

Biološka evaluacija sintetiziranih metoksiflavona

Rajn, Martina

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:162633>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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, 23. rujna 2019.

Martina Rajn
1034/MB

**BIOLOŠKA EVALUACIJA
SINTETIZIRANIH
METOKSIFLAVONA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na ukazanom povjerenju, uloženom trudu i strpljivosti, savjetima te nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada. Također, zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem svojim prijateljima na podršci i razumijevanju koji su studentske dane učinili lakšim i punim lijepih uspomena.

Posebno hvala mojoj obitelji na razumijevanju, strpljenju, podršci i svemu što čine za mene.

Hvala mojem Tiboru na ljubavi i motivaciji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOLOŠKA EVALUACIJA SINTETIZIRANIH METOKSIFLAVONA

Martina Rajn, 1034/MB

Sažetak: Flavonoidi su raznovrsna skupina fitonutrijenata, bioaktivni polifenoli prisutni u voću, povrću i ljekovitim biljkama. Povezani su sa širokim spektrom učinaka u ljudskom tijelu koji povoljno utječu na zdravlje, a ponajviše se istražuje njihov antitumorski potencijal. S obzirom na malu apsorpciju prehrambenih flavonoida sintetizirani su metabolički stabilniji derivati, metoksiflavoni. U ovom radu ispitana je *in vitro* biološka aktivnost sedam različitih metoksiflavona na humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa i MCF-7) te je određen mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja protočnom citometrijom i fluorescentnom mikroskopijom. Svih sedam metoksiflavona su pokazali inhibitorni učinak na staničnu liniju HeLa, te njih šest na MCF-7 pri čemu metoksiflavon 7 ima najveći inhibitorni učinak na proliferaciju stanica ($IC_{50}=57,323 \mu M$). Također, praćenjem vijabilnosti stanica fluorescentnom mikroskopijom i određivanjem tipa stanične smrti u uzorcima tretiranim ispitivanim spojevima primjenom protočne citometrije pokazano je da metoksiflavon 7 ima najveći proapoptotički učinak. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal antitumorskog djelovanja ispitivanih metoksiflavona.

Ključne riječi: antitumorsko djelovanje, flavonoidi, *in vitro* biološka aktivnost, metoksiflavoni, stanične linije

Rad sadrži: 40 stranica, 15 slika, 1 tablicu, 31 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
2. Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
3. Doc. dr. sc. Natka Ćurko
4. Doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjena)

Datum obrane: rujan 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL EVALUATION OF SYNTHESIZED METHOXYFLAVONES

Martina Rajn, 1034/MB

Abstract: Flavonoids are a diverse group of phytonutrients, bioactive polyphenols present in fruits, vegetables and medicinal plants. They are associated with a wide spectrum of effects in human body that have a beneficial effect on health, and are mostly explored because of their anticancer potential. Given the small absorption of dietary flavonoids, metabolically more stable derivatives, methoxyflavones are synthesized. In this research, *in vitro* biological activity of seven different methoxyflavones on human tumor cell lines (HeLa and MCF-7) and a mechanism for their cytotoxic activity using flow cytometry and fluorescence microscopy were determined. All tested methoxyflavones showed inhibitory effect on the HeLa cell line, and six of them on MCF-7 where methoxyflavone 7 had the greatest inhibitory effect on cell lines proliferation ($IC_{50} = 57,323 \mu M$). The results have also shown that methoxyflavone 7 had the greatest proapoptotic effect. The obtained results indicate the potential antitumor effect of the tested methoxyflavones.

Keywords: antitumor activity, flavonoids, *in vitro* biological activity, methoxyflavones, cell lines

Thesis contains: 40 pages, 15 figures, 1 table, 31 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 Kristina Radošević, Associate professor

Reviewers:

1. PhD Višnja Gaurina Srček, Full professor
2. PhD Kristina Radošević, Associate professor
3. PhD Natka Ćurko, Assistant professor
4. PhD Teuta Murati, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 2019

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FLAVONOIDI.....	2
2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST FLAVONOIDA	5
2.2.1. Antitumorsko djelovanje flavonoida	8
2.3. TESTOVI ZA <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI PRIMJENOM KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	9
2.3.1. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti flavonoida primjenom kultura stanica.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Flavonoidi.....	16
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Otopine i puferi	17
3.1.4. Humane stanične linije	18
3.1.5. Uređaji i oprema.....	19
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Uzgoj stanica	20
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	20
3.2.3. Tretman stanica ispitivanim flavonoidima i određivanje preživljenja stanica MTS metodom.....	21
3.2.4. Praćenje vijabilnosti stanica bojanjem s fluorescein diacetatom i primjenom fluorescentne mikroskopije.....	23
3.2.5. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a	24
3.3. OBRADA REZULTATA	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. <i>IN VITRO</i> CITOTOKSIČNOST SINTETIZIRANIH METOKSIFLAVONA	26
4.2. MEHANIZAM CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA SINTETIZIRANIH METOKSIFLAVONA	31
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Flavonoidi su raznovrsna skupina fitonutrijenata, bioaktivni polifenoli prisutni u voću, povrću i ljekovitim biljkama. Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur difenil propana koji sadrži petnaest ugljikovih atoma u primarnoj jezgri, naziva se C6-C3-C6 i označava kao A, B i C (Karak, 2019). Flavonoidi su povezani sa širokim spektrom učinaka u ljudskom tijelu koji povoljno utječu na zdravlje. Stoga su često sastavna komponenta raznih nutritivnih, farmaceutskih, medicinskih i kozmetičkih pripravaka zbog njihovih antioksidativnih, protuupalnih (Panche i sur., 2016), hepatoprotektivnih, antibakterijskih, antiviralnih i antikancerogenih svojstava (Kumar i Pandey, 2013), te kardioprotektivne, antidijabetske i aktivnosti protiv neurodegeneracije (Wang i sur., 2018).

Brojni su znanstvenici pokazali kako su flavonoidi sposobni inhibirati proliferaciju stanica raka i odgoditi razvoj tumora suzbijanjem metastaza, angiogeneze te regulacijom mnogih signalnih putova povezanih s apoptozom. Ove osobine flavonoida su temelj novih platformi za moduliranje tumorske signalizacije, prevladavanje kemorezistentnosti i rearanžman tumorskog mikrookoliša (Sudhakaran i sur., 2019). Stoga se općenito smatra da konzumiranje hrane bogate flavonoidima može pomoći u sprječavanju nastanka i/ili razvoja raka (Razak i sur., 2019).

Apsorpcija flavonoida iz hrane ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima poput molekularne mase, konfiguracije, lipofilnosti, topljivosti i pKa (Kumar i Pandey, 2013). Iako se mnogi flavonoidi apsorbiraju i u određenoj količini se nalaze u cirkulaciji, njihove koncentracije u krvi u većini slučajeva nisu dovoljno visoke da ispune svoje stanične biološke funkcije *in vivo*, a glavni razlog tome se smatra opsežna konjugacija slobodnih hidroksilnih skupina. Stoga je dokazano da metilacija hidroksilnih skupina u flavonima rezultira metabolički stabilnijim derivatima s povećanim membranskim transportom, što dovodi do olakšane apsorpcije te stoga znatno poboljšane bioraspoloživosti (Walle, 2009).

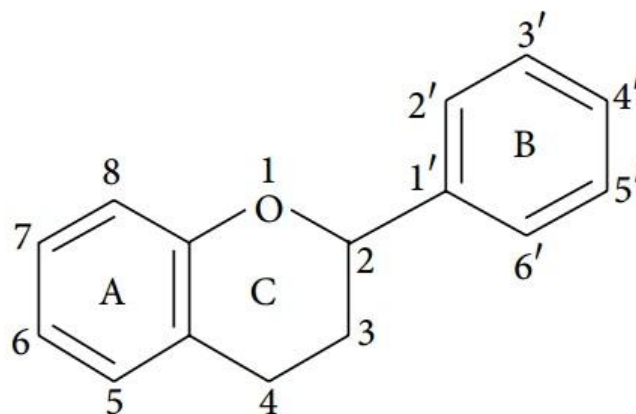
Cilj ovog rada je ispitati biološku aktivnost sedam novosintetiziranih metoksiflavona u Zavodu za kemiju, Sveučilišta u Wrocław-u, Wrocław, Poljska. U radu je ispitana njihova *in vitro* biološka aktivnost na humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa i MCF-7) te je određen mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja protočnom citometrijom i fluorescentnom mikroskopijom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FLAVONOIDI

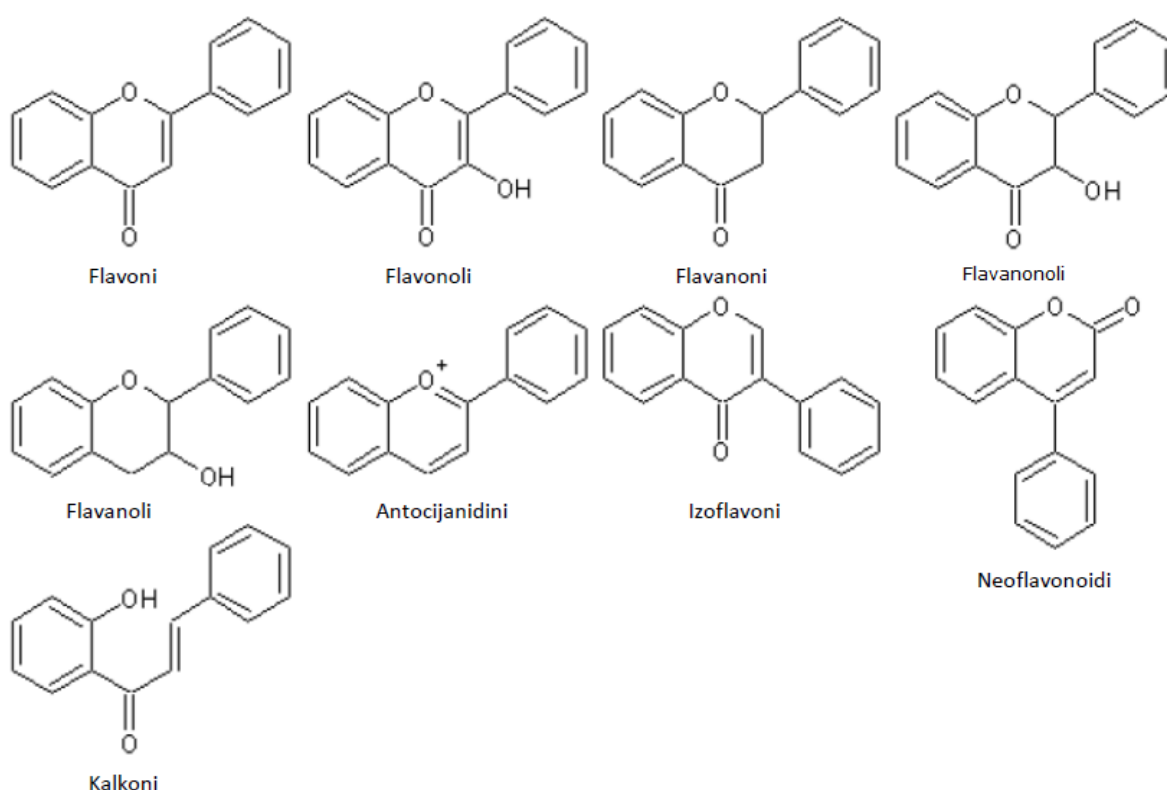
Flavonoidi su raznovrsna skupina fitonutrijenata, bioaktivni polifenoli niske molekularne mase koji su prisutni u voću, povrću i ljekovitim biljkama. Istraživanje flavonoida započelo je 1936. godine kada je mađarski znanstvenik Albert Szent-Gyorgi otkrio sinergiju između čistog vitamina C i još neidentificiranih kofaktora iz kore limuna koje je najprije nazvao citrin, a kasnije vitamin P (Karak, 2019). Kasnije je postalo jasno kako je ta supstanca flavonoid rutin (Kumar i Pandey, 2013), a do sada je sveukupno identificirano više od 6000 vrsta flavonoida (Rodríguez-García i sur., 2019).

Flavonoidi se pojavljuju kao aglikoni, glikozidi i metilirani derivati. Njihova biosinteza uključuje dva različita biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (Rodríguez-García i sur., 2019). Iako se u prirodi uglavnom javljaju u obliku glikozida, njihova je ekstrakcija često zahtjevna i skupa, kao i kemijska sinteza te se metoda biotransformacije pomoću mikroorganizama pokazala kao izvrsna za dobivanje flavonoidnih glikozida (Dymarska i sur., 2018). Kemijska priroda flavonoida ovisi o njihovoj strukturi, stupnju hidroksilacije, drugim supstitucijama i konjugacijama te stupnju polimerizacije (Kumar i Pandey, 2013). Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur difenil propana koji sadrži petnaest ugljikovih atoma u primarnoj jezgri: dva šesteročlana prstena povezana s jedinicom od tri ugljika koja može ili ne mora biti dio trećeg prstena. Dva benzenska prstena (prsten A i B) su međusobno povezana preko trećeg heterocikličkog pirenskog prstena (prsten C). Ova se struktura također naziva C6-C3-C6 i označava se kao A, B i C (slika 1) (Karak, 2019).



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida (Karak, 2019).

Flavonoidi se mogu podijeliti u različite podskupine (slika 2), što pruža iznimno raznolik raspon derivata, ovisno o ugljiku C prstena na koji je vezan B prsten i stupnju nezasićenosti i oksidacije C prstena. Flavonoidi u kojima je prsten B vezan u položaju 3 prstena C nazivaju se izoflavoni; oni u kojima je prsten B vezan u položaju 4 neoflavonoidi, a oni u kojima je prsten B vezan u položaju 2 se mogu podijeliti u nekoliko podskupina na temelju strukturnih značajki C prstena. Te podskupine su flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli ili katehini i antocijanidini, a flavonoidi s otvorenim C prstenom se nazivaju kalkoni (Karak, 2019).



Slika 2. Kemijske strukture podskupina flavonoida (Karak, 2019).

Izoflavoni su velika i karakteristična podskupina flavonoida koja se uglavnom nalazi u soji i drugim mahunarkama, a neki su pronađeni i u mikroorganizmima. Imaju važnu ulogu kao prekursori fitoaleksina tijekom interakcije biljki i mikroorganizama (Panche i sur., 2016). Također pokazuju veliki potencijal u borbi protiv mnogih bolesti (Wang i sur., 2018).

Neoflavonoidi su klasa polifenolnih spojeva sa okosnicom 4-fenilkromena bez supstitucije hidroksilne skupine na poziciji 2. Prvi izolirani neoflavon je kalofilolid iz sjemena *Callophyllum inophyllum* te je pronađen u kori i drvetu endemske biljke sa Šri Lanke *Mesua thwaitesii* (Panche i sur., 2016).

Flavoni su važna podskupina flavonoida prisutna u listovima, cvijeću i voću kao glukozidi. Glavni izvor flavona su celer, peršin, crvena paprika, kamilica, metvica i ginko biloba (Fraga i sur., 2019). Imaju dvostruku vezu između položaja 2 i 3 i ketona u položaju 4 prstena C. Većina flavona iz voća i povrća ima hidroksilnu skupinu na položaju 5 prstena A, dok se hidroksilacija u drugim položajima može razlikovati prema taksonomskoj klasifikaciji pojedinog voća i povrća (Panche i sur., 2016).

Flanonoli su flavonoidi s ketonskom skupinom i građevni su blokovi proantocijanina. Bogati izvor flavonola su luk, kelj, rajčica, jabuka, grožđe i bobice, a osim voća i povrća, čaj i crno vino (Fraga i sur., 2019). Imaju hidroksilnu skupinu u položaju 3 prstena C koji može biti glikoliziran (Wang i sur., 2018). Flanonoli imaju različite uzorke metilacije, hidroksilacije i glikolizacije te s obzirom na iste su najčešće i najveća podskupina flavonoida u voću i povrću (Panche i sur., 2016).

Flanononi su prisutni u svim citrusima kao što su naranče, limun i grožđe te su odgovorni za gorak okus soka i kore agruma. Imaju zasićenu vezu između položaja 2 i 3 u prstenu C (Panche i sur., 2016).

Flanonoli, koji se nazivaju i dihidroflanonoli ili katehini, su 3-hidroksi derivati flavanona. Nazivaju se i flavan-3-oli jer je hidroksilna skupina uvijek vezana na položaj 3 prstena C. Nemaju dvostruke veze između položaja 2 i 3, a izvor flavanola su banane, jabuke, borovnice, breskve i kruške (Panche i sur., 2016).

Antocijanidini su pigmenti odgovorni za boju biljaka, voća i povrća. Boja antocijana ovisi o pH, metilaciji ili acetilaciji hidroksilne skupine na A i B prstenovima. Stabilnost i zdravstvene koristi ovih spojeva olakšavaju njihovu upotrebu u prehrambenoj industriji u različitim primjenama (Panche i sur., 2016). Pojavljuju se uglavnom u vanjskim slojevima stanica plodova poput brusnica, grožđa, malina, jagoda, borovnica i kupina (Fraga i sur., 2019).

Kalkone karakterizira odsutnost C prstena te se nazivaju i flavonoidi otvorenog lanca (Wang i sur., 2018). Izvor kalkona su rajčice, jagode, kruške i određeni proizvodi od pšenice, te su privukli značajnu pozornost zbog brojnih prehrambenih i bioloških koristi (Panche i sur., 2016).

Flanonoidi imaju različite biološke aktivnosti u biljkama, životinjama i bakterijama. U biljkama se sintetiziraju na određenim mjestima i odgovorni su za boju i miris cvijeća, u voću privlače oprašivače čime pomažu u germinaciji spora i sjemena, te u rastu i razvoju sadnica. Također, flavanonoidi štite biljke od različitih biotičkih i abiotičkih stresova djelujući kao

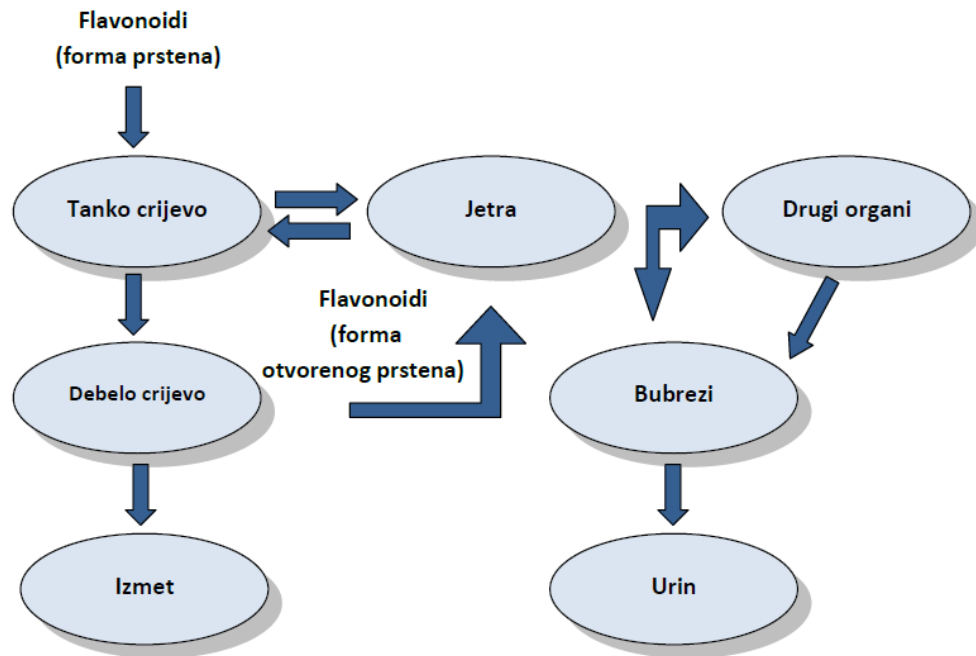
jedinstveni UV filteri, signalne molekule, alopatske komponente, agensi za detoksikaciju i antimikrobni obrambeni spojevi, te imaju ulogu u otpornosti na sušu, smrzavanje i toplinsku aklimatizaciju biljki (Panche i sur., 2016).

S obzirom da su fitokemikalije, flavonoide ne mogu sintetizirati ljudi i životinje, no oni čine sastavni dio njihove prehrane te se u organizam unose namirnicama biljnog porijekla (Kumar i Pandey, 2013). U ljudskoj prehrani u najvećoj količini su prisutni izoflavoni soje, flavonoli i flavoni (Karak, 2019). Flavonoidi u hrani mogu utjecati na kvalitetu i stabilnost iste budući da su odgovorni za boju, okus, sprječavanje oksidacije masti te za zaštitu vitamina i enzima u hrani. Priprema i prerada hrane može smanjiti razinu flavonoida u istoj ovisno o upotrijebljenim metodama. Također apsorpcija flavonoida iz hrane oslobođenih žvakanjem će ovisiti o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima poput molekularne mase, konfiguracije, lipofilnosti, topljivosti i pKa. Mogu se apsorbirati u tankom ili debelom crijevu ovisno o njihovoj strukturi, tj. jesu li glikozidi ili aglikoni (Kumar i Pandey, 2013). Flavonoidi kvalitativno i kvantitativno utječu na sastav mikrobne flore u lumenu debelog crijeva djelujući kao prebiotici čime podupiru rast bifidobakterija i laktobacila (Hoensch i Oertel, 2015). Iako se mnogi flavonoidi apsorbiraju i u određenoj količini se nalaze u cirkulaciji, njihove koncentracije u krvi u većini slučajeva nisu dovoljno visoke da ispune svoje stanične biološke funkcije *in vivo*. Opsežna konjugacija slobodnih hidroksilnih skupina je vjerojatno glavni razlog niske oralne biorasploživosti prehrambenih flavonoida (Walle, 2009). U radu iz 2009. godine Walle je ispitivao hipotezu da se blokiranjem slobodnih hidroksilnih skupina flavona metilacijom eliminira konjugacija kao primarni metabolički put što rezultira poboljšanom metaboličkom stabilnošću flavona. Prilikom istraživanja je dokazano da metilacija hidroksilnih skupina u flavonima rezultira metabolički stabilnijim derivatima s povećanim membranskim transportom, što dovodi do olakšane apsorpcije te stoga znatno poboljšane biorasploživosti. Metilacija sprječava stvaranje glukuronske kiseline i konjugata sulfata, smanjuje mogućnost toksičnih nuspojava i povećava topljivost (Walle, 2009). Stoga su metoksilirani flavonoidi poželjni za proizvodnju novih terapijskih agenasa (Dymarska i sur., 2018).

2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST FLAVONOIDA

Flavonoidi su povezani sa širokim spektrom učinaka koji povoljno utječu na zdravlje, pri čemu su mnogi organi uključeni u njihovo metaboliziranje (slika 3). Česta su komponenta u raznim nutritivnim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim pripravcima zbog njihovih

antioksidativnih, protuupalnih (Panche i sur., 2016), hepatoprotektivnih, antibakterijskih, antiviralnih i antikancerogenih svojstava (Kumar i Pandey, 2013), te kardioprotektivne, antidijabetske i aktivnosti protiv neurodegeneracije (Wang i sur., 2018).



Slika 3. Organi uključeni u metaboliziranje flavonoida u organizmu ljudi (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi posjeduju mnoga biokemijska svojstva, ali najbolje opisano svojstvo gotovo svake podskupine flavonoida je njihova sposobnost da djeluju kao antioksidansi. Antioksidacijska aktivnost im ovisi o raspodjeli funkcionalnih skupina u strukturi (Kumar i Pandey, 2013). Konfiguracija, zamjena i ukupan broj hidroksilnih skupina značajno utječe na mehanizme antioksidacijskog djelovanja kao što su uklanjanje radikala, sposobnost keliranja metalnih iona, aktivacija antioksidativnih enzima, inhibicija oksidaza, ublažavanje oksidacijskog stresa uzrokovanog dušikovim oksidom i povećanje antioksidativnih svojstava niskomolekularnih antioksidansa (Karak, 2019). Hidroksilna konfiguracija B prstena je najznačajnija odrednica uklanjanja ROS-a (eng. *reactive oxygen species*) i RNS-a (eng. *reactive nitrogen species*) jer donira vodik i elektron na radikale hidroksila, peroksila i peroksinitrita stabilizirajući ih i dovodeći do relativno stabilnog flavonoidnog radikala. Flavonoidi također štite stanične membrane koje su oštećene zbog lipidne peroksidacije te prema tome doprinose kao antioksidansi u prevenciji mnogih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom (Kumar i Pandey, 2013).

Upalna stanja su uobičajena u kliničkoj medicini. To su složeni biološki odgovori tjelesnih tkiva na štetne stimulanse kao što su infekcija patogena, oštećene stanice, ozljeda tkiva i kemijska iritacija. Upala nastaje zbog migracije imunoloških stanica iz krvnih žila i oslobađanja kemijskih medijatora na mjestu oštećenja tkiva (Karak, 2019). Zatim slijedi regrutiranje upalnih stanica, oslobađanje ROS-a, RNS-a i proupalnih citokina da bi se uklonili strani patogeni i popravilo oštećeno tkivo (Kumar i Pandey, 2013). Vjeruje se da je kronična upala osnova za mnoge degenerativne poremećaje kao što su kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, reumatska oboljenja, osteoartritis, leukemija, astma, sepsa te da na početak i razvoj navedenih bolesti mogu značajno utjecati flavonoidi (Hoensch i Oertel, 2015). Određeni flavonoidi djeluju na funkciju imunološkog sustava i upalnih stanica, inhibirajući enzime poput kinaza i sintaza uključenih u stvaranje upalnih procesa te fosfodiesteraza uključenih u staničnu aktivaciju te drugih medijatora upalnih procesa poput citokina, kemokina i adhezijskih molekula (Kumar i Pandey, 2013).

Također, budući da biljke mogu sintetizirati flavonoide kao odgovor na mikrobnu infekciju, oni su vrlo učinkoviti kao antimikrobne tvari protiv velikog broja mikroorganizama. Stoga, biljni ekstrakti bogati flavonoidima poput flavona, izoflavona, flavanona iz različitih biljaka posjeduju snažno antimikrobno djelovanje koje može biti povezano s njihovom sposobnošću inaktivacije mikrobnih adhezina, enzima, transportnih proteina stanične ovojnice (Karak, 2019).

Još iz davnih 1940-tih je u mnogim radovima pokazano kako flavonoidi posjeduju izvanrednu antivirusnu aktivnost tako što djeluju na inhibiciju raznih enzima povezanih sa životnim ciklusom virusa. Uočen je strukturni i funkcionalni odnos između flavonoida i njihove aktivnosti inhibicije enzima (Kumar i Pandey, 2013). Flavan-3-ol se pokazao učinkovitijim od flavona i flavonona u selektivnoj inhibiciji HIV-1 i HIV-2. Također, različite kombinacije flavona i flavonola pokazuju sinergizam protiv herpes simplex virusa (HSV) i drugih virusnih infekcija (Karak, 2019).

Poznato je kako neki flavonoidi poput katehina, rutina, apigenina, kvercetina, venorutona i naringenina imaju hepatoprotektivnu aktivnost koja je od osobite važnosti tijekom različitih kroničnih bolesti kao što je dijabetes. Tako npr. flavonoid silimarin stimulira enzimsku aktivnost RNA-polimeraze što rezultira staničnom proliferacijom i regeneracijom oštećene jetre. Farmakološka svojstva silimarina, također, uključuju regulaciju permeabilnosti i integriteta stanične membrane, inhibiciju leukotriena, uklanjanje ROS-a, depresiju protein kinaza i proizvodnju kolagena te ima kliničku primjenu u liječenju ciroze

jetre, ishemijskih ozljeda i toksičnog hepatitisa induciranih raznim toksinima (Kumar i Pandey, 2013).

U prevenciji kardiovaskularnih bolesti ključna je uloga flavonoida iz kore jabuke, brusnica, luka i raznog drugog bilja. Također, postoje mnoge studije koje ukazuju na povoljan učinak konzumiranja flavonoida. No, kako bi se utvrdila pretpostavljena važnost flavonoida u kardiovaskularnoj zaštiti nužno je istražiti različite podskupine flavonoida u farmakološkim ispitivanjima (Wang i sur., 2018).

Dijabetes melitus (DM) je kronična hiperglikemijska bolest i brojne studije podržavaju hipoglikemijsko djelovanje flavonoida. Učinkoviti su jer djeluju i smanjuju popratne tegobe koje se razvijaju tijekom te kronične bolesti (Wang i sur., 2018).

Također, nedavne studije o različitim biljnim metabolitima su pokazale da flavonoidi mogu imati važnu ulogu u funkcioniranju enzimskih sustava i receptora u mozgu te da mogu značajno utjecati na središnji živčani sustav i prevenirati neurodegeneraciju i Parkinsonovu bolest (Panche i sur., 2016).

2.2.1. Antitumorsko djelovanje flavonoida

Rak je jedna od bolesti koja ima najveći utjecaj na društvo. Iako se učestalost bolesti tijekom godina povećava, smrtnost se smanjila zbog napretka u liječenju. Međutim, i nadalje su potrebne mjere kojima bi se poboljšala prevencija raka. Da bi organizam bio zdrav, svi biološki procesi u organizmu moraju biti u homeostazi, a kada nastupi neravnoteža određenih staničnih procesa to može za rezultat imati razvoj različitih oboljenja. Tako npr. kada je antioksidativna obrana nadjačana proizvode se u većoj količini ROS-ovi i drugi slobodni radikali. Oksidativni stres karakteriziran je količinom proizvedenih ROS-ova i blisko je povezan sa bolestima poput raka (Rodríguez-García i sur., 2019). Rak je višestupanjska bolest kojoj pridonose fizički, okolišni, metabolički, kemijski i genetski čimbenici koji imaju važnu ulogu u nastanku i razvoju raka. Mnogi polifenolni spojevi kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, antocijanidini i tanini posjeduju širok spektar farmakoloških aktivnosti uključujući i antikancerogenu aktivnost (Karak, 2019). Prehrana je jedan od faktora i načina života koji utječe kako na učestalost razvoja raka tako i na stopu smrtnosti. Nedavno je nekoliko studija pokazalo da je prehrana koja se temelji na visokoj razini unosa voća i povrća snažno povezana sa značajnim smanjenjem rizika od razvoja ove bolesti (Rodríguez-García i sur., 2019).

Različiti mehanizmi su povezani s ulogom flavonoida u prevenciji i/ili terapiji raka, uključujući indukciju apoptoze, inhibiciju proteasoma, indukciju diferencijacije i zaustavljanja staničnog ciklusa, interakcije s određenim receptorima ili s kancerogenim enzimima. Štoviše, flavonoidi mogu pokazivati specifičnu citotoksičnost prema stanicama raka, što je temelj razvoja novih citostatika temeljenih na flavonoidima kao sredstvima u borbi protiv raka (Wang i sur., 2018). Glavni molekularni mehanizam učinka flavonoida je smanjenje ekspresije mutiranog proteina p53, što je najčešća genetska abnormalnost u raznim tipovima karcinoma kod ljudi. Flavonoidi također mogu djelovati na zaustavljanje staničnog ciklusa, inhibiciju tirozin kinaza uključenih u onkogenezu, sposobnost vezanja estrogenskog receptora i inhibiciju ekspresije Ras proteina kao i proteina toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*) koji omogućavaju preživljavanje stanica raka pod različitim tjelesnim stresovima (Kumar i Pandey, 2013).

Prema podacima GLOBOCAN-a (eng. *Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence*) vrste raka s najvećom incidencijom kod muškaraca su rak pluća, prostate, želuca, jetre i debelog crijeva. Za žene su to rak dojke i rak pluća. U raznim je studijama pokazano kako je konzumacija flavonoida poput izoflavona, flavanona i proantocijanidina smanjila incidenciju raka pluća; visoki unos katehina i flavonola značajno reducira rizik od nastanka raka prostate; flavonoidi značajno reduciraju rizik od raka želuca kod žena, no to nije pokazano i kod muškaraca; flavoni, flavanoni i antocijanidini smanjuju rizik od nastanka raka debelog crijeva dok ukupni unos polifenola smanjuje rizik od nastanka raka dojke žena u menopauzi. Stoga, budući da su glavni izvori ovih flavonoida različiti, rizik od nastanka raka se može smanjiti uključivanjem voća i povrća, cjelovitih žitarica, mahunarki, sjemenki i orašastih plodova, kave, čajeva i voćnih sokova u svakodnevnu prehranu. Međutim potrebne su daljnje studije kako bi se potvrdila hipoteza da zdrava prehrana smanjuje učestalost različitih vrsta raka (Rodríguez-García i sur., 2019).

2.3. TESTOVI ZA *IN VITRO* ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI PRIMJENOM KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA

Značajan napredak u području rane medicine bilo je Paracelsusovo zapažanje kako svaka tvar može biti lijek ili otrov ovisno o dozi te je upravo zbog toga ispitivanje toksičnosti nužno kako bi se utvrdile sigurnosne granice za sve nove potencijalne kemoterapeutike, a *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti su uveliko pojednostavila taj proces (Niles i sur., 2009).

Razna fizička i kemijska sredstva mogu utjecati na zdravlje stanica i metabolizam. Između ostalog, ta sredstva mogu djelovati citotoksično na stanice različitim mehanizmima kao što su uništavanje staničnih membrana, prevencija sinteze proteina, ireverzibilno vezanje na receptore, inhibicija produljenja polideoksinukleotida i enzimskih reakcija (Aslantürk, 2018). Rezultat djelovanja navedenih sredstava uvelike ovisi o duljini izloženosti pojedinom spoju te mehanizmu citotoksičnosti (Niles i sur., 2009). Razina vijabilnosti i/ili stope proliferacije stanica su dobri pokazatelji zdravlja stanica. Stoga su *in vitro* testovi citotoksičnosti i vijabilnosti stanica primjenom kultura stanica u širokoj upotrebi iz niza razloga. *In vitro* testovi citotoksičnosti su brzi, jeftini, ne zahtijevaju upotrebu životinja, korisni su za testiranje velikog broja uzoraka i moguća je automatizacija istih, no nedostatak im je što nisu dovoljno napredni da u potpunosti zamjene pokuse na životinjama (Aslantürk, 2018). Širok spektar testova citotoksičnosti i stanične vijabilnosti se trenutno koristi u području farmakologije i toksikologije, a baziraju se na različitim staničnim funkcijama poput propusnosti stanične membrane, aktivnosti enzima, prijanjanju stanica, proizvodnji ATP-a (adenozin trifosfat), proizvodnji enzima i aktivnosti preuzimanja nukleotida (Niles i sur., 2009). Izbor metode analize je presudan u procjeni tipa interakcije. Postoje različite klasifikacije za testove citotoksičnosti i stanične vijabilnosti, no s obzirom na vrstu mjerenja krajnjeg ishoda razlikuju se testovi isključenja boje, kolorimetrijski, fluorometrijski i luminometrijski testovi (Aslantürk, 2018).

Najjednostavnija i najkorištenija metoda za određivanje udjela živih stanica u staničnoj populaciji je metoda isključivanja boje pri kojoj žive stanice isključuju boje za razliku od mrtvih stanica. Testovi isključivanja boje imaju mnoge prednosti poput jednostavnosti i brzine izvedbe prilikom ispitivanja kemosenzitivnosti. Međutim, nijedna od navedenih boja nije preporučljiva za upotrebu na monoslojnim staničnim kulturama, već sa stanicama u suspenziji (Aslantürk, 2018).

Tripan plavo je test isključivanja boje koji se koristi za određivanje broja živih i/ili mrtvih stanica u suspenziji stanica, a temelji se na principu da žive stanice imaju netaknute stanične membrane koje isključuju boje, dok mrtve stanice nemaju i citoplazma im se oboji u plavo što se određuje svjetlosnom mikroskopijom. Prednosti metode su što je jednostavna, jeftina i dobar pokazatelj integriteta membrane, a mrtve se stanice oboje u plavo unutar sekunde nakon izlaganja boji (Aslantürk, 2018). Nedostaci su što može doći do greške u brojanju koje se obično izvodi pomoću hemocitometra, teško je obraditi veliki broj uzoraka istovremeno, metoda se ne može koristiti za razlikovanje zdravih i živih stanica stoga nije

dovoljno osjetljiva za *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti te su moguće toksične nuspojave boje na stanicama (Kim i sur., 2015).

Eritrozin B poznat kao eritrozin se primarno koristi kao agens za bojanje hrane. Princip ovo testa isključivanja boje sličan je principu tripan plavog, no nije u širokoj upotrebi iako je alternativna metoda za brojanje stanica (Aslantürk, 2018). Prednosti metode su niska cijena, raznovrsnost i biosigurnost. Nedostaci su dugotrajna procedura, moguće su kontaminacije komora za brojanje stanica te varijacije stope punjenja hemocitometra (Kim i sur., 2015).

Kolorimetrijski testovi se temelje na mjerenju biokemijskih markera prilikom procjene metaboličke aktivnosti stanica. Reagensi koji se pritom koriste razvijaju boju kao odgovor na vijabilnost stanica koja se mjeri spektrofotometrijski. Kolorimetrijski testovi su primjenjivi za adherentne i suspendirane stanične linije, lako se izvode i ekonomični su (Präbst i sur., 2017).

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolijev bromid) test je jedan od najčešće korištenih kolorimetrijskih testova za ispitivanje citotoksičnosti ili vijabilnosti stanica mjerenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima čime se određuje mitohondrijska funkcija stanica (Aslantürk, 2018). Ova je metoda superiornija od metoda isključivanja boje jer je jednostavna, sigurna, ima visoku reproducibilnost i u širokoj je upotrebi. Nedostaci su što je MTT formazan netopiv u vodi i formira kristaliće u stanicama te je citotoksičan i potrebno je provesti dodatne kontrolne pokuse kako bi se smanjila pojava lažno pozitivnih ili negativnih rezultata (Bopp i Lettieri, 2008). Nedostatak klasičnog MTT testa, nastanak kristala formazana koje je prije mjerenja potrebno otopiti dodatkom organskog otapala, je riješen u novijim izvedbama tog testa u kojima se koriste druge tetrazolijeve soli (MTS, XTT, WST-1) čiji je produkt topiv u mediju u kojem se uzgajaju stanice.

Druge kolorimetrijske metode, prethodno spomenute, bazirane na tetrazolijevim solima su MTS (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazolij) test, XTT (2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-karboksanilid-2H-tetrazolij, mononatrijeva sol) i WST-1 (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolij mononatrijeva sol) test. Navedeni se testovi temelje na konverziji tetrazolijeve soli mitohondrijskom aktivnošću živih stanica u obojeni formazan koji se mjeri spektrofotometrijski pri čemu postoji linearna ovisnost intenziteta formazana i broja živih stanica. Prednosti ovih metoda su što su jednostavne, precizne, brze, ekonomične, točne i u širokoj upotrebi. Nedostaci su im što na stupanj apsorpcije utječe vrijeme inkubacije, vrsta i broj stanica te drugi okolišni čimbenici (Aslantürk, 2018).

Test citotoksičnosti LDH (laktat dehidrogenaze) je kolorimetrijska metoda koja spektrofotometrijski mjeri LDH. Laktat dehidrogenaza koja se normalno nalazi u staničnoj citoplazmi, prilikom smanjivanja vitalnosti stanica i povećanja propusnosti plazmine membrane se oslobađa u medij za uzgoj kulture stanica i mjeri pomoću enzimske reakcije dijaforazom koja rezultira redukcijom tetrazolijeve soli (jodonitrotetrazolij, INT) u crveno obojani formazan. Metoda je brza, jednostavna i pouzdana, a glavno je ograničenje da serum ili drugi spojevi mogu imati LDH aktivnost (Niles i sur., 2009).

Test unosa neutralno crvene boje (NRU, eng. *neutral red uptake*) je jedan od najčešće korištenih kolorimetrijskih testova citotoksičnosti i vijabilnosti stanica. Temelji se na sposobnosti živih stanica da preuzmu neutralnu crvenu boju. Ova kationska boja prodire u stanične membrane neionskom pasivnom difuzijom i koncentrira se u lizosomima, zatim se ekstrahira iz vitalnih stanica pomoću zakiseljene otopine etanola i apsorbancija boje se mjeri spektrofotometrom. Unos neutralne crvene se modificira ovisno o promjenama na površini stanice ili lizosomalne membrane vijabilnih stanica te je stoga moguće razlikovati vijabilne, oštećene i mrtve stanice (Aslantürk, 2018).

Jednostavna kolorimetrijska metoda za otkrivanje održivosti adherentnosti stanica je bojanje kristal ljubičastim. U ovom se testu kristal ljubičasta boja veže na proteine i DNK živih stanica te ih oboji, dok tijekom stanične smrti stanice gube adherentnost te se ujedno smanjuje obojenje u kulturi. Brza je i pouzdana metoda provjere utjecaja kemoterapeutika ili drugih spojeva na stanično preživljenje i inhibiciju rasta, no nije moguće mjeriti stopu proliferacije stanica (Feoktissova i sur., 2016).

Fluorometrijski testovi stanične vijabilnosti i citotoksičnosti nude mnoge prednosti u odnosu na tradicionalne metode isključivanja boje i kolorimetrijske analize od kojih su osjetljiviji. Primjenjivi su za adherentne i za suspenzijske stanične linije te se lako provode uz uporabu fluorescencijskog mikroskopa, fluorometra, protočne citometrije ili fluorescentnog čitača mikroploča (Aslantürk, 2018).

Reduktivni kapacitet svojstven živim stanicama može biti izmjeren pomoću redoks indikatora resazurina. Test redukcije resazurina se temelji na pretvorbi plave nefluorescentne boje resazurin u ružičasti fluorescentni resorufin pomoću mitohondrijskih i drugih enzima kao što su dijaforaze. Test je relativno jeftin i osjetljiviji je od kolorimetrijskih testova, a glavni nedostatak je što produljeno vrijeme inkubacije reagensa može izazvati toksičan učinak na stanice (Niles i sur., 2009).

CFDA-AM (5-karboksifluorescein diacetat, acetoksimetil eter) je fluorogenska boja koja je indikator integriteta plazmine membrane. Ona je netoksični supstrat nespecifičnih esteraza vijabilnih stanica koje ju konvertiraju iz nepolarne, nefluorescentne tvari koja prolazi kroz membranu u polarnu, fluorescentnu boju karboksifluorescein (CF). Nedostatak je metode što je moguća fluorescentna interferencija ispitivanih spojeva (Aslantürk, 2018).

Fluorogeni supstrat proteaza GF-AFC (glicilfenilalanin-aminofluorokumarin) koji prodire u stanice je razvijen da selektivno detektira aktivnost proteaze koja je ograničena na žive stanice. Supstrat procesiraju aminopeptidaze u citoplazmi te je nakon proteolize nastali AFC proporcionalan broju živih stanica te se vijabilnost mjeri fluorometrom. Metoda je relativno netoksična za stanice i pogodna je za multipleksiranje s drugim testovima, nedostatak je što je moguća fluorescentna interferencija ispitivanih spojeva (Niles i sur., 2009).

Luminometrijski testovi omogućuju brzo i jednostavno određivanje proliferacije i citotoksičnosti stanica sisavaca. Značajka ovih testova je postojan i stabilan sjajni signal proizveden nakon dodatka reagensa (Aslantürk, 2018).

Kvantifikacija ATP-a je općeprihvaćena metoda za ispitivanje vijabilnosti stanica jer zdrave stanice sadrže strogo regulirane razine biomarkera. Kada su stanice oštećene, gube sposobnost sintetiziranja ATP-a i njegova se razina u stanici smanjuje. Test ATP-a se temelji na reakciji luciferina u oksiluciferin koju katalizira luciferaza u prisutnosti Mg^{2+} iona i ATP-a dajući luminiscentni signal. Ovaj je test najbrži i najosjetljiviji za ispitivanje vijabilnosti stanica (Niles i sur., 2009).

Razvijen je novi pristup za mjerenje broja živih stanica u realnom vremenu. U ovome testu se pro-supstrat (koji nije supstrat luciferaze) i luciferaza dodaju izravno kao reagens u medij za kulturu stanica. Žive stanice s aktivnim metabolizmom reduciraju pro-supstrat u supstrat koji luciferaza koristi generirajući luminiscentni signal. Ovo je jedini test koji omogućuje mjerenje stanične vijabilnosti i citotoksičnosti u stvarnom vremenu, no nedostatak je što luminiscentni signal korelira sa metabolički aktivnim stanicama i duljina trajanja signala ovisi o broju vijabilnih stanica i njihovoj metaboličkoj aktivnosti što se određuje empirijski (Duellman i sur., 2015).

Trenutno se u području toksikologije i farmakologije koristi širok spektar testova ispitivanja citotoksičnosti i vijabilnosti stanica. Idealni *in vitro* testovi trebaju biti brzi, pouzdani, sigurni, učinkoviti te vremenski i cijenom isplativi. Metodu analize treba odabrati uzimajući u obzir mehanizam djelovanja ispitivanog spoja i tipova tkiva ili stanica koje se pri

tome upotrebljavaju. Stoga, prije odabira testa treba ispitati i usporediti različite metode i, ako je moguće, ispitati citotoksičnost i vijabilnost stanica u *in vitro* studijama s više testova kako bi bila veća pouzdanost rezultata (Aslantürk, 2018).

2.3.1. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti flavonoida primjenom kultura stanica

Brojni su znanstvenici pokazali kako su flavonoidi sposobni inhibirati proliferaciju stanica raka i odgoditi razvoj tumora suzbijanjem metastaza, angiogeneze i regulacijom mnogih signalnih putova povezanih s apoptozom. Ove osobine flavonoida su temelj novih platformi za moduliranje tumorske signalizacije, prevladavanje kemorezistentnosti i rearanžman tumorskog mikrookoliša (Sudhakaran i sur., 2019). Stoga, općenito se smatra da konzumiranje hrane bogate flavonoidima može pomoći u sprječavanju nastanka i/ili razvoja raka (Razak i sur., 2019). Nacionalni institut za rak (NCI, eng. *National Cancer Institute*) je također ukazao da je prevencija bolesti ključna komponenta u smanjenju broja oboljelih od raka te da se zdravom, biljnom prehranom, fizičkom aktivnošću i održavanjem zdrave tjelesne težine može postići prevencija iste (Hui i sur., 2013). Međutim, nedosljedni rezultati učinaka flavonoida na kancerogenezu ukazali su na činjenicu da različite podskupine flavonoida imaju različita svojstva i učinke te da su potrebna daljnja istraživanja u tom smjeru.

Karcinom dojke najčešći je oblik raka prisutnog kod žena u svijetu i drugi je vodeći uzrok smrti, nakon raka pluća. Razak i sur. su u svojoj studiji iz 2019. godine istraživali citotoksičan učinak i indukciju apoptoze djelovanjem eupatorina na MCF-7 i MDA-MB-231 stanice *in vitro*. Eupatorin je metoksiflavon koji pokazuje veliki potencijal kao kemoprevencijski agens u staničnim kulturama te je poznat kao antiproliferacijski i antimitotički flavonoid. Njihovi rezultati su pokazali kako eupatorin uzrokuje inhibiciju stanične proliferacije navedenih stanica ovisno o dozi i vremenu izloženosti te da može djelovati kao induktor apoptoze ili inhibitor rasta stanica (Razak i sur., 2019). Hui i suradnici su u studiji 2013. godine naveli kako konzumiranje flavonola i flavona može pomoći prevenciji raka dojke, naročito kod žena u postmenopauzi.

Rak grlića maternice je, također, bolest koja zahvaća veliki broj žena u svijetu te su Szliszka i suradnici u studiji 2008. godine pokazali kako flavoni, apigenin i genistein, djeluju citotoksično na HeLa stanice putem faktora nekroze tumora te su stoga obećavajući agensi za kemoprevenciju i terapiju raka grlića maternice. Citotoksičan učinak flavonoida ekstrahiranih

iz biljke *Morus alba* na HeLa stanice pokazali su također Fallah i suradnici u studiji 2017. godine potvrdivši ga posljedičnom apoptozom stanica i fragmentacijom DNK.

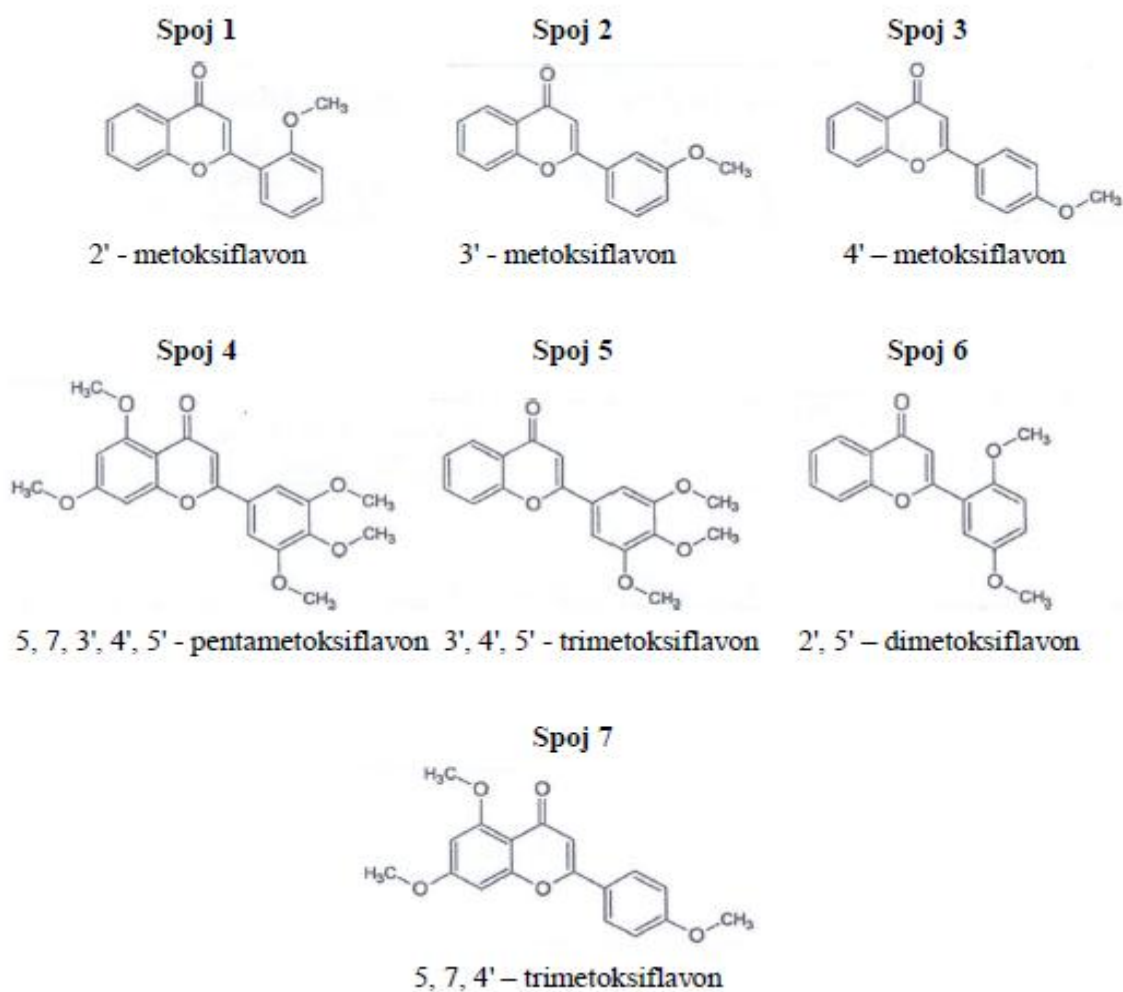
Iako je vrijednost flavonoida općeprihvaćena, potrebna su daljnja istraživanja njihovog potencijala u prevenciji i liječenju karcinoma kako bi se ubrzao početak njihova korištenja u kliničkim studijama (Sudhakaran i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Flavonoidi

U ovom diplomskom radu provedena je biološka evaluacija sedam spojeva podskupine flavonoida, metoksiflavona sintetiziranih u Zavodu za kemiju, Sveučilišta u Wrocław-u, Wrocław, Poljska (slika 4). Flavonoidi su sintetizirani, a zatim prevedeni u njihove glikozilirane derivate reakcijama biotransformacija pomoću devet entomopatogenih sojeva gljiva *Beauveria bassiana*, *B. caledonica*, *Isaria farinosa* i *I. fumosorosea* vrste.



Slika 4. Kemijska struktura ispitivanih metoksiflavona.

3.1.2. Kemikalije

- 0,25 % Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Fluorescein diacetat (FDA), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega, SAD
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4):

- | | |
|------------------------------------|------------|
| • NaCl | 8,0 g |
| • KCl | 0,2 g |
| • Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g |
| • KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |
| • Destilirana voda | do 1000 mL |

Otopina tripan-plavo (0,4 %):

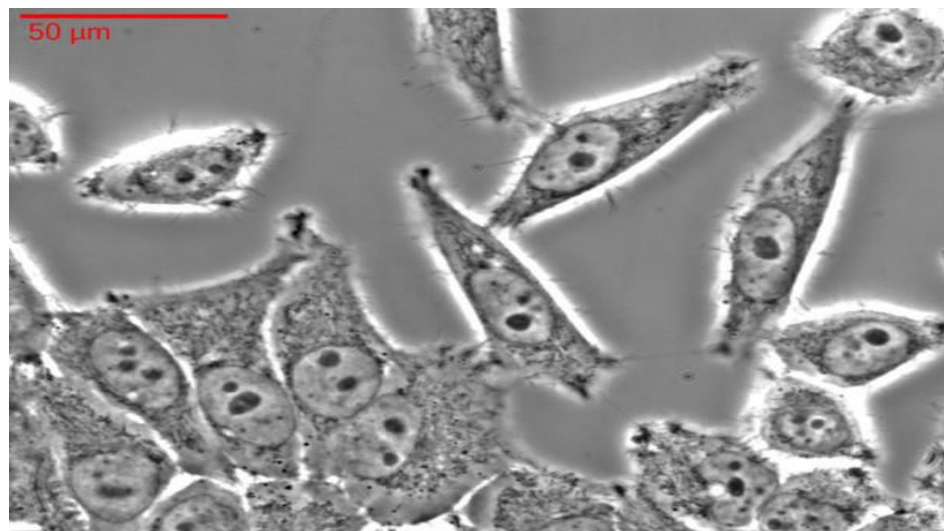
- | | |
|---------------------|----------|
| • Boja tripan-plavo | 0,04 g |
| • PBS pufer | do 10 mL |

FDA otopina za bojanje

- FDA (5 mg mL^{-1}) 8 μL
- Medij za uzgoj stanica bez FBS 5 mL

3.1.4. Humane stanične linije

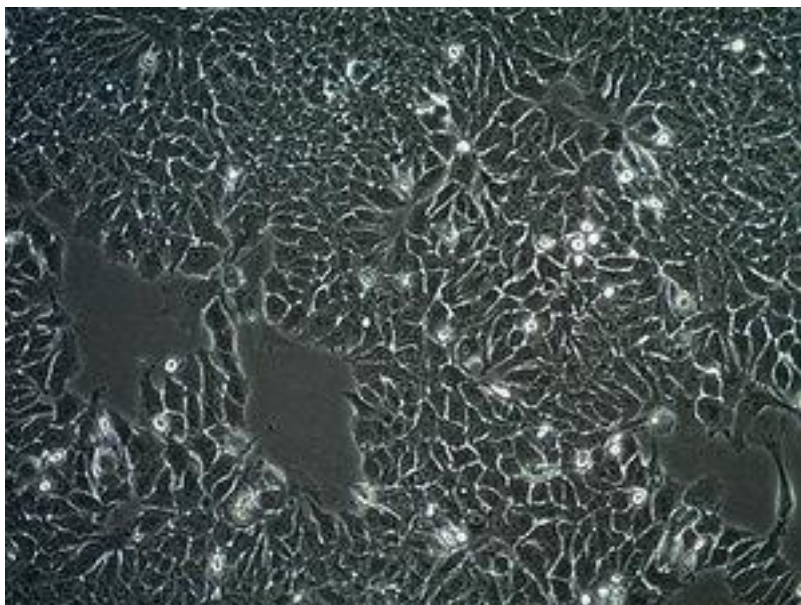
U ovom radu korištene su tumorske humane stanične linije HeLa i MCF-7 dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Stanična linija HeLa (slika 5) je prva uzgojena kultura stanica malignog tumora u povijesti, a dobile su ime po Henrietti Lacks iz čijeg su adenokarcinoma vrata maternice izolirane. HeLa stanice se neprestano repliciraju te su zbog toga izvrsne i najviše korištene stanice za eksperimentalnu biologiju. Potvrda tome je i činjenica da se svaki mjesec objavi više od 300 znanstvenih članaka o istraživanjima provedenim na njima. HeLa stanice su utrle put za mnoge druge besmrtno stanične linije i znanstvena bi povijest bez njih bila značajno drugačija (Anonymus 1, 2019).



Slika 5. HeLa stanična linija (Anonymus 1, 2019).

MCF-7 (slika 6) je stanična linija karcinoma epitela izolirana 1970. godine iz adenokarcinoma dojke šezdesetdevetogodišnje žene, a uspostavljena je 1973. godine u Michigan Cancer Foundation-7 institutu u Detroitu po kojem je dobila ime. MCF-7 stanice su korisne za *in vitro* studije raka dojke kao rezultat stanične linije koja zadržava nekoliko idealnih karakteristika, posebno u epitelu dojke, koje uključuju i njihovu sposobnost da

procesiraju estrogen u obliku estradiola preko estrogenskih receptora u staničnoj citoplazmi (Anonymus 2, 2019).



Slika 6. MCF-7 stanična linija (Anonymus 3, 2019).

3.1.5. Uređaji i oprema

- Analizator staničnog zdravlja Muse (eng. *Muse™ Cell Analyzer*), Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Fluorescentni mikroskop „EVOS FLoid Cell Imaging Station“, Thermofisher, SAD
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, Eppice)
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Petrijeve posude za kulture stanica, Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

3.2. METODE

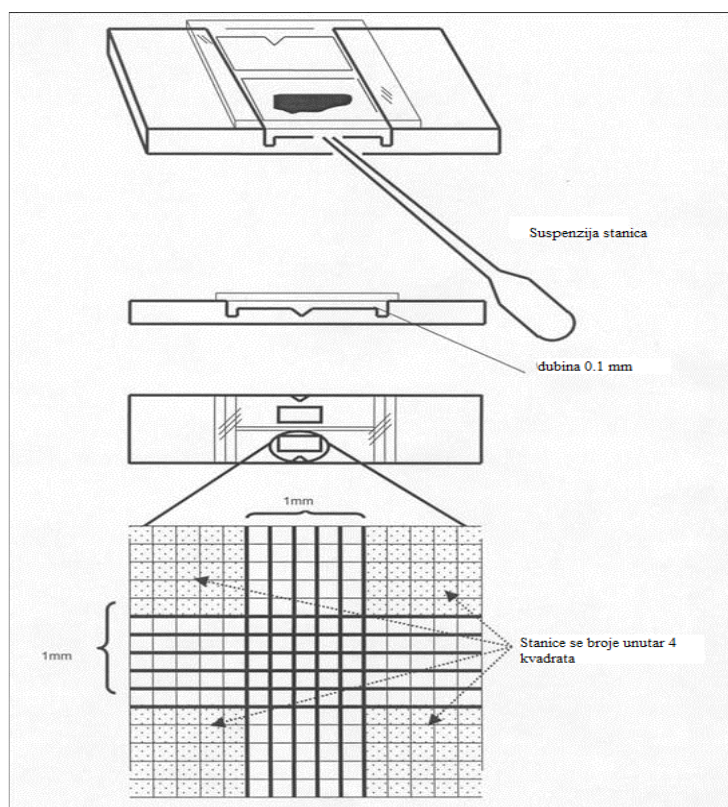
3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice su uzgajane u DMEM mediju uz dodatak 10 % (v/v) FBS-a u plastičnim Petrijevim zdjelicama za održavanje biomase stanica za potrebe postavljanja pojedinačnih eksperimenata. U pločama s jažicama postavljeni su pojedinačni eksperimenti u kojima se ispitala biološka aktivnost sintetiziranih metoksiflavona. Uzgoj stanica se provodio u kontroliranim uvjetima u inkubatoru s reguliranom atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ na temperaturi od 37 °C.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Za određivanje broja stanica prihvaćenih na površinu petrijevke najprije se uklonio hranjivi medij sa serumom i potom se dodao potreban volumen tripsina. Petrijevka je zatim vraćena u inkubator na 4-5 minuta kako bi se stanice zbog djelovanja tripsina odvojile od površine. Djelovanje tripsina praćeno je pod inverznim mikroskopom, kada su se stanice zaokružile i odvojile od površine dodan je volumen svježeg medija sa serumom proporcionalan volumenu dodanog tripsina kako bi se zaustavilo njegovo djelovanje. Alikvot suspenzije stanica (20 µL) je pomiješan s 20 µL boje tripan-plavo te se 10 µL nanijelo na Neubauer komoricu za brojanje stanica, koja sadrži 4 velika kvadrata, od kojih svaki sadrži 16 manjih kvadratića (slika 7). Stanice su brojane u svim kvadratima, a broj stanica po mL suspenzije se računao prema izrazu:

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{zbroj stanica u 4 velika kvadrata} \times 5000 \quad (1)$$



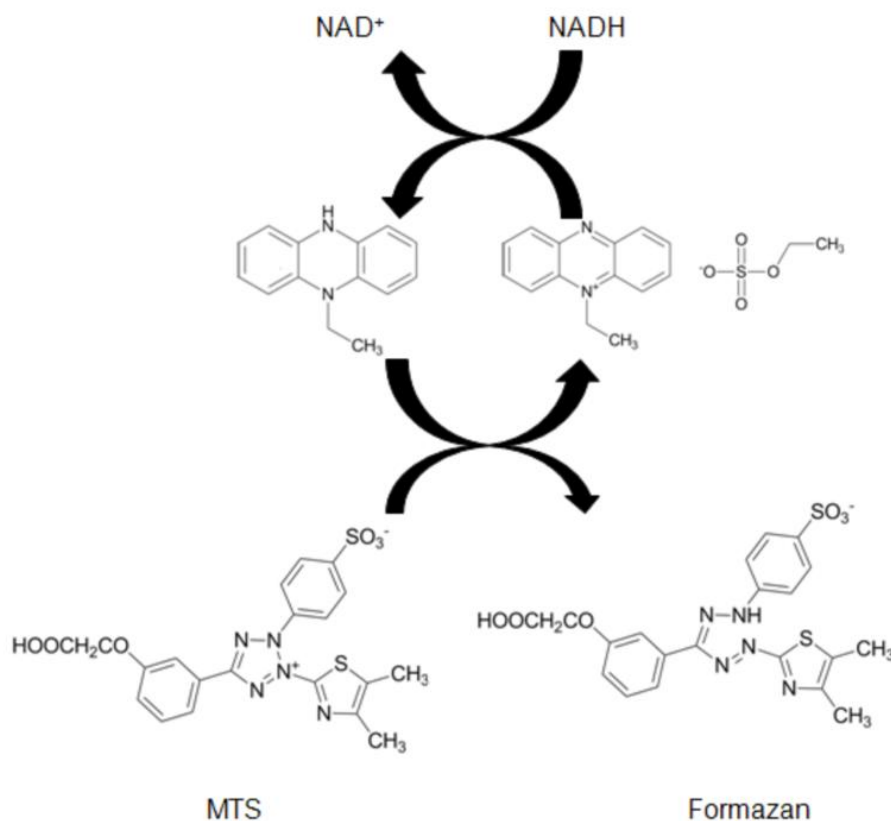
Slika 7. Neubauer-ova komorica (Anonymous 4, 2019).

3.2.3. Tretman stanica ispitivanim flavonoidima i određivanje preživljenja stanica MTS metodom

Za potrebe svakog eksperimenta HeLa i MCF-7 stanice su u eksponencijalnoj fazi rasta tripsinizirane, izbrojane uz dodatak boje tripan-plavo te nacijepljene u ploče sa 96 jažica u početnoj koncentraciji od 3×10^4 stanica mL^{-1} i volumenu od $100 \mu\text{L}$ po jažici. Nakon 24 sata od nacijepljivanja stanice su tretirane ispitivanim sintetiziranim metoksiflavonima u koncentracijama od $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ i $200 \mu\text{M}$, a za svaku koncentraciju postavljene su po tri paralele. Svaki pokus je ponovljen 2 ili 3 puta. Ploča s jažicama je vraćena na inkubaciju pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na 72 sata nakon čega se odredio citotoksičan učinak primjenom kolorimetrijske MTS metode pri čemu je iz jažica uklonjen medij s ispitivanom tvari te je u svaku jažicu dodano $100 \mu\text{L}$ svježeg medija s MTS reagensom (10 % v/v).

Navedeni reagens sadrži MTS, tetrazolijevu sol, i fenazin etosulfat (PES), intermedijarni akceptor elektrona koji povećava stabilnost reagensa. MTS se reducira u obojeni produkt, formazan, djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u metabolički

aktivnim stanicama pri čemu se koenzimi NADPH ili NADH oksidiraju u NADP⁺ ili NAD⁺ (Anonymus 5, 2019) (slika 8).



Slika 8. Struktura intermedijarnog akceptora elektrona fenazin etosulfata (PES), MTS-a i formazana u reakciji MTS testa u kojoj PES prenosi elektrone iz NADH u citoplazmi i reducira MTS dodan u mediju za uzgoj u topivi oblik formazana (Anonymus 6, 2019).

Stanice su potom vraćene na inkubaciju tijekom 3 sata te je primjenom čitača ploča spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm u odnosu na slijepu probu izmjeren intenzitet razvijene boje. Izmjerena apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u mjerenoj jažici. Vijabilnost stanica je izražena kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih, kontrolnih, stanica prema izrazu:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{490} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{490} \text{ kontrole}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.4. Praćenje vijabilnosti stanica bojanjem s fluorescein diacetatom i primjenom fluorescentne mikroskopije

U ploče s jažicama nacijeppljeno je oko 3×10^4 stanica mL^{-1} , te su ploče stavljene na inkubaciju u kontroliranim uvjetima u inkubatoru. Nakon 24 sata od nacijeppljivanja stanice su tretirane različitim koncentracijama ispitivanog spoja. Kvalitativna analiza stanica provedena je 72 sata nakon tretmana bojanjem s fluorescein diacetatom (FDA). FDA je nenabijena fluorescentna boja koja može proći kroz membranu stanica, a unutar stanice ju esterificiraju esterase. Hidrolizom FDA nastaje fluorescein, koji fluorescira zeleno, i koji zbog svoje polarnosti više ne može izaći iz žive stanice, dok iz stanice s oštećenom membranom i/ili mrtve stanice može izaći (Ambriović Ristov, 2007). Najčešće se FDA boja koristi u kombinaciji s nekom drugom bojom, kao što je npr. propidij jodid (PI) pa tada omogućuje razlikovanje živih, nekrotičnih i apoptotičnih stanica u uzorku i tada se može koristiti za kvantifikaciju stanične smrti. No, navedena metoda se češće koristi kvalitativno, odnosno samo za vizualizaciju ima li ili nema stanične smrti u uzorku. U ovom radu su stanice obojane samo sa FDA pa smo na taj način vizualizirali samo vijabilnost stanica temeljem njihove metaboličke aktivnosti.

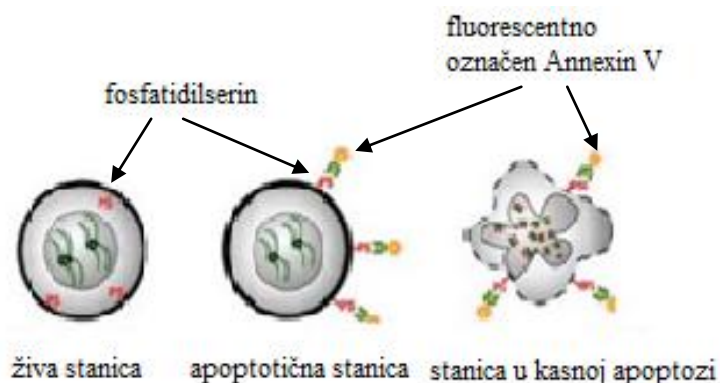
U ovom radu bojane su adherentne HeLa stanice kojima je nakon 72-satnog tretmana ispitivanim spojevima, metoksiflavonima, uklonjen medij za uzgoj stanica, te su stanice 2x isprane PBS puferom. Zatim je na stanice dodana otopina za bojanje, u dovoljnom volumenu da pokrije površinu na kojoj stanice rastu, te je ploča stavljena na inkubaciju 4-5 minuta na sobnoj temperaturi u tami. Potom je uklonjena otopina za bojanje i uzorak ispran PBS puferom. Nakon toga je na stanice dodan PBS ili svježi medij bez seruma te je uzorak analiziran na fluorescentnom mikroskopu. Analiza je provedena na fluorescentnom mikroskopu (EVOS FLoid Cell Imaging Station, Thermofisher) u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Protokol bojenja primjenjiv je na adherentne stanice, suspenzijske stanice, pojedinačne stanice ugrađene u ekstracelularni matriks i 3D stanične strukture, kao na primjer višestanične sferoide (Anonymus 7, 2019). Ovisno o tipu stanica protokol se može razlikovati u samoj pripremi stanica za bojanje.

3.2.5. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a

Pomoću Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a i „mini” protočnog citometra, odnosno Muse™ analizatora staničnog zdravlja provedena je kvantitativna analiza stanične smrti, odnosno, određen je udio živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u uzorku stanica. Muse™ Annexin V & Dead Cell reagens sadrži Annexin V i 7-aminoaktinomicin D (7-ADD). Annexin V je protein ovisan o kalciju koji se specifično veže na fosfatidilserin (PS), molekulu koja se u zdravim stanicama nalazi s unutrašnje strane membrane, dok se u stanicama u kojima je započela stanična smrt procesom apoptoze translocira na vanjsku stranu membrane (slika 9). 7-AAD je fluorescentni interkalator koji ima spektralni pomak nakon vezanja na DNK i služi kao marker za mrtve stanice te je pokazatelj integriteta stanične membrane. Ne obilježava žive, zdrave stanice te one rano apoptotične. Kompleks 7-AAD/DNK pobuđuje energija pri 488 nm dok mu je maksimum emisije pri 647 nm, što se primjenjuje pri analizi uzoraka fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom. 7-AAD se uglavnom učinkovito izlučuje iz živih stanica, ali se može koristiti za obilježavanje stanica koje imaju oštećenu staničnu membranu ili su prethodno fiksirane i permeabilizirane.

Na temelju navedenog moguće je primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a razlikovati četiri populacije stanica:

- žive i zdrave stanice: annexin V (-) i 7-AAD (-)
- rano apoptotične stanice: annexin V (+) i 7-AAD (-)
- kasna faza apoptoze i mrtve stanice: annexin V (+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: annexin V (-) i 7-AAD (+)



Slika 9. Translokacija fosfatidilserina s unutarne na vanjsku stranu membrane tijekom apoptoze i njegovo specifično obilježavanje fluorescentno obilježenim Annexin-om V (Anonymus 8, 2019).

Nakon 72-satnog tretmana adherentnih HeLa stanica ispitivanim spojevima, metoksiflavonima, je najprije iz jažica sakupljen medij u „Eppice”, odnosno tubice od 1,5 mL, zatim je u jažice na monosloj stanica dodan tripsin u određenom volumenu kako bi se stanice odvojile od podloge. Tripsinizirane stanice su pripojene mediju te je uzet alikvot suspenzije od 20 μL za određivanje broja stanica u uzorku. Zatim su stanice centrifugirane na 2000 rpm (eng. *revolutions per minute*) tijekom 5 minuta, supernatant je bačen, a talog stanica resuspendiran u odgovarajućem volumenu DMEM-a s minimalno 1 % FBS-a kako bi konačna koncentracija stanica bila $1-5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . Reagens je čuvan u hladnjaku (+4 °C), prije korištenja izvađen je na sobnu temperaturu da se temperira. Pripremljena je reakcijska smjesa od 100 μL suspenzije stanica i 100 μL reagensa u „Eppici” koja je zamotana folijom i stavljena na inkubaciju 20 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla. Nakon inkubacije, prije analize na MUSE™ uređaju svaki je uzorak lagano resuspendiran kako bi imali pojedinačne stanice te kako nakupine agregiranih stanica ne bi onemogućile analizu, odnosno začepile cjevčice uređaja. Parametri analize su postavljeni s pozitivnom i negativnom kontrolom te su uzorci analizirani nakon što je uređaj očišćen i sustav provjeren.

3.3. OBRADA REZULTATA

Sva mjerenja provedena su u paralelama, rezultati su prosječne vrijednosti dva ili više mjerenja, ovisno o pokusu, izračunati prema izrazu:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3)$$

te su iskazani zajedno sa standardnom devijacijom (\pm S.D.):

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (4)$$

gdje je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjih 20-tak godina flavonoidi su izazvali veliki interes kako znanstvene zajednice tako i ljudi općenito zbog njihovih višestrukih povoljnih učinaka na zdravlje ljudi i životinja te sveprisutnosti u biljnom carstvu. U novijoj se literaturi nazivaju „funkcionalnim sastojcima” i „biomolekulama za promicanje zdravlja” zbog njihove sposobnosti da povoljno djeluju na zdravlje i sprječavaju kronične degenerativne bolesti i niz drugih oboljenja. Također, nedavno je dokazano kako su flavonoidi najučinkovitiji agens protiv raka poticanjem stanične smrti, zaustavljanjem staničnog ciklusa i inhibicijom ključnih enzima uključenih u promicanje tumora (Karak, 2019).

Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti na svjetskoj razini. Postoje različiti pristupi liječenju raka, no često su zbog nuspojava bolni, a ponekad i neučinkoviti zbog povećane otpornosti na klasične lijekove protiv raka ili zračenja. Stoga se stalno istražuju novi lijekovi za liječenje raka, pri čemu su prirodni spojevi biljnog podrijetla izazvali veliki interes s obzirom na njihovu visoku biodostupnost, sigurnost, minimalne nuspojave i isplativost. Među njima najveći su potencijal pokazali upravo flavonoidi (Abotaleb i sur., 2018).

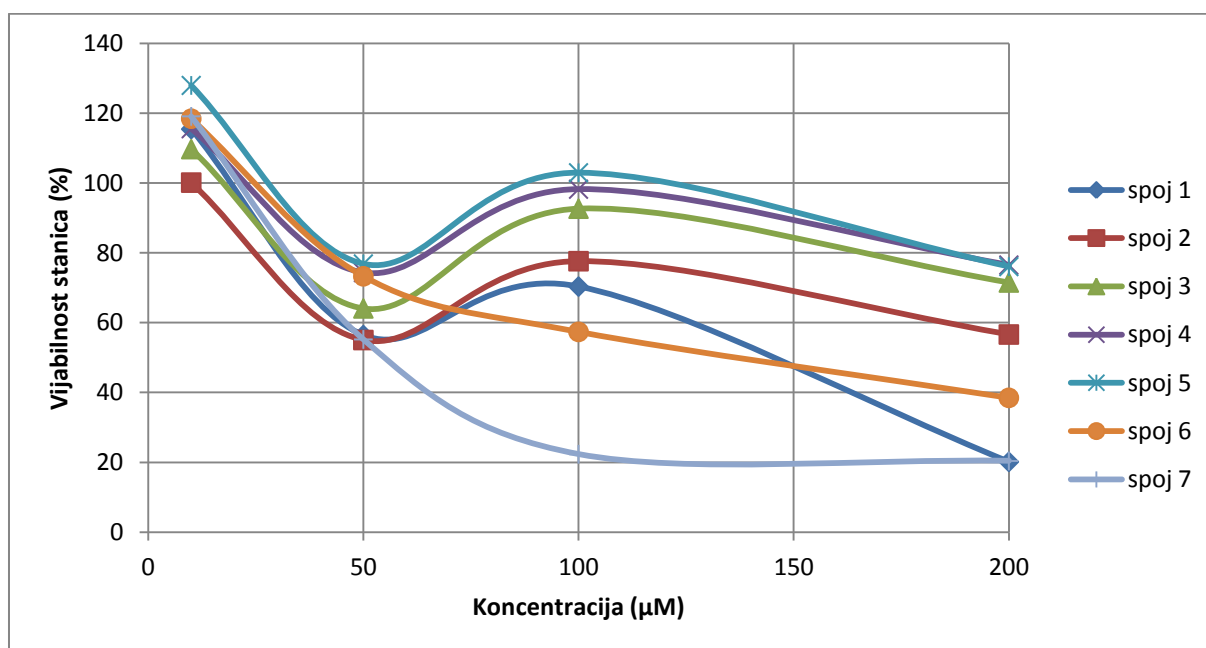
Iako se mnogi flavonoidi apsorbiraju i u određenoj se količini nalaze u cirkulaciji, njihove koncentracije u krvi u većini slučajeva nisu dovoljno visoke da ispune svoje stanične biološke funkcije *in vivo*, a glavni razlog tome se smatra opsežna konjugacija slobodnih hidroksilnih skupina. Stoga je dokazano da metilacija hidroksilnih skupina u flavonima rezultira metabolički stabilnijim derivatima s poboljšanim membranskim transportom, što dovodi do olakšane apsorpcije te stoga znatno poboljšane bioraspoloživosti (Walle, 2009).

S obzirom da je pokazano kako metilacija hidroksilnih skupina flavona rezultira metabolički stabilnijim derivatima (Walle, 2009) u ovom je radu provedeno ispitivanje sedam novosintetiziranih metoksiflavona. Cilj je bio ispitati njihovu sposobnost inhibicije rasta stanične linije HeLa (stanice tumora grlića maternice) i MCF-7 stanične linije (stanice raka dojke) te odrediti mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja.

4.1. *IN VITRO* CITOTOKSIČNOST SINTETIZIRANIH METOKSIFLAVONA

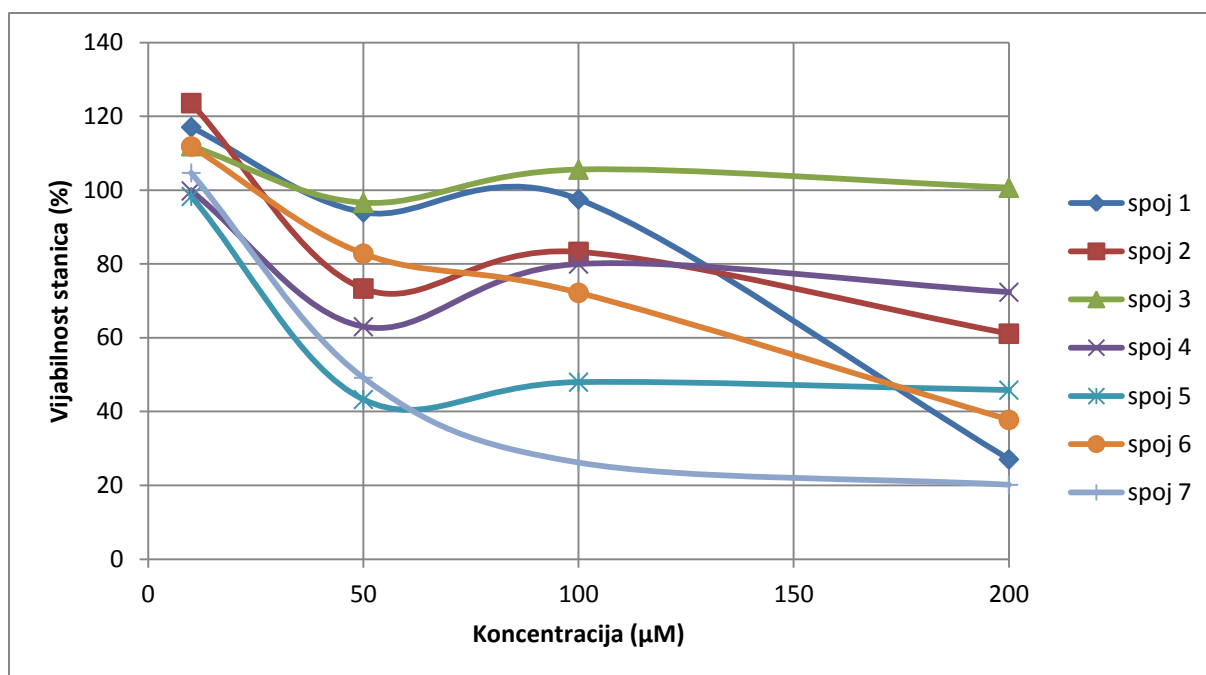
Biološka aktivnost sedam spojeva (1-7), s naglaskom na moguću antikancerogenu aktivnost sintetiziranih metoksiflavona, testirana je *in vitro* i ocijenjena na temelju njihove

spособnosti da inhibiraju rast staničnih linija MCF-7 (karcinom dojke) i HeLa (cervikalni karcinom). Citotoksičnost sintetiziranih spojeva u različitim koncentracijama (10 μM , 50 μM , 100 μM i 200 μM) je određena na temelju *in vitro* rasta u pločama s 96 jažica izmjerenih pomoću CellTiter 96[®] AQueous One Solution testa proliferacije stanica ili tzv. MTS testom, koji se temelji na stanično-posredovanoj redukciji tetrazolijeve soli MTS. Rezultati su izraženi kao vijabilnost stanica (%) tretiranih u odnosu na kontrolne stanice i prikazani su na slikama 10 i 11.



Slika 10. Učinci različitih metoksiflavona (spojevi 1-7) na sposobnost preživljavanja HeLa stanica određeni MTS analizom.

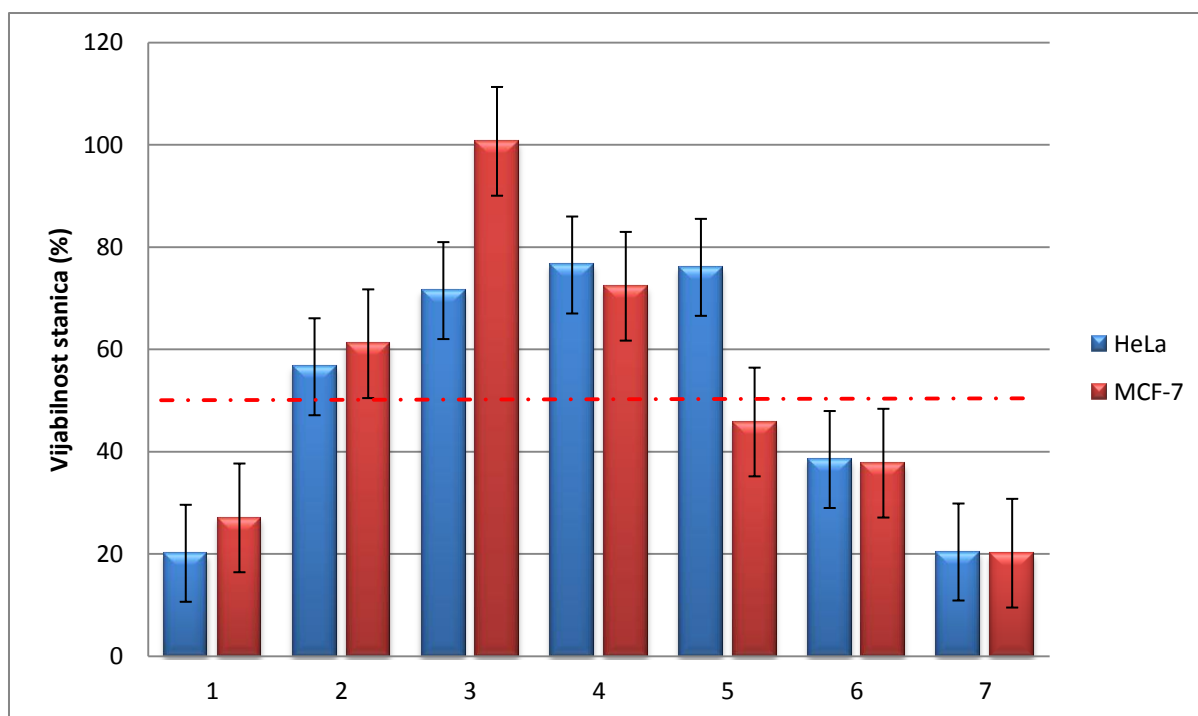
Svih sedam spojeva ima inhibitorni učinak na vijabilnost stanične linije HeLa, kao što je vidljivo na slici 10. Citotoksičan učinak metoksiflavona na proliferaciju stanica ovisan je o primijenjenoj koncentraciji pojedinog spoja. Svi ispitivani spojevi pri najnižoj ispitanoj koncentraciji (10 μM) ne pokazuju inhibitorni učinak na staničnu liniju HeLa. Spojevi 1, 6 i 7 pokazuju najveći inhibitorni učinak od svih ispitivanih spojeva, pri čemu postotak preživljenja stanica tretiranih najvišom koncentracijom (200 μM) iznosi 20,17 % za spoj 1; 38,5 % za spoj 6 te 20,42 % za spoj 7, dok je preživljenje stanica tretiranih ostalim spojevima (2-5) pri istoj koncentraciji iznad 50 %.



Slika 11. Učinci različitih metoksiflavona (spojevi 1-7) na sposobnost preživljavanja MCF-7 stanica određeni MTS analizom.

Iz grafičkog prikaza na slici 11 vidljivo je kako 6 od 7 ispitanih spojeva ima inhibitorski učinak na vijabilnost stanične linije MCF-7. Citotoksičan učinak ispitanih metoksiflavona na proliferaciju stanica ovisan je o primijenjenoj koncentraciji pojedinog spoja te je vidljivo kako spojevi pri najnižoj koncentraciji (10 µM) tretiranja stanica ne pokazuju inhibitorski učinak na stanice, dok spoj 3 uopće ne djeluje inhibitorski na rast MCF-7 stanica, čak niti pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 200 µM. S druge strane, pri najvišoj koncentraciji (200 µM) tretiranja stanica spojevi 1, 6 i 7 pokazuju najveći inhibitorski učinak na vijabilnost stanica koji iznosi 27,09 % za spoj 1; 37,78 % za spoj 6 i 20,18 % za spoj 7, dok je kod ostalih spojeva (2-4) preživljenje stanica iznad 50 %.

Sličan učinak je opažen u obje stanične linije, kao što je prikazano na slici 12, koja pokazuje vijabilnost HeLa i MCF-7 stanica tretiranih s najvišom koncentracijom svih sedam ispitivanih spojeva (200 µM).



Slika 12. Učinci metoksiflavona (1-7) 200 µM koncentracije na vijabilnost HeLa i MCF-7 stanica određeni MTS analizom.

Iz grafičkog prikaza na slici 12 kod ispitivanih metoksiflavona 3 i 5 je vidljiva statistički značajna razlika između preživljenja HeLa i MCF-7 stanica, a za ostale ispitivane metoksiflavone je učinak podjednak bez obzira na staničnu liniju. Inhibicija $\geq 50\%$ postignuta je sa spojevima 1, 6 i 7 na obje stanične linije, te sa spojem 5 na MCF-7 stanice što je i izračunato kao IC_{50} vrijednosti (eng. *Inhibitory concentration*) iz krivulja doza-odgovor pomoću jednadžbi linija trenda koje ih najbolje opisuju ($R^2 \sim 1$) (tablica 1). Vrijednost IC_{50} je definirana kao koncentracija spoja koja odgovara stopi preživljavanja stanica od 50%.

Tablica 1. IC₅₀ vrijednosti izračunate iz krivulja doza-odgovor, odnosno rezultata stanične vijabilnosti HeLa i MCF-7 stanica u ovisnosti o koncentraciji ispitivanog spoja.

	IC ₅₀ vrijednosti (μM)	
	HeLa	MCF-7
Spoj 1	105, 969	172, 206
Spoj 2	n.i.	n.i.
Spoj 3	n.i.	n.i.
Spoj 4	n.i.	n.i.
Spoj 5	n.i.	66, 708
Spoj 6	128, 256	141, 192
Spoj 7	60, 311	57, 323

n.i. = nije izračunato; jer u rasponu ispitivanih koncentracija (10–200 μM) nije izmjerena 50% inhibicija staničnog rasta i stoga se njihove IC₅₀ vrijednosti mogu smatrati višim od 200 μM.

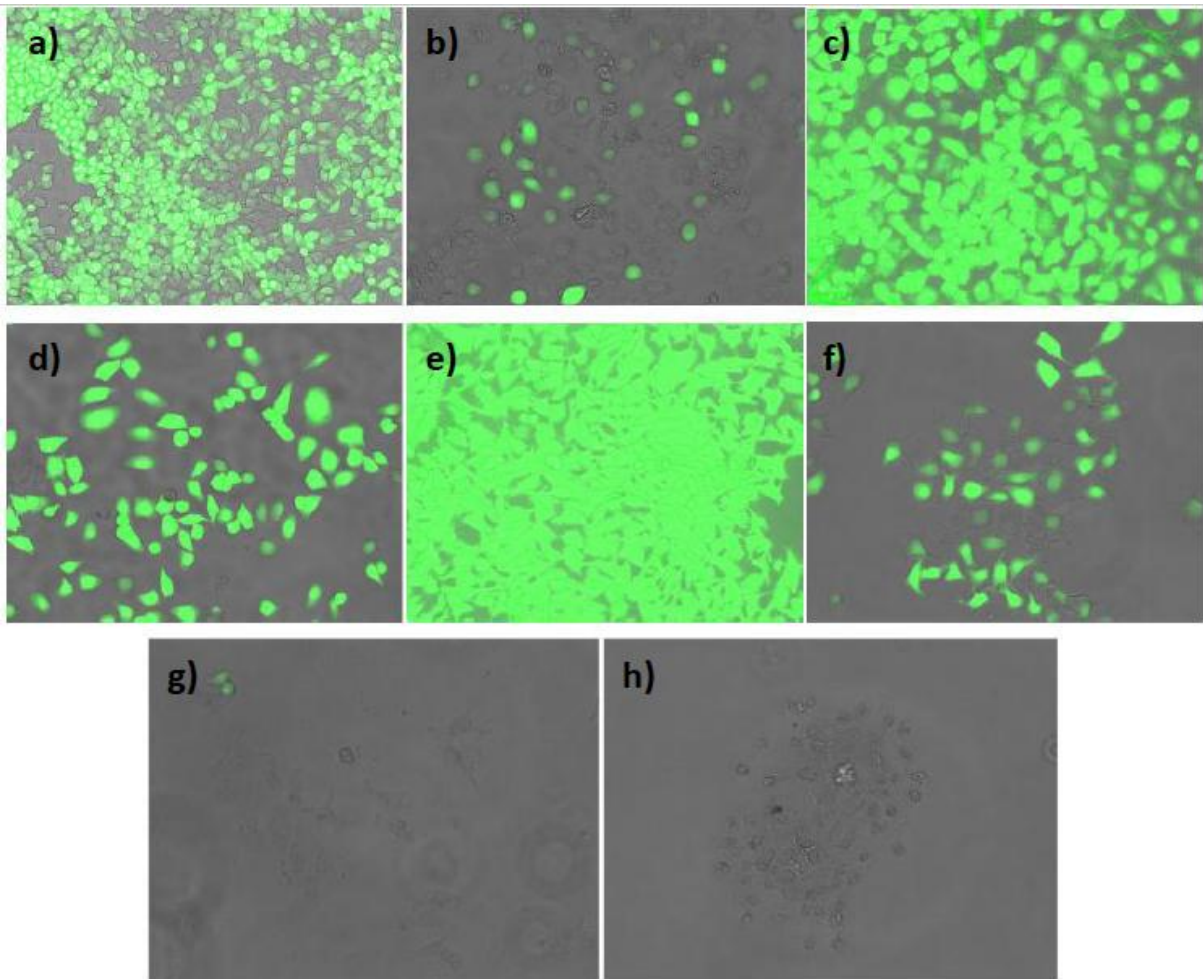
Prema izračunatim IC₅₀ vrijednostima iz tablice 1 vidljivo je kako spojevi 1, 6 i 7 imaju najveći antiproliferativni učinak na HeLa i MCF-7 stanice te spoj 5 na MCF-7 stanice, što može ukazivati na njihov antitumorski potencijal. IC₅₀ vrijednosti za druge ispitivane spojeve nisu izračunate jer u rasponu koncentracija (10 μM - 200 μM) ispitivanih spojeva nije postignuta 50 %-tna inhibicija staničnog rasta, stoga se njihove IC₅₀ vrijednosti smatraju višima od 200 μM.

Fallah i suradnici su u radu iz 2017. godine također pokazali veliki inhibitorski učinak flavonoida izoliranog iz lišća *Morus alba*-e na staničnu liniju HeLa ovisan o primijenjenoj dozi. Pri najnižim koncentracijama (1 mg mL⁻¹) ispitivanog spoja zabilježen je minimalni inhibitorski učinak na staničnu vijabilnost (90,63 %) što korelira s rezultatima prikazanim u ovom radu. Pokazali su smanjenu vijabilnost stanica na 47,43 % (pri koncentraciji ispitivanog flavonoida od 2 mg mL⁻¹) i proliferaciju stanica što potvrđuje izračunata vrijednost IC₅₀ koja iznosi 2 mg mL⁻¹. Isto tako su Razak i suradnici u radu 2019. godine pokazali kako ispitivani flavonoid eupatorin inhibira proliferaciju MCF-7 stanične linije ovisno o vremenu tretmana i primijenjenoj dozi. Njihovi rezultati pokazuju kako je najveća IC₅₀ vrijednost izračunata 72 sata nakon tretmana i iznosi 3 μg mL⁻¹, odnosno 8,71 μM.

Iz navedenih rezultata je vidljivo kako su flavonoidi obećavajući agensi za kemoprevenciju i terapiju raka dojke i raka grlića maternice, te da su dobiveni rezultati s ispitivanim metoksiflavonima vrijedni kao smjernica za daljnja istraživanja i za sintezu novih, sličnih analoga s poboljšanim biološkim svojstvima u odnosu na druge flavonoide.

4.2. MEHANIZAM CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA SINTETIZIRANIH METOKSIFLAVONA

Pri radu sa staničnim linijama svakodnevno se prati izgled stanica pod svjetlosnim mikroskopom. Prilikom ispitivanja citotoksičnosti raznih tvari često se već nakon 24 ili 48 sati na tretiranim stanicama mogu uočiti promjene u izgledu stanica kao posljedica tretmana. Kako bi morfološke promjene bile bolje vidljive provedena je kvalitativna analiza stanične linije HeLa primjenom fluorescentne mikroskopije s ciljem provjere vijabilnosti stanica te uočavanja ima li u uzorcima tretiranih HeLa stanica stanične smrti ili ne. HeLa stanice nacičepjene su u ploču s 12 jažica i tretirane ispitivanim spojevima (1-7) u koncentraciji 100 μM tijekom 72 sata. Nakon tretmana, stanice su obojane fluorescentnom bojom FDA i provedena je analiza na fluorescentom mikroskopu. Stanice su fotografirane i na slici 13 su prikazane kontrolne, netretirane stanice te stanice tretirane ispitivanim metoksiflavonima.

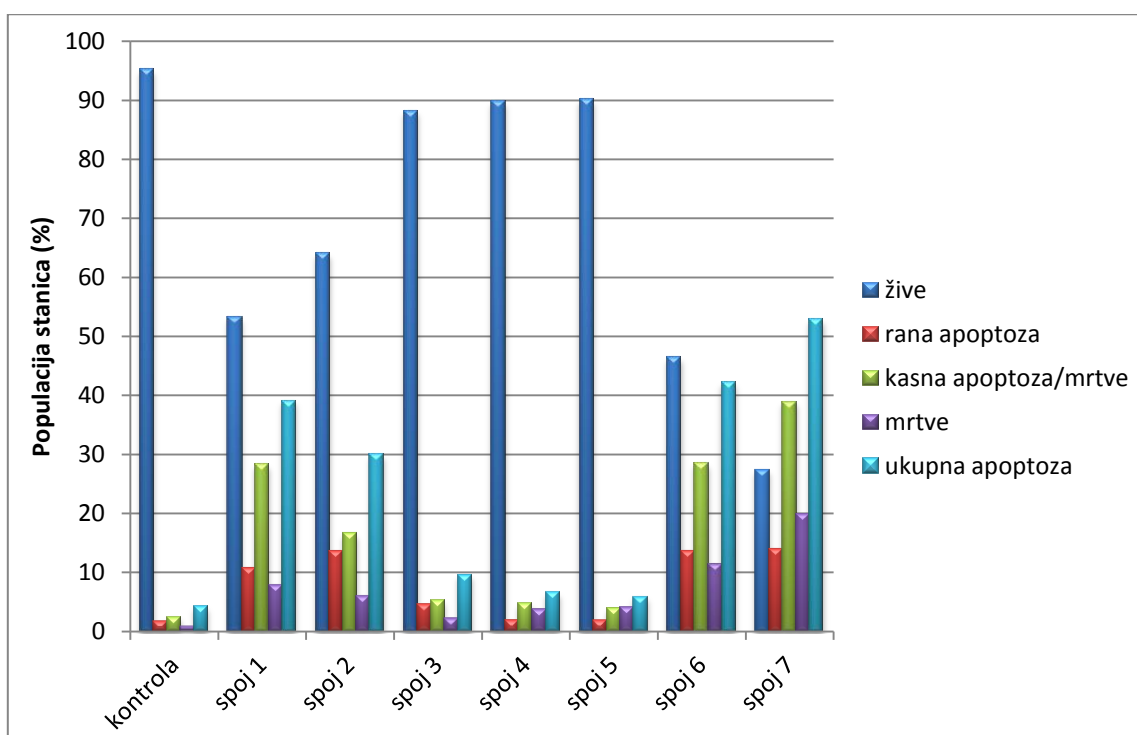


Slika 13. HeLa stanice tretirane ispitivanim spojevima (1-7) u koncentraciji 100 μ M te obojane FDA i slikane fluorescentnim mikroskopom: a) kontrolne, netretirane stanice; te stanice tretirane b) spojem 1; c) spojem 2; d) spojem 3; e) spojem 4; f) spojem 5; g) spojem 6 i h) spojem 7.

Na slici 13 je vidljiva razlika između kontrolnih, netretiranih stanica HeLa (a) i stanica tretiranih ispitivanim spojevima (b-h) u gustoći i izgledu stanica. Netretirane stanice su veće gustoće i karakteristične morfologije (a) dok su tretirane stanice manje gustoće i izmijenjene morfologije (b-h). Također vidljivo je kako najveći inhibitorski učinak na stanice imaju spojevi 1 (b), 6 (g) i 7 (h), potom spojevi 3 (d) i 5 (f), dok su HeLa stanice tretirane spojevima 2 (c) i 4 (e) vijabilne i metabolički aktivne skoro kao i netretirane, kontrolne HeLa stanice. Ova kvalitativna analiza fluorescentnom mikroskopijom potvrđuje rezultate dobivene kolorimetrijskim MTS testom ispitivanja citotoksičnosti pojedinih spojeva na HeLa staničnu liniju. Korištenjem FDA boje, doduše najčešće u kombinaciji s još jednom fluorescentnom bojom kao što je PI, provjerava se ima li ili nema stanične smrti u ispitivanom uzorku. FDA je nenabijena fluorescentna boja koja može proći kroz membranu stanica, unutar stanice ju

esterificiraju esterase i nastaje fluorescein, koji fluorescira zeleno. Fluorescein zbog svoje polarnosti više ne može izaći iz žive stanice, dok iz nekrotične i/ili apoptotične (mrtve) stanice može izaći. S obzirom na navedeno, vidljivo je kako je u uzorcima stanica tretiranih ispitivanim spojevima 2 i 4 najviše živih, zeleno obojenih stanica (12 c i e) što ukazuje na najmanji inhibitorski učinak tih spojeva u koncentraciji 100 μM na HeLa stanice. Također, u uzorcima stanica tretiranih spojevima 1, 6 i 7 (12 b, g i h) vidljiv je najveći inhibitorski učinak navedenih spojeva s minimalnim brojem zeleno obojenih, odnosno živih stanica što ukazuje na aktivaciju stanične smrti.

Za potvrdu uočenih morfoloških promjena koje ukazuju na indukciju stanične smrti prilikom tretmana ispitivanim metoksiflavonima i za njenu kvantifikaciju, provedena je protočna citometrija pomoću Muse[®] analizatora staničnog zdravlja i Muse[™] Annexin V & Dead Cell Kit-a. Navedenom metodom kvantificirane su žive, mrtve te HeLa stanice u ranoj i kasnoj apoptozi nakon tretmana ispitivanim metoksiflavonima. Rezultat te analize prikazan je na slikama 14 i 15.

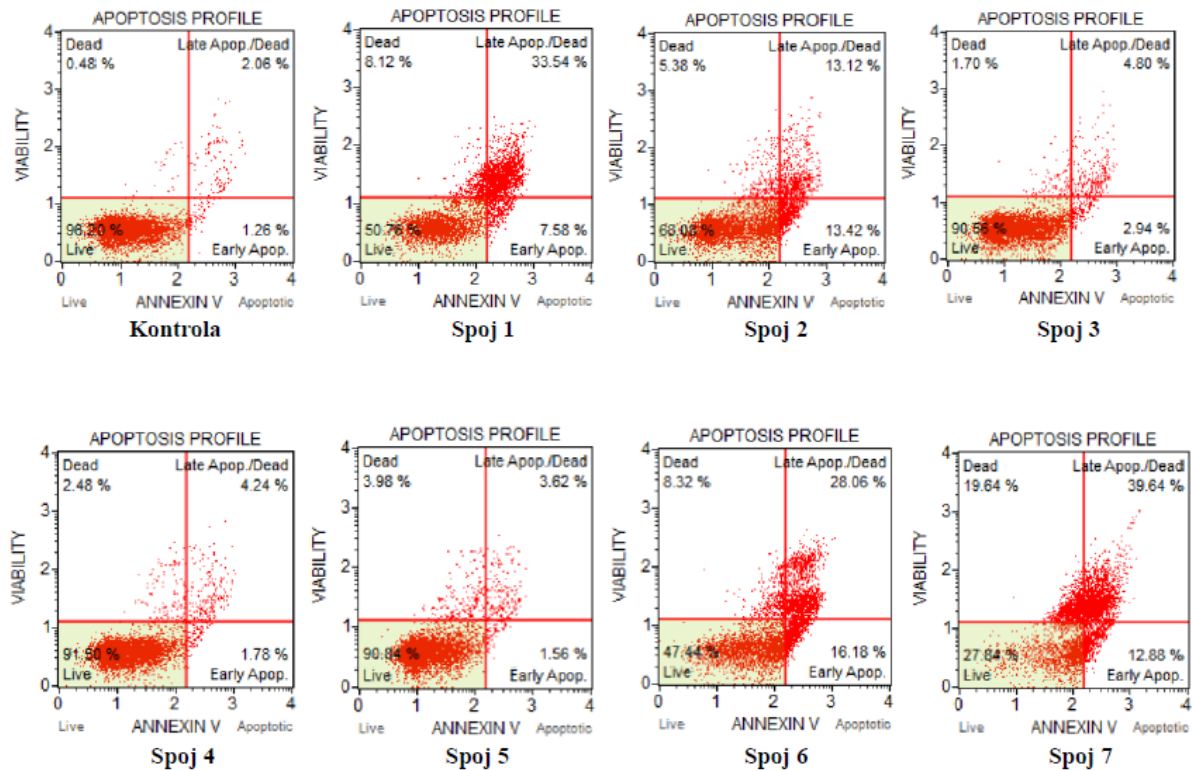


Slika 14. Distribucija staničnih populacija (žive, rano apoptotične, kasno apoptotične, mrtve i ukupno apoptotične stanice) određena Muse[™] Annexin V & Dead Cell Kit-om.

Prikazani rezultati na slici 14 su u dobroj korelaciji s opaženom citotoksičnošću ispitivanih spojeva. Na temelju rezultata testa stanične smrti može se zaključiti da je

citotoksičnost svih spojeva, osobito onih s najvišim IC₅₀ vrijednostima (spoj 1, 6 i 7) povezana s indukcijom programirane stanične smrti, tj. apoptozom.

Reprezentativni histogrami za svaki spoj prikazani su na slici 15.



Slika 15. Reprezentativni histogrami provedenog Muse Annexin V & Dead Cell testa.

Kao što je vidljivo iz rezultata na slikama 14 i 15 ispitivani spojevi 1, 6 i 7 imaju najveći citotoksični učinak i u najvećoj mjeri induciraju programiranu staničnu smrt, odnosno apoptozu HeLa stanica. U uzorku stanica tretiranih spojem 7 u koncentraciji od 100 μ M izmjeren je najveći postotak ukupne populacije stanica u apoptozu (52,88 %), zatim u uzorku tretiranim spojem 6 (42,17 %) te naposljetku u uzorku tretiranim spojem 1 (39,4 %). U uzorcima tretiranim drugim ispitivanim spojevima (2-5) nije vidljiva značajna razlika u postotku živih, stanica u ranoj ili kasnoj apoptozu te mrtvih stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Iz navedenog se može zaključiti kako oni nemaju potencijalnu antitumorsku aktivnost jer ne induciraju programiranu staničnu smrt u dovoljnoj mjeri. Također, IC₅₀ vrijednosti su im veće od 200 μ M što potvrđuje njihov slabi inhibični učinak na tumorske stanice te se stoga ne smatraju dobrim kandidatima za daljnja ispitivanja antitumorskog potencijala. Rezultati dobiveni protočnom citometrijom potvrdili su rezultate *in vitro* ispitivanja

citotoksičnosti sintetiziranih metoksiflavona (1-7). Spojevi 6 i 7 imaju najjači inhibitorni učinak na tumorske stanične linije HeLa i MCF-7 te najveći potencijal indukcije apoptoze, dok spojevi 3 i 4 pokazuju najslabiji učinak s obzirom na oba ispitana biološka aspekta, tj. njihovo antiproliferativno i proapoptotično djelovanje.

U ovom radu prikazani su rezultati biološke evaluacije sintetiziranih metoksiflavona (1-7). Dobiveni rezultati potvrđuju antitumorski potencijal flavonoida poznat iz literature (Razak i sur. (2019); Abotaleb i sur. (2018); Fallah i sur. (2017)) te su značajni za buduća istraživanja i sintezu novih metoksiflavona. Spojevi 1, 6 i 7 imaju potencijal za nastavak *in vivo* ispitivanja i drugih farmakokinetičkih studija, koje su nužne prije odluke o mogućem korištenju navedenih spojeva u kliničkim studijama za liječenje karcinoma.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitivanjem biološke aktivnosti sintetiziranih metoksiflavona (spojeva 1-7) na HeLa i MCF-7 staničnim linijama uočen je citotoksičan učinak. Inhibitorni učinak na rast i proliferaciju stanica ovisan je o primijenjenoj koncentraciji spoja. Najjače djelovanje imaju metoksiflavoni 1, 6 i 7, a najslabije spojevi 3 i 4.
2. Novosintetizirani metoksiflavoni djeluju na smanjenje gustoće i broja HeLa i MCF-7 stanica te potiču mehanizme stanične smrti procesom apoptoze.
3. Metoksiflavon 7 ima najveći potencijal za indukciju stanične smrti i najjači inhibitorni učinak na tumorske stanične linije.
4. Dokazani antiproliferativni i proapoptotični učinak na tumorske stanice ukazuju na antitumorski potencijal novosintetiziranih metoksiflavona.

6. LITERATURA

Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., Büsselberg D. (2019) Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers* **11** (1), 28.

Ambriović Ristov, A. (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, str. 793-795.

Anonymus 1 (2019) Henrietta Lacks' Immortal Cells, <<https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/henrietta-lacks-immortal-cells>>.

Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Anonymus 2 (2019) MCF-7 Cells, <<http://www.mcf7.com/>>. Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Anonymus 3 (2019) MCF-7/TAMR-1 Human Breast Cancer Cell Line, <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scc101?lang=en®ion=HR>>.

Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Anonymus 4 (2019) Counting chamber, <http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/cellculture.html#Cell%20counting%20tools>. Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Anonymus 5 (2019) MTS Assay, <<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>>. Pristupljeno 16. srpnja 2019.

Anonymus 6 (2019) MTS Assay reaction, <<https://www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.htm>>.

Pristupljeno 15. srpnja 2019.

Anonymus 7 (2019) Live/dead staining with FDA and PI. Application Note 33, <<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwj m5f6XtbnjAhWsy4UKHa2mBDAQFjAAegQIAhAC&url=https%3A%2F%2Fibidi.com%2Fi>>

[mg%2Fcms%2Fsupport%2FAN%2FAN33_Live_Dead_staining_with_FDA_and_PI.pdf&usg=AOvVaw2itywDz-qQktS2ZiS_TzKp](#)>. Pristupljeno 16. srpnja 2019.

Anonymous 8 (2019) Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide, <[http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%204600-3384MAN%20\[B\]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER%27S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%204600-3384MAN%20[B]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER%27S%20GUIDE.pdf)>. Pristupljeno 16. srpnja 2019.

Aslantürk, Ö. S. (2018) *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. U: *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, (Larramendy, M. L., Soloneski, S., ured.), IntechOpen, London, str. 1-19.

Bopp, S. K., Lettieri, T. (2008) Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology* **8**, 1-11.

Duellman, S. J., Zhou, W., Meisenheimer, P., Vidugiris, G., Cali, J. J., Gautam, P., Wennerberg, K., Vidugiriene, J. (2015) Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev. Techn.* **13** (8), 456-465.

Dymarska, M., Janeczko, T., Kostrzewa-Susłow, E. (2018) Glycosylation of 3-Hydroxyflavone, 3-Methoxyflavone, Quercetin and Baicalein in Fungal Cultures of the Genus *Isaria*. *Molecules* **23** (10), 2477.

Fallah, S., Hajihassan, Z., Sadeghi, A. (2017) Cytotoxicity Effects of Flavonoid Extract of *Morus alba* Leaves in Hela Cell Line. *Asian J. Biol. Sci.* **10**, 72-79.

Feoktissova, M., Geserick, P., Leverkus, M. (2016) Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols* str. 343-346.

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., Tomás-Barberán, F. A. (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* **10**, 514-528.

Hoensch, H. P., Oertel, R. (2015) The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clin. Nutr. Exp.* **3**, 8-14.

Hui, C., Qi, X., Qianyong, Z., Xiaoli, P., Jundong, Z., Mantian, M. (2013) Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *PLoS One*. [online] **8** (1), e54318, <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054318>>. Pristupljeno 8. srpnja 2019.

Karak, P. (2019) Biological activities of flavonoids: an overview. *IJPSR* **10** (4), 1567-1574.

Kim, S. I., Kim, H. J., Lee, H. J., Lee, K., Hong, D., Lim, H., Cho, K., Jong, N., Yi, Y. W. (2016) Application of non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Anal. Biochem.* **492**, 8-12.

Kumar, S., Pandey A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, 1-16.

Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L. (2009) *In Vitro* Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Curr Chem Genomics* **3**, 33-41.

Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* [online] **5**, e47, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/>>. Pristupljeno 7. srpnja 2019.

Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H. (2017) Basic colorimetric proliferation assay: MTT, WST and Resazurin. U: Cell Viability Assays. *Methods in Molecular Biology*. (Gilbert, D., Friedrich, O., ured.), Humana Press, New York, str. 1-17.

Razak, N. A., Abu, N., Ho, W. Y., Zamberi, N. R., Tan, S. W., Alitheen, N. B., Long, K., Yeap, S. K. (2019) Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Nature* **9** (1), 1514.

Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Gaforio, J. J. (2019) Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants* **8** (5), 137.

Sudhakaran, M., Sardesai, S., Doseff, A. I. (2019) Flavonoids: New Frontier for Immuno-Regulation and Breast Cancer Control. *Antioxidants* **8** (4), 103.

Szliszka, E., Czuba, Z. P., Jernas, K., Król, W. (2008) Dietary Flavonoids Sensitize HeLa Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 56-64.

Walle, T. (2009) Methylation of Dietary Flavones Increases Their Metabolic Stability and Chemopreventive Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 5002-5019.

Wang, T., Li, Q., Bi, K. (2018) Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm.* **13**, 12-23.