



STRUČNI RAD / PROFESSIONAL PAPER

Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka

The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants

Ivana Radojčić Redovniković, Marina Cvjetko Bubalo, Višnja Gaurina Srček, Kristina Radošević*

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-bio-tehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author:

Tel. +385-1-46 05 136; Fax. +385-1-46 05 065; E-mail: kristina.radosevic@pbf.hr

Sažetak

Prirodni proizvodi poput žitarica, orašastih plodova, voća, povrća i ljekovitog bilja sadrže brojne biološki aktivne tvari (fenolne spojeve, glukozinolate, karotenoide, alkaloidne i dr.) koje mogu imati različite povoljne, ali i nepovoljne učinke na organizam. Povoljni učinci na zdravlje ljudi povezuju se s antitumorskim, antialergijskim, antibiotskim, antioksidacijskim i drugim svojstvima koje mogu posjedovati biološki aktivne tvari iz biljaka. Utvrđeno je da djelovanje navedenih tvari ima zaštitni učinak kod širokog raspona tumorskih oboljenja, smanjuje mogućnost pojave koronarnih bolesti, srčanog udara te štiti organizam od oksidativnog stresa uzrokovanog slobodnim radikalima. Stoga se sve više ispituje primjena biološki aktivnih tvari iz biljaka kao izvora novih lijekova, pri čemu se u istraživanjima često koriste in vitro testovi koji uključuju uporabu različitih humanih staničnih linija.

Stanične linije koriste se u procjeni toksičnosti kemikalija i uzoraka iz okoliša te predstavljaju vrlo koristan alternativni pristup u (eko) toksikološkim istraživanjima. Također, često se koriste pri ispitivanju biološke aktivnosti spojeva prisutnih u biljkama, osobito voću i povrću, te raznih proizvoda koji se baziraju na tim sirovinama. Interakcija ispitivane tvari i bioloških sustava odvija se ponajprije na staničnoj razini, na čemu se temelji primjena in vitro staničnih kultura, koje omogućuju brže i ekonomičnije studije u odnosu na in vivo istraživanja. Kod in vitro testova najčešće se određuje tzv. bazalna citotoksičnost, kojom se određuje učinak ispitivane tvari na preživljenje stanica u kulturi, a tako dobiveni rezultati mogu poslužiti kao smjernice za daljnja in vivo istraživanja.

Ključne riječi: biljke, biološki aktivne tvari, humane stanične linije, in vitro biološka aktivnost

Summary

Natural products such as cereals, nuts, fruits, vegetables and herbs contain many biologically active substances (phenolic compounds, glucosinolates, carotenoids, alkaloids, etc.) which may have a different favorable, but also the adverse effects on the organism. Beneficial effects on human health are associated with antitumor, antiallergy, antibiotic, antioxidant and other properties of plant's biologically active substances. It was found that the biological activities of such substances have a protective effect toward different types of tumors, reduces the incidence of coronary heart disease, heart attack and protect the organism from oxidative stress caused by free radicals. Therefore, biologically active substances from the plants are being investigated as a potential source of new drugs, wherein in vitro assays using different cell line are frequently applied.

Cell lines represent a useful alternative approach in the (eco)toxicological studies and are often used to assess the toxicity of chemicals and environmental samples. In addition, human cell lines are used in testing biological activity of compounds present in plants, especially fruit and vegetables, and a variety of products based on it. The interaction of the test substance and biological systems occurs preferentially at the cellular level, what is the fact on which the application of in vitro cell cultures is based on. Also, the application of in vitro cell cultures enables faster and more cost-effective studies compared to in vivo studies. Generally, by in vitro tests basal cytotoxicity is determined, by which the effect of the test substance on cell survival is determined. Therefore, the findings gain by in vitro tests could serve as guidelines for further in vivo studies of biological activity of compounds.

Key words: plants, biologically active compounds, human cell lines, in vitro biological activity



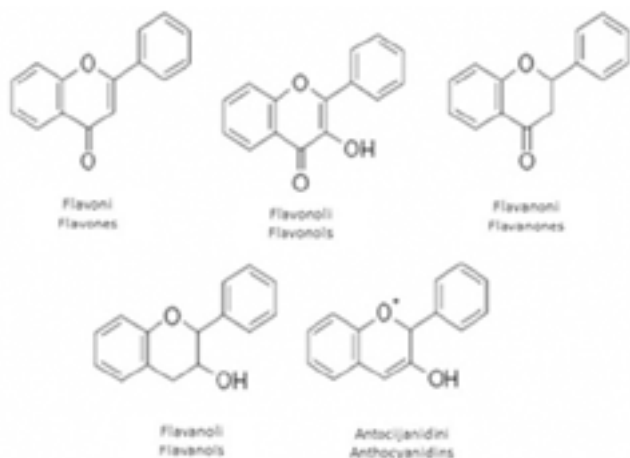
Uvod

Biološki aktivni sastojci hrane su tvari prisutne u hrani najčešće u malim količinama, s dokazanim dvojnim, povoljnim i nepovoljnim, učinkom na zdravlje ljudi. Odlikuju se sposobnošću da svojom biološkom aktivnošću smanje ili potpuno uklone učinak štetnih tvari u ljudskom organizmu. Osim poželjnog učinka na zdravlje, pojam biološke aktivnosti može se odnositi i na nepovoljne učinke na organizam i tada govorimo o toksičnosti tih sastojaka. Biološki aktivni sastojci hrane međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji u organizmu, a tu se ubrajaju razne skupine spojeva: vitamini i minerali, enzimi, karotenoidi, fitosteroli, glukozinolati, polifenolni spojevi, glikozidi, alkaloidi i druge tvari prisutne u hrani. Navedeni spojevi, uneseni i prisutni u organizmu u odgovarajućim količinama, mogu povoljno utjecati na zdravlje čovjeka tj. na različite organske sustave kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, nervni, imunološki i drugi. Smatra se da se najveći broj biološki aktivnih tvari nalazi u biljkama odnosno voću, povrću i žitaricama (Jašić, 2010). Biološki aktivni nenutritivni sastojci iz biljaka nazivaju se fitokemikalije, odnosno fitonutrijenti. Biljke ih sintetiziraju sa ciljem samozaštite od abiotskih i biotskih stresnih faktora, a fiziološki gledano to su produkti sekundarnog metabolizma, koje biljka ne treba za primarne potrebe rasta i razmnožavanja. Najveći interes znanstvenika usmjeren je na skupinu polifenolnih spojeva koji su sveprisutni u biljnom carstvu, pa tako i u svakodnevnoj prehrani i životu čovjeka.

Sve vrste voća sadrže biološki aktivne fitokemikalije kao što su već spomenuti polifenolni spojevi, a količine i vrste biološki aktivnih tvari razlikuju se ovisno o vrstama voća. Među polifenolnim spojevima najzastupljeniji su flavonoidi (slika 1) koji su podijeljeni u podskupine: flavoni, flavononi, flavonoli, izoflavonoidi, flavani, izoflavani, flavanoli i antocijani. Osim što su najbrojniji, flavonoidi imaju i najznačajniji biološki utjecaj te im se pripisuju antitumorska, protuupalna, antioksidativna, antimikrobna, antivirusna, kardio- i neuro-protektivna svojstva.

Slika 1. *Strukturne formule flavonoida (Anonymous 1, 2013)*

Figure 1. *The structural formula of flavonoids (Anonymous 1, 2013)*



Istraživanja bobičastog voća pokazala su da sadrže visok udio flavonoida i fenolnih kiselina u odnosu na druge vrste voća. Dokazano je da bobičasto voće tamnije boje sadrži višu koncentraciju polifenolnih spojeva od svjetlije obojenog te da visoki sadržaj polifenolnih spojeva korelira s dobrom antioksidacijskom aktivnošću navedenog voća (Jašić, 2010). Osim bobičastog voća, grožđe (*Vitis* spp.) je vrlo često predmet znanstvenih istraživanja kao vrlo dobar izvor biološki aktivnih tvari. Grožđe je jedna od najekonomičnijih biljaka koja se koristi u proizvodnji vina, sokova i ostalih prehrambenih proizvoda te se navodi kao bogat izvor vrijednih fitonutrijenata (Georgiev i sur., 2014) s višestrukim pozitivnim učincima na zdravlje (Ramirez-Tortosa i sur., 2001; McDougall i sur., 2005; Miguel, 2011), pri čemu su upravo polifenolni spojevi najvažnije fitokemikalije u grožđu (Ferri i sur., 2015). Osim o vrsti voća, količina, sastav i fiziološki učinak biološki aktivnih tvari ovisi i o njihovoj kemijskoj strukturi. Tako se npr. antocijani, pigmenti koji daju plavu, crvenu, ljubičastu i narančastu boju voću i povrću, razlikuju po broju i položaju hidroksilnih i metilnih grupa, broju šećera vezanih na njihovu strukturu, alifatskih ili aromatskih karboksila vezanih na šećer te položaju tih veza (Kong i sur., 2003). Kako je njihova biološka aktivnost određena kemijskom strukturom ovisno o broju hidroksilnih grupa, antocijani imaju veći ili manji antioksidacijski potencijal.

Zbog svega gore navedenog, intenzivno se istražuje antitumorigeno, antitumorsko i antioksidativno djelovanje fitokemikalija na staničnom nivou te njihovo djelovanje na različite sustave organa kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, živčani, imunološki. Međutim, mnogi mehanizmi djelovanja bioaktivnih tvari iz hrane te posljedično njihovog utjecaja na zdravlje ljudi, još uvijek nisu dovoljno istraženi. Obzirom da biljno carstvo obiluje mnoštvom bioloških aktivnih tvari alternativni *in vitro* testovi primjenom kultura stanica višestruko su korisni u ispitivanjima potencijalno aktivnih spojeva iz biljaka.

Primjena *in vitro* testova i kultura stanica

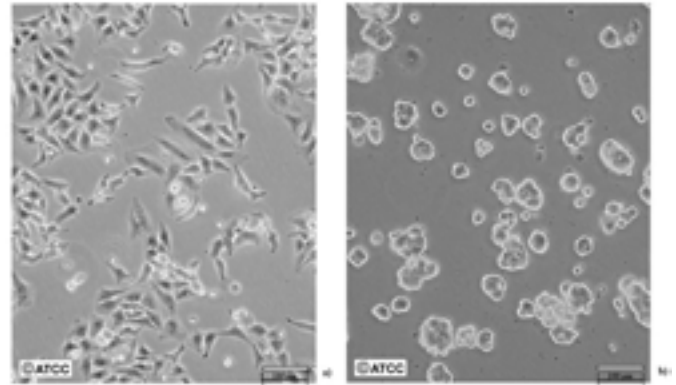
Određivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva iz biljaka, kao i nosintetiziranih kemikalija, provodi se izvođenjem niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) kako bi se na temelju toga mogao procijeniti njihov učinak na ljude. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005). Razvoj *in vitro* testova potaknut je zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Već desetljećima, u laboratorijima koji provode *in vivo* ispitivanja na pokusnim laboratorijskim životinjama, nastoji se primjenjivati takozvani 3R pristup (eng. *Reduce, Refine, Replace*), kojim se želi smanjiti broj životinja koje se koriste, a uznemirenost, bol i patnju životinja tijekom izvođenja testova svesti na minimum te u konačnici, gdje god je moguće zamijeniti *in vivo* testove alternativnim *in vitro* metodama. Nedostatak *in vitro* metoda je da ne mogu u potpunosti zamijeniti *in vivo* ispitivanja na laboratorijskim životinjama, budući da *in vitro* testovi ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanja tkivno-specifične toksičnosti, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se zbivaju u živom organizmu, no u prilog im ide činjenica da je dokazana podudarnost za oko 80% rezultata

istraživanja toksičnosti provedenih primjenom različitih *in vitro* i *in vivo* testova (Fent, 2001). Unatoč tome daljnja optimizacija *in vitro* testova nužna je kako bi rezultati dobiveni *in vitro* testovima bili što bolji pokazatelji *in vivo* učinaka.

Kulturu životinjskih stanica definiramo kao pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva ili organa, koje je moguće održavati u umjetnom okolišu, odnosno u *in vitro* uvjetima. Prvi korak je uspostavljanje primarne kulture životinjskih stanica, odnosno izolacija stanica iz željenog organa/organizma i njihovo naciepljivanje u hranjivom mediju te održavanje te kulture u optimalnim *in vitro* uvjetima. Budući da ove stanice zadržavaju većinu specifičnih funkcija i svojstva tkiva iz kojeg su potekle, primarna kultura najbolje odražava *in vivo* uvjete i stoga je najprikladnija za ispitivanja svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice (Benford, 1992). Pasažiranjem ili subkultiviranjem primarne kulture razvija se stanična linija. U svakodnevnom znanstveno-istraživačkom radu najčešće se koriste kontinuirane stanične linije. Pri *in vitro* ispitivanju biološke aktivnosti prirodnih spojeva, ekstrakata biljnog podrijetla te prehrambenih proizvoda najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije (Slika 2) koje su dostupne putem banka stanica, od kojih su dvije najveće: *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC).

Slika 2. Mikroskopska slika dviju često korištenih humanih staničnih linija: a) HeLa (stanice adenokarcinoma grlića maternice) i b) MCF-7 (stanice adenokarcinoma dojke). Preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org>

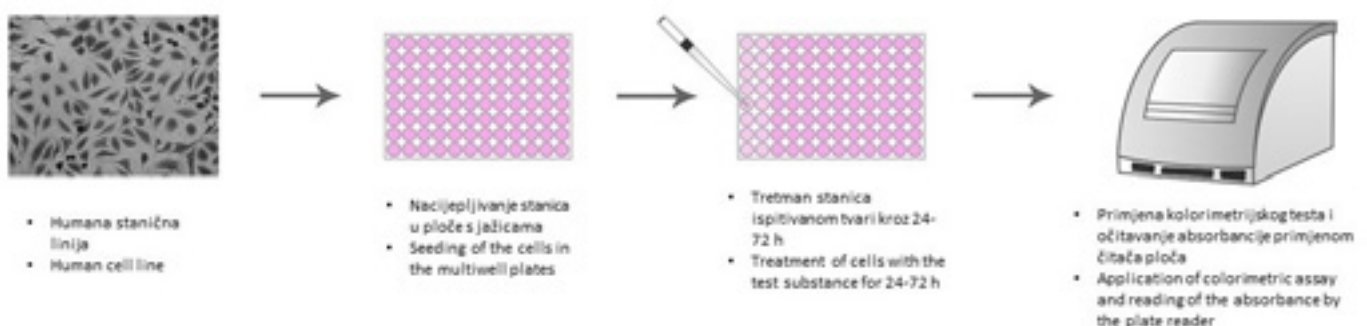
Figure 2. A microscopic image of two commonly used human cell lines: a) HeLa (cervical adenocarcinoma cells) and b) MCF-7 (breast adenocarcinoma cells). Downloaded from <https://www.lgcstandards-atcc.org>

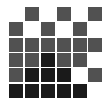


Prilikom provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995). Navedeni testovi se koriste za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja te mehanizma djelovanja određene tvari. Prednosti uporabe *in vitro* testova toksičnosti su niža cijena u odnosu na *in vivo* testove, visok stupanj standardizacije, reproducibilnost i brzina izvođenja pri čemu nastaje manja količina toksičnog otpada te svakako dobrobit eksperimentalnih životinja. Također, primjenom staničnih kultura se u kratkom vremenu može analizirati veliki broj tvari u širokom rasponu koncentracija što je svakako dobra preliminarna smjernica za planiranje *in vivo* studija. Nedostaci primjene *in vitro* testova su nepotpuna ili u potpunosti odsutna metabolička aktivacija ispitivane tvari u staničnim sustavima, budući da te stanice ipak imaju izmijenjena svojstva u odnosu na ishodne *in vivo* stanice, te mogućnost reagiranja ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj. Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kultura stanica je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT). MTT test je kolorimetrijska metoda, koja se bazira na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Mosmann, 1983), odnosno u novijim izvedbama te metode koriste se supstrati tzv. WST-1 i MTS koji se metaboliziraju u produkt topiv u mediju za uzgoj stanica stoga taj protokol ima jedan korak manje nego klasičan test. Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 3).

Slika 3. Shematski prikaz *in vitro* testova primjenom kultura stanica (vlastita ilustracija).

Figure 3. Schematic representation of the *in vitro* tests using cell cultures (our own illustration).





U primjeni su i brojni drugi testovi kao što su: *Kenacid Blue* metoda, *Trypan Blue* metoda, *Neutral Red* metoda, bojanje bojom kristal-ljubičasto, metoda otpuštanja laktat dehidrogenaze, test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a (Atterwill, 1995; Fent, 2001). Primjenom više različitih metoda možemo, osim informacije o bazalnoj citotoksičnosti ispitivane tvari, dobiti ideju o mogućem mehanizmu toksičnosti budući se metode temelje na različitim principima, dok korištenje različitih staničnih linija može ukazati na ciljne stanice za ispitivanu tvar. Kao što je već spomenuto, *in vitro* testovi primjenom kultura stanica imaju široku upotrebu, budući se navedenim testovima osim inhibitorynog djelovanja može odrediti i stimulatorni, odnosno, pozitivan učinak na rast stanica u kulturi.

U prirodi postoji mnoštvo bioloških aktivnih tvari koje imaju razne učinke na organizam, stoga se alternativni *in vitro* testovi koriste u ispitivanjima potencijalno aktivnih spojeva iz biljaka. Provede se ispitivanja biljnih ekstrakata, pojedinih frakcija i/ili izoliranih i pročišćenih sastojaka kako bi se odredilo njihovo djelovanje. Najčešće ispitivana svojstva biološki aktivnih tvari su antitumorski i antioksidacijski učinak. Veliki broj različitih biljaka i spojeva izoliranih iz biljnih vrsta pokazuje *in vitro* antitumorsku aktivnost te predstavljaju potencijalni izvor farmakološki aktivnih spojeva koji se istražuju i usmjeruju ka razvoju novih antitumorskih lijekova. Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) je 1990. g. predložio primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija (Boyd i Paull, 1995). Cilj takvog pristupa je ustanoviti relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju. Ovaj i slični *in vitro* testovi služe kao sredstvo za odabir spojeva od interesa tj. onih koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za daljnja *in vivo* istraživanja. Velika raznolikost i brojnost prirodnih spojeva iz voća i povrća, odnosno općenito biljaka, već je rezultirala razvojem nekoliko antitumorskih lijekova iz prirodnih spojeva koji su u kliničkoj primjeni (Furniss i sur., 2008). Jedan od najistraživanijih polifenolnih spojeva je resveratrol koji ima jaki antioksidacijski učinak i istraživan je kao tvar s izrazitim potencijalom za kemoprevenciju. Provedena istraživanja pokazala su da inhibira aktivnost enzima ciklooksigenaze u različitim vrstama tumora. Rezultat je to istraživanja na nizu tumorskih staničnih linija gdje je utvrđena njegova sposobnost da inhibira rast stanica što je ukazalo na to da spoj ima inhibitoryno djelovanje na promociju i progresiju tumora (Schneider i sur., 2000).

Biološka aktivnost polifenolnih spojeva određena pomoću kultura stanica

Povoljni učinci na zdravlje ljudi povezuju se s antitumorskim, antialergijskim, antibiotskim, antioksidacijskim i drugim svojstvima koje posjeduju biološki aktivne tvari iz žitarica, orašastih plodova, voća, povrća i ljekovitog bilja. Rezultat je to niza epidemioloških studija koje su ukazale na povezanost kvalitetne prehrane i zdravlja organizma te niza *in vivo* i *in vitro* znanstvenih istraživanja na raznim modelnim sustavima, pri čemu se često rabe humane stanične linije. Provede se ispitivanja biljnih ekstrakata, pojedinih frakcija i/ili izoliranih i pročišćenih sastojaka kako bi se odredilo njihovo djelovanje na organizam, a najčešće ispitivana svojstva biološki aktivnih tvari su antitumorski i antioksidacijski učinak.

Antioksidacijsko djelovanje kako polifenolnih tako i drugih prirodnih spojeva rezultira smanjenjem oksidativnog stresa. Oksidativni stres je stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja izuzetno reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica (O⁻), koje nazivamo „reaktivne kisikove vrste“ ili skraćeno ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*). Antioksidacijska aktivnost se često povezuje i istražuje zajedno s antitumorskom aktivnošću. Uloga antioksidansa u nastajanju tumora nije još jednoznačno razjašnjena. Smatra se da antioksidansi najčešće sprječavaju nastajanje tumora u početnoj fazi budući da inaktiviraju slobodne radikale, koji doprinose mutageni putem destabilizacije membrana i oštećenja DNA. Isto tako, antioksidansi mogu aktivirati ili inhibirati enzime faze I i faze II uključene u metabolizam ksenobiotika. Mogućim mehanizmom citotoksičnosti polifenola spram tumorskih stanica, iako još nedovoljno istraženim, smatra se njihovo prooksidativno djelovanje. Naime, polifenolni spojevi mogu djelovati i kao antioksidansi i kao prooksidansi, ovisno o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala te o prisutnosti prijelaznih metala kao što je bakar, koji potiče njihovu pro-oksidativnu aktivnost. U tom slučaju, dolazi do povećanog nastanka slobodnih radikala u tumorskim stanicama koji potom djeluju kao regulacijske molekule, dovode do zastoja staničnog ciklusa i apoptoze u tumorskim stanicama (Gomes i sur., 2003) te tako sprječavaju rast i širenje tumora.

Niz studija s flavanolima (katehin i epikatehin) i fenolnim kiselinama (galna kiselina i elaginska kiselina) ukazuju na njihovu antioksidacijsku i antitumorsku aktivnost *in vivo* i *in vitro*. Antioksidacijsko djelovanje flavonoida usko je povezano s antitumorskom aktivnošću tih spojeva te povoljnim učinkom kod kardiovaskularnih bolesti i nekih kožnih oboljenja (Yilmaz i Toledo, 2004). Istraživanje Hudson i sur. (2007) te Xia i sur. (2010) pokazalo je da ekstrakt pokožice grožđa inducira apoptozu stanične linije tumora prostate, dok fenoli iz grožđanog soka izazivaju značajnu inhibiciju sinteze DNA u stanicama tumora dojke (Singletary i sur., 2003; Xia i sur., 2010). Znanstvenim istraživanjem također je pokazano da ekstrakti pokožice grožđa djeluju sinergistički s doksorubicinom pri inhibiciji rasta estrogen receptor pozitivnih MCF-7 stanica, kao i estrogen receptor negativnih MDA-MB468 stanica, na temelju čega je zaključeno da ekstrakti grožđa mogu povećati učinkovitost tog antitumorskog lijeka (Sharma i sur., 2004; Kaur i sur., 2009). U istraživanju Mantena i sur. (2006) te Kaur i sur. (2009) sposobnost metastaziranja 4T1 stanica tumora dojke inhibirana je djelovanjem proantocijanidina iz sjemenki grožđa, dok je istraživanjem Kaur i sur. (2008) pokazano da ekstrakti pokožice grožđa induciraju apoptozu LoVo, HT29 i SW480 humanih tumorskih staničnih linija te se pretpostavlja moguća primjena ovih ekstrakata za kontrolu rasta stanica tumora debelog crijeva.

Biološka aktivnost antocijana dobro je poznata u znanstvenoj literaturi te su relativno dobro opisani mehanizmi njihovog protuupalnog (Miguel, 2011), antioksidacijskog (Kong i sur., 2003; Miguel, 2011) i antitumorskog (Hou, 2003) djelovanja, u kojima su kao modelni sustavi korištene transformirane ili tumorske stanične linije (Kšonžekova i sur., 2015). *In vivo* i *in vitro* istraživanjima dokazano je da antocijani smanjuju proliferaciju tumorskih stanica, a njihovo antitumorsko djelovanje povezano je s antioksidacijskim kapacitetom antocijana te inhibitorynim djelovanjem na enzim ciklooksigenazu, koji je ključ-

ni enzim u biosintetskom putu prostaglandina. Također, antitumorsko djelovanje antocijana zapaženo je u različitim fazama karcinogeneze (Lila, 2004), iako se najčešće povezuje s prvom fazom, odnosno sprječavanjem nastanka tumora. Dokazano je da antocijani iz crvenog vina inhibiraju rast HCT-15 stanica raka debelog crijeva i AGS stanica raka želuca. Takva zapažanja nisu isključiva samo za istraživanja polifenolnih spojeva iz grožđa i njegovih proizvoda, već su iste aktivnosti zapažene i pri istraživanjima bobičastog i drugog voća. Kšonžeková i sur. (2015) su primjenom MTT testa ispitili citotoksični učinak ekstrakata aronije, bazge i borovnice, voća također bogatog antocijanima. Istražen je učinak navedenih ekstrakata obzirom na metaboličku aktivnost, stanični ciklus i staničnu proliferaciju IPEC-1 stanica. Najjači citotoksični učinak na rast navedene stanične linije imao je ekstrakt borovnice. Kao što je već spomenuto, učinak pojedinačnih spojeva i njihova antitumorska aktivnost ovisi o kemijskoj strukturi spoja, a konkretno kod antocijana o broju hidroksilnih i metilnih grupa vezanih na molekulu benzena u antocijanidinu pa je delfinidin, koji ima 3 hidroksilne grupe vezane na benzenski prsten, imao jaču antitumorsku aktivnost od cijanina (Kšonžeková i sur., 2015). Osim spomenutog antitumorskog i protuupalnog djelovanja, poznati su i drugi pozitivni učinci antocijana na zdravlje ljudi. Pokazano je da antocijani djeluju protektivno i sprječavanju oštećenje stanica jetre štakora izazvano djelovanjem ugljikovog tetraklorida (Kong i sur., 2003) te da su kao prirodni antioksidansi korisni za regulaciju oksidativnog stresa tijekom komplikacija u trudnoći (Kong i sur., 2003). Oralnim unosom antocijana iz crnog ribiza može se poboljšati oštrina noćnog vida (Lila, 2004), a povoljan učinak antocijana na funkcioniranje mozga i središnji živčani sustav opisan je u radu Miguela (2011), gdje je dokazano da antocijani mogu inhibirati neuroupage i smanjiti oksidativni stres te time smanjiti rizik od degenerativnih poremećaja kao što je Alzheimerova bolest.

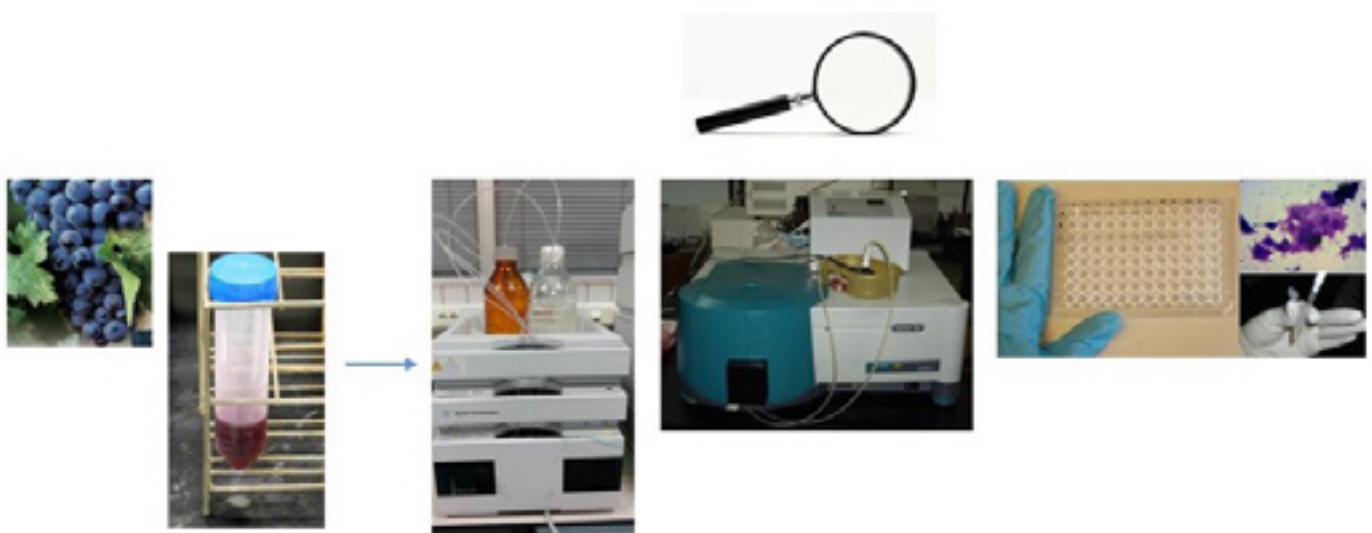
U našim istraživanjima također smo koristili humane stanične linije za određivanje biološke aktivnosti polifenolnih spojeva iz voća. U radu Ljevar i sur. (2016) prvi puta je

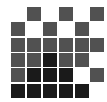
napravljena karakterizacija polifenolnih spojeva prisutnih u voćnim vinima proizvedenim u Hrvatskoj, spektrofotometrijskom i HPLC-PDA/MS analizom, dok se određivanje njihovih bioloških svojstava temeljilo na određivanju antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i FRAP metoda te *in vitro* citotoksičnosti na trima humanim tumorskim staničnim linijama (MCF-7, Caco-2 i HeLa) primjenom WST-1 testa. Među ispitivanim voćnim vinima, ona od kupine, trešnje i crnog ribizla u odnosu na ona od jagoda i jabuka imaju najviše koncentracije ukupnih polifenola, dok vina od trešnje i crnog ribizla sadrže i najviše ukupnih antocijana. Navedena vina također posjeduju najveći antioksidativni kapacitet te je utvrđena pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativnog svojstva. Voćna vina inhibirala su rast tumorskih MCF-7, Caco-2 i HeLa stanica ovisno o primjenjenoj dozi (1 % -20%, v/v). Vina od kupina, višanja, malina i crnog ribizla imala su najizraženiji antiproliferativni učinak, uz zapaženu veću osjetljivost HeLa i MCF-7 stanica u odnosu na Caco-2 stanice (Ljevar i sur., 2016).

U radu Radošević i sur. (2016) provedena je karakterizacija sastava ekstrakta pokožice grožđa pripremljenih primjenom alternativnih eutektičkih otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DESs) te ispitivanje njihove *in vitro* biološke aktivnosti (Slika 4). Citotoksičnost pripremljenih ekstrakata određena je primjenom WST-1 testa na MCF-7 i HeLa stanicama te je također provedena kvalitativna i kvantitativna karakterizacija obzirom na sastav polifenolnih spojeva. Rezultati su pokazali da četiri od pet ekstrakata pokožice grožđa u DES-u ima bolji citotoksični potencijal prema tumorskim stanicama nego ekstrakt pripremljen klasičnom ekstrakcijom s metanolom, pri čemu je ekstrakt u otapalu kolin klorid:jabučna kiselina imao najjači inhibični učinak. U konačnici, i u ovom radu je određena visoka pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih spojeva, antioksidacijskog kapaciteta i citotoksičnosti spram tumorskih stanica *in vitro* čime je još jednom potvrđena antitumorska aktivnost polifenola iz grožđa.

Slika 4. Kvantitativne i kvalitativne analize ekstrakta pokožice grožđa te određivanja antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom i *in vitro* biološke aktivnosti na kulturama stanica (vlastite fotografije)

Figure 4. Quantitative and qualitative analysis of the grape skin extracts and determination of their antioxidant activity by ORAC method and *in vitro* biological activity on cell cultures (our own photographs)



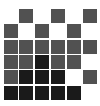


Zaključci

Određivanje biološke aktivnosti primjenom kultura stanica dobar je modelni sustav za preliminarna istraživanja spojeva izoliranih iz biljaka te njihovih ekstrakata i proizvoda. Usporedbom postojećih *in vivo* istraživanja i epidemioloških studija sa spoznajama temeljenim na *in vitro* testovima vidljivo je da takav pristup omogućava predviđanje citotoksičnosti, odnosno antitumorske aktivnosti spoja te ispitivanje njegovog potencijala kao lijeka u razvojnoj fazi. Istraživanja biološke aktivnosti spojeva iz biljaka trebaju biti sveobuhvatna te uključiti i određivanja drugih tipova bioloških aktivnosti, kao npr. antioksidacijskog kapaciteta, budući su često razni učinci međusobno ovisni. Također, nužno je povezati rezultate biološke aktivnosti s kvalitativnim i kvantitativnim analizama biljnih ekstrakata i proizvoda, jer takva cjelovita istraživanja omogućuju povezivanje zapaženog učinka s količinom i sastavom biološki aktivnih spojeva u uzorku.

Literatura

- Anonymous 1 (2013) : <<http://www.pbf.unizg.hr/hr/content/download/23256/91108/version/1/file/Zacinsko+i+aromatsko+2013+5.pdf>>, pristupljeno 27.09.2016.
- Atterwill C.K. (1995) Alternative Method of Assessing Toxicity. U: *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (O'Hare, S., Atterwill, C.K., ured.), Humana Press, Totowa/New Jersey, str. 1-9.
- Benford D.J. (1992) The use of animal cells as replacements for whole animals in the toxicity testing of chemicals and pharmaceuticals. U: *Animal Cell Technology* (Spier, R.E., Griffiths, J.B., ured.), Academic Press, London, 97-121.
- Boyd M.R., Paull K.D. (1995) Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute *In Vitro* Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Development Research*, 34, 91-109.
- Ekwall B. (1995) The basal cytotoxicity concept. U: *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences*, (Goldberg, A., van Zutphen, L., ured.), The World Congress on 54 Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing, 11. Mary Ann Libart, New York, str. 721-725.
- Fent K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assesment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicology in Vitro*, 15, 477-488.
- Ferri M., Bin S., Vallini V., Fava F., Michelini E., Roda A., Minnucci G., Bucchi G., Tassoni A. (2015) Recovery of polyphenols from red grape pomace and assesment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *New Biotechnology*, 33, 338-344.
- Furniss C.S.M, Bennett R.N., Bacon J.R., LeGall G., Mithen R.F. (2008) Polyamine metabolism and transforming growth factor- β signaling are affected in Caco-2 sells by differentially cooked broccoli extracts. *Journal of Nutrition*, 38, 1840-1845.
- Georgiev V., Ananga A., Tsolova V. (2014) Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, 6, 391-415.
- Gomes C.A., Girao da Cruz T., Andrade J.L., Milhazes N., Borges F., Marques P.M. (2003) Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure Activity Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5395-5401.
- Hou D. X. (2003) Potential Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, 3, 149-159.
- Hudson T. S., Hartle D. K., Hursting S. D., Nunez N. P., Wang T. T. Y., Young H. A., Arany P., Green J.E. (2007) Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Research*, 67, 8396-8405.
- Jašić M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. <http://prirodnamedicina.org/knjige/M.Jasic-Uvid_u_aktivne_bioloski_aktivne_komponente_hrane.pdf>, pristupljeno 22.06.2014.
- Kaur M., Mandair R., Agarwal C., Agarwal R. (2008) Grape Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 60, 2-11.
- Kaur M., Agarwal C., Agarwal R. (2009) Anticancer and Cancer Chemopreventive Potential of Grape Seed Extract and Other Grape-Based Products. *Journal of Nutrition*, 139, 1806-1812.
- Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Srček V., Kniewald Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 56, 195-204.
- Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K., Chia T. F., Brouillard R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- Kšonžeková P., Mariychuk R., Eliašová A., Mudronová D., Csank T., Király J., Marcincáková J., Pisl J., Tkáčiková L. (2015) *In vitro* study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1093-1100.
- Lila M. A. (2004) Anthocyanins and Human Health: An *In Vitro* Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313.
- Ljevar A., Čurko N., Tomašević M., Radošević K., Gaurina Srček V., Kovačević Ganić K. (2016) Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and *in vitro* Cytotoxicity Assesment of Fruit Wines. *Food Technology and Biotechnology*, 54, 145-155.
- Mantena S. K., Baliga M. S., Katiyar S. K. (2006) Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 27, 1682-91.
- McDougall G. J., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D. (2005) Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896-5904.
- Miguel M. G. (2011) Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01, 7-15.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Radošević K., Čurko N., Gaurina Srček V., Cvjetko Bubalo M., Tomašević M., Kovačević Ganić K., Radojčić Redov-



niković I. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 45-51.

Ramirez-Tortosa C., Andersen O. M., Gardner P. T., Morrice P. C., Wood S. G., Duthie S. J., Collins A. R., Duthie G. G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1033-1037.

Schneider Y., Vincent F., Duranton B., Badolo L., Gosse F., Bergmann C., Seiler N., Raul F. (2000) Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Letters*, 158, 85-91.

Sharma G., Tyagi A. K., Singh R. P., Chan D. C., Agarwal R. (2004) Synergistic anticancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 85, 1-12.

Singletery K. W., Stansbury M. J., Giusti M., Breemen R. B. V., Wallig M., Rimando, A. (2003) Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7280-7286.

Xia E., Deng G., Guo Y., Li H. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646.

Yilmaz Y., Toledo R.T. (2004) Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science Technology*, 15, 422-433.