Preživljavanje i morfologija tumorskih HeLa stanica u prisustvu ekstrakata peteljki jabuke i trešnje

Žuna, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:240883

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij
Biotehnologija

Kristina Žuna

7049/BT

PREŽIVLJAVANJE I MORFOLOGIJA TUMORSKIH HeLa STANICA U PRISUSTVU EKSTRAKATA PETELJKI JABUKE I TREŠNJE

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona
Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Preživljavanje i morfologija tumorskih HeLa stanica u prisustvu ekstrakata peteljki jabuke i trešnje

Kristina Žuna, 0058206627

Sažetak: Svojstva koja imaju mnogi biološki aktivni spojevi nađeni u biljkama mogu se ispitati *in vitro* testovima citotoksičnosti pri čemu se često koriste humane stanične linije. Rezultati dobiveni određivanjem tzv. bazalne citotoksičnosti određuju učinak ispitivane tvari na postotak preživljenja stanica, a takav pristup je alternativa klasičnim *in vivo* pokusima na životinjama. U ovom radu, *in vitro* ispitivanje učinka subkritičnih vodenih ekstrakata peteljki jabuke i trešnje provedeno je na tumorskoj staničnoj liniji HeLa te je određena vijabilnost MTS metodom nakon 48 sati od tretmana. Djelovanje ekstrakata je uglavnom bilo inhibitorno na preživljavanje stanica. IC_{50} za ekstrakt trešnje iznosio je 5,8351% (v/v), a za ekstrakt jabuke 2,9547% (v/v). Blagi stimulacijski učinak zapažen je kod volumnog udjela ekstrakta trešnje od 5%. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na potencijal primjene peteljki jabuke i trešnje kao izvor biološki aktivnih spojeva.

Ključne riječi: ekstrakt, HeLa stanice, peteljke jabuke i trešnje, vijabilnost
Rad sadrži: 26 stranica, 5 slika, 1 tablicu, 23 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
Pomoć pri izradi: **-**

Datum obrane: 13. lipnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The viability and morphology of tumor HeLa cells in the presence of apple and cherry stem extracts

Kristina Žuna, 0058206627

Abstract: Properties of biologically active compounds found in plants can be tested with *in vitro* cytotoxicity tests using human cell lines. Results received by determining the so-called basal cytotoxicity determine the effect of the test substance on the percentage of cell survival, and this approach is an alternative to classical *in vivo* animal experiments. In this study, *in vitro* testing of the effects of subcritical water extracts of apple and cherry stems has been conducted on HeLa, human tumor cell line, and the viability was determined by MTS method after 72 hours of treatment. Results mostly showed inhibitory effects. IC_{50} for the cherry extract was 5,8351% (v/v), and for the apple extract 2,9547% (v/v). Mild stimulatory effect was noticed for cherry extract at volume ratio of 5%. These results indicate the potential of apple and cherry stems as a source of bioactive compounds.

Keywords: apple and cherry stems, extract, HeLa cells, viability
Thesis contains: 26 pages, 5 figures, 1 table, 23 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Full Professor Ph.D. Višnja Gaurina Srček
Technical support and assistance: **-**

Defence date: 13th June 2017.

SADRŽAJ:

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO **2**

2.1. Kultura životinjskih stanica 2

2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica 3

2.1.2. Serum 4

2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica 4

2.1.4. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka 5

2.2. Subkritična ekstrakcija vodom 6

2.3. Jabuka, *Malus domestica* 8

2.3.1. Gospodarski i biološki značaj jabuke 9

2.4. Trešnja, *Prunus avium* L. 10

2.4.1. Gospodarski i biološki značaj trešnje 10

3. EKSPERIMENTALNI DIO **12**

3.1. Materijali 12

3.1.1. Kemikalije 12

3.1.2. Stanična linija HeLa 12

3.1.3. Otopine i puferi 13

3.1.4. Uređaji i oprema 13

3.2. Metode rada 14

3.2.1. Priprema subkritičnih vodenih ekstrakata peteljki jabuke i trešnje 14

3.2.2. Uzgoj HeLa stanica u T-bocama 14

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo 14

3.2.4. Ispitivanje biološke aktivnosti subkritičnih vodenih ekstrakata peteljki jabuke i trešnje na HeLa staničnoj liniji 15

3.2.5. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom 15

3.2.6. Bojanje HeLa stanica bojom kristal violet 16

4. REZULTATI **17**

4.1. Učinak subkritičnih vodenih ekstrakata iz peteljki jabuke i trešnje na vijabilnost HeLa stanica 17

4.2. Morfološke promjene u HeLa stanicama nakon tretmana subkritičnim vodenim ekstraktima jabuke i trešnje 18

5. RASPRAVA **20**

6. ZAKLJUČCI **23**

7. LITERATURA **24**

1. UVOD

Trešnja (*Prunus avium* L.) i jabuka (*Malus domestica*) su biljne vrste čiji se plodovi uobičajeno u velikoj količini koriste i konzumiraju u ljudskoj prehrani, u svježem ili prerađenom obliku. Podaci dostupne literature ukazuju da osim plodova i tzv. biljni otpad poput peteljki ili listova može imati značajnu primjenu jer je bogat biološki aktivnim spojevima. Naime, peteljke trešnje se stoljećima koriste u tradicionalnoj medicini za liječenje upale mokraćnih putova, bolesti jetre i žuči te tretman gastrointestinalnih tegoba dok se peteljke jabuke u tradicionalnoj medicini koristi za tretman određenih bolesti.

Tvari iz biljaka i biljnog otpada kao potencijalni izvor biološki aktivnih spojeva se sve više istražuju. Ekstrakcija i izdvajanje tih spojeva mogu biti kompliciran jer je kemijski sastav biljaka vrlo kompleksan. Dosadašnje metode razdvajanja pokazale su se skupima, a otapala koja se pritom koriste su štetna za okoliš. Zbog toga se u novije vrijeme koristi subkritična ekstrakcija vodom. Voda je jeftino i ekološki prihvatljivo otapalo, a njena svojstva se mogu značajno mijenjati promjenom temperature i tlaka te zbog toga može otopiti fitokemikalije koje su inače netopljive u vodi pri sobnim uvjetima.

U *in vitro* testovima toksičnosti te pri ispitivanju biološke aktivnosti novih spojeva, a i spojeva iz prirode, često se primjenjuju humane tumorske stanične linije. Primjenom kultura životinjskih stanica se u kraćem vremenu može ispitati velik broj tvari u širokom rasponu koncentracija. Ispitivanjem djelovanja ekstrakata dobivenih iz plodova, lišća ili ostalih dijelova biljke na kulture životinjskih stanica moguće je dobiti rezultate koji mogu poslužiti kao smjernica za daljnja istraživanja u smjeru stvaranja novih lijekova.

U ovom radu korištena je tumorska stanična linija HeLa, a cilj rada bio je ispitati učinak subkritičnih vodenih ekstrakata peteljki trešnje i jabuke na vijabilnost i morfološke karakteristike stanica, odnosno utvrditi kakav učinak imaju izolirane biološke aktivne tvari na rast tumorskih stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura životinjskih stanica

Stanice izolirane iz životinjskog tkiva, uzgajane uz dodatak odgovarajućih hranjivih tvari i faktora rasta, predstavljaju laboratorijsku tehniku zvanu kultura stanica. Pojedinačne stanice su izdvojene iz svog uobičajenog okoliša te mogu funkcionirati kao zaseban organizam u *in vitro* uvjetima. Takve stanice su prije izdvajanja bile pod kontrolom organizma ili tkiva u kojem su se nalazile, a u novom okolišu imaju sposobnost prilagodbe na nove uvjete što rezultira gubitkom njihovih visokospecijaliziranih funkcija pa stanice podliježu diferencijaciji, degeneraciji ili transformaciji. Primarnu kulturu stanica čine stanice direktno izolirane iz tkiva ili organa, a uspostavljanje takve kulture provodi se razgradnjom tkiva. Kultura će biti primarna sve dok se višestrukom supkultivacijom ne postignu svojstva stanične linije. Ta svojstva su promjena morfologije stanica, povećana učinkovitost kloniranja, mogućnost rasta u suspenziji i neograničeni životni vijek (Freshney, 2005.).

Prednost korištenja kultura životinjskih stanica je dobivanje ujednačenih i reproducibilnih rezultata, bolja kontrola staničnog okoliša u smislu kontrole pH, temperature, razine kisika, hranjivih tvari i proizvoda metabolizma te bolje razumijevanje staničnih procesa. Također, korištenje kulture stanica je jeftinije i etički opravdanije od *in vivo* ispitivanja na životinjama. Nedostatci primjene kulture stanice su neizbježne promjene karakteristika nakon dugotrajnog *in vitro* uzgoja stanica, a moguće su promjene enzimske aktivnosti te promjene biokemijskih karakteristika kao posljedica nedostatka nutrijenata u hranjivom mediju ili nakupljanja nekih nusproizvoda. Također, početni troškovi ulaganja su visoki, a odnose se na nabavu medija i seruma za uzgoj, a osoblje koje radi s ovakvom kulturom stanica treba biti posebno obučeno te imati dovoljno predznanje i iskustvo.

Kulture životinjskih stanica se mogu primjenjivati u raznim područjima, kao u istraživanjima na području biokemije ili fiziologije stanica, istraživanjima utjecaja djelovanja specifičnih spojeva na stanice, kod proizvodnje umjetnih tkiva te za poboljšanje proizvodnje i proizvodnju novih visokovrijednih proizvoda u području biofarmaceutike.

2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica

Uloga medija za uzgoj stanica *in vitro* je da im osigura uvjete što sličnije uvjetima koji su vladali u *in vivo* sustavu iz kojeg su izolirane, a to su – optimalna temperatura, pH vrijednost, koncentracija kisika i CO_2, osmotski tlak te optimalna koncentracija svih potrebnih nutrijenata koji su stanicama nužni za diobu i rast. Mediji dostupni na tržištu su kemijski definirani i moguće ih je naći u raznim formulacijama. Najčešće korišteni mediji su BME (*Basal Medium Eagles's*; originalno oblikovan za rast mišjih L i HeLa stanica), EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, poboljšani BME medij koji ima veću količinu aminokiselina), DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*, modifikacija BME koja ima četiri puta veću koncentraciju aminkiselina i vitamina) te GMEM (*Glasgow's Modification of Eagle's Medium*, također ima veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME).

Osnovna komponenta hranjivog medija za uzgoj stanica u *in vitro* sustavu je voda. Ona mora biti visoke čistoće jer bi prisutnost kontaminanata i elemenata u tragovima znatno utjecala na kvalitetu medija. Najčešće faze pročišćavanja koje se koriste uključuju reverznu osmozu, filtraciju, deionizaciju i filtraciju kroz mikropore. Od ugljikohidrata u mediju je najzastupljenija glukoza, s početnom koncentracijom od 10-25 mM, a stanice je koriste kao izvor energije i ugljika. Aminokiseline su u mediju prisutne u koncentracijama od 0.1-0.2 mM i prekursori su u sintezi proteina. Prisutnost glutamina je iznimno bitna za većinu stanica i on se dodaje u višoj koncentraciji od ostalih aminokiselina, a glutamin, osim za sintezu proteina, ima ulogu prekursora za sintezu purina, pirimidina, asparagina te kao preteča za intermedijere citratnog ciklusa. Anorganske soli djeluju kao koenzimi enzima te održavaju ionsku ravnotežu i osmotski tlak u mediju za uzgoj. Dodaju se u obliku iona Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-} i HCO_3^-. Puferski kapacitet medija održava bikarbonat koji zajedno s plinovitim CO_2 koji se nalazi u atmosferi inkubatora osigurava održavanje optimalne pH vrijednosti medija (pH= 6).

Od vitamina se najčešće dodaju vitamini B skupine kao što su biotin i folna kiselina, a dodaju se u malim koncentracijama i djeluju kao koenzimi enzima. Od hormona se dodaju inzulin, glukokortikoidi, trijodtironin i steroidi. Od mnogih elemenata u tragovima, važnu ulogu ima selen koji ima antioksidacijska svojstva i sudjeluje u rastu stanica. Faktori rasta se dodaju osnovnom mediju kako bi se povećala proliferacija stanica i simulirale stanične funkcije. Indikator fenol-red se dodaje kao indikator koji je osjetljiv na male promjene pH vrijednosti, a pri nižim pH vrijednostima mijenja boju u narančastu (pH= 7) ili žutu (pH= 6,5) što je najčešće znak kontaminacije. Lipidi u mediju imaju dvije važne uloge: strukturne su komponente

membrane i služe kao izvor i zaliha energije. Najvažnije masne kiseline koje se dodaju u medij su palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska i arahidonska kiselina (Freshney, 2005.).

2.1.2. Serum

Serum je bezstanična krvna komponenta koja se dobije zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla. Glavne komponente seruma su proteini i tvari nužne za proliferaciju stanica te biomolekule koje potiču ili inhibiraju stanični rast. Dodaje se mediju za uzgoj u koncentracijama od 5-10% (v/v). Najčešće se koriste fetalni goveđi serum (FCS= *fetal calf serum*), goveđi, konjski i teleći (NCS= *newborn calf serum*) (Freshney, 2005.). Dodatkom seruma u medij za uzgoj se dodaju osnovni nutrijenti, vezni proteini, hormoni, faktori prihvaćanja i širenja stanice, zaštite od mehaničkog oštećenja te inhibitori proteaza. Korištenje seruma je kontroverzno jer njegova proizvodnja uzrokuje nepotrebnu patnju životinja, kemijski je sastav seruma nepotpuno istražen te stoga on može sadržavati neke tvari koje za stanice mogu biti štetne i može biti izvor mikrobnih kontaminanata kao što su bakterije, gljivice, virusi, prioni i mikoplazme. Sami dodatak seruma povećava cijenu medija za uzgoj, a u zadnje vrijeme se ovi problemi pokušavaju izbjeći upotrebom *serum free* medija. Takav medij je selektivan za određeni tip stanica što znači da se sastav medija može standardizirati, a mijenjanjem koncentracije i vrste faktora rasta proliferacija i diferencijacija stanica se mogu regulirati. Ipak, nedostatci primjene *serum free* medija su sporija proliferacija stanica, niža maksimalna koncentracija stanica i niži broj generacija stanica kod staničnih linija te visoka cijena potrebnih tvari koje se naknadno moraju dodati.

2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Za uzgoj stanica *in vitro* potrebno je osigurati optimalne vrijednosti različitih fizikalno-kemijskih parametara kao što su koncentracija kisika, CO_2, temperatura, pH vrijednost, osmolarnost i viskoznost.

Optimalna temperatura za uzgoj životinjskih stanica ovisi o životinjskom tkivu ili organu iz kojeg su izolirane, a najčešće je 37^0C, a temperaturu inkubatora je poželjno podesiti na malo nižu od optimalne kako bi se spriječilo pregrijavanje kultura.

pH vrijednost ovisi o tipu stanica, a većini stanica odgovara pH vrijednost oko 7,4.

Na pH vrijednost utječe i ravnoteža između CO_2 u plinovitoj i tekućoj fazi, a otapanje CO_2 uzrokuje sniženje pH vrijednosti. U inkubatorima je najčešće kontrolirana atmosfera od 5% CO_2. Za većinu kultura stanica je dovoljan atmosferski kisik, a za kulture tkiva nužno je osigurati do 95% kisika u kontroliranoj atmosferi.

Stanične linije većinom pokazuju toleranciju na promjenu osmotskog pritiska, a raspon u kojem je taj pritisak optimalan je 260-320 mOsm/kg.

Viskoznost medija najčešće nema utjecaj na rast stanica u kulturi, ali je bitna u sustavima s miješanjem stanica te nakon tripsinizacije, kad su stanice disocirane.

2.1.4. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka

Prirodni proizvodi sadrže brojne biološki aktivne tvari kao što su fenolni spojevi, glukozinolati, karotenoidi, alkaloidi i drugi koji potencijalno mogu imati povoljne učinke na ljudski organizam. Povoljni učinci mogu se okarakterizirati kao antitumorski, antialergijski, antioksidacijski ili antitumorski, a biološka aktivnost spojeva koji ih posjeduju određuje se provođenjem niza testova na organizmima *in vivo* ili *in vitro* u kulturi stanica. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva ili kulturama organa (Kniewald i sur., 2005.). Sve više se ispituje primjena biološki aktivnih tvari iz biljaka kao izvora novih lijekova pri čemu se često koriste i humane stanične linije koje predstavljaju vrlo koristan alternativni pristup u (eko)toksikološkim istraživanjima. Kod *in vitro* testova najčešće se određuje tzv. bazalna citotoksičnost, kojom se određuje učinak ispitivane tvari na preživljavanje stanica, a tako dobiveni rezultati mogu poslužiti kao smjernica za daljnja *in vivo* istraživanja. Ako se usporede postojeća istraživanja *in vivo* sa spoznaja dobivenim *in vitro* testovima, vidljivo je da i takav pristup može učinkovito ispitati potencijal mogućeg lijeka u razvojnoj fazi. Testovi toksičnosti *in vitro* su jeftiniji u odnosu na *in vivo* testove, imaju visoki stupanj standardizacije, brži su, nastaje manja količina toksičnog otpada i poštuju dobrobit životinja. Primjenom kultura životinjskih stanica se u kraćem vremenu može ispitati velik broj tvari u širokom rasponu koncentracija. No, stanice u kulturi ipak imaju promijenjena svojstva u odnosu na ishodne *in vivo* stanice te mogu metabolički drukčije reagirati na ispitivanu tvar,

a ta tvar može reagirati i sa sastojcima u hranjivom mediju za uzgoj. Istraživanja biološke aktivnosti spojeva iz biljaka trebaju biti sveobuhvatna te uključiti i ispitivanja koja su međusobno ovisna, kao što je antioksidacijski kapacitet. Cjelovito istraživanje svakako treba obuhvatiti i kvalitativne i kvantitativne analize biljnih ekstrakata s kojima se radi jer se tako može povezati zapaženi učinak tih ekstrakata na kulturu stanica sa sastavom biološki aktivnih spojeva u uzorku (Radojčić Redovniković i sur., 2016.).

Antitumorska svojstva koja posjeduju mnogi biološki aktivni spojevi nađeni u prirodi mogu se ispitati *in vitro* testovima. Svojstva biljnih ekstrakata, prirodnih spojeva te prehrambenih proizvoda ispituju se na raznim staničnim linijama sisavaca, uključujući humane, a koriste se i stanične linije riba. Humane stanične linije dostupne su putem banka stanica, od kojih su dvije najveće: *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Testovi citotoksičnosti mogu se koristiti za ispitivanje potencijalno aktivnih tvari odnosno antitumorske aktivnosti spoja tj. lijeka u razvojnoj, pretkliničkoj fazi. U tom području se najčešće koriste humane tumorske stanične linije (Radojčić Redovniković i sur., 2016.). Primarni *in vitro* test Nacionalnog instituta za rak (NCI, *National Cancer Institute*) iz 1990. uključuje listu 60 najvažnijih humanim tumorskih staničnih linija kako bi se testirale razne komponente u definiranim rasponima koncentracija. Komponente koje se testiraju mogu biti prirodne molekule koje su ekstrahirane iz sirovina prirodnog porijekla ili mogu biti male sintetske molekule, a testira se njihov učinak kako bi se utvrdio stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju (Boyd i Paull, 1995.).

2.2. Subkritična ekstrakcija vodom

Biljni lijekovi, koji se pretežno temelje na ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka, trenutno čine 30 do 40% tržišno prisutnih farmaceutskih proizvoda. Najvažniji i prvi korak u razvoju takvog pripravka su ekstrakcija i separacija biološki aktivnih spojeva koji će imati djelovanje, a što može biti vrlo složeno. Kemijski sastav biljaka koje se koriste u medicini je također veoma složen i pripravak može sadrži više različitih vrsta biološki aktivnih spojeva. Dosadašnje konvencionalne metode koje se koriste za izdvajanje takvih spojeva su: destilacija vodenom parom, ekstrakcija otapalom i sublimacija koje se kombiniraju sa daljnjim koracima pročišćavanja preostalih nečistoća i organskih otapala. Takve metode su korisne za ekstrakciju i pročišćavanje malih količina fitokemikalija za primjenu u istraživanju, ali su problematične kad treba izdvojiti veće količine za komercijalnu primjenu. Problemi koji se tada javljaju su

skupoća izvedbe, nedovoljna čistoća kemikalija te teško uklanjanje otapala koja su se koristila za ekstrakciju. Nadalje, tip i koncentracija tih otapala moraju biti pažljivo odabrani da se izbjegnu strukturalne promjene željenih fitokemikalija (Liang i Fan, 2013.). Posljednjih godina su se javile nove tehnologije i metode za ekstrakciju kao što su ultrazvuk, membranske tehnologije izdvajanja, mikrovalna ekstrakcija, te između ostalog, subkritična tekućinska ekstrakcija pomoću raznih otapala. Od novijih tehnologija, ona je posebno primjenjiva za toplinski osjetljiv materijal zbog svojih mnogih prednosti, kao što su visok stupanj izdvajanja, očuvanje okoliša te uspješno izdvajanje ostataka otapala od ekstrakcije. Zbog visoke cijene i visokog tlaka pri izdvajanju spojeva primjena je ograničena, ali se iz subkritične tekućinske ekstrakcije pomoću različitih otapala razvila subkritična ekstrakcija vodom. Voda je jeftino i ekološki prihvatljivo otapalo te se u zadnje vrijeme sve više koristi jer se njena svojstva pri otapanju značajno mogu promijeniti promjenom temperature i tlaka (Rovio i sur., 1999.). Tako voda ostaje u tekućem obliku čak i kada je temperatura značajno viša od njene točke ključanja pri 100°C. Polarnost, viskozitet, površinska napetost i konstanta disocijacije su sniženi u usporedbi s vodom na sobnoj temperaturi što značajno približava kemijska svojstva vode onima koja imaju organska otapala. Voda s niskom polarnošću, koja se dobije stlačivanjem, može otopiti polarne (pri nižim temperaturama) i nepolarne (pri višim temperaturama) komponente kao što su fitokemikalije koje su inače netopive u vodi pri sobnim uvjetima tlaka i temperature (Ramos i sur., 2002.). Subkritična voda se može održavati u tekućem obliku do temperature od 374°C i tlaku od 221 bara te se ovi uvjeti mogu mijenjati u ovisnosti o organskom spoju kojeg želimo izdvojiti. Prednost subkritične vode je da ona kao otapalo može otopiti nepolarna organska otapala, ekološki je prihvatljiva kao otapalo i lakše ju je odlagati i skladištiti nego uobičajeno korištena organska otapala za ekstrakciju te ne predstavlja prijetnju za okoliš. Vremenski je ekstrakcija subkritičnom vodom brža i manje opasna po korisnika od korištenja uobičajenih organskih otapala koja mogu biti toksična te se zato može primjenjivati u industriji i za toplinski osjetljive spojeve, a mijenjanjem parametara procesa se mogu izdvajati polarni i nepolarni biološki aktivni spojevi te oni manje i veće molarne mase. Trenutno se ovakva ekstrakcija primjenjuje za pročišćavanje esencijalnih ulja, tanina, flavonoida, glikozida, proteina, pektina, laktona i organskih kiselina. Ipak, ako je cilj pročistiti aktivne sastojke iz biljaka, čiji sastav je kompleksan i oni mogu biti međusobno slični, sama ekstrakcija subkritičnom vodom neće biti dovoljna da se postignu zahtjevi čistoće pa se treba kombinirati s ostalim tehnikama pročišćavanja kao što su membranska separacija, molekularna destilacija ili adsorpcija. Nastavak istraživanja u području ekstrakcije bioloških aktivnih spojeva pomoću subkritične ekstrakcije vodom će pridonijeti proširenju ove tehnologije i razvoju dobrobiti za okoliš i ekonomski razvoj. (Liang i Fan, 2013.).

2.3. Jabuka *Malus domestica*

Jabuka *Malus domestica* je najzastupljenija voćna vrsta u travnjačkim voćnjacima, a u „divljem" obliku je također stanovnik brdskih i nizinskih šuma. To je listopadno stablo iz porodice ruža (*Rosaceae*) koje može narasti i do 12 metara. Mlade grane obrasle su dlačicama, kasnije postaju gole i sive do smeđe boje. Listovi su ovalni i sitno nazubljeni, a cvjetovi su pravilni i dvospolni. Sastavljeni su od čaške i vjenčića. Čašku čini pet zelenih lapova, dok je vjenčić sačinjen od pet bijelih okruglih latica koje su s vanjske strane malo crvenkaste. Prašnici cvijeta su žuti i mnogobrojni. Plod je okrugao, obično veći od 5 cm, zelene, crvene ili žute boje (Umeljić, 2004.). Stablima jabuke odgovara umjereno toplo podneblje s jednakomjerno raspoređenim padalinama tijekom ljetnog razdoblja i srednjom vlažnosti zraka. Stabla mogu rasti na ljetnim temperaturama do 35ºC ako su pravilno ishranjena, ali teško podnose jutarnji mraz pa za uzgoj treba odabrati područja gdje mraz nije čest. Najbolje uspijevaju na dubljim dobro dreniranim pjeskovito-ilovastim, ilovastim i glinasto-ilovastim tlima. Vrijeme zriobe plodova ovisi o sorti, opskrbljenosti hranjivima, podneblju i nadmorskoj visini. Različite se sorte jabuka beru od kraja srpnja do kraja listopada (Vrbanac i sur., 2007.).



Slika 1. Biljka *Malus domestica* ili obična jabuka (Vrbanac i sur., 2007.)

2.3.1. Gospodarski i biološki značaj jabuke

Rod *Malus* vuče podrijetlo iz regija centralne Azije, Kavkaza, zapadne Kine, himalajske Indije i Pakistana. Razvoju današnje jabuke kakvom je svi znamo je doprinio poznati Put svile, odnosno trgovački put od Crnog mora do zapadne Kine. Smatra se da su različite kulture jabuke postojale već od Neolitika kad su sjeme tim putem rasprostranili trgovci, putnici i životinje. Njihovo postojanje zabilježili su prvi put Rimljani (Juniper i sur., 1998.).

Suvremena proizvodnja jabuka je jedna od najprofitnijih i stabilnijih proizvodnji u voćarskoj grani. Svježi plodovi jabuke mogu potrošačima biti na raspolaganju cijelu godinu i zbog toga je ta proizvodnja jedna od stabilnijih (Brzica, 1995.). Godišnja potražnja voća po stanovniku iznosi 70 kg, a po preporuci bi jedan stanovnik trebao uzeti oko 220 kg voća. U Hrvatskoj bi valjalo posaditi najmanje 5600 hektara visoko proizvodnih nasada jabuke s prirodom od 40000 kg/ha da bi se postigla proizvodnja od 50 kg plodova jabuke po stanovniku.

Jabuka spada među najzdravije i najkorisnije vrste voća te ima terapijski učinak. Plodovi se mogu koristiti svježi ili osušeni. Osim za ishranu, služe za izradu mnogobrojnih prehrambenih proizvoda, kao što su džemovi, marmelade, rakije i ostala alkoholna pića. Drvo gorenjem daje puno dima, koji ima ugodan miris, pa ga se koristi pri sušenju suhomesnatih proizvoda na seoskim gospodarstvima (Vrbanac i sur., 2007.).

Danas se u znanstvenim i medicinskim krugovima sve više istražuju spojevi izolirani iz ove biljke. Iz lišća su izolirani floridzin, floretin, rutin, avikularin te razni glikozidi. Floridzin je glavna fenolna komponenta nađena u listovima ove biljke sa udjelom od 76,9% do 84,2% ukupnih fenolnih spojeva identificiranih HPLC metodom. Floridzin ima široki spektar bioloških učinaka, sprječava rast tumorskih stanica, poboljšava pamćenje i koristan je u suzbijanju koštanih lomova. Također ima antidijabetičku aktivnost jer sprječava apsorpciju glukoze tako što blokira rad natrij glukoznih simportera u tankom crijevu i bubrezima. Floretin je fenolni spoj sa udjelom od 1.0-1.8% ukupnih fenola određenih HPLC metodom. Floretin ima izraženo antiupalno djelovanje. Daljnja istraživanja ovih spojeva dat će nova saznanja o njihovoj primjeni u suzbijanju mnogih bolesti (Liaudanskas i sur., 2014.).

2.4. Trešnja *Prunus avium* L.

Trešnja *Prunus avium* L. je listopadno stablo koje pripada porodici ruža (*Rosaceae*). U divljini raste u brdsko bjelogoričnim šumama, a rasprostranjeno je u Europi, sjevernoj Africi i zapadnoj Aziji. Stablo trešnje dobro raste na dubokim i ocjeditim tlima koja ne zadržavaju višak vode i dobro podnosi niske temperature, ali ne zadugo (Vrbanac i sur., 2007.). Kora drveta je žilava i smeđa, a korijen dubok. Cvjetovi su jednodomni i dvospolni, a listovi naizmjenični i nazubljeni. Plod trešnje je okrugla mesnata koštunica promjera do 1 centimetra (Umeljić, 2004.). Plodovi se razlikuju debljinom, bojom i konzistencijom mesa. Debljina ploda i pucanje plodova su sortne osobine (Vrbanac i sur., 2007.).



Slika 2. Biljka *Prunus avium* L. ili trešnja (Umeljić, 2004.).

2.4.1. Gospodarski i biološki značaj trešnje

Većina znanstvenika koja se bavi istraživanjem podrijetla biljaka smatra da trešnja potječe s područja između Crnog mora i Kaspijskog mora. Na području Švicarske i Italije nađene su koštice trešnje iz mlađeg kamenog doba te se smatra da su tada bile korištene divlje trešnje vrapčare (*Prunus avium* L.). Kultura uzgoja trešnje u Hrvatskoj ima dugu tradiciju, a uzgaja se na gotovo čitavom području, više na mediteranskom nego u kontinentalnom, gdje se uzgaja u okolici većih gradova. U Hrvatskoj postoji oko 800 000 stabala trešnje na površini od 4000 hektara, a proizvodnja nije dostatna jer se po stanovniku troši 3 kg trešanja godišnje kako u svježem obliku tako i u obliku raznih prerađevina (Miljković, 2011.).

Plodovi trešnje bez koštica mogu se ili zamrznuti ili preraditi u različite prehrambene proizvode kao što su džemovi, sokovi ili alkoholna pića. Drvo trešnje je izuzetno elastično, žilavo i lijepe crvenkastosmeđe boje te se stoga upotrebljava u stolarskim i tesarskim radovima (Vrbanac i sur., 2007.).

Sve više znanstvenih radova upućuje na to koliko je trešnja bogata biološki aktivnim komponentama. Trešnje su prirodni izvor antioksidansa kao što su polifenoli (Serra i sur., 2011.). Crvenu boju plodu trešnje daju antocijani, polifenoli koji imaju antioksidacijsku i antiupalnu aktivnost (Blando i sur., 2004.). Antocijani nađeni u trešnji, posebice cijanidi, potencijalno mogu inhibirati rast tumora, usporiti razvoj kardiovaskularnih bolesti te usporiti proces starenja (Kong i sur., 2003.). Neki od ostalih flavonoida identificiranih iz trešanja su rutin, kvercetin, kampferol, katehin, epikatehin i fenolne kiseline (klorogenska, neoklorogenska i druge) (Casagrande i Darbon, 2001.).

U znanstvenom radu Ballistreri i sur. (2013.) korištena je HPLC metoda da bi se identificirale i kvantificirale šećerne i fenolne komponente te organske kiseline u svježim plodovima trešnje. Ukupni sadržaj fenolnih komponenti je bio raspona 6,21 do 94,20 miligrama ekvivalenata galne kiseline na 100 grama svježe mase trešanja. Visoka razina fenolnih komponenti ukazuje na to da bi trešnje mogle biti izvor bioaktivnih komponenti koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Također, u znanstvenom radu Hooman i sur. (2009.) ispitivan je diuretički efekt peteljki trešanja u prahu na 13 zdravih ispitanika, a s obzirom da je zapaženo povećanje volumena urina ispitanika, diuretički efekt je potvrđen. Visoka razina fenolnih komponenti ukazuje na to da bi trešnje mogle biti izvor bioaktivnih komponenti koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
Dulbecco's Modified Eagle's Meidum (DMEM), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
Fetalni teleći serum (FBS), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevasol)), Promega, SAD
Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Subkritični vodeni ekstrakt iz peteljki jabuke, Tehnološki fakultet, Sveučilište Novi Sad
Subkritični vodeni ekstrakt iz peteljki trešnje, Tehnološki fakultet, Sveučilište Novi Sad

3.1.2. Stanična linija HeLa

U ovom radu korištena je humana tumorska stanična linija HeLa dobivena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Izolirana je 1951. godine iz tumorskog tkiva vrata maternice pacijentice Henriette Lacks te su stanice transformirane pomoću humanog papiloma virusa 18 (HPV 18). Navedena stanična linija se uzgaja u plastičnim T-bocama ravnih stijenki te u pločicama s jažicama u inkubatoru s 95% zraka i 5% CO_2 pri temperaturi od 37°C. Za uzgoj je korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10% FBS. Ova stanična linija sadrži 82 kromosoma umjesto 46 te 4 tipična HeLa kromosomska markera (M1, M2, M3 i M4). HeLa je do danas najčešće korištena humana tumorska stanična linija.

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH= 7,4)

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

0,4% otopina tripan – plavo

Boja tripan-plavo	0,08 g
PBS pufer	20,00 mL

0,2% otopina kristal violet

Boja kristal-violet	0,2 g
2% etanol	10,00 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

Dyno – Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Taiwan
Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija
Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2, Kambič, Slovenija
Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
Neubauerova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD
Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
Spektrofotometar, Thermo Scientific Genesys 10S UV/VIS, SAD
Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija
Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, lijevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)
Ploče s 6 jažica, Corning, SAD
Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
T-boce od 25cm^2, Corning, SAD

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema subkritičnih vodenih ekstrakata peteljki jabuke i trešnje

Bioaktivni spojevi iz peteljki jabuke i trešnje ekstrahirani su subkritičnom vodom pri temperaturi ekstrakcije 150°C, pritisku od 30 bara tijekom 30 minuta te frekvenciji vibracije posude za ekstrakciju od 3 Hz. Priprava subkritičnih vodenih ekstrakata provedena je na Tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Novom Sadu.

3.2.2. Uzgoj HeLa stanica u T-bocama

Stanice se čuvaju u mediju za zamrzavanje pri -70°C, a njihov uzgoj počinje odmrzavanjem uranjanjem u vruću kupelj. Stanice su zamrznute u koncentraciji od oko $1x10^7$ stanica po mililitru, a ampula u kojoj se nalaze se odmrzne te se stanice centrifugiraju 3 minute pri 1000 okretaja po minuti. Nakon centrifugiranja, supernatant se ukloni pipetom, a talog se resuspendira u DMEM mediju za uzgoj sa 5-10% FBS u odgovarajućim T bocama. Zatim se T boce stavljaju u inkubator na temperaturu od 37°C uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO_2. Opće stanje i morfologija stanica te brojnost se provjeravaju pod inverznim mikroskopom, a ovako nacijepljene stanice omogućavaju održavanje biomase za pojedinačne pokuse. Nakon što je pokrivenost površine odnosno gustoća stanica viša od 80%, stanice je potrebno precijepiti kako ne bi došlo do kontaktne inhibicije rasta.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Kada se želi pripremiti uzorak za brojenje stanica, stanice je potrebno tripsinizirati kako bi se odvojile od podloge u pojedinačne stanice. Hranjivi medij se iz T boce uklanja pipetom te se doda 1mL tripsina. Tripsinizacija se brže provodi na višoj temperaturi pa se T boca stavi u inkubator kroz 3-5 minuta, a učinak tripsinizacije se prati pod inverznim mikroskopom. Odvajanje stanica od podloge je završeno kad se stanice zaokruže. Djelovanje tripsina nakon toga se zaustavlja dodatkom 2 mL medija sa serumom, a stanice se tako resuspendiraju. Alikvot od 20 µL suspenzije stanica se pomiješa sa 20 µL boje tripan-plavo, a 20 µL tako pripremljene otopine se nanosi u Neubauerovu komoricu za brojanje. Neubauerova komorica

je podijeljena na 16 kvadratića s ukupnom površinom od 1mm^2, a broj stanica se računa tako da se srednja vrijednost stanica iz 4 kvadratića pomnoži s 5x10^3. Ova metoda se temelji na principu da žive stanice ne propuštaju boju tripan plavo u stanicu čije molekule su velike i polarne i vežu se na unutarstanične proteine. Stoga se žive stanice ne boje, a mrtve stanice se boje plavo.

$$Broj\ stanica/mL\ suspenzije = srednja\ vrijednost\ broja\ stanica\ u\ 4\ kvadratića\ x\ 5\ x\ 10^3$$

3.2.4. Ispitivanje biološke aktivnosti subkritičnih vodenih ekstrakata peteljki jabuke i trešenje na HeLa staničnoj liniji

Prethodno uzgojene HeLa stanice nacijepljene su u ploče sa 96 jažica u početnoj koncentraciji od 2,5x10^4 st/mL, a u svaku jažicu je nacijepljeno 100 µL suspenzije stanica. Ploče su stavljene u inkubator s reguliranom atmosferom na 37°C. Prihvaćanje stanica za podlogu, njihova morfologija, brojnost i opće stanje su kontrolirani inverznim mikroskopom. Nakon 24 sata od nacjepljivanja stanice su tretirane subkritičnim vodenim ekstraktima jabuke i trešnje u volumnim udjelima 1-20% (v/v). U kontrolne jažice HeLa stanica se ne dodaju ekstrakti. Svaki uzorak postavljen je u tri paralele, a pokus je ponavljan tri puta. Nakon 48 sati od dodatka ekstrakata određena je vijabilnost stanica MTS metodom te je izražena kao postotak u odnosu na kontrolne stanice.

3.2.5. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

MTS test služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevasol)) u obojeni formazanski produkt. Nakon tretiranja stanica, u svaku jažicu se dodaje 10 µL MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom 3 sata na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Apsorbancija se mjeri na 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica proglasi se 100 %, a vrijednosti apsorbancija tretiranih uzoraka izraze se kao udio u odnosu na netretirane stanice.

$$Preživljenje\ stanica\ (\%)\ =\ [Srednja\ vrijednost\ A_{490}\ (uzorak)\ srednja\ vrijednost/\ A_{490}\ (kontrolne\ stanice)\ ]\ x\ 100$$

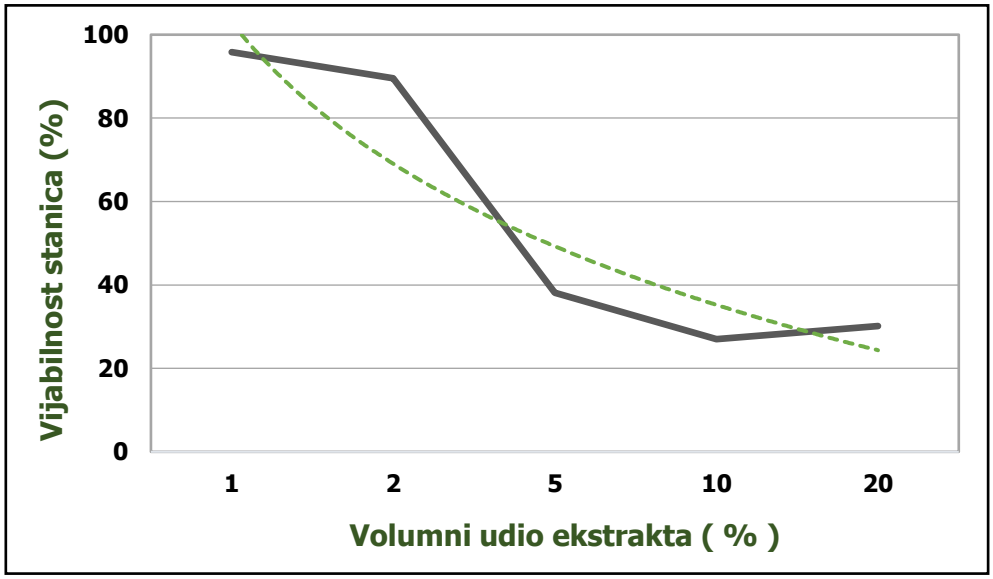
3.2.6. Bojanje HeLa stanica bojom kristal violet

Prethodno uzgojene HeLa stanice, održavane u T-bocama, nacijepljene su u ploče sa 6 jažica u početnoj koncentraciji od 2,5 x 10^4 st./mL, a u svaku jažicu nacijepljeno je 2 mL stanica. Ploče s nacijepljenim stanicama uzgajane su 24 sata u inkubatoru pri kontroliranim uvjetima atmosfere i na temperaturi od 37°C, a nakon toga su tretirane ekstraktima. Dvije od šest jažica su služile za kontrolu i u njih nisu dodani ekstrakti. U prve dvije jažice su dodani ekstrakti jabuke, a u druge dvije ekstrakti trešnje u volumnim udjelima od 5% (volumen od 100 µL) i 20% (volumen od 400 µL). Nakon 48 sata uzgoja, uzorci su obojani otopinom kristal violet i slikani pomoću digitalne kamere. Iz jažica je najprije uklonjen medij i stanice su isprane PBS puferom. Nakon toga u svaku je jažicu dodano 0,5 mL otopine boje kristal violet te je ploča s jažicama stavljena 10-15 minuta u inkubator na 37°C. Nakon toga boja se uklanja te se jažice ispiru sa po 1 mL PBS pufera. Nakon ispiranja u svaku jažicu se dodaje još po 1 mL PBS pufera te se slikaju digitalnom kamerom pri povećanju od 100x.

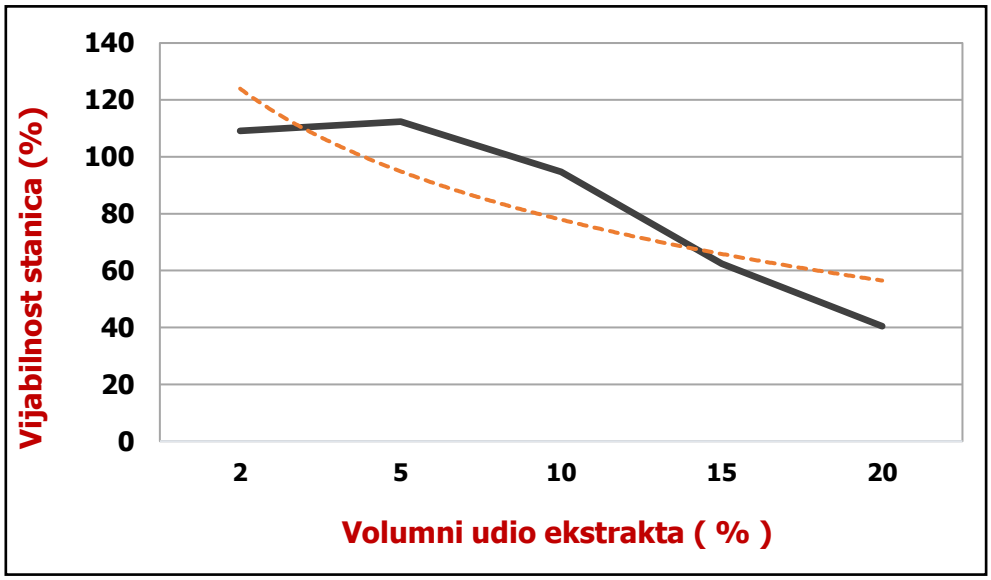
4. REZULTATI

4.1. Učinak subkritičnih vodenih ekstrakata iz peteljki jabuke i trešnje na vijabilnost HeLa stanica

HeLa stanice su nacijepljene u ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji od 2,5x10^4 st/mL te su nakon 24 sata tretirane sa subkritičnim vodenim ekstraktima peteljki jabuke i trešnje u rasponu 0-20% (v/v). Nakon 48 sati određena je vijabilnost stanica MTS metodom. Rezultati su izraženi kao postotak preživljenja stanica tretiranih ekstraktom u odnosu na kontrolne stanice (slike 3 i 4).



Slika 3. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta iz peteljki jabuke na HeLa stanice.



Slika 4. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta iz peteljki trešnje na HeLa stanice.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta iz peteljki jabuke ima inhibitoran učinak na HeLa stanice pri svim ispitanim koncentracijama i taj učinak je proporcionalan volumnom udjelu ekstrakta. Kod ispitivanja učinka subkritičnog vodenog ekstrakta iz peteljki trešnje također je zapažen inhibitorni učinak proporcionalan ispitanim koncentracijama.

Eksperimentalni podaci su aproksimirani krivuljom koja ih najbolje opisuje, odnosno regresijskom analizom odabrana je ona krivulja koja najmanje odstupa od eksperimentalnih podataka tj. ona čija je vrijednost koeficijenta determinacije R^2 bliža 1 (R^2~1). Rješavanjem pripadajuće jednadžbe izračunata je IC_{50} vrijednost, koja definira onaj volumni udio ekstrakta koji inhibira rast 50% stanica u kulturi.

Tablica 1. IC_{50} vrijednosti ispitanih ekstrakata (v/v) za HeLa stanice

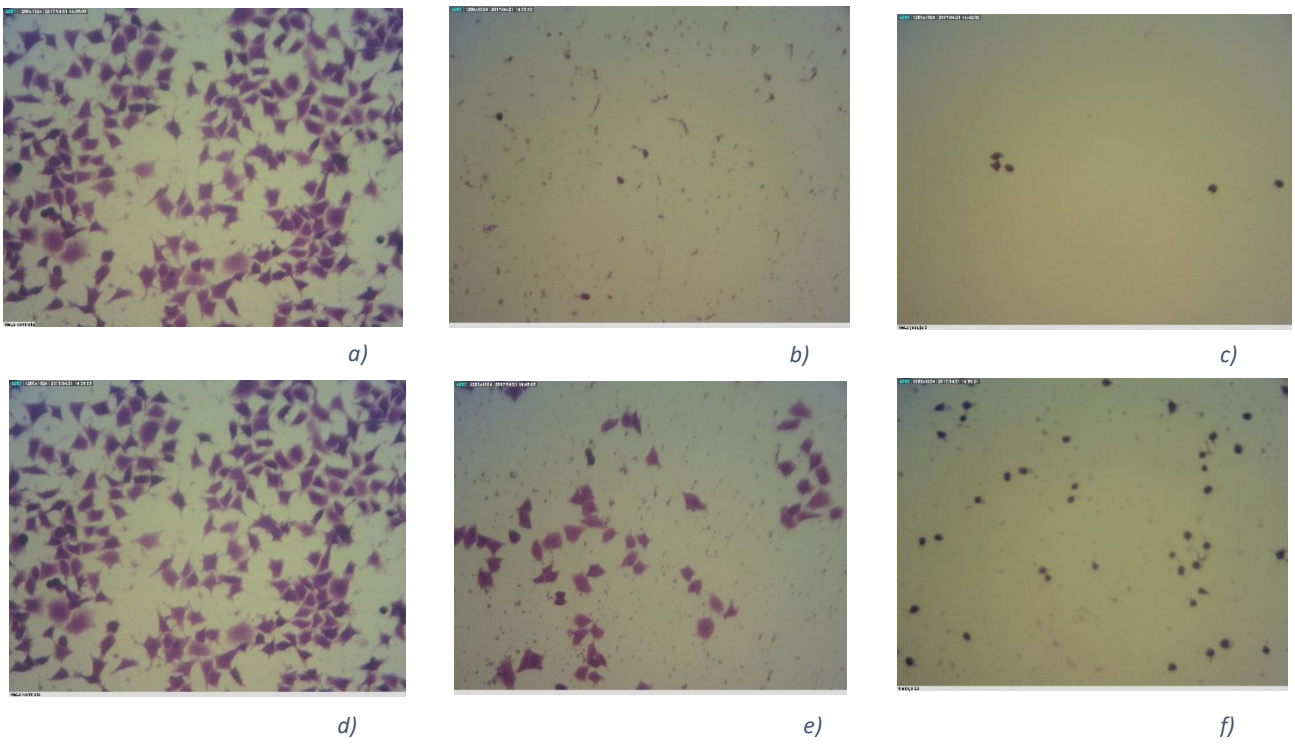
	IC_{50} (v/v %)
Ekstrakt JABUKA	2,9547
Ekstrakt TREŠNJA	5,8351

Iz tablice 1.vidljivo je da je inhibitorni učinak subkritičnog vodenog ekstrakta jabuke na HeLa stanice dvostruko izraženiji nego inhibitorni učinak subkritičnog vodenog ekstrakta trešnje.

4.2. Morfološke promjene u HeLa stanicama nakon tretmana subkritičnim vodenim ekstraktima jabuke i trešnje

Tijekom određivanja utjecaja dodatka subkritičnih vodenih ekstrakata iz peteljki jabuke i trešnje na preživljavanje HeLa stanica, svjetlosnom mikroskopijom te bojanjem stanica kristal violet (Slike 3 a-f) praćene su i promjene unutar stanica uz dodatak 5 i 20% (v/v) ekstrakata.

Kontrola *5% (v/v)* *20% (v/v)*



a) *b)* *c)*

d) *e)* *f)*

Slika 5. Morfološki izgled HeLa stanica obojanih otopinom kristal violet. Kontrolne, netretirane stanice su prikazane na slikama a) i d), stanice tretirane s 5% i 20% (v/v) ekstrakta jabuke su b) i c), dok su na slikama e) i f) fotografije stanica tretirane ekstraktima trešnje s 5% i 20% (v/v).

Praćenjem morfologije HeLa stanica svjetlosnom mikroskopijom vidljivo je kako su kontrolne stanice (slike 5 a i d) veće gustoće, pravilne morfologije te visoko formiranog monosloja stanica za razliku od stanica tretiranih ekstraktom jabuke (slike 5 b i e), odnosno ekstraktom trešnje (slike 5 c i f) koje pokazuju manju gustoću i slabije formiran monosloj stanica, a što je u korelaciji s rezultatima njegova učinka na proliferaciju stanica određen MTS metodom.

5. RASPRAVA

Antitumorska svojstva koja posjeduju mnogi biološki aktivni spojevi nađeni u prirodi mogu se ispitati *in vitro* testovima. Testovi citotoksičnosti mogu se koristiti za ispitivanje potencijalno aktivnih tvari odnosno antitumorske aktivnosti spoja tj. lijeka u razvojnoj, pretkliničkoj fazi. U tom području se najčešće koriste humane tumorske stanične linije. Prednost korištenja kultura životinjskih stanica je dobivanje ujednačenih i reproducibilnih rezultata, bolja kontrola staničnog okoliša u smislu kontrole pH, temperature, razine kisika, hranjivih tvari i proizvoda metabolizma te bolje razumijevanje staničnih procesa.

Humane stanične linije, kao HeLa, su novi pristup u (eko)toksikološkim istraživanjima. Takvi *in vitro* testovi razvili se kao alternativa klasičnim testovima na pokusnim životinjama i podrazumijevaju ispitivanja na staničnim kulturama, linijama, dijelovima tkiva ili organa (Kniewald i sur., 2005.). Primarni *in vitro* test Nacionalnog instituta za rak (NCI, *National Cancer Institute*) iz 1990. uključuje listu 60 najvažnijih humanim tumorskih staničnih linija kako bi se testirale razne komponente u definiranim rasponima koncentracija. Komponente koje se testiraju mogu biti prirodne molekule koje su ekstrahirane iz sirovina prirodnog porijekla ili mogu biti male sintetske molekule, a testira se njihov učinak kako bi se utvrdio stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju (Boyd i Paull, 1995.).

Upotreba HeLa stanica postala je uobičajena u istraživanju i razumijevanju važnih bioloških procesa te sekvencioniranju genoma kako bi se bolje spoznale razne funkcije i biološke aktivnosti u tumorskim stanicama. Jedno od prvih postignuća u znanosti do kojeg je došlo korištenjem HeLa stanične linije bilo je kreiranje cjepiva protiv polio virusa (Scherer i sur., 1953.). HeLa stanice su besmrtne, dijele se otprilike svako 23 sata te se adherentno vežu za podlogu. Također, jednostavne su za upotrebu u standardiziranom mediju, podložne su infekcijama te se mogu koristiti pri transformaciji virusima (Decelles, 2012.). Posjeduju i neke karakteristike normalnih humanih stanica kao što su proizvodnja proteina i regulacija gena te se zato koriste i pri proučavanju reakcija koje bi se odvijale i u normalnim humanim stanicama. Može se ispitivati njihov rast pod utjecajem raznih bioloških aktivnih spojeva kao što su npr. polifenoli.

Cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje subkritičnih vodenih ekstrakata jabuke i trešnje na rast HeLa stanične linije. Stanice su nacijepljene u ploče s 96 jažica i nakon 24 sata su tretirane sa pet različitih volumnih udjela ovih ekstrakata. Ekstrakt jabuke je dodan u volumnim udjelima od 1, 2, 5, 10 i 20%, a ekstrakt trešnje u volumnim udjelima od 2, 5, 10, 15 i 20%. 48 sati

nakon tretiranja stanica ekstraktima, određena im je vijabilnost MTS metodom (slike 3 i 4). Tretman ekstraktima ovih biljaka pokazao je inhibitorni učinak na rast HeLa stanične linije; jedino je kod 5% ekstrakta trešnje primijećen blagi stimulatorni učinak oko 12%. Ekstrakt jabuke je pokazao inhibitoran učinak pri svim ispitanim koncentracijama. Navedena pojava kod djelovanja ekstrakta trešnje pri 5% (v/v) zove se kemijska hormeza, česta biološka pojava koju karakterizira stimulacija proliferacije pri niskim dozama ispitivane tvari, odnosno adaptivni odgovor HeLa stanica na izlaganje niskim dozama ekstrakta trešnje. Sličan, inhibitorni učinak na HeLa stanice zamijećen je i pri dodatku ekstrakta jabuke u staničnu liniju raka debelog crijeva, Caco-2 stanice. Ekstrakt je dodan u koncentracijama u rasponu od 5-50 mg/L, a inhibitorni učinak je zamijećen pri koncentracijama većim od 20 mg/L. Također, ekstrakt je dodan u istim koncentracijama na staničnu liniju tumora jetre, HepG2 stanice, kod kojih je zamijećena inhibicija pri koncentraciji većoj od 50 mg/L. Treba napomenuti i da je ekstrakt koji je sadržavao koru jabuka značajnije reducirao proliferaciju tumorskih stanica od ekstrakta koji nije sadržavao koru jabuka, što može značiti da se u kori jabuka nalaze određene biološke aktivne tvari koje imaju inhibitorni učinak (Eberhardt i sur., 2000.). Laboratorijski miševi koji su imali rak crijeva hranjeni su dijetom bogatom antocijanima, odnosno ekstraktom trešnje koji je sadržavao 375-3000 mg/kg antocijana. Zamijećeno je da su ti miševi imali 74% manje pojave raka slijepog crijeva od miševa koji nisu hranjeni istim ekstraktom, ali postotne promjene kod raka debelog crijeva i tankog crijeva nisu bile značajne kod miševa hranjenih ekstraktom i miševa koji nisu hranjeni ekstraktom (Kang i sur., 2003.).

Kako bi se ispitao učinak ekstrakata jabuke i trešnje na morfologiju HeLa stanica, stanice su nacijepljene u ploče sa 6 jažica i tretirane odabranim koncentracijama ekstrakata 5 % i 20% (v/v). Stanice su obojane kristal ljubičastim i slikane pod inverznim mikroskopom na povećanju od 100x. Kod kontrolnih, netretiranih stanica uočen je pravilni monosloj stanica karakteristične epitelne morfologije, a kod tretiranih stanica primijećena je smežuranost, zaokruženost i manji broj stanica, a što je u korelaciji sa rezultatima preživljavanja stanica određenih kolorimetrijskom MTS metodom.

Iz provedenog istraživanja može se zaključiti da dodatak subkritičnih vodenih ekstrakata biljaka *Malus domestica* i *Prunus avium* L. u medij za uzgoj HeLa stanica inhibira rast tih stanica te biološki aktivne tvari iz peteljki jabuke i trešnje imaju potencijal u sprečavanju rasta tumorskih stanica. Ipak, potrebno je nastaviti ovakvu vrstu istraživanja kako bi se dobila potpuna slika o učinku ovih ekstrakata kako na normalne tako i na tumorske stanične linije zbog toga što se često znaju dobiti suprotni rezultati u ispitivanju utjecaja istih ekstrakata na različite tumorske stanične linije.

Nadalje, ako se usporede postojeća *in vivo* istraživanja sa spoznajama dobivenim *in vitro* testovima, vidljivo je da i takav pristup može učinkovito ispitati potencijal mogućeg lijeka u razvojnoj fazi. *In vitro* testovi su jeftiniji u odnosu na *in vivo* testove, brži su, nastaje manje toksičnog otpada i poštuju dobrobit životinja, a primjenom kultura životinjskih stanica se u kratkom vremenu može ispitati veliki broj tvari u širokom rasponu koncentracija (Radojčić Redovniković i sur., 2016.).

6. ZAKLJUČCI:

Iz provedenih pokusa i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta jabuke u rasponu koncentracija 1-20% (v/v) pokazao je inhibitorni učinak na rast HeLa stanica pri svim volumnim udjelima u rasponu 1-20%, određeno MTS metodom.

2. Dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta trešnje u rasponu koncentracija 5-20% (v/v) na HeLa stanice pokazao je inhibitorni učinak na rast stanica praćen MTS metodom, pri volumnim udjelima većim od 5%.

3. Subkritični vodeni ekstrakt jabuke pokazao je jači inhibitorni učinak na rast HeLa stanica od subkritičnog vodenog ekstrakta trešnje, za 50% preživljenje HeLa stanica potrebno je dodati 2.9547% volumnog udjela ekstrakta jabuke, odnosno 5.8351% volumnog udjela ekstrakta trešnje.

4. Svjetlosnom mikroskopijom HeLa stanica potvrđeni su rezultati dobiveni MTS metodom. U odnosu na kontrolni uzorak HeLa stanica, vidljive su morfološke promjene u stanicama izloženim djelovanju ekstrakata jabuke i trešnje.

7. LITERATURA

Ballistreria, G., Continellab, A., Gentileb, A., Amentaa, M., Fabronia, S., Rapisardaa, P. (2013.), Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy, Food Chemistry **140**, 630-638.

Blando, F., Gerardi, C., Nicoletti, I. (2004.), Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanins as ingredients for functional foods, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 253–258.

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

Brzica, K. (1995.), Jabuka, Agroznanje d.o.o., Zagreb, str. 11-22, 257-259.

Casagrande, F., Darbon, J. (2001.), Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1, *Biochemical Pharmacology* **61**, 1205–1215.

Eberhardt, V.M., Lee Yong, C., Hai Liu, R. (2000.), Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples, *Nature* **405**, 903-904.

Decelles, P. (2012.), The Biology of HeLa Cells, http://blogs.jccc.edu/pdecell/files/2012/08/HeLaSlides2.pdf, pristupljeno 24.5.2017.

Hooman, N., Mojab, F., Nickavar, B., Pouryousefi-Kermani, P. (2009.), Diuretic effect of powdered *Cerasus avium* (cherry) tails on healthy volunteers, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **22**, 381-383.

Juniper, B.E., Watkins ,R., Harris, S.A. (1998.), The origin of the apple, *Acta Hortic* **484**, 27-34.

Kang, S.Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., Bourquin, L.D. (2003.), Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells, *Cancer Letters* **194**, 13-19.

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

Kong, M.J., Chia, S.L., Goh, K.N., Chia, F.T., Brouillard, R. (2003.), Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry* **64**, 923–933.

Landry, M.J.J., Pyl, T.P., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M.,. Stütz, M.A., Jauch, A., Raeka, S. Aiyar, S.R., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, O.J., Huber, W., Steinmetz, M.L. (2013.), The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line, *G3: Genes, Genomes, Genetics* **3**, 1213-1224.

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

Liaudanskas, M., Viškelis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N., Janulis, V. (2014.), Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *The Scientific World Journal* **1**, 1-10.

Miljković, I. (2011.), Trešnja, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb, str. 18-25.

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

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

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

Scherer, W.F., Syverton, J.T., Gey, G.O. (1953.), Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses, IV. Viral multiplication in a stable strain of human maligant epithelial cells (strain HeLa) derived from a epidermoid carcinoma of the cervix, *The Journal of Experimental Medicine* **97**, 695-710.

Serra, T.A., Duarte, O.R., Bronze, R.M., Duartea, M.M.C. (2011.), Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal, *Food Chemistry* **125**, 318-325.

Umeljić, V. (2004.), U svijetu cvijeća i pčela; atlas medonosnog bilja 1, Ilija Borković, Split, str. 94, 98.

Vrbanac, K., Jakopec, L., Ilijaš, I., Malovec, K. (2007.), Priručnik tradicionalnih i autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, https://www.park-zumberak.hr/dokumenti/prirucnik_ppzsg.pdf, pristupljeno 24.5.2017.

Zadnja stranica završnog rada

Izjava o izvornosti

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

Kristina Žuna