BIOLOŠKI UČINCI IZOLATA DOBIVENIH KEMIJSKOM EKSTRAKCIJOM IZ CVIJETOVA KAMILICE (Camomila mattricaria)

Pervan, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:994395

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Martina Pervan

BIOLOŠKI UČINCI IZOLATA DOBIVENIH KEMIJSKOM EKSTRAKCIJOM IZ CVJETOVA KAMILICE (*Camomila mattricaria)*

Diplomski rad

Osijek, 2013.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Martina Pervan

BIOLOŠKI UČINCI IZOLATA DOBIVENIH KEMIJSKOM EKSTRAKCIJOM IZ CVJETOVA KAMILICE (*Camomila mattricaria)*

Diplomski rad

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

BIOLOŠKI UČINCI IZOLATA DOBIVENIH KEMIJSKOM EKSTRAKCIJOM IZ CVIJETOVA KAMILICE (*Camomila mattricaria)*

Martina Pervan

Rad je izrađen: Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Mentor: Dr.sc. Tatjana Belovari, **red.prof.**
Neposredni voditelj: Dr.sc. Ljubica Glavaš-Obrovac, **red.prof.**

Kratak sadržaj diplomskog rada:

Biološki učinak 12 ekstrakata iz cvjetova kamilice istražen je *in vitro* na staničnim linijama HuT-78, K562, HeLa, NCI-H358 i MDCK-I. Antiproliferativne sposobnosti ekstrakata i apigenina nakon 72 sata izlaganja stanica određene su MTT testom. Morfološke promjene analizirane su svjetlosnom mikroskopijom, a apoptoza je određena Annexin-V-FITC testom. Rast stanica značajno je inhibiralo 3 ekstrakta u koncentracijama 0,2 i 0,5 mg/mL rezultirajući s više od 80 % inhibicije rasta HuT-78 i K562 stanica. Najmanje osjetljiva stanična linija na djelovanje ekstrakata je NCI-H358 kod koje je uočena inhibicija rasta od 60-65 %. Najizražajnije morfološke i apoptotičke promjene na HeLa stanicama izaziva ekstrakt 11 (IC_{50} = 0,098 mg/ml). Ispitivani izolat apigenina u odnosu na komercijalno dostupan apigenin pokazuje različit obrazac antiproliferativnog djelovanja u odnosu na komercijalno dostupni uzorak što upućuje da apigenin nije jedina biološki aktivna tvar u ekstraktima. U zaključku, ispitivani ekstrakti značajno inhibiraju rast stanica i imaju sposobnost indukcije apoptoze. Nije uočena selektivnost u djelovanju između tumorskih i normalnih stanica.

Broj stranica: 57
Broj slika: 12
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 48
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: ekstrakt kamilice, apigenin, citotoksičnost, protutumorski učinak, apoptoza
Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr.sc.** Tatjana Belovari, **red.prof.**
2. **Dr.sc.** Ljubica Glavaš-Obrovac, **red.prof.**
3. **Dr.sc.** Ivna Štolfa, **doc.**

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku i na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTACION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

EFFCTS OF BIOLOGICAL ISOLATES OBTAINED BY CHEMICAL EXTRACTION OF CHAMOMILE FLOWERS (*Camomile mattricaria*)

Martina Pervan

Thesis performed at: Department of Medicinal Chemistry, Biochemistry and Clinical Chemistry, Faculty of Medicine, University J. J. Strossmayer in Osijek
Supervisor: Dr.sc. Tatjana Belovari, **red.prof.**
Assistant in charge: Dr.sc. Ljubica Glavaš-Obrovac, **red.prof**.

Short abstract of MS thesis:

The biological effect of 12 extracts from chamomile flowers was investigated *in vitro* on cell lines HuT-78, K562, HeLa, NCI-H358 and MDCK-I. Antiproliferative abilities of extracts and apigenin after 72 hours of cell exposure were examined by MTT assay. Morphological changes were analyzed by light microscopy, and apoptosis was determined by Annexin V-FITC assay. Cell growth was significantly inhibited by 3 extracts at concentrations 0.2 and 0.5 mg/mL resulting in a more than 80 % growth inhibition HuT-78 and K562 cells. The least sensitive cell line on the effect of extracts is NCI - H358 in which is observed inhibition of growth of 60-65 %. Pronounced morphological and apoptotic changes in HeLa cells were caused by extract 11 (IC 50 = 0.098 mg/mL). Isolate of apigenin compared to commercially available apigenin shows different patterns of antiproliferative activity compared to a commercially available sample, indicating that apigenin is not the only biologically active substance in the extract. In conclusion, the tested extracts significantly inhibited the growth of cells and have the ability to induce apoptosis. There was no selectivity toward normal and tumor cells.

Number of pages: 57
Number of figures: 12
Number of tables: 1
Number of references: 48
Original in: Croatian
Key words: chamomile extract, apigenin, cytotoxicity, anti-tumor effect, apoptosis
Date of the thesis defence:

Reviewers:
1. **Dr.sc.** Tatjana Belovari, **full professor**
2. **Dr.sc.** Ljubica Glavaš-Obrovac,**full professor**
3. **Dr.sc.** Ivna Štolfa, **assistant professor**

Thesis deposited in Library of Department of Biology, Unversity of Josip Juraj Strossmayer in Osijek and on web page of Department of Biology.

Veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Tatjani Belovari, na ukazanoj suradnji i izdvojenom vremenu tijekom izrade diplomskog rada.

Veliku i posebnu zahvalu dugujem komentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac, na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da napravim svoj diplomski rad. Hvala na neizmjernoj stručnoj pomoći, savjetima, razumijevanju i sugestijama.

Najveće hvala dr. sc. Katarini Mišković i Marijani Jukić, mag. biol. koje su mi pružile veliku pomoć prilikom izrade rada, te podijelio svoja znanje i vrijeme sa mnom.

Draganu, veliko hvala za ljubav, podršku i razumijevanje tijekom cjelokupnog školovanja.

Posebnu zahvalu upućujem mojim roditeljima i braći na svim oblicima podrške, ljubavi, odricanja i brizi u trenutcima kada je to bilo najpotrebnije.

Na kraju želim se zahvaliti svim dragim prijateljima uz koje su studentski dani bili nezaboravni.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. BILJNI FLAVONOIDI 2

1.1.1. Apigenin 3

1.2. KULTURA STANICA 5

1.2.1. Rast stanica *in vitro* 6

1.2.2. Razlike *in vitro* i *in vivo* 7

1.3. GENI I NASTANAK RAKA 7

1.3.1. Onkogeni 8

1.3.2. Tumor supresorski geni 9

1.4. PROGRAMIRANA STANIČNA SMRT 10

1.4.1. Vanjski put apoptoze 10

1.4.2. Unutarnji put apoptoze 11

1.4.3. Događaji u procesu programirane stanične smrti 12

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA 14

2. MATERIJAL I METODE 15

2. 1. MATERIJAL 16

2.1.1. Ekstrakt apigenina(4',5,7-trihidroksiflavon) 16

2.1.2. Stanične linije 17

2.1.3. Kemikalije 17

2.2. METODE 18

2.2.1. Rast stanica *in vitro* 18

2.2.2. Određivanje broja vijabilnih stanica u kulturi 19

2.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT metodom 19

2.2.4. Analiza apoptoze pomoću fluorescentnog mikroskopa 21

2.2.5. Morfološke promjene 22

2.2.6. Krivulja rasta 23

2.2.7. Obrada podataka 24

3. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK..... 25

3.1. CITOTOKSIČAN UČINAK EKSTRAKATA KAMILICE POMOĆU MTT METODE..... 26

3.1.1. Razlike u citotoksičnom djelovanju izolata apigenina i standarda apigenina..... 34

3.2. MORFOLOŠKE PROMJENE NA HeLa STANIČNOJ LINIJI..... 35

3.3. PROAPOPTOTIČKO DJELOVANJE EKSTRAKATA KAMILICE NA HeLa STANICE..... 38

4. RASPRAVA 41

5. ZAKLJUČCI 47

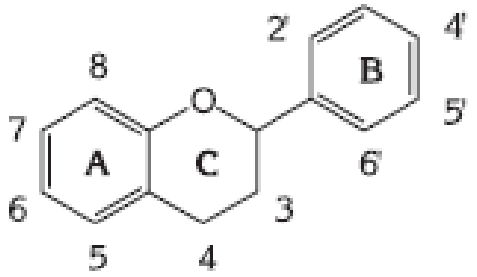
6. LITERATURA 49

7. PRILOZI 55

1. UVOD

1.1. Biljni flavonoidi

Flavonoidi su zbog mnogobrojnih funkcija u prirodi, uočljivog izgleda, ali i široke rasprostranjenosti u biljnom svijetu privlačili pažnju istraživača. Do sada su najbolje istraženi flavanoidi - sekundarni metaboliti biljaka. Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti "hvatanja" elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004). Flavonoidi pripadaju skupini prirodnih polifenolnih spojeva, široko rasprostranjenih u biljnom carstvu, koji pokazuju razne biološke aktivnosti, uključujući i inhibiciju rasta tumora (Formica i Regelson, 1995; Shukla i Gupta, 2008). Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropanski prsten C_{15} (C_6-C_3-C_6), odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil) propan-1-ol. Struktura sadrži dva benzenska prstena (A i B), povezana s piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 1). Biljni flavonoidi podijeljeni su u nekoliko osnovnih skupina: flavanoni, flavan-3-oli (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida (Kazazić, 2004).



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida. Preuzeto iz Kazazić, 2004.

Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacijom hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi) (Web 1).

Oko 90% flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida (Swain i sur., 1979). Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, prirodi i stupnju njihove alkilacije i/ili glikozidacije. Glikozidi sadrže najčešće šećer glukozu, no zastupljeni su i galaktoza, ramnoza i ksiloza. U biljkama flavanoidi se nalaze u obliku 3-O-glikozida ili polimera (Kazazić, 2004). Dokazano je da flavonoidi mogu inhibirati aktivnost enzima koji reguliraju proliferaciju stanica (Formica i Regelson, 1995), zaustaviti stanični ciklus u određenoj fazi staničnog ciklusa (Yoshida i sur., 1990;

Ranelletti i sur., 1992; Plaumann i sur., 1996) i inducirati apoptozu (Plaumann i sur., 1996; Ahmad i sur., 1997), te su stoga zanimljiv predmet istraživanja.

1.1.1. Apigenin

Kamilica je jednogodišnja samonikla biljka iz porodice glavočika (lat.*Asteraceae*) visine 15-60 cm, tankog i razgranatog korijena, dvostruko perasto razdijeljenih listova, mirisnih pojedinačnih cvjetnih glavica na dugim stapkama. Imaju ispupčenu i šuplju cvjetnu ložu, a sastavljene su od dvospolnih žutih cjevastih cvjetića u sredini i bijelih jezičastih cvjetića na rubu, koji su povijeni prema dolje. Biljka cvjeta od kraja travnja do rujna na osunčanim područjima. Rasprostranjenost biljke je velika i nalazimo je u velikom dijelu Europe i Aziji (Web 2).

Kamilica raste u cijeloj Hrvatskoj, na obrađenim tlima, uz putove i ruševine, kao poljski korov. Postoji nekoliko različitih vrsta kamilica, ali Rimska kamilica *(Chamaemelum nobile)* i Njemačka kamilica (*Chamomilla recutita*) imaju posebna ljekovita svojstva. Najcjenjenija je Njemačka kamilica koja ima široku primjenu u ljekovite svrhe (Janmeya i Sanjay, 2009). Oko 120 sekundarnih metabolita pronađeno je u kamilici, uključujući 28 terpenoida i 36 flavonoida (Janmeya i sur., 2010). Najvažniji, biološki aktivni spojevi kamilice su eterična ulja, flavonoidi, kumarini, polifenoli i polisaharidi. Eterična ulja sadrže kamazulen, seskviterpenske alkohole (α-bisabolol), seskviterpenske okside (bisabolol), seskviterpenske laktone i kumarine (herniarin, umbeliferon). Terpenoid (α-bisabolol), bisabolol i kamazulen posjeduju protuupalno, antialergijsko, antibakterijsko, antipiretsko i antifungalno svojstvo. Najupečatljivija razlika između kamilica je u eteričnom ulju. Eterično ulje rimske kamilice prozirno je i bogato esterima, dok je ulje njemačke kamilice duboko plave do plavo-zelene boje, koja potječe od spoja kamazulena (Janmeya i Sanjay, 2009).

Glavni sastojak cvjetova kamilice su prije svega flavonoidi kao što je apigenin, luteolin, patuletin i kvercetin (Janmeya i sur., 2010). Analize brojnih ekstrakata kamilice potvrdile su da je apigenin-7-O-glukozid (AP-7-Glc) glavni sastojak kamilice (Janmeya i Sanjay, 2009), kao i njegovi brojni acilirani derivati poput AP-7-(6 "-malonil-Glc), Ap -7- (6 "-acetil-Glc), Ap-7-(6"-kafeoil-Glc), Ap-7-(4 "-acetil-Glc), Ap-7-(4"-acetil, 6 "-malonil-Glc) (Svehlikova i sur., 2004). Ljekoviti sastojci izlučuju se iz suhih cvjetova kamilice pomoću vode ili etanola/metanola kao otapala (Janmeya i sur., 2010). Dokazano je da metanolni ekstrakti imaju visoku koncentraciju apigenin-7-O-glukozida zajedno s nekoliko polifenolnih

sastojaka koji uključuju kafeinsku kiselinu, luteolin i luteolin-7-O-glukozid (Janmeya i Sanjay, 2009).

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) je biljni flavonoid prisutan u biljkama, voću i povrću. Pripada skupini polifenola s potvrđenim antioksidativnim i protutumorskim svojstvima (Silvan i sur., 2010; Ross i Preedy 2010). Dokazano je da apigenin potiče tumorske stanice na apoptozu – programiranu staničnu smrt (Budhraja i sur., 2011) i utječe na stanični ciklus zaustavljajući ga u G_2/M fazi (Zhu i sur., 2013). Apigenin je obilno prisutan u voću (trešnje, jabuke, grožđe, naranče), povrću (peršin, celer, paprika, luk), biljnim napitcima, pšeničnim klicama, te nekim začinima. Jedan od najčešćih izvora apigenina nalazi se u biljnom čaju od kamilice koji se dobije iz suhog cvijeća *Matricaria chamomilla* (McKay i Blumberg, 2006). Apigenin je pronađen u vinu (Bevilacqua i sur., 2004), a također i kao sastojak u pivu (Gerhauser, 2005). U prirodnim izvorima, apigenin je prisutan kao apigenin-7-O-glukozid i kao različiti acilirani derivati (Svehlikova i sur., 2004), koji imaju veću topljivost u vodi od osnovnog spoja i ostaju uglavnom nepromijenjeni prilikom kuhanja (Ross i sur., 2002). Utvrđeno je da se apigenin vrlo brzo metabolizira putem UDP-glukuronoziltransferaze (UGT1A1) u glukurozidne i sulfatne konjugate koji se lakše transportiraju u krvi i iz organizma izlučuju putem žuči ili urina (Walle i Walle, 2002). Istraživanja o apsorpciji i izlučivanju apigenina ukazuju na to da samo mali dio apigenina iz prehrane ulazi u krvotok čovjeka (Meyer i sur., 2006). Istraživanja su također utvrdila da apigenin ima veliku bioraspoloživost u organizmu, jer se nalazi u obliku glikozidnih konjugata koji imaju veću topljivost u vodi od osnovnog spoja i sporo se eliminira iz organizma, te na taj način pojačava svoj ljekoviti učinak (Ross i sur., 2002). Snažno inhibira ornitindekarboksilazu, enzim koji igra važnu ulogu u proliferaciji tumora (Wei i sur., 1990). Također, utječe na unutarstaničnu koncentraciju glutationa i povećava endogenu obranu stanica od oksidativnog stresa (Myhrstad i sur., 2002).

Zbog raznovrsnog farmakološkog djelovanja koji potječe od brojnih aktivnih komponenti, kamilica je poznata kao "univerzalni lijek" i može poslužiti kao blagi anestetik, dezinficijens, antiseptik, bakteriostatik, baktericid i sedativ (Birth i sur., 1986).

Istraživanjem u okviru ovog diplomskog rada želi se ispitati antiproliferativni učinak 12 ekstrakata iz cvjetova kamilice (lat. *Matricaria camomilla*), dobivenih različitim metodama ekstrakcije, na normalne i tumorske stanice *in vitro*, ovisno o primijenjenim koncentracijama i vremenu izlaganja.

1.2. Kultura stanica

Kultura tkiva prvi put je opisana kada su Harrison i suradnici 1907. godine uspjeli izolirati i kultivirati kroz nekoliko tjedana komadiće tkiva iz medularnog kanala žabljeg embrija. Ta tehnika opisana je prvo kao uzgoj fragmenata tkiva, a rast je bio ograničen na umnožavanje stanica iz tkivnog odsječka. U pedesetim godinama prošlog stoljeća stanice se počinju uzgajati kao kultura stanica i pojam «kultura tkiva» danas se koristi i za kulturu organa i kulturu stanica (Cooper i sur., 2004).

Careel je 1912. godine uveo sterilne uvjete da bi se kulture duže održale i spriječila kontaminacija. Tijekom sljedećih 50 godina utvrđeno je da stanice za svoj rast trebaju hranjive sastojke. Istraživanjem optimalnog sastava medija za uzgoj stanica utvrđeno je da stanice u kulturi za svoj rast trebaju točno definirani medij s najmanje 13 esencijalnih aminokiselina, 8 vitamina, glukozu, soli i serum sisavaca (Eagle, 1955). Koncentracije svih sastojaka moraju biti točno definirane kako bi osmotski tlak medija odgovara osmotskom tlaku fiziološke otopine. Ovaj omjer je važan jer ako je koncentracija aminokiselina viša ili niža od optimalne, stanice degeneriraju i na kraju umiru. Izostavljanje samo jedne esencijalne aminokiseline dovodi do zaustavljanja rasta stanica. Stanična kultura je kao eksperimentalna metoda prihvaćena tek 1952. godine kada je Dulbecco uspio iz tkiva izolirati stanice pomoću tripsina. Standardizacija uvjeta kultivacije i uspostava staničnih linija, a posebno proizvodnja velikog broja stanica prikladnih za biokemijska istraživanja dali su značajan doprinos razvoju moderne tehnologije kulture tkiva (Freshny, 1987).

1.2.1. Rast stanica *in vitro*

Kultura stanica je kultura dobivena od dispergiranih stanica uzetih iz originalnog tkiva, iz primarne kulture ili stanične linije. Stanice u monosloju se odvajaju od podloge djelovanjem enzima (tripsin) i nakon razrijeđivanja ponovno "nasađuju" ili sub-kultiviraju u novim bocama za uzgoj. Postupak je poznat kao „pasažiranje" i takvo stvaranje stanica kćeri početak je stvaranja stanične linije. Vrijednost kultiviranih stanica kao modela fiziološke funkcije *in vivo* često je kritizirana, jer javljaju se problemi karakterizacije uslijed promjene u okolišu stanice: stanice *in vitro* umnožavaju se i onda kada stanice u uvjetima *in vivo* se ne mogu umnožiti. Interakcija stanice i staničnog matriksa smanjena je jer stanične linije gube heterogenost i trodimenzionalnu arhitekturu. Stanice u kulturi žive, rastu i dijele se, odnosno metabolički su aktivne prolazeći kroz različite faze staničnog ciklusa. S obzirom na to u kojoj fazi staničnog ciklusa se stanična populacija nalazi, rast kultura dijelimo na sinkroni i asinkroni rast. Asinkrona stanična populacija je ona u kojoj se svaka stanica nalazi u drugoj fazi staničnog ciklusa. Nakon presađivanja, mogu se razlikovati tri faze asinkronog rasta; faza zastoja ili prilagodbe (lag-faza), eksponencijalna faza ili faza logaritamskog rasta (log-faza) i stacionarna faza ili plateu faza (Freshny, 1987).

Faza zastoja praćena je pričvršćivanjem stanica za podlogu i prilagodbom na nove uvjete. Stanice se u toj fazi ne razmnožavaju, ali su metabolički aktivne. Eksponencijalna faza je faza učestalih dioba. Vrijeme umnožavanja stanica u ovoj fazi gotovo je identično vremenu diobe stanica diobenog ciklusa. U ovoj fazi se izračunava vrijeme umnožavanja ili duplikacijsko vrijeme (T2). Pri kraju eksponencijalne faze rasta vrijeme umnožavanja se usporava. U stacionarnoj fazi rasta broj stanica se više ne mijenja. Stanice izlaze iz diobenog ciklusa i ulaze u fazu mirovanja (G_0- faza). Međutim, vijabilnost i preživljene stanica je isto kao i kod stanica koje se dijele. Ako se prebace u svjež medij, stacionarne stanice mogu opet ući u diobeni ciklus i to počevši s G_1 fazom (Freshny, 1987).

1.2.2. Razlike *in vivo* i *in vitro*

Razlike u ponašanju stanica između kultiviranih stanica i istovjetnih stanica *in vivo*:

1. Specifične interakcije između stanica karakteristične za histologiju tkiva se pri kultivaciji *in vitro* gube.
2. *In vitro* je uvijek vrlo velika frakcija stanične populacije. Kada se stvara stanična linija ona može prikazivati karakteristike jednog ili dva stanična tipa, dok su mnoge heterotipske značajke izgubljene.
3. Pri uvjetima kultivacije vrlo često nedostaju neke sistematske komponente uključene u homeostatsku regulaciju *in vivo*, uglavnom one iz endokrinog i živčanog sustava. Bez te kontrole, stanični metabolizam je stabilniji *in vitro* nego *in vivo*.
4. Energetski metabolizam *in vitro* uglavnom ide preko glikolize. Ciklus limunske kiseline još uvijek je funkcionalan, ali ima nešto manju ulogu u ukupnom energetskom metabolizmu stanice (Web 3).

1.3. Geni i nastanak raka

Rak se prvi puta u čovjeka spominje 5300-4500 godina prije Krista, ali pretpostavlja se da ljudska vrsta nikada nije bila zaštićena od nekog oblika deregulacije biološke kontrole staničnog rasta. Naziv "rak" dolazi od latinske riječi *cancer*, i to nije jedna, nego više od 200 različitih bolesti. Iako se pojavljuje i u dječjoj dobi, rijedak je prije 30. godine života, a njegova se učestalost povećava sa životnim vijekom (Šamija i sur., 2000). Rak nastaje zbog poremećaja temeljnih regulacijskih mehanizama, a osnovni poremećaj je trajno poremećena proliferacija stanica. Stanice raka ne reagiraju na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, one nekontrolirano rastu i dijele se. Važno je razlikovati dobroćudne (benigni) od zloćudnih (malignih) tumora. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna ili zloćudna, a pojam raka odnosi se samo na zloćudne tumore (Cooper i sur., 2004). Integritet organizma je zbroj svih signala unutar organizma i između organizma i okoliša, pa tumor možemo shvatiti kao narušavanje integriteta organizma. Tumorska se progresija najčešće zbiva u smjeru povećanja zloćudnosti. Tri su važne skupine gena važne za nastanak tumora: onkogeni, tumor supresorski geni i geni za popravak pogrešaka u molekuli DNK (Šamija i sur., 2006).

Stanični ciklus reguliran je nizom gena koji djeluju na stanični rast, proliferaciju i diferencijaciju. Toj skupini pripadaju pro-onkogeni i tumor supresorski geni. Mutacija u pro-onkogenima dovodi do pokretanja procesa tumorigeneze, dok kod tumor supresorskih gena dolazi do inaktivacije ili gubitka tih gena da bi došlo do neoplastične preobrazbe stanica (Mendelshon i sur., 2003).

1.3.1. Onkogeni

Istraživanja tumorskih virusa pokazala su da određeni geni, onkogeni, mogu dovesti do transformacije stanica i time omogućila pravi uvid u nastanak tumora, te se na osnovu virusnih onkogena dobila spoznaja o staničnim onkogenima. Virusni su onkogeni prvo nađeni u staničnoj kulturi fibroblasta pilećih embrija (Cooper i sur., 2004).

Onkogeni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koje nazivamo proto-onkogenima. Proto-onkogeni su uključeni u prijenos signala u stanici i svi su evolucijski dobro očuvani, što ukazuje na njihovu važnost. Važni su za normalnu staničnu proliferaciju i diferencijaciju (Šamija i sur., 2006). Relativno malim promjenama proto-onkogena nastaju onkogeni čija pojačana aktivnost dovodi do razvoja tumora. Nastale promjene mogu biti uzrokovane mutacijama ili pojačanom ekspresijom gena. Dostatna je promjena u samo jednom alelu da bi se ispoljio učinak onkogena (Mršić-Krmpotić i sur., 2004).

Aktivacija onkogena postiže se na tri načina: mutacijom, translokacijom i amplifikacijom. Najčešće mutacije su tzv. točkaste mutacije, pri čemu se jedan nukleotid zamjeni drugim, a najčešći je primjer mutacija kod onkogena *ras* koji ima važnu ulogu u prijenosu signala s membrane u jezgru (Šamija i sur., 2000). Prvi dobro opisani proces aktivacije onkogena do koje dolazi zbog translokacije jest uloga *c-myc* onkogena u Burkittovim limfomima i mišijim plazmocitomima (Cooper i sur., 2004). Najbolje proučene translokacije u tumorima krvotvornog tkiva su onkogeni *myc*, *bcl*-2 i *abl*. Učestali mehanizam aktivacije onkogena je i amplifikacija koja predstavlja prekomjernu aktivnost nekog gena (Šamija i sur., 2000), prototip takvih poremećaja jest translokacija *abl* protonkogena s 9. na 22. kromosom kod kronične mijeloične leukemije, gdje dolazi do fuzije *abl* s genom *bcr* na 22. kromosomu (Cooper i sur., 2004).

Većina onkogenih proteina dijelovi su signalnih putova koji reguliraju proliferaciju i preživljenje stanice nakon stimulacije faktorima rasta. Takvi onkoproteini mogu biti polipeptidni faktori rasta, receptori za faktore rasta, dijelovi unutar staničnih signalnih putova

ili transkripcijski faktori. Veliki broj onkogena kodira receptore za faktore rasta, uglavnom protein-tirozin-kinaze (Cooper i sur., 2004). Onkogeni mogu djelovati na više načina: sudjeluju u prijenosu signala faktora rasta, antiapoptotički ili mogu imati utjecaj na tumor supresorske gene (Wynford i sur., 1991).

1.3.2. Tumor supresorski geni

Kako onkogeni dovode do poremećaja u staničnoj proliferaciji i nastanka tumora, tumor supresorski geni imaju suprotnu ulogu u kontroli staničnog rasta. Oni u normalnim uvjetima inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak malignog oboljenja. Gubitak ili inaktivacija tumor supresorskih gena dovodi do nastanka tumora (Cooper i sur., 2004). Mutacija tumor supresorskih gena ima recesivan učinak tj. moraju uzrokovati inaktivaciju oba alela, da bi se uočio učinak tumor supresorskih gena. Gubitak jednog alela tumor supresorskog gena očituje se kao gubitak heterozigotnosti (LOH, eng. Loss of heterozigosity), na tom genskom lokusu, tj. ne dolazi do tumorskih promjena kao kod onkogena kojima je dostatna promjena samo na jednom alelu da ispolje svoj učinak (Mršić i sur., 2004). Proteini koje kodiraju većina tumor supresorskih gena inhibiraju staničnu proliferaciju ili preživljenje. Tumor supresorski proteini inhibiraju one stanične putove koje onkogeni produkti stimuliraju (Cooper i sur., 2004). Na taj način zaustavljaju stanični ciklus i sudjeluju u popravku oštećenja DNK (Mršić i sur., 2000).

Prvi opisani tumor supresorski gen je *Rb*, nalazi se na drugom kraku 13. kromosoma. Uloga proteina *Rb* je u regulaciji staničnog ciklusa, tako što onemogućava ulazak stanice u S fazu. Protein p53 jedan je od najvažnijih tumor supresorskih proteina, smješten je u jezgri, a nalazi se promijenjen u više od 50 % tumora. Nastaje od gena p53, koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 17 (Mršić i sur., 2000), te djeluje na način da zaustavlja stanicu u G_1 fazi staničnog ciklusa ne dopuštajući replikaciju oštećene DNK. Stoga se gen p53 smatra čuvarom genoma. Ekspresija istog proteina važan je promotor apoptoze (Polyak i sur., 1996). Sudjeluje u procesu apoptoze na nekoliko načina: može poticati transkripciju proapoptotičkih gena (npr. *bax*), koči transkripciju antiapoptotičkih gena (npr. *bcl- 2*), te može poticati stvaranje proteina koji se vežu na receptore faktora rasta, te tako dolazi do poticanja apoptoze (Mendelshon, 2003). Gen p53 smatra se čuvarom genoma, ako dođe do oštećenja DNK, p53 zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi omogućavajući popravak oštećenja, a ako su oštećenja veća, izaziva programiranu smrt stanice (Mršić i sur., 2000).

1.4. Programirana stanična smrt

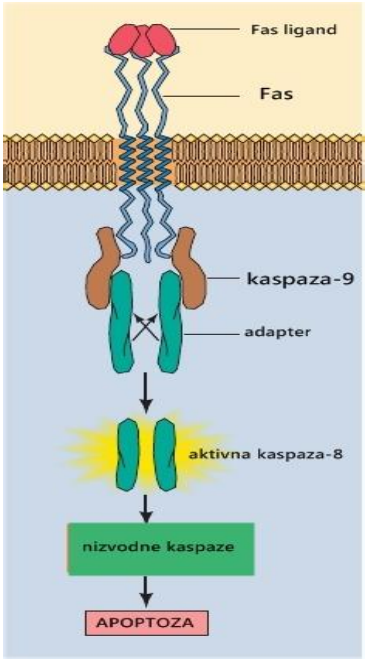
Apoptoza ili programirana stanična smrt kontrolirani je način umiranja stanica značajan u embrionalnom razvoju i održavanju homeostaze organizma (Mršić i sur., 2004). U odraslim organizmima, programirana stanična smrt je u ravnoteži s proliferacijom stanica i održava broj stanica u tijelu konstantnim. Predstavlja dio normalnog ciklusnog razvoja, ali do nje može doći utjecajem štetnih čimbenika i bitna je sastavnica u razvoju tumora. Za razliku od apoptoze, nekroza je posljedica oštećenja koja direktno utječe na cjelovitost same stanice. Oštećena stanična membrana dovodi do oslobađanja citoplazmatskog sadržaja u izvanstanični prostor, uključujući i lizosomske enzime, što uzrokuje upalni proces (Kolooman i sur., 2005). Apoptoza je regulirana pomoću različitih signalnih putova, od kojih neki potiču staničnu smrt, a neki potiču stanično preživljavanje (Cooper i sur., 2004).

Stanice koje su ušle u apoptozu karakteriziraju različite morfološke i biokemijske značajke. U apoptotičkim stanicama kromosomska DNK obično je fragmentirana, kromatin se kondenzira i jezgra se raspada u male komadiće, a stanični sadržaj obavijen je u apoptotička tjelašca. Morfološke promjene očituju se u smanjenju volumena stanice, nabiranju stanične membrane, sakupljanju kromatina uz jezgrinu membranu, dok su organeli, uključujući i mitohondrije normalni, a stanična membrana zadržava cjelovitost (Kolooman i sur., 2005). Zahvaljujući cjelovitosti membrane, stanični sadržaj se ne izlijeva u stanični prostor te organizam može ukloniti takve stanice bez oštećenja okolnog tkiva i bez stvaranja upale (Mršići i sur., 2004). Kaspaze (engl. caspases = cystein-aspartate proteases), predstavljaju ključne enzime u procesu programirane stanične smrti, one posjeduju cisteinske ostatke u svojim aktivnim mjestima, te na aspartatnim ostacima kidaju svoj supstrat. Ključni cilj kaspaze je inhibirati DNaze, koje su odgovorne za fragmentaciju jezgrine DNK (Cooper i sur., 2004).

1.4.1. Vanjski put apoptoze

Signali programirane stanične smrti aktiviraju receptore koji izravno potiču apoptozu u ciljnim stanicama. Ti signali stanične smrti su polipeptidi, koji pripadaju obitelji faktora tumorske nekroze (TNF). Jedan od najbolje opisanih članova te obitelji je stanični receptor Fas. Vezanje liganda za receptor Fas potiče apoptozu izravnom aktivacijom kaspaze 8 (Slika

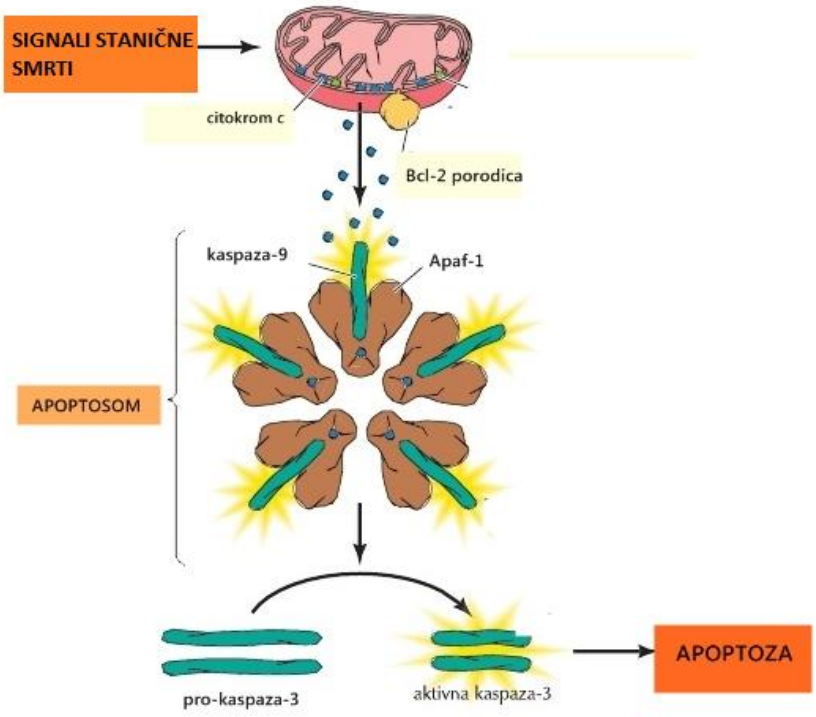
2). Fas ligand se sastoji od tri polipeptidna lanca, tako da njegovo vezanje uzrokuje trimerizaciju receptora. Kaspaza 8, koja je vezana za receptor preko adapterske molekule, aktivira se tako da samu sebe proteolitički cijepa što uzrokuje aktivaciju nizvodnih kaspaza i staničnu smrt (Cooper i sur., 2004).



Slika 2. Receptori stanične smrti. Vezanje liganda za Fas receptor potiče apoptozu, aktivacijom nizvodnih kaspaza. Preuzeto i prilagođeno iz Cooper i sur., 2004.

1.4.2. Unutarnji put apoptoze

Sisavci nose uputu za sintezu cijele obitelji proteina (porodica Bcl-2), koji nadziru cjelovitost mitohondrija. Neki članovi obitelji Bcl-2 djeluju kao inhibitori, a drugi kao aktivatori kaspaza i u konačnici su regulatori apoptoze. Jedna od glavnih inicijacijskih kaspaza kod sisavaca je kaspaza-9. Središnja uloga proteina iz Bcl-2 obitelji je djelovanje na mitohondrije, koji ovisno o podražaju otpuštaju citokrom c, koji je signalna molekula u procesu pokretanja programirane smrti stanice (Slika 3). U normalnim uvjetima, kada stanica preživljava, citokrom c smješten je u međumembranskom prostoru mitohondija. Otpuštanje citokroma c, dovodi do nastanka apoptosoma (Apaf-1/kaspaza-9) što dalje rezultira lančanom aktivacijom nizvodnih kaspaza i smrću stanice (Cooper i sur., 2004).



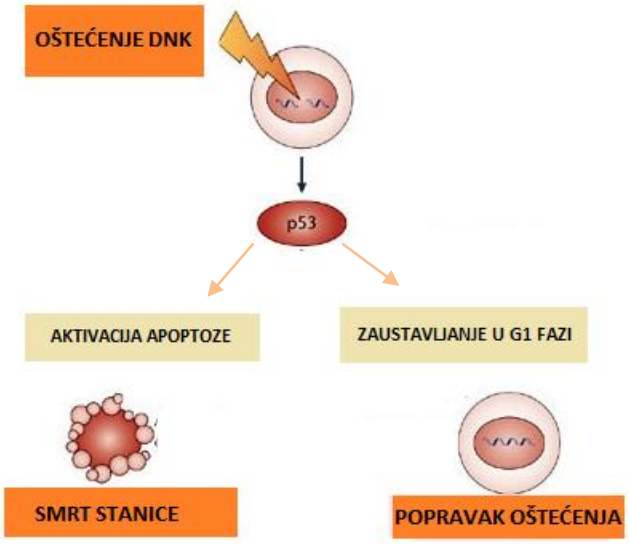
Slika 3. Regulatori i efektori apoptoze. Signali stanične smrti djeluju izravno na mitohondrije čiju cjelovitost reguliraju članovi Bcl-2 obitelji. Otpuštanje citokroma c, aktivira nizvodne kaspaze i potiče apoptozu. Preuzeto i prilagođeno iz Cooper i sur., 2004.

1.4.3. Događaji u procesu programirane stanične smrti

Apoptotički put možemo podijeliti na tri faze (Mendelshon):

- Inicijalna faza

Stanica prima podražaje iz okoline i ovisno o okolnostima pokreće apoptozu. Brojni faktori mogu potaknuti sam proces: oštećenje DNK, polipeptidi iz obitelji faktora tumorske nekroze (TNF), hormoni, citokini, te brojni drugi čimbenici mogu biti prepoznati od specifičnih receptora na staničnoj membrani i započeti proces apoptoze (Raynolds i sur., 1995). Ključnu ulogu ima i protein p53 koji djeluje preko proteina p21 tako da zaustavi stanicu u G1 fazi staničnog ciklusa u kojoj se vrši popravak oštećene DNK (Slika 4). Aktivacija proteina p53 može dovesti do popravka oštećenja DNK, kako bi se spriječilo zadržavanje mutacije u genomu ili dovodi do aktivacije apoptoze i uzrokuje smrt stanice ako se oštećenje ne može popraviti (Mršić i sur., 2004).



Slika 4. Djelovanje proteina p53. Oštećenje DNK, aktivira protein p53 da izvrši popravak ili potakne apoptozu. Preuzeto i prilagođeno iz web 3.

- Faza izvršenja

Ulaskom u ovu fazu proces se dalje ne može zaustaviti. Ključni enzimi za ovaj dio procesa su kaspaze, koje se sintetiziraju kao inaktivne preteče, a aktiviraju se proteolitičkim cijepanjem pomoću ostalih kaspaza, te na taj način počinje lančana reakcija koja uzrokuje smrt stanice. Djelovanjem kaspaza dolazi do cijepanja DNK, kondenzacije kromatina i u konačnici do smrti stanica (White, 2006).

- Faza uklanjanja

Apoptotičke stanice na svojoj površini imaju anionski fosfolipid - fosfatidilserin, kojeg prepoznaju fagociti. Fosfatidilserin se normalno nalazi na unutrašnjoj strani plazma membrane, ali tijekom apoptoze dolazi do njegovog premještanja na vanjsku stranu stanične membrane. Tako označena stanica, predstavlja signal fagocitima i dolazi do sigurnog uklanjanja oštećene stanice, bez stvaranja upalnog procesa (Fadok i sur., 1992).

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je odrediti biološki učinak 12 ekstrakata cvjetova kamilice (*Mattricaria camomila*) na panelu humanih i jednoj psećoj staničnoj liniji. Naglasak je stavljen na apigenin, jednu od aktivnih komponenti kamilice. Postavljeni su sljedeći ciljevi u istraživanju:

1. utvrditi postoji li razlika u učinkovitosti ekstrakta cvjetova kamilice u ovisnosti o koncentraciji apigenina u ekstraktima

2. odrediti postoji li razlika u citotoksičnim učincima određene koncentracije čistog apigenina i apigenina u ekstraktu

3. odrediti mehanizam smrti stanica izloženih djelovanju ekstrakta s najboljim citotoksičnim učincima.

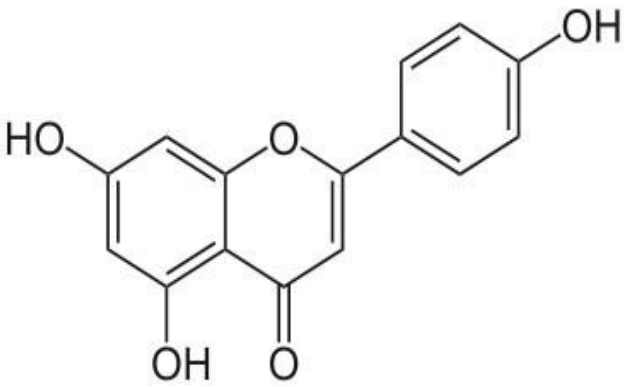
2. MATERIJAL I METODE

2.1. MATERIJAL

2.1.1. Ekstrakt apigenina (4', 5, 7-trihidroksiflavon)

Dvanaest ekstrakata iz cvjetova kamilice s različitim koncentracijama apigenina (Slika 5) pripremljeni su u laboratoriju za izolaciju pri Katedri za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta iz Novog Sada (Srbija), različitim metodama kemijske ekstrakcije.

Za potrebe *in vitro* istraživanja, ekstrakti su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) kao 25 mg/mL koncentrirane otopine. Neposredno prije primjene, pripremljene su radne otopine svih ekstrakata čije su konačne koncentracije bile kako slijedi: 0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 mg/mL u sterilnoj destiliranoj vodi pri sobnoj temperaturi.



Slika 5. Molekula apigenina (4',5,7-trihidroksiflavon). Preuzeto iz web 4.

2.1.2. Stanične linije

Biološki učinak 12 ekstrakata kamilice i apigenina istražen je na panelu humanih i jednoj psećoj staničnoj liniji.

Humane stanične linije su:

- Adenokarcinom vrata maternice (**HeLa**)
- Kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi (**K562**)
- Limfom T – stanica (**HuT-78**)
- Bronhoalveolarni karcinom (**NCI-H358**)

Pseća stanična linija je:

- Normalna epitelna stanica bubrega psa (**MDCK-I**) između 33 i 44 pasaže

2.1.3. Kemikalije

- Dulbecco modificirani Eagle-ov medij (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Switzerland)
- Fetalni goveđi serum (FBS), 0,25 % tripsin EDTA, Na-piruvat i antibiotik-antimikotik 100x; GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija)
- Tripansko plavilo, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES), 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT), L-glutamin, Natrij dodecil sulfat (SDS), standard apigenina; Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Dimetil sulfoksid (DMSO); Acros organics (New Jersey, SAD)
- ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis Kit; Clontech (California, SAD)
- PBS (Phospate Buffer Saline) pufer pH = 7,4 (1,37 mol/dm^3(M) NaCl; 0,027 (M) KCl; 0,043 (M) Na_2HPO_4; 0,014 (M) KH_2PO_4); Kemika (Zagreb, Hrvatska)

2.2. METODE

2.2.1. Kultura stanica *in vitro*

Stanice se uzgajaju u bocama za uzgoj aktivne površine rasta od 25 cm^2 i 75 cm^2 (BD, Falcon, Njemačka), u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima 37 °C i 5 % CO_2. Stanične linije se uzgajaju u DMEM i RPMI 1640 mediju obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma.

DMEM medij za održavanje stanica, sadrži dodatak 10 % temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicin antibiotika, dok DMEM medij za pokus, sadrži sve navedene komponente osim penicilin/streptomicin antibiotika. U DMEM mediju se kultiviraju stanice HeLa i MDCK-I.

RPMI medij je prikladan za kultivaciju NCI-H358, HuT-78 i K562. Ovaj medij za održavanje stanica u sebi sadrži dodatak 10 % temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrij-piruvata, 10mM HEPES-ai 100U/0,1mg penicilin /streptomicin antibiotika, dok RPMI medija za pokus, sadrži sve navedene sastojke osim penicilin/streptomicin antibiotika.

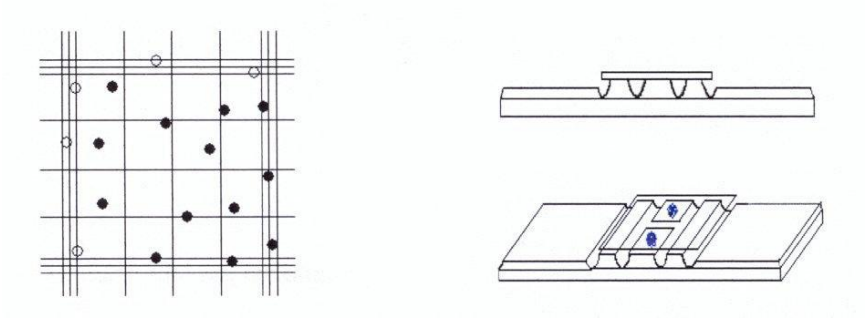
Ovisno o tome radi li se o stanicama u suspenziji (HuT-78 i K562), ili adherentnim stanicama (HeLa, MDCK-I, NCI-H358), primjenjuje se različit postupak za održavanje i presađivanje stanica. Adherentne stanice se isperu pomoću 2-5 mL sterilnog PBS, koji služi za uklanjanje zaostalog medija odnosno seruma jer serum inaktivira tripsin. Za odvajanje stanica od podloge dodaje se 0, 25 % tripsin/EDTA i inkubira oko 6 minuta bez tripsina. Kada se stanice odvoje od podloge prikupljamo ih dodatkom 5 ml medija za uzgoj stanica. Stanice centrifugiramo na 1100 ok/6 min na 4 °C. Stanične linije koje rastu u suspenziji se održavaju oduzimanjem dijela volumena i dodavanjem svježeg medija.

2.2.2. Određivanje broja vijabilnih stanica u kulturi

Testom tripan plavilom određena je vijabilnost stanica. Stanice se odvajaju pomoću tripsina i dobro resuspendiraju. Za brojanje stanica uzima se 50 μL prethodno resuspendiranih stanica i 100 μL 0, 3 % tripan plavila. Stanice se broje pomoću Bürker-Türk-ove komorice na invertnom mikroskopu (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Žive stanice s neoštećenom staničnom membranom ne propuštaju boju tripan plavilo te su neobojene, za razliku od mrtvih stanica, koje su plavo obojane. Broj živih stanica određen je pomoću računa:

- broj stanica **N/4 x 3 = X x 10^4** stanica/cm^3

N – broj stanica, 4 – broj polja u komorici, 3 – faktor razrjeđenja



- stanice koje se ne broje
- stanice koje se broje

Slika 6. Bürker-Türk komorica. Preuzeto i prilagođeno web. 5.

2.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT test (Mickisch i sur, 1990), metoda je za kvantitativno određivanje stanične proliferacije, odnosno kvantifikacije antiproliferativnog ili citotoksičnog djelovanja testiranih spojeva na stanice. Test se zasniva na nastanku ljubičastih kristala formazana, koji nastaju cijepanjem žute tetrazolijeve MTT soli (3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) pomoću mitohondrijskog enzima dehidrogenaze živih stanica. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica i očitava se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 nm pomoću mikročitača (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).

Materijal: stanice (HeLa, MDCK-I, NCI-H358, HuT-78, K562), medij (RPMI, DMEM), PBS, DMSO, 10 % SDS s HCl (0,01M), tripsin/EDTA, 10xMTT koncentrirane otopine.

Postupak: stanice su nasađene na mikrotitarske ploče s 96 jažica, koje su namijenjene za uzgoj adherentnih stanica. Stanice su nasađene u koncentraciji $2x10^4$st/mL u ukupnom volumenu od 200 μL (180 μL stanične suspenzije i 20 μL testnog ekstrakta). Stanice su ostavljene 24 sata da se prihvate za podlogu. Nakon toga je u svaku jažicu dodano 20 μL ekstrakta kamilice, odnosno apigenina u različitim finalnim koncentracijama: 0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 mg/mL. Kontrolne, ne tretirane stanice rasle su u istim uvjetima. Test se provodio u vremenskom periodu od 48 i 72 sata, nakon čega je uklonjen medij, a u svaku jažicu se doda 40 μL otopine 1xMTT/PBS koncentracije 5 mg/mL. Potom slijedi inkubacija od 4 sata u CO_2 inkubatoru. Nastali formazanski kristali otopili su se dodatkom DMSO uz laganu trešnju na sobnoj temperaturi. Rezultati su očitani na mikročitaču poloča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).

Stanice koje rastu u suspenziji nasađene su na ploče s 96 jažica u koncentraciji $1x10^5$ st/mL u volumenu od 100 μL (90 μL stanične suspenzije i 10 μL testnog ekstrakta). Odmah nakon nasađivanja dodaje se ispitivani ekstrakt u rasponu finalnih koncentracija: 0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 mg/mL. Nakon inkubacije u vremenskom periodu od 48 i 72 sata, u svaku jažicu je dodano 10 μL MTT (10 x koncentriran), medij se ne izbacuje jer se radi o stanicama u suspenziji. Potom slijedi inkubacija od 4 sata u CO_2 inkubatoru. Nastali kristali formazana otopljeni su preko noći u 10% SDS-u s HCl (0,01 M). Rezultati su očitani na mikročitaču (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) pri valnoj duljini od 570 nm. Preživljenje testiranih stanica se izračunava kao postotak u odnosu na kontrolu:

$$\textbf{PREŽIVLJENJE (\%)} = (\Delta \mathbf{T} - \Delta \mathbf{B} / \Delta \mathbf{K} - \Delta \mathbf{B}) \times \mathbf{100}$$

Δ **T** = srednja vrijednost tretirane stanice

Δ **K** = srednja vrijednost kontrole

Δ **B** = slijepa proba

B (BLANCK) adherentne stanice = MTT 1:10 (1xMTT/PBS), DMSO

B (BLANCK) stanice u suspenziji =medij bez stanica, MTT (10x koncentriran), 10% SDS

2.2.4. Analiza apoptoze pomoću fluorescentnog mikroskopa

Promijene u izgledu stanica koje nastaju uslijed potaknute apoptoze i nekroze, promatrane su vizualno pomoću fluorescentnog mikroskopa (Axioscope 2 MOT, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Njemačka) povezanog sa računalom i softverom koji omogućuje snimanje i obradu slike. Mikroskop ima sustav od 4 filtra koji omogućuju detekciju svjetlosti na različitim valnim duljinama i to: (f1) λexc 365/12 nm λem 397 nm, (f2) λexc 530–585 nm λem 615 nm, (f3) λexc = 450–490 nm λem = 520 nm i (f4) vidljivo područje.

Princip metode: Annexin V-FITC se veže za fosfatidil-serin, koji se u normalnim uvjetima nalazi s unutrašnje strane membrane. Tijekom apoptoze fosfatidil-serin prebacuje se s unutrašnje na vanjsku stranu membrane, za njega se veže FITC-om obilježeni Annexin. Annexin V-FITC se veže na fosfatidil-serin apoptotičnih stanica, ali može ući i u nekrotične stanice, što se očituje kao zeleni fluorescentni signal. Propidij jodid se veže na DNK i ulazi u nekrotične stanice te fluorescira crvenom bojom.

Materijal: HeLa stanice, DMEM, 1x PBS, Annexin V-FITC Apoptosis Kit, propidij jodid (PI), apigenin standard

Postupak: stanice u koncentraciji $1x10^5$ st/mL nasađene su na sterilno predmetno staklo na koje je pričvršćena silikonska komorica (Flexiperm, Greiner, Njemačka) koja formira barijere i tvori 8 jažica u koje su nasađene stanice. Stakalce se stavlja u petrijevu zdjelicu i stanice su inkubirane kroz 24 sata u inkubatoru pri 37 °C i 5 % CO_2. Slijedeći dan sa stanica je uklonjen medij i dodani su ekstrakti kamilice 3, 7 i 11 u sljedećim IC_{50} (koncentracija pri kojoj je 50 % preživjelih stanica) koncentracijama (Tablica 1). Stanice su testirane u vremenskom periodu od 24 i 48 sati. Po isteku zadanog vremena uklonjen je medij, stanice se ispiru PBS-om, te se ukloni silikonska komorica. Pripremljena je otopina (1:0,5 Annexin/PI), (70 -100 μL/komorici). Koncentracija PI smanjena za 1,5 x u odnosu na koncentraciju koju proizvođač sugerira. Stanice se inkubiraju 5-10 minuta u mraku. Analiza stanica je provedena primjenom fluorescentnog mikroskopa.

2.2.5. Morfološke promjene

Da bi se utvrdile morfološke promjene na HeLa stanicama, koje su izložene ekstraktima kamilice 3, 7, i 11 primijenjen je invertni mikroskop Olympus 1 x 51 s Olympus SP-500 UZ fotoaparatom za vizualizaciju. HeLa stanice su testirane u vremenskom periodu od 48 i 72 sata.

Materijal: HeLa stanice, DMEM, ekstrakti kamilice 3, 7, 11.

Postupak: stanice su nasađene u koncentraciji $1x10^5$ st/mL, na ploče sa 6 jažica koje su potom inkubirane kroz 24 sata u inkubatoru pri 37°C i 5 % CO_2. Sljedeći dan dodani su ekstrakti kamilice 3, 7 i 11 u sljedećim IC_{50} koncentracijama za 48 i 72 sata (Tablica 1). Kao kontrola korištene su netretirane stanice. Koncentracije IC_{50}, izračunate su na osnovu postotka preživljena HeLa stanične linije nakon provedenog MTT testa u okviru vremenskog perioda 48 i 72 sata. Ekstrakti i apigenin u IC_{50} koncentraciji su primijenjeni za procjenu apoptotičkog djelovanja i morfoloških promjena.

Tablica 1. IC_{50} (mg/mL) odabranih ekstrakata kamilice i standarda apigenina.

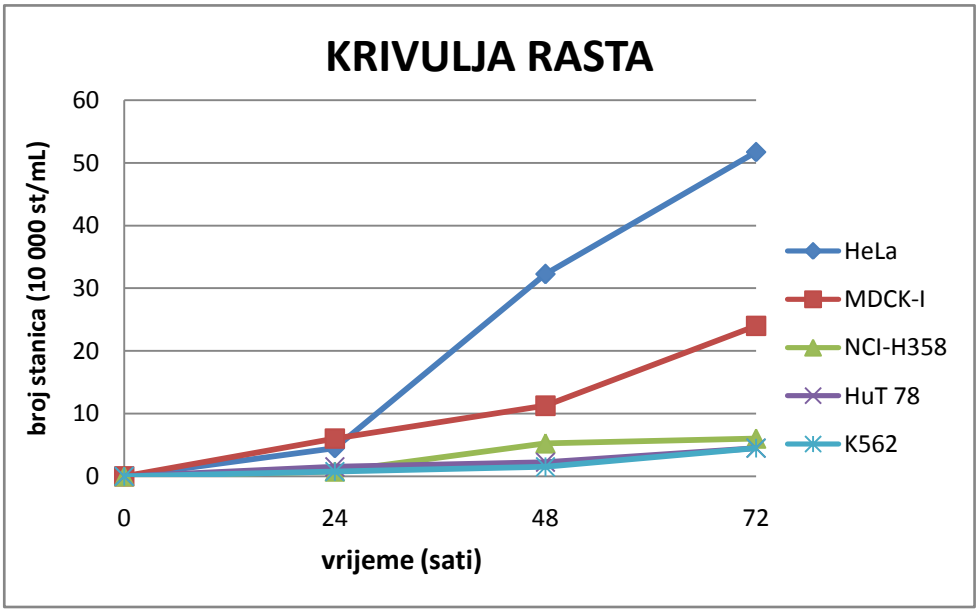
Ekstrakt	IC_{50} (mg/mL) 48 h	IC_{50} (mg/mL) 72 h
3	0,099	0,185
7	0,075	0,079
11	0,097	0,098
Apigenin standard	0,0083	0,0083

2.2.6. Krivulja rasta

Rast istraživanih staničnih linija određen je pomoću krivulje rasta. Rast stanica praćen je u vremenskom periodu od 24, 48 i 72 sata. Stanice se broje pomoću Bürker-Türk-ove komorice na invertnom mikroskopu (Zeiss Axiovert 25, Njemačka).

Materijal: stanice (HeLa, MDCK-I, NCI-H358, HuT-78, K562), medij (RPMI, DMEM), tripsin/EDTA

Postupak: stanice su nasađene u koncentraciji 10 000st/mL, na ploče s 24 jažice koje su potom inkubirane u inkubatoru pri 37 °C i 5 % CO_2. DMEM medij je korišten za adherentne stanice, a RPMI 1640 mediji za stanice u suspenziji. Adherentne stanice, nakon nasađivanja, ostavljene su 24 sata da se prihvate za podlogu. Nakon toga su tripsinom odvojene od podloge, a rast stanica određen je brojanjem u Bürker-Türk-ovoj komorici u vremenskom intervalu od 24, 48 i 72 sata. Rast stanica u suspenziji praćen je brojanjem stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici 24, 48 i 72 sati nakon nasađivanja.



Slika 12. Krivulja rasta. Stanični rast svih istraživanih staničnih linija praćen je u vremenskom period od 24, 48 i 72 sata. Početni broj nasađenih stanica je 10 000 st/mL, a dobiveni rezultati se očituju kao broj stanica x 10^4/mL.

2.2.7. Obrada podataka

Rezultati istraživanja određeni su pomoću statističkog programa Statistica for Windows v. 11.0. Rezultati istraživanja prezentirani su na grafikonima uz raspravu i odgovarajuće zaključivanje o istraživanim pojmovima. Od statističkih parametara prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija (X+-SD). Provedena je neparametrska analiza primjenom Kolmogorov-Smirnov testa. Statistički značajan utjecaj koncentracije smatran je onaj kod kojeg je izračunata vrijednost P bila manja od 0,05 ($P<0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Citotoksičan učinak ekstrakata kamilice određen MTT testom

Biološki učinak 12 ekstrakata kamilice istražen je na 4 humane stanične linije (adenokarcinom vrata maternice – HeLa; kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi - K562; limfom T – stanica - HuT-78; bronhoalveolarni karcinom - NCI-H358) i jednoj psećoj staničnoj liniji (normalne epitelne stanice bubrega psa MDCK- I). Rezultati istraživanja citotoksičnog učinka ispitivanih ekstrakata prikazani su na Slikama 7a-7i. Rezultati prikazuju postotak rasta svih staničnih linija u koncentracijskom nizu od 0,5 mg/mL do 0,0001 mg/mL. Uočeno je smanjenje vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije ispitivanih ekstrakata.

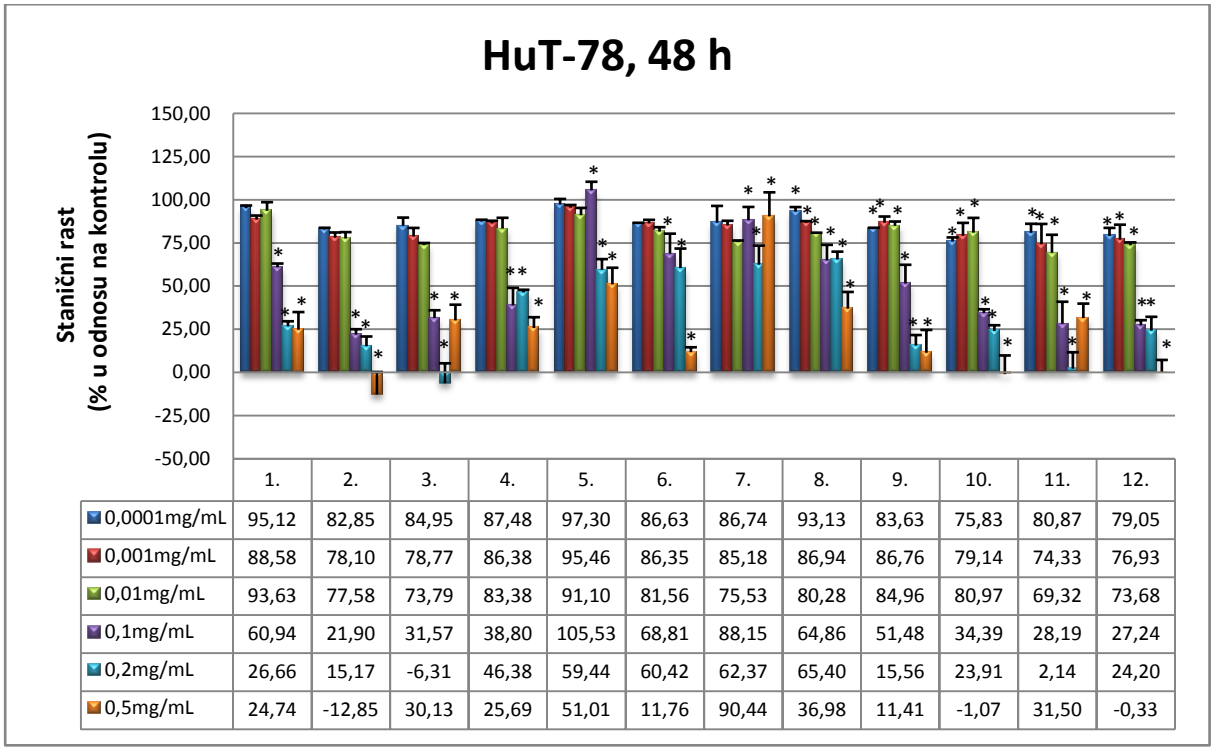
Ispitivani ekstrakti kamilice pokazali su najsnažniji citotoksičan učinak na HuT-78 staničnu liniju limfoma T-stanica. Već nakon 48 sati (Slika 7a), ekstrakti 1-3 i 9-12 u koncentraciji od 0,5 mg/mL i 0,2 mg/mL izazivaju inhibiciju rasta veću od 74 % u odnosu na kontrolne stanice. Ekstrakti 2-4 i 10-12 pokazuju značajan inhibitorni učinak i pri koncentraciji od 0,1 mg/mL. Djelotvornost ekstrakta 5 i 7 je zanemariva. Još snažniji citotoksičan učinak uočava se nakon 72 sata (Slika 7b), kada svi ispitivani ekstrakti gotovo u potpunosti zaustavljaju rast stanica pri koncentracijama od 0,5 mg/mL i 0,2 mg/mL. Svi ekstrakati u koncentracijama nižim od 0,01 mg/mL pokazuju inhibitorni učinak manji od 20%. Najveći citotoksični utjecaj se očituje djelovanjem ekstrakta 3 i 11, koji pri tri najviše koncentracije (0,1; 0,2 i 0,5 mg/mL) potpuno zaustavljaju stanični rast. Ekstrakti 1, 2, 9, 10 i 12 pokazuju sličan inhibitorni učinak pri koncentracijama 0,5 mg/mL i 0,2 mg/mL. Ekstrakt 5, pokazuje najslabiji inhibitorni učinak na rast stanica u odnosu na djelovanje ostalih ekstrakata, pri svim istraživanim koncentracijama i u dva vremenska tretmana.

Statistički značajan utjecaj na preživljenje stanica uočen je i kod stanične linije K562. Nakon 48 h (Slika 7c), uočava se snažan inhibitorni učinak svih ekstrakata pri višim koncentracijama 0,5 mg/mL; 0,2 mg/mL, dok ekstrakti 3, 7 i 11 imaju značajnu aktivnost i pri koncentraciji od 0,1 mg/mL. Isti trend djelotvornosti ekstrakata uočava se i nakon 72 sata. Svi analizirani ekstrakti pri koncentracija od 0,5 mg/mL nakon 48 sati inhibiraju 80-90 % K-562 stanica da bi nakon 72 sata na istoj koncentraciji inhibitorni učinak postao nešto viši i kreće se od 87-94%. Aktivnost ekstrakata 1-4 i 7 kontinuirano se povećava s dužinom djelovanja, dok ostali ekstrakti maksimum svoje aktivnost postižu u okviru prvih 48 sati nakon čega se stanice počinju oporavljati. Najveći inhibitorni učinak na rast K562 stanica pokazuju ekstrakti 3, 7 i 11.

Inhibicija stanične proliferacije kod HeLa stanica, uočena je nakon 48 sati izlaganja (Slika 7e), pri čemu se proporcionalno smanjuje preživljenje stanica izloženih analiziranim ekstraktima, što se najviše uočava kod koncentracija od 0,2 i 0,5 mg/mL. Statistički najznačajniji učinak uočen je pri koncentraciji od 0,5 mg/mL, gdje je stanično preživljavanje kod gotovo svih ekstrakata manje od 50 %. Trend smanjenja staničnog preživljavanja proporcionalan je vremenu izlaganja i nakon 72 sata postotak inhibicije pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji kod ekstrakata 2-8 je veći od 75% (Slika 7f). Djelovanjem ekstrakta 7 inhibiran je rast tumorskih stanica nakon 72 sata izlaganja, dok ekstrakti 9-12 najveću aktivnost postižu nakon 48 sati. Stanice se sa vremenom počinju oporavljati, što najjasnije pokazuju najveća koncentracija od 0,5 mg/mL koja inače ima najveći inhibicijski učinak.

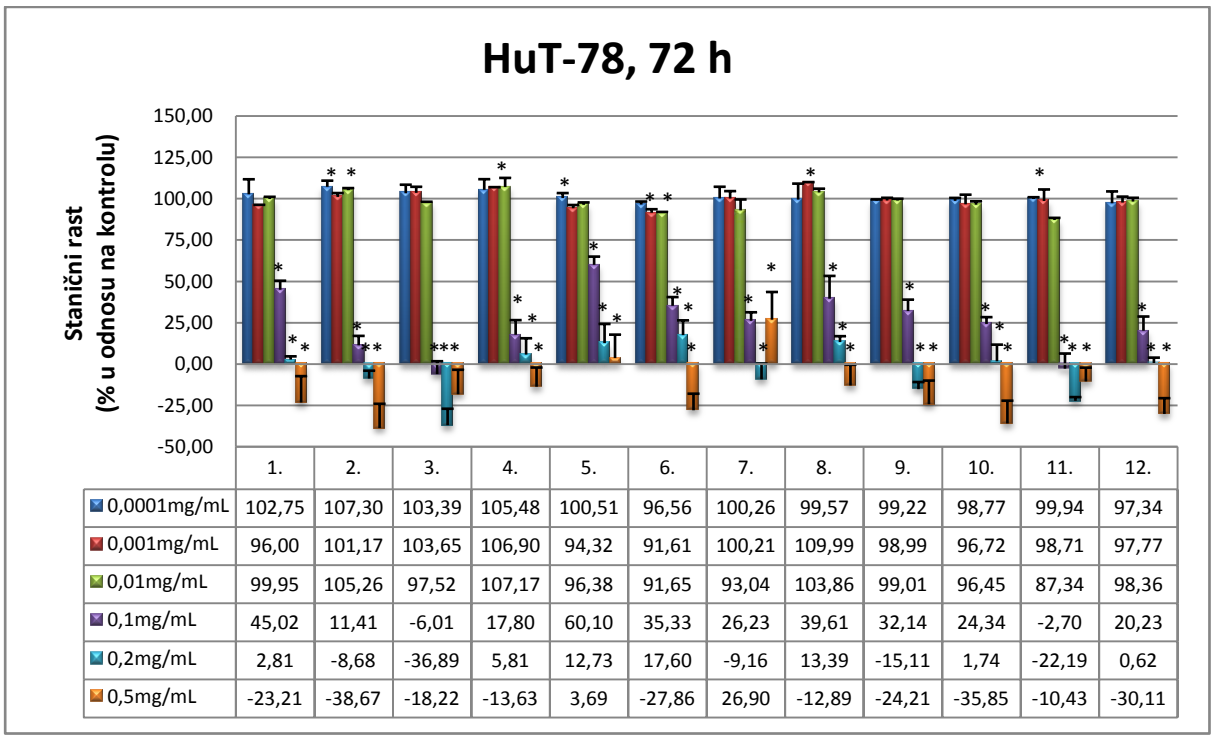
Profil djelovanja ekstrakata na MDCK-I liniju jednak je kao kod HeLa stanične linije. Veću otpornost MDCK-I stanica uočavamo nakon 48-satnog izlaganja (Slika 7g), u odnosu na HeLa stanice, ali se ta razlika gubi pri produženom periodu od 72 h (Slika 7h) jer je postotak inhibicije rasta također iznad 75 % kod većine ekstrakata. Statistički značajan utjecaj na smanjenje rasta normalne stanične linije MDCK-I, u odnosu na kontrolne stanice uočen je kod obadva vremenska perioda izlaganja i najznačajniji učinak imaju dvije najviše ispitivane koncentracije (0,2 i 0,5 mg/mL). Dobiveni rezultati pokazuju da svi ekstrakti primijenjeni u koncentracijama 0,5 mg/mL i 0,2 mg/mL, nakon 72 sata izlaganja i dalje smanjuju stanično preživljavanje. Ekstrakt 7, pokazuje najveći inhibicijski potencijal, njegova učinkovitost se uočava već pri koncentraciji od 0,1 mg/mL kod koje je rast stanica inhibiran za 60±1 % i nakon 48 nakon 72 sata tretmana.

Citotoksična aktivnost ekstrakta kamilice na NCI-H358 staničnu liniju manja je u usporedbi s drugim staničnim linijama. Značajni postotak inhibicije (58-63%) pokazuju samo ekstrakti 3, 7, 11 primijenjeni u koncentraciji od 0,1 mg/mL. Ostali ekstrakti učinkoviti su pri višim ispitivanim koncentracijama odnosno 0,5 mg/mL i 0,2 mg/mL. Postotak inhibicije pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji manji je oko 75 %. Nakon 72 sata izlaganja (Slika 7i), pri 0,5 mg/mL uočava se najslabiji citotoksičan utjecaj na preživljenje stanica u odnosu na ostale stanične linije.



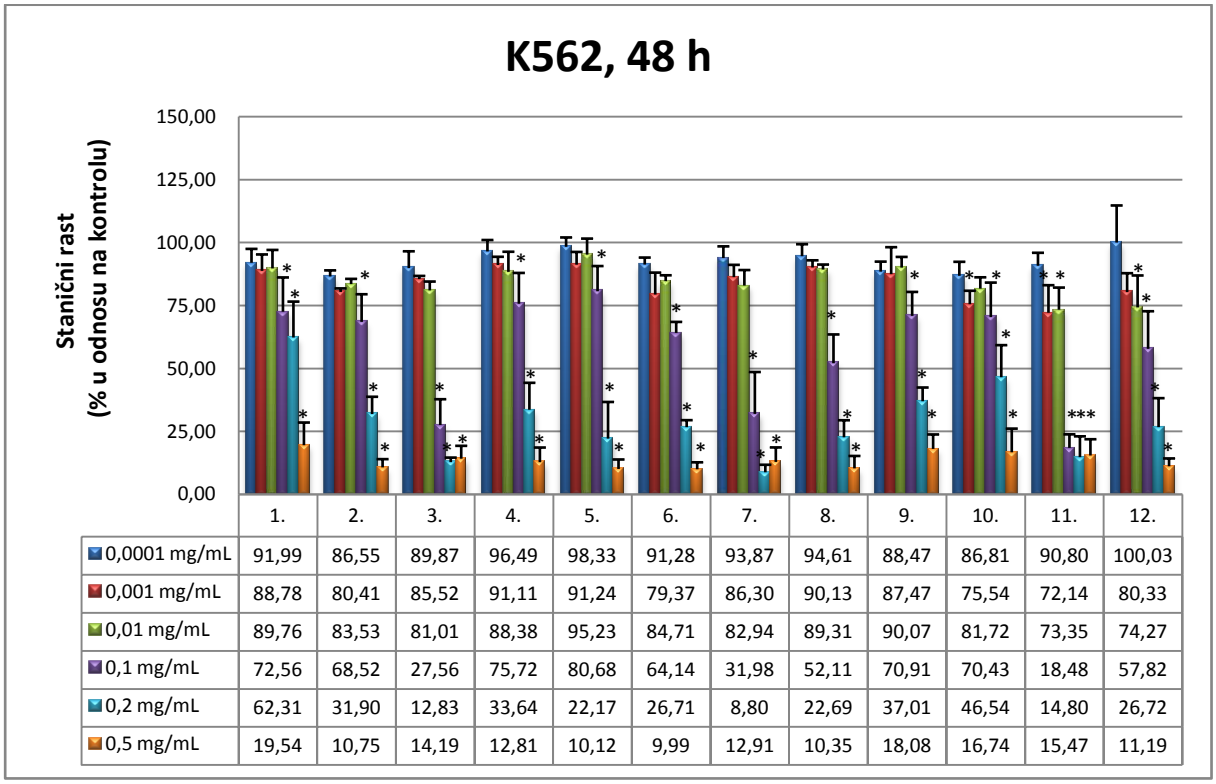
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	95,12	82,85	84,95	87,48	97,30	86,63	86,74	93,13	83,63	75,83	80,87	79,05
0,001mg/mL	88,58	78,10	78,77	86,38	95,46	86,35	85,18	86,94	86,76	79,14	74,33	76,93
0,01mg/mL	93,63	77,58	73,79	83,38	91,10	81,56	75,53	80,28	84,96	80,97	69,32	73,68
0,1mg/mL	60,94	21,90	31,57	38,80	105,53	68,81	88,15	64,86	51,48	34,39	28,19	27,24
0,2mg/mL	26,66	15,17	-6,31	46,38	59,44	60,42	62,37	65,40	15,56	23,91	2,14	24,20
0,5mg/mL	24,74	-12,85	30,13	25,69	51,01	11,76	90,44	36,98	11,41	-1,07	31,50	-0,33

(7a)



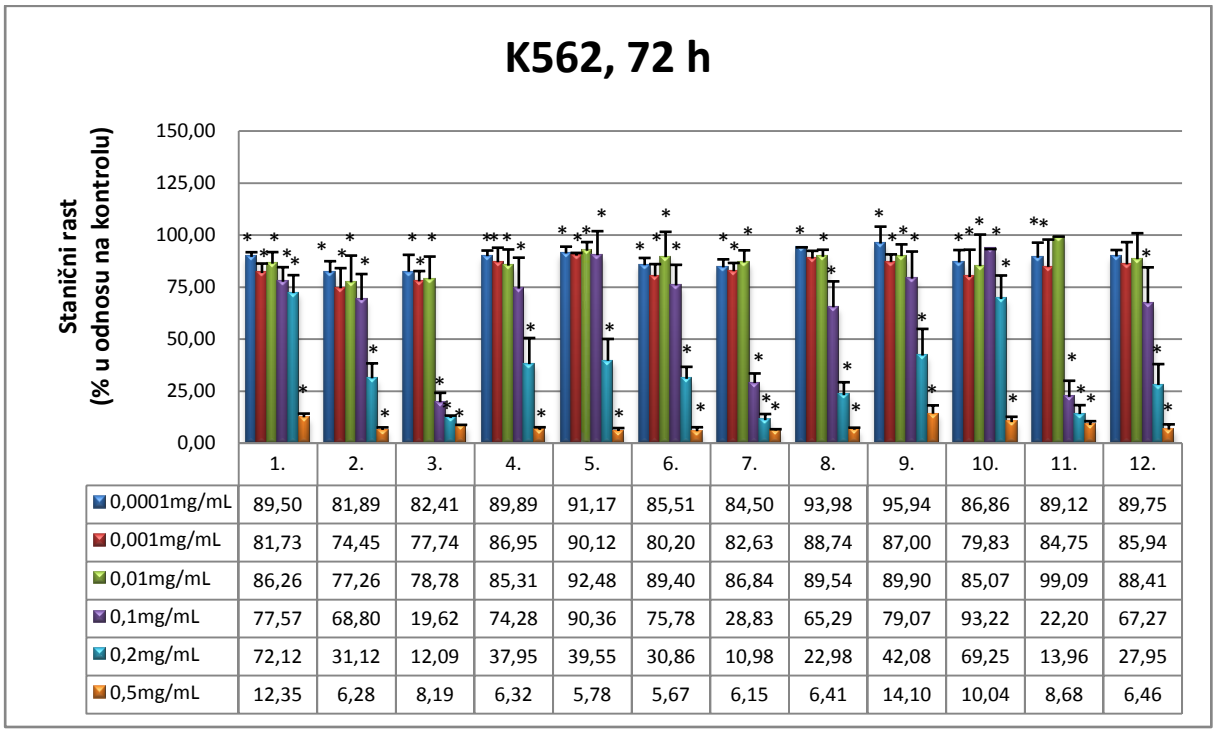
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	102,75	107,30	103,39	105,48	100,51	96,56	100,26	99,57	99,22	98,77	99,94	97,34
0,001mg/mL	96,00	101,17	103,65	106,90	94,32	91,61	100,21	109,99	98,99	96,72	98,71	97,77
0,01mg/mL	99,95	105,26	97,52	107,17	96,38	91,65	93,04	103,86	99,01	96,45	87,34	98,36
0,1mg/mL	45,02	11,41	-6,01	17,80	60,10	35,33	26,23	39,61	32,14	24,34	-2,70	20,23
0,2mg/mL	2,81	-8,68	-36,89	5,81	12,73	17,60	-9,16	13,39	-15,11	1,74	-22,19	0,62
0,5mg/mL	-23,21	-38,67	-18,22	-13,63	3,69	-27,86	26,90	-12,89	-24,21	-35,85	-10,43	-30,11

(7b)



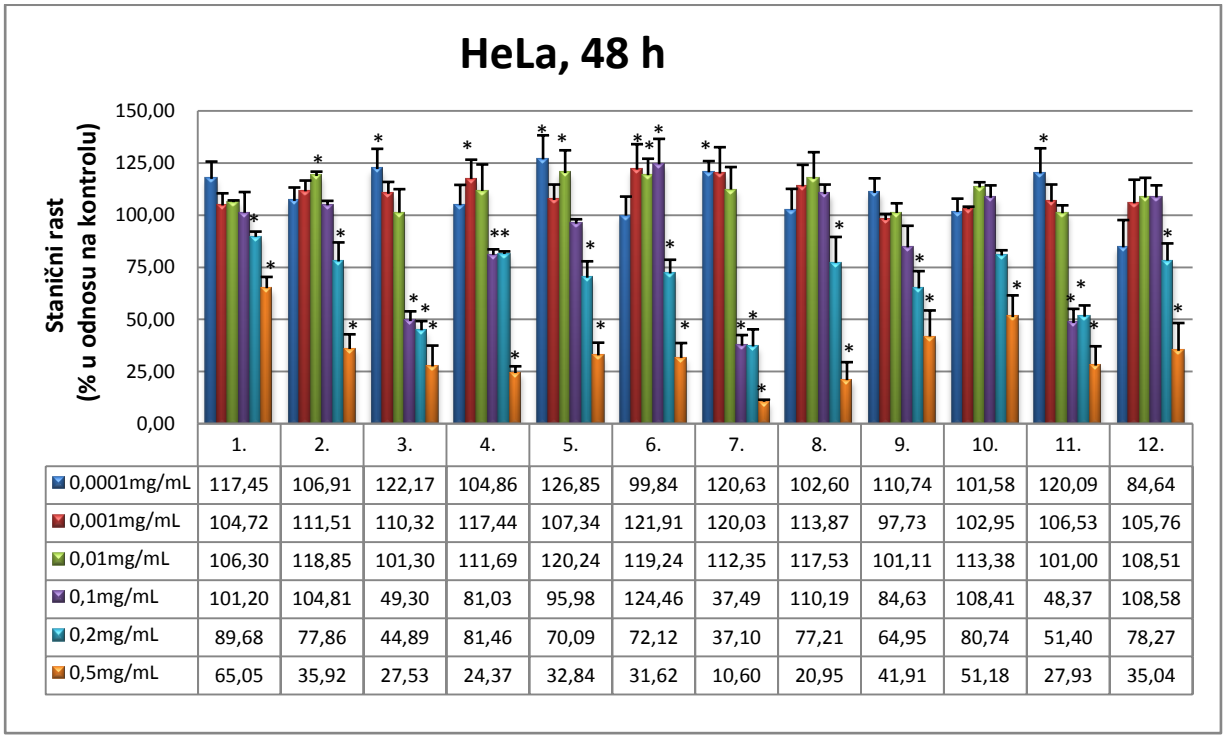
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001 mg/mL	91,99	86,55	89,87	96,49	98,33	91,28	93,87	94,61	88,47	86,81	90,80	100,03
0,001 mg/mL	88,78	80,41	85,52	91,11	91,24	79,37	86,30	90,13	87,47	75,54	72,14	80,33
0,01 mg/mL	89,76	83,53	81,01	88,38	95,23	84,71	82,94	89,31	90,07	81,72	73,35	74,27
0,1 mg/mL	72,56	68,52	27,56	75,72	80,68	64,14	31,98	52,11	70,91	70,43	18,48	57,82
0,2 mg/mL	62,31	31,90	12,83	33,64	22,17	26,71	8,80	22,69	37,01	46,54	14,80	26,72
0,5 mg/mL	19,54	10,75	14,19	12,81	10,12	9,99	12,91	10,35	18,08	16,74	15,47	11,19

(7c)



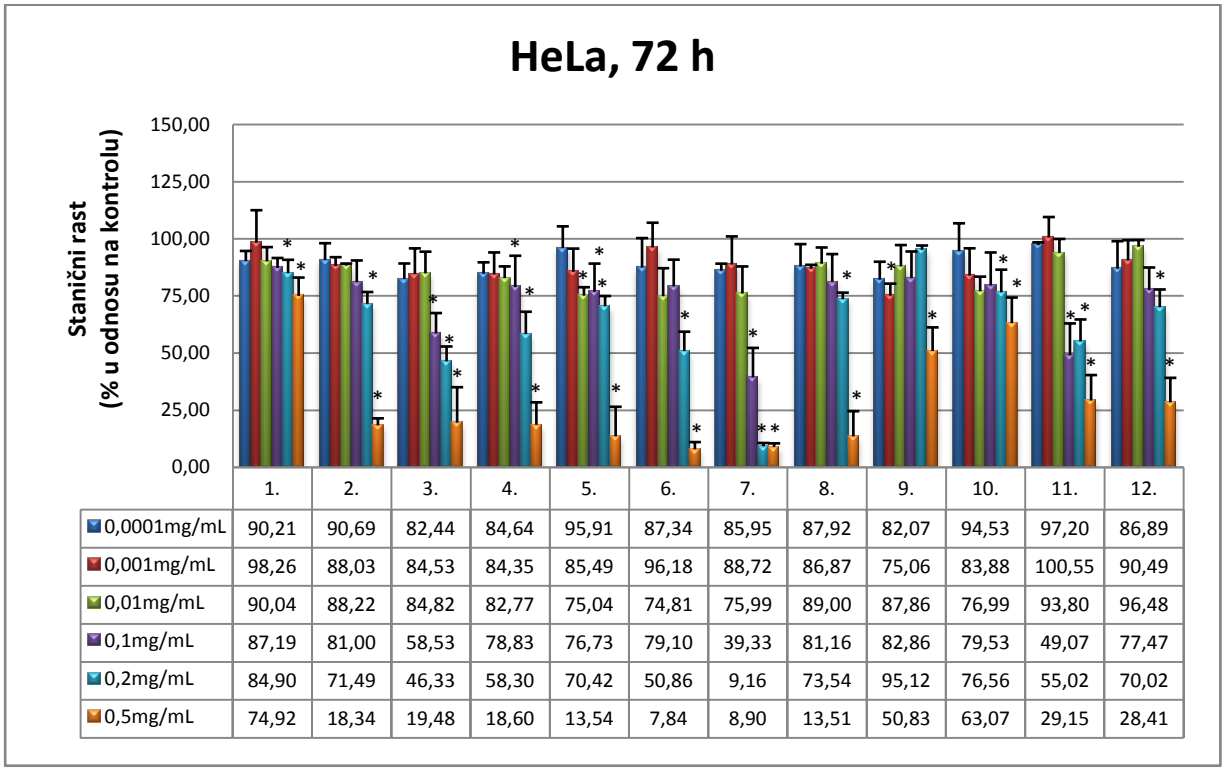
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	89,50	81,89	82,41	89,89	91,17	85,51	84,50	93,98	95,94	86,86	89,12	89,75
0,001mg/mL	81,73	74,45	77,74	86,95	90,12	80,20	82,63	88,74	87,00	79,83	84,75	85,94
0,01mg/mL	86,26	77,26	78,78	85,31	92,48	89,40	86,84	89,54	89,90	85,07	99,09	88,41
0,1mg/mL	77,57	68,80	19,62	74,28	90,36	75,78	28,83	65,29	79,07	93,22	22,20	67,27
0,2mg/mL	72,12	31,12	12,09	37,95	39,55	30,86	10,98	22,98	42,08	69,25	13,96	27,95
0,5mg/mL	12,35	6,28	8,19	6,32	5,78	5,67	6,15	6,41	14,10	10,04	8,68	6,46

(7d)



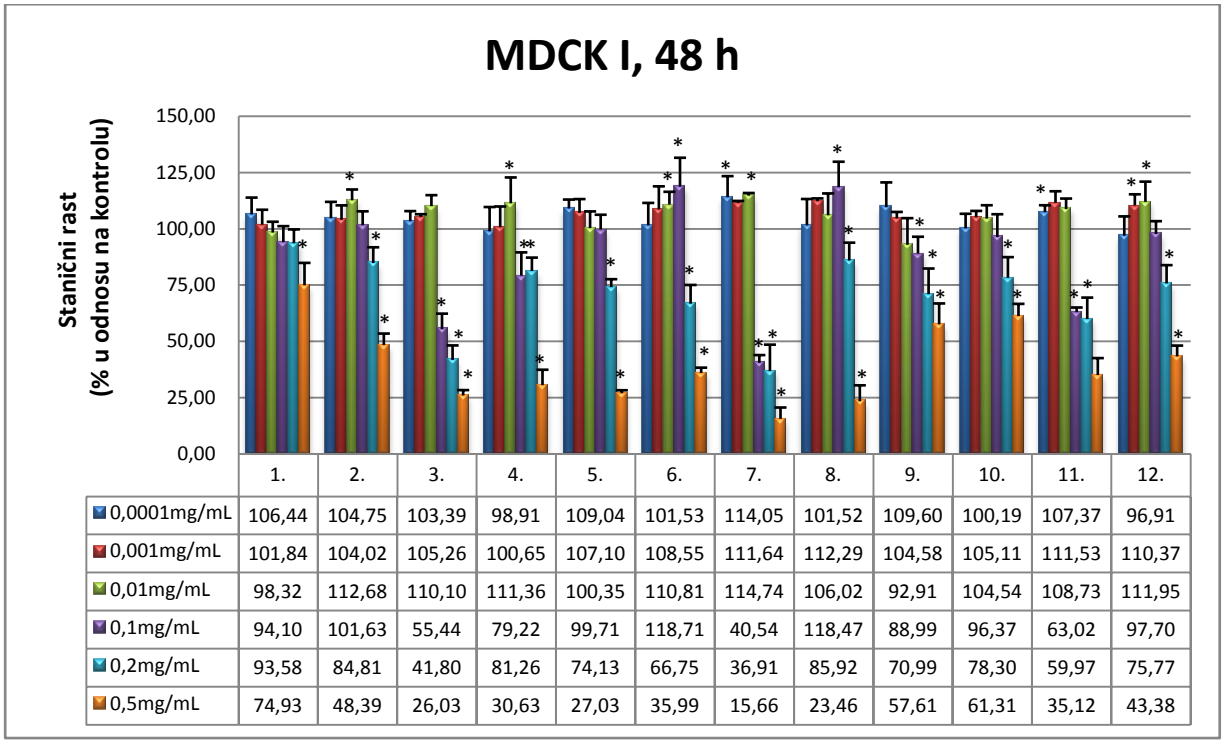
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	117,45	106,91	122,17	104,86	126,85	99,84	120,63	102,60	110,74	101,58	120,09	84,64
0,001mg/mL	104,72	111,51	110,32	117,44	107,34	121,91	120,03	113,87	97,73	102,95	106,53	105,76
0,01mg/mL	106,30	118,85	101,30	111,69	120,24	119,24	112,35	117,53	101,11	113,38	101,00	108,51
0,1mg/mL	101,20	104,81	49,30	81,03	95,98	124,46	37,49	110,19	84,63	108,41	48,37	108,58
0,2mg/mL	89,68	77,86	44,89	81,46	70,09	72,12	37,10	77,21	64,95	80,74	51,40	78,27
0,5mg/mL	65,05	35,92	27,53	24,37	32,84	31,62	10,60	20,95	41,91	51,18	27,93	35,04

(7e)



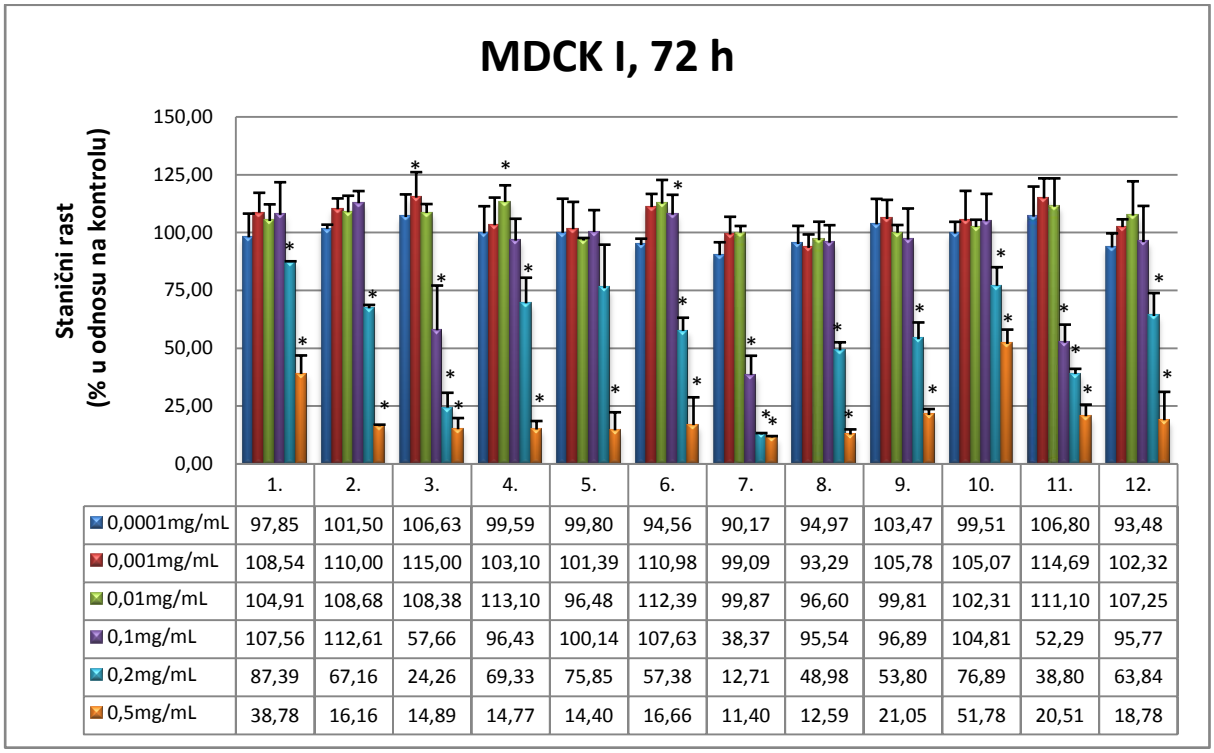
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	90,21	90,69	82,44	84,64	95,91	87,34	85,95	87,92	82,07	94,53	97,20	86,89
0,001mg/mL	98,26	88,03	84,53	84,35	85,49	96,18	88,72	86,87	75,06	83,88	100,55	90,49
0,01mg/mL	90,04	88,22	84,82	82,77	75,04	74,81	75,99	89,00	87,86	76,99	93,80	96,48
0,1mg/mL	87,19	81,00	58,53	78,83	76,73	79,10	39,33	81,16	82,86	79,53	49,07	77,47
0,2mg/mL	84,90	71,49	46,33	58,30	70,42	50,86	9,16	73,54	95,12	76,56	55,02	70,02
0,5mg/mL	74,92	18,34	19,48	18,60	13,54	7,84	8,90	13,51	50,83	63,07	29,15	28,41

(7f)



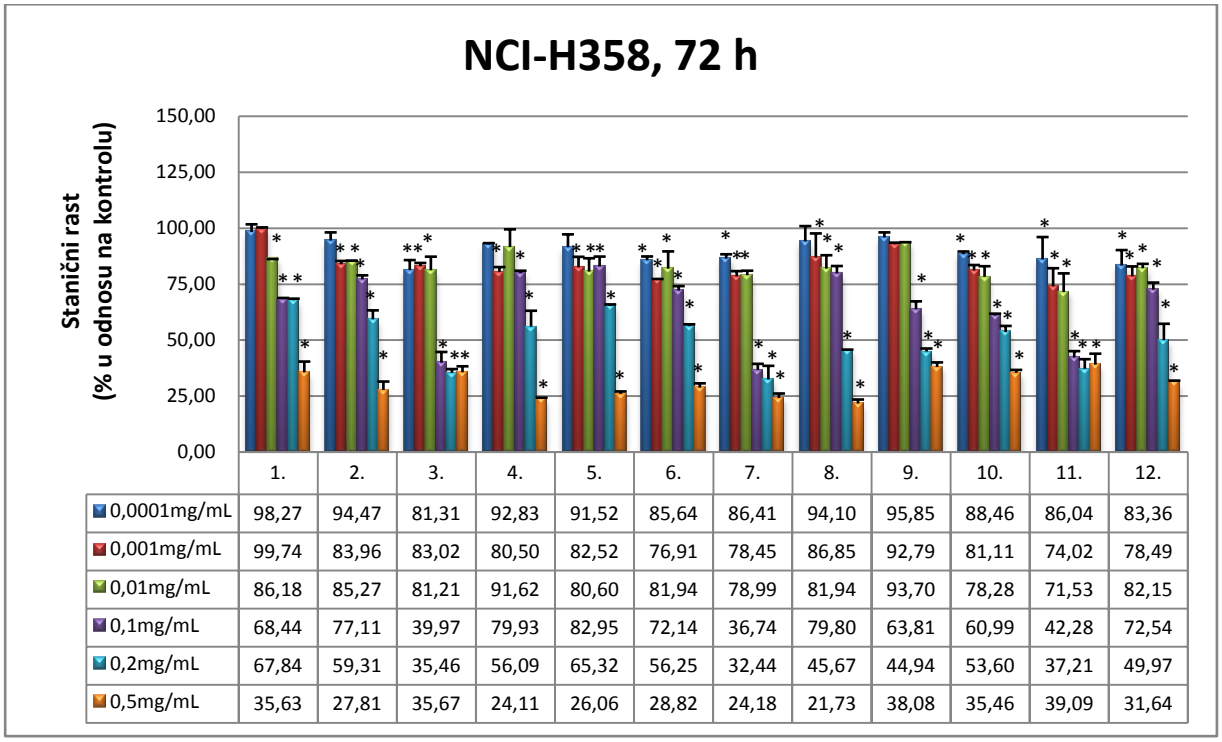
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	106,44	104,75	103,39	98,91	109,04	101,53	114,05	101,52	109,60	100,19	107,37	96,91
0,001mg/mL	101,84	104,02	105,26	100,65	107,10	108,55	111,64	112,29	104,58	105,11	111,53	110,37
0,01mg/mL	98,32	112,68	110,10	111,36	100,35	110,81	114,74	106,02	92,91	104,54	108,73	111,95
0,1mg/mL	94,10	101,63	55,44	79,22	99,71	118,71	40,54	118,47	88,99	96,37	63,02	97,70
0,2mg/mL	93,58	84,81	41,80	81,26	74,13	66,75	36,91	85,92	70,99	78,30	59,97	75,77
0,5mg/mL	74,93	48,39	26,03	30,63	27,03	35,99	15,66	23,46	57,61	61,31	35,12	43,38

(7g)



	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	97,85	101,50	106,63	99,59	99,80	94,56	90,17	94,97	103,47	99,51	106,80	93,48
0,001mg/mL	108,54	110,00	115,00	103,10	101,39	110,98	99,09	93,29	105,78	105,07	114,69	102,32
0,01mg/mL	104,91	108,68	108,38	113,10	96,48	112,39	99,87	96,60	99,81	102,31	111,10	107,25
0,1mg/mL	107,56	112,61	57,66	96,43	100,14	107,63	38,37	95,54	96,89	104,81	52,29	95,77
0,2mg/mL	87,39	67,16	24,26	69,33	75,85	57,38	12,71	48,98	53,80	76,89	38,80	63,84
0,5mg/mL	38,78	16,16	14,89	14,77	14,40	16,66	11,40	12,59	21,05	51,78	20,51	18,78

(7h)



	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
0,0001mg/mL	98,27	94,47	81,31	92,83	91,52	85,64	86,41	94,10	95,85	88,46	86,04	83,36
0,001mg/mL	99,74	83,96	83,02	80,50	82,52	76,91	78,45	86,85	92,79	81,11	74,02	78,49
0,01mg/mL	86,18	85,27	81,21	91,62	80,60	81,94	78,99	81,94	93,70	78,28	71,53	82,15
0,1mg/mL	68,44	77,11	39,97	79,93	82,95	72,14	36,74	79,80	63,81	60,99	42,28	72,54
0,2mg/mL	67,84	59,31	35,46	56,09	65,32	56,25	32,44	45,67	44,94	53,60	37,21	49,97
0,5mg/mL	35,63	27,81	35,67	24,11	26,06	28,82	24,18	21,73	38,08	35,46	39,09	31,64

(7i)

Slika 7. Citotoksičan učinak ekstrakata kamilice na stanične linije: (a) HuT-78, nakon 42h; (b) HuT-78, nakon 72h; (c) K562, nakon 48h; (d) K562, nakon 72h; (e) HeLa, nakon 48h; (f) HeLa, nakon 72h; (g) MDCK-I, nakon 48h; (h) MDCK-I, nakon 72h; (i) NCI-H358, nakon 72h. Stanice su izložene djelovanju 12 ekstrakata kamilice, u koncentracijama: 0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 mg/mL. Njihov citotoksičan učinak određen je metodom MTT testa u tri neovisna ponavljanja u triplikatu, a rezultati su izraženi kao postotak preživljenja, odnosno rasta izloženih stanica u odnosu na kontrolne stanice. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) označena je zvjezdicom (*).

Na osnovi rezultata dobivenih testom citotoksičnosti ekstrakti 3, 7 i 11 izabrani su za daljnje ispitivanje biološke aktivnosti. Analizirani ekstrakti pokazuju različitu sposobnost inhibicije staničnog rasta normalne i tumorskih staničnih linija. Razlika u citotoksičnoj aktivnosti ovisna je o tipu stanica i primijenjenoj koncentraciji. Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 7a-i, jasno se uočavaju razlike u djelotvornosti ekstrakata 3, 7 i 11. Vidljiva je smanjena vijabilnost stanica povećanjem koncentracije, a najveći učinak postiže se pri koncentracijama od 0,1; 0,2 i 0,5 mg/mL što je i statistički značajno u odnosu na kontrolu. Najveći učinak očituje se pri koncentraciji od 0,2 mg/mL. Niže koncentracije (0,01; 0,001 i 0,0001mg/mL) samo neznatno utječu na smanjenje rasta stanica. Posebno je izražena citotoksična aktivnost na maligne stanične linije K562 i HuT-78. Najveći citotoksični učinak uočen je na staničnoj liniji HuT-78 pri čemu je učinak povećan s produženjem vremena

izlaganja. K562 je jednako osjetljiva na sva tri ekstrakta neovisno o vremenu izlaganja i primijenjenoj koncentraciji. Najotpornija stanična linija je NCI-H358, na koju sva tri ekstrakta imaju istu djelotvornost u svim primijenjenim koncentracijama. Stanične linije HeLa i MDCK-I pokazuju sličan inhibicijski odgovor potaknut aktivnošću sva tri ekstrakta, a najveća sličnost uočava se djelovanjem ekstrakta 7, tijekom 72 sata izlaganja (Slika 7f) (Slika 7h). MDCK-I pokazao je veću otpornost u odnosu na HeLa stanice nakon 48 satnog izlaganja (Slika 7g), ali se ta razlika gubi pri produženom inkubacijskom periodu od 72 sata (Slika 7h).

Ekstrakt 3 izazvao je statistički značajne promjene staničnog preživljenja na svim staničnim linijama, a osobitona leukemijskim. Nakon 48 sati najveću osjetljivost pokazala je HuT-78 linija (Slika 7a), kod koje je najveći citotoksičan učinak izražen pri koncentraciji od 0,2 mg/mL. Tijekom dužeg vremena inkubacije od 72 sata kontinuirano je izražen sve veći inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju, pa sve tri koncentracije 0,1; 0,2 i 0,5 mg/mL, kod HuT-78 (Slika 7b) snažno inhibiraju staničnu proliferaciju i onemogućuju stanično preživljavanje.

Ekstrakt 7 ima slabiji inhibicijski učinak na proliferaciju HuT-78 u odnosu na ekstrakt 3 i 11. Nakon 48 sati izlaganja (Slika 7a), stanični rast nije bio inhibiran značajno u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama, ali nakon 72 sata (Slika 7b), smanjuje se vijabilnost stanica povećanjem primijenjene koncentracije, a statistički najznačajniju promjenu uzrokuje koncentracija od 0,2 mg/mL koja onemogućava stanično preživljavanje. Najveću djelotvornost ekstrakt 7 ima na HeLa (Slika 7e-f) i MDCK-I (Slika 7g-h) stanične linije, u odnosu na ekstrakt 3 i 11. Pri koncentracijama od 0,2 i 0,5 mg/mL postotak preživjelih stanica je manji od 25 % (Slika 7f; 7h).

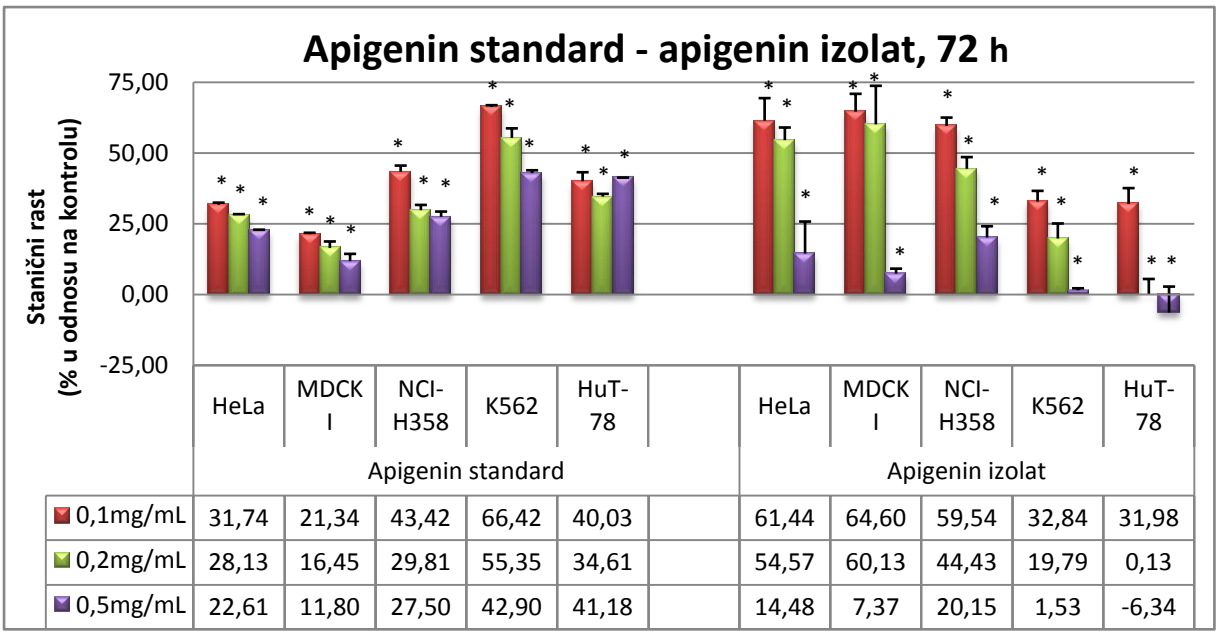
Ekstrakt 11 pokazuje slične citotoksične učinke kao i ekstrakt 3, iako ekstrakt 11 ima slabiji citotoksični utjecaj. Razlika se posebno uočava nakon 48 sati, ali nakon dužeg perioda izlaganja od 72 sata učinak na inhibiciju staničnog rasta se izjednačava s djelovanjem ekstrakta 3, što je osobito naglašeno kod NCI-H358 (Slika 7i) i leukemijskih staničnih linija (Slika 7b; 7d). Najveći utjecaj na smanjenje staničnog preživljavanja i ovdje se uočava upravo pri koncentraciji od 0,2 mg/mL.

3.1.1. Razlike u citotoksičnom djelovanju izolata apigenina iz cvijeta kamilice i standarda apigenina

Učinak izolata apigenina dobivenog iz ekstrakata cvjetova kamilice u odnosu na komercijalni standard apigenina prikazan je na Slici 8. Uočene su razlike u citotoksičnim učincima izolata tijekom izlaganja od 72 sata, što pokazuje isti obrazac inhibicije rasta stanica kao u prethodno opisanim djelovanjima različitih ekstrakata kamilice. Najveći učinak očituje se pri većim koncentracijama, osobito pri koncentraciji od 0,5 mg/mL, kod koje sve stanične linije pokazuju najmanji postotak preživljena. Najveća citotoksična aktivnost uočena je kod malignih staničnih linija K562 i HuT-78, a najosjetljivijom se staničnom linijom pokazao HuT-78. NCI-H358 opet se pokazao kao najmanje osjetljiva linija.

Rezultati djelovanja standarda apigenina pokazuju drugačiju sliku citotoksičnog djelovanja na preživljenje stanica. Leukemijske stanične linije ne pokazuju najveću inhibiciju stanične proliferacije kao što je slučaj s ekstraktima. Naprotiv, najveći utjecaj se očituje na normalnu MDCK-I i tumorsku staničnu liniju HeLa, gotovo jednako pri svim koncentracijama, s blagim povećanjem citotoksičnosti s povećanjem primjenjene koncentracije. Djelovanje i na NCI-H358, koji se pokazao kao najotpornija stanična linija, pokazalo je drugačiji stupanj preživljavanja, prema kojem komercijalni apigenin snažnije inhibira stanični rast NCI-H358 nego što djeluje na HuT-78. Najmanje je osjetljiva K562 linija.

Navedene razlike upućuju na to da dobiveni izolat apigenina iz cvijeta kamilice uzrokuje citotoksičnost i smanjuje postotak preživljenja stanica, ali učinak je različit u odnosu na učinak komercijalno dostupnog apigenina.



	Apigenin standard						Apigenin izolat				
	HeLa	MDCK I	NCI-H358	K562	HuT-78		HeLa	MDCK I	NCI-H358	K562	HuT-78
0,1mg/mL	31,74	21,34	43,42	66,42	40,03		61,44	64,60	59,54	32,84	31,98
0,2mg/mL	28,13	16,45	29,81	55,35	34,61		54,57	60,13	44,43	19,79	0,13
0,5mg/mL	22,61	11,80	27,50	42,90	41,18		14,48	7,37	20,15	1,53	-6,34

Slika 8. Biološki učinak standarda apigenina u odnosu na izolat apigenina iz cvijeta kamilice na stanične linije: HeLa, MDCK-I, HuT-78, K562 i NCI-H358. Stanične linije su izložene djelovanju standarda apigenina i izolata u vremenu od 72 sata, pri koncentracijama: 0,5; 0,2; 0,1mg/mL. Citotoksičan učinak određenivan je MTT testom u triplikatu, a rezultati su istraženi kao postotak preživljavanja izlaganih stanica u odnosu na kontrolne stanice. Statistički značajna razlika ($p<0,05$) označena je zvjezdicom (*).

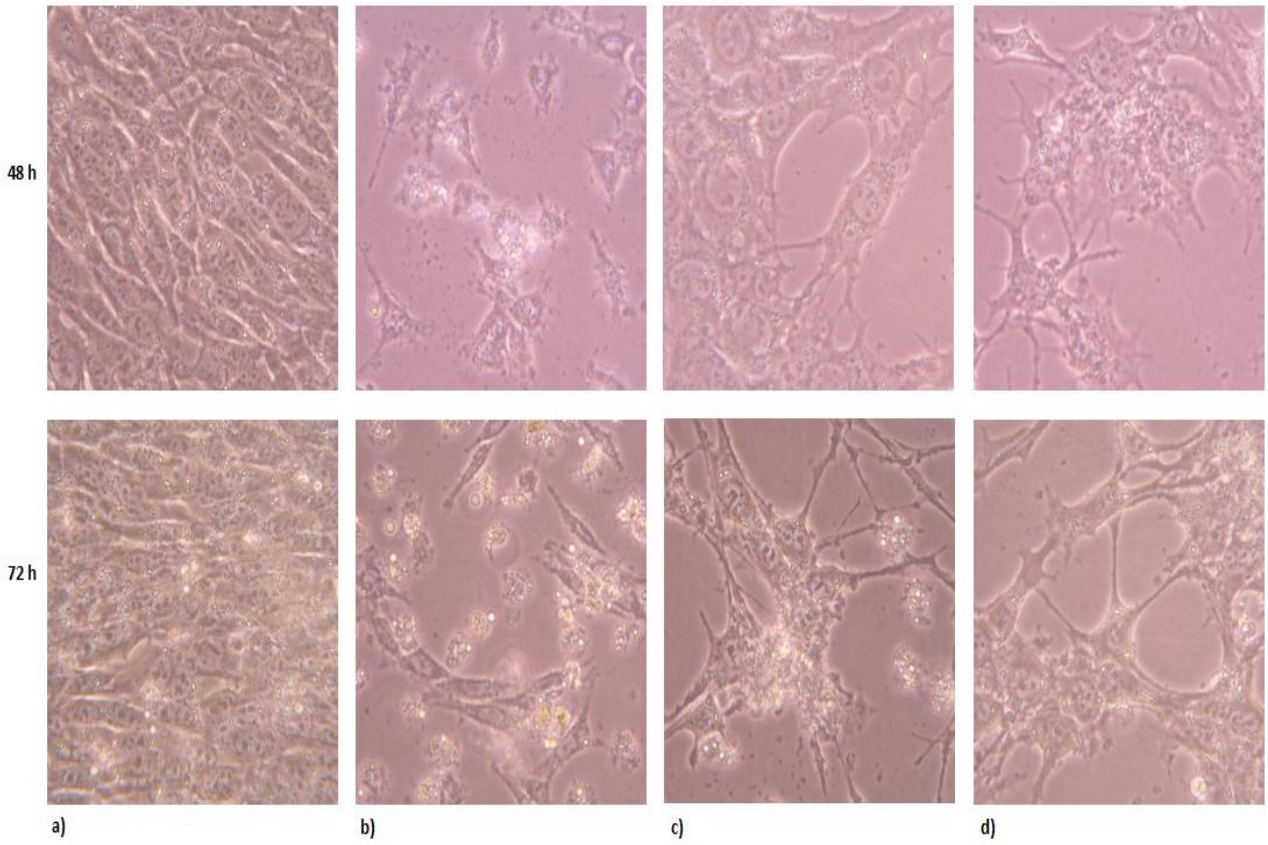
3.2. Morfološke promjene na HeLa staničnoj liniji

Model za promatranje morfoloških promjena djelovanjem ekstrakata kamilice 3, 7 i 11 bila je stanična linija HeLa (Slika 10). Po završetku testnog perioda od 48 i 72 kontrolne i tretirane stanice su mikroskopirane. Rezultati pokazuju jasno vidljiv učinak ekstrakata kamilice na promjenu morfološkog izgleda stanica.

Smanjeni broj stanica nakon tretmana s ekstraktima u odnosu na kontrolu ukazuje na citotoksično djelovanje. Djelovanjem ekstrakt 3, značajno je smanjen broj stanica već nakon 48 h u odnosu na kontrolne stanice, a tijekom dužeg vremena inkubacije od 72 h citotoksičan učinak još je vidljiviji i narušena je morfologija stanica. Stanice gube konfluentnost koja je prisutna kod kontrolnih stanica. Karakterističan razvučeni oblik HeLa stanica je narušen, što se najjasnije vidi nakon 72 sata (Slika 10 b) izlaganja kada stanice poprimaju ovalan izgled. Ekstrakti 7 i 11 djeluju na sličan način na promjenu same morfologije stanica što se može uočiti i prema sličnim IC_{50} vrijednostima. Stanice još uvijek nisu potpuno izgubile

konfluentnost i karakterističan oblik, ali produženo vremensko izlaganje evidentno utječe na pojačanu promjenu morfologije stanica. Nakon 72 sata izlaganja djelovanju istraživanih ekstrakata, jasno je vidljiva promjena u konfluentnosti stanica i promjena oblika što se najviše uočava djelovanjem ekstrakta 7 i 11, pri 72 sata (Slika 10 b). Ekstrakt 3, također je utjecao na smanjen broj i narušenu morfologiju stanica, ali slabije od ekstrakata 7 i 11. Broj stanica je smanjen, ali su pojedine stanice još uvijek zadržale svoj karakterističan oblik.

IC_{50} vrijednosti odabranih ekstrakata kamilice na HeLa stanice, pokazale su različit učinak, što je vidljivo iz vrijednosti u Tablici 1. Ekstrakti 7 i 11, svoju aktivnost postižu već nakon 48 h što se vidi po dobivenim vrijednostima koje su gotovo iste na oba promatrana vremena, što implicira da produžena izloženost nije potrebna. Ekstrakt 3, također već nakon 48 h postiže svoju aktivnost. Budući da ekstrakt 7 i 11, imaju IC_{50} pri nižim koncentracijama, kristalizacija koja se pojavljivala pri finalnim koncentracijama od 0,2 i 0,5 mg/mL ne utječe na rezultat. Kod ekstrakta 3, IC_{50} se približava koncentraciji od 0,2 mg/mL na kojoj je uočena prisutnost kristala što se može povezati s povišenom IC_{50} koja se gotovo udvostručuje u odnosu na 48 h.

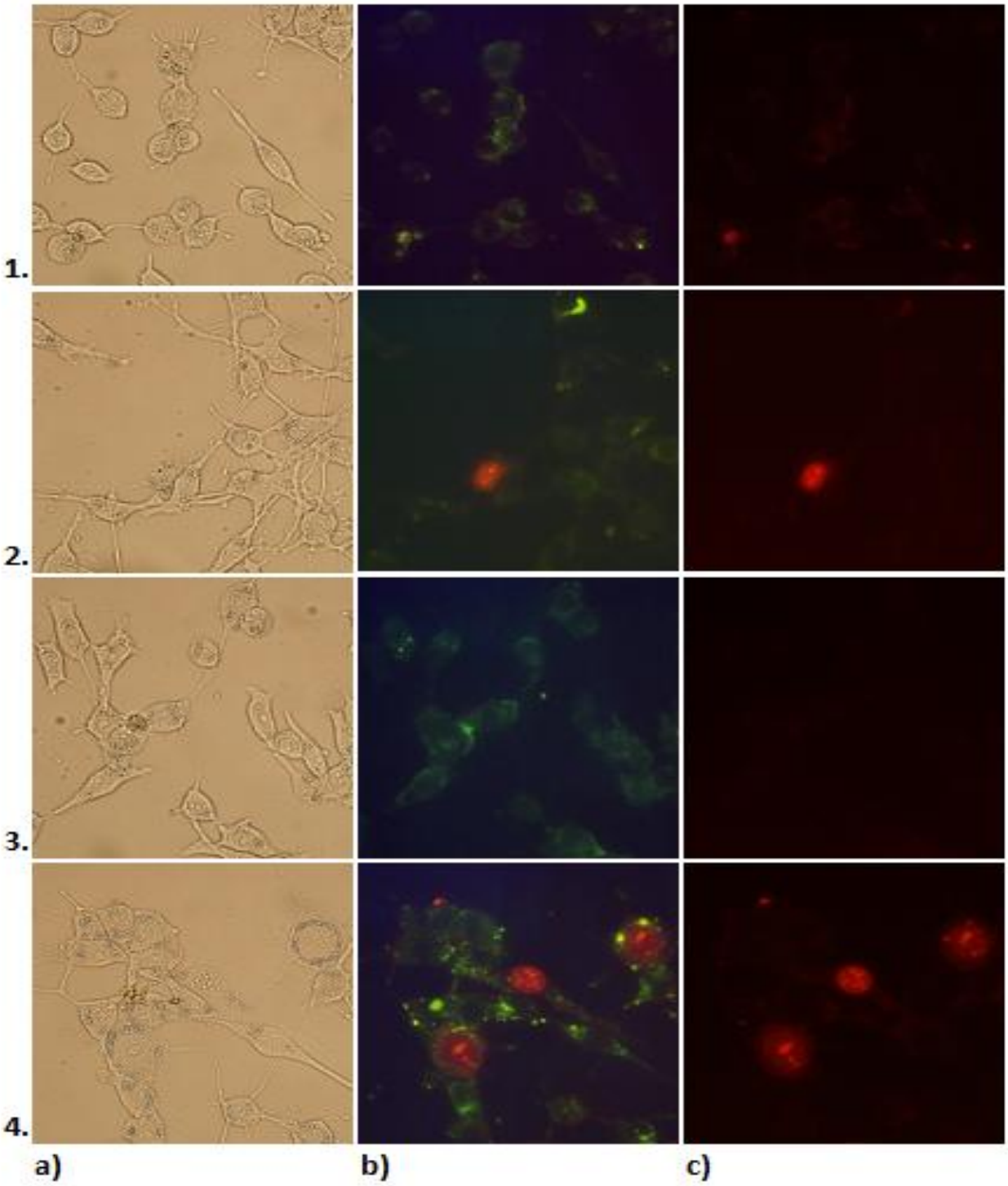


Slika 9. Morfološke promjene na HeLa stanicama. HeLa stanice izložene su djelovanju tri ekstrakta kamilice u koncentracija u kojima izazivaju 50 % preživljavanje stanica - IC_{50} (Tablica 1) tijekom 48 sati i 72 sata. **a)** kontrolne stanice; **b)** ekstrakt 3; **c)** ekstrakt 7; **d)** ekstrakt 11. Stanice su vizualizirane invertnim mikroskopom Olympus 1x51 povezanim s Olimpus SP-500 UZ fotoaparatom. Povećanje 400x.

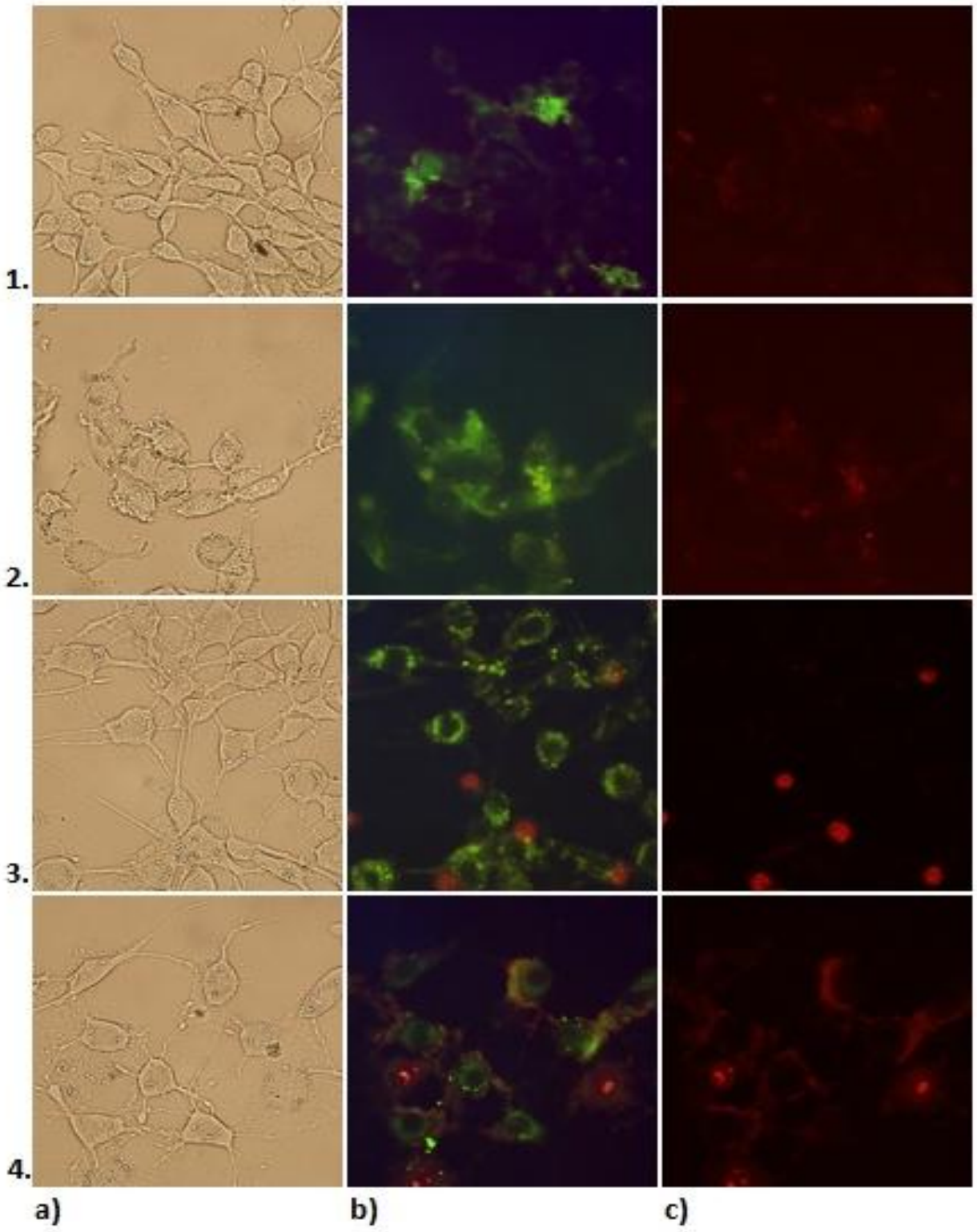
3.3. Proapoptotičko djelovanje ekstrakata kamilice na HeLa stanice

Proapoptotičko djelovanje ekstrakata 3, 7 i 11 u IC_{50} koncentracijama testirano je na HeLa stanicama tijekom 24 i 48 sata u usporedbi sa standardom apigenina kao pozitivnom kontrolom. Kod stanica u apoptozi Annexin V-FITC se veže za fosfatidil-serin koji se nalazi na vanjskoj strani membrane, a rezultat se očituje kao jasno vidljiva zelena fluorescencija. Propidijev jodid (PI) se primarno veže na DNK unutar jezgre što se detektira kao crveno obojenje. Crveno obojenje je raspršeno po čitavoj stanici što ukazuje da se PI veže i na jezgrice. Preklapanje crvenog i zelenog signala jasno pokazuje razliku u lokalizaciji. Nikakve značajne morfološke promjene na tretiranim stanicama nisu uočene pod vidljivom svjetlošću što je dobar znak koji upućuje da su stanice vijabilne i stoga reprezentativne.

Nakon 24 satnog izlaganja (Slika 11), jasno su vidljivi apoptotički i nekrotični elementi djelovanja koji su najjače izraženi djelovanjem ekstrakta 11 (Slika 11. 4 b-c). Potpuni učinak nekroze vidljiv je nakon 48 h, gdje se jasno vidi kako PI ulazi u većinu stanica oslikavajući crveno obojenje, koje je zahvatilo raspadnute stanice (Slika 12. 4 a-c). Ekstrakt 7, nakon 24 sata tek započinje proces apoptoze, što se vidi kao lagana zelena fluorescencija oko još uvijek cjelovitih membrana stanica (Slika 11. 3 b), bez znakova nekrotičnog djelovanja (Slika 11. 3c). Slika se značajno mijenja nakon 48 h, kada ekstrakt 7 uzrokuje vidljive znakove apoptotičkih i nekrotičnih stanica (Slika 12. 3 b-c). Apoptoza i nekroza vidljive su i pri djelovanju ekstrakta 3, kojeg s obzirom na najveće IC_{50} vrijednosti, očigledno treba više za postizanje značajnog učinka.



Slika 10. Proapoptotičko djelovanje ekstrakata kamilice na HeLa staničnu liniju nakon 24 sata. Hela stanice izložene su djelovanju standarda apigenina i tri ekstrakta kamilice primijenjenih u IC_{50} vrijednosti (Tablica X). Nakon 24 sata na stanice je dodan Annexin V-FITC i PI. Za analizu proapoptotičkog učinka primijenjen je Carl Zaiss fluorescentni mikroskop: **a)** vidljivo svjetlo; **b)** Annexin V-FITC λ_{exc}=495 nm, λ_{em}=525 nm (zelena fluorescencija); **c)** PI λ_{exc} = 488-535 nm, λ_{em}=612-617 nm (crvena fluorscencija); **1)** apigenin standard (pozitivna kontrola); **2)** ekstrakt kamilice 3; **3)** ekstrakt kamilice 7; **4)** ekstrakt kamilice 11. Povećanje 400x.



Slika 11. Proapoptotičko djelovanje ekstrakata kamilice na HeLa staničnu liniju nakon 48 sata. Hela stanice izložene su djelovanju standarda apigenina i tri ekstrakta kamilice primijenjenih u IC_{50} vrijednosti (Tablica 1). Nakon 48 sati na stanice je dodan Annexin V-FITC i PI. Za analizu proapoptotičkog učinka primijenjen je Carl Zaiss fluorescentni mikroskop: **a)** vidljivo svjetlo; **b)** Annexin V-FITC λ_{exc}=495 nm, λ_{em}=525 nm (zelena fluorescencija); **c)** PI λ_{exc} = 488-535 nm, λ_{em}=612-617 nm (crvena fluorscencija); **1)** apigenin standard (pozitivna kontrola); **2)** ekstrakt kamilice 3; **3)** ekstrakt kamilice 7; **4)** ekstrakt kamilice 11.

4. RASPRAVA

Kako su tumorska oboljenja jedna od vodećih uzročnika smrtnosti, a do sada nije pronađen posve učinkovit lijek nameće se potreba za pronalaskom boljeg pristupa u suzbijanju tumorskih oboljenja (Mendelsohn i sur., 2001). U svrhu pronalaska tvari s mogućim učincima na inhibiciju rasta tumorskih stanica, istraženo je 12 ekstrakata kamilice (*Matricaria camomilla*), dobivenih u laboratoriju za izolaciju pri Katedri za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo u Novom Sadu. Cilj istraživanja bio je odrediti učinak 12 ekstrakata cvjeta kamilice na panelu humanih tumorskih linija (HeLa, NCI-H358, K562 i HuT 78) i jednoj psećoj liniji normalnih stanica (MDCK-I). Flavonoidi pripadaju skupini prirodnih polifenolnih spojeva, široko rasprostranjenih u biljnom carstvu, koji pokazuju razne biološke aktivnosti, uključujući i inhibiciju rasta tumora (Formica i Regelson, 1995; Shukla i sur., 2008). Biljni flavonoid apigenin koji je jedna od aktivnih tvari u istraživanim ekstraktima važna je komponenta cvjetova kamilice (Janmeya i sur., 2010). Brojni drugi spojevi koji se nalaze u cvjetovima kamilice poput kamazulena, seskviterpenskih alkohola (α-bisabolol), seskviterpenskih oksida (bisabolol), seskviterpenskih laktona i kumarina (herniarin, umbeliferon) imaju dokazane biloške učinke na inhibiciju stanične proliferacije (Janmeya i Sanjay, 2009). Analize brojnih ekstrakata kamilice potvrdile su da je apigenin-7-O-glukozid (AP-7-Glc) glavni sastojak (Švehlikova i sur., 2004) i da ekstrakti kamilice koja raste na različitim područjima sadrže različite količine apigenina za kojeg je utvrđeno da ima antioksidativna i protutumorska svojstva (Silvan i sur., 2010).

Rezultati ove studije pokazuju da ekstrakti iz cvjetova kamilice imaju različito citotoksično djelovanje na ispitivane stanične linije nakon 48 i 72 sata izlaganja stanica. Učinci ekstrakata bili su ovisni o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji (0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 mg/mL) i vremenu izlaganja. Rezultati pokazuju smanjen postotak rasta svih staničnih linija u primijenjenom koncentracijskom nizu od 0,5 mg/mL do 0,0001 mg/mL. Proporcionalno smanjenje vijabilnosti stanica kod svih analiziranih ekstrakata uočava se kod dvije najviše primijenjene koncentracije od 0,2 i 0,5 mg/mL, osobito nakon 72 sata izlaganja. Slične učinke na inhibiciju rasta tumorskih stanica jetre HeP-G2 pokazala su istraživanja na apigeninu ($2{,}7x10^{-4}$ – $2{,}7x10^{-2}$ mg/mL) tijekom izlaganja stanica 48 i 72 sata. Rezultati studije Papachristou i sur. pokazali su da koncentracije od $1{,}3x10^{-2}$ i $2{,}7x10^{-2}$ mg/mL uzrokuju inhibiciju staničnog rasta od 75-100 % nakon 72 sata izlaganja (Papachristou i sur., 2013). Ovaj rezultat pokazuje da apigenin ima značajan citotoksičan učinak u koncentracijama 10 puta manjim od koncentracije naših ekstrakata 3, 7 i 11 (0,2 mg/mL) koji su imali značajan učinak na vijabilnost stanica. Wang i sur. su istraživanjem flavonoida apigenina, kvercetina,

mircetina i kampferola na leukemijskim HL-60 stanicama ustanovili da najveću inhibiciju stanične proliferacije izaziva apigenin, proporcionalno s povećanjem koncentracije što je u korelaciji s djelovanjem naših ekstrakata. Dvije najviše koncentracije apigenina od $2{,}1x10^{-2}$-$2{,}7x10^{-2}$ mg/mL, izazvale su smanjenje staničnog rasta za 60-70 % nakon 48 sati izlaganja (Wang i sur., 1999). Ove spoznaje o učinku apigenina na nižim koncentracijama ($2x10^{-2}$ mg/mL) od onih koje su imali naši ekstrakti 3, 7 i 11 ($2x10^{-1}$ mg/mL), upućuju nas da apigenin nije jedini spoj u našim ekstraktima koji pokazuje biološki učinak.

Najveća inhibicija staničnog rasta uočena je kod malignih staničnih linija HuT-78 i K562, a osobito HuT-78. Najveći učinak ima koncentracija ekstrakta od 0,2 mg/mL. Niže koncentracije (0,01; 0,001 i 0,0001mg/mL) neznatno utječu na rast stanica. Prema literaturnim navodima, stanične linije HuT-78 i K562, pripadaju skupini transformiranih limfoblastnih stanica. HuT-78 stanice su izolirane iz krvi pacijenta oboljenog od Sazarijevog sindroma, a K562 iz koštane srži pacijentice oboljele od kronične mijeloidne leukemije CLM (Web 6). Ruela-de-Sousa i sur. u svojim istraživanjima citotoksičnog učinka apigenina na dva tipa leukemijskih stanica, ustanovili su da apigenin značajnije inhibira rast mijeloidnih (HL-60 i K562) u odnosu na eritroidne (TF1) leukemijske stanice (Ruela-de-Sousa i sur., 2010), što nas dovodi u korelaciju s rezultatom ove studije i izraženim utjecajem ekstrakata na našu istraživanu staničnu liniju mijeloidne leukemije K562. Nadalje, istraživanje citotoksičnog učinka apigenina na različite linije leukemijskih stanica, rezultiralo je selektivnim antiproliferativnim i apoptotičkim učinkom na monocite i limfocite leukemija (Vargo i sur., 2006). Brojna druga istraživanja potvrdila su biološki učinak apigenina na leukemijske stanice. Wang i sur. potvrdili su da apigenin ima znatno veću citotoksičnu aktivnost od ostalih flavonoida u izazivanju apoptoze leukemijskih stanica (Wang i sur., 1999).

Usporedbom citotoksičnog djelovanja svih ekstrakata na istraživane stanične linije, najjače proapoptotičko djelovanje pokazali su ekstrakati 3, 7 i 11. Najmanju dobivenu citotoksičnu aktivnost ekstrakta kamilice na NCI-H358 u usporedbi s drugim staničnim linijama, možemo dovesti u korelaciju sa dosadašnjim spoznajama o otpornosti ovih stanica na djelovanje kemoterapijskih spojeva (Winter i sur. 1992). NCI-H358 stanična linija ima mutirani tumor supresorski gen p53, koji nije u mogućnosti potaknuti daljnji tijek reakcija koje odvode tumorske stanice u programiranu staničnu smrt (Winter i sur. 1992).

Ekstrakt 3 pokazao je najjači citotoksičan učinak, a nešto slabiji učinak ima ekstrakt 11. Djelovanje ekstrakta 7 na HuT-78, slabije je u odnosu na ostala dva ekstrakta, ali pokazuje veću djelotvornost na HeLa i MDCK-I staničnu liniju od ekstrakta 3 i 11. Dobiveni rezultati pokazatelj su djelovanja različitih spojeva iz ekstrakata koji su dobiveni različitim metodama ekstrakcije s naglaskom na apigenin kao jednu od aktivnih komponenti. Drugi istraživači su uvidjeli da apigenin i strukturno srodni flavonoidi kao što su kvercetin, mircetin i kampferol pokazuju inhibitorni učinak na proteosome i aktivaciju apoptoze u leukemijskim stanicama sa naglaskom da apigenin i kvercetin imaju jači učinak od kampferola i mircetina na aktivaciju kaspaze 3 i poticanje apoptoze u leukemijskoj Jurkat staničnoj liniji (Chen i sur., 2005)

Točan mehanizam djelovanja ekstrakata na inhibiciju stanične proliferacije u ovom istraživanju nije utvrđen, ali dosadašnje spoznaje ukazuju na nekoliko putova djelovanja apigenina i srodnih flavonoida. Jedna studija potvrdila je utjecaj flavonoida apigenina i kvercetina na inhibiciju enzima topoizomeraze koji regulira DNK nepravilnosti i uključen je u metabolizam leukemijskih stanica uključujući kontrolu DNK replikacije i transkripcije (Vargo i sur., 2006). Još davne 1975, Suolinna i sur. pokazali su da flavonoidi kao što je kvercetin imaju inhibitorni učinak *in vitro* na malignim staničnim linijama, kao što je HeLa i leukemijske stanične linije L1210 i P-388. Tretirane stanice imaju sniženu razinu Bcl-2 i povećanu razinu Bax proteina što potiče aktivaciju mitohondrijskog puta apoptoze (Suolinna i sur., 1975). Jedna od novih spoznaja o kojima su izvijestili Cao i sur., 2013, odnosi se na citotoksično djelovanje apigenina na stanice tumora dojke T47D i MDA-MB-231. Ovo istraživanje ukazalo je da apigenin utječe na apoptozu i autofagiju istovremeno na način da inhibira autofagiju i time pojačava proapoptotičku aktivnost. Apigenin izaziva autofagiju stvaranjem autofagnih vakuola i povišenjem koncentracije LC3-II. Dokazano je da apigenin istovremeno utječe na apoptozu i autofagiju, a inhibira i fostaidilinozitol 3-kinazni/Akt/mTOR signalni put koji je bitan u negativnoj regulaciji autofagije. Djelovanjem inhibitora autofagije kao što je 3-MA (3-metiladenin) pojačava se učinak apoptoze. Ovo istraživanje ukazuje kako određeni kemoterapeutici inhibirajući autofagiju i istovremeno pojačavajući apoptozu, daju važne informacije za prevenciju nastanka tumora (Cao i sur., 2013). Rezultati istraživanja na ljudskoj promijelocitnoj leukemiji HL-60, potvrdili su da flavonoidi induciraju gubitak mitohondrijskog transmembranskog potencijala što dovodi do otpuštanja citokroma c u citosol i aktivacije nizvodnih kaspaza, koje potiču programiranu stanične smrt. Kao glavni flavanoid s proapotptičkim djelovanjem istaknut je apigenin (Wang i sur., 1999). Objavljene spoznaje o utjecaju apigenina i srodnih flavonoida na tumorske stanice i signalne puteve

uključene u smrt izloženih stanica upućuju na mogućnost da je jedan od prethodno opisanih procesa potaknut djelovanjem i naših ekstrakata, a što bi se moglo potvrditi daljnjom analizom.

Rezultati ispitivanja morfoloških promjena i sposobnosti indukcije apoptoze u HeLa stanicama djelovanjem ekstrakata 3, 7 i 11 potvrđuju njihov proapotpotički potencijal. Novija istraživanja na stanicama tumora dojke T47D i MDA-MB-231 (Cao i sur., 2013) i HeLa stanicama (Xu i sur., 2011), koje su tretirane apigeninom, potvrdila su pojačan apoptotički učinak vidljiv vezanjem obilježenog aneksina na izloženi fosfatidilserin. Istraživanja su potvrdila da flavonoidi imaju potencijal vezanja na ATP vezna mjesta velikog broja proteina, zbog njihove sličnosti s ATP strukturom, što čini flavonoide konkurentnim inhibitorima proteinskih kinaza. Apigenin se pokazao kao inhibitor protein-tirozinskih kinaza, koje nadziru rast i diferencijaciju stanica (Ruela-de-Sousai sur., 2010). Prema izvješćima drugih autora o utjecaju apigenina na tumorske stanice vrata maternice (HeLa), možemo pretpostaviti jedan od mogućih putova izazivanja apoptoze kod ove stanične linije koji su izazvali i naši ekstrakti. Prva izvješća o utjecaju apigenina na HeLa stanice, pokazala su da apigenin inhibira rast stanica kroz apoptozu na način da djeluje na aktivaciju proteina p53, koji aktivira transkripciju gena uključujući p21 koji u konačnici zaustavljanja rast stanica u G1 fazi staničnog ciklusa. Tvori se kompleks (Apaf-1/kaspaza-9) što dalje rezultira lančanom aktivacijom nizvodnih kaspaza i odvodi tumorske stanice u apoptozu. Apigenin također utječe na smanjenu ekspresiju Bcl-2 proteina, a koji djeluje kao inhibitor programirane stanične smrti (Zheng i sur., 2005).

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti apigenina standarda i izolata pokazali su različit citotoksičan učinak, što potvrđuje da apigenin nije jedina aktivna komponenta u izolatu apigenina. Ove razlike mogu biti utjecaj različitih metoda ekstrakcije i čistoće istraživanih ekstrakata, što nas upućuje da u našim ekstraktima apigenin nije jedina tvar s biološkim učinkom. Apigeninski izolat pokazao je najveći postotak inhibicije staničnog rasta na leukemijske stanice HuT-78 i K562, a standard apigenina na HeLa i MDCK-I staničnu liniju.

Epidemiološke studije izvještavaju da hrana bogata biljnim flavonoidima ima pozitivan utjecaj na zdravlje, uključujući smanjen rizik od razvoja određenih vrsta tumora. Apigenin je jedan od najvažnijih bioaktivnih biljnih flavonoida. Njegov unos je u velikoj mjeri zastupljen u obliku biljnog čaja kamilice. Laboratorijska istraživanja pokazala su da apigenin posjeduje protuupalna, antioksidativna i antitumorska svojstva, te da utječe na nekoliko ključnih putova i/ili ciljeva koji su povezani s nekoliko zdravstvenih poremećaja, uključujući i tumore (Shukla i Gupta, 2010).

Temeljem prethodno navedenih spoznaja, apigenin i srodni flavonoidi imaju potencijal za daljnje istraživanje i razvoj kao kemopreventivno i/ili terapijsko sredstvo.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK

- Citotoksičan utjecaj na smanjenje preživljenja stanica povećava se proporcionalno s povećanjem koncentracije, pa tako najveće koncentracije 0,2 i 0,5 mg/mL imaju najveći citotoksičan učinak kod svih analiziranih staničnih linija, pri čemu je učinak povećan produženim vremenskim periodom izlaganja za svih dvanaest ispitivanih ekstrakata kamilice

- Ekstrakti 3, 7 i 11 pokazali su najveći inhibicijski učinak od svih ispitivanih ekstrakata u odnosu na kontrolne stanice

- Stanične linije HuT-78 i K562 pokazale su najveću osjetljivost djelovanjem ekstrakata 3,7 i 11, dok je NCI-H358 najmanje osjetljiva stanična linija

- Ekstrakt 3, pokazao je najveću inhibiciju staničnog rasta na HuT-78 staničnu liniju

- Komercijalni i izolirani apigenin pokazuju različito djelovanje na stanične linije; izolat najvećim dijelom inhibira HuT-78 i K562 dok komercijalno dostupan apigenin nema značajnu učinkovitost na iste

- Razlike u citotoksičnom djelovanju komercijalnog dostupnog i izoliranog apigenina upućuju na to da apigenin nije u potpunosti čist i jedina aktivna komponenta u izolatu apigenina koja djeluje citotoksično

- Ekstrakti 7 i 11 najviše utječu na promjenu morfološkog izgleda HeLa stanica

- Sva tri ekstrakta (3,7,11) dovode do apoptoze u HeLa stanicama sa naglaskom na ekstrakt 11 koji pokazuje najsnažnije proapoptotičko djelovanje

6. LITERATURA

Ahmed N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J nat Cancer Inst* 89:1881-1886.

Bevilacqua L, Buiarelli F, Coccioli F, Jasionowska R. 2004. Identification og compounds in wine by HPLC-tandem mass spectometry. *Annali di Chimica* 94:697-689.

Birt DF, Walker B, Tibbel MG, Bresnick E. 1986. Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole 3-carbinol. *Carcinogenesis* 7:959-963.

Cao X, Liu B, Cao W, Zhang W, Zhang, Zhang F, Zhao H, Meng R, Zhang L, Niu R, Hao X, Zhang B. 2013. Autophagy inhibition enhances apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Chin J Cancer Res* 25:212-222.

Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. 2005. Dietary flavonoids as proteasome inhobitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* 69:1421-1432.

Cooper GM, Hausman RE 2004. *Stanica, moleklarni pristup*. Apoptoza. Medicinska naklada Zgareb 699 pp.

Eagle H. 1955. Nutrition Needs of Hummalian Cells in Tissue Cultur. National Institutes of Health, Bethesda, *MD Science* 122:501–504.

Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Dohery DE, Campbell PA, Henson PM. 1992. Different populations of macrophages use either the vitonection receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149:4029-4035.

Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food chem. Toxicol* 33:1061-1080.

Freshny RI 1987. *Cultre of animala cells. A manual of bacis technique*. New York, Alan R. Liss Inc, 796 pp.

Gerhauser C. 2005. Beer contituens as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer* 41:1941-1954.

Janmeya KS, Sanjay G, Shankar E. 2010. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future, NIH Public Access. *Mol Med Report* 6:895-901.

Janmeya KS, Sanjay G. 2009. Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers. *Mol Cell Pharmacol* 1-3:138.

Jayasooriya RGPT, Kang SH, Kang CH, Choi YH, Moon DO, Hyun JW, Chang WY, Kim GY. 2012. Apigenin decreases cell viability and telomerase activity in human leukemiacell lines. *Food and Chemical Toxicology* 50:2605–2611.

Kazazić SP 2004. Antioksidacijksa i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol* 55:279-290.

Koolman J, Roehm K-H 2005. *Color atlas of biochemistry*. 2nd Ed, Stuttgart, New York, 467 pp.

Mayer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J. 2006. Bioavability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50:167-172.

McKay DL, Blumberg JB. 2006. A rewiew of the bioactivity and potential health benefits of camomile tea. *Phytotherapy Research* 20:519-530.

Mendelsohn J, Howley PM, Israel M, Liotta LA 2001. *The Molecular Basis of Cancer.* 2nd Ed. W.B. Saundres, Philadelphia, 691 pp.

Mickisch G, Fajta S, Keilhaur G, Schlick E, Tschada R, Alken P. 1990. Chemosensitivity testing of prmary human renal cell carcinoma by tetrazolium based microculture assay (MTT). *Urol Res* 18:131-136.

Mršić- Krmpotić Z, Roth A, suradnici 2004. *Internistička onkologija*. Medicinska naklada, Zagreb, 630 pp.

Myrstad MC, Carlsen H, Nordstorm O, Blomhoff R, Moskaung JO. 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biology and Medicine* 32:386-393.

Papachristou F, Chatzaki E, Petrou A, Kougioumtzi I, Katsikogiannis N, Papalambros A, Tripsianis G, Simopoulos C, Tsaroucha AK. 2013. Time course changes of anti- and pro-apoptotic proteins in apigenin-induced genotoxicity. *Chinese Medicine* 1:8-9.

Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Brandger G, Hess RD. 1996. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 13:1605-1614.

Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Gens Dev* 10:1945-1952.

Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Rumi C, Piantelli M. 1992. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 50:486-492.

Reynolds JR, Schecker JA. 1995. Radiation, cell cycle, and cancer. *Los Alamos Sci* 23:51-89.

Ross JA, Kausum CM. 2002. Dietery flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition* 22:19-34.

Ross W, Preedy VR 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health Fruits and Vegetables* Academic Press 725 pp.

Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Blom N, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP. 2010. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death and Diseas Macmillan Publishers Limited All rights reserved* 10:2041-4889.

Shukla S, Gupta S. 2008. Apigenin induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radical Biology & Medicine* 44:1833-1845.

Shukla S, Gupta S. 2010. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm Res* 27:962-978.

Silvan S, Manoharan S, Baskaran N, Singh AK. 2010. Apigenin: A potent antigenotoxic and anticlastogenic agent. *BIOPHA* 6:2963-2960.

Soulinna EM, Buchsbaum RN, Racker E. 1975. The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res* 35:1865-1872.

Svehlikova V, Bennett RN, Mellon FA, Needs PW, Piacente S, Kroon PA, Bao Y. 2004. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita*). *Phytochemistry* 65:2323-2332.

Swain T, Harborne JB, Sumere CF 1979. *Biochemistry of Plant Phenolics, Recente Advances in Phytochemistry.* Publiscing by Plenum Press, New York, 59-89.

Šamija M 2000. *Onkologija*. Medcinska naklada, Zagreb 485 pp.

Šamija M, Vrdoljak E, Krajin Z 2006. *Klinička onkologija.* Medicinska naklada, Zagreb 438 pp.

Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI. 2006. Apigenin-induced–apoptosis is mediated by the activation of PKC delta and caspases in leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* 72:681-692.

Walle UK, Walle T. 2002. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metabolism and Disposition* 30:564-659.

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *European Journal of Cancer* 35:1517-1525.

Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. 1990. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid. On epidermal ornithine decarboxylases and skin tumor promotion in mice. *Cancer Research* 50:499-502.

White E. 2006. Mechanism of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorogenesis. *Cell Death Differ* 13:1371-1377.

Winford-Thomas D. 1991. Oncogenes and anti-oncogenes; the molecular basis of tumor behavior. *J Pathol* 165:187-202.

Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. 1992. Development of Antibodies against p53 in Lung Cancer Patients Appears to Be Dependent on the Type of p53 Mutation. *Cancer Res* 52:4168-4174.

Xu Y, Xin Y, Diao Y, Lu C, Fu J, Lou L, Yin Z. 2011. Synergistic Effects of Apigenin and Paclitaxel on Apoptosis of Cancer Cells. *PLoS ONE* 6(12):e29169.

Yoshida M, Sakai T, Hosokowa N, Marui N, Matsumato K, Fujikola A, Nishino H, Aoike A. 1990. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 260:10-13.

Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. 2005. Apigenin induced apoptosis through p53-dependet pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sciences* 76:1367-1379.

Zhu Y, Mao Y, Chen H, Lin Y, Hu Z, Wu J, Xu X, Xu X, Qin J, Xie L. 2013. Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer Cell International* 13:54-60.

Web 1 - http://www.tehnologijahrane.com/tehnologijavoca-i-povrca/konzervisanje-maline-zamrzavanjem

Web 2 - http://biljke-kao-lijek.blogspot.com/2013/05/ljekovita-biljka-kamilica.html

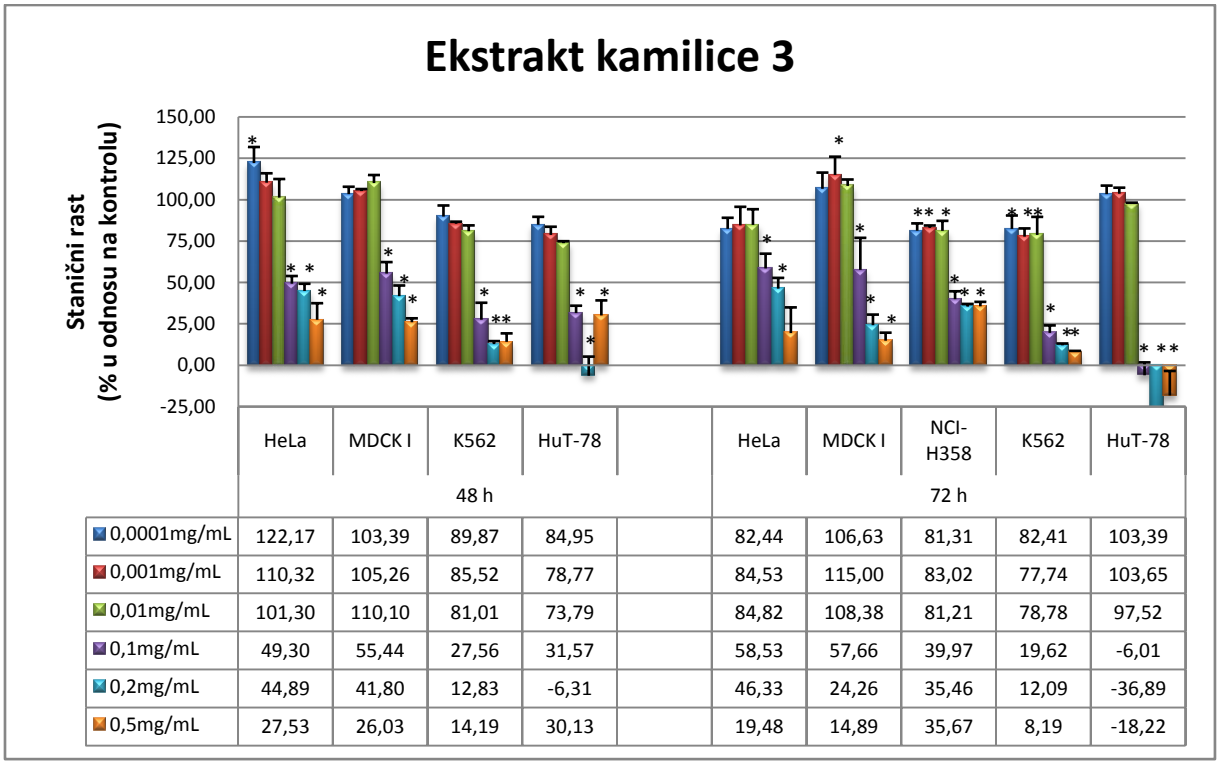
Web 3 - http://histologia.ugr.es/pdf/0471629359.pdf

Web 4 - http://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2009/08/opsta-strukturna-formula-antocijanidina.jpg

Web 5 - http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/manu779_04-a_files/image005.jpg

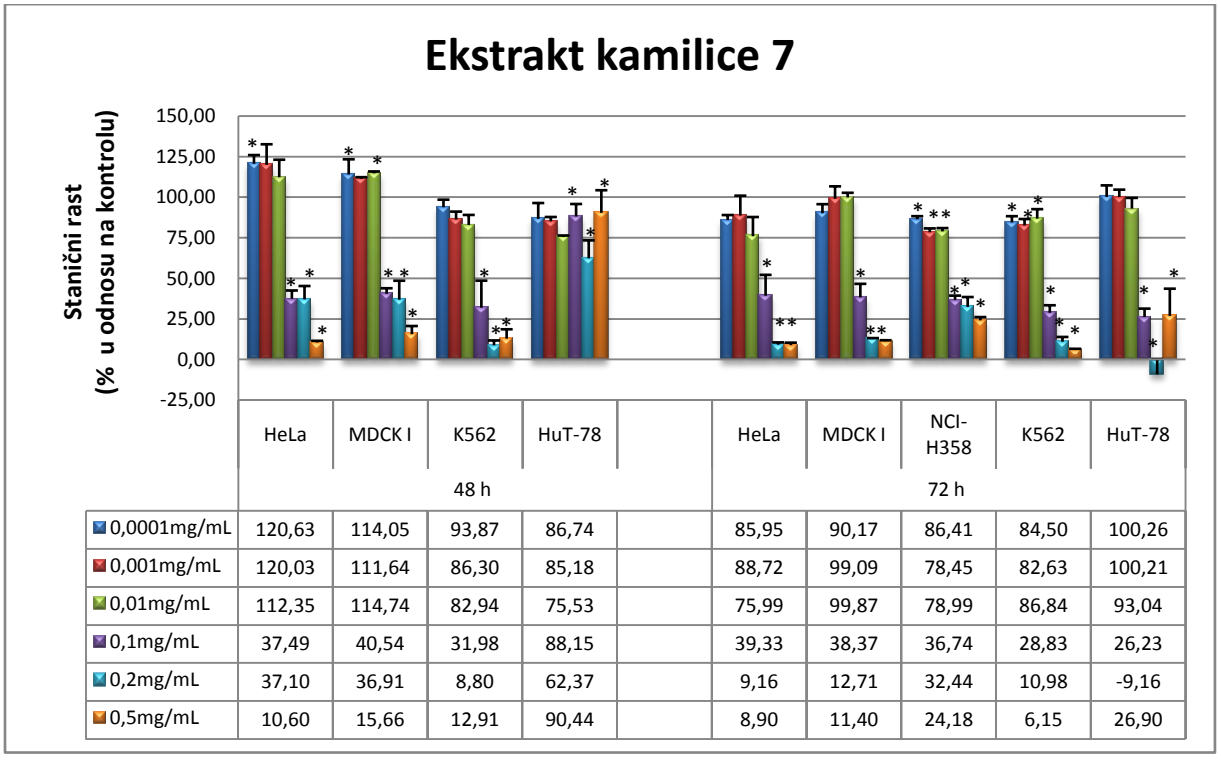
Web 6 - http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4304/e4347/index_eng.html

7. PRILOZI



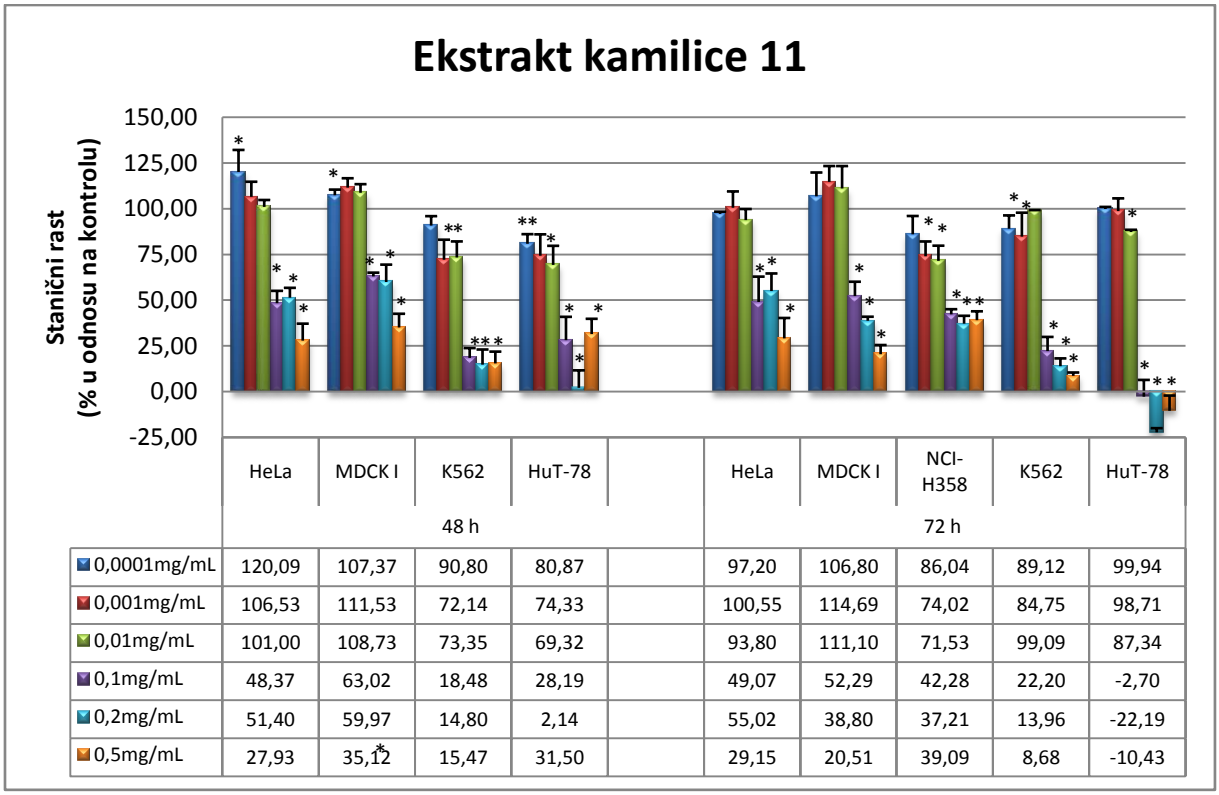
	HeLa	MDCK I	K562	HuT-78		HeLa	MDCK I	NCI-H358	K562	HuT-78
	48 h					72 h				
0,0001mg/mL	122,17	103,39	89,87	84,95		82,44	106,63	81,31	82,41	103,39
0,001mg/mL	110,32	105,26	85,52	78,77		84,53	115,00	83,02	77,74	103,65
0,01mg/mL	101,30	110,10	81,01	73,79		84,82	108,38	81,21	78,78	97,52
0,1mg/mL	49,30	55,44	27,56	31,57		58,53	57,66	39,97	19,62	-6,01
0,2mg/mL	44,89	41,80	12,83	-6,31		46,33	24,26	35,46	12,09	-36,89
0,5mg/mL	27,53	26,03	14,19	30,13		19,48	14,89	35,67	8,19	-18,22

(8a)



	HeLa	MDCK I	K562	HuT-78		HeLa	MDCK I	NCI-H358	K562	HuT-78
	48 h					72 h				
0,0001mg/mL	120,63	114,05	93,87	86,74		85,95	90,17	86,41	84,50	100,26
0,001mg/mL	120,03	111,64	86,30	85,18		88,72	99,09	78,45	82,63	100,21
0,01mg/mL	112,35	114,74	82,94	75,53		75,99	99,87	78,99	86,84	93,04
0,1mg/mL	37,49	40,54	31,98	88,15		39,33	38,37	36,74	28,83	26,23
0,2mg/mL	37,10	36,91	8,80	62,37		9,16	12,71	32,44	10,98	-9,16
0,5mg/mL	10,60	15,66	12,91	90,44		8,90	11,40	24,18	6,15	26,90

(8b)



	HeLa	MDCK I	K562	HuT-78		HeLa	MDCK I	NCI-H358	K562	HuT-78
	48 h					72 h				
0,0001mg/mL	120,09	107,37	90,80	80,87		97,20	106,80	86,04	89,12	99,94
0,001mg/mL	106,53	111,53	72,14	74,33		100,55	114,69	74,02	84,75	98,71
0,01mg/mL	101,00	108,73	73,35	69,32		93,80	111,10	71,53	99,09	87,34
0,1mg/mL	48,37	63,02	18,48	28,19		49,07	52,29	42,28	22,20	-2,70
0,2mg/mL	51,40	59,97	14,80	2,14		55,02	38,80	37,21	13,96	-22,19
0,5mg/mL	27,93	35,12	15,47	31,50		29,15	20,51	39,09	8,68	-10,43

(8c)

Slika 8. Citotoksični učinak najdjelotvornijih ekstrakata kamilice. Sve istraživane stanične linije su izložene djelovanju ekstrakata kamilice 3(8a), 7(8b) i 11(8c), kroz dva vremenska perioda (48 i 72 sata), pri koncentracijama: 0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 mg/mL. Njihov citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) označena je zvjezdicom (*).