
Sofija Šolaja, Teodora Torbica i Lazar Mitrović

Ispitivanje protektivnog dejstva ekstrakta koprive na modelu humanih hepatocita tretiranih benzo[a]pirenom i benz[a]antracenom

Policiklični aromatični ugljovodonici nastaju nepotpunim sagorevanjem organskih materija i predstavljaju značajne kontaminante životne sredine. Metabolišu se u jetri, aktivnošću enzima iz grupe citohrom P450 monooksigenaza (CYP), koji ih prevode u epokside, a zatim u reaktivniju formu, diol-epokside, koji ometaju proces ćelijske deobe i mogu inicirati kancerogenezu. Fitohemijskim istraživanjima je utvrđeno da kopriva sadrži biološki aktivne supstance koje smanjuju stopu nastanka reaktivnih metabolita policikličnih aromatičnih ugljovodonika, kroz inhibiciju aril ugljovodoničnog receptora. Cilj istraživanja je bio da se ispita potencijalno protektivno dejstvo ekstrakta koprive pri tretmanu benzo(a)pirenom i benz(a)antracenom, odabranim jedinjenjima iz grupe policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Korišćena je HepG2 kontinualna ćelijska linija humanog hepatocelularnog karcinoma, kao model hepatocita. Na osnovu rezultata pilot eksperimenta za dalji rad je odabrana koncentracija 10^{-4} M za benzo(a)piren i 10^{-4} M i 4.6×10^{-5} M za benz(a)antracen. Ekstrakt koprive je u testiranoj koncentraciji pokazao protektivno dejstvo u kotretmanu sa 4.6×10^{-5} M benz(a)antracenom. Pretretman ekstraktom koprive u trajanju od 24 h nije doveo do povećanja preživljavanja hepatocita nakon tretmana odabranim citotoksičnim koncentracijama policikličnih aromatičnih ugljovodonika.

Uvod

Policiklični aromatični ugljovodonici (engl. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) su organska jedinjenja izgrađena od ugljenika i vodonika organizovanih u prstenastu strukturu, sa najmanje dva aromatična prstena. U čistom obliku, PAH su čvrsta jedinjenja koja slabo isparavaju na sobnoj temperaturi, rastvorljivi su u mnogim organskim rastvaračima, a slabo rastvorljivi u vodi. Najčešće nastaju nepotpunim sagorevanjem organskih materija, a neka jedinjenja iz grupe PAH se i namenski proizvode radi upotrebe u različitim granama industrije (Teodorović i Kaišarević 2015).

PAH su veoma rasprostranjeni u životnoj sredini. U atmosferi podležu fotodegradaciji, a u zavisnosti od temperature vazduha i veličine molekula PAH, mogu se adsorbovati na čestice prašine (PAH sa više od četiri aromatična prstena) ili ostati u gasovitom stanju (PAH manje molekulske mase) (Skupinska *et al.* 2004). Prisutni su i u akvatičnim ekosistemima, naročito na lokalitetima gde dolazi do značajnog slivanja vode sa okolnog kontaminiranog zemljišta ili ulivanja otpadnih voda, a uglavnom se deponuju u sedimentu (Radonić 2009).

Ova grupa polutanata pobuđuje veliko interesovanje zbog značajne izloženosti ljudi i toksičnih efekata koje izazivaju. Potentna su mu-

Sofija Šolaja (1998), Beograd, Gospodar Jevremova 25, učenica 4. razreda Treće beogradske gimnazije

Teodora Torbica, Nakovo, Slavka Rodića 7, učenica 4. razreda Gimnazije „Dušan Vasiljev” u Kikindi

Lazar Mitrović, Kraljevo, Zelena gora 41/30, učenik 4. razreda Medicinske škole u Kraljevu

MENTORI:

dr Sonja Kaišarević, Laboratorija za ekotoksikologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Dina Tenji, Laboratorija za ekotoksikologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu

tagena i kancerogena jedinjenja (Roy i Trinchieri 2017). Do intoksikacije ljudi ovom grupom jedinjenja uglavnom dolazi kroz respiratorni ili digestivni sistem (Barranco *et al.* 2004). Metabolišu se u jetri, aktivnošću enzima iz grupe citohrom P450 monooksigenaza (CYP), od kojih su CYP1A1 i CYP1B1 odgovorni za aktivaciju većine kancerogenih PAH i njihovo prevođenje u epokside koji se zatim konvertuju u reaktivniju formu – diol-epokside koji iniciraju kancerogenezu i ometaju rast i deobu ćelija (Shimada i Fujii-Kuriyama 2004). Ćelije koje su najviše ugrožene akutnim izlaganjem PAH su one koje se brzo dele, kao što su ćelije kostne srži, kože i plućnog epitela, dok su tkiva kod kojih se ćelijske deobe odvijaju sporije manje podložna štetnom dejstvu PAH.

Benzo[a]piren (BaP) je petoprsteno jedinjenje, najzastupljenije u atmosferi iz grupe PAH. Pripada grupi 1 na IARC listi kancerogena (International Agency for Research of Cancer). U SAD je procenjeno da se godišnje ispusti u atmosferu oko 3000 t samo ovog jedinjenja (Vollhardt i Schore 2004).

Benz[a]antracen (BaA) je kristalni, kancerogeni PAH sastavljen od 4 kondenzovana benzenova prstena i komponenta je ukupnih polinuklearnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini. Nalazi se u izduvnim gasovima, duvanskom dimu i katranu i nastaje pri sagorevanju različitih organskih jedinjenja (IARC 2006).

Fitohemijским istraživanjima je utvrđeno da kopriva sadrži biološki aktivne supstance, među kojima su taninska kiselina, kvercetin, miricetin i elaginska kiselina. Ranija istraživanja pokazuju da ova jedinjenja smanjuju kancerogeno dejstvo PAH (Das *et al.* 1987; Wood *et al.* 1982).

Cilj ovog istraživanja je da se ispita da li kopriva ostvaruje protektivni efekat na ćelije koje su izložene toksičnim koncentracijama BaP i BaA.

Materijal i metode

Na osnovu rezultata pilot eksperimenta odabrane su koncentracije testiranih supstanci koje su korišćene u daljem radu. Pomoću MTT i SRB eseja ispitivano je protektivno dejstvo ekstrakta koprive kroz kotretman ispitivanih PAH u

toksičnim koncentracijama i kroz pretretman u trajanju od 24 h pre izlaganja toksičnim koncentracijama PAH.

HepG2 ćelijska linija. HepG2 je kontinualna linija humanih hepatoma ćelija koja je prvi put izolovana iz hepatocelularnog karcinoma jetre petnaestogodišnjeg dečaka. Po morfologiji, to su epitelne adherentne ćelije i rastu u vidu jednog sloja zalepljene za podlogu. Ova ćelijska linija ne gubi osnovne funkcije i sadrži mnoge enzime koji učestvuju u transformaciji ksenobiotika, što ih čini pogodnim za toksikološka i ekotoksikološka istraživanja (Darroudi *et al.* 2004). Ćelije se kultiviraju u Modified Eagle's Medium (MEM) sa dodatkom 10% goveđeg fetalnog seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 100 i.j./mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina, u vlažnoj sredini sa 5% CO₂ na temperaturi od 37°C.

Testirane supstance. Etanolno-vodeni rastvor lista koprive (*Urticae folium*) je nabavljen iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”. Citotoksični efekat etanolno-vodenog rastvora lista koprive je ispitan u pilot eksperimentu, tretmanom ćelija rastvorom u sledećim koncentracijama: 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.06%, 0.03%, 0.016%.

Ispitivani policiklični aromatični ugljovodonici, BaP i BaA, su testirani u pilot eksperimentu u sledećim koncentracijama: 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 5 × 10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5 × 10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 5 × 10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M.

Pilot eksperiment. Radi ispravnog odabira koncentracija testiranih supstanci za eksperiment, njihova citotoksičnost je prvo ispitana MTT i SRB testom, u prethodno navedenom, širokom opsegu koncentracija. Napravljeni su osnovni rastvori BaP i BaA u 100%-nom etanolu u koncentraciji 10⁻² M, a zatim su odabrane koncentracije pravljene sukcesivnim razblaživanjem u medijumu. Odabrane koncentracije ekstrakta koprive su postignute razblaživanjem vodeno-etanolnog rastvora u medijumu.

Eksperimentalni dizajn. Na osnovu rezultata pilot eksperimenta, odabrana je najviša koncentracija ekstrakta koprive koja nije pokazala citotoksičan efekat (0.25%), dok su koncentracije koje su ispoljile najveću toksičnost i IC50 koncentracije PAH korišćene u tretmanu. Maksimalna testirana koncentracija BaP je ujedno

bila i IC50 koncentracija, pa je samo ona korišćena u daljem radu (10^{-4} M), dok je BaA testiran u koncentracijama 10^{-4} M i 4.6×10^{-5} M.

Protektivno dejstvo ekstrakta koprive je ispitivano na dva načina. Prvi način je podrazumevao kotretman ekstraktom koprive i PAH u odgovarajućim koncentracijama u trajanju od 24 h, nakon čega su urađeni testovi citotoksičnosti. Pored toga, ispitivani su i efekti pre tretmana ekstraktom koprive u trajanju od 24 h, nakon čega su aplikovane odabrane koncentracije BaP, odnosno BaA, u trajanju od 24 h.

Sadenje i tretman ćelija. Ćelije su zasejane u gustini 2×10^4 ćelija/bunariću u mikrotitar ploče sa 96 bunara, u 0.1 mL MEM medijuma sa dodatkom 10% FBS. Ćelije su tretirane nakon adherencije na dno bunarića. U kotretmanu medijum je zamenjen svežim medijumom sa ekstraktom koprive, BaP i BaA u odgovarajućim koncentracijama. Za tretman sa pretretmanom, medijum je zamenjen svežim medijumom sa ekstraktom koprive, a nakon 24 h je medijum odliven i zamenjen svežim medijumom sa BaP i BaA u odgovarajućim koncentracijama, nakon čega su ćelije inkubirane još 24 h.

Testovi citotoksičnosti. MTT esej je test vijabilnosti ćelija, gde se ispituje sposobnost ćelija da redukuju tetrazolijumske soli (MTT) u plavi formazan, aktivnošću mitohondrijalne reduktaze. Po isteku eksperimentalnog tretmana, medijum je odliven iz bunarića, i zatim u svaki bunarić je dodato 100 μ L MTT (koncentracije 500 μ g/mL) i ćelije su inkubirane na 37°C 3 h. Po isteku inkubacije, medijum je temeljno odliven i ćelije su lizirane pomoću 0.1 mL 0.04 M HCl u izopropanolu. Nakon inkubacije od 10 minuta,

očitanje su vrednosti apsorbanci na 540 nm i 690 nm (referentna apsorbancia).

Za SRB esej, koji se zasniva na bojenju proteina, nakon završenog tretmana ćelija u svaki bunarić je dodato 25 μ L 50% TCA direkno u medijum nakon čega su ploče inkubirane 1 h na 4°C. Ploče su isprane pet puta hladnom destilovanom vodom i ostavljene na vazduhu da se osuše. Zatim je u bunariće nasuto 50 μ L 0.4% rastvora sulforodamin B boje u 1% sirćetnoj kiselini i ploče su inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su isprane pet puta 1% sirćetnom kiselinom, a zatim ostavljene da se osuše. U svaki bunarić je dodato 100 μ L 10 mM Tris baznog rastvora (pH 10.5), a nakon 10 minuta inkubacije, očitane su vrednosti apsorbanci na talasnim dužinama 492 nm i 690 nm.

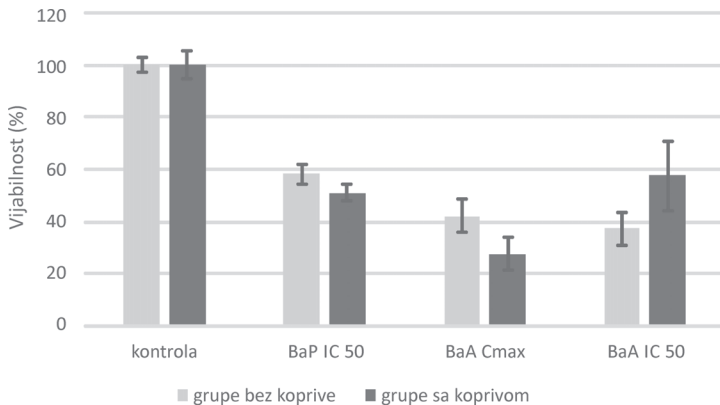
Prikazivanje citotoksičnog efekta. Procenat citotoksičnosti i vijabilnosti je izračunat na sledeći način:

$$\begin{aligned} \text{Citotoksičnost (\%)} &= \\ &= \frac{1 - \text{apsorbancia uzorka}}{\text{apsorbancia kontrole}} \times 100, \end{aligned}$$

$$\text{Vijabilnost (\%)} = 100 - \text{citotoksičnost (\%)}$$

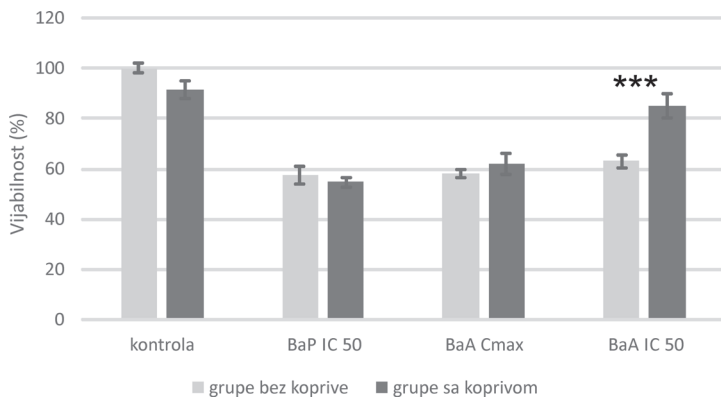
Rezultati i diskusija

Na osnovu rezultata MTT testa (slika 1) i SRB testa (slika 2), kotretman ekstraktom koprive nije doveo do značajnih razlika u preživljavanju ćelija tokom tretmana odabranim toksičnim koncentracijama BaP i BaA u trajanju od 24 h, osim u slučaju tretmana IC50 koncentracijom BaA.



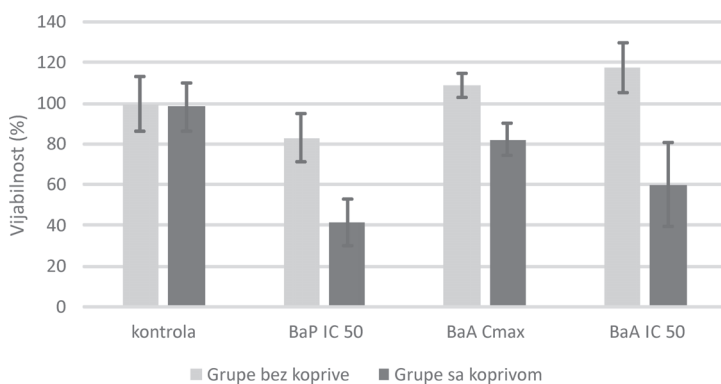
Slika 1. Preživljavanje hepatocita nakon 24 h kotretmana ekstraktom koprive i PAH u odabranim toksičnim koncentracijama na osnovu rezultata MTT testa. Error-barovima označena je standardna greška srednje vrednosti.

Figure 1. Cell viability after 24 h cotreatment with nettle extract and PAHs (dark grey), based on MTT assay results. Error bars represent the standard error of mean.



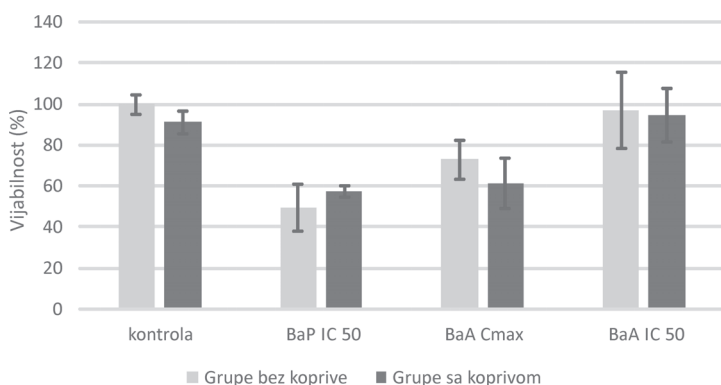
Slika 2. Preživljavanje hepatocita nakon 24 h kotretmana ekstraktom koprive i PAH u odabranim toksičnim koncentracijama na osnovu rezultata SRB testa. Error-barovima označena je standardna greška srednje vrednosti. Zvezdicama je označen statistički značajan efekat tretmana ($p < 0.001$)

Figure 2. Cell viability after 24 h cotreatment with nettle extract and PAHs (dark grey), based on SRB assay results. Error bars represent the standard error of mean. Asterisks represent the significant effect of the treatment ($p < 0.001$).



Slika 3. Preživljavanje hepatocita nakon 24 h pretretmana ekstraktom koprive i tretmana PAH u odabranim toksičnim koncentracijama u trajanju od 24 h, na osnovu rezultata MTT testa. Error-barovima označena je standardna greška srednje vrednosti.

Figure 3. Cell viability after 24 h pretreatment with nettle extract followed by 24 h treatment with PAHs ((dark grey), based on MTT assay results. Error bars represent the standard error of mean.



Slika 4. Preživljavanje hepatocita nakon 24 h pretretmana ekstraktom koprive i tretmana PAH u odabranim toksičnim koncentracijama u trajanju od 24 h, na osnovu rezultata SRB testa. Error-barovima označena je standardna greška srednje vrednosti.

Figure 4. Cell viability after 24 h pretreatment with nettle extract followed by 24 h treatment with PAHs (dark grey), based on SRB assay results. Error bars represent the standard error of mean.

Pre tretman ekstraktom koprive u trajanju od 24 h nije ostvario protektivan efekat na ćelije koje su nakon toga tretirane odabranim toksičnim koncentracijama BaP i BaA (slike 3 i 4).

Elaginska kiselina je u prethodnim istraživanjima prepoznata kao potencijalni inhibitor kancerogenog efekta diol epoksida policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Ona direktno interaguje sa epoksidima, čime se oni prevode u biološki neaktivne supstance (Wood *et al.* 1982). Biljni fenoli kao što su kvercetin, miricetin i tanińska kiselina, kao i jedinjenja njima slične strukture, pokazali su inhibitorno dejstvo na aril ugljovodoničnu hidroksilazu (CYP 1A1), čime je pokazano da smanjuju kancerogeni efekat PAH (Das *et al.* 1987). Prisustvo navedenih supstanci u ekstraktu koprive može objasniti njeno protektivno dejstvo (Otlés i Yalcin 2012).

Zastupljenost određenih fenola u ekstraktu zavisi od dela biljke iz kog se vrši ekstrakcija, kao i od njenog uzgoja (Otlés i Yalcin 2012). Pošto je u istraživanju korišćen etanolno-vodeni ekstrakt lista koprive, moguće je da u njemu koncentracija aktivnih supstanci nije bila dovoljna za ispoljavanje protektivnog dejstva. Iz navedenog razloga trebalo bi analizirati sastav ekstrakata različitih delova biljke (koren, stablo, listovi), odrediti koncentracije aktivnih supstanci u uzorcima, pa zatim uraditi eksperiment. Pored navedenog, odustvo protektivnog dejstva može biti uzrokovano i greškom pri izvođenju tretmana, zbog čega bi bilo poželjno ponavljanje eksperimenta.

Zaključak

Kopriva je ispoljila protektivno dejstvo jedino pri kotretmanu sa BaA koncentracije 46 μ M. Dalja istraživanja bi trebalo usmeriti ka ispitivanju potencionalnog protektivnog dejstva pojedinačnih biološki aktivnih jedinjenja, koja se nalaze u koprivi, kao i na utvrđivanje mehanizama kojima se ovo dejstvo ostvaruje.

Zahvalnost. Zahvaljujemo se dr Sonji Kaišarević i Dini Tenji iz Laboratorije za ekotoksikologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, na savetima, strpljenju, uloženom trudu i pomoći koju su nam pružile i time omogućile da sprovedemo ovo istraživanje.

Literatura

Barranco A., Alonso-Salces M., Crespo I., Berrueta A., Gallo B., Vicente F., Sarobe M. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbon content in commercial Spanish fatty foods. *Journal of Food Protection*, **67**(12): 2786.

Darroudi F., Kassie F., Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Wu, X. 2004. Use of a human-derived liver cell line of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, **198**(1-3): 329.

Das M., Mukhtar H., Bik D., Bickers D. 1987. Inhibition of Epidermal Xenobiotic Metabolism in SENCAR Mice by Naturally Occurring Plant Phenols. *Cancer Research*, **47**: 760.

IARC. 2006. Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. *Chemical Environmental and Experimental Data*, **32**: 135.

Otlés S., Yalcin B. 2012. Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal*, **2012**: 1.

Radonić J. 2009. Atmosferski transport i modelovanje raspodele između čvrste i gasovite faze policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Doktorska disertacija. Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

Roy S., Trinchieri G., 2017. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, **17**(5): 271.

Skupinska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physiochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta poloniae pharmaceutica*, **61**(3): 233.

Shimada T., Fuji-Kuriyama Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes p450 1A and 1B. *Cancer Science*, **95**: 1.

Teodorović I., Kaišarević S. 2015. *Ekotoksikologija*. Novi Sad: Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Vollhardt P., Schore N. 2004. *Organska hemija struktura i funkcija*. Beograd: Data status

Wood A., Huang M., Chang R., Newmark H., Lehr R., Yagi H., Sayer J., Jerin, D., Conney A. 1982. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by

naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**: 5513.

Sofija Šolaja, Teodora Torbica and Lazar Mitrović

Protective Effect Of Nettle Extract on HepG2 Cell Line as a Hepatocyte Model Treated with Benzo[a]pyrene and Benz[a]anthracene

Polycyclic aromatic hydrocarbons are formed by the incomplete combustion of organic matter and they represent significant contaminants of the environment. They are metabolized in the liver, by the activity of cytochrome P450 monooxygenases (CYP), which converts them into epoxides and then, in a more reactive form, diol epoxides. Diol epoxides can interfere with the cell cycle and induce cancerogenesis. Previous phytochemical studies showed that nettle contains biologically active substances, such as tannic acid, quercetin, mirycinin and elaginic

acid. These compounds reduce the rate of the formation of reactive metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by inhibition of the aryl hydrocarbon receptor. The aim of this research was to investigate the potentially protective effect of nettle extract on hepatocytes treated with cytotoxic concentrations of benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene. The HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line was used as a hepatocyte model. Based on the results of the pilot experiment in which the cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and nettle extract was tested in a wide range of concentrations, 10^{-4} M benzo(a)pyrene and 10^{-4} M and 4.6×10^{-5} M benz(a)anthracene were used for the treatment. The nettle extract showed a protective effect in the co-treatment with 4.6×10^{-5} M benz(a)anthracene. The 24 hrs pre-treatment with nettle extract did not increase the survival rate of hepatocytes after treatment with the selected cytotoxic concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons. Further research should be directed towards investigating the potential protective effect of biologically active compounds present in the nettle extract, as well as the elucidation of the mechanisms underlying their effects.

