

ANTIGENOTOKSIČNI UČINAK EKSTRAKTA *Echinacea purpurea* IZAZVAN (PROUZROČEN) AFLATOKSINOM B₁ I OHRATOKSINOM A

Huska Jukić^{1*}, Maja Šegvić Klarić², Nevena Kopjar³, Antun Jozinović⁴, Drago Šubarić⁴

¹Sveučilište u Bihacu, Fakultet zdravstvenih studija, Nositelja hrvatskog trilista 4, 77000 Bihac, BiH

²Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Schrottova 39/I, 10000 Zagreb, Hrvatska

³Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

⁴Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 18, 31000, Osijek, Hrvatska
*huska037@gmail.com

13th International Scientific and Professional Conference
WITH FOOD TO HEALTH
16th and 17th September 2021

SAŽETAK

Biljni bioaktivni polifenoli su relativno dobro poznati po svojim antioksidativnim, antimutagenim, antikancerogenim, protuupalnim, antiangiogenim, antiulkusnim i antimikrobnim (baktericidnim, fungicidnim te antivirusnim) osobinama. Temeljem preliminarne istraživanja antigenotoksičnosti ekstrakata različitih biljnih vrsta, uočeno je da one vrste koje su bogate polifenolima imaju značajan antigenotoksični učinak sprječavanjem oksidativnih oštećenja izazvanih citostatcima u kulturi ljudskih limfocita.

Ispitano je djelovanje vodenih i alkoholnih ekstrakata vrste *Echinacea purpurea* L. antigenotoksično u uvjetima *in vitro*. Rezultati pokazuju konkretan utjecaj vodenih i alkoholnih ekstrakata, kao i najdominantnijih sastavnica *E. purpurea*, te polifenola (tanina), nakon tretmana stanica mikotoksinima ohratoksinom A i aflatoksinom B₁.

Nadalje, ispitan je sadržaj polifenola u ekstraktima vrste *Echinacea purpurea* L. Moench te određen antioksidativni učinak ekstrakata primjenom elektronske spinske rezonancije i kolorimetrijske metode gašenja slobodnog radikala DPPH. Antioksidativna aktivnost ekstrakata bi mogla biti jedan od pokazatelja antigenotoksičnog učinka s obzirom na mogućnost nastanka oštećenja DNA djelovanjem slobodnih radikala.

Antigenotoksični potencijal ekstrakata utvrđen je primjenom alkalnog kometnog testa na ljudskim leukocitima *ex situ*.

MATERIJALI I METODE

Materijal

U istraživanju su korišteni na zraku osušeni nadzemni dijelovi ljubičaste ehinaceje, preuzeti iz tvrtke Jan-Spider (Pitomača)-HR.

Metode

Određivanje ukupnog sadržaja tanina kao i ukupnog sadržaja polifenola, te fenolnih kiselina, derivata hidroksimetne kiseline, u nadzemnim dijelovima vrste *E. purpurea* provedeno je prema metodi opisanoj u Europskoj farmakopeji (EDQM, 2004).

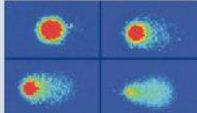
Sadržaj flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste ehinaceje određen je primjenom spektrofotometrijske metode prema Christu i Mülleru (Christ and Müller, 1960).

HPLC analiza polifenola u ekstraktima ehinaceje korištena je metoda prema Belščak-Cvitanović i sur. (2011.) koja je pomoću gradijentne elucije otapala omogućila dobru separaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva prisutnih u biljnim ekstraktima.

Antiradikalna aktivnost etanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova ispitivane vrste i standardnih supstancija (klorogenska kiselina, rutin, taninska kiselina, butilhidroksianisol) određena je spektrofotometrijskom metodom prema Bloisu (Blois, 1958).

Antioksidativni učinak ekstrakata ispitan je primjenom elektronske spinske rezonancije (ESR) kapaciteta hvatanja hidroksilnog radikala te najvažnijih sastojaka ekstrakata za inhibiciju hidroksilnih radikala generiranih u Fentonovoj reakciji (Fe²⁺/H₂O₂). Antioksidativna aktivnost frakcija ekstrakta *Echinacea* definirana je kao: AA.OH = (ho-hx)/ho x 100 (%), gdje je: ho - visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta slijepe probe, hx - visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta probe s ekstraktom. EC50 vrijednost je definirana kao ona masena koncentracija ekstrakta neophodna da inhibira nastajanje DMPO-OH spin adukta za 50 % u odnosu na kontrolu.

Kometni test genotoksičnosti (SCGE) je brza i osjetljiva metoda za dokazivanje pri procjeni oštećenja i popravka DNA na razini pojedinačne stanice, odnosno otkrivanja lomova jednolančane DNA u pojedinačnim stanicama. Oštećenje DNA procjenjuje se na osnovi udjela DNA u "repu" kometa i udjela DNA u "glavi" kometa. Za mjerenje kometa i procjenu oštećenja danas se najčešće koriste sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom, a pomoću posebnih računalnih programa za svaku pojedinačnu kometu istovremeno se mjeri više parametara (Kopjar i sur., 2001.; 2010.).



Fotomikrografije stupnjeva oštećenja DNA s različitim izgledom kometa

Statistička obrada podataka kometnog testa

Rezultati dobiveni mjerenjem dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta prikazani su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama (SD) i standardnim pogreškama aritmetičke sredine (SEM), minimalne i maksimalne vrijednosti te kao medijani sa 25 i 75 percentilom. Kolmogorov-Smirnov test je primijenjen za testiranje normalnosti distribucije navedenih mjerenja. U slučaju nenormalne distribucije rezultati mjerenja su logaritamski transformirani nakon čega je ponovno testirana normalnost distribucije. Kod normalno distribuiranih vrijednosti za statističku analizu značajnosti razlike između kontrolnih i tretiranih stanica primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Tukey post test multiple komparacije, dok je za nenormalno distribuirane vrijednosti primijenjen Kruskal-Wallisov test uz Dunnov test multiple komparacije. Kometni parametri su također klasificirani prema 95. percentilu (AST, engl. abnormal size tails) u kontroli. Dobivene AST vrijednosti su statistički analizirane primjenom Pearsonovog x-kvadrat testa. Nivo značajnosti p<0,05 je uzet kao statistički značajna razlika za sve provedene statističke analize.

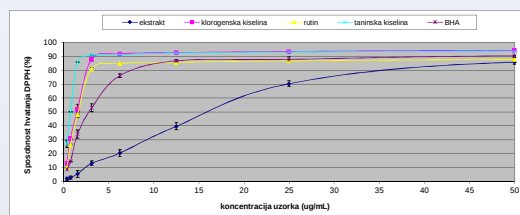
REZULTATI

Rezultati ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i tanina u vrsti *Echinacea purpurea* prikazani su u tablici 1.

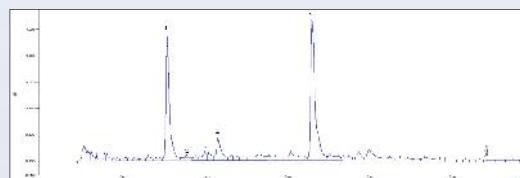
Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, flavonoida i tanina u ekstraktima herbe *ehinaceje*

Biljni ekstrakt	Conten (%)			
	Ukupni polifenoli	Flavonoidi	Fenolne kiseline	Tanini
<i>Echinacea purpurea</i>	13,31±0,43	0,126±0,004	3,47±0,25	0,863±0,003

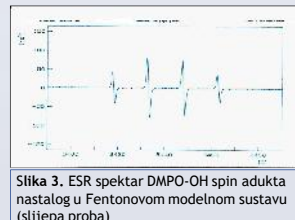
Srednja vrijednost ± SD tri neovisna mjerenja



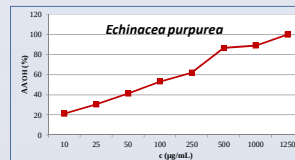
Slika 1. Spособnost hvatanja DPPH[•] radikala *Echinacea* etanolnog ekstrakta u usporedbi s polifenolnim sastavnicama i referentnim antioksidantom



Slika 2. Kromatogram ekstrakata nadzemnih dijelova biljke *Echinacea purpurea*: 1. kaftarinska kiselina, 2. klorogenska kiselina, 3. kavena kiselina, 4. ehinakozid kiselina, 5. cikorijska kiselina



Slika 3. ESR spektar DMPO-OH spin adukta nastalog u Fentonovom modelnom sustavu (slijepe proba)



Slika 4. Antioksidativna aktivnost ekstrakta *E. purpurea* prema hidroksilnom radikalu

Tablica 2. Evaluacija oštećenja DNA određena kometnim testom uz humane leukocite 2-h nakon izlaganja ekstraktu ljubičaste ehinaceje, aflatoksinu B₁, ohratoksinu A ili kombinaciji mikotoksina s biljnim ekstraktima

Stanični tretman	Dužina repa (µm)				Rečni intenzitet (% DNA)				Rečni moment			
	Sr. vrij.±SD	M	25%-P	75%-P	Sr. vrij.±SD	M	25%-P	75%-P	Sr. vrij.±SD	M	25%-P	75%-P
C1 (10% DMSO)	14.19±1.75	14.10	12.82	14.74	0.58±1.23	0.0	0.0	0.52	0.076±0.17	0.0	0.0	0.055
C2 (0.03% etanol)	13.53±2.15	13.46	12.18	14.74	0.34±0.97	0.0	0.0	0.55	0.060±0.11	0.0	0.0	0.062
C3 (0.3% etanol)	14.61±2.07	14.74	13.46	13.38	0.53±1.57	0.0	0.0	0.21	0.076±0.23	0.0	0.0	0.023
E1 (1 mg/mL)	13.49±1.35	13.46	12.82	14.10	0.50±1.05	0.13	0.0	0.63	0.063±0.13	0.018	0.0	0.077
E2 (10 mg/mL)	14.09±2.09	14.10	12.82	15.38	0.58±1.25	0.02	0.0	0.62	0.075±0.15	0.002	0.0	0.081
E3 (20 mg/mL)	15.34±2.11	15.38*	13.46	16.67	0.39±0.85	0.0	0.0	0.47	0.054±0.10	0.0	0.0	0.070
AFB1 (1 nM)	16.58±4.63	15.38*	13.46	19.71	1.73±2.49	0.54*	0.0	2.55	0.240±0.33	0.078*	0.0	0.364
E1+AFB1	14.38±1.81	14.10**	12.98	15.38	0.52±1.46	0.0**	0.0	0.41	0.070±0.18	0.0**	0.0	0.059
E2+AFB1	15.00±1.84	15.38	14.10	16.67	0.40±0.87	0.0**	0.0	0.44	0.060±0.12	0.0**	0.0	0.065
E3+AFB1	14.82±2.49	14.74	13.46	15.87	0.96±2.13	0.06	0.0	0.83	0.130±0.27	0.004	0.0	0.125
OTA (10 nM)	17.30±4.85	16.03*	13.62	19.87	1.16±2.10	0.21*	0.0	1.25	0.170±0.30	0.030*	0.0	0.277
E1+OTA	14.48±1.86	14.10**	13.46	15.38	0.56±1.04	0.02	0.0	0.85	0.073±0.13	0.001	0.0	0.106
E2+OTA	14.26±2.35	14.10**	12.82	15.22	0.34±0.67	0.0**	0.0	0.30	0.045±0.08	0.0**	0.0	0.040
Standardna devijacija: 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05												
AFB1 ili OTA ili AFB1 (p<0.05)												

ZAKLJUČCI

- ESR spektralnom analizom, usporedbom intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukta utvrđeno je da ekstrakti ehinaceje, u rasponu ispitivanih koncentracija, inhibiraju stvaranje hidroksilnog radikala i/ili utječu na njegovu transformaciju;
- Leukociti koji su bili simultano izloženi AFB1-u i ekstraktu ehinaceje imali su značajno niži repni moment, repni intenzitet i dužinu repa kod nižih testiranih koncentracija ekstrakta, u odnosu na stanice koje su bile izložene samo mikotoksinu. Time je demonstriran neutralizirajući učinak ekstrakta herbe ljubičaste ehinaceje na navedenom rasponu koncentracija;
- Ekstrakti ehinaceje također su neutralizirali genotoksičnost OTA. Repni intenzitet i repni moment bili su značajno niži u stanicama izloženim kombinaciji OTA i dviju najviših koncentracija nego u stanicama tretiranim samo s OTA. Sve tri koncentracije ekstrakata pokazale su značajan zaštitni učinak s obzirom na dužinu repa komete;

LITERATURA:

Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Manojlović V, Komar D, Juranović Cindrić L, Nedović V, Bugarski B: Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res Int* 44:1094-1101, 2011.
Blois MS: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 191:1199-1200, 1958.
Christ B, Müller RH: Zur serienweisen Bestimmung des Gehaltes an Flavonoid-Derivaten in Drogen. *Archiv der Pharmazie* 293:1033-1042, 1960.
European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM). *European Pharmacopoeia*, 4th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2004.
Singh NP, Ho CY, HT, Tice RH, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191
Collins AR, Ouzzal AA, Brunborg G, Galvão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Sjöström R (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151
Domjan AM, Zejčević D, Kopjar N, Perica A (2006) Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B1-treated rats. *Toxicology* 222:52-59