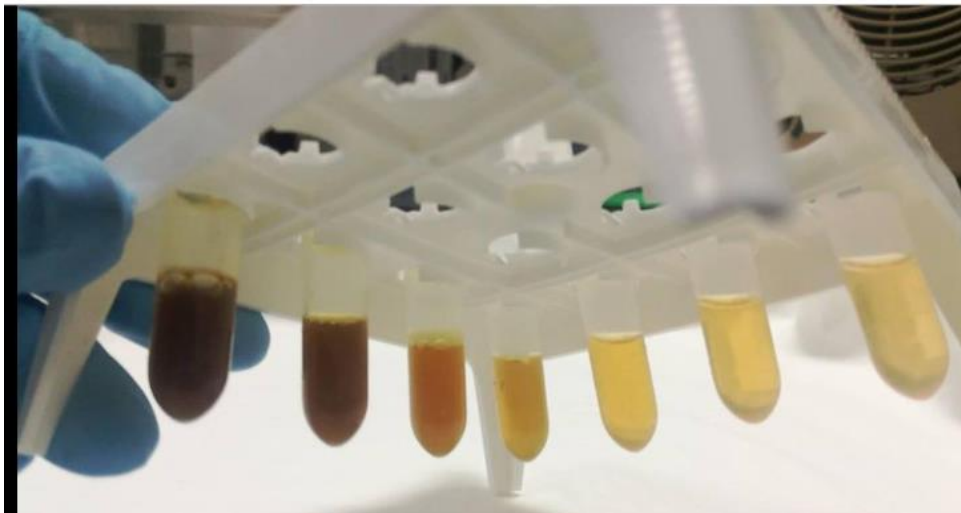
- Staklene pokrovnice Vitrognost 24x40, Biognost, Hrvatska
- 14 mL-tarske tube za centrifugiranje stanica, TPP, Njemačka
- tubice od 1,5 i 2 mL, Eppendorf, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje pH vrijednosti radnih koncentracija na sobnoj temperaturi i na 37°C

Neposredno nakon otapanja, kao i neposredno nakon tretmana stanica, provjeren je i pH svakog ekstrakta u koncentracijama od 5x do 0,05x (Slika 11.) . Ekstrakti su, kao i tretirane stanice sa ekstraktima, držani 1 h na 37°C.

Korištena su dva standarda za kalibriranje za pH 7 i pH 9,21. Nakon svakog očitavanja, pH metar je ispran destiliranom vodom i obrisao čistom staničevinom. Sva mjerenja su očitana dva puta i provjerena je temperatura očitavanja.



Slika 11. Ekstrakti u koncentracijama od 5x do 0,05x

3.2.2. MTT test – Tretman i protokol

3.2.2.1. *Nasađivanje stanica*

Od koncentrirane stanične suspenzije nakon brojanja stanica, napravljena su razrjeđenja stanične suspenzije da bi u svakoj jažici za MTT test u koju će ići 100 μ L medija (RPMI 1640 s 10% serumom) bila koncentracija od 10^5 st mL⁻¹ (stanica po mililitru). Stanice su nasađene na jednu mikrotitarsku pločicu sa 96 jažica. Za svaku mjerenu koncentraciju te kontrolni uzorak nasađeno je 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).

3.2.2.2. *Tretman stanica za MTT test*

Stanice su nakon 24 h prekrile 70% podloge, potom je medij uklonjen a stanice su isprane autoklaviranom sterilnom vodenom otopinom 1xPBS-a pH 7,4 sobne temperature (10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 2,7mM KCl, 137mM NaCl), a zatim tretirane sa 100 µL medija s ekstraktom kroz 1 h na 37°C u CO₂ inkubatoru.

3.2.2.3. *Priprema mikrotitarske pločice za MTT i mjerenje apsorbancije*

Medij je ponovno uklonjen i ispran s novim sterilnim 1xPBS-om sobne temperature. Koncentrirani MTT reagens (štok je imao koncentraciju 5mg mL⁻¹, radna koncentracija je 10 puta manja) je stavljen u novi RPMI 1640 medij sa 10%-tnim telećim serumom. U svaku jažicu sa stanicama dodano je po 10 µL MTT reagensa već pomiješanog s medijem i serumom i mikrotitarska pločica je stavljena u CO₂ inkubator na 37°C na inkubaciju od 4 sata. Nakon toga je u digestoru dodano 100 µL koncentriranog DMSO-a, te je mikrotitarska pločica inkubirana 30-35 min kako bi se otopili formirani kristali formazana i pritom držana na blagoj tresilici radi ravnomjernijeg raspoređivanja boje te nestanka potencijalnih mjehurića zraka koji mogu uzrokovati pogreške u mjerenju apsorbancije. Apsorbancija je mjerena na 570 nm, od dobivenih vrijednosti se prvo oduzimaju vrijednosti slijepe probe, te zatim izračunava relativan broj stanica u odnosu na kontrolu (u postocima). Prema Lambert-Beerovom zakonu, vrijednosti apsorbancije moraju biti unutar raspona 0,20-2,00. Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru Victor3 TM, Perkin Elmer, SAD (Slika 12.). U rezultatima su također izražene srednje vrijednosti i standardne devijacije od svih 5 mjerenja.



Slika 12. Spektrofotometar Victor3 TM, Perkin Elmer, SAD

3.2.3. Priprema radnih koncentracija vodenih otopina peroksida

U prethodnim eksperimentima (alkalni komet test, rezultati nisu prikazani) je utvrđeno da 0,25 μ M vodikov peroksid uzrokuje oštećenja stanica CAL27, no postotak genomskog oštećenja ne spada u apoptotični učinak (još je uvijek 60% DNK stanica u jezgri, rezultati nisu prikazani), dok 0,50 μ M vodikov peroksid uzrokuje oštećenje genoma stanica CAL27 s izraženim apoptotičnim učinkom. Ove dvije radne koncentracije dobivene su slijedom razrjeđenja od matične otopine i tijekom tog postupka razrjeđivanja s destiliranom vodom, sve su otopine držane na ledu, jer brzo dolazi do gubitka same oksidativne aktivnosti vodikovog peroksida. Matična otopina je bila 30%-tni vodikov peroksid odnosno 9,79M vodikov peroksid.

3.3. ALKALNI KOMET TEST

3.3.1. Nasađivanje stanica

U svaku jažicu na 24-jažičnoj mikrotitarskoj ploči je nasađeno 10^5 st mL^{-1} otopljenih u 500 μL medija i to u dvije replike.

Stanice su kontrolirane u sterilnim uvjetima pod invertnim mikroskopom do trenutka prekrivanja podloge od 70%.

3.3.2. Tretman stanica

Nakon 48 sati, stanice su prekrile više od 70% površine, medij je uklonjen, ispran 1xPBS-om na sobnoj temperaturi, te su stanice u jažicama tretirane sa ekstraktima. U svaku jažicu je stavljeno 500 μL medija s ekstraktom bez seruma te su stanice tretirane 1 h na 37°C u inkubatoru sa CO₂.

3.3.3. Priprema stakla i gelova za komet test

Vodena otopina 1% NMP (engl. *normal melting point*) agaroze pripremljena je dan prije eksperimenta. Nakon zagrijavanja u mikrovalnoj pećnici do točke vrelišta, otopina je držana u vodenoj kupelji na 37°C. Na svako staklo za komet test nanoseno je 300 μL 1% NMP agaroze, poklopljeno pokrovnicom, držano 10 minuta u na hladnom, zatim je pokrovnica uklonjena te su gelovi na stakalcima postavljeni horizontalno na grijače stakalaca na 50 °C gdje su se gelovi osušili. Ovaj sloj služi kao podloga drugom sloju gela sa stanicama a također pomaže da sloj sa stanicama ne otklizi sa stakalca tijekom postupaka liziranja, denaturacije i

elektroforeze u komet testu. Osušena stakla spremljena su u suhu kutiju za držanje mikroskopskih stakla.

Na dan eksperimenta, 0,5% LMP (engl. *low melting point*) agarozna je zagrijana u mikrovalnoj pećnici do točke vrelišta (tališta) te je ohlađena u vodenoj kupelji na 37°C. Ovaj korak je bitan jer bi veća temperatura mogla prouzročiti dodatna oštećenja tretiranih stanica.

3.3.4. Priprema stanica za alkalni komet test sa i bez prethodnog tretmana vodikovim peroksidom

Nakon što su stanice prekrile više od 70% površine podloge, u svakoj jažici uklonjen je medij, te su adherirane stanice isprane sa sterilnim 1x PBS-om sobne temperature radi uklanjanja tragova seruma prije postupka tripsinizacije. Nakon uklanjanja seruma, na adherirane stanice u svaku jažicu stavljeno je 100 μ L 0,25% EDTA-otopine tripsina. Tripsiniziranje stanica trajalo je 5-10 minuta na 37°C u CO₂ inkubatoru. Nakon što je invertnim mikroskopom utvrđeno odvajanje stanica od podloge i njihovo zaokruživanje, na tripsinizirane stanice stavljena je kap (30 μ L) fetalnog seruma radi inaktivacije djelovanja tripsina i naneseo je u svaku jažicu po 1 mL RPMI medija. Stanična suspenzija je prenesena u 2 tubice volumena 1 mL te su stanice istaložene centrifugiranjem 1 minutu na 2000 rpm min⁻¹. Supernatant je odsisan vodenom sisaljkom, a na talog u svaku tubicu je dodano 200 μ L 0,5% LMP agaroze, te je zatim po 100 μ L agarozne suspenzije stanica naneseo na stakla za komet od prije presvučena sa osušenim slojem 1% NMP. Agarozna suspenzija je pokrivena pokrovnicom 24x40 mm.

Agarozni sloj sa stanicama je držan 10 minuta iznad leda radi polimerizacije gela. Nakon toga je pokrovnica uklonjena s gelova.

3.3.5. Tretman 0,50 μ M i 0,25 μ M vodikovim peroksidom

Nakon polimerizacije, 0,5% LMP agaroznog sloja sa stanicama, na stakalca koja će biti tretirana vodikovim peroksidom nanešeno je 100 μ L otopine vodikovog peroksida. Za svako razrjeđenje i koncentraciju vodikovog peroksida tretirana su dva stakla na isti način. Radi podjednagog tretmana cijelog stakla, gel je pokriven pokrovnicom. Nakon 5 minutnog tretmana tijekom kojega su stakalca bila cijelo vrijeme držana iznad leda, pokrovnica je skinuta, a gel je temeljito i oprezno ispran destiliranom vodom. Daljnji tijek izrade pokusa za komet test je bio isti i za normalni alkalni komet test bez tretmana vodikovim peroksidom, s time da su ipak stakla tretirana s vodikovim peroksidom držana u posebnim otopinama i nisu bila miješana sa stakalcima na normalni alkalni komet test.

3.3.6. Priprema otopine za lizu

Otopina za liziranje staničnih membrana i uklanjanje histona napravljena je svježa isti dan kada je bila i izrada preparata, i držana barem 4 sata na 4°C da bi bila dovoljno hladna. Pripremljena stakalca stavljaju se u staklene vertikalne košice (engl. *Coplin Jar*) te se dodaje pufer za lizu. Liza se provodisat vremena na temperaturi od 4°C. Stakalca se nakon lize temeljito ispiru destiliranom vodom.

3.3.7. Priprema otopine za denaturaciju, denaturacija i elektroforeza stakalaca

Otopina za denaturaciju je također bila pripremljena svježa, i držana barem 4 sata na 4°C da bi bila dovoljno hladna, a destilirana voda koja je korištena je držana već od dana prije u frižideru na 4°C.

Temeljito isprana destiliranom vodom, stakalca su uronjena u hladne vertikalne košice s hladnom svježom otopinu za denaturaciju i tamo su držana 20 minuta.

Nakon toga stakalca su prenesena u horizontalnu kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazila nova, svježa hladna otopina za denaturaciju za elektroforezu. Elektroforeza je provedena pri konstantnom naponu od 21 V, u vremenu od 15 minuta bez prisustva svjetla.

3.3.8. Neutralizacija

Nakon elektroforeze, stakalca su prenesena na kadicu sa rešetkama, položena horizontalno i tretirana tri puta po 5 minuta s 0,4M Tris-HCl otopinom s pH 7,5 na sobnoj temperaturi u mraku. Poslije toga su stakalca postavljena horizontalno u vlažne komorice i držana na 4°C i pregledana isti dan.

3.3.9. Bojanje i analiziranje gelova

Svako staklo je bojano 10 minuta s 50 µL radne otopine etidij-bromida koncentracije 20µg mL⁻¹. Stakla su analizirana fluorescencijskim mikroskopom povećanja 200x spojenim crno-bijelom CCD kamerom na softverski sustav Comet Assay (Perceptive Instruments-Instem, Engleska). Na svakom staklu se izbrojalo po 100 stanica-kometa. Budući da je sve rađeno u duplikatu, ukupno po jednom razrjeđenju analizirano je 200 kometa. Parametri određeni za analiziranje bili su dužina repa kometa i postotak DNK u repu kometa. Uzete su u obzir srednje vrijednosti, medijani, minimumi i maksimumi, standardne devijacije.

3.4. MIKRONUKLEUS TEST

3.4.1. Nasađivanje stanica

Okrugla stakalca promjera 18 mm prethodno su oprana etanolom te autoklavirana i postavljena na dno sterilnih 24-jažičnih mikroploča u sterilnim uvjetima. Stanice u koncentraciji od 10^5 stanica po mililitru su dodane u volumenu od 500 μL u potpunom mediju (RPMI 1640, 10% FBS). Konfluentnost stanica je praćena invertnim mikroskopom u sterilnim uvjetima do trenutka popunjenja 50% površine jažica.

3.4.2. Tretman stanica

Nakon 48 sati stanice su prekrile više od 50% površine, medij je odsisan, adherirane stanice su bile isprane sterilnim 1x PBS-om sobne temperature, te su stanice tretirane s 500 μL ekstrakata odgovarajućih koncentracija pripremljenih u kompletnom mediju. Nakon tretmana u trajanju od 4 sata (prema uputama OECD-a minimalno trajanje tretmana za mikronukleus *in vitro* test na staničnim linijama treba biti 4 sata) na 37°C i 5% CO_2 , medij je uklonjen, stanice su isprane od ostataka ekstrakta sterilnim 1x PBS-om sobne temperature te je dodan novi topli medij sa 10% FBS-om i citohalazinom B ($3\mu\text{g mL}^{-1}$). Negativna kontrola je pripremljena na isti način, samo bez dodavanja ekstrakata u medij.

Kao pozitivna kontrola u mikronukleus *cytome* testu korišten je mitomicin C koncentracije $3,5\text{ mg mL}^{-1}$, a tretman je također trajao 4 h, u istim uvjetima. Mitomicin C je klastogen (uzrokuje oštećenja genoma, ali ne utječe na citokinezu stanica) i ne treba metaboličku aktivaciju.

3.4.3. Izrada preparata

Isti dan fiziološka otopina je stavljena na 4°C na barem 4 sata, a također je pripremljena i svježa otopina fiksativa.

Nakon tretmana s citohalazinom B koji je trajao 30 sati, stanice su dva puta isprane s 1xPBS-om zagrijanim na sobnu temperaturu te su tretirana sa 100 μL hladne fiziološke otopine. Nakon 10 minuta tretmana, fiziološka otopina je uklonjena, a na stakalca u jažicama stavljeno je 100 μL hladnog fiksira (1:3 octena kiselina: metanol). Tretman je trajao 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što je fiksir uklonjen vakuumsom sisaljkom, stakalca su sesušila na sobnoj temperaturi 2 sata. Nakon toga na stanice je nanijeto 200 μL 3% vodene otopine Giemse-boje za histološke preparate koja se jako veže za DNK a malo manje za citoplazmu. Nakon 10 minuta, stakalca su isprana destiliranom vodom. Nakon sušenja, stakalca su vađena iz bunarića iglicama i pincetom vodeći računa da je strana sa stanicama

uvijek okrenuta prema gore. Na tu stranu je nanoseno stanično lijepilo DPX (medij za ukapljanje stanica) i ta je strana okrenuta prema dolje da bi se zalijepila za predmetno staklo. Na svako predmetno staklo postavljena su po tri stakalca.

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

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

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 kao 1000 stanica.

3.5. 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 v₁+1 radi normalizacije rezultata koji svi imaju pozitivnu vrijednost zbog prirode samog testa. Korištenjem Analize Varijance ustanovilo se da li postoje razlike među samim promatranim točkama, i nakon toga se upotrijebila analiza Break down one way ANOVA test sa Posthoc Scheffe modifikacijom za usporedbu uzoraka u duplikatu, i ako nije nađena razlika onda su se uzorci uzimali zajedno kao 200 mjerenja, te je napravljena još jednom Break down one way ANOVA test sa Posthoc Scheffe modifikacijom. Posthoc testovi se koriste ukoliko se rezultati statistički značajno razlikuju jer ova vrsta testova uz postavljenu razinu značajnosti na p<0,05 uzima u obzir i broj komparacija (0,05/broj komparacija). Za mikronukleus test se koristio t-test i hi kvadrat testa. Razina značajnosti je postavljena na p<0,05. U istom programu su napravljeni i grafički prikazi rezultata sa srednjim vrijednostima (SV) i standardnim devijacijama (±2 SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ružmarin je biljka koja se uzgaja u mnogim predjelima svijeta i koja se koristi u brojnim kućanstvima, prvenstveno zbog upotrebe u kulinarstvu, ali i u različite medicinske svrhe zbog dokazanih bioloških svojstava eteričnog ružmarinskog ulja kao što su antimikrobno (Bozin i sur., 2007), antioksidacijsko (Haloui i sur., 2000), antikancerogeno (Cheng i sur., 2011; Huang i sur., 1994; Offord i sur., 1997a; Salih i sur., 2015) te antiproliferativno svojstvo (Bakirel i sur., 2008; Cattaneo i sur., 2015; Petiwala i Johnson, 2015; Valdés i sur., 2013; Yesil-Celiktas i sur., 2010). Zbog tih se svojstava koristi, osim kao začim, sve više i kao čajna mješavina. No unatoč dokazanim pozitivnim svojstvima, ružmarin je pokazao i moguća druga neželjena svojstva koja se odnose na citotoksičnost ružmarina. Pri većim koncentracijama, ružmarin može imati citotoksičan učinak na zdrave stanice, a sastav eteričnog ulja ružmarina varira o njegovom geografskom podrijetlu, o čemu i ovise njegova ljekovita svojstva (Maistro i sur., 2010).

Cilj ovog istraživanja bio je testirati utjecaj različitih koncentracija ekstrakta dobivenog od listova ružmarina na vijabilnost i primarna te trajna genomska oštećenja humane stanične kulture skvamoznog epitela jezika CAL27 te istražiti postojanje zaštitnog učinka prilikom izlaganja tretiranih stanica oksidativnom stresu. Primarna oštećenja analizirana su alkalnim komet testom nakon 1-satnog tretmana stanica netoksičnim koncentracijama ekstrakata (0,05x, 0,1x, 0,2x, 0,5x, 1x, 2,5x i 5x), a zaštitni učinak ispitan je nakon 5-minutnog izlaganja 0,25 i 0,50 μM vodikovom peroksidu. Nakon 4-satnog izlaganja ekstraktima i oporavka u trajanju od 36 sati trajna oštećenja te utjecaj na proliferaciju analizirani su mikronukleus *cytome* testom. Pošto komponente eteričnog ulja (lipofilne, hidrofobne, hidrofilne komponente) ponekad mogu vezati i komponente iz medija te promijeniti pH otopine (Frankel i sur., 1996), te tako ne/uzrokovati oštećenja, provjerene su i pH vrijednosti ekstrakata u mediju na sobnoj temperaturi i na 37°C.

4.1. pH VRIJEDNOSTI EKSTRAKATA NA SOBNOJ TEMPERATURI I NA 37°C

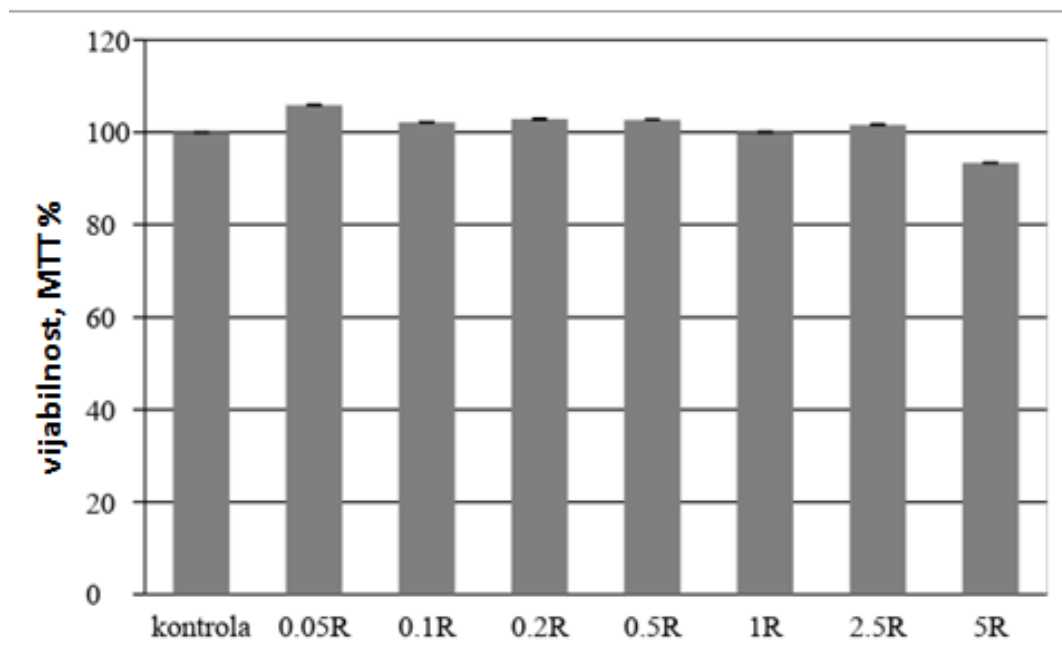
U Tablici 3. vidljivi su rezultati određivanja pH vrijednosti radnih ekstrakata. Iz rezultata je vidljivo da temperatura nije utjecala na pH vrijednost samih uzoraka i da uzorci međusobno nisu imali prevelike razlike u pH vrijednostima te da se takve promjene mogu isključiti iz daljnjeg tumačenja rezultata. Ovaj eksperiment je bio rađen na temelju iskustva drugih znanstvenika koji su pokazali da pH može znatno utjecati na aktivnost antioksidativnog učinka samog ekstrakta ružmarina, kao i medij u kojem se ekstrakt otapa.

Tablica 3. Prikaz vrijednosti pH radnih ekstrakata lišća ružmarina pri sobnoj temperaturi i pri 37 °C

Koncentracija (mg mL ⁻¹)	sobna temperatura	37 °C
0,06925	7,50	7,48
0,1385	7,52	7,48
0,277	7,52	7,47
0,6925	7,55	7,42
1,385	7,59	7,41
3,4625	7,50	7,40
6,925	7,47	7,38

4.2. VIJABILNOST, PROLIFERACIJA I MITOTIČKI INDEKS

Na Slici 13. prikazani su rezultati MTT testa (u postocima) sa standardnim devijacijama. Kao što se može vidjeti i iz slike, prevelikih razlika u vijabilnosti stanica nakon tretmana od jednog sata nije bilo, iako su u nekim koncentracijama vrijednosti bile i više od kontrolnih. Pad preživljenja od 8 posto uočen je pri izlaganju najvećoj koncentraciji ružmarina 5x. Ono što se mjeri MTT-testom je zapravo količina metaboličke aktivacije i mitohondrijske toksičnosti, te je ovim testom dokazano da stanice zbog izlaganja ružmarinu ne gube svoju metaboličku aktivaciju, po čemu zaključujemo da su i vijabilne.



Slika 13. Prikaz rezultata MTT testa nakon 1 sata tretmana s ekstraktima lišća ružmarina (R) sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom

Različite stanične linije mogu pokazivati različitu osjetljivost na izlaganje ekstraktima ružmarina. Rezultati dobiveni u ovom radu su usporedivi s rezultatima drugih autora koji su sličan učinak pokazali i na drugim vrstama stanica. Stanična linija karcinoma vrata maternice HeLa pokazala je povećanu vijabilnost tretiranih stanica u MTT testu te nepromijenjenu vijabilnost u Neutral crvenom testu (vijabilnost provjerom lizosomalne toksičnosti) u odnosu na kontrolu nakon 24-satnog tretmana u koncentracijama od 31,12–1192 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Santos i sur., 2016). Niske koncentracije ružmarina $<1,40 \text{ mg mL}^{-1}$ nisu uzrokovale citotoksične učinke na staničnoj liniji Vero (normalne epitelne stanice bubrega majmuna), staničnoj liniji ljudskih epitelnih stanica karcinoma jajnika A2780 (Kingston, 2009) niti na staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2 (koncentracije ispod koncentracije od 500 mg mL^{-1}) (Haza i Morales, 2013; Haza i sur., 2010). U neutralnom crvenom testu, u CHO staničnoj liniji, IC_{50} je iznosio 167 g mL^{-1} , a niže koncentracije (5–50 g mL^{-1}) nisu pokazale citotoksični učinak (Taner i sur., 2016). Čučković (Čučković, 2017) je nakon jedno- i dvo-satnog tretmana stanične linije humanih epitelnih stanica CALB1 ustanovila da 0,5x smanjuje postotak preživljenja za 50%. Usporedba dviju staničnih linija adenokarcinoma pokazala je razlike u osjetljivosti. Na staničnoj liniji AGS došlo je do smanjenja vijabilnosti u MTT i Neutral crvenom testu pri koncentracijama 4,1, 1,8 i 1,3 mg mL^{-1} (IC_{50}) poslije 24, 48 i 72 sata izlaganja, a na drugoj staničnoj liniji KYSE30 došlo je do sličnog učinka tek nakon izlaganja

puno većim koncentracijama od 600, 180 i 150 mg mL⁻¹ za MTT test i 860, 270 i 200 mg mL⁻¹ za Neutral crveni test (Karimi i sur., 2017).

Naravno, na ovakve rezultate osim stanične linije utječe i količina aktivnih tvari u ružmarinu, s obzirom da svaka biljka nema isti sastav. U studiji Santosa i suradnika (Santos i sur., 2016), ružmarin je imao najviše monoterpena (1,8-cineol i β -pinen) koji su pokazali u njihovoj, ali i u studiji Wang i suradnika nisko citotoksično djelovanje u tumorskim stanicama (Wang i sur., 2012). Frankel i suradnici (Frankel i sur., 1996) su također dokazali da u uljno-vodenim otopinama, sastojci ružmarina kao što su karnozinska kiselina, karnozol i alfa-tokoferol imaju veću aktivnost nego ružmarinska kiselina. Salih i suradnici 2015 (Salih i sur., 2015) testirajući koncentracije ružmarina od 50, 100, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazali su da 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i vodenog i metanolnog ekstrakta ružmarina koji odgovara koncentraciji 0,5x korištenoj u ovom radu kod stanične linije skeletnih mišićnih tumorskih stanica rdbomiosarkoma RD nakon izlaganja 24 sata pokazao postotak preživljenja od 18 i 16 posto; dok je stanična linija normalnih fibroblasta mišjeg embrija MEF pokazala postotak preživljenja od 86 i 85%. Cardile i suradnici (Cardile i sur., 2009) pokazali su da je ekstrakt ružmarina sa 31,7% karnozinske kiseline u koncentracijama od 10-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ značajno smanjio proliferaciju u MTT testu od dvije melanomske stanične linije M14 i A375.

Postoje naravno i tvari koje ne utječu na vijabilnost stanica, ali mijenjaju staničnu proliferaciju i genomsku osjetljivost bez citotoksičnog učinka. Kao što se vidi u Tablici 4., određivanjem mitotičkog indeksa u mikronukleus *cytome* testu, pokazano je da u manjim koncentracijama, do 1x, ružmarin utječe na ubrzavanje stanične proliferacije.

Tablica 4. Mitotički indeks nakon 4 sata tretmana ekstraktom ružmarina u mikronukleus testu do koncentracije ispod 1x

	kontrola	MMC	0,05	0,1	0,2	0,5
M1	398	695	303	528	476	628
M2	583	297	446	397	462	265
M3	14	6	92	45	36	58
M4	5	2	79	30	26	49
NCPBI/NDI	1,626	1,315	1,787	1,577	1,612	1,528
M1-mononuklearne, M2-binuklearne, M3-trinuklearne, M4-tetranuklearne stanice, MMC-mitomycin C (pozitivna kontrola)						

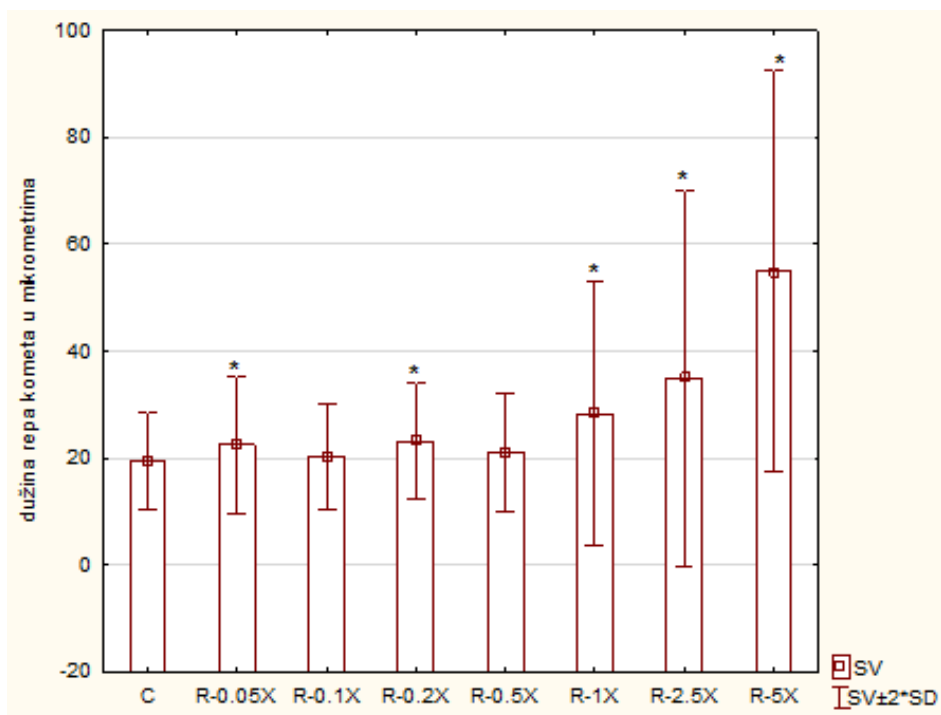
Rezultati mjerenja mitotičkog indeksa dobiveni u ovom radu korištenjem mikronukleus *cytome* testa su u skladu s rezultatima od Karimi i suradnika (Karimi i sur., 2017) koji su pokazali da postoji dozna ovisnost koja će ili dovesti do proliferacije ili do inhibicije, s učinkom zaustavljanja stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa, ali uvijek sa tendencijom smanjenja broja stanica u G1 fazi i porastom stanica u barem G2/M fazi. Kao potvrdu ove tvrdnje, u eksperimentima provedenim u ovom radu mitotički se indeks više nije mogao pratiti od koncentracija 1x do 5x. Koncentracije 1x i 2x dovele su do vidljivog zaustavljanja u proliferaciji, fragmentiranja samih jezgara i pojave apoptotičnih tjelešaca, a koncentracija 5x je izazvala pojavu nekroze.

Izlaganje stanica korijena crvenog luka *Allium cepa* vodenom ekstraktu ružmarina u koncentracijama od 0,02, 0,04, 0,06 i 0,08 mg mL⁻¹ 24 ili 48 sati pokazale su antiproliferativno djelovanje (Cardoso i sur., 2014). Vodeni i alkoholni ekstrakti lišća ružmarina u koncentracijama od 12,50 do 47,55 mg mL⁻¹ inhibirali su podjelu stanica u humanim staničnim linijama NCI-H82 (karcinom pluća), DU-145 (karcinom prostate), Hep-3B (hepatocelularni karcinom), K-562 (kronična mijelogeno leukemija) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) (Yesil-Celiktas i sur., 2010), slična značajna redukcija u mitotičkom indeksu nađena je i kod tretmana stanične linije A2780 (ljudski karcinom ovarija) (Tai i sur., 2012; Cheng i sur., 2011), ali i u različitim staničnim linijama karcinoma kolona štakora tretiranih visokim koncentracijama samo karnozola, jednog od glavnih sastojaka ekstrakta ružmarina (Tai i sur., 2012; Cheng i sur., 2011).

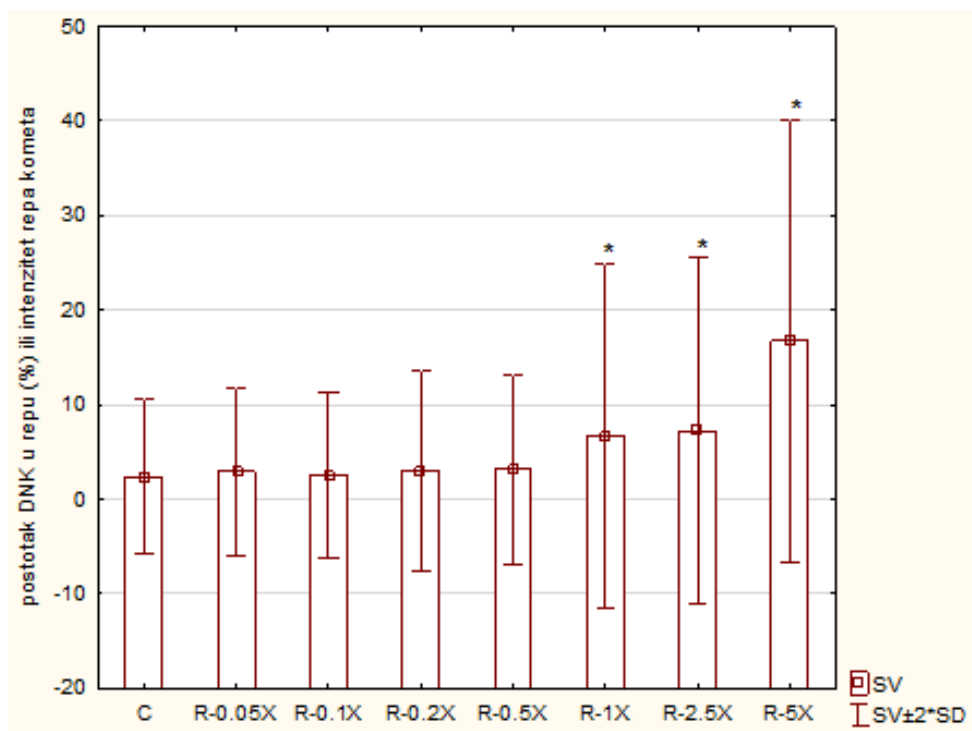
Mehanizam citotoksičnog djelovanja spojeva iz ružmarina na stanice objasnili su Visanji i suradnici (Visanji i sur., 2006). Prema njihovim rezultatima, visoke koncentracije diterpen karnozola iz ružmarina utječu na dijeljenje stanica, tj. diterpen karnozol djeluje na B1 cikline tijekom procesa diobe i tako onemogućava pravilno formiranje diobenog vretena. Antiproliferativni učinak ružmarina se također pripisuje aktivnosti ružmarinskih difenola, kinona i rozmanola (Yesil-Celiktas i sur., 2010). Visoka koncentracija tih terpena utječe na diobeni ciklus i prekida stanice najviše u G2 fazi interfaze, utječući na replikaciju citoplazme i kondenzaciju kromosoma. Ovi učinci se mogu primjetiti čak i pri koncentracijama od 0,02mg mL⁻¹.

4.3. UTJECAJ NA GENOMSKI MATERIJAL, APOPTOZA I NEKROZA

Kao što je već i rečeno, genotoksični učinak može postojati i bez citotoksičnog učinka. Tretman od 1x, 2,5x te 5x u oba testa za primarna oštećenja (komet test) i trajna oštećenja (mikronukleus test) je pokazao značajna oštećenja genomske materijala. U komet testu je nakon 1-satnog izlaganja kod dužine repa uzrokovao fragmentaciju i veći postotak DNK materijala u repu kometa (Slika 14.a i 14.b) dok je kod 4 satnog izlaganja u mikronukleus testu uzrokovao pojavnost apoptoze tj. programirane stanične smrti počevši od 0,5x pa do najviših koncentracija (Tablica 4., Slika 14.a i 14. b i Tablica 5.). Mikronukleus test je dao i uvid u način na koji ekstrakt ružmarina utječe na genomski materijal. Iako je kratkotrajno izlaganje pokazalo oštećenja pri većim koncentracijama ružmarina (od 1x do 5x) (Slika 15.), 4 satno izlaganje i praćenje popravka DNK nakon prve diobe u kojoj je stanica imala mogućnost popraviti nastala oštećenja, primjećuje se od najmanje koncentracije do 1x koncentracije značajni porast frekvencije mikronukleusa, dok ostala oštećenja nisu prisutna, a poslije 1x, frekvencija mikronukleusa pada zbog pojavnosti prvo apoptoze (0,5 i 1x), a zatim i nekroze zbog masivnog i unutarnjeg i vanjskog oštećenja stanica.



14. a) Dužina repa kometa



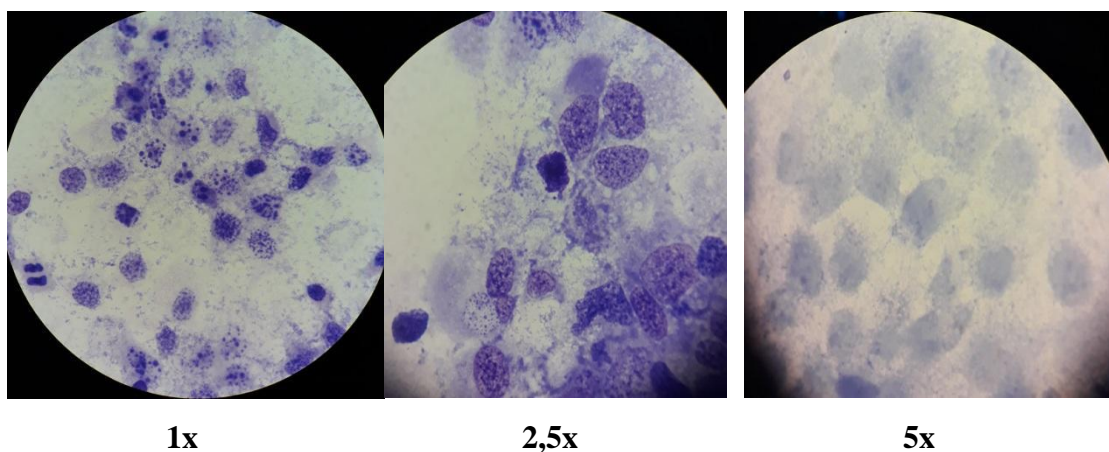
14. b) Postotak DNK u repu (%) ili intenzitet repa kometa

Slika 14.a) i 14.b) Rezultati komet testa nakon 1 sata tretmana s ekstraktima ružmarina prema parametru dužine repa i postotka DNK u repu, SV-srednja vrijednost; SD-standardna devijacija

Tablica 5. Frekvencije MN, nuklearnih pupova i nukleoplazmatskih mostova nakon 4 sata tretmana s ekstraktima ružmarina

	MN	PUP	MOST	AP
kontrola	2	-	-	-
MMC	17	-	-	-
0,05	8*	-	-	-
0,1	8*	-	-	-
0,2	10*	-	-	-
0,5	7*	-	-	59
1	APOPTOZA*			
2,5	NEKROZA**			
5				

MN-mikronukleus; PUP-nuklearni pup; MOST-Nukleoplazmatski most; AP-apoptoza*genotoksični učinak (pojava apoptoze u većini stanica tretiranih koncentracijom 1x)**genotoksični učinak (pojava nekroze u većini stanica tretiranih koncentracijama 2,5 i 5x).



Slika 15. Prikaz stanične linije CAL27 nakon 1h izlaganja ekstraktima ružmarina od 1-5x

U usporedbi s rezultatima drugih autora, iako ružmarin ima dokazani citotoksični učinak, on uvelike ovisi o koncentraciji, periodu izlaganja, ali i vrsti stanica koje su izložene ekstraktu. Santos i suradnici (Santos i sur., 2016) su pokazali da tretman HeLa stanica u koncentraciji od $322,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ nije pokazao znakove apoptoze, dapače, svi organeli su bili netaknuti u

stanicama, citoplazma nije izgubila svoju organizaciju, te je stanična membrana zadržala svoj integritet kao i kontrolne netretirane stanice.

Stanična linija CALB1 pokazala je veću osjetljivost pri istim koncentracijama i vremenu izlaganja nego što su to pokazale stanice CAL27, a pošto su CALB1 bile izložene također i 2 sata ekstraktima istih koncentracija, taj citotoksični učinak je bio još izraženiji a također i jači s porašću koncentracije ekstrakta (Čučković, 2017). U tom radu je pokazano da tijekom tretmana od jednog sata CC_{50} iznosi $15,21 \text{ mg mL}^{-1}$, a tijekom dva sata tretmana iznosi $8,83 \text{ mg mL}^{-1}$. Karimi i suradnici (Karimi i sur., 2017) su pokazali da tretman od 24 sata stanične linije skvamoznih stanica karcinoma jednjaka KYSE30 u koncentracijama ekstrakta ružmarina od $2-250 \text{ mg mL}^{-1}$ uzrokuje morfološke promjene na stanicama, uključujući fragmentaciju i kondenzaciju nukleusa i kromatina, kao i formiranje apoptotičnih tjelešaca. Apoptoza je bila potaknuta i kod HepG2 stanica s eteričnim ružmarinskim uljem, ali i tretmanom sa karvakrolom kod Melusova i suradnici (Melusova i sur., 2014).

Taner i suradnici (Taner i sur., 2016) su pokazali da tretman CHO stanica sa 100 g mL^{-1} je uzrokovalo oštećenje DNK stanica i stvaranje mikronukleusa. Fragmentacija DNK je pokazana pri tretmanu ekstraktom ružmarina u dvije stanične linije melanoma m14 i A375 (Cardile i sur., 2009). Slamenova i suradnici (Slamenová i sur., 2002) su pokazali da 24-satna preinkubacija V79 stanične linije hrčka sa $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ružmarinskog ekstrakta uzrokovala značajno oštećenje DNK.

Eterično ulje ružmarina sadrži različite spojeve u različitim koncentracijama, koji mogu djelovati na sinergistički način ili regulirati jedan drugoga. Mnogi monoterpeni i seskviterpeni utječu na citotoksičnost jer kao lipofilne tvari mogu proći kroz staničnu i citoplazmatsku membranu i uništiti strukture koje povezujemo s oštećenjem membrane, gubitkom iona, redukcijom membranskog potencijala, kolaps protonske pumpe i izmjene ATP-a (Armstrong, 2006; Richter i Schlegel, 1993; Vercesi i sur., 1997).

Haza i Morales (Haza i Morales, 2012) i drugi autori (Andrade i sur., 1997; Jaganathan i sur., 2011; Jaganathan i Mandal, 2009; Martos i sur., 1997; Morales i Haza, 2013) su pokazali na raznim vrstama biljnih vrsta meda da veća koncentracija fenolnih sastojaka inducira ili povećava apoptotični učinak u tumorskim stanicama (ljudske stanice periferne krvi od promijelocitne leukemije-HL-60), ali i da u normalnim staničnim linijama štiti DNK stanice (HepG2-(Haza i Morales, 2012)), te da med ružmarina naspram drugih vrsta meda ima manju

koncentraciju fenolskih spojeva, potvrđujući da sa velikim povećanjem koncentracije, kao što je npr. 5 puta više se može vidjeti više taj učinak kod ružmarina.

Cardile i suradnici 2009. (Cardile i sur., 2009) pokazali su da je ekstrakt ružmarina sa 31,7% karnozinske kiseline u koncentracijama od 10-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ potaknuo apoptotični odgovor dvije melanomske stanične linije M14 i A375.

Zegura i suradnici (Zegura i sur., 2011) su pokazali da preparat ružmarina VIVOX bogat karnozinskom kiselinom (50,27%) i karnozolom (5,65%) u HepG2 staničnoj liniji na komet testu uzrokuje veća oštećenja nego ružmarin u sličnim koncentracijama.

Horváthová i suradnici (Horváthová i sur., 2010) su pokazali smanjenje DNK oštećenja i protektivni učinak 14-dnevnog tretmana štakora koji je bio mjereno na stanicama jetre tih štakora komet testom nakon što su stanice bile izložene oksidativnom stresu, a slični učinak su pokazali i na HepG2 stanicama koje su izložili karcinogenima BaP (benzo(a)piren) i PhIP(2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridin). Ekstrakt ružmarina je inhibirao genotoksični učinak BaP u ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama (Offord i sur., 1995) i aflatoksina B1 u ljudskim stanicama epitela jetre i humanim bronhijalnim stanicama (Offord i sur., 1997b). U HepG2 stanicama ružmarinska kiselina je također pokazala zaštitni učinak od citotoksičnosti, oksidativnog stresa i stvaranju apoptoza od izlaganja okratoksinu A i aflatoksinu B1 (Renzulli i sur., 2004). Ovi rezultati ukazuju da zaštitni učinak ekstrakata od pro-karcinogena može biti povezan s moduliranjem enzima koji sudjeluju u metabolizmu i aktivaciji karcinogena i detoksifikaciji, što također potvrđuje i Manoharan i suradnici (Manoharan i sur., 2010) na karnozinskoj kiselini u istraživanju antiklastogenog učinka na hrčcima gdje je pokazano da nakon 5 dana tretmana klastogenima, ružmarin, tj. karnozinska kiselina je pokazala zaštitni učinak vjerojatno utječući na antioksidativni potencijal i na modulaciju detoksifikacijskih enzima faze 1 i 2. Maurin i suradnici (Maurin i sur., 2007) su pokazali da karnozinska kiselina ima zaštitni učinak od zračenja i mutacija od gama zračenja na ljuske limfocite, foto-protektivni učinak na ljudske fibroblaste izložene UVA zračenju (Offord i sur., 1997), smanjenje metaboličke aktivacije i povećanje detoksifikacije karcinogena kao što (Offord i sur., 1995) je benzopiren, citotoksičnu aktivnost u tumorskim ljudskim stanicama (Steiner i sur., 2001), te inhibira lipidnu peroksidaciju za 88-100% kod oksidativnih stres uvjeta (Wijeratne i Cuppett, 2007).

Maistro i suradnici (Maistro i sur., 2010) su pokazali da ružmarin kada je dan oralno u tretmanu može uzrokovati genotoksični i mutageni učinak. Oni su tretirali Swiss miševce i

Wistar štakore sa 300, 1000 ili 2000 mg kg⁻¹ ulja ružmarina. Komet test na jetrenim i perifernim stanicama krvi je pokazao oštećenja DNK u sve tri koncentracije, dok su mikronukleus test i test kromosomskih aberacija pokazali oštećenja u samo zadnje dvije najveće doze.

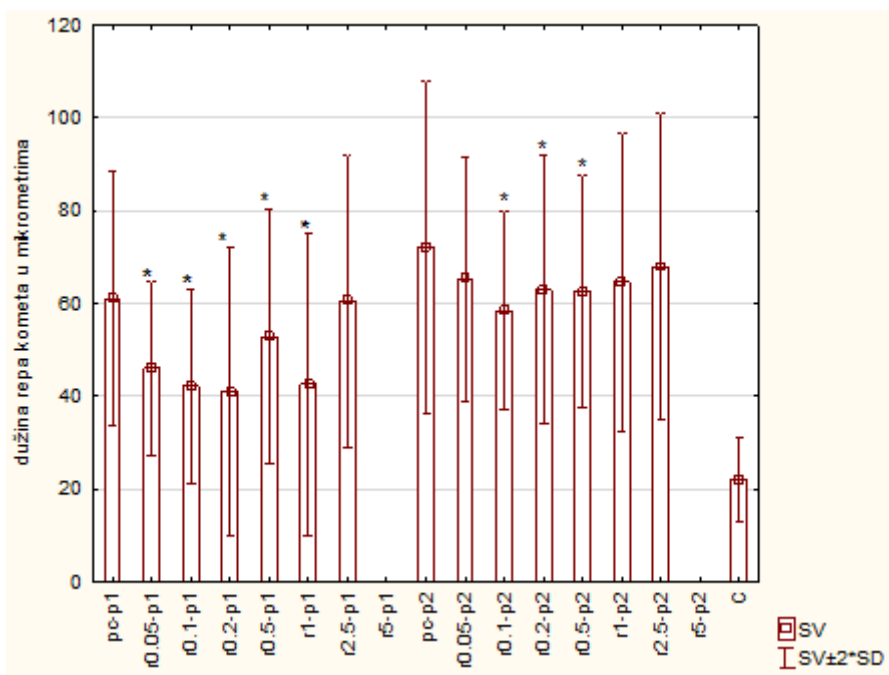
Maistro i suradnici (Maistro i sur., 2010) te Gaiani i suradnici (Gaiani i sur., 2006) su istraživali genotoksični potencijal vodeno-alkoholnih ekstrakata ružmarina *in vivo* u štakorima soja Wistar u stanicama koštane srži mikronukleus testom i testom kromosomskih aberacija i pokazali da 6,43, 100 i 200 mg kg⁻¹, ekstrakt nije mutagen. Papachristos i Stamopoulos (Papachristos i Stamopoulos, 2002) su pokazali fumigantnu toksičnost ružmarinskog ulja na larve i ličinke *Acanthoscelides obtectus*, ovocidnu, repelentnu i fumigantnu aktivnost naspram i drugih insekata (Hori, 1998; Shaaya i sur., 1997; Tunç i sur., 2000), veliki postotak abnormalnih štakorskih embrija je zamijećen u tretmanu sa 260 mg kg⁻¹ ružmarinskog ekstrakta koji je davan od prvog do 4. gestacijskog dana (Damasco i Lemonica, 1999), a viša doza od 1040 mg kg⁻¹ u istom periodu je uzrokovala reducirani broj blastocista u uterusu. Maistro i suradnici (Maistro i sur., 2010) su pokazali da u svim tretmanima staničnih linija s eteričnim uljem ružmarina, najčešća kromosomska oštećenja su bila „gapovi“, zatim kromatidni lomovi, izokromatidni lomovi i delecije, te da u jednoj stanici nije bilo više od jedne vrste oštećenja. Mehanizam genotoksičnog učinka stvaranja kromosomskih lomova i delecija bi mogao biti odgovoran za abortuse i u ljudima i u životinjama zbog izlaganja velikim koncentracijama ružmarinskog ulja (Beckman i Brent, 1984).

4.4. ZAŠTITNI UČINAK RUŽMARINA

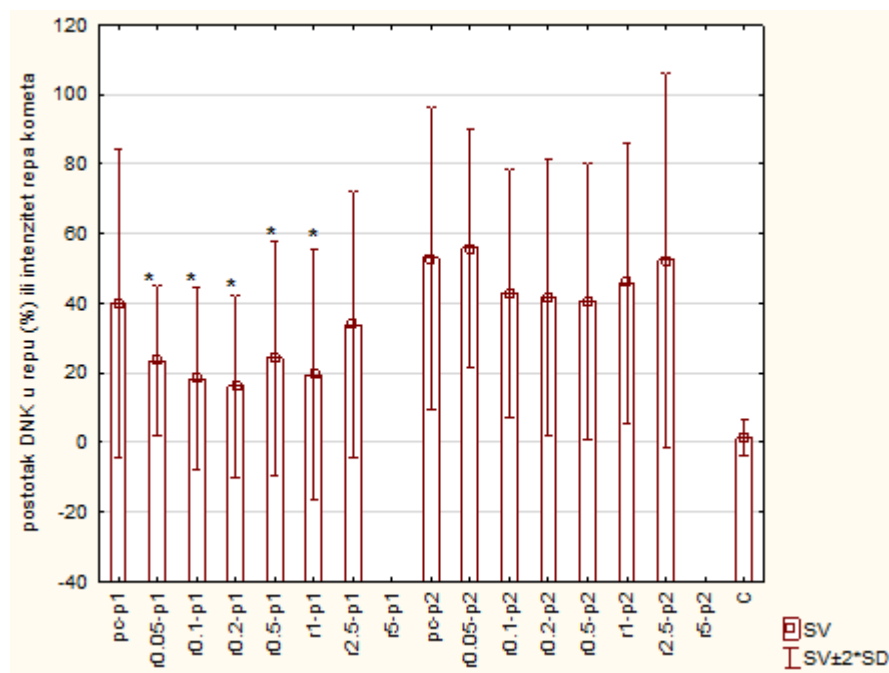
No, iako je ružmarin pokazao svoj genotoksični potencijal, ipak je u 1 satnom pre-tretmanu stanica pokazao zaštitni učinak prilikom izlaganja 5 minuta dvjema različitim koncentracijama peroksida (Slika 16.a i 16.b)

Prilikom izlaganja većoj dozi peroksida koja inače uzrokuje apoptotične stanice, smanjena je i fragmentacija DNK, ali i količina DNK u repu kometa, čime je pokazano da je postignut zaštitni učinak u smanjenju broja stanica u apoptozi, ali ne i onih sa velikih preostalim oštećenjima.

Prilikom izlaganja slabijoj dozi peroksida koja uzrokuje oštećene stanice, ali ne i apoptoze, pokazano je značajno manje oštećenja osim za dvije najveće koncentracije.



16.a) Dužina repa kometa



16.b) Postotak DNK u repu (%) ili intenzitet repa kometa

Slika 16.a) i 16.b) Rezultati komet testa nakon 1 sata pre-tretmana s ekstraktima ružmarina i 5 minutnog izlaganja 0,25 i 0,50 μ M peroksidu prema parametru dužine repa i postotka DNK u repu, SV-srednja vrijednost; SD-standardna devijacija

Učinak ružmarina odnosno njegovih komponenata kao što je ružmarinska kiselina pokazao je zaštitni učinak od stvaranja oksidativnog stresa prilikom izlaganja različitih staničnih linija različitim koncentracijama peroksida: tretman od 1-500 μM ružmarinske kiseline i 100 μM peroksida kojima su tretirane stanice N2A mišjeg neuroblastoma smanjila je količine laktat-dehidrogenaze, reducirao membranski mitohondrijski potencijal, povećao količinu unutarnjih ROS-ova, smanjio genotoksičnost za 3,7 puta (komet test, ali repni moment, konc 1-25 μM), promovirao povećanu regulaciju tirozin hidroksilaze za 4,5 puta te ekspresiju neurotrofskog faktora karaktersitičnog za mozak (BDNF- engl. *brain-derived neurotrophic factor*) za 5,4 puta.

Iz Ghaffari (Ghaffari i sur., 2014) vodikov peroksid tj. H_2O_2 s lakoćom prolazi staničnu membranu te stvara visoko reaktivne hidroksilne radikale koji jako uspješno napadaju stanične komponente kao što su lipidi, proteini i DNK stvarajući tako oksidativna oštećenja (Denisova i sur., 2001). Tretman sa ružmarinskom kiselinom je spriječio stvaranje oksidativnih oštećenja nakon izlaganja N2A stanica mišjeg neuroblastoma vodikovom peroksidu kroz up-regulaciju gena koji sudjeluju u zaštiti i imaju antioksidativni mehanizam.

Taner i suradnici (Taner i sur., 2016) su pokazali da je u visokim koncentracijama (100 i više g mL^{-1}) u CHO stanicama ružmarin je također smanjio genotoksični učinak prilikom izlaganja peroksidu.

Horvathova i suradnici (Horvathova i sur., 2014) su pokazali na staničnoj liniji HepG2 da je eterično ulje ružmarina nakon 24h imalo zaštitni efekt od izlaganja peroksidu koncentracije 250 μM , iako u njihovom slučaju ružmarin nije pokazao antioksidativni učinak, nego samo antiradikalni učinak.

Antibakterijski učinak eteričnih ulja na mikroorganizme javlja se zbog njihove hidrofobnosti koja im omogućuje integriranje u lipide stanične membrane mitohondrija, koje postaju propusne te tako dolazi do curenja staničnog sadržaja (Ait-Ouazzou i sur., 2011; Burt, 2004). Horváthová i suradnici (Horváthová i sur., 2014) su pokazali sličan učinak kao i u rezultatima komet testa koji su prikazani u ovom radu, da niže koncentracije pokazuju niže oštećenje DNK, dok od 0,063 promila oštećenja počinju opet rasti, a također nam se slažu i vrijednosti oštećenja što se tiče postotka DNK u repu kometa, jer nisu radili niti jedan drugi parametar. Sami tretman sa ružmarinom nije uzrokovao oštećenja uHepG2 stanicama.

Zegura i suradnici (Zegura i sur., 2011) su pokazali zaštitni učinak ružmarina od oksidativnog stresa u HepG2 stanicama, a Horváthová (Horváthová i sur., 2010) također i u primarnim hepatocitima. Isti protektivni učinak našli su i Posadas i suradnici (Posadas i sur., 2009) i Ngo i suradnici (Ngo i sur., 2011).

Razavi-Azarkhiavi i suradnici (Razavi-Azarkhiavi i sur., 2014) su pratili izloženost limfocita H_2O_2 (100 μM) i 1 ili 2,5 mg mL^{-1} oba ekstrakta (vodeni i etanolski) na 4°C kroz 30 min. U limfocitima slični učinak na DNK oštećenja su izazvana koncentracijam peroksida od 50 i 100 μM . Etanolni ekstrakt je uzrokovao značajno smanjenje oštećenja, a vodeni ekstrakt nije.

Halliwell i Aruoma; Rhaese i Freese; Yen i suradnici (Halliwell i Aruoma, 1991; Rhaese i Freese, 1968; Yen i sur., 2000) su pokazali daje vodikov peroksid agens koji ne reagira direktno sa molekulom DNK. Slobodni radikali lako prolaze kroz membranu i mogu ući u jezgru, a u prisustvu metalnih iona kao što su željezo i bakar kroz fenton reakciju mogu generirati visoko reaktivne hidroksilne radikale koji napadaju DNK i rezultiraju u lomovima i DNK fragmentaciji. Vodikov peroksid (H_2O_2), ion kisika (1O_2) i hidroksilni radikali (OH^-) su reaktivni oksidativni spojevi (ROS) koji su ponajviše odgovorni za stvaranje oksidativnog stresa u stanicama i organizmu. H_2O_2 stvara primarno DNK lomove kroz stvaranje OH^- radikala (Halliwell i Aruoma, 1991) Haber–Weiss reakcijom kataliziranom željeznim ionom (Starke i Faber, 1985). Između svih ROS-ova, OH^- ima visoku reaktivnost sa DNK, lipidima i proteinima, vodeći tako do oštećenja stanica (Dröge, 2002). DNK lezije uzrokovane ionom kisika su prvenstveno oksidativne DNK baze (Pflaum i sur., 1994; Pflaum i sur., 1998), na guaninskim ostacima najviše (predominantni oblik oštećenja je 8-oxo-7,8-dihydroguanine) (DeFedericis i sur., 2006) koji su osjetljivi na djelovanje specifičnih DNK glikozilaza (bakterijski Fpg ili ljudski Ogg1 protein) (Boiteux i sur., 1992). Slobodni radikali mogu promijeniti strukturu biomakromolekula i uzrokovati oštećenja stanica, tkiva i degeneraciju i imati ulogu u patogenezi raznih bolesti i ubrzavanju učinka starenja.

Slamenova i suradnici (Slamenová i sur., 2002) su pokazali da etanolni ekstrakt ružmarina u koncentracijama od 1 i 2,5 mg mL^{-1} pokazuje zaštitni učinak smanjujući kromosomska oštećenja nakon izlaganja vodikovom peroksidu. Sličan učinak utvrđen je i kod CaCO_2 -stanica raka debelog crijeva i V79 hrčkovih stanica raka pluća (Slamenová i sur., 2002), te kod tretmana ljudskih limfocita. Cardile i suradnici (Cardile i sur., 2009) pokazali su da je ekstrakt ružmarina sa 31,7% karnozinske kiseline zaštitio i DNK jezgre, ali i plazmidnu DNK od hidroksilnih radikala nastalih nakon izlaganja UV-A zračenju, te u koncentracijama od 10-

80 $\mu\text{mg mL}^{-1}$ potaknuo apoptotični odgovor dvije melanomske stanične linije M14 i A375, te također Melusova i suradnici (Melusova i sur., 2014) su pokazali zaštitni učinak i eteričnog ružmarinskog ulja i karvakrola u tretmanu HepG2 stanica s peroksidom. Horváthová i suradnici; Slamenova i suradnici, 2008.; i Horvathova i suradnici 2009. (Horváthová i sur., 2010; Slamenova i sur., 2008; Horvathova i sur., 2009) su pokazali da komponente ružmarinskog ulja kao što su karvakrol ili borneol davani u vodu za pijenje štakorima 14 dana mogu zaštititi DNK od oksidativnog stresa uzrokovanog izlaganjem peroksidu.

Lábaj i suradnici i Lazarova i suradnici (Lábaj i sur., 2007; Lazarová i sur., 2006) su proučavali utjecaj peroksida na primarne štakorske hepatocite te zaključili da ružmarin predstavlja esencijalnu biljku u borbi organizma protiv bolesti čovječanstva te da pomaže u stvaranju učinkovite alternative ili dodataka u industriji hrane u zamjeni za dodavanje sintetičkih konzervansa.

Aherne i suradnici (Aherne i sur., 2007) su pokazali da je u njihovom slučaju IC_{50} bio 123 mg mL^{-1} , da je ružmarin zaštitio od DNK oštećenja prouzrokovanih vodikovim peroksidom („*Olive tail moment*“ i postotak DNK), ali ne i protiv citotoksičnosti uzrokovane izlaganju vodikovom peroksidu. Takvo je svojstvo u njihovom ekperimentu pokazala samo kadulja koja je ujedno bila i jedina koja je kao antioksidans povećavala GSH (glutation) koncentraciju u stanicama.

Slamenová i suradnici (Slamenová i sur., 2002) su pokazali da je količina DNK oštećenja (lomova DNK) značajno smanjena kao i količina oksidativnog stresa kada su stanice izložene pre-tretmanu etanolskom ekstraktu ružmarina u kraćem (2 h; 30 mg mL^{-1}) i duljem vremenskom periodu pre-tretmana (24 h; 0,3 mg mL^{-1}).

Benhusein i suradnici (Benhusein i sur., 2010) su pokazali da 5 minutno izlaganje 0,25 i 0,50 μM vodikovom peroksidu uzrokuje značajno veća oštećenja od kontrolnih uzoraka, te da oštećenja rastu porastom koncentracije vodikovog peroksida, mjereno komet testom. Rezultati se nisu mogli usporediti jer su u tom radu korištene OTM (engl. *Olive tail moment*) vrijednosti.

4.5. MEHANIZAM DJELOVANJA

Slamenová i suradnici (Slamenová i sur., 2002) su predložili kao mogući mehanizam djelovanja ekstrakta ružmarina od oksidativnog oštećenja kao posljedicu hvatanja OH radikala i O₂ radikala. Antioksidativni mehanizam ružmarina se povezuje s njegovim svojstvom hvatanja i vezanja radikala kao i za donaciju elektrona slobodnim radikalima da bi se stvorile manje reaktivne tvari te inhibirale u napadu i prihvaćanju na stanične biomolekule kao što su proteini i DNK (Sakr i Lamfon, 2012).

Horváthová i suradnici i Joyeux i suradnici (Horváthová i sur., 2010; Joyeux i sur., 1990) su pokazali da vodeni ekstrakti mlade biljke ružmarina pokazuju antilipoperoksidaznu aktivnost jer su u izlaganju stanica (izoliranih štakorskih hepatocita) organskom hidroperoksidu značajno smanjili stvaranje malondialdehida u dozno ovisnoj vezi (više ružmarina, veće smanjenje), i značajno smanjili otpuštanje laktat-dehidrogenaze i aspartat aminotransferaze i time pokazali da ružmarin ima antihepatotoksični učinak.

Debersac i suradnici te Hiroi i suradnici (Debersac i sur., 2001; Hiroi i sur., 1995) su pokazali da je ružmarinsko ulje bogato 1,8-cineolom (36,1%), snažno induciralo CYP 450, enzim iz faze I metabolizacije, tj. pogotovo CYP2B1/2 i malo povisilo UDP-glukoziltransferaznu aktivnost- enzim iz faze II. Indukcija CYP2B bi mogla kompenzirati disbalans tijekom reduciranja radikala povezanih sa oksidativnim stresom.

Maistro i suradnici (Maistro i sur., 2010) zaključili su da ulje ružmarina izaziva genotoksičnost u perifernoj krvi i u stanicama jetre miševa, što ukazuje na sastav ulja koji može varirati ovisno o geografskom podrijetlu ovog materijala.

Kao prvo istraživanje na ovoj vrsti staničnog modela CAL27 stanične linije skvamoznog epitela humanog jezika i utjecaja različitih koncentracija ekstrakta čaja lišća ružmarina na genomsku stabilnost, vijabilnost, proliferaciju i protektivni učinak na izlaganje koncentracijama peroksida koji uzrokuje genomska oštećenja, ovaj rad doprinosi u otkrivanju mehanizama djelovanja ružmarina, te još jednom potvrđuje da su stanice tumora osjetljivije izlaganju nego normalne zdrave humane stanične linije, i da se ružmarin kao takvo jedno moćno i prirodno sredstvo treba naći u različitim terapijskim tretmanima i svrhama, da treba biti pažljiv u doziranju, budući da je već i koncentracija u normalnoj šalici čaja pokazala apoptotični učinak, te da je ružmarin potvrdio protektivni učinak u kratkotrajnom izlaganju peroksidima i potvrdio svoju primjenu i pomoć u smanjenju oksidativnog oštećenja i pri

kratkim pred-tretmanima, u koje bi se moglo svrstati i svakodnevno lagano ispijanje šalice čaja.

5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakt lista ružmarina ne mijenja pH vrijednosti na sobnoj temperaturi i na 37°C pri radnim koncentracijama od 0,05x (0,06925 mg mL⁻¹); 0,1x (0,1385 mg mL⁻¹); 0, 2x (0,277 mg mL⁻¹); 0,5x (0,6925 mg mL⁻¹); 1x (1,385 mg mL⁻¹); 2,5x (3,4625 mg mL⁻¹) i 5x (6,925 mg mL⁻¹).
2. Ekstrakt lista ružmarina ne pokazuje citotoksični učinak na staničnu liniju CAL27 humanog skvamoznog epitela karcinoma jezika, osim što u koncentraciji od 5x smanjuje vijabilnost u MTT testu za 8%.
3. Ekstrakt lista ružmarina u navedenim koncentracijama potiče fragmentaciju DNK, koja je zajedno sa značajno većim postotkom oštećene DNK u odnosu na kontrolne uzorke vidljiva kod primarnih oštećenja mjerenih alkalnim komet testom pri koncentracijama od 1x; 2,5x i 5x.
4. Ekstrakt lista ružmarina je pokazao zaštitno djelovanje prilikom izlaganja koncentracijama peroksida od 0,50μM, te je smanjio apoptotični učinak i fragmentaciju DNK, no nije pokazao statistički značajni učinak u smanjenju oštećene DNK.
5. Ekstrakt lista ružmarina je pokazao statistički značajno zaštitno djelovanje prilikom izlaganja koncentracijama peroksida od 0,25 μM smanjujući i fragmentaciju i postotak oštećene DNK s više-manje sličnim učinkom pri svim radnim koncentracijama ekstrakta.
6. U mikronukleus testu, ružmarin je utjecao na ubrzavanje stanične proliferacije i značajnog genomskog oštećenja u obliku mikronukleusa do 0,5x, a nakon toga započinje značajan utjecaj programirane stanične smrti koji je izraženiji sa većom koncentracijom, a prilikom 2,5x i 5x značajan je više utjecaj nekroze nego apoptoze.
7. Ovaj eksperiment je pokazao zaštitno djelovanje ekstrakata lišća ružmarina te je potvrdio da koncentracije koje se nalaze u normalnoj šalici čaja ne treba pojačavati zbog neželjenog suprotnog učinka, već suprotno, dosad prihvaćena koncentracija ekstrakta lišća ružmarina u jednoj šalici čaja bi se trebala smanjiti za pola.
8. Potvrđen je toksični učinak na tumorsku staničnu epitelnu liniju skvamoznog karcinoma ljudskog jezika.

6. LITERATURA

Aherne, S.A., Kerry, J.P., O'Brien, N.M. (2007) Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* **97**, 321–328.

Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Loran, S., Rota, C., Pagan, R. (2011) The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **12**, 320–329.

Almela, S., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J.A., Roca, M.J., Rabe, V. (2006) Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J. Chromatogr. A.* **1120**, str.221-229.

Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P. (1999) Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp. Biol.* **37**, 124–130.

Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. (1997) Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* **60**, 79–84.

Angioni, A., Barra, Andreaas, P., Cereti, E., Barile, D, Coïsson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P. (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3530–3535.

Armstrong, J.S. (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: The sine qua non for cell death. *BioEssays.* **28**, 253–260.

Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.Ü., Ülgen, S. G., Yardibi, H. (2008) In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* **116**, 64–73.

Beckman, D., Brent, R. (1984) Mechanisms of teratogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**, 483–500.

Benhusein, G.M., Mutch, E., Aburawi, S., Williams, F.M. (2010) Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan J. Med.* **5(1)**, 1–6.

Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionising radiation or photosensitization. *Biochemistry*. **31**, 106–110.

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R. (2006) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. **28(3)**, 625–631.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites : A historical perspective. *Plant Sci*. **161**, 839–851.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Agric. food Chem.* **55**, 7879–7885.

Briskin, D.P. (2000) Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol*. **124(2)**, 507–514.

Brusick, D.J. (1980) Origins of genetic toxicology. U: *Principles of genetic toxicology*. Springer, Boston, 1-10.

Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 223– 253.

Cardile, V., Russo, A., Lombardo, L., Troncoso, N., Garbarino, J. (2009) *Rosmarinus officinalis* extract inhibits human melanoma cell growth. *Nat Prod Commun.* **4(12)**, 1707-10.

Cardoso, G., Dantas, E., Sousa, F., Peron, A. (2014) Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (*Labiatae*) in plant test system. *Brazilian J. Biol.* **74(4)**, 886–889.

Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignogna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G., Ferracane, R., Grosso, A., Aducci, P., Schininà, M.E., Marra, M. (2015) Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *Plos One*. **10(7)**, 1–18.

Cerda, H., Delincee, H., Haine, H., Rupp, H. (1997) The DNA „comet assay“ as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.* **375(2)**, 167-181.

Chen, J., Chen, J., Li, W. (2017) MicroRNA-149 targets specificity protein 1 to suppress human tongue squamous cell carcinoma cell proliferation and motility. *Oncol. Lett.* **13(2)**, 851–856.

Cheng, A.C., Lee, M.F., Tsai, M.L., Lai, C.S., Lee, J.H., Ho, C.T., Pan, M.H. (2011) Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Food Chem. Toxicol.* **49(2)**, 485–493.

Choucroun, P., Gillet, D., Dorange, G., Sawicki, B., Dewitte, J.D. (2001) Comet assay and early apoptosis. *Mutat. Res.* **478(1-2)**, str.89-96.

Collins, A.R., Dobson, V.L., Kennedy, G., Stetina, R. (1997) The comet assay : what can it really tell us? *Mutat. Res.* **375**, 183–193.

Cortopassi, G.A., Shibata, D., Arnheim, N. (1992) A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. **89**, 7370–7374.

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

Damasco, D., Lemonica, I. (1999) Embryotoxicity and antiimplantation effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. *Rev. Bras. Toxicol.* **12**, 47–54.

Debersac, P, Heydel, J.M., Amiot, M.J., Goudonnet, H. Artur, Y., Suschetet, M. (2001) Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: Description of specific patterns. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 907–918.

DeFedericis, H.C., Patrzyc, H.B., Rajecki, M.J., Budzinski, E.E., Iijima, H., Dawidzik, J. B. (2006) Singlet oxygen-induced DNA damage. *Radiat. Res.* **165**, 445–451.

Denisova, N., Cantuti-Castelvetri, I., Haasan, W.N., Paulson, K.E., Joseph, J.A. (2001) Role of membrane lipids in regulation of vulnerability to oxidative stress in PC12 cells: implication for aging. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 671–678.

Dorman, H.J., Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88(2)**, 308–316.

Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95.

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.

EFSA (2015) Extension of use of extracts of rosemary (E392) in fat-based spreads, <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4090>>. Pristupljeno 25. listopada 2018.

Erickson, R.P. (2010) Somatic gene mutation and human disease other than cancer: An update. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **705**, 96–106.

Fadel, O., Kirat, K. El, Morandat, S. (2011) The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *BBA - Biomembr.* **1808**, 2973–2980.

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

Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R., Prior, E. (1996) Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **44**(1), 131–135.

Gaiani, T., Carvalho, J., Silva, J., Maistro, E. (2006) Absence of clastogenic effects of the extract from medicinal plant *Rosmarinus officinalis* L. on Wistar rat bone marrow cells. *Cytologia.* **71**, 101–106.

Ghaffari, H., Venkataramana, M., Jalali Ghassam, B., Chandra Nyaka, S., Nataraju, A. Geetha, N. P., Prakash, H. S. (2014) Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sci.* **113**, 7–13.

Gioanni, J., Fischel, J.L., Lambert, J.C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., Ettore, F., Formento, P., Chauvel, P., Lalanne, C.M., Courdi, A. (1988) 2 new human-tumor cell-lines derived from squamous-cell carcinomas of the tongue - establishment, characterization and response to cyto-toxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol.***24**(9), 1445-55.

Halliwell, B., Aruoma, O. (1991) DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**, 9–19.

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B., Lyoussi, B. (2000) Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. *J. Ethnopharmacol.* **71**(3), 465–472.

Harborne, J.B. (1984) Phenolic compounds. U: *Phytochemical methods*. Springer, Dordrecht, 37-99.

Haza, A., Coto, L.J., Morales, P. (2010) Rosemary, heather and heterofloral honeys protect towards cytotoxicity of acrylamide in human hepatoma cells. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* **4**(2), 12-32.

Haza, A.I., Morales, P. (2012) Spanish honeys protect against food mutagen-induced DNA damage. *J. Sci. Food Agric.* **93**(12), 2995–3000.

Hiroi, T., Miyazaki, Y., Kobayashi, Y., Imaoka, S., Funae, S. (1995) Induction of hepatic P450s in rat by essential wood and leaf oils. *Xenobiotica*. **25**, 457–467.

Hori, M. (1998) Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a screenhouser. *J. Chem. Ecol.* **24**, 1425–1432.

Horváthová, E., Navarová, J., Galova, E., Sevcovicova, A., Chodakova, L., Sahnicanova, Z., Melusova, M., Kozics, K., Slamenova, D. (2014) Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-Protective effects of selected essential oil components (Eugenol, Carvacrol, Thymol, Borneol, Eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *J. Agric. Food Chem.* **62(28)**, 6632–6639.

Horvathova, E., Slameňová, D., Maršálková, L., Šramková, M., Wsolova, L. (2009) Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. *Food Chem Toxicol.* **47(6)**, 1318-1323.

Horváthová, E., Slameňová, D., Navarová, J. (2010) Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents. *Food Chem.* **123(1)**, 151–156.

Huang, M.T., Ho, C.T., Yuan Wang, Z., Ferraro, T., Lou, Y.R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D., Conney, A.H. (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* **54(3)**, 701–708.

Jaganathan, S.K., Mandal, M. (2009) Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols : A Review. *J. Biomed. Biotechnol.* 1-13.

Jaganathan, S.K., Mazumdar, A., Mondhe, D., Mandal, M. (2011) Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **35**, 607–615.

Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A. (2012) Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* L. methanolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 9603–9608.

Joyeux, M., Rolland, A., Fleurentin, J., Mortier, F., Dorfman, P. (1990) Tert-butyl hydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes: A model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Med.* **56**, 171–174.

Juhás, Š., Bukovská, A., Čikoš, Š., Czikková, S., Fabian, D., Koppel, J. (2009) Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice. *Acta Vet. Brno* **78(1)**, 121–127.

Karimi, N., Rashedi, J., Poor, B.M., Arabi, S., Ghorbani, M., Tahmasebpour, N., Asgharzadeh, M. (2017) Cytotoxic effect of rosemary extract on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* **10(2)**, 102–107.

Kashyap, B., Reddy, P. (2012) Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J. Cancer Res. Ther.* **8(2)**, 184-191.

Khan, N., Mukhtar, H. (2013) Tea and health: studies in humans. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6141–6147.

Lábaj, J., Slameňová, D., Lazarová, M., Košíková, B. (2007) Induction of DNA lesions in freshly isolated rat hepatocytes by different genotoxins and their reduction by lignin given either as a dietary component or in in vitro conditions. *Nutr. Cancer.* **57**, 209–215.

Lazarová, M., Lábaj, J., Eckl, P., Slameňová, D. (2006) Comparative evaluation of DNA damage by genotoxicants in primary rat cells applying the comet assay. *Toxicol. Lett.* **164**, 54–62.

Luzhna, L., Kathiria, P., Kovalchuk, O. (2013) Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front. Genet.* **4**, 1–17.

Maistro, E.L., Mota, S.F., Lima, E.B., Bernardes, B.M., Goulart, F.C. (2010) Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis (labiatae)* essential oil in mammalian cells in vivo. *Genet. Mol. Res.* **9(4)**, 2113–2122.

Manoharan, S., Balakrishnan, S., Vinothkumar, V., Silvan, S.(2010) Anti-clastogenic potential of carnosic acid against 7,12-dimethylbenz(a) anthracene (DMBA)-induced clastogenesis. *Pharmacol. Reports.* **62**, 1170–1177.

Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. (1997) Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *J. Agric. Food Chem.***2**, 2824–2829.

Maurin, M., Delbano, J., Mackaya, L., Colomb, H., Guier, C., Mandjee, A., Recule, C., Croize, J. (2007) Human infection with *Schineria* larvae. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 657–659.

Melusova, M., Slamenova, D., Kozics, K., Horvathova, E. (2014) Carvacrol and rosemary essential oil manifest cytotoxic, DNA-protective and pro-apoptotic effect having no effect on DNA repair. *Neoplasma.* **61**, 690–699.

Morales, P., Haza, A. (2013) Antiproliferative and apoptotic effects of spanish honeys. *Pharmacogn. Mag.* **9(35)**, 231.

Mosmann, T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Meth.***65**, 55–63.

Napoli, E.D., Curcuruto, G., Ruberto, G. (2010) Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochem. Syst. Ecol.***38(4)**, 659-670.

Neri, M., Milazzo, D., Ugolini, D., Milic, M., Campolongo, A., Pasqualetti, P., Bonassi, S. (2015) Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis.* **30**, 155–163.

Ngo, S.N., Williams, D.B., Head, R.J. (2011) Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 946–954.

OECD (2015) Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines,

<<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20Guidance%20Document%20on%20OECD%20Genetic%20Toxicology%20Test%20Guidelines.pdf>>. Pristupljeno 22. studenog 2018.

OECD (2016a) Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, <https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en>. Pristupljeno 22. studenog 2018.

OECD (2016b) Test No. 489: In vivo mammalian alkaline Comet assay, <https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en#.W_syVDj0nIU>. Pristupljeno 22. studenog 2018.

Offord, E.A., Mark, K., Ruffieux, C., Pfeifer, A. (1995) Rosemary components inhibit benzo(a)pyreneinduced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. **16**, 2057–2062.

Offord, E.A., Guillot, F., Aeschbach, R., Loliger, J., Pfeifer, A. (1997) Antioxidant and biological properties of rosmarin compounds: implications for food and health. U: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. (Shahidi, F., ured.), AOCS Press, Champaign, Illinois, str. 180-184.

Offord, E.A., Macé, K., Avanti, O., Pfeifer, A. (1997) Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer Lett* . **114**, 275–281.

Papachristos, D., Stamopoulos, D. (2002) Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: *Bruchidae*). *J. Stor. Prod. Res.* **38**, 365–373.

Petiwala, S.M., Johnson, J.J. (2015) Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Lett.* **367(2)**, 93–102.

Petiwala, S.M., Puthenveetil, A.G., Johnson, J.J. (2013) Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. *Front. Pharmacol.* 1–4.

Pflaum, M., Boiteux, S., Epe, B. (1994) Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis*. **15**, 297–300.

Pflaum, M., Kielbassa, C., Garmyn, M., Bernd, E. (1998) Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: Extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutat. Res.* **408**, 137–146.

Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.

Posadas, S., Caz, V., Largo, C., De la Gándara, B., Matallanas, B., Reglero, G., De Miguel, E. (2009) Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp. Gerontol.* **44**, 383–389.

Proestos, C., Komaitis, M. (2008) Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Sci. Technol.* **41(4)**, 652–659.

Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., Mikov, M. (2014) Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 225.

Razavi-Azarkhiavi, K., Behravana, J., Mosaffa, F., Sehatbakhsh, S., Shirani, K., & Karimi, G. (2014) Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay. *J. Complement. Integr. Med.* **11(1)**, 27–33.

Renzulli, C., Galvano, F., Pierdomenico, L., Speroni, E., Guerra, M.C. (2004) Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B₁ and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). *J. Appl. Toxicol.* **24(4)**, 289–296.

Rhaese, H., Freese, E. (1968) Chemical analysis of DNA alterations: base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine. *Biochem. Biophys Acta.* **155**, 476–490.

Richter, C., Schlegel, J. (1993) Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Tox. lett.* **67**, 119–127.

Sakr, S.A., Lamfon, H.A. (2012) Protective effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves extract on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in albino rats. *Life Sci. J.* **9**, 779–785.

Salih, S.M., Alobaidi, K.H., Alobaidi, Z.F. (2015) Cytotoxic effect of *Rosmarinus officinalis* L. leaf extracts on tumor cell line. *J. Al-Nahrain Univ.* **18**(1), 98–102.

Santos, P.A.S.R., Avanço, G.B., Nerilo, S.B., Marcelino, R. I. A., Janeiro, V., Valadares, M. C., Machinski, M. (2016) Assessment of cytotoxic activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), turmeric (*Curcuma longa* L.), and ginger (*Zingiber officinale* R.) essential oils in cervical cancer cells (HeLa). *Sci. World J.* **2016**, .

Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J., Reglero, G. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* **68**(4), 790–795.

Shaaya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J., Suprakarn, C. (1997) Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *J. Stor. Prod. Res.* **33**, 7–15.

Shah, S.U. (2012) Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testings for pharmaceuticals, <www.iosrjournals.org>. Pristupljeno 25 rujna 2018.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**(1), 184–191.

Slameňová, D., Horváthová, E., Maršálková, L., Šramková, M., Wsólová, L. (2008) Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H₂O₂. *Neoplasma.* **55**, 394–399.

Slameňová, D., Kubošková, K., Horváthová, E., Robichová, S. (2002) Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Lett.* **177**(2), 145–153.

Slatter, M.A., Gennery, A.R. (2010) Primary immunodeficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert Rev. Mol. Med.* **12**, 1-26.

Starke, P.E., Faber, J.L. (1985) Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **260**, 10099– 10104.

Steiner, M., Priel, I., Giat, J., Levy, J., Sharoni, Y., Danilenko, M. (2001) Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin dsub3 and retinoic acid. *Nutr. Cancer.* **41**, 135–144.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barraón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibanéz, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2012) Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **50(6)**, 1817–1825.

Tai, J., Cheung, S., Wu, M., Hasman, D. (2012) Phytomedicine antiproliferation effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Eur. J. Integr. Med.* **19(5)**, 436–443.

Taner, G., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, A. A., Başaran, N. (2016) Comparisons of antioxidant, cytotoxic and genotoxic/antigenotoxic effects of pycnogenol and rosmarinic acid. *Toxicol. Lett.* **258**, 62-70.

TermoFisher (2018) Specifikacija hranjive podloge, <<http://www.thermofisher.com/hr/en/home/technical-resources/media-formulation.114.html>>. Pristupljeno 17. rujna 2018.

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, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel / comet assay : guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Beilstein J. Nanotechnol.* **221**, 206–221.

Topçu, G., Tümen, G., Kiliç, T., GÖren, A.C., Barla, A., Türkmen, Z., Kingston, D.G.I. (2009) Bioactive Turkish Plant Extracts. *Innov. Chem. Biol.* 61-81.

Tunç, I., Berger, B., Erler, F., Dagli, F. (2000) Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored product insects. *J. Stor. Prod. Res.* **36**, 161–168.

Valdés, A., García-Cañas, V., Rocamora-Reverte, L., Gómez-Martínez, Á., Ferragut, J. A., Cifuentes, A. (2013) Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: Transcriptomic profiling and functional enrichment analysis. *Genes Nutr.* **8(1)**, 43–60.

Vanparys, P., de Kok, T.M.C.M., Van Schooten, F.J. (1996) Genetic toxicology. U: *Toxicology, principles and Applications* (Raymond Niesink, R., de Vries, J., Hollinger, M.A., ured.) New York, CRC Press, str. 315–336.

Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F. (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* **17**, 43–52.

Visanji, J.M., Thompson, D.G., Padfield, P.J. (2006) Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett.* **237(1)**, 130–136.

Wan, H., Williams, R., Doherty, P., Williams, D.F. (1994) A study of the reproducibility of the MTT test. *J.Mater. Sci.* **5**, 154-159.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* **108(3)**, 1019–1022.

Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Efferth, T. (2012) Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules.* **17(3)**, 2704–2713.

Wijeratne, S., Cuppett, S. (2007) Potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) diterpenes in preventing lipid hydroperoxide-mediated oxidative stress in CaCO₂ cells. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1193–1199.

Yamamoto, J., Yamada, K., Naemura, A., Yamashita, T., Arai, R. (2005) Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition.* **21(5)**, 580–587.

Yen, G., Hung, Y., Hsieh, C. (2000) Protective effect of extracts of *Mesona procumbens* Hemsl. on DNA damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide and UV irradiation. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 747–754.

Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. (2010) Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* **65(2)**, 158–163.

Zegura, B., Dobnik, D., Niderl, M.H., Filipic, M. (2011) Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. *Toxicol. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 296–305.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, IVANA LEDENKO, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Potpis studenta