Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost staničnih linija Hepa 1-6 I AML 12

Štefanko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:194254

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016. Ana Štefanko 722/N

UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST STANIČNIH LINIJA HEPA 1-6 I AML 12

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv.prof. dr. sc. Ivane Kmetič, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentica dr.sc. Teute Murati i Marine Miletić, mag.ing.

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Ivani Kmetič što je pristala biti mi mentoricom i time mi omogućila izradu diplomskog rada u sklopu željenog Zavoda. Veliko hvala na vođenju kroz rad, pruženom znanju i pomoći pri usavršavanju rada. Posebno zahvaljujem asistenticama dr.sc. Teuti Murati i mag.ing. Marini Miletić na suradnji, pruženom znanju, pomoći, strpljenju i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST STANIČNIH LINIJA HEPA 1-6 I AML 12

Ana Štefanko, 722/N

Sažetak: U ovom radu ispitan je učinak ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) na vijabilnost mišjih kanceroznih Hepa 1-6 i nekanceroznih AML 12 stanica tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue*. Za tretman su korištene različite koncentracije ekstrakta cvijeta trnine (za Hepa 1-6 staničnu liniju od 10 do 200 μg mL^{-1}, a za AML 12 staničnu liniju od 5 do 100 μg mL^{-1}). Utvrđeno je da ekstrakt cvijeta trnine ima statistički značajan inhibicijski učinak na proliferaciju Hepa 1-6 stanica tijekom cijelog perioda inkubacije od 72 sata pri koncentracijama većim od 100 μg mL^{-1}. Statistički značajan inhibicijski učinak i na proliferaciju AML 12 stanica, ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L. pokazao je nakon 48 sati pri koncentracijama većim od 30 μg mL^{-1} , a nakon 72 sata pri koncentracijama većim od 10 μg mL^{-1}. Iz izračunatih i uspoređenih IC_{50} vrijednosti, ekstrakt cvijeta trnine pokazao je jači inhibitorni učinak na AML 12 staničnu liniju. Istraživanje je pokazalo da ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L., u ispitivanim koncentracijama inducira nastajanje ROS-a (eng. *reactive oxygen species,* kisikove reaktivne vrste) u Hepa 1-6 stanicama, što ukazuje na prooksidacijsku aktivnost.

Ključne riječi: Hepa 1-6 stanična linija, AML 12 stanična linija, *Prunus spinosa* L., *Kenacid Blue* metoda, oksidacijski stres

Rad sadrži: 45 stranica, 13 slika, 4 tablice, 44 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič

Pomoć pri izradi: dr.sc. Teuta Murati, asistent; mag.ing. Marina Miletić, asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac
2. Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič
3. Doc.dr.sc. Kristina Radošević
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo

Datum obrane: 20. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotehnology

EFFECT OF THE EXTRACT OF A BLACKTHORN FLOWER ON VIABILITY OF HEPA 1-6 AND AML 12 CELL LINES

Ana Štefanko, 722/N

Abstract: In this study effects of the blackthorn flower (*Prunus spinosa* L.) extract on cell proliferation and viability were examited in mouse cancer Hepa 1-6 and normal AML 12 cell lines using *Kenacid Blue* method during 72 hours. Different concentrations of blackthorn flower extract were used in treatmant of cells (for Hepa 1-6 10 - 200 μg mL^{-1}, and for AML 12 5-100 μg mL^{-1}). Statisically significant decrease of Hepa 1-6 cell proliferation was detected at concentrations greather than 100 μg mL^{-1} during whole period of incubation. Blackthorn flower extract has shown statistically significant inhibitory effect on AML 12 cell proliferation, after 48 hours at concentrations greather than 30 μg mL^{-1}, and after 72 hours at concentrations greather than 10 μg mL^{-1}. According to calculated and compared IC_{50} values, blackthorn flower extract has shown stronger toxic effect on AML 12 cell line. This study has shown that *Prunus spinosa* L. extract at applied concentration range induces ROS (*reactive oxygen species*) formation in Hepa 1-6 cells, indicating prooxidant activity.

Keywords: Hepa 1-6 cell line, AML 12 cell line, *Prunus spinosa* L., *Kenacid Blue* method, oxidative stress

Thesis contains: 45 pages, 13 figures, 4 tables, 44 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ivana Kmetič, Associate Proffesor

Technical support and assistance: PhD. Teuta Murati, Scientific Assistant, BSc. Marina Miletić, Scientific Assistant

Reviewers:
1. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
2. PhD. Ivana Kmetič, Associate professor
3. PhD. Ksenija Radošević, Assistant professor
4. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor

Thesis defended: 20 July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD ... **1**

2. TEORIJSKI DIO ... **2**

2.1. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDACIJSKI STRES ... 2

2.2. ANTIOKSIDANSI ... 3

2.3. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE ... 4

2.3.1. Kemijska struktura i podjela fenolnih spojeva ... 4

2.4. TRNINA (*Prunus spinosa* L.) ... 8

2.4.1. Taksonomija vrste *Prunus spinosa* L. ... 9

2.4.2. Rasprostranjenost i upotreba trnine ... 9

2.4.3. Biološki aktivni spojevi trnine ... 10

2.5. TESTOVI TOKSIČNOSTI ... 11

2.6. KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA ... 12

2.6.1. Konačne i kontinuirane stanične linije ... 13

2.6.2. Stanične kulture u monosloju i suspenziji ... 14

2.6.3. Uzgoj životinjskih stanica ... 14

2.6.3.1. Hepa 1-6 stanična linija ... 15

2.6.3.2. AML 12 stanična linija ... 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... **17**

3.1. MATERIJAL ... 17

3.1.1. Biološki materijal ... 17

3.1.2. Kemikalije ... 17

3.1.3. Otopine i puferi ... 18

3.1.4. Oprema i uređaji ... 22

3.2. METODE RADA ... 23

3.2.1. Održavanje Hepa 1-6 i AML 12 stanica u kulturi ... 23

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue* ... 23

3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica *Kenacid Blue* metodom ... 24

3.2.4. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanica ... 24

3.2.5. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanica ... 25

3.2.6. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u Hepa 1-6 stanicama nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine ... 25

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA ... 26

4. REZULTATI I RASPRAVA ... **27**

4.1.Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanične linije određen *Kenacid Blue* metodom ... 28

4.1.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji ... 31

4.2. Produkcija ROS u Hepa 1-6 stanicama tretiranim ekstraktom cvijeta trnine ... 33

4.3. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanične linije određen metodom *Kenacid Blue* ... 36

4.3.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na AML 12 staničnoj liniji ... 37

5. ZAKLJUČCI ... **40**

6. LITERATURA ... **41**

1. UVOD

Fenolni spojevi su uobičajeni sastojci voća i povrća za koje se smatra da su glavni izvor prirodnih antioksidacijskih tvari. Već dugi niz godina, fenolne komponente se intenzivno proučavaju zbog svojeg antitumorskog, proapoptotskog i antiangiogenog djelovanja. Interes za proučavanje ekstrakata biljnih fenola proizlazi iz dokaza o njihovoj snažnoj antioksidacijskoj aktivnosti i širokom rasponu farmakoloških svojstava, uključujući antitumorsku aktivnost. Međutim, znatna raznolikost njihovih struktura utječe na njihova biološka svojstva kao što su bioraspoloživost, antioksidacijsko djelovanje, interakcije u stanici s receptorima i enzimima (Guimarães i sur., 2014).

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka čiji plodovi, cvjetovi, kora i korijen imaju ljekovita svojstva. Trnina se koristi u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti povezanih s raznim oblicima kašlja, kao blagi laksativ, diuretik, spazmolitik, ima protu-upalni i antiseptički učinak (zbog prisutnosti tanina) te smanjuje upalu sluznice probavnog sustava (Veličković i sur., 2014). Plodovi trnine su dobar izvor fenolnih komponenata, uključujući antocijane. Ti spojevi imaju jako antioksidacijsko djelovanje, koje se povezuje s antikancerogenim djelovanjem (Guimarães i sur., 2014). Kvantitativne studije su pokazale visoki sadržaj flavonoida u cvijeću trnine. Osim flavonoida, cvjetovi sadrže A-tip proantocijanidina i fenolne kiseline (Veličković i sur., 2014).

Većina potencijalnih štetnih učinaka za ljudski organizam nastaju zbog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*). Mnoge takve reaktivne vrste su slobodni radikali i imaju jedan ili više slobodnih elektrona, te su stoga nestabilni i vrlo reaktivni. Oksidacijski stres nastaje kada produkcija ROS-a prelazi prirodne antioksidacijske mehanizme, uzrokujući štetu biomolekulama kao što su lipidi, proteini i DNA. Oksidacijski stres doprinosi padu staničnih funkcija koje su povezane s razvojem mnogih bolesti uključujući Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest, aterosklerozu, makularnu degeneraciju, rak, kao i sam proces starenja. Jedan od načina sprječavanja takvih oksidacijskih oštećenja i bolesti je adekvatan unos antioksidanasa iz vanjskih izvora (Kumarasamy i sur., 2007).

Cilj ovog rada je ispitati i usporediti djelovanje ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost kanceroznih stanica jetre (Hepa 1-6) i normalnih stanica jetre (AML 12) miša metodom *Kenacid Blue* te odrediti učinak ekstrakta na formiranje ROS-a.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDACIJSKI STRES

Slobodni radikali su molekule koje imaju jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali, zbog čega su vrlo reaktivne i nestabilne. Oni uglavnom nastaju od kisika (ROS - eng. *reactive oxygen species* - reaktivne kisikove vrste) i dušika (RNS - eng. *reactive nitrogen species* - reaktivne dušikove vrste) i u tijelu se stvaraju od strane endogenih sustava, te uslijed izloženosti različitim fizikalno-kemijskim uvjetima ili patofiziološkim stanjima (Devasagayam i sur., 2004). Važne reaktivne kisikove i dušikove vrste prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Reaktivne kisikove (ROS) i reaktivne dušikove (RNS) vrste (Devasagayam i sur., 2004).

ROS	
superoksid radikal	O_2•
hidroksil-radikal	OH•
peroksil-radikal	ROO•
vodikov peroksid	H_2O_2
organski peroksid	ROOH
singletni kisik	O_2
ozon	O_3
RNS	
dušikov oksid	NO•
peroksinitrit	ONOO-
peroksinitritna kiselina	ONOOH
dušikov dioksid	NO_2

Produkcija ROS-a i RNS-a u stanicama pomaže održavanju homeostaze na staničnoj razini te imaju važnu ulogu kao signalne molekule (Valko i sur., 2006). Većina stanica proizvodi superoksid radikal, vodikov peroksid te nitritne okside. Treba naglasiti važnu ulogu slobodnih radikala u proizvodnji ATP-a iz ADP-a u mitohondrijima u procesu oksidativne fosforilacije, u detoksikaciji ksenobiotika citokromom P450, apoptozi stanica, ubijanju mikroorganizama i tumorskih stanica makrofazima i citotoksičnim limfocitima, u proizvodnji prostaglandina i leukotriena koji imaju mnoge regulatorne funkcije (Devasagayam i sur., 2004).

Kada dolazi do izlaganja nepovoljnim fiziološko-okolišnim uvjetima kao što su atmosferski zagađivači, pušenje, UV zračenje te kemikalije, ravnoteža se pomiče u korist prooksidacije što rezultira oksidacijskim stresom (Devasagayam i sur., 2004). Indukcija oksidacijskog stresa i oštećenja stanica uočena je uslijed izlaganja različitim ksenobioticima (Valko i sur., 2006). Oksidacijskim stresom inducirana apoptoza uključuje degradaciju mitohondrijskih polinukleotida (DNA i RNA) (Cadenas i Davies, 2000). Lipidi su skloni oštećenju slobodnim radikalima što rezultira lipidnom peroksidacijom, dok oštećenja proteina slobodnim radikalima mogu rezultirati gubitkom enzimske aktivnosti, a oštećenja na DNA mogu dovesti do mutageneze i karcinogeneze (Devasagayam i sur., 2004).

Oksidacijski stres doprinosi padu staničnih funkcija koje su povezane s mnogim bolestima uključujući Alzheimerovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu, Parkinsonovu bolest, aterosklerozu, ishemijsko-neuronske ozljede, degenerativnu bolest temporomandibularnog zgloba, tvorbu mrene, makularnu degeneraciju, degenerativna oštećenja retine, reumatoidni artritis, multiplu sklerozu, rak, kao i sam proces starenja (Kumarasamy i sur., 2007).

2.2. ANTIOKSIDANSI

Antioksidacijski obrambeni sustav u većini stanica se sastoji od dvije komponente: antioksidacijskih enzima - komponente koja uključuje enzime superoksid dismutazu, katalazu i glutation peroksidazu te antioksidanasa niske molekulske mase koji uključuju vitamine A i E, askorbat te glutation i tioredoksin. Te tvari su obrana organizma protiv endogeno generiranih ROS-a i ostalih slobodnih radikala, kao i ROS-a generiranih vanjskim okolišnim čimbenicima (Kumarasamy i sur., 2007). Vitamini A, C i E, kao i polifenoli sadržani u voću imaju antioksidacijske značajke i mogu igrati važnu ulogu u sprječavanju raznih bolesti (Jabłońska-Ryś i sur., 2009; Morales i sur., 2013).

Ljekovito bilje je poznato kao važan izvor različitih prirodnih antioksidanasa. Velik je interes za antioksidacijske učinke biljnih komponenata, poznatijih kao fitokemikalije, koje bi mogle biti relevantne s obzirom na njihovu nutritivnu učestalost i njihovu ulogu u zdravlju i bolesti (Kumarasamy i sur., 2007). Mnogi, nedovoljno iskorišteni divlji plodovi samoniklog bilja imaju velik nutritivni i funkcionalni potencijal jer sadrže komponente s biološkim svojstvima.

Antioksidansi iz hrane koriste se za prevenciju negativnih učinaka slobodnih radikala u ljudskom tijelu, što može dovesti do smanjenja rizika od kroničnih bolesti.

Prehrambena industrija uvelike koristi antioksidanse kako bi produžili trajnost proizvoda. Trenutno, prirodni antioksidansi zbog svojih ograničenih izvora i visoke cijene nisu u široj upotrebi u prehrambenoj industriji te se većinom koriste sintetički antioksidansi. Ipak, mogućnost novih izvora za sigurne i jeftine antioksidanse prirodnog podrijetla može biti dobra strategija prehrambenoj i farmaceutskoj industriji za zamjenu sintetičkih antioksidanasa, izbjegavajući potencijalne zdravstvene rizike i toksičnost (Ruiz-Rodriges i sur., 2013).

2.3. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti, derivati puta pentoza fosfata, šikimata i fenilpropanoid puta u biljkama (Balasundram i sur., 2006). Imaju važnu ulogu u biljkama kao signalne molekule i uloge u procesima kao što su UV-zaštita, obrana od predatora i patogena te razmnožavanje biljaka (Balasundram i sur., 2006; Grotewold, 2006).

Mnoge fenolne fitokemikalije imaju antioksidacijsko, antikancerogeno, antimikrobno, antimutageno i protuupalno djelovanje (Kim i sur., 2003). Epidemiološke studije su pokazale da je prehrambeni unos flavonoida i fenolnih kiselina inverzno povezan s kasnijim koronarnim bolestima srca (Rupasinghe i sur., 2006).

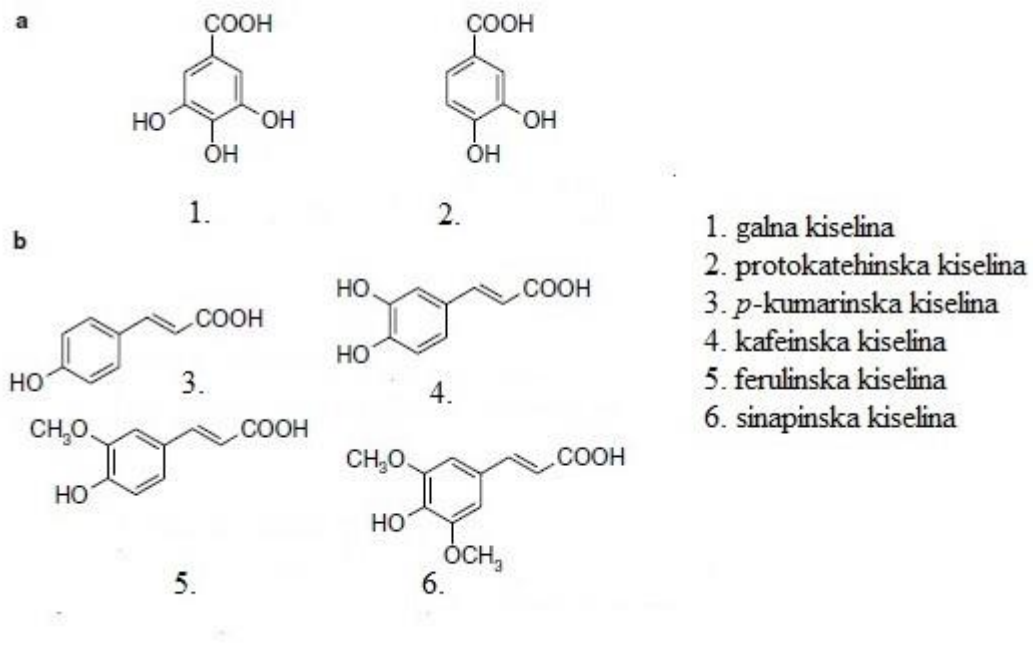
Fenolni spojevi imaju antioksidacijsku aktivnost zbog sposobnosti vezanja slobodnih radikala; doniraju vodikov atom ili elektron, ili keliraju metalne katione (Rice-Evans i sur., 1996), aktiviraju antioksidacijske enzime, reduciraju α-tokoferol radikale, inhibiraju oksidaze (Grotewold, 2006). Antioksidacijska aktivnost ovisi o strukturi fenolnih spojeva (Balasundram i sur., 2006), posebno o hidroksilnim grupama koje su vezane za aromatske prstene (Guimarães i sur., 2014).

2.3.1. Kemijska struktura i podjela fenolnih spojeva

Strukturno, fenolni spojevi sadrže aromatski prsten na koji je vezan jedan ili više hidroksilnih supstituenata, te su u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do vrlo polimeriziranih spojeva. Većina prirodno prisutnih fenolnih spojeva prisutni su kao konjugati mono- i polisaharida, te se mogu pojaviti kao funkcionalni derivati kao što su esteri i metil-esteri (Balasundram i sur., 2006). Šećeri vezani na fenole su glukoza, arabinoza, ksiloza, ramnoza i galaktoza (Kim i sur., 2003). Prema kemijskoj strukturi, dijele se na nekoliko skupina, a najznačajnije su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini (Balasundram i sur., 2006).

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline dijele se u dvije podgrupe - hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu kiselinu, *p*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku, vanilinsku i siringinsku kiselinu, koje imaju C_6-C_1 strukturu. Hidroksicimetne kiseline su aromatski spojevi s bočnim lancem od 3 ugljika. Najčešći predstavnici te skupine su kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina (Balasundram i sur., 2006). Na Slici 1 su prikazani neki od predstavnika fenolnih kiselina.



Slika 1. Primjeri hidroksibenzojevih (a) i hidroksicimetnih (b) kiselina (prema Balasundram i sur., 2006)

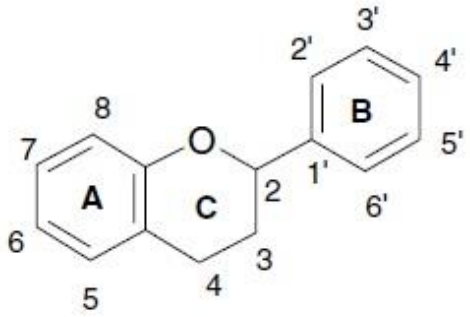
Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju –OH skupina u odnosu na karboksilne skupine. Monohidroksibenzojeve kiseline s –OH skupinom u –*ortho* ili –*para* položaju u odnosu na karboksilnu skupinu ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost, za razliku od monohidroksibenzojevih kiselina kod kojih se –OH skupina nalazi u *meta* položaju (Balasundram i sur., 2006).

Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina povećava se sa stupnjem hidroksilacije; npr. trihidroksilirana galna kiselina pokazuje visoku antioksidacijsku aktivnost. Supstitucija hidroksilnih grupa na 3- i 5- položaju s metoksilnim smanjuje antioksidacijsku aktivnost (Balasundram i sur., 2006).

Hidroksicimetne kiseline pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na hidroksibenzojeve.

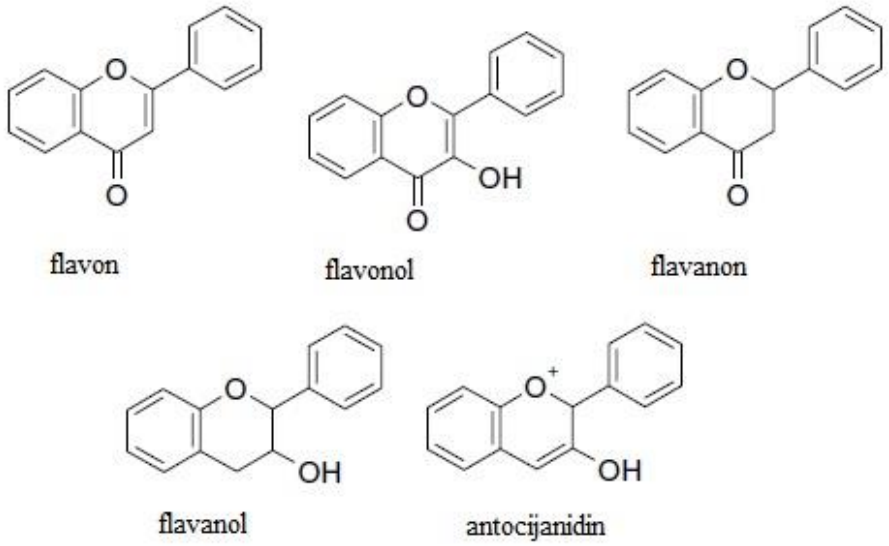
Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu biljnih fenolnih spojeva. To su molekule male molekulske mase, sastoje se od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u C_6-C_3-C_6 strukturu (Aherne i O'Brien, 2002). Struktura sadrži dva aromatska prstena, A i B, povezana 3-karbonskim mostom, najčešće u formi heterocikličkog prstena, C (Balasundram i sur., 2006). Osnovna struktura flavonoida prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Osnovna struktura molekule flavonoida (Balasundram i sur., 2006)

Ovisno o supstituentima na prstenu C, flavonoidi se dijele na brojne podskupine: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli (katehini), izoflavoni, flavanonoli i antocijanidini. Osnovne strukture najvažnijih podskupina flavonoida prikazane su na Slici 3. U flavonole se ubrajaju kvercetin i miricetin, a katehin i epikatehin pripadaju skupini flavan-3-ola. Supstitucija na prstenovima A i B dovodi do različitih spojeva unutar svake grupe flavonoida. Te supstitucije mogu uključivati oksidaciju, alkilaciju, glikozilaciju, acilaciju i sulfataciju (Balasundram i sur., 2006).



Slika 3. Osnovne strukture molekula flavonoida (prema Balasundram i sur., 2006)

Neke strukturne značajke koje određuju antioksidacijsko djelovanje flavonoida uključuju (Balasundram i sur., 2006):

1. stupanj hidroksilacije i položaj –OH skupina u prstenu B: antioksidacijsko djelovanje se povećava brojem –OH skupina;

2. prisutnost hidroksilnih skupina na 3'-, 4'- i 5'- položaju u prstenu B povećava antioksidacijsku aktivnost;

3. dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma u kombinaciji s 4-okso skupinom u C prstenu povećava sposobnost vezanja slobodnih radikala;

4. dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma u kombinaciji s 3-OH skupinom u prstenu C povećava antioksidacijsku aktivnost što je slučaj kod npr. kamferola;

5. supstitucija hidroksilnih grupa metoksilnim u prstenu B smanjuje sposobnost vezanja slobodnih radikala.

Tanini

Tanini čine treću važnu skupinu fenola. To su spojevi relativno visoke molekulske mase, a dijele se na hidrolizirane i kondenzirane tanine. Hidrolizirani tanini su esteri galne kiseline, dok su kondenzirani tanini (proantocijanidini) polimeri polihidroksiflavan-3-ol monomera. Treća skupina tanina su florotanini, koji se sastoje od fluoroglucinola. Florotanini

su izolirani iz nekoliko redova smeđih algi te nisu značajni u ljudskoj prehrani (Balasundram i sur., 2006).

2.4. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je listopadni veliki grm ili malo stablo (Slika 4), koje raste do pet metara u visinu (Radovanović i sur., 2013). Pripada istom rodu (*Prunus*) kao bademi, trešnje i šljive. *Spinosa* u nazivu opisuje oštre bodlje ili trnje koje je karakteristično za ovu biljku (KEW, 2016). Mlade grane su smeđe ili crvenkaste boje s trnjem. Listovi ove biljke su eliptični, dugi 2-4 cm, mladi mekano dlakavi (Glenčir i Glenčir, 1991), a cvjetovi bijeli, promjera 1,5 cm, s 5 latica i 5 lapova (Slika 5). Cvjetovi se na proljeće obično pojavljuju prije lišća, što pomaže razlikovati trninu od drugih bijelih grmova koji cvatu na proljeće kao što je npr. glog (*Crataegus monogyana*) (KEW, 2016). Vrijeme cvatnje trnine je od ožujka do travnja (Glenčir i Glenčir, 1991).



Slika 4. Grm trnine u cvatu (Anonymous, 2016)



Slika 5. Cvijet trnine (KEW, 2016)

Plodovi trnine (Slika 6) su tamnoplavi/ljubičasti (KEW, 2016), veličine 20 mm, kiseli i vrlo gorki (Erturk i sur., 2009).



Slika 6. Plodovi trnine (KEW, 2016)

2.4.1. Taksonomija vrste *Prunus spinosa* L.

Taksonomija vrste *Prunus spinosa* L. prikazana je u Tablici 2 (ITIS, 2016).

Tablica 2. Taksonomija vrste *Prunus spinosa* L. (ITIS, 2016)

Carstvo	Plantae
Odjeljak	Tracheophyta
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	Rosanae
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Rod	*Prunus* L.
Vrsta	*Prunus spinosa* L.

2.4.2. Rasprostranjenost i upotreba trnine

Trnina je višegodišnja biljka koja raste kao grm na obroncima neobrađenih površina, na skloništima od vjetra. Raste u umjerenoj kontinentalnoj klimi (Veličković i sur., 2014). *Prunus spinosa* L. je prirodno prisutna u Europi, zapadnoj Aziji i sjeverozapadnoj Africi (Radovanović i sur., 2013), autohtona je biljka u Južnoj Europi, Turskoj i Armeniji (Erturk i sur., 2009).

Sušeno cvijeće i plodovi trnine su važni u narodnoj medicini, dok se osušeni listovi koriste za pripremu čaja (Erturk i sur., 2009). Trnina (*Prunus spinosa* L.) se najčešće koristi u prehrambenoj industriji i fitoterapiji. Plodovi, cvjetovi, kora i korijen te biljke imaju ljekovita svojstva. Trnina se koristi u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti povezanih s raznim oblicima kašlja, kao blagi laksativ, diuretik, spazmolitik, ima protu-upalni i antiseptički učinak (zbog prisutnosti tanina), smanjuje upalu sluznice probavnog sustava. Osim u fitoterapiji, koristi se u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova i raznih napitaka poput likera, vina, sokova, kompota i čaja (Veličković i sur., 2014). Komponenta pektina iz biljke ima opuštajuće i umirujuće djelovanje na upalu želuca. Biljni čaj se može upotrijebiti kao blagi laksativ u liječenju konstipacije. Plodovi trnine se mogu koristiti za stimulaciju metabolizma, korisni su kod ekcema, herpesa, alergija, prehlade, probavnih smetnji, bubrežnih kamenaca, poremećaja kože i mokraćnog mjehura (Radovanović i sur., 2013). Plod trnine ima anti-inflamatorno i antibakterijsko djelovanje (Olszewska i sur., 2001).

2.4.3. Biološki aktivni spojevi trnine

Jedna od najzastupljenijih skupina bioaktivnih spojeva trnine su flavonoidi. Cvjetovi i listovi trnine sadrže kompleks flavonoida, derivate flavonola: kvercetin, kamferol i njihove glikozide s arabinozom, ramnozom i ksilozom. Studija provedena na odjelu za farmakognoziju medicinskog fakulteta u Łódźu potvrdila je prisutnost kamferola, kvercetina i njihovih heterozida u cvjetovima i listovima trnine. U cvjetovima, flavonoidi su prisutni većinom u formi monoglikozida, uglavnom kamferol i kvecertin 3-*O*-arabinozida (Olszewska i sur., 2001).

U istraživanju provedenom 2001. godine Olszewska i Wolbis izolirali su iz cvjetova trnine sljedeće flavonoide: kamferol, kvercetin, kamferol-3-*O*-α-L-arabinofuranozid, kvercetin 3-*O*-α-L-arabinofuranozid, kvercetin 3-*O*-α-D-ksilopiranozid, kamferol 3-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 7-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 3-*O*-β-D-ksilopiranozid, kamferol 3-*O*-(2"-E-p-kumaroil)-α-L-arabinofuranozid. Osim flavonoida, u cvijeću trnine potvrđena je prisutnost proantocijanidina tipa A i fenolnih kiselina (Olszewska i Wolbis, 2001). U istraživanju kojeg su isti znanstvenici proveli 2002. godine, iz cvjetova trnine izolirano je još 7 flavonoida: kamferol 3,7-di-*O*-α-L ramnopiranozid (kapferitrin), kvercetin 3-*O*-α-L ramnopiranozid (kvercitrin), kamferol 3-*O*-(4"-β-D-glukopiranozil)-α-L-ramnopiranozid (multiflorin B), kvercetin 3-*O*-(4"-β-D-glukopiranozil)-α-L-ramnopiranozid (multinozid A), kvercetin 3-*O*-β-D-glukopiranozid (izokvercitrin), kvercetin 3-*O*-α-L-arabinopiranozid (guaijaverin), kvercetin 3-*O*-α-D-ksilopiranozid (reinoutrin) (Olszewska i Wolbis, 2002).

Cvjetovi *Prunus spinosa* L. sadrže cijanogene glikozide koji se istražuju kao blagi laksativi i diuretici. U cvjetovima biljke sadržani su i flavonoidi rutin i hiperozid (Veličković i sur., 2014).

Plodovi trnine su dobar izvor fenolnih komponenata, uključujući antocijane (Guimarães i sur., 2014). Dominantni flavan-3-oli su procijanidin B2, katehin i epikatehin (Radovanović i sur., 2013). Veličković i suradnici 2014. godine odredili su fenolni sastav te antimikrobnu i antibakterijsku aktivnost plodova trnine. Fenolne kiseline (neoklorogenska i kafeinska kiselina), flavonoidi (kvercetin i miricetin) i antocijani (cijanidin-3-*O*-glikozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid i peonidin-3-*O*-glikozid) su identificirani u ispitivanim ekstraktima HPLC analizom (Veličković i sur., 2014). Koštice *Prunus spinosa* L. su otrovne jer sadrže toksični glikozid amigdalin koji sadrži cijanovodik (Glenčir i Glenčir, 1991; Veličković i sur., 2014). Ekstrakti svježeg ploda pokazuju visok sadržaj fenolnih spojeva i visoku antioksidacijsku aktivnost, pa se mogu koristiti kao antioksidansi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Veličković i sur., 2014).

2.5. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Toksičnost označava štetan učinak koji neka supstanca može imati na organizam, a kao posljedica toksičnog djelovanja mogu nastati direktna stanična oštećenja te strukturni i funkcionalni poremećaji na razini tkiva, organa i organskih sustava. Ispitivanja toksičnosti se mogu provoditi *in vitro* i *in vivo* ekperimentima (Kniewald i sur., 2005).

Klasičnim (*in vivo*) testovima toksičnosti istražuje se akutna (jedna doza), subakutna (ponavljanje doze do jednog mjeseca) i kronična toksičnost (ponavljanje doze od 3 mjeseca do dvije godine). Sve širu primjenu nalaze alternativni (*in vitro*) testovi. Takvi testovi podrazumijevaju primjenu različitih sustava poput staničnih frakcija, staničnih linija, primarnih staničnih kultura te dijelove tkiva i kulture organa (Atterwill, 1995).

In vitro sustavi važni su za istraživanja molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama, dok *in vivo* studije toksičnosti ne mogu dati te odgovore (Kniewald i sur., 2005). *In vitro* testovi toksičnosti imaju brojne prednosti u odnosu na *in vivo* testove. Osiguravaju brz i učinkovit način za „screening“ i rangiranje kemikalija po toksičnosti, korisni su za razumijevanje opasnih utjecaja kemikalija na staničnom i molekularnom nivou, omogućuju proučavanje veza između strukture ispitivanog spoja i njegovog mehanizma djelovanja na staničnoj razini (Eisenbrand i sur., 2002). Također,

imaju visok stupanj standardizacije i reproducibilnosti, rezultati su dostupni u relativno kratkom vremenu, niža im je cijena i smanjuju upotrebu pokusnih životinja (Kniewald i sur., 2005). *In vitro* testovi su potrebni za definiranje raspona koncentracija tvari za daljnja i detaljna *in vitro* testiranja kako bi se dobile značajne informacije o parametrima kao što su genotoksičnost, indukcija mutacija ili programirana smrt stanica (Eisenbrand i sur., 2002). Većina eksperimenata provedena *in vitro* ima za cilj odrediti potencijalnu citotoksičnost i specifične intracelularne mehanizme djelovanja spojeva koji se ispituju iz razloga njihove potencijalne upotrebe, najčešće u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji. Različiti lijekovi, kozmetički preparati, prehrambeni aditivi i slično prolaze kroz opsežna ispitivanja toksičnosti prije nego budu pušteni u upotrebu (Kniewald i sur., 2005).

Uz prednosti, postoje i neki nedostaci *in vitro* testova toksičnosti. Ispitivana tvar može utjecati na sastav medija za uzgoj, te može doći do promjene pH i krivih rezultata, ispitivana tvar može reagirati sa sastojcima medija za uzgoj i onemogućiti pritok hranjivih tvari u stanicu (Atterwill,1995). Neke netoksične tvari postaju toksične nakon što su metabolizirane u jetri, dok brojnim tvarima koje pokazuju toksičnost *in vitro* to svojstvo može biti uklonjeno djelovanjem jetrenih enzima (Freshney, 2005). Stoga *se in vitro* testovi npr. na kulturama stanica provode kao predtestovi onima *in vivo*.

MTT, Kenacid Blue, Neutral Red i Crystal Violet su dobro poznate boje koje se koriste u analizama kod kojih razvijena boja predstavlja odgovor o vijabilnosti stanica, omogućujući tako kolorimetrijsko mjerenje stanične vijabilnosti (Ishiyama i sur., 1996).

2.6. KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kulture životinjskih stanica mogu se uzgajati *in vitro* u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, a koriste se za istraživanja u staničnoj biologiji ili kao postupak za razvoj proizvoda od komercijalnog interesa (McGlinchey, 2007).

Kulture životinjskih stanica najčešći su *in vitro* model za praćenje mehanizama toksičnih učinaka ispitivanih spojeva (Freshney, 2005). Velika upotreba staničnih kultura započela je 50-ih godina prošlog stoljeća, nakon što je Dulbecco uspio izolirati stanice iz tkiva pomoću tripsina i time omogućio kultivaciju monoslojnih kultura stanica. Stanične kulture se mogu uzgajati u selektivnom mediju, mogu se razmnožavati i dijeliti na identične replike te se očuvati zamrzavanjem. Razlikujemo primarne kulture životinjskih stanica i stanične linije (konačne i kontinuirane). Primarne kulture stanica imaju limitiran životni vijek, dok su

kontinuirane stanične linije često transformirane i mogu se „neograničeno“ uzgajati (Wolf, 2010). Prednost korištenja animalnih staničnih linija je u tome što su manje podložne oštećenjima od humanih te što su izvorna tkiva dostupnija (Freshney, 2005).

Kultura stanica izolirana izravno iz određenog tkiva ili organa naziva se primarnom kulturom sve dok se ne postignu svojstva stanične linije. Stanična linija nastaje subkultivacijom primarnih kultura stanica (Freshney, 2005).

2.6.1. Konačne i kontinuirane stanične linije

Stanična linija može biti konačna ili kontinuirana. Konačne stanične linije imaju ograničen broj dioba. Formiraju se nakon prve subkultivacije primarne kulture te za razliku od kontinuiranih staničnih linija imaju ograničen životni vijek (20-80 dioba prije nego što dođe do odumiranja). Točan broj dioba stanica ovisi o vrsti i različitosti staničnih linija, a konstantan je za svaku pojedinu vrstu stanične linije u jednakim uvjetima uzgoja (Hartung i sur., 2002; Freshney, 2005). *In vitro* transformacijom iz konačnih staničnih linija dobivaju se kontinuirane stanične linije. Transformacijom iz konačnih u kontinuirane stanične linije dobiva se biološki materijal za dugotrajnu upotrebu, međutim, može doći do gubitka specijaliziranih staničnih funkcija (Freshney, 2005).

Neke karakteristike kontinuiranih staničnih linija, koje ih razlikuju od konačnih su promijenjena morfologija, veći stupanj rasta, sposobnost da osim u monosloju rastu i u suspenziji, manja potreba za serumom, veća sposobnost kloniranja te neograničen životni vijek.

Stanice prolaze kroz nekoliko faza rasta. Prva faza se naziva lag faza i u njoj ne dolazi do povećanja broja stanica. Duljina ove faze ovisi o početnoj koncentraciji i stanju stanica, te sastavu medija za uzgoj. Nakon nje slijedi eksponencijalna faza rasta koja se naziva i log faza, a u njoj stanice prolaze kroz stanični ciklus. Sljedeća faza je stacionarna faza u kojoj nema porasta u biomasi stanica. U ovoj fazi brzina rasta stanica jednaka je brzini njihovog odumiranja. Zadnja faza je faza odumiranja u kojoj dolazi do smanjenja broja živih stanica (Butler, 2004).

2.6.2. Stanične kulture u monosloju i suspenziji

Stanične kulture mogu rasti u monosloju (pričvršćene za površinu) ili u suspenziji (slobodne u mediju i serumu). Prednosti uzgoja stanica u suspenziji su u tome što je proces umnožavanja puno brži, ne dolazi do kontaktne inhibicije, nije potrebna česta zamjena medija, nije potreban tretman tripsinom, prijenos kulture u veće mjerilo je puno jednostavniji (Freshney, 2005).

Upotrebom monoslojnih kultura može se jednostavno i prikladno testirati mnoge tvari čak i kada je broj stanica malen. Kod monoslojnih stanica jednostavnija je opskrba stanica nutrijentima te se uklanjanje otpadnih tvari u mediju provodi vrlo efikasno (Yuichi i sur., 1993). Prednosti uzgoja stanica u monosloju su lakša promjena medija i mogućnost ispiranja stanica od neželjenih tvari, jednostavnija perfuzija zbog imobiliziranosti stanica, učinkovitije izlučivanje produkata (Freshney, 2005).

2.6.3. Uzgoj životinjskih stanica

Kulture životinjskih stanica uzgajaju se u aseptičkim uvjetima, kako bi se spriječio kontakt s vanjskim kontaminantima koji bi mogli narušiti rast stanica te u konačnici dovesti do njihovog odumiranja. Aseptički uvjeti se osiguravaju radom u komori za rad u sterilnim uvjetima, a preparati i radna površina se moraju redovito čistiti 70 %-tnim etanolom.

In vitro sustavi nastoje oponašati one *in vivo*, pa se pažljivo mora odabrati sastav medija za uzgoj stanica, kao i njegov pH, optimalna temperatura te parcijalni tlakovi O_2 i CO_2 (Freshney, 2005).

Ovisno o staničnoj kulturi koju uzgajamo ovisi i odabir medija, koji ima točno definiran sastav. Koncentracije svih sastojaka moraju biti točno definirane i podešene. Medij za uzgoj strogo je definiranog sastava, a sadrži ugljikohidrate (glukoza je glavni izvor energije u mediju), organske sastojke (masne kiseline, lipide, proteine, peptide...), anorganske soli (koje osiguravaju osmotsku ravnotežu), esencijalne i neesencijalne aminokiseline (potrebe za pojedinim aminokiselinama ovise o vrsti stanica), vitamine i elemente u tragovima (Alberts i sur., 2002; Freshney, 2005).

Kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast i razmnožavanje stanica u mediju za uzgoj potrebna je i prisutnost seruma, u količini od 5-20 %. Sadržaj seruma ovisi o tipu stanica, a sadrži faktore rasta, proteine (albumin, transferin, fibronektin, globulini), hormone

(hidrokortizon, inzulin, tiroksin, trijodotironin), vitamine, različite hranjive tvari (glukoza, aminokiseline, poliamini), lipide (kolesterol, masne kiseline, fosfolipidi, linolenska kiselina), minerale (kalcij, željezo, kalij, kloridi, selen, natrij, cink, fosfat) i inhibitore pojedinih enzima (npr. proteaza). Najviše se koriste fetalni teleći, konjski i goveđi serum. Upotreba seruma ima i neke negativne strane, a među njima je i povećani rizik od kontaminacije stanica različitim mikroorganizmima (Freshney, 2005).

Optimalna temperatura za uzgoj stanica ovisi o temperaturi izvornog organizma čije se stanice koriste za uzgoj, kao i o anatomskim varijacijama temperature. Preporučena temperatura za uzgoj staničnih linija toplokrvnih životinja je 37 °C. Optimalni pH za rast većine stanica je 7,4. Većina stanica prestaje rasti kad se pH spusti na 6,5, a stanice gube sposobnost za život između pH vrijednosti 6,5 i 6,0. Optimalna atmosfera za rast stanica sadrži 95 % zraka i 5 % CO_2 i osigurava se uzgojem stanica u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (Freshney, 2005).

Izmjena medija za uzgoj stanica potrebna je iz razloga što se s vremenom pojedine komponente medija iscrpe ili spontano raspadnu. Manjak hranjivih tvari iz medija za uzgoj može uzrokovati apoptozu stanica (Freshney, 2005).

Vrijeme za subkultivaciju stanične linije u monosloju određuje se prema nekoliko kriterija: gustoći stanične kulture, iskorištenosti medija za uzgoj stanica, vremenu od zadnje subkultivacije te fazi rasta u kojoj se stanice nalaze. Stanice ne bi trebalo subkultivirati kad se nalaze u lag fazi, već između eksponencijalne i stacionarne faze rasta (Freshney, 2005).

2.6.3.1. Hepa 1-6 stanična linija

Hepa 1-6 stanična linija, kancerozna jetrena stanična linija, izolirana je od BW7756 hepatoma koji je nastao u C57/L miša (*Mus musculus).* Linija je pogodna za transfekciju domaćina. Morfologija ovih stanica je epitelna, a stanice rastu u monosloju, pa prilikom rasta Hepa 1-6 stanica dolazi do kontaktne inhibicije, što znači da je rast ograničen površinom za prihvaćanje. Tijekom subkultivacije stanice se podvrgavaju tretmanu tripsinom kako bi se odvojile od površine na kojoj rastu. Stanični produkti ove linije su α-fetoprotein (AFP), albumin, α 1 antitripsin, amilaze (ATCC, 2014a).

Stanice su okarakterizirane svojim kariotipom i zadržavanjem specifičnih svojstava jetre. Aktivnost specifičnih jetrenih enzima prisutna je u ovim stanicama (Darlington i sur., 1980).

Uvjeti uzgoja Hepa 1-6 stanične linije su modificirana atmosfera s 95 % zraka i 5 % CO_2, pri temperaturi od 37 ^oC. Medij za uzgoj ove stanične linije je Dulbecco modificirani Eagel-ov medij uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (ATCC, 2014a).

2.6.3.2. AML 12 stanična linija

AML 12 stanična linija izolirana je iz hepatocita zdrave jetre mužjaka miša (*Mus musculus*), starog tri mjeseca, CD1 soja i linije MT G2. Linija je pogodna za transfekciju domaćina. Stanice rastu u monosloju, pa prilikom rasta dolazi do kontaktne inhibicije. Tijekom subkultivacije stanice se podvrgavaju tretmanu tripsinom kako bi se odvojile od površine na kojoj rastu. Morfologija ovih stanica je epitelna. Promatrane elektronskim mikroskopom, stanice pokazuju tipične značajke hepatocita kao što su peroksisom i žučni kanalić (ATCC, 2014b).

Stanični produkti AML 12 stanične linije su albumin, faktor nekroze tumora α (TGF-α), mišji TGF-α. Stanice izražavaju visoku razinu ekspresije ljudskog TGF-α i niže razine mišjeg TGF-α (ATCC, 2014b; Wu i sur., 1994). Ekspresija jetrenih specifičnih proteina smanjuje se s vremenom u kulturi, ali se ponovno aktivira uzgojem stanica u mediju bez seruma.

Uvjeti uzgoja AML 12 stanične linije su modificirana atmosfera s 95 % zraka i 5 % CO_2, pri temperaturi od 37 ^oC. Osnovni medij za uzgoj ove stanične linije je 1:1 mješavina Dulbecco modificiranog Eagel-ov medija i Ham-ovog F12 medija, s dodatkom 0.005 mg/mL inzulina, 0.005 mg/mL transferina, 5 ng/mL selena i 40 ng/mL deksametazona. Osnovnom mediju se dodaje 10 % fetalnog goveđeg seruma (ATCC, 2014b).

Ova diferencirana, netumorska stanična linija služi u modelima koji proučavaju rast i diferencijaciju hepatocita (Wu i sur., 1994).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena stanična linija Hepa 1-6 izolirana od BW7756 hepatoma koji je nastao u C57/L miša (*Mus musculus)* i stanična linija AML 12 izolirana iz hepatocita zdrave jetre miša. Obje stanične linije rastu u monosloju (ATCC, 2014a; ATCC, 2014b).

Korišten je etanolni ekstrakt cvijeta trnine izvorne koncentracije 200 $\mu g\ mL^{-1}$

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

- Dulbecco's MEM/F12, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- Dulbecco's Modifield Eagle's Medium (DMEM), ATCC, Manassas, VA, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS-serum goveđeg fetusa), GIBCO, SAD
- inzulin-transferin-natrij-selenit suplement, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- dekasmetazon, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- boja *Coomassie Brilliant Blue* R-250, LKB, Bromma, Švedska
- apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje
- DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
- natrijev klorid, Kemika, Zagreb
- kalijev klorid, Kemika, Zagreb
- dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- kalijev acetat, Kemika, Zagreb
- destilirana voda (dH_2O)
- DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit (ab113851, kit za detekciju ROS-a), Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F-12 (GIBCO) - sastav:

Sastojci:	**Koncentracija (mg L^{-1})**
Aminokiseline:	
Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin × H_2O	7,45
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid × H_2O	17,56
L-Cistein 2HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid × H_2O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,35
L-Metionin	17,24
L-Fenilalanin	35,48
L-Prolin	17,25
L-Serin	26,25
L-Treonin	53,45
L-Triprofan	9,02
L-Tirozin	55,79
L-Valin	25,85
Vitamini:	
Biotin	0,0035
Kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
Folna kiselina	2,02

Niacinamid (nikotinamid)	2
Piridoksin hidroklorid	0,219
Riboflavin	2,17
Tiamin hidroklorid	0,68
Vitamin B_{12}	0,68
ı-inozitol	12,61

anorganske soli:

$CaCl_2$	116,6
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0013
$Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$	0,05
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,417
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	61
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	100
KCl	100
$NaHCO_3$	311,8
NaCl	1200
$Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$	134
$NaH_2PO_4 \times\ H_2O$	62,5
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,432

ostali sastojci:

ɒ-Glukoza	3151
HEPES	3075,4
Hipoksantin Na	2,39
Linolna kiselina	0,042
Lipoična kiselina	0,105
Fenol crvenilo	8,1
Putrescin 2HCl	0,081
Natrij piruvat	55
Timidin	0,365

Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) - sastav:

Sastojci:	**Koncentracija (mg L^{-1})**
Aminokiseline:	
L-Arginin×HCl	84
L-Cistin×2HCl	62,60
L-Glutamine	584
Glicin	30
L-Histidin×HCl×H_2O	42
L-Izoleucin	105
L-Leucin	105
L-Lysine×HCl	146
L -Metionin	30
L -Fenilalanin	66
L -Serin	42
L -Treonin	95
L -Triptofan	16
L -Tirozin×2Na×2H_2O	103,79
L -Valin	94
Vitamini:	
Kolin klorid	4
Folna kiselina	4
myo-Inozitol	7,20
Nikotinamid	4
D-Ca pantotenska kiselina	4
Piridoksin×HCl	4
Riboflavin	0,4
Tiamin×HCl	4
anorganske soli:	
$CaCl_2$	200

$Fe(NO_3)_3 \times 9H_2O$	0,1
$MgSO_4$	97,7
KCl	400
$NaHCO_3$	1500
NaCl	6400
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	125

ostali sastojci:

D-Glukoza	4500
Fenol crvenilo, natrijeva sol	15
Natrij piruvat	110

PBS (Phosphate-Buffered Saline) pufer pH=7,4

NaCl	8g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
dH_2O	do 1000 mL

0,4%-tna otopina *Trypan Blue*

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20mL
profiltrirati.	

***Kenacid Blue* R *stock* otopina**

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,4 g
apsolutni etanol	250 mL
dH_2O	630 mL

radna otopina *Kenacid Blue*

Kenacid Blue R stock otopina	88 mL
ledena octena kiselina	12 m

otopina za fiksiranje *Kenacid Blue* boje

apsolutni etanol	50 % (v/v)
ledena octena kiselina	1 % (v/v)
dH_2O	49 % (v/v)

otopina za ispiranje *Kenacid Blue* boje

apsolutni etanol	10 %
ledena octena kiselina	5 %
dH_2O	85 %

otopina za desorpciju

kalijev acetat	98,15 g
apsolutni etanol	700 mL
dH_2O	300 mL

3.1.4. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema:

- Inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO_2, Flow laboratories, Velika Britanija
- Komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- Spektrofotometar, Helios-γ, Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- Precizna vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- Analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- Centrifuga, Centric 322A, Technica Železniki, Slovenija
- Vibracijska mješalica, Technica Železniki, Slovenija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje Hepa 1-6 i AML 12 stanica u kulturi

Uzgoj i održavanje kako Hepa 1-6, tako i AML 12 stanica započinje naglim odmrzavanjem smrznutih stanica na 37 °C, u atmosferi 95 % zraka i 5 % CO_2. Nakon odmrzavanja stanica slijedi centrifugiranje pri 1200 okretaja/min u trajanju od 5 minuta te otklanjanje supernatanta. Talog stanica se resuspendira u mediju koji se sastoji od 90 % medija za uzgoj (za Hepa 1-6: DMEM, za AML 12: DMEM/F12 uz dodatak 0,005 mg mL^{-1} inzulina, 0,005 mg mL^{-1} transferina, 5 ng mL^{-1} selena i 40 ng mL^{-1} deksametazona) i 10 % FBS-a te prenese u T-bocu radi daljnje kultivacije.

Uvjeti kontrolirane atmosfere (37 °C, 95 % zraka i 5 % CO_2) potrebni su za optimalan rast i razvoj stanica, a osiguravaju se uzgojem stanica u inkubatoru u kojem vladaju navedeni uvjeti. Uz to je potrebno redovito mijenjanje medija za uzgoj. Monoslojne stanice u T-boci je prvo potrebno isprati od ostatka iskorištenog seruma i medija, a zatim odvojiti od površine T-boce dodavanjem 1-2 mL tripsina (proteolitički enzim potreban kako bi se stanice odvojile jedna od druge i od površine T-boce). Tripsiniziranim stanicama se dodaje svježi medij za uzgoj. Uzima se uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*. Nakon izračunavanja broja stanica u uzorku, stanice se razrjeđuju na koncentraciju 2×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj dodatkom novog medija.

Kada se ne koriste, stanice se čuvaju u zamrzivaču na -80 °C u mediju za smrzavanje koji se sastoji od 80 % medija za uzgoj, 10 % FBS-a i 10 % DMSO-a.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Iz suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica uzme se 20 µL uzorka te mu se dodaje 20 µL 0,4 %-tne boje *Trypan Blue*. Dobivenu suspenziju resuspendiramo te nanesemo 20 µL na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica. Fuchs-Rosenthalova komorica sastoji se od 16 kvadrata, a stanice se broje unutar središnja 4. Stanice se u svakom od ta 4 kvadrata broje unutar samih kvadrata te na donjem i desnom rubu kako bi se izbjeglo brojanje istih više puta. Stanice brojimo pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju neobojane, dok su mrtve plavo obojane zbog oštećenja stanične membrane.

Fuchs-Rosenthalova komorica duboka je 0,2 mm, a njezina površina iznosi 0,0625 mm^2. Broj stanica po mililitru medija za uzgoj se određuje tako da se izračuna srednja vrijednost broja živih stanica izbrojanih u 4 središnja kvadrata i pomnoži s 10^4.

3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica *Kenacid Blue* metodom

Kenacid Blue je boja koja prolazi kroz staničnu membranu i veže se za proteine u stanicama. Metoda *Kenacid Blue* je opisana 1976. godine (Bradford, 1976) kao alternativni test za praćenje potencijalnih toksikanata u ispitivanju toksičnosti. Jednostavna je i točna metoda koja daje reproducibilne rezultate. *Kenacid Blue* metodom se mjeri ukupna biomasa stanica putem bojanja staničnih proteina bojom *Commassie Brilliant Blue* R-250.

Postupak određivanja vijabilnosti stanica *Kenacid Blue* metodom započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica mikrotitarskih ploča te ispiranjem stanica dva puta s 1 mL PBS pufera kako bi se uklonili tragovi medija za uzgoj koji mogu utjecati na rezultate mjerenja. U svaku jažicu doda se 1 mL fiksativa i stanice se fiksiraju za dno jažice tijekom 20 minuta na tresilici pri nižim brzinama. Fiksativ se potom ukloni i u svaku jažicu na ploči doda se 1 mL *Kenacid Blue* boje pripremljene neposredno prije eksperimenta. Bojanje se provodi 20 minuta na tresilici, nakon čega se uklanja boja. Jažice se ispiru dva puta s po 1 mL otopine za ispiranje te se nakon drugog ispiranja ponovno stavljaju na tresilicu. Nakon 20 minuta ukloni se otopina za ispiranje, u svaku jažicu mikrotitarske ploče se dodaje po 2 mL otopine za desorpciju i ploče se ostave 20 minuta na tresilici. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.4. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanica

U svaku od jažica na mikrotitarskoj ploči sa 6 jažica otpipetira se 2 mL suspenzije Hepa 1-6 stanica u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. Jedna od jažica na mikrotitarskoj ploči se tretira s 10 µL etanola i služi kao kontrola, tako da se postigne koncentracija etanola 5 µg mL^{-1}. Ostale jažice se tretiraju s 10 µL ekstrakta cvijeta trnine koji je pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 10, 50, 100, 150 i 200 µg mL^{-1}.

Tretirane stanice se inkubiraju 72 sata, a svakih 24 sata se provjerava vijabilnost stanica metodom *Kenacid Blue*. Dobiveni podaci su međusobno uspoređeni kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanica.

3.2.5. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanica

U svaku od jažica na mikrotitarskoj ploči s 24 jažice otpipetira se 1 mL suspenzije AML 12 stanica u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. Nekoliko jažica na mikrotitarskoj ploči se tretiraju s 5 μL etanola i služe kao kontrola. Ostale jažice se tretiraju s 5 μL ekstrakta cvijeta trnine koji je pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 5, 10, 30, 50 i 100 μg mL^{-1}.

Tretirane stanice se inkubiraju 72 sata, a svakih 24 sata se provjerava vijabilnost stanica metodom *Kenacid Blue*. Dobiveni podaci su međusobno uspoređeni kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanica.

3.2.6. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u Hepa 1-6 stanicama nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine

Test za mjerenje ROS-a koristi reagens 2',7'- diklorfluorescin diacetat (DCFDA), boju koja mjeri hidroksilne, peroksilne i druge ROS unutar stanice. Nakon difuzije u stanicu, DCFDA se deacetilira staničnim esterazama u nefluorescentni spoj, koji se kasnije oksidira ROS-ima u 2',7' diklorfluorescin (DCF). DCF je intenzivno fluorescentni spoj koji se može detektirati fluorescencijskom spektroskopijom (Jambunathan, 2010).

Na mikrotitarsku ploču s 96 jažica nacijepi se 100 μL suspenzije Hepa 1-6 stanica u koncentraciji od $2{,}5\times10^5$ st mL^{-1} medija za uzgoj. Stanice se inkubiraju 24 sata. Potom se uklanja medij i dodaje 1X pufer. Nakon uklanjanja pufera u jažice se dodaje 100 μL DCFDA otopine koncentracije 25 μM te se ploča stavlja u inkubator 45 min. Nakon inkubiranja uklanja se DCFDA i stanice se ispiru sa 100 μL 1X pufera ili PBS-pufera. Stanice se zatim tretiraju ekstraktom cvijeta trnine koji je pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 10, 50, 100, 150 i 200 μg mL^{-1}. Dio stanica se tretira s TBHP (tert-butil hidroperoksid) te služe kao pozitivna kontrola, a dio stanica ostaje netretiran. Inkubacija se nakon toga provodi u inkubatoru 3 sata. Na kraju se na čitaču ploča izmjeri fluorescencija pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i emisije od 535 nm.

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $(\bar{x})$ uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom izračunavajući t vrijednost prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S^2_{\bar{x}_1} + S^2_{\bar{x}_2}}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti najmanje $p<0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem ispitivanja djelovanja ekstrakta cvijeta trnine na kancerozne i normalne stanice, u ovom radu su korištene stanične linije Hepa 1-6 izolirana od BW7756 hepatoma koji je nastao u C57/L miša (*Mus musculus*) i AML 12 izolirana iz hepatocita zdrave jetre miša. Obje stanične linije rastu u monosloju (ATCC, 2014).

Već dugi niz godina, fenolne komponente se intenzivno proučavaju zbog svojeg antitumorskog, proapoptivnog i antiangiogenog djelovanja, a u posljednjih nekoliko godina, korištenje tih spojeva se znatno povećalo (Guimarães i sur., 2014).

U istraživanju (Olszewska i Wolbis, 2001) iz cvjetova trnine izolirani su sljedeći flavonoidi: kamferol, kvercetin, kamferol-3-*O*-α-L-arabinofuranozid, , kvercetin 3-*O*-α-L-arabinofuranozid, kvercetin 3-*O*-α-D-ksilopiranozid, kamferol 3-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 7-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 3-*O*-β-D-ksilopiranozid, kamferol 3-*O*-(2''-E-*p*-kumaroil)-α-L-arabinofuranozid. Struktura komponenata određena je kemijskim i spektrofotometrijskim metodama. Kemijski sastav cvjetova trnine istraživan je s obzirom na polifenolne komponente. Osim flavonoida, u cvijeću trnine potvrđena je prisutnost proantocijanidina tipa A i fenolnih kiselina (Olszewska i Wolbis, 2001). U istraživanju Olszewska i Wolbis (2002) iz cvjetova trnine izolirano je još 7 flavonoida: kamferol 3,7-di-*O*-α-L ramnopiranozid (kapferitrin), kvercetin 3-*O*-α-L ramnopiranozid (kvercitrin), kamferol 3-*O*-(4''-β-D-glukopiranozil)-α-L-ramnopiranozid (multiflorin B), kvercetin 3-*O*-(4''-β-D-glukopiranozil)-α-L-ramnopiranozid (multinozid A), kvercetin 3-*O*-β-D-glukopiranozid (izokvercitrin), kvercetin 3-*O*-α-L-arabinopiranozid (guaijaverin), kvercetin 3-*O*-α-D-ksilopiranozid (reinoutrin). U ekstraktu trnine koji je korišten u našem istraživanju primjenom UPLC MS/MS metode određeni su slijedeći fenolni spojevi; fenolne kiseline: derivat hidroksi benzojeve kiseline, 3-*O*-kafeoilkina kiselina, derivat klorogenske 1, 3-*p*-kumaroilkina kiselina, 4-*O*-kafeoilkina kiselina, 3-*O*-feruloilkina kiselina, derivat klorogenske kiseline 2, derivat klorogenske kiseline 3; Procijanidini: procijanidin A1, procijanidin A2; Flavonol glikozidi: derivat kvercetina 1, kvercetin pentozil heksozid, kvercetin ramnozil heksozid, kamferol ramnozil heksozid, kamferol-3-rutinozid, kvercetin-3-O-rutinozid, kamferol pentozil heksozid, kamferol-3-O glukozid, kamferol heksozid, kamferol heksozil ramnozid, kamferol pentozid, kamferol ramnozid, kamferol acetil heksozid, kamferol acetil rutinozid. (Ostrman, 2016).

Vijabilnost Hepa 1-6 stanične linije tretirane različitim koncentracijama 10-200 μg mL^{-1} ekstrakta cvijeta trnine, te stanica tretiranih etanolom koje su služile kao kontrola, praćena je svaka 24 sata tijekom 72 sata inkubacije metodom *Kenacid Blue.* *Kenacid Blue* metodom se mjeri ukupna biomasa stanica putem bojanja staničnih proteina bojom *Commassie Brilliant Blue* R-250. Nakon odbojavanja stanica, intenzitet nastalog obojenja se određuje spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu.

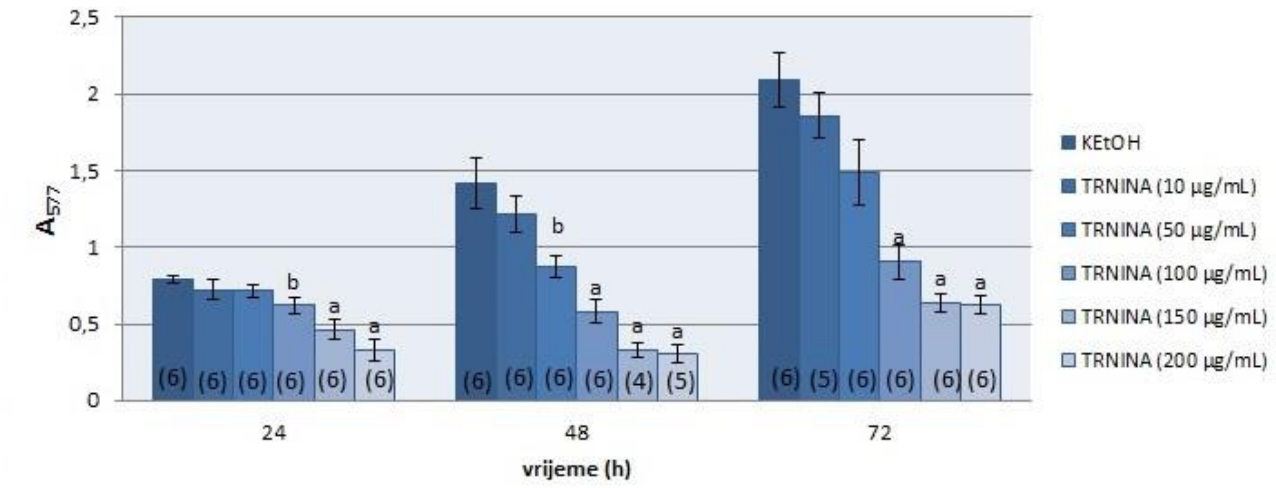
Vijabilnost AML 12 stanica tretiranih rasponom koncentracija (5-100 μg mL^{-1}) ekstrakta cvijeta trnine, te stanica tretiranih etanolom koje su služile kao kontrola, praćena je svaka 24 sata, tijekom 72 sata inkubacije, metodom *Kenacid Blue.*

Na Hepa 1-6 stanicama tretiranim ekstraktom cvijeta trnine dodatno je praćen nastanak ROS-a (reaktivne kisikove vrste). Test za mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta koristi reagens 2',7' diklorfluorescin diacetat (DCFDA), boju koja mjeri hidroksilne, peroksilne i druge ROS unutar stanice. Nakon tretmana, na čitaču ploča izmjeri se fluorescencija pri valnoj duljini ekscitacije 485 nm i emisije 535 nm.

4.1.Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hepa 1-6 stanične linije određen *Kenacid Blue* metodom

Hepa 1-6 stanice su nacijepljene na mikrotitarske ploče od 6 jažica u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine, jedna od jažica na mikrotitarskoj ploči se tretira etanolom i služi kao kontrola. Učinak ekstrakta trnine u koncentracijama od 10-200 μg mL^{-1} na vijabilnost Hepa 1-6 stanica praćen je tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue.*

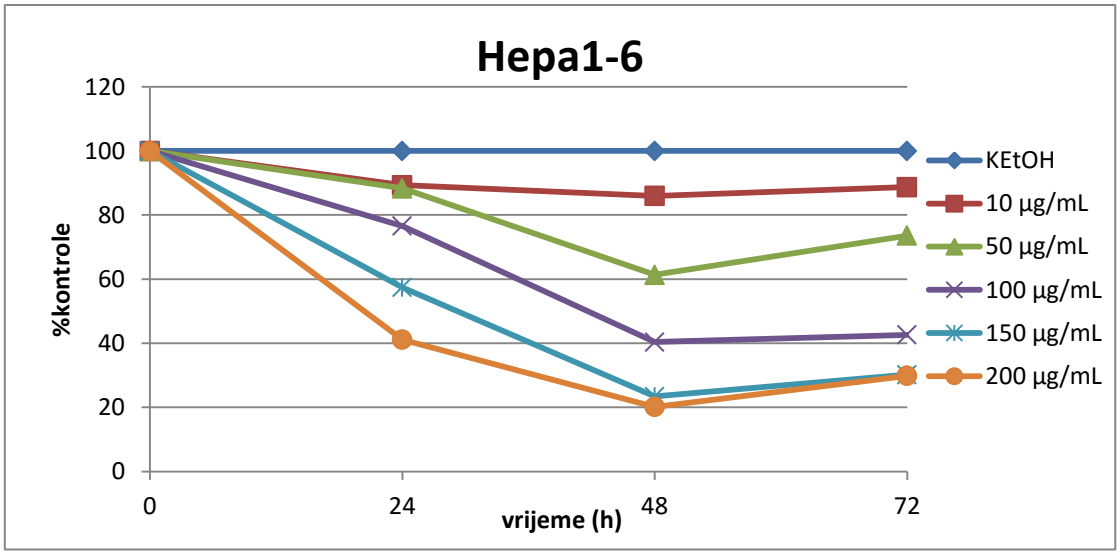
Rezultati učinka ispitivanog ekstrakta na vijabilnost Hepa 1-6 stanica statistički su obrađeni i prikazani na Slici 7.



Slika 7. Proliferacija Hepa 1-6 stanica tretiranih s 10-200 µg mL^{-1} ekstrakta cvijeta trnine praćena tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue*. ( ) broj uzoraka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$, $^{b}p<0,025$.

Tijekom cijelog perioda inkubacije od 72 sata, utvrđena je statistički značajna ($p<0,001$, $p<0,025$) inhibicija vijabilnosti stanica pri koncentracijama većim od 100 µg mL^{-1}. Utvrđeno je da nakon 48 sati, koncentracija od 50 µg mL^{-1} statistički značajno inhibira vijabilnost stanica. Kod tretmana najnižom koncentracijom od 10 µg mL^{-1}, nije utvrđen statistički značajan inhibicijski učinak na stanice tijekom čitavog vremena inkubacije, a isto je utvrđeno i za koncentraciju od 50 µg mL^{-1} nakon 24 i 72 sata (Slika 7). Dobiveni rezultati ukazuju na to da ekstrakt cvijeta trnine smanjuje vijabilnost Hepa 1-6 stanica, a inhibitoran učinak povećava se povećanjem koncentracije ispitivanog ekstrakta.

Na Slici 8. prikazan je citotoksični učinak različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine kao postotak preživljavanja tretiranih stanica u odnosu na kontrolu tretiranu etanolom (K_{EtOH}).



Slika 8. Vijabilnost Hepa 1-6 stanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolne stanice tretirane etanolom (100 % preživljavanje) praćena je tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue*. K_{EtOH}-kontrola uz dodatak 5 µg mL^{-1} etanola; koncentracije ekstrakta u mediju za uzgoj: 10 µg mL^{-1}, 50 µg mL^{-1}, 100 µg mL^{-1}, 150 µg mL^{-1}, 200 µg mL^{-1}.

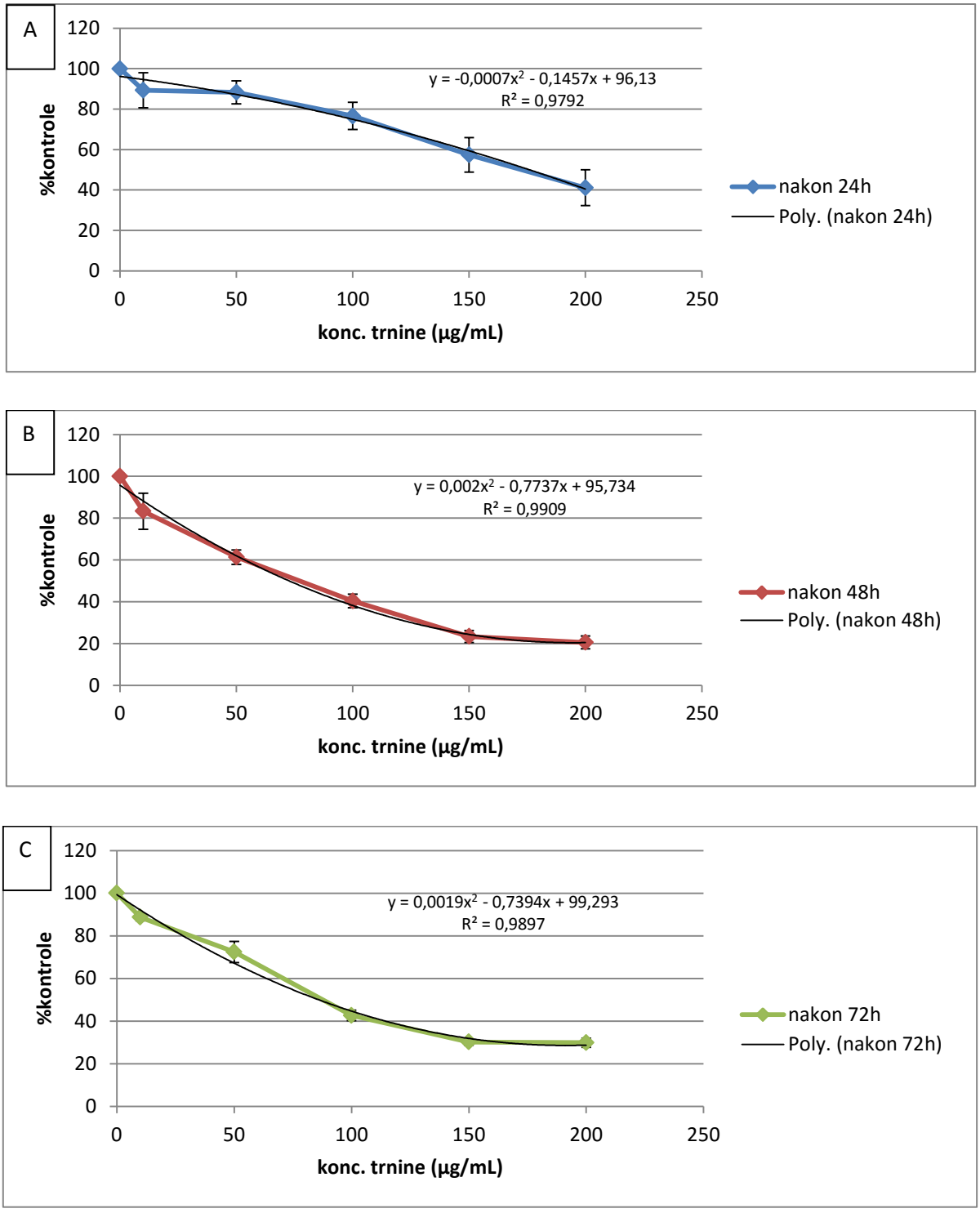
Već nakon 24 sata uočena je inhibicija rasta Hepa 1-6 stanica kod svih koncentracija. Kod najniže koncentracije (10 µg mL^{-1}) postotak preživljavanja je 89,31 %, inhibicija raste porastom koncentracije i kod najviše koncentracije (200 µg mL^{-1}) postotak preživljavanja iznosi 41,14 % u odnosu na kontrolu. Nakon 48 sati inhibicijski učinak je još izraženiji kod svih koncentracija, a kod najviše koncentracije (200 µg mL^{-1}) preživljava svega 20,16 % stanica. Nakon 72 sata uočava se povećanje vijabilnosti stanica u odnosu na 48 sati, a postotak preživljavanja u odnosu na kontrolu kod najniže koncentracije (10 µg mL^{-1}) je 88,70 % , a kod najviše (200 µg mL^{-1}) 29,86 %.

U istraživanju koje su proveli Guimarães i sur. (2014) godine istraživano je antioksidacijsko (AO) i antitumorsko (GI) djelovanje ekstakta različitih divljih plodova među kojima je bio i ekstrakt ploda trnine. Koncentracije metanolnih ekstrakata korištene za određivanje AO i GI djelovanja bile su 4-1000 µg mL^{-1} i 25-400 µg mL^{-1}. Rezultati su izraženi EC_{50} vrijednošću za AO djelovanje (koncentracija koja pruža 50 % antioksidacijske aktivnosti) i GI_{50} vrijednošću za antitumorsko djelovanje (koncentracija koja inhibira rast stanica za 50 %). Za određivanje AO djelovanja korišten je DPPH test, test sposobnosti redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+}, TBARS test i dr. Za određivanje GI aktivnosti korišteno je 5 tumorskih staničnih linija MCF-7, NCI-H460, HCT-15, HeLa i HepG2 (Guimarães i sur., 2014). Pripremljena su dva različita ekstrakta plodova; ekstrakt bez antocijanina obogaćen polifenolima (PE) i antocijaninima obogaćeni ekstrakt (AE). PE ekstrakt ploda trnine pokazao

je visoko antioksidacijsko djelovanje, za koje se pretpostavlja da su odgovorne fenolne kiseline i flavonoli. AE ekstrakt ploda trnine imao je najmanju antioksidacijsku aktivnost. Ekstrakti su inhibirali rast svih tumorskih stanica, osim AE ekstrakta trnine koji nije inhibirao rast MCF-7 stanica (Guimarães i sur., 2014).

4.1.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji

Ovisnost preživljavanja Hepa 1-6 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolu etanolom praćena je tijekom 72 sata i prikazana na Slici 9.



Slika 9. Proliferacija Hepa 1-6 stanica nakon 24, 48 i 72 sata uz tretman 10-200 µg mL^{-1} ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Kenacid Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ±standardna pogreška, određenu iz 4 do 6 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

Iz jednadžbi interpoliranih krivulja (*trend line*) izračunate su IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji. Kod odabira interpolirane

krivulje, težilo se da njoj pripadajući koeficijent determinacije R^2 bude što bliži 1. Vrijednost pripadajućih koeficijenta determinacije R^2 ukazuju na reprezentativnost regresijskog modela (približavanje R^2 vrijednosti 1).

IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti predstavljaju one koncentracije ispitivane tvari koje inhibiraju stanični rast za 20 %, 50 % i 80 %. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji određene su nakon 24, 48 i 72 sata i prikazane su u Tablici 3. IC_{50} vrijednost određena na Hepa 1-6 staničnoj liniji metodom *Kenacid Blue* nakon 24 h iznosi 172,93 μg mL^{-1}, nakon 48 h 72,82 μg mL^{-1} i nakon 72 sata 85,41 μg mL^{-1}.

Tablica 3. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hepa 1-6 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata.

	vrijeme h^{-1}		
IC(μg mL^{-1})	**24h**	**48h**	**72h**
IC_{20}	79,98	21,53	28,13
IC_{50}	172,93	72,82	85,41
IC_{80}	241,74	/	/

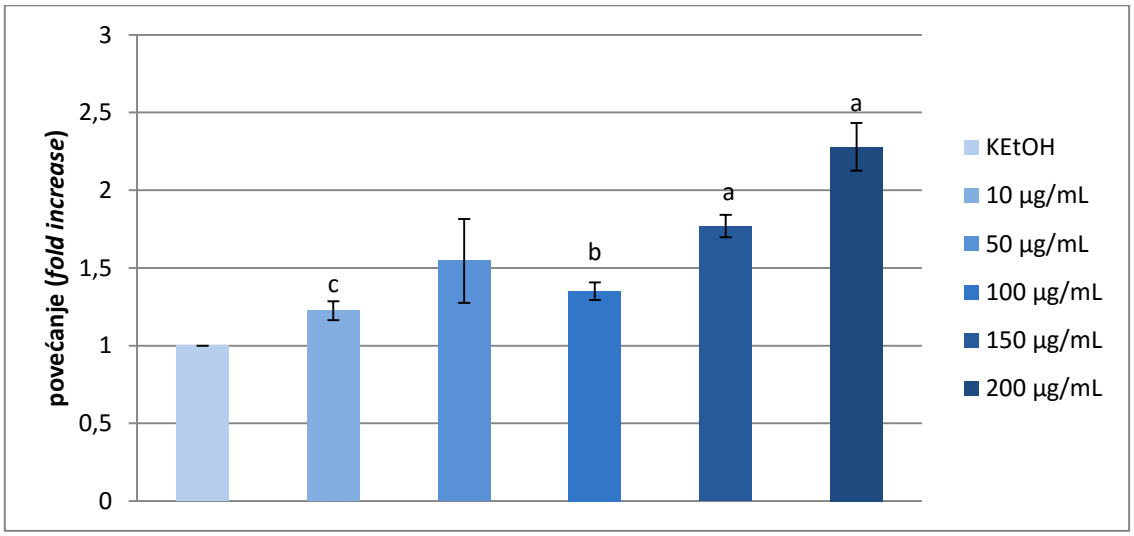
4.2. Produkcija ROS u Hepa 1-6 stanicama tretiranim ekstraktom cvijeta trnine

Oksidacijski stres nastaje kada produkcija ROS prelazi prirodne tjelesne antioksidacijske mehanizme, oštečujući stanične biomolekule kao što su lipidi, proteini i DNA. Oksidacijski stres doprinosi narušavanju staničnih funkcija koje su povezane s mnogim bolestima (Kumarasamy i sur., 2007).

Glavno svojstvo antioksidanasa je sposobnost hvatanja slobodnih radikala koji mogu oksidirati nukleinske kiseline, proteine, lipide. Ekstrakti svježeg voća su izvrstan izvor polifenolnih spojeva, koji su „čistači“ slobodnih radikala, što može značajno ublažiti negativan učinak slobodnih radikala u organizmu te stoga imaju važnu ulogu u prevenciji neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti te raka. Postoji sve veći interes za korištenjem antioksidanasa u znanstvenim istraživanjima, kao i u industrijskim (prehrambena, farmaceutska i kozmetička) svrhama (Veličković i sur. 2014).

Fenolni i polifenolni spojevi posjeduju antioksidacijska i prooksidacijska svojstva, te stoga mogu biti važni za zdravlje (Procházková i sur., 2011). Ljekovito bilje je poznato kao važan izvor različitih prirodnih antioksidanasa. Velik je interes za antioksidacijske i prooksidacijske učinke komponenta biljaka, poznatijih kao fitokemikalije, koji bi mogli biti relevantni s obzirom na njihovu nutritivnu učestalost i njihovu ulogu u zdravlju i bolesti (Kumarasamy i sur., 2007; Procházková i sur., 2011).

Na fluorescentnom čitaču ploča, mjerena je produkcija ROS-a u Hepa 1-6 stanicama tretiranim različitim koncentracijama cvijeta trnine. Učinak ekstrakta cvijeta trnine u koncentracijama od 10-200 µg mL^{-1} na produkciju ROS-a prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Učinak ekstrakta cvijeta trnine u koncentracijama od 10-200 µg mL^{-1} na produkciju ROS-a na Hepa 1-6 stanicama. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): $^{a}p< 0,001$, $^{b}p< 0,005$, $^{c}p< 0,05$.

Kod tretmana Hepa 1-6 stanica ekstraktom *Prunus spinosa* L., uočeno je statistički značajno ($p< 0,001$- $p< 0,05$) povećanje produkcije ROS-a u odnosu na kontrolu etanolom kod svih koncentracija. Utjecaj nije statistički značajan kod koncentracije od 50 µg mL^{-1}, iako je i u ovom slučaju određena indukcija ROS-a. Rezultati tretmana ekstraktom cvijeta trnine na kancerogenim stanicama ukazuju na prooksidacijsko djelovanje pri ispitanim koncentracijama, tj. na to da ekstrakt cvijeta trnine inducira stvaranje ROS-a.

U istraživanju Kumarasamy i sur. (2007) analizirana je sposobnost hvatanja slobodnih radikala 45 biljaka, među kojima je bila i trnina, pomoću DPPH metode. Ekstrakti su uspoređivani sa standardnim antioksidansima (kvercetin i TROLOX). U ovom slučaju, ekstrakt trnine je pokazao antioksidacijsko djelovanje. Izračunata je RC_{50} vrijednost u

mg mL^{-1} koja pokazuje koncentraciju ispitivanog uzorka, koja smanjuje 50 % koncentracije slobodnih radikala. RC_{50} vrijednost metanolnog ekstrakta *Prunus spinosae* iznoslila je $4{,}8\times10^{4}$ mg mL^{-1}, a RC_{50} vrijednost diklormetanolnog ekstrakta *Prunus spinosae* iznoslila je 5×10^{4} mg mL^{-1}.

Radovanović i sur. 2013. godine određivali su polifenole, antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje divljih plodova, među kojima je bila i trnina. Antimikrobna aktivnost ocjenjivala se primjenom kultura *Clostridium porfrigens, Bacillus subtilis, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Sarcina lutea, Micrococcus flavus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Shigella Sonnei, Klebsiella pneumoniae i Proteus vulgaris*. Antibakterijska aktivnost procijenjena je pomoću mjerenja zone inhibicije (u mm) u testu bakterijskih sojeva. Određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) u skladu s Nacionalnim odborom za kliničke i laboratorijske standarde. Antimikrobna aktivnost ekstrakata bila je visoka u gotovo svih testiranih sojeva bakterija. Zone inhibicije testiranih ekstrakata 50 µL na disku bile su u rasponu 12,0-16,2 mm. Sadržaj ukupnih fenola u plodovima trnine određen je HPLC analizom i iznosio je 7959,9±1,95 mg GAE kg^{-1}. Od hidroksicimetnih kiselina, najveći udio zauzima galna kiselina. Dominantni flavan-3-oli u plodovima trnine su procijanidin B2, katehin i epikatehin. DPPH testom ustanovljena je visoka antioksidacijska aktivnost plodova trnine.

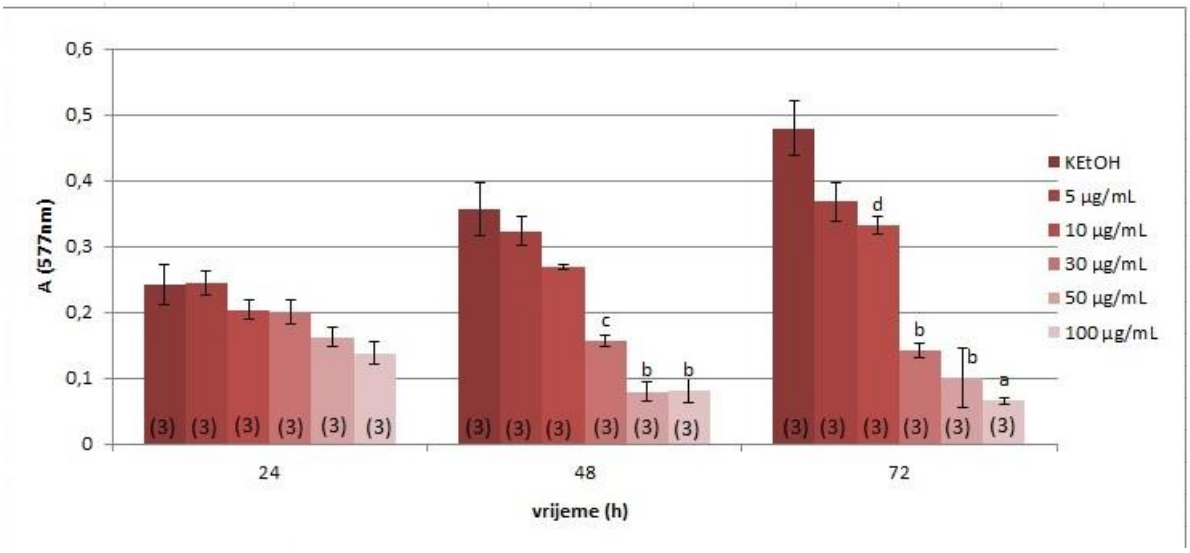
S druge strane, npr. za fenolne spojeve koje sadrži ekstrakt grožđa (*Vitis vinifera)* određena je uz antioksidacijsku i prooksidacijska aktivnost. Ovisno o metodi ekstrakcije i sorti grožđa, ekstrakti su pokazali antioksidacijsku i prooksidacijsku aktivnost. Prema dobivenim rezultatima, galna kiselina je najzastupljeniji fenolni spoj u svim ekstraktima. Osim toga, u ekstraktima su pronađene i vanilinska, protokatehinska i sinirginska kiselina te kvercetin i kamferol (Cotoras i sur., 2014).

Ekstrakt cvijeta trnine korišten u ovom istraživanju, nije pokazao antioksidacijsko djelovanje. Naprotiv, utvrđena je povećana produkcija ROS-a u Hepa 1-6 staničnoj liniji kod tretmana svim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine (Slika 10).

4.3. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanične linije određen metodom *Kenacid Blue*

AML 12 stanice se nacijepe na mikrotitarske ploče u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. S obzirom da je korišten etanolni ekstrakt, kao kontrola služe stanice koje se tretiraju etanolom. Učinak ekstrakta trnine u koncentracijama od 5-100 µg mL^{-1} na vijabilnost AML 12 stanica praćen je tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue.*

Rezultati učinka ispitivanog ekstrakta na proliferaciju AML-12 stanica statistički su obrađeni i prikazani na Slici 11.

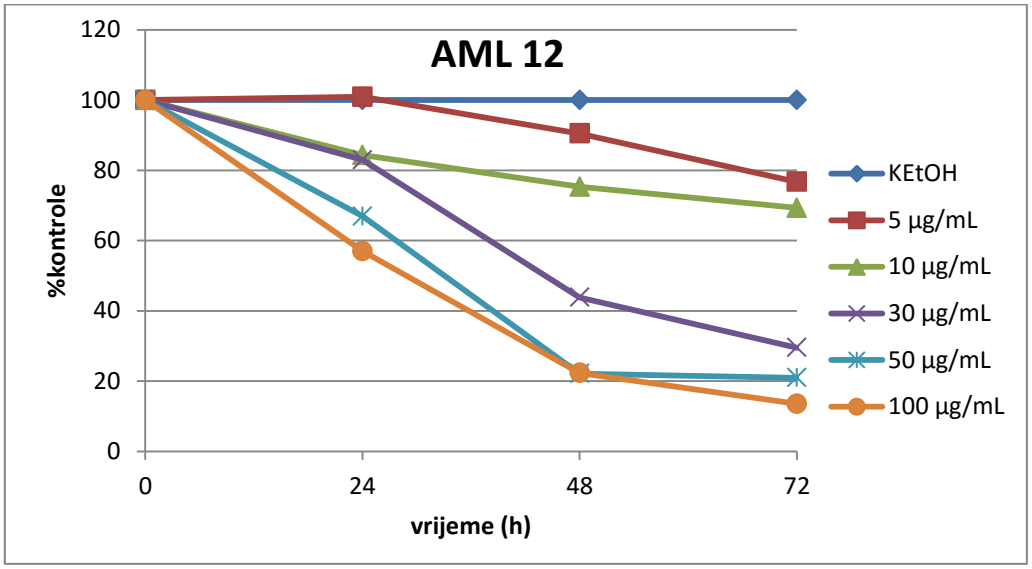


Slika 11. Proliferacija AML 12 stanica tretiranih s 5-100 µg mL^{-1} ekstrakta cvijeta trnine praćena tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue.* ( ) broj uzoraka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$, $^{b}p<0,005$, $^{c}p<0,01$, $^{d}p<0,05$

Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost AML 12 stanica ispitan je u koncentracijama 5, 10, 30, 50 i 100 µg mL^{-1} nakon 24, 48 i 72 sata. Iz priloženog grafa (Slika 11) vidi se da nakon 24 sata sve koncentracije osim 5 µg mL^{-1} smanjuju vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu tretiranu etanolom, no taj učinak nije statistički značajan. Nakon 48 sati, koncentracije od 30, 50 i 100 µg mL^{-1} statistički značajno ($p<0,005$, $p<0,01$) inhibiraju rast stanica. Nakon 72 sata, sve koncentracije osim najmanje (5 µg mL^{-1}) pokazuju statistički značajan ($p<0,05$ - $p<0,001$) inhibitorni učinak na vijabilnost stanica. Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da ekstrakt cvijeta trnine smanjuje vijabilnost AML 12 stanica, a smanjenje vijabilnosti povećava se porastom koncentracije i vremena djelovanja ekstrakta. S druge

strane, najniža doza ekstrakta cvijeta trnine (5 µg mL^{-1}) nakon 24 sata pokazala je blagi pozitivan učinak na proliferaciju AML 12 stanica.

Učinak različitih koncentracija (5-100 µg mL^{-1}) ekstrakta cvjeta trnine prikazan kao postotak preživljavanja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice tretirane etanolom (K_{EtOH}) prikazan je na Slici 12.

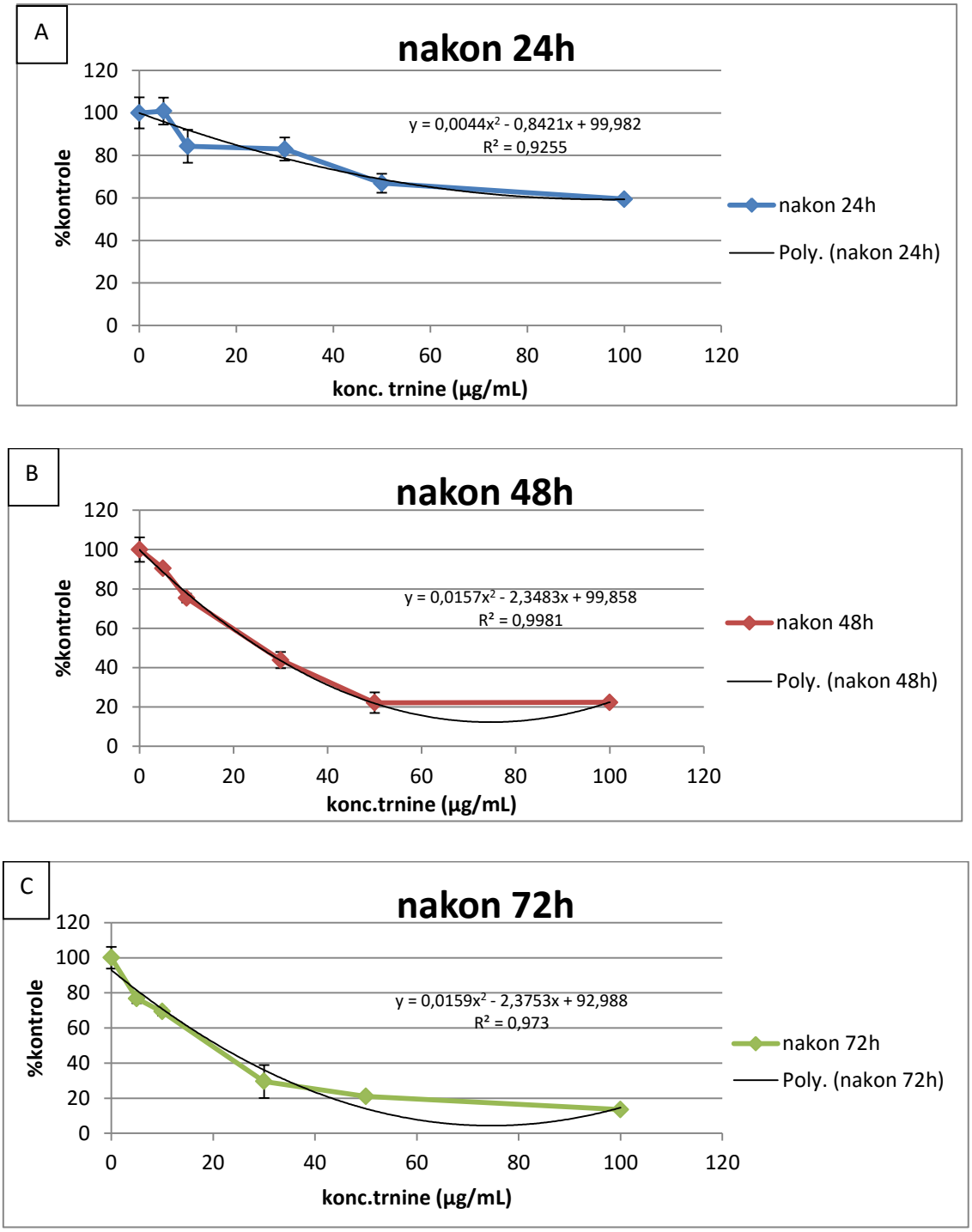


Slika 12. Vijabilnost AML 12 stanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolne stanice tretirane etanolom (100 % preživljavanje) praćena je tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue*. K_{EtOH}-kontrola uz dodatak 5 µL mL^{-1} etanola; koncentracije ekstrakta u mediju za uzgoj: 5 µg mL^{-1}, 10 µg mL^{-1}, 30 µg mL^{-1} , 50 µg mL^{-1}, 100 µg mL^{-1} .

Inhibicija proliferacije AML-12 stanica uočena je već nakon 24 sata kod svih koncentracija, osim kod najniže koncentracije (5 µg mL^{-1}) gdje je došlo do blagog povećanja vijabilnosti stanica (100,90 %) u odnosu na kontrolu. Pri najvišoj koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine određeno je preživljavanje 57 % stanica u odnosu na kontrolu već nakon 24 sata. Inhibicijski učinak sve je veći tijekom daljnjeg perioda inkubacije i sve izraženiji porastom koncentracije. Nakon 72 sata kod najniže koncentracije (5 µg mL^{-1}) preživljava 76,74 % stanica, a kod koncentracije od 100 µg mL^{-1} preživljava samo 13,51 % stanica.

4.3.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na AML 12 staničnoj liniji

Ovisnost preživljavanja AML 12 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine tijekom tretmana od 24, 48 i 72 sata prikazana je na Slici 13. Ispitane koncentracije ekstrakta cvijeta trnine kretale su se u rasponu od 5-100 µg mL^{-1}, a učinci svake pojedine doze određeni su iz tri mjerenja.



Slika 13. Proliferacija AML 12 stanica nakon 24, 48 i 72 sata uz tretman 5-100 µg mL^{-1} ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Kenacid Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ±standardna pogreška, određenu iz 3 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti su izračunate iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja, na isti način kao i za Hepa 1-6 staničnu liniju, te su izračunate vrijednosti prikazane u Tablici 4. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine na AML 12 staničnoj liniji određena

metodom *Kenacid Blue* nakon 48 sati iznosi 25,61 μg mL^{-1}, a nakon 72 sata iznosi 21,07 μg mL^{-1}. Koncentracija ekstrakta cvijeta trnine kod koje preživljava 50 % stanica nakon 24 sata tretmana nije se mogla izračunati iz jednadžbe prikazane polinomne krivulje.

Tablica 4. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju AML 12 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata.

	vrijeme h^{-1}		
IC (μg mL^{-1})	**24h**	**48h**	**72h**
IC_{20}	27,75	8,99	5,68
IC_{50}	/	25,61	21,07
IC_{80}	/	52,28	43,25

IC_{50} vrijednost ekstrakta cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji nakon 24 sata iznosi 172,93 μg mL^{-1}, nakon 48 sati 72,82 μg mL^{-1}, a nakon 72 sata 85,41 μg mL^{-1} (Tablica 3). IC_{50} vrijednosti ekstrakta cvijeta trnine na AML 12 nakon 48 i 72 sata iznose 25,61 i 21,07 μg mL^{-1} (Tablica 4).

Iz usporedbe IC_{50} vrijednosti ekstrakta cvijeta trnine nakon 48 i 72 sata na Hepa 1-6 i AML 12 staničnoj liniji, vidljivo je da ekstrakt cvijeta trnine pokazuje veći toksični učinak na AML 12 staničnu liniju. Koncentracija koja inhibira vijabilnost stanica za 50 % nakon 48 sata za Hepa 1-6 staničnu liniju iznosi 72,82 μg mL^{-1}, a za AML 12 staničnu liniju 25,61. μg mL^{-1} Nakon 72 sata 50 % inhibirana vijabilnost Hepa 1-6 stanica postiže se koncentracijom 85,41 μg mL^{-1}, a AML 12 stanica postiže se koncentracijom od samo 21,07 μg mL^{-1}. Može se zaključiti da su AML 12 stanice osjetljivije na tretman ekstraktom cvijeta trnine pri čemu je kod visokih doza određen jači inhibitorni učinak u odnosu na Hepa 1-6, dok je najniža doza pokazala pozitivan učinak na proliferaciju AML 12 stanica nakon 24 sata.

5. ZAKLJUČCI

1. *Kenacid Blue* metoda se pokazala kao dobra metoda za praćenje vijabilnosti Hepa 1-6 i AML 12 stanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine.

2. Statistički značajno ($p<0,001$, $p<0,025$) smanjenje vijabilnosti Hepa 1-6 tanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine uočeno je tijekom cijelog perioda inkubacije od 72 sata pri koncentracijama višim od 100 μg mL^{-1}.

3. Statistički značajno ($p<0,005$, $p<0,01$) smanjenje vijabilnosti AML 12 stanica tretiranih ekstraktom cvijeta trnine uočeno je nakon 48 sati pri koncentracijama višim od 30 μg mL^{-1}, a nakon 72 sata statistički značajno ($p<0,05$ - $p<0,001$) smanjenje vijabilnosti AML 12 stanica uočeno je pri koncentracijama višim od 10 μg mL^{-1}. Smanjenje vijabilnosti povećava se porastom koncentracije i vremena djelovanja ekstrakta.

4. IC_{50} vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hepa 1-6 staničnoj liniji određene metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata iznose 172,93 μg mL^{-1}, 72,82 μg mL^{-1} i 85,41 μg mL^{-1}.

5. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine na AML 12 staničnoj liniji određena metodom *Kenacid Blue* nakon 48 sati iznosi 25,61 μg mL^{-1}, a nakon 72 sata iznosi 21,07 μg mL^{-1}, dok se nakon 24 sata uz primjenjene koncentracije nije mogla odrediti.

6. Iz usporedbe IC_{50} vrijednosti vidljivo je da ekstrakt cvijeta trnine korišten u ovom istraživanju ima izraženiji inhibitorni učinak na proliferaciju nekancerozne AML 12 stanične linije, nego na kanceroznu Hepa 1-6 staničnu liniju. Niske doze ekstrakta cvijeta trnine (5 μg mL^{-1}) nakon 24 sata pokazuju potencijalno pozitivan učinak na proliferaciju nekancerozne AML 12 stanične linije.

7. Kod tretmana Hepa 1-6 stanica ekstraktom cvijeta trnine koncentracijama 10-200 μg mL^{-1}, uočeno je statistički značajno ($p<0,001$ - $p<0,05$) povećanje produkcije ROS-a u odnosu na kontrolu etanolom kod svih ispitanih koncentracija. Utjecaj nije bio statistički značajan kod koncentracije od 50 μg mL^{-1}, ali je također određena indukcija ROS-a. Iz navedenog se može zaključiti da je ekstrakt cvijeta trnine pri koncentracijama ispitanim u ovom istraživanju potaknuo nastanak ROS-a u kulturi stanica Hepa 1-6.

6. LITERATURA

Aherne, S. A., O'Brien, N.M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4. izd., Garland Science, New York.

ATCC (2014a) Hepa 1-6 [Hepa1-6] (ATCC CRL-1830) <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1830.aspx?geo_country=hr#generalinformation>. Pristupljeno, 17. lipnja 2016.

ATCC (2014b) AML12 (ATCC CRL-2254) <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2254.aspx?geo_country=hr#generalinformation>. Pristupljeno, 17. lipnja 2016.

Atterwill, C.K. (1995) Alternative method of Assessing Toxicity. U: *In vitro Toxicity testing Protocols*, Vol 43 (O'Hare, S., Atterwill, C.K., ured.), Humana Press, Totowa, New Yearsy, str 1-9.

Anonymous, (2016) Blackthorn/Sloe (*Prunus spinosa*) <http://www.naturessecretlarder.co.uk/wild-food-useful-plants/blackthorn-sloe-prunus-spinosa.htm>. Pristupljeno 20.lipnja. 2016.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. **99**, 191–203.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Butler, M. (2004) Animal Cell Culture and Tehnology: The Basics, 2.izd., Bios Scientific Publishers, Oxon.

Cadenas, E., Davies, K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radial Bio. Med.* **29**, 222-230.

Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., Mendoza, L. (2014) *In Vitro* and *in vivo* evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules* **19**, 21154-21167.

Darlington, G.J., Bernhard, H.P., Miller, R.A., Ruddle, F.H. (1980) Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J. Natl. Cancer I.* **64**, 809-819.

Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians I*. **52**, 794-804.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboere, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 193-236.

Erturk, Y., Ercisli, S., Tosun, M. (2009) Physico-chemical characteristics of wild plum fruits (*Prunus spinosa* L.). *Int. J. Plant Prod*. **3**, 89-92.

Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Glenčir, J., Glenčir, J. (1991) *Atlas ljekovitog bilja*, Prosvjeta, Zagreb.

Grotewold, E. (2006) *The Science of Flavonoids*, Springer Science & Business Media, Inc., New York.

Guimarães, R., Barros, L., Calhelha, R.C., Carvalho, A.M., Queiroz, M.J., Ferreira, I.C. (2014) Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Food Hum. Nutr*. **69**, 37-42.

Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler,G., Lewis, D. (2002) Good cell culture practice. *ATLA* **30**, 407-414.

Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. (1996) A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1518-1520.

ITIS (2016) *Prunus spinosa* L. ITIS-Integrated Taxonomic Information System, <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24802>. Pristupljeno 20. Lipnja, 2016.

Jabłońska-Ryś, E., Zalewska-Korona, M., Kalbarczyk, J. (2009) Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* **17**, 115-120.

Jambunathan, N. (2010) Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Methods Mol. Biol.* **639**, 291-297.

KEW (2016) *Prunus spinosa* (blackthorn), KEW Royal Botanic Gardens, London, <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/prunus-spinosa-blackthorn>. Pristupljeno 20. lipnja 2016.

Kim, D.-O., Jeong, S.W., Lee, C.J. (2002) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* **81**, 321–326.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček,V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-202.

Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2007) Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother. Res.* **21**, 615-621.

McGlinchey, E. (2007) Animal Cell Culture Scale-up Dublin City University, Dublin. doi: 10.1002/9780470015902.a0002562.pub2

Morales, P., Ferreira, I. C.F.R., Carvalho, A. M., Fernaández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Morales, R., Tardío, J. (2013) Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **115**, 176–185.

Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbis, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**, 199-203.

Olszewska, M., Wolbis, M.(2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**, 367-372.

Olszewska, M., Wolbis, M. (2002) Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **59,** 133-137.

Ostrman, M. (2016) Utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na bioaktivne spojeve cvijeta trnine, diplomski rad.

Procházková, P., Boušová, I., Wilhelmová, N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513-523.

Radovanović, B., Milenković-Anđelković, A., Radovanović, A., Anđelković, M. (2013) Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 813-819.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.* **7**, 933-956.

Ruiz-Rodríguez, B.M., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M., Cámara, M., Tardío, J. (2013) Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna Jacq*.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **69**, 61–73.

Rupasinghe, H.P.V., Jayasankar, S., Layb, W.(2006) Variation in total phenolics and antioxidant capacity among European plum genotypes. *Sci. Hortic.-Amsterdam* **108**, 243–246.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.- Biol. Interact.* **160**, 1-40.

Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović G. S., Mitić, S. S., Mitić,M.S., Ranđelović, S.S., Đorđević A.S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind*. **68**, 297–303.

Wolf, J.B. (2010) Tissue Culture Methods. University of Maryland, Baltimore. <http://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>. Pristupljeno 22. lipnja 2016.

Wu, J.C., Merlino, G., Fausto, N. (1994) Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *P. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **91**, 674–678.

Yuichi, M., Toshiaki, T., Manabu, Y. (1993) Cytotoxicity test method. US Patent 5229288.

.