Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica

Kolarić, Josipa

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:159:252199

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. Josipa Kolarić, 726/N

UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST Hep G2 STANICA

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ (2014.-2018.), “Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF).“

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 asistentice dr.sc. Teute Murati i asistentice Marine Miletić mag.ing.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Ivani Kmetič, dr.sc. Teuti Murati i mag.ing. Marini Miletić što su mi omogućile izradu diplomskog rada u Laboratoriju za toksikologiju i što su mi sa svojim stručnim savjetima i znanjem, s puno strpljenja, pomogle pri izradi mog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji što su uvijek bili uz mene i omogućili mi školovanje u drugom gradu.

Tata, posebno hvala tebi što si uvijek bio tu za mene i što si uvijek vjerovao u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UČINAK EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA VIJABILNOST Hep G2 STANICA

Josipa Kolarić, 726/N

Sažetak: U ovom radu ispitan je učinak ekstrakta cvijeta trnine, koncentracije ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline u rasponu 10-200 µg/mL, na vijabilnost i proliferaciju Hep G2 stanica metodama *Kenacid Blue* i *Neutral Red* tijekom 72 sata. Statistički značajna inhibicija stanične proliferacije utvrđena je metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata kod koncentracije ekstrakta od 50-200 µg/mL. IC_{50} vrijednost određena metodom *Kenacid Blue,* nakon 24 h iznosi 148,11 µg/mL, nakon 48 h 94,49 µg/mL i nakon 72 sata 59,87 µg/mL. Metodom *Neutral Red* određeno je da ekstrakt cvijeta trnine u koncentracijama od 50-200 µg/mL statistički značajno inhibira staničnu proliferaciju već nakon 24 sata inkubacije. IC_{50} vrijednost određena metodom *Neutral Red,* nakon 24 h iznosi 92,50 µg/mL, nakon 48 h 84,02 µg/mL i nakon 72 sata 54,93 µg/mL. Ovim istraživanjem utvrđeno je da ekstrakt cvijeta trnine inducira nastajanje ROS-a (reaktivnih kisikovih vrsta) u Hep G2 stanicama što ukazuje na izostanak antioksidacijske aktivnosti te biljke pri ispitanim koncetracijama.

Ključne riječi: *Prunus spinosa* L., Hep G2 stanična linija, *Kenacid Blue* metoda, *Neutral Red* metoda, oksidacijski stres

Rad sadrži: 43 stranice, 11 slika, 3 tablice, 42 literaturna navoda

Jezik izvornik: 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. izv.prof.dr.sc. Irena Landeka Jurčević
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič
3. doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević
4. doc.dr.sc. Igor Slivac (zamjena)

Datum obrane: 19.srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF BLACKTHORN FLOWER EXTRACT ON VIABILITY OF Hep G2 CELL LINE

Josipa Kolarić, 726/N

Abstract: In this study we examined the effect of blackthorn flower extract, the concentration of total phenolics expressed as gallic acid equivalents in the range 10-200 mg/mL, on the viability and proliferation of Hep G2 cells by *Kenacid Blue* and *Neutral Red* methods for 72 hours. Statistically significant inhibition of cell proliferation was determined according *Kenacid Blue* method after 24, 48 and 72 hours at a concentration of 50-200 µg/mL. The IC_{50} value determined by the method *Kenacid Blue*, after 24 h was 148.11 µg/mL after 48 h 94.49 µg/mL and after 72 hours 59.87 µg/mL. By *Neutral Red* method was determined that the blackthorn flower extract at concentrations of 50-200 µg/mL significantly inhibited cell proliferation after 24 hours of incubation. The IC_{50} value determined by the method *Neutral Red*, after 24 h was 92.50 µg/mL after 48 h 84.02 µg/mL and after 72 hours 54.93 µg/mL. This study has established that an blackthorn flower extract induces the formation of ROS (reactive oxygen species) in Hep G2 cells, indicating the absence of antioxidant activity of that plant in the concentrations which are tested.

Keywords: *Prunus spinosa* L., Hep G2 cell line, *Kenacid Blue* method, *Neutral Red* method, oxidative stress

Thesis contains: 43 pages, 11 figures, 3 tables, 42 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ivana Kmetič, Associate professor

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

Reviewers:
1. PhD. Irena Landeka Jurčević, Associate professor
2. PhD. Ivana Kmetič, Associate professor
3. PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor
4. PhD. Igor Slivac, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD ... **1**

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

2.1. Trnina ... **2**

2.1.1. Upotreba trnine ... 3

2.2 . Antioksidacijska aktivnost polifenola ... **4**

2.2.1. Polifenolne komponente u trnini ... 7

2.3. Reaktivne kisikove vrste (ROS) ... **7**

2.4. Testovi toksičnosti ... **9**

2.5. Stanične kulture ... **10**

2.5.1. Konačne i kontinuirane stanične linije ... 10

2.5.2. Stanične kulture u monosloju i u suspenziji ... 11

2.6. Uzgoj stanične linije ... **11**

2.7. Hep G2 stanična linija ... **13**

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... **15**

3.1. Materijal ... **15**

3.1.1. Biološki materijal ... 15

3.1.2. Ekstrakt cvijeta trnine ... 15

3.1.3. Kemikalije ... 15

3.1.4. Otopine i puferi ... 16

3.1.5. Oprema i uređaji ... 20

3.2. Metode rada ... **21**

3.2.1. Uzgoj i održavanje Hep G2 stanica u kulturi ... 21

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue* ... 21

3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica *Kenacid Blue* metodom ... 22

3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica *Neutral Red* metodom ... 22

3.2.5. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metodom ... 23

3.2.6. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta u Hep G2 stanicama tretiranim ekstraktom cvijeta trnine ... 23

3.3. Statistička obrada rezultata ... **25**

4. REZULTATI I RASPRAVA ... **26**

4.1. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica određen *Kenacid Blue* metodom ... **26**

4.1.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji određene *Kenacid Blue* metodom ... 28

4.2. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica određen *Neutral Red* metodom ... **30**

4.2.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji određene *Neutral Red* metodom 32

4.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u Hep G2 stanicama nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine ... **34**

5. ZAKLJUČCI ... **36**

6. LITERATURA ... **38**

1. UVOD

Vodeći uzrok smrti u svijetu je karcinom, a treći najčešći uzrok smrti uzrokovane karcinomom je karcinom jetre. Među različitim oblicima tumora učestalost karcinoma jetre značajno se povećala u posljednjih 20 godina, pri čemu je najčešći oblik primarni karcinom jetre (hepatocelularni karcinom) (Lizcano i sur., 2015). Hepatocelularni karcinom uzrokuje približno milijun smrtnih slučajeva svake godine uglavnom u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju (Seow i sur., 2001).

Zanimanje za otkrivanje kemoterapeutika koji mogu spriječiti tumorsku inicijaciju, odgoditi ili zaustaviti rast tumora i metastaza ili smanjiti smrtnost sve je veće. Također, značajnu pažnju zbog svojih svojstava, uključujući antioksidativno, protuupalno i antitumorsko djelovanje dobili su biljni proizvodi. Biljke i njihove aktivne komponente imaju važnu ulogu u liječenju raka. Pokazalo se da fenolni spojevi ekstrahirani iz ljekovitog bilja imaju zanimljiva biokemijska i farmakološka svojstva, a zbog svog inhibitornog i antioksidacijskog djelovanja djeluju na ključne enzime u upalnom procesu (Lizcano i sur., 2015).

Trnina je višegodišnja biljka koja raste kao grm na obroncima neobrađenih površina. Plodovi, cvjetovi, kora i korijen trnine imaju ljekovita svojstva. Plodovi i cvijetovi trnine bogati su fenolnim komponentama stoga se koriste u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti povezanih s raznim oblicima kašlja, kao blagi laksativ, diuretik, spazmolitik, imaju protuupalni i antiseptički učinak (zbog prisutnosti tanina) te smanjuju upalu sluznice probavnog sustava (Veličković i sur., 2014).

Reaktivne kisikove vrste (ROS, eng. *reactive oxygen species*) su prirodni nusprodukti normalnog metabolizma kisika i imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji. Međutim, tijekom oksidacijskog stresa, razine ROS-a mogu se povećati, a akumulacija rezultira značajnim oštećenjima stanične strukture. Utvrđeno je da oksidacijski stres ima veliku ulogu kod razvoja kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze, srčanog udara, upalnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti i karcinoma.

Cilj ovog rada je istražiti djelovanje ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.*)* na vijabilnost Hep G2 stanične linije primjenom *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metode te odrediti razinu ROS-a u Hep G2 stanicama tretiranima istim ekstraktom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Trnina

Trnina (*Prunus spinosa* L.*)* je višegodišnja biljka porijeklom iz Europe, zapadne Azije i sjeverozapadne Afrike (Radovanović i sur., 2013). Klasifikacija trnine prikazana je u Tablici 1. Raste uglavnom po pašnjacima ili rubovima šuma kao gusto razgranat grm s trnovitim ograncima. Stablo ima vijek do oko 40 godina. Visine je između jednog do pet metara, a tamne grane nose oštre, krute bodlje duge do 8 cm. Razmjerno maleni listovi su veličine od 2 do 4 centimetra. Sitni bijeli cvjetovi cvatu u travnju i svibnju (Slika 1). Plodovi trnine počinju dozrijevati u kolovozu i tada postaju okrugla plavkasto-crna koštunica promjera izmedu 1 i 1,5 centimetara (Slika 2). Vrlo su kiseli i gorki, a nakon mraza postaju ukusniji jer se reducira količina prisutnih tanina, dok su u prosincu najukusniji (Veličković, 2013; Kew, 2016; Gelenčir i Gelenčir, 1991).

Tablica 1. Klasifikacija trnine (*Prunus spinosa* L.) (ITIS, 2016).

CARSTVO	*Plantae*
ODJELJAK	*Tracheophyta*
RAZRED	*Magnoliopsida*
PODRAZRED	*Rosanae*
RED	*Rosales*
PORODICA	*Rosaceae*
ROD	*Prunus*
VRSTA	*Prunus spinosa* L.



Slika 1. Trnina u cvatu (Kew, 2016)



Slika 2. Plod trnine (Kew, 2016)

2.1.1. Upotreba trnine

Trnina se koristi u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti. Koristi se kod liječenja raznih vrsta kašlja, kao diuretik, spazmolitik, antiinflamatorik. Ima antiseptička svojstva (zbog prisutnosti tanina) i smanjuje upalu sluznice probavnog sustava. Pektinske komponente

djeluju umirujuće i opuštajuće na želučane upale, a može se koristiti kao blagi laksativ pri liječenju zatvora. Plodovi trnine pokazali su se korisnima u slučajevima ekcema, herpesa, alergije, prehlada, probavnih smetnji, bubrežnih kamenaca, kožnih problema i problema s mokraćnim mjehurom (Veličković i sur., 2014; Radovanović i sur., 2013; Gelenčir i Gelenčir, 1991). Zbog svojih ljekovitih svojstava plod, cvijet, kora i korijen biljke koriste se u ljekovite svrhe, međutim trnina se koristi i u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova i raznih napitaka poput likera, vina, sokova, kompota i čajeva (Veličković i sur., 2014; Ruiz Rodriguez i sur., 2013).

2.2. Antioksidacijska aktivnost polifenola

Antioksidansi su kemijski spojevi koji u malim koncentracijama u odnosu na oksidanse mogu spriječiti ili usporiti oštećenja stanice. Svaki spoj koji može donirati elektrone i na taj način neutralizirati slobodne radikale ima antioksidacijska svojstva. Antioksidansi djeluju na tri različita načina: onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, neutraliziraju nastale slobodne radikale i popravljaju oštećenja na stanici nastala djelovanjem slobodnih radikala (Štefan i sur., 2007).

Antioksidansi iz hrane korisni su pri spriječavanju negativnih učinaka slobodnih radikala u ljudskom tijelu, što može dovesti do smanjenja rizika nastanka nekih kroničnih bolesti (Ruiz Rodriguez i sur., 2013).

Fenolni spojevi su uobičajeni sastojci voća i povrća. Zanimanje prema fenolnim ekstraktima potječe od dokaza njihove snažane antioksidacijske aktivnosti i širokog raspona farmakoloških svojstava, uključujući antitumorsku aktivnost. Velika raznolikost njihovih struktura utječe na njihova biološka svojstva kao što su bioraspoloživost, antioksidacijsko djelovanje, interakcija sa staničnim receptorima i enzimima (Guimarães i sur., 2014).

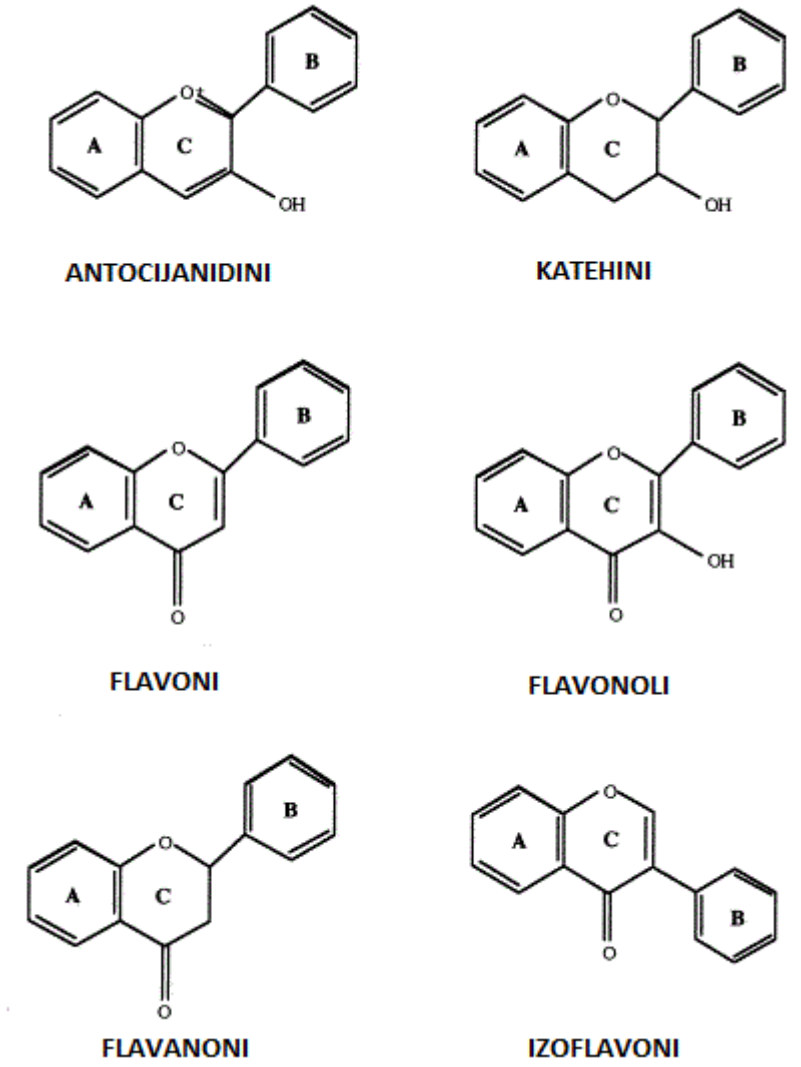
Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se pojavljuju u hrani biljnog porijekla, a opisano ih je preko 4000 (Hollman i Katan, 1999). Posjeduju mnoga biokemijska i farmakološka svojstva koja mogu značajno utjecati na osnovne stanične funkcije popust rasta, diferencijacije i programirane stanične smrti (apoptoze). Najbolje opisano svojstvo u gotovo svakoj skupini flavonoida jest njihova antioksidacijska sposobnost, koja ovisi o položaju funkcionalne grupe u molekuli (Kuntz i sur., 1999; Kumar i Pandey, 2013). Konfiguracija, supstitucija i ukupan broj hidroksilnih grupa značajno utječu na mehanizme antioksidacijske aktivnosti, mehanizme poput vezanja na slobodni radikal ili kelacije metalnih iona. Flavonoidi

imaju idealnu strukturu za vezanje slobodnih radikala i pokazali su se učinkovitijim antioksidansima u *in vitro* uvjetima nego što su to vitamin E i vitamin C (Rice Evans i sur., 1997; Kumar i Pandey, 2013)

Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur koji čine 15 C-atoma raspoređenih u 2 aromatska prstena (A i B) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C). Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne strukture, a uvjetuju ju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, *O*-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikozilacije hidroksilnih grupa (*O*-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Zbog varijacija unutar strukturnih prstenova imamo nekoliko grupa flavonoida koje su prikazane na Slici 3.

Hidroksilna konfiguracija B prstena je najznačajnija pri vezanju na slobodni radikal zato što djeluje kao donor vodika i elektrona hidroksilnim, peroksilnim i peroksinitritnim radikalima pri čemu ih stabilizira i dovodi do nastanka relativno stabilnih flavonoidnih radikala (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi se pojavljuju u obliku glikozida (vezani na šećerne komponente), aglikona (nisu vezani na šećerne komponente) te u obliku metiliranih derivata. Flavonoid glikozid je najčešći oblik flavonoida prisutan u biljkama (Aisling Aherne i O'Brien, 2002). Glikozilacija kod flavonoida najčešće se događa u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Šećerna komponenta koja se najčešće javlja je glukoza, iako se pojavljuju i galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza (Kazazić, 2004; Rice Evans i sur., 1997).



Slika 3. Klasifikacija flavonoida s obzirom na varijacije u heterocikličkom prstenu C (prema Aisling Aherne i O'Brien, 2002)

Raspodjela flavonoida u biljkama ovisi o nekoliko čimbenika kao što su biljni odjeljak, razred, red, porodica, rod i varijacije među vrstama. Također jedan od čimbenika je i stupanj dostupnosti svjetla jer svjetlost ubrzava nastanak viših oksidiranih flavonoida. Flavonoid glikozidi nalaze se uglavnom u lišću, cvijetu i vanjskim dijelovima biljaka, kao što su koža i kora, a prema središtu biljke smanjuje se njihova koncentracija. Faktori koji mogu utjecati na sadržaj flavonoida su vrsta biljke, sezonske pomjene, utjecaj svjetlosti i klime, stupanj zrelosti biljke, pripremanje i procesiranje biljke (Aisling Aherne i O'Brien, 2002).

2.2.1. Polifenolne komponente u trnini

Ekstrakt cvijeta trnine koristi se kao spazmolitik, kao sredstvo za čišćenje krvi, ima antiinflamatorno djelovanje, a zbog sadržaja cijanogenih glikozida može se koristiti i kao blagi laksativ i diuretik (Veličković i sur., 2014; Olszewska i Wolbis, 2001). Aktivne tvari u ekstraktu cvijeta trnine su flavonoidi. U eksperimentima kojeg su provele Olszewska i Wolbis (2001, 2002) iz cvijeta trnine izolirani su sljedeći flavonoidi: kamferol, kvercetin, kamferol 3-*O*-α-L-arabinofuranozid, kvercetin 3-*O*-α-L-arabinofuranozid, kamferol 3-*O*- (2“-E-*p*-kumaroil)-α-L-arabinofuranozid, kamferol 3-*O*-β-D-ksilopiranozid, kamferol-7-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 3-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 3,7-di-*O*-α-L-ramnopiranozid, kvercetin 3-*O*-α-L-ramnopiranozid, kamferol 3-*O*-(4“-β-D-glukopiranozil)-α-L-ramnopiranozid, kvercetin 3-*O*-(4“-β-D-glukopiranozil)-α-L-ramnopiranozid, kvercetin 3-*O*-β-D-glukopiranozid, kvercetin 3-*O*-α-L-arabinopiranozid, kvercetin 3-*O*-α-D-ksilopiranozid.

Pored navedenih, cvijet trnine sadrži i flavonoide rutin i hiperozid (Veličković i sur., 2014).

Koštice trnine su otrovne jer sadrže toksični glikozid amigdalin koji sadrži cijanovodik. Osim flavonoida, potvrđeno je da cvijetovi trnine sadrže proantocijanidine tipa A i fenolne kiseline (Veličković, 2013).

U cvijetu trnine flavonoidi se uglavnom nalaze u obliku monoglikozida dok se u listu nalaze u obliku diglikozida (Veličković i sur., 2014). U istraživanju kojeg su proveli Veličković i sur. (2014) HPLC analizom u plodu trnine utvrđeni su sljedeći spojevi: 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).

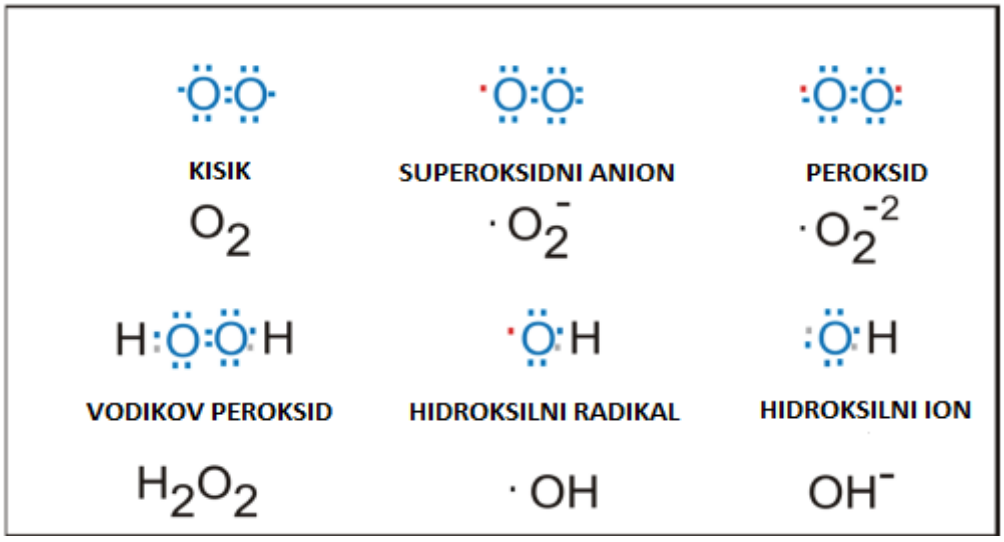
2.3. Reaktivne kisikove vrste (ROS)

Reaktivne kisikove vrste (ROS, eng. *reactive oxygen species*) je izraz koji označava niz reaktivnih molekula i slobodnih radikala koji su izvedeni iz molekularnog kisika (Held, 2014). Slobodni radikali su vrlo nestabilne kemijske čestice koje u vanjskoj ljusci sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Upravo zbog nesparenog elektrona, slobodni radikali su vrlo reaktivni. Nespareni elektroni nastoje se što prije povezati u stabilniji spoj, na način da „uzmu“ elektron nekom drugom spoju. Slobodni radikali reagiraju s

okolnim molekulama kako bi postigli stabilnost, pri čemu molekula s kojom reagiraju postaje novi slobodni radikal. Započeta lančana reakcija prekinut će se kada se spoje dva slobodna radikala, koji svaki sa svojim nesparenim elektronom pridonosi stvaranju čvrste i stabilne kovalentne veze (Štefan i sur., 2007). Izvori slobodnih radikala mogu biti endogeni i egzogeni. Oni kontinuirano nastaju u stanici i okolini. Endogeni slobodni radikali u organizmu mogu nastati tijekom metabolizma kisika, fagocitoze, kemotaksije, apoptoze, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije. Egzogeni izvor slobodnih radikala mogu biti dim cigareta, lijekovi, prehrana, pesticidi, radioaktivno zračenje ili UV-zračenje.

ROS uključuju slobodne radikale kisika kao što su superoksidni, hidroksilni, peroksilni, hidroperoksilni i alkoksilni radikal te određena neradikalna oksidacijska sredstva kao što je vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, ozon i singletni kisik koji se mogu lako pretvoriti u radikale (Bayir, 2005). Strukture čestih reaktivnih kisikovih vrsta prikazane su na Slici 4 (Held, 2014).

ROS se proizvode i za vrijeme normalnog metabolizma i uključeni su u enzimske reakcije, mitohondrijski elektron transport, signalnu transdukciju, aktivaciju transkripcijskih faktora, ekspresiju gena te antimikrobnu aktivaciju neutrofila i makrofaga (Bayir, 2005).



Slika 4. Strukture reaktivnih kisikovih vrsta (prema Held, 2014)

Promjene redoks stanja kao i iscrpljivanje zaliha antioksidanasa zbog izlaganja oksidansima dovodi do oksidacijskog stresa i oštećenja stanica. Kako bi se smanjila razina ROS-a, stanice su razvile učinkovite mehanizme zaštite djelovanjem unutarstaničnih antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, citokrom

oksidaza) i membranskih antioksidanasa (vitamin E, β-karoten, koenzim Q) (Bayir, 2005; Štefan i sur., 2007).

Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa i time može narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u nastanku kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize i procesa starenja (Halliwell i Gutteridge, 2015).

2.4. Testovi toksičnosti

Testovi toksičnosti postaju sve značajniji u ispitivanju toksičnosti spojeva, a temelje se na izlaganju, odnosno ispitivanju učinaka različitih toksičnih tvari na test organizme. Toksičnost se može odnositi na cijeli organizam (čovjek, životinje, biljke ili bakterije), a također i na stanice (citotoksičnost) i organe (npr. jetra - hepatotoksičnost). Različiti lijekovi, kozmetički preparati, prehrambeni aditivi i slično prolazi kroz opsežna ispitivanja toksičnosti prije puštanja u upotrebu (The Academies, 2007; Eisenbrand i sur., 2002).

Testovi toksičnosti dijele se na klasične animalne (*in vivo*) i alternativne (*in vitro*) testove toksičnosti. Klasični testovi toksičnosti koriste se za istraživanje akutne (jedna doza), subakutne (ponavljanje doze do 1 mjeseca), subkronične (ponavljanje doze od 1 do 3 mjeseca) i kronične toksičnosti (ponavljanje doze od 3 mjeseca do 2 godine). Mogu se vršiti hematološka ispitivanja, testovi toksičnosti na reprodukcijski sustav i plodnost te testovi teratogenosti, mutagenosti, očne i kožne iritacije, imunotoksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti, citotoksičnosti (Pravilnik, 1999). Klasični testovi toksičnosti su vrlo dugotrajni i zahtijevaju velik broj pokusnih životinja.

In vitro sustavi su pogodni za istraživanja molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama kemijski izazvane toksičnosti, koja se ne može lako proučavati *in vivo* za ciljane organe. Najznačajnije prednosti korištenja *in vitro* laboratorijskih testiranja su smanjenje broja pokusnih životinja, niža cijena i dostupnost rezultata u relativno kratkom vremenu (Kniewald i sur, 2005; SOT, 2015). Alternativni testovi toksičnosti većinom se koriste kao predtestovi klasičnim animalnim testovima za utvrđivanje raspona aktivnosti tvari ili određivanja raspona

toksične koncentracije. Kod *in vitro* ispitivanja koriste se mikroorganizmi, animalne ili humane stanice.

2.5. Stanične kulture

Stanične kulture imaju široku primjenu kao bitan dio laboratorijskih tehnika za proučavanje biokemijskih i fizioloških procesa, a najčešće se koriste za praćenje djelovanja ispitivanog spoja. U kulturi se mogu uzgajati različiti tipovi stanica, poput stanica tumora, stanica koštanog tkiva, stanice srčanog tkiva, fibroblasti i brojne druge. Sve dok im se osiguravaju hrana i optimalna atmosfera, stanice će rasti i umnažati se. Faktori koji utječu na razmnožavanje stanica su niska koncentracija kalcija, niska gustoća stanica te prisustvo faktora rasta. Prednosti korištenja staničnih kultura u laboratorijskim istraživanjima uključuju kontrolu okoline, karakterizaciju i homogenost uzoraka, *in vitro* modeliranje *in vivo* uvjeta, ekonomičnost, smanjenje broja eksperimentalnih životinja.

Najveći problem kod ovakvih testova je kontaminacija koja može biti kemijska (medij za uzgoj, inkubator, serum, voda) i biološka (bakterije, kvasci, virusi, mikoplazme, unakrsne kontaminacije drugim stanicama), a izvor kontaminacije može biti radna površina, zaposlenici laboratorija, atmosfera, otopine, biološki materijal te laboratorijsko posuđe (Roche Diagnostics GmbH, 2012).

2.5.1. Konačne i kontinuirane stanične linije

Kultura stanica izolirana izravno iz određenog tkiva ili organa, smještena u odgovarajuću okolinu u kojoj će se prihvatiti, dijeliti i rasti naziva se primarnom kulturom. Subkultivacijom primarne stanične kulture nastaje stanična linija. Subkutivaciju je potrebno provesti kada stanice kulture narastu i iscrpe sav dostupan supstrat i ispune sav prostor dostupan za rast (Freshney, 2005; Butler, 2004).

Stanične linije s ograničenim brojem staničnih dioba nazivaju se konačne stanične linije (formiraju se nakon prve subkultivacije primarne stanične kulture). Broj dioba ovisi o vrsti stanične linije, a rastu u ograničenom broju generacija (20-80) prije odumiranja (Butler, 2004). *In vitro* transformacijom stanične linije nastaje kontinuirana stanična linija. Kontinuirane stanične linije imaju neograničeni životni vijek, lakše su za održavanje, rastu brže, lakše se prilagode mediju bez seruma, imaju veću sposobnost kloniranja i mogu rasti u monosloju ili u suspenziji (Freshney, 2005).

2.5.2. Stanične kulture u monosloju i u suspenziji

Stanične kulture mogu rasti u monosloju ili u suspenziji. Stanice koje rastu u suspenziji su slobodne u mediju i serumu te nemaju sposobnost adhezije na površinu boce u kojoj se uzgajaju, dok stanice koje rastu u monosloju adheziraju za staklo ili tretiranu plastičnu površinu.

Precjepljivanje stanica u suspenziji je nešto jednostavnije, brže i manje stresno za stanice jer nije potrebno korištenje tripsina za subkultivaciju, stanicama je potrebno manje prostora za rast i prijenos kulture u veće mjerilo je jednostavnije (Thermo Fisher Scientific, 2015a).

Većina primarnih kultura stanica raste u monosloju. Prednosti rasta stanica u monosloju su lakša promjena medija, mogućnost ispiranja od neželjenih tvari prije dodatka novog medija za uzgoj, učinkovitije izlučivanje produkata i jednostavnija perfuzija zbog imobiliziranosti stanica. Kod stanica koje rastu u monosloju teže je prenošenje kulture u veće mjerilo, stanicama je potrebno više prostora za rast, teža je kontrola pojedinih parametara (npr. pH i koncentracija O_2) i teže je postizanje homogenosti (Freshney, 2005; Thermo Fisher Scientific, 2015b).

2.6. Uzgoj stanične linije

Uzgoj stanične linije nešto je teži u usporedbi s uzgojem kultura mikroorganizama jer stanične linije zahtijevaju više hranjivih tvari, aseptičke uvjete i podložne su raznim kontaminacijama. Zbog izrazite osjetljivosti potrebno je osigurati aseptičke uvjete radom u komori za rad u sterilnim uvjetima (laminar). Radnu površinu i preparate nužno je održavati čistima upotrebom 70 %-tnog etanola.

Kultivacija stanica odvija se u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO_2), na temperaturi 34-37 ˚C i pri pH vrijednosti 7,4 jer većina stanica najbolje raste u tim uvjetima. Povišenje temperature uzrokovat će denaturaciju proteina i potencirati staničnu smrt, dok sniženje temperature neće uzrokovati oštećenje stanica, ali će utjecati negativno na razmnožavanje. Budući da se stanice uzgajaju u kemijski složenom i definiranom tekućem mediju, sastav medija strogo je određen i mora sadržavati sve potrebne sastojke i dodatke (esencijalne aminokiseline, vitamine, soli, saharide, organske dodatke i ostale tvari potrebne za rast i razvoj stanica) ovisno o vrsti stanica koje se uzgajaju.

Medij za uzgoj staničnih linija je kompleksna smjesa ugljikohidrata (glukoza, galaktoza, maltoza i fruktoza predstavljaju glavni izvor energije), aminokiselina (esencijalnih i neesencijalnih), anorganskih soli (održavanje izotoničnosti medija), vitamina (A, C, D, E, B kompleks), hormona i faktora rasta, a za *in vitro* uzgoj životinjskih stanica kroz duži vremenski period, medij se mora dopuniti različitim sastojcima (Slivac i sur., 2014; Butler, 2004) .

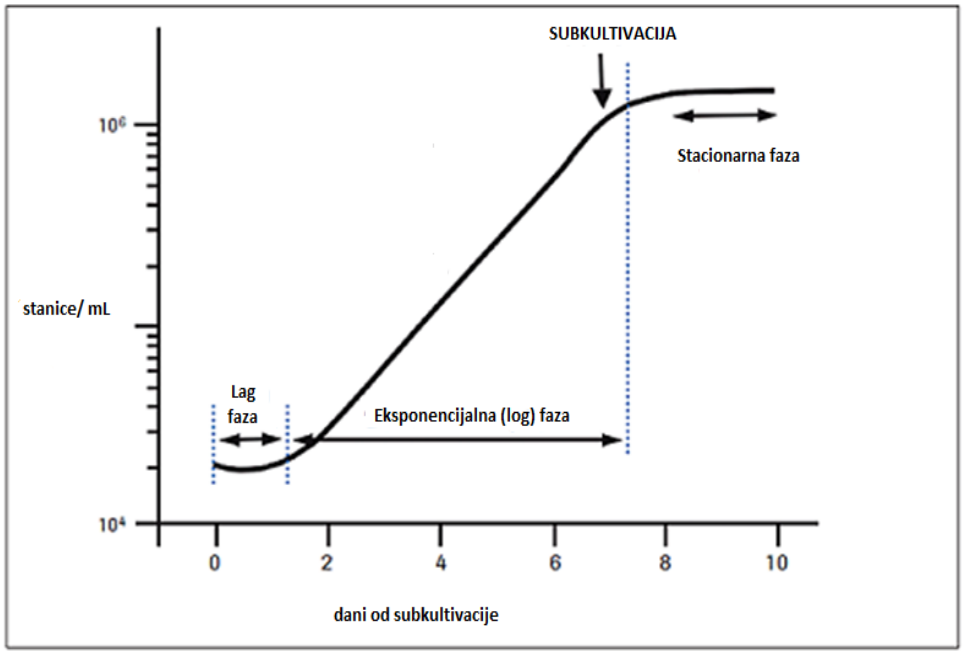
Serum životinjskog ili humanog porijekla uobičajan je dodatak, ali i najvarijabilniji sastojak hranjive podloge. Najčešće se koristi fetalni goveđi serum (FBS), supernatant zaostao nakon koagulacije proteina krvi fetusa goveda. To je složena smjesa velikog broja sastojaka - faktora rasta, proteina (albumin, transferin, globulini), vitamina, minerala (kalcij, natrij, cink, kalij, željezo), elemenata u tragovima, hormona (inzulin, tiroksin, trijodtironin), lipida (kolesterol, masne kiseline, linolenska kiselina, fosfolipidi) itd., esencijalnih za rast i održavanje stanica u kulturi. Nužan je dodatak mediju za uzgoj, jer predstavlja nadomjestak za hormonalni, hranidbeni i stromalni sustav *in vivo* organizma, a dodaje se u količini 5-20 % (Freshney, 2005; Slivac i sur., 2014).

Ovisno o vrsti stanica koje se uzgajaju ovisi i odabir seruma i medija koji su potrebni za rast i razmnožavanje stanica. Kako bi se prevladali nedostaci upotrebe seruma, razvijaju se različite formulacije medija bez seruma tzv. *serum-free* mediji (SFM) kojima se u čistom obliku dodaju hormoni, faktori rasta i ostale komponente sadržane u serumu. Međutim, SFM su općenito specifičniji nego mediji sa serumom pa ih je potrebno posebno razvijati za određene tipove stanica i primjene (Butler, 2004; Slivac i sur., 2014). Kako bi se zadržale karakteristike rasta te morfološka svojstva tijekom uzgoja u SFM, stanice se prethodno moraju prilagoditi na rast u takvim uvjetima (npr. postupnim smanjivanjem udjela seruma) što ponekad može biti dugotrajan i ne nužno uspješan proces.

Budući da se s vremenom pojedine komponente medija iscrpe ili spontano raspadaju, potrebna je periodična zamjena medija za uzgoj stanica. Manjak hranjivih tvari iz medija može izazvati odumiranje stanica. Faktori koji ukazuju da je potrebna promjena medija su pad pH vrijednosti, povećana koncentracija te morfološke promjene stanica. Stanice prestaju rasti kada se pH sa 7,0 spusti na 6,5, a sposobnost za život gube na pH vrijednosti između 6,5 i 6,0. Kao indikator pH vrijednosti u medij može biti dodano fenol crveno (Roche Diagnostics GmbH, 2012; Freshney, 2005).

Kriteriji koji ukazuju da je potrebna subkultivacija stanične linije su gustoća stanične kulture, iskorištenost medija, vrijeme od zadnje subkultivacije stanica i faza rasta u kojem se stanice nalaze (Freshney, 2005; Roche Diagnostics GmbH, 2012). Stanice ne bi trebalo

subkultivirati dok se nalaze u lag fazi u kojoj ne dolazi do povećanja koncentracije stanica, već dok se nalaze između log (eksponencijalne) faze, tijekom koje se stanična populacija udvostručuje, i stacionarne faze rasta, u kojoj nema prirasta biomase stanica (Slika 5).

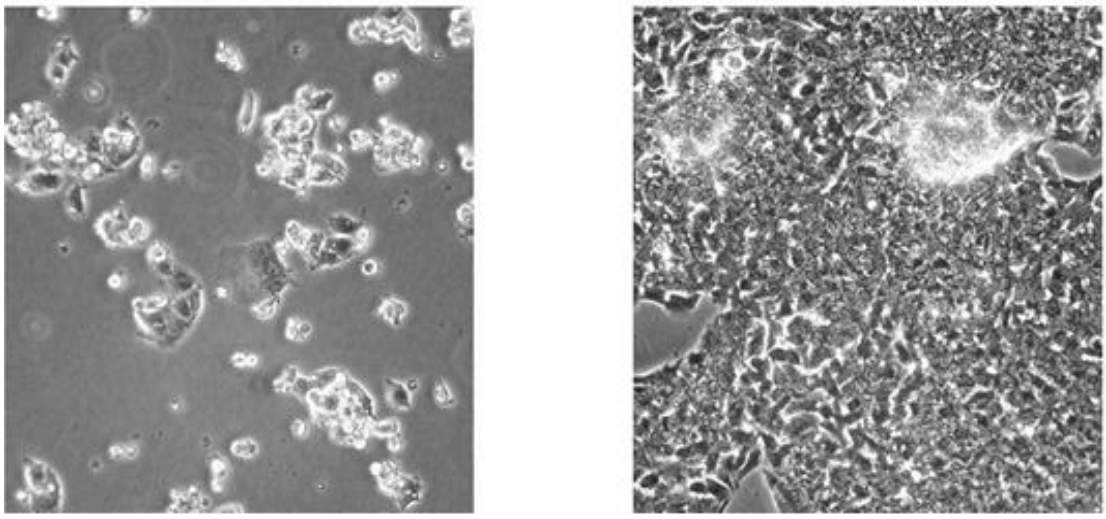


Slika 5. Krivulja rasta stanica i održavanje stanične kulture (prema Roche Diagnostics GmbH, 2012)

2.7. Hep G2 stanična linija

Hep G2 stanična linija je adherentna, epitelna stanična linija dobivena iz jetre hepatocelularnog karcinoma 15-ogodišnjeg američkog bijelca (Slika 6). Za optimalne uvjete kultivacije u medij za uzgoj (Dulbecco MEM/F12) potrebno je dodati fetalni goveđi serum u količini od 10 %. Budući da Hep G2 stanična linija raste u monosloju, tijekom subkultivacije potrebno je provoditi tripsinizaciju (ATCC, 2014).

A B



Slika 6. Hep G2 stanice: A-niska gustoća stanica; B-visoka gustoća stanica (ATCC, 2014)

Zbog njihovog visokog stupnja morfološke i funkcionalne diferencijacije, Hep G2 stanice su prikladan model za proučavanje unutarstaničnih puteva i dinamike žučnih kanalića, membranskih proteina i lipida u humanim hepatocitima *in vitro*. To može biti važno za proučavanje bolesti jetre. Hep G2 stanice također se koriste kao modelni sustav u raznim studijama u kojima se ispituju lijekovi te u studijama metabolizma jetre i toksičnosti ksenobiotika, otkrivanju okolišnih i prehrambenih citotoksičnih i genotoksičnih, a time i citoprotektivnih i antigenotoksičnih agenasa i razumijevanju hepatokarcinogeneze (Mersch-Sundermann i sur., 2004; Knasmüller i sur., 1997).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena stanična linija hepatocelularnog karcinoma ljudske jetre Hep G2.

3.1.2. Ekstrakt cvijeta trnine

U radu je korišten etanolni ekstrakt cvijeta trnine koncentracije ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline u rasponu (10-200 μg/mL).

3.1.3. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

-Dulbecco MEM/F-12, Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
-fetalni goveđi serum (Foetal Bovine Serum, FBS), GIBCO, SAD
-tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
-apsolutni etanol, Alkaloid, Skopje
-dimetilsulfoksid (DMSO) , Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
-boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St.Luis, SAD
-*Coomasie brilliant blue* R-250, LKB, Bromma, Švedska
-ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb
-natrijev klorid, Kemika, Zagreb
-kalijev klorid, Alkaloid, Skopje
-dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
-kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
-destilirana voda (dH_2O)
-kalijev acetat, Kemika, Zagreb
-Neutralrot, E.Merck Ag- Darmstadt, Njemačka
-DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit (ab113851, kit za detekciju ROS-a), Abcam, Cambrige, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.1.4. Otopine i puferi

Dulbecco MEM (GIBCO)

Sastav Dulbecco medija

Sastojci:	**Koncentracija (mg/L)**
anorganske soli:	
$CaCl_2$	116,6
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,0013
$Fe(NO_3)_3$x $9H_20$	0,05
$FeSO_4$ x $7H_20$	0,417
KCl	311,80
$MgCl_2$ anhidrid	28,64
$MgSO_4$ anhidrid	48,84
NaCl	6995,50
$NaHCO_3$	1200,00
$NaHPO_4$	71,02
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,432
NaH_2PO_4 x H_2O	62,5
aminokiseline:	
L-alanin	4,45
L-arginin hidroklorid	147,50
L-asparagin x H_20	7,50
L-aspartat	6,65
L-cistein x HCl x H_2O	17,56
L-cistein x 2HCl	31,29
L-glutaminska kiselina	7,35
L-glutamin	365,000
L-glicin	18,75
L-histidin x HCl x H_2O	31,48
L-izoleucin	54,47
L-leucin	59,05
L-lizin hidroklorid	91,25

L-metionin	17,24
L-fenilalanin	35,48
L-prolin	17,25
L-serin	26,25
L-treonin	53,45
L-triptofan	9,02
L-tirozin x 2Na x $2H_2O$	55,79
L-valin	25,85

vitamini:

biotin	0,0035
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
kolin-klorid	8,98
folna kiselina	2,65
i-inozitol	12,60
nikotinamid	2,02
piridoksin hidroklorid	2,00
riboflavin	0,219
tiamin hidroklorid	2,17
vitamin B12	0,68

ostali sastojci :

D-glukoza	3151,00
Hipoksantin x Na	2,39
HEPES	3075,4
linolna kiselina	0,042
fenol crvenilo	8,10
timidin	0,365
putrescin x 2HCl	0,081
lipoična kiselina	0,105
Na piruvat	55,00

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

NaCl	8 g
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

4 %-tna *stock* otopina *Neutral Red*

Neutral Red	4 g
dH_2O	100 mL

-sterilno profiltrirati

Radna otopina *Neutral Red*

stock otopina *Neutral Red*	125 µL
medij za uzgoj	100 mL

Otopina za odbojavanje *Neutral Red* boje

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

3.1.5. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema:

-komora za rad u sterilnim uvjetima (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija

-inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO_2, Flow Laboratories, Velika Britanija

-centrifuga; Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija

-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

-analitička vaga; Mettler, Zürich, Švicarska

-vibracijska mješalica; Tehnica Železniki, Slovenija

-precizna vaga; Mettler P1210, Zürich, Švicarska

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj i održavanje Hep G2 stanica u kulturi

Prvi korak kod uzgoja i održavanja Hep G2 stanica je odmrzavanje. Stanice se čuvaju u mediju za smrzavanje na temperaturi od -80 ˚C. Medij za smrzavanje čine medij za uzgoj (80 %), FBS (10 %) i DMSO (10 %). Hep G2 smrzavaju se u koncentraciji ~$3x10^6$ stanica/mL. Stanice se naglo odmrznu u inkubatoru, na temperaturi od 37 ˚C i atmosferi od 95 % zraka i 5 % CO_2. Slijedi centrifugiranje pri 1200 okretaja/min u trajanju od 5 minuta te se potom uklanja supernatant. Kada se ukloni supernatant, talog stanica se resuspendira u 10 mL hranjivog medija za uzgoj koji se sastoji od 90 % Dulbecco MEM/F-12 medija i 10 % FBS-a te se potom prenese u T-bocu na daljnju kultivaciju.

Optimalni uvjeti za rast i razvoj stanica su temperatura od 37 ˚C te atmosfera od 95 % zraka i 5 % CO_2, a oni se osiguravaju uzgajanjem stanica u inkubatoru u kojem vladaju navedeni uvjeti. Stanicama je potrebo periodično mijenjati medij za uzgoj koji im osigurava sve hranjive tvari potrebne za rast i razvoj. Kod promjene medija i seruma, monoslojne stanice u T-boci se prvo isperu (PBS-om ili tripsinom) kako bi se uklonio sav iskorišteni medij i serum. Potom se dodaje 1 mL tripsina, proteolitičkog enzima kako bi se stanice odvojile od površine T-boce. Kada se odredi broj stanica *Trypan Blue* metodom, stanice se razrijeđuju na koncentraciju $1x10^5$ stanica/mL medija za uzgoj dodatkom novog medija za uzgoj.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Uzorak od 20 μL suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica resuspendira se s 20 μL 0,4 %-tne otopine boje *Trypan Blue.* Potom 20 μL te suspenzije nanesemo 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. Fuchs-Rosenthalova komorica duboka je 0,2 mm, a njezina površina iznosi 0,0625 mm^2. Ovom metodom je pod svjetlosnim mikroskopom omogućeno brojanje i mrtvih i živih stanica. Mrtve stanice oboje se plavo budući da *Trypan Blue* boja lako prolazi kroz staničnu membranu razorenog integriteta, dok žive stanice ostaju neobojane.

Ukupan broj živih stanicu u uzorku odredi se prema formuli:

Ukupan broj stanica=srednja vrijednost izbrojanih stanica x10^4 (stanica/mL)

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 (Putnam i sur., 2002). *Kenacid Blue* metodom se mjeri ukupna biomasa stanica putem bojanja staničnih proteina bojom *Commassie Brilliant Blue* R-250. Metoda je opisana 1976. godine kao alternativni test za praćenje potencijalnih toksikanata u ispitivanju toksičnosti. Jednostavna je i točna metoda koja daje reproducibilne rezultate.

Postupak određivanja vijabilnosti stanica *Kenacid Blue* metodom započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica mikrotitarskih ploča te ispiranjem stanica dva puta s po 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, a u svaku jažicu mikrotitarske ploče dodaje se 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 vijabilnosti stanica *Neutral Red* metodom

Neutral Red je kationska boja koja aktivnim transportom prolazi kroz staničnu membranu u živu stanicu i akumulira se u lizosomima (Santa Maria i sur., 1997). Stoga se primjenom te boje može odrediti aktivnost lizosoma i Golgijevih tijela u stanicama. Nakon bojanja *Neutral Red* bojom stanice se ispiru, a zatim se inkorporirana boja oslobađa iz stanica u zakiseljenoj otopini etanola. Originalno razvijena od strane Borenfreuda i Puernera, metoda je opisana 1985. godine kao alternativni test za utvrđivanje toksičnosti potencijalnih ksenobiotika. Jednostavna je i točna metoda koja daje reproducibilne rezultate.

Postupak određivanja vijabilnosti stanica *Neutral Red* metodom započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica mikrotitarskih ploča te ispiranjem stanica s 1 mL sterilnog PBS pufera kako bi se uklonili tragovi medija za uzgoj koji mogu utjecati na rezultate mjerenja. U svaku jažicu se potom dodaje 1 mL radne otopine *Neutral Red*. Slijedi inkubacija pri 37 °C u sterilnim uvjetima. Nakon 3 sata inkubacije iz jažica mikrotitarskih ploča uklanja se otopina boje te se stanice ispiru s PBS puferom. U jažice se dodaje 2 mL otopine za odbojavanje, koje se provodi na tresilici u trajanju od 20 minuta. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.5. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metodom

Po 2 mL suspenzije Hep G2 stanica u koncentraciji $5x10^4$ st/mL medija za uzgoj se otpipetira u jažice na mikrotitarskoj ploči. Stanice se inkubiraju 24 sata te se zatim dio jažica tretira različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine. Jedna od jažica na mikrotitarskoj ploči tretira se s 10 µL etanola i služi kao kontrola (5 µL/mL). Ostale jažice tretiraju se 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. Tretirane stanice se inkubiraju 72 sata, a svakih 24 sata ispituje se vijabilnost stanica metodama *Kenacid Blue* i *Neutral Red.* Dobiveni podaci su međusobno uspoređeni kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost stanica.

3.2.6. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta u Hep G2 stanicama tretiranim ekstraktom cvijeta trnine

S ciljem određivanja reaktivnih kisikovih vrsta, Hep G2 stanice uzgojene su u staničnom mediju. Zatim se na tamnu 96-mikrotitarsku ploču nacijepi 100 µL suspenzije Hep G2 stanica u koncentraciji od $2,5×10^5$ st/mL medija za uzgoj. Slijedi inkubacija od 24 sata kako bi se stanice vezale za dno ploče. Nakon inkubacije ukloni se medij i doda 100 µL/jažici 1X pufera. Ukloni se 1X pufer i stanice se bojaju dodatkom 100 µL/jažici razrijeđene otopine 2',7'- diklorofluorescin diacetata (DCFDA) (25 µM). Stanice se inkubiraju s razrijeđenom DCFDA otopinom 45 minuta na 37 °C u mraku. Zatim se ukloni razrijeđena DCFDA otopina i stanice se isperu s 100 µL/jažici 1X pufera ili 1X PBS-a koji se zatim uklone i dio stanica se

tretira etanolom (kontrola), a dio ekstraktom cvijeta trnine, koji je pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 10, 50, 100, 150 i 200 µg/mL te dio stanica tert-butil hidroperoksidom (TBHP) koji služi kao pozitivna kontrola. Stanice se drže u inkubatoru u trajanju od 3 sata. Zatim se očita signal na fluorimetru uz maksimalnu ekscitaciju 485 nm i emisiju spektra na 535 nm. DCFDA je boja koja mjeri aktivnost hidroksil, peroksil i drugih reaktivnih kisikovih vrsta u stanici. Nakon difuzije u stanicu, DCFDA deacetiliraju stanične esteraze u nefluorescentnu komponentu koja kasnije pomoću reaktivnih kisikovih vrsta oksidira u 2',7'- diklorofluorescin (DCF). DCF je intenzivno fluorescentni spoj čija fluorescencija se može odrediti pomoću fluorimetra.

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:

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

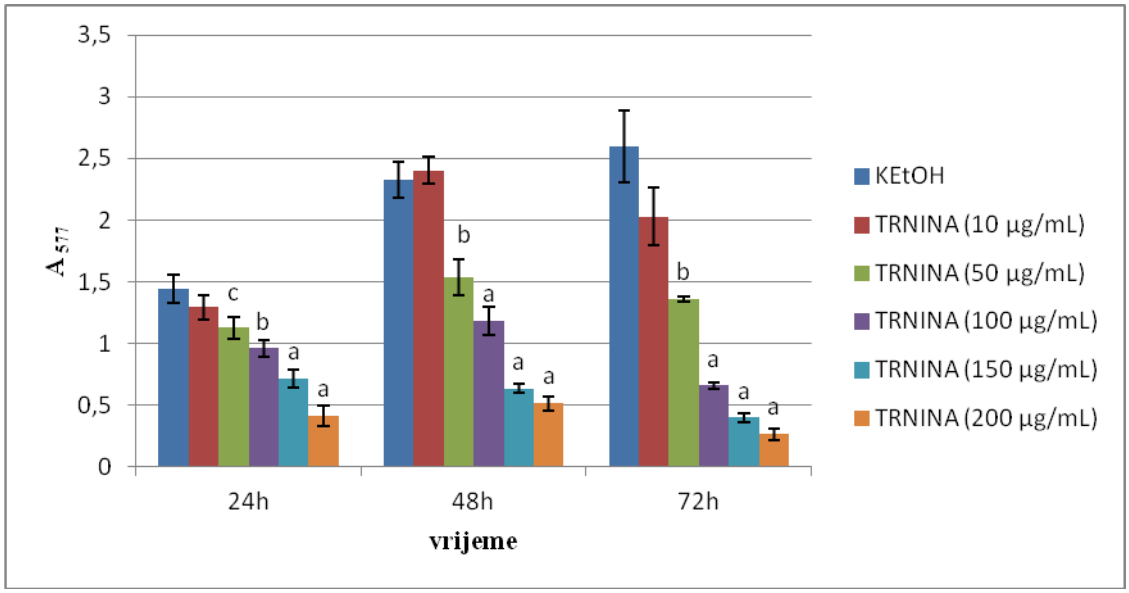
Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti najmanje $p<0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je citotoksični učinak ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2, adherentnoj staničnoj liniji humanog karcinoma jetre. Dodatno, određena je razina reaktivnih kisikovih vrsta. Etanolni ekstrakt cvijeta trnine ispitan je u koncentracijama od 10, 50, 100, 150 i 200 μg/mL. Kako bi se isključila potencijalna toksičnost otapala etanola, ispitan je i njegov učinak na Hep G2 stanice. Proliferacija netretiranih stanica i stanica tretiranih različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine praćena je kroz period od 72 sata metodama *Kenacid Blue* i *Neutral Red*. *Kenacid Blue* je boja koja prolazi kroz staničnu membranu i veže se za proteine u stanicama. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu. *Neutral Red* je kationska boja koja aktivnim transportom prolazi kroz staničnu membranu u živu stanicu i akumulira se u lizosomima. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu. Kao konačni parametar određene su IC vrijednosti - one doze ekstrakta cvijeta trnine pri kojima je došlo do 20 %-tne (IC_{20}), 50 %-tne (IC_{50}) i 80 %-tne (IC_{80}) inhibicije staničnog rasta.

4.1. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica određen *Kenacid Blue* metodom

Za praćenje učinka ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji, stanice se nacjepljuju u jažice mikrotitarskih ploča. U jažice se nacjepljuje po 2 mL stanične suspenzije u koncentraciji 5×10^4 stanica/mL medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju s 10 μL ekstrakta cvijeta trnine u etanolu tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 10-200 μg/mL ekstrakta. Postavi se i kontrolni uzorak. Učinak 10-200 μg/mL ekstrakta cvijeta trnine na proliferaciju Hep G2 stanica praćen je tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue* i prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Proliferacija Hep G2 stanica tretiranih s ekstraktom cvijeta trnine praćena tijekom 72 sata metodom *Kenacid Blue*. K_{EtOH}- kontrola uz dodatak 5 µL etanola/mL medija za uzgoj; 10, 50, 100, 150 i 200 µg/mL – koncentracije ekstrakta cvijeta trnine u mediju za uzgoj. Podaci su određeni iz 3 do 13 uzoraka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$, $^{b}p<0,005$, $^{c}p<0,05$ u usporedbi s kontrolom.

Ispitivanjem utjecaja ekstrakta cvijeta trnine na proliferaciju stanica utvrđena je statistički značajno manja vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu kod svih koncentracija ekstrakta osim kod 10 µg/mL. Koncentracije ekstrakta od 50-200 µg/mL su statistički značajno ($p<0,001$, $p<0,025$, $p<0,05$) inhibirale staničnu proliferaciju tijekom čitavog vremenskog perioda inkubacije (24, 48 i 72 sata).

U istraživanju kojeg su proveli Zhao i sur. (2014) ispitano je djelovanje kvercetina, jednog od flavonoida koji se nalazi i u cvijetu trnine, na Hep G2 stanice. Stanice su tretirane kvercetinom u koncentracijama od 0-200 µM, a vijabilnost stanica utvrđena je *MTT* metodom. Rezultati pokazuju da se vijabilnost Hep G2 stanica smanjila na 52 % kod koncentracije kvercetina od 25 µM, a kod koncentracije od 50 µM preživjelo je 34 %. Stanični rast je za 82 % inhibiran kod koncentracije kvercetina od 200 µM u usporedbi sa kontrolom. Potvrđeno je da kvercetin ima veliki inhibitorni učinak na vijabilnost Hep G2 stanica, a IC_{50} vrijednost iznosi 24 µM.

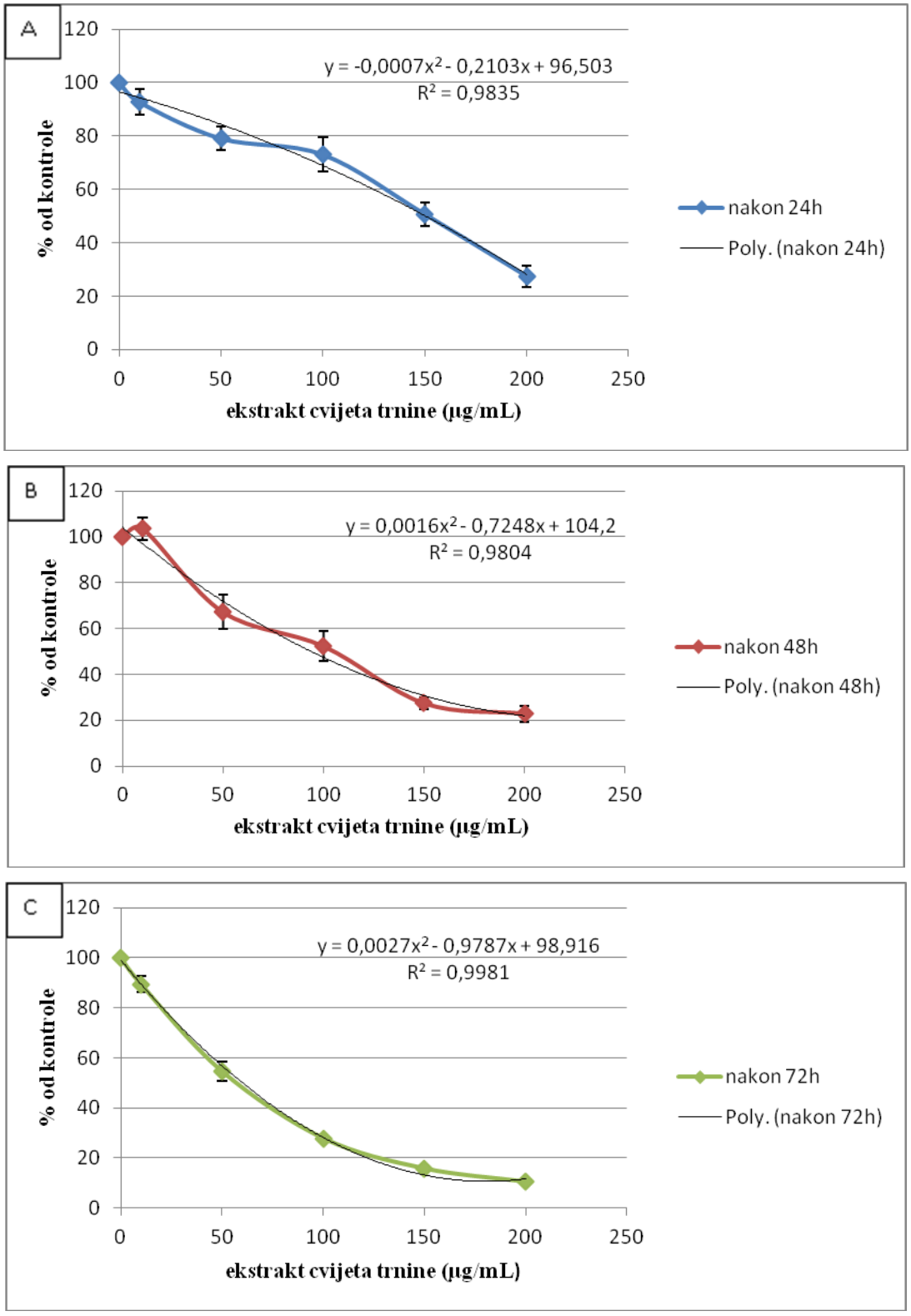
U istraživanju kojeg su proveli Ramos i sur. (2008) također je ispitano djelovanje kvercetina na Hep G2 stanice. Tretiranje stanica različitim koncentracijama kvercetina kroz inkubaciju od 72 sata pokazalo je inhibiciju rasta stanica koja je utvrđena *MTT* metodom. Nakon 24 sata utvrđena je inhibicija od 30 i 45 % pri koncentracijama od 25 i 50 µM, a nakon 72 sata inhibicija od 40 i 86 % pri koncentracijama od 12,5 i 25 µM.
Potvrđeno je inhibitorno djelovanje kvercetina dok se za rutin, flavonoid također prisutan u cvijetu trnine, pokazalo da ni jedna koncentracija kojom su tretirane stanice nema inhibitorni učinak na vijabilnost stanica.

Iz rezultata dobivenih metodom *Kenacid Blue* u ovom radu može se zaključiti kako ekstrakt cvijeta trnine također smanjuje vijabilnost stanica, a njegov negativan učinak na proliferaciju i staničnu aktivnost Hep G2 povećava se s povećanjem koncentracije ekstrakta.

4.1.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji određene *Kenacid Blue* metodom

Ovisnost preživljavanja Hep G2 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolu tretiranu etanolom praćena je tijekom 24, 48 i 72 sata te je prikazana na Slici 8. Raspon ispitanih doza ekstrakta cvijeta trnine je od 10 do 200 µg/mL pri čemu je učinak pojedine doze određen iz najmanje 3, a najviše 13 mjerenja. IC vrijednosti su izračunate iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (*trend line*) koje najmanje odstupaju od izmjerenih podataka pri čemu se kod odabira interpolirane krivulje težilo da njoj pripadajući koeficijent determinacije (R^2) bude što bliži 1. Vrijednost koeficijenta determinacije kreće se u intervalu $0 \leq R^2 \leq 1$. Regresijski model je reprezentativniji ukoliko je ovaj pokazatelj bliži 1.

Iz pripadajućih jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja nakon 24, 48 i 72 sata izračunate su IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti koje predstavljaju one koncentracije ekstrakta cvijeta trnine kod kojih dolazi do 20, 50 i 80 %-tne inhibicije staničnog rasta. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine nakon 24 sata iznosi 148,11 µg/mL, nakon 48 sata 94,49 µg/mL i nakon 72 sata 59,87 µg/mL (Tablica 2).



Slika 8. Vijabilnost Hep G2 stanica nakon 24 (A), 48 (B) i 72 (C) sata uz tretman s 10-200 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Kenacid Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardno odstupanje, određenu iz 3 do 13 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

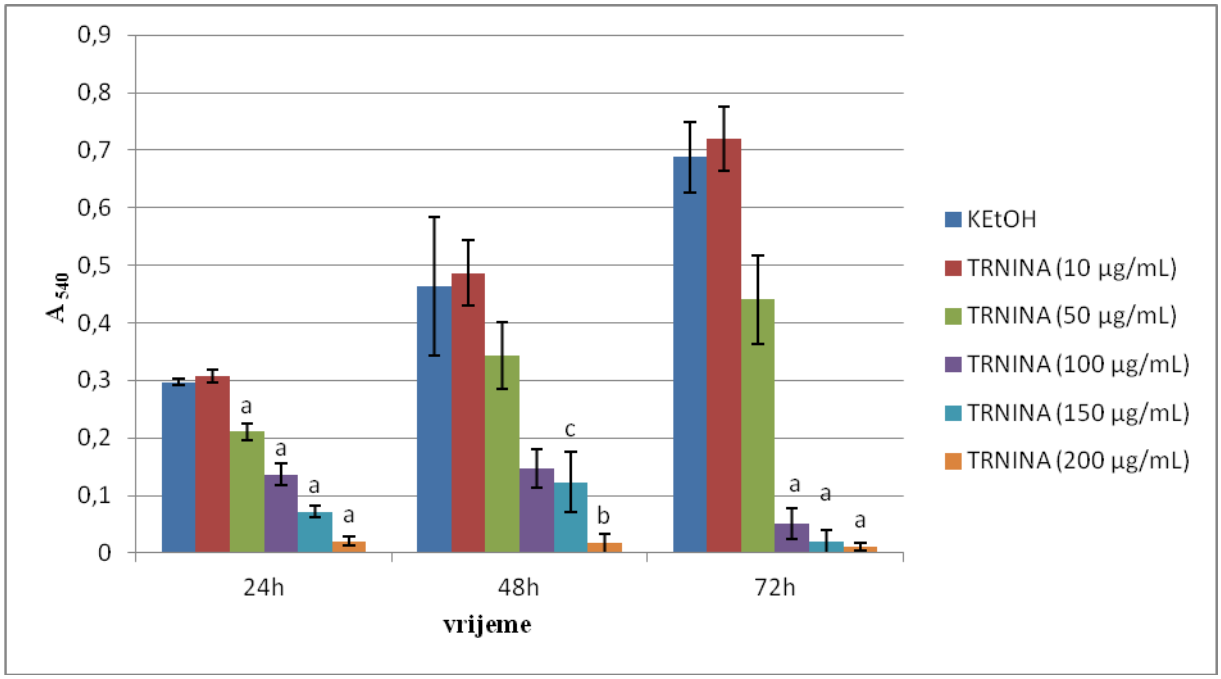
Tablica 2. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata.

IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 stanicama (µg/mL)	**vrijeme**		
	24h	**48h**	**72h**
IC_{20}	64,59	36,30	20,49
IC_{50}	148,11	94,49	59,87
IC_{80}	212,90	/	121,07

4.2. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica određen *Neutral Red* metodom

Hep G2 stanice se nacijepe na mikrotitarske ploče sa 6 jažica tako da se u svaku jažicu otpipetira 2 mL suspenzije stanica u koncentraciji 5×10^4 stanica/mL medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju ekstraktom cvijeta trnine u koncentracijama od 10-200 µg/mL. Postavi se i kontrolni uzorak. Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica praćen je tijekom 72 sata metodom *Neutral Red.*

Rezultati učinka ispitivanog ekstrakta na vijabilnost Hep G2 stanica statistički su obrađeni i prikazani na Slici 9.



Slika 9. Proliferacija Hep G2 stanica tretiranih s 10-200 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine praćena tijekom 72 sata metodom *Neutral Red.* Podaci su određeni iz 3 do 5 uzoraka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$, $^{b}p<0,01$, $^{c}p<0,05$.

Najniža koncentracija ekstrakta cvijeta trnine (10 µg/mL) nije statistički značajno utjecala na proliferaciju Hep G2 stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane etanolom). Koncentracije od 50-200 µg/mL su statistički značajno ($p<0,001$) inhibirale staničnu proliferaciju već nakon 24 sata inkubacije. Nakon 48 sati, koncentracije od 150 µg/mL i 200 µg/mL statistički su značajno inhibirale staničnu proliferaciju ($p<0,01$, $p<0,05$), dok su koncentracije od 100 µg/mL, 150 µg/mL i 200 µg/mL statistički značajno, gotovo u potpunosti, inhibirale staničnu proliferaciju nakon 72 sata ($p<0,001$).

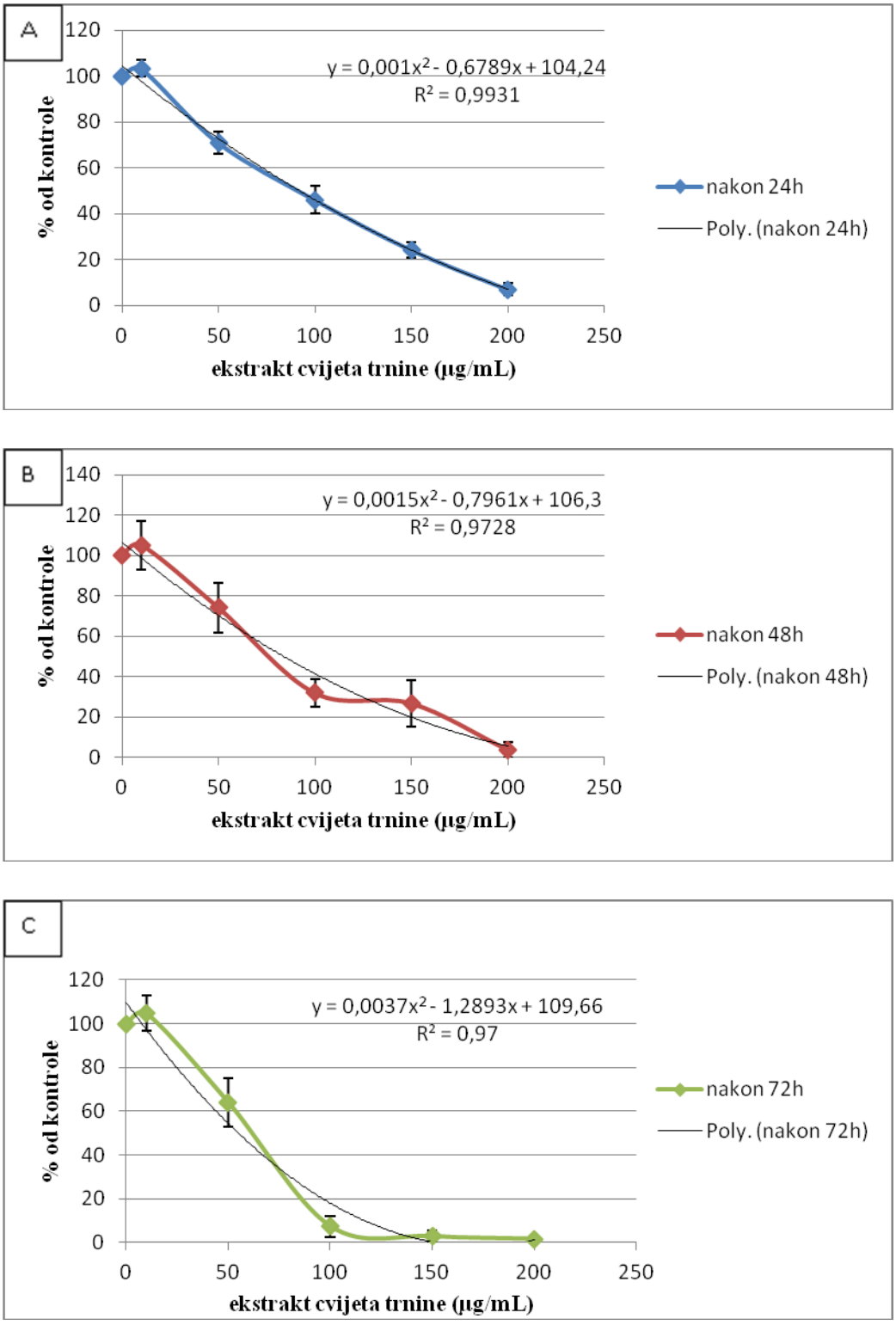
U istraživanju kojeg su proveli Barcelos i sur. (2011) ispitano je djelovanje kvercetina i rutina na Hep G2 stanice. Za određivanje vijabilnosti stanica korištena je *Trypan blue* metoda. Utvrđeno je da koncentracije kvercetina iznad 10 µg/mL i koncentracije rutina iznad 50 µg/mL imaju citotoksični efekt na stanice.

Iz rezultata dobivenih metodom *Neutral Red*, poput onih dobivenih *Kenacid Blue* metodom, u ovom radu može se potvrditi kako ekstrakt cvijeta trnine smanjuje vijabilnost stanica, a njegov negativan učinak na proliferaciju i staničnu aktivnost povećava se s povećanjem koncentracije ekstrakta.

4.2.1. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji određene *Neutral Red* metodom

Ovisnost preživljavanja Hep G2 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolu etanolom praćena je tijekom 24, 48 i 72 sata te je prikazana na Slici 10. Raspon ispitanih doza ekstrakta cvijeta trnine je od 10 do 200 µg/mL pri čemu je učinak pojedine doze određen iz najmanje 3, a najviše 5 mjerenja. IC vrijednosti su izračunate iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (*trend line*) koje najmanje odstupaju od izmjerenih podataka pri čemu se kod odabira interpolirane krivulje težilo da njoj pripadajući koeficijent determinacije (R^2) bude što bliži 1.

Iz pripadajućih jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja nakon 24, 48 i 72 sata izračunate su IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti. IC_{50} vrijednost određena *Neutral Red* metodom za ekstrakt cvijeta trnine nakon 24 sata iznosi 92,50 µg/mL, nakon 48 sata 84,02 µg/mL i nakon 72 sata 54,93 µg/mL (Tablica 3).



Slika 10. Vijabilnost Hep G2 stanica nakon 24 (A), 48 (B) i 72 (C) sata uz tretman s 10-200 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Neutral Red* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardno odstupanje, određenu iz 3 do 5 mjerenja. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

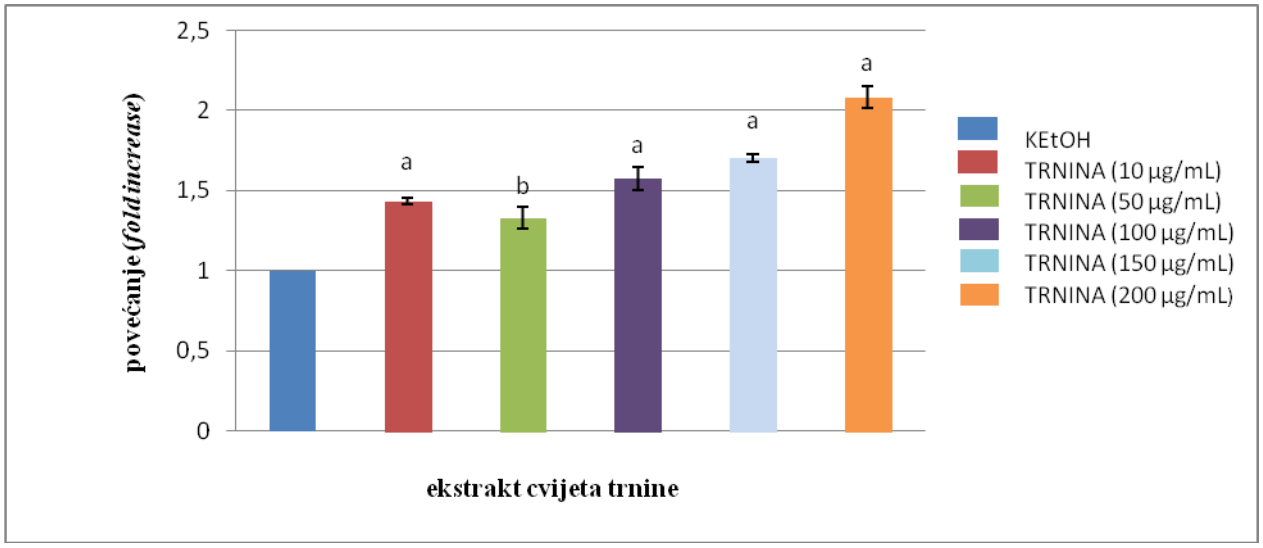
Tablica 3. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Neutral Red* nakon 24, 48 i 72 sata.

IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 stanicama (µg/mL)	**vrijeme**		
	24h	**48h**	**72h**
IC_{20}	37,81	35,40	24,76
IC_{50}	92,50	84,02	54,93
IC_{80}	163,42	151,85	95,98

4.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u Hep G2 stanicama nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine

Nakon što je s dvije validirane metode - *Kenacid Blue* i *Neutral Red*, određen inhibitorni učinak ekstrakta cvijeta trnine na proliferaciju humanih kanceroznih stanica jetre, u slijedećoj fazi, određena je indukcija ROS-a u tretiranim stanicama kao mogući mehanizam citotoksičnosti.

Hep G2 stanice tretirane su različitim koncentracijama trnine (10-200 µg/mL), a nastali ROS izmjereni su pomoću fluorimetra. Rezultati učinka ispitivanog ekstrakta na razinu ROS-a u Hep G2 stanicama statistički su obrađeni i prikazani na Slici 11.



Slika 11. Razina ROS-a u Hep G2 stanicama tretiranim s ekstraktom cvijeta trnine. K_{EtOH}-kontrola uz dodatak 10 µL etanola; 10, 50, 100, 150 i 200 µg/mL – koncentracije ekstrakta cvijeta trnine. Podaci su određeni iz 4 uzorka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$, $^{b}p<0,01$ u odnosu na kontrolu.

U istraživanju kojeg su proveli Chang i sur. (2006) pomoću protočne citometrijske analize ispitano je da li kvercetin, jedan od aktivnih sastojaka ekstrakta cvijeta trnine, ima utjecaj na razinu superoksida i peroksida u Hep G2 stanicama. Rezultati pokazuju da kvercetin povisuje razinu superoksida i peroksida u Hep G2 stanicama.

U istraživanju kojeg su proveli Barcelos i sur. (2011) utvrđeno je pomoću fluorescentne spektroskopije da više koncentracije kvercetina (50, 100 i 200 µg/mL) i rutina (100 i 200 µg/mL) induciraju oksidacijski stres. Istražena je i primjena kvercetina i rutina istovremeno s H_2O_2, kvercetin u koncentracijama od 1 i 5 µg/mL i rutin u koncentracijama od 0,1, 1 i 5 µg/mL i utvrđeno je da reduciraju oksidacijski stres induciran pomoću H_2O_2.

Ekstrakt cvijeta trnine, korišten u ovom radu, u koncentracijama od 10 do 200 µg/mL statistički značajno potiče nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta u Hep G2 stanicama u odnosu na kontrolu ($p<0,001$, $p<0,01$) što ukazuje na mogući mehanizam citotoksičnosti.

5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija humanog karcinoma jetre, Hep G2, uz primjenu metoda *Kenacid Blue* i *Neutral Red* pokazala se kao zadovoljavajući alternativni test sustav u *in vitro* praćenju učinaka ekstrakta cvijeta trnine.

2. Ispitivanjem utjecaja ekstrakta cvijeta trnine na proliferaciju stanica, metodom *Kenacid Blue*, utvrđen je statistički značajno manji broj stanica u odnosu na kontrolu kod svih koncentracija ekstrakta osim kod 10 µg/mL. Koncentracije ekstrakta od 50-200 µg/mL su statistički značajno ($p<0,05$- $p<0,001$) inhibirale staničnu proliferaciju tijekom čitavog vremenskog perioda inkubacije (24, 48 i 72 sata).
   Citotoksični učinak ekstrakta cvijeta trnine povećava se povećanjem koncentracije ispitivanog ekstrakta.

3. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine, određena metodom *Kenacid Blue*, nakon 24 sata iznosi 148,11 µg/mL, nakon 48 sati 94,49 µg/mL i nakon 72 sata 59,87 µg/mL. Niža IC vrijednost zabilježena nakon 72 sata, u odnosu na one nakon 24 i 48 sati, ukazuje da je u tom periodu inkubacije citotoksično djelovanje ekstrakta cvijeta trnine najizraženije.

4. Metodom *Neutral Red* određeno je da ekstrakt cvijeta trnine u koncentracijama od 50-200 µg/mL statistički značajno ($p<0,001$) inhibira staničnu proliferaciju već nakon 24 sata inkubacije. Nakon 48 sati, koncentracije od 150 µg/mL i 200 µg/mL su statistički značajno inhibirale staničnu proliferaciju ($p<0,01$, $p<0,05$) dok su koncentracije od 100 µg/mL, 150 µg/mL i 200 µg/mL statistički značajno inhibirale staničnu proliferaciju nakon 72 sata ($p<0,001$). Najniža koncentracija ekstrakta cvijeta trnine (10 µg/mL) nije statistički značajno utjecala na proliferaciju Hep G2 stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane etanolom) što je u korelaciji s rezultatima dobivenim metodom *Kenacid Blue*.

5. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine, određena metodom *Neutral Red*, nakon 24 sata iznosi 92,50 µg/mL, nakon 48 sati 84,02 µg/mL i nakon 72 sata 54,93 µg/mL.

6. Usporedbom IC_{50} vrijednosti vidljivo je da je *Neutral Red* metoda osjetljivija.

7. Ekstrakt cvijeta trnine inducira nastajanje ROS-a u Hep G2 stanicama što ukazuje na mogući mehanizam citotoksičnog učinka.

6. LITERATURA

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

ATCC (2014) Hep G2 cells ATCC HB-8065, American Type Culture Collection, <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=hr>. Pristupljeno 25.lipnja 2016.

Barcelos, G.R.M., Grotto, D., Angeli, J.P.F., Serpeloni, J.M., Rocha, B.A., Bastos, J.K., Barbosa, F. (2011) Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. *Phytother. Res.* **25**, 1381–1388.

Bayir, H. (2005) Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* **33,** 498-501. doi: 10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12

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

Chang, Y.F., Chi, C.W., Wang, J.J. (2006) Reactive oxygen species production is involved in quercetin-induced apoptosis in human hepatoma cells. *Nutr. Cancer* 55, 201-209.

Eisenbrand, G., Pool-Zobelb, B., Bakerc, V., Ballsd, M., Blaauboere, B.J., Boobisf, A., Carereg, A., Kevekordesh, S., Lhuguenoti, J.C., Pieterse, R., Kleinerj, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40,** 193-236.

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

Gelenčir, J., Gelenčir, J., (1991) Atlas ljekovitog bilja. Zagreb: Prosvjeta

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 Foods Hum. Nutr.* **69,** 37-42.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free Radical in Biology and Medicine*, 5.izd., Oxford University Press, New York.

Held, P. (2014, 26.siječanj) An introduction to reactive oxygen species, BioTek Instruments, Inc., <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>. Pristupljeno 18. lipnja 2016.

Hollman, P.C.H, Katan, M.B. (1999) Dietary flavonoids: intake, health efects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **37,** 937-942.

ITIS (2016) *Prunus spinosa* L., Integrated Taxonomic Information System, <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24802>. Pristupljeno 02. srpnja 2016.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada.*

Toksikol. **55,** 279-290.

Kew (2016) *Prunus spinosa* (blackthorn), Kew Royal Botanic Garden, <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/prunus-spinosa-blackthorn>. Pristupljeno 25. lipnja 2016.

Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1997) Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res.* **402**, 185–202.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toxicol.* **56,** 195-204.

Kumar, S., Pandey, A.K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* 2013, doi: 10.1155/2013/162750

Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.* **38**, 133–142.

Lizcano, L.J., Siles, M., Trepiana, J., Hernández, M.L., Navarro, R., Ruiz Larrea, M.B., Ruiz Sanz, J.I. (2015) *Piper* and *Vismia* species from Colombian Amazonia differentially affect cell proliferation of hepatocarcinoma cells. *Nutrients* **7**, 179-195. doi:10.3390/nu7010179

Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* **198**, 329–340. doi:10.1016/j.tox.2004.02.009

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.

Pravilnik o mjerilima za razvrstavanje otrova u skupine (1999) *Narodne novine* 27, Zagreb.

Putnam, K.P., Bombick, D.W., Doolittle, D.J. (2002) Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. In Vitro* **16,** 599-607.

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

Ramos, A.A., Limaa, C.F., Pereira, M.L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2008) Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicol. Lett.* **177** , 66–73.

Rice Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.

Roche Diagnostics GmbH (2012) Culture of Animal Cells - Basic Techniques, <https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/X-tremeGENE_TT_10.12.pdf>. Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Ruiz Rodríguez, B.M., Ancos, B., Sánchez Moreno, C., Fernández Ruiz, V., Sánchez Mata, M.C., 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.

Santa Maria, A., Lopez, A., Diaz, M.M., Alban, J., Galan de Mera, A., Vicente Orellana, J.A., Pozuelo, J.M. (1997) Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by biassays *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* **57,** 183-187.

Seow, T.K., Liang, R.C.M.Y., Leow, C.K., Chung, M.C.M. (2001) Hepatocellularcarcinoma: From bedside to proteomics. *Proteomics* **1**, 1249-1263.

Slivac, I., Radošević, K., Dukić, B., Gaurina Srček, V. (2014) Cultivation of CCO cells on non-porous microcarriers in low-serum conditions. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **9**, 43-47.

SOT (2015) Alternative toxicity test methods: Reducing, refining, and replacing animal use for safety testing, SOT- Society of toxicology, <http://www.toxicology.org/pubs/docs/pr/toxtopics/tt3_invitro_sot.pdf#search=%22Alternative Toxicity Test Reducing Refining Replacing Animal Use for Safety Testing%22>. Pristupljeno 29. lipnja 2016.

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* **43**, 84-93.

The Academies (2007) Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy, The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, <http://dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/reports-in-brief/Toxicity_Testing_final.pdf>. Pristupljeno 29. lipnja 2016.

Thermo Fisher Scientific (2015a) Subculturing Suspension Cells, Thermo Fisher Scientific Inc., <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/subculturing-suspension-cells.html>. Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Thermo Fisher Scientific (2015b) Subculturing Adherent Cells, Thermo Fisher Scientific Inc., <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/subculturing-adherent-cells.html>. Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Veličković, J.M., Kostić, D.A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., 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. doi:10.2298/HEMIND130312054V

Veličković, J.M. (2013) Kemijska analiza i antioksidativnu aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim spojevima. Doktorska disertacija. Niš: Prirodno-matematički fakultet, Odjel za kemiju

Zhao, P., Mao, J.M., Zhang, S.J., Zhou, Z.Q., Tan, Y., Zhang, Y. (2014) Quercetin induces HepG2 cell apoptosis by inhibiting fatty acid biosynthesis. *Oncol. Lett.* 8, 765-769.