

## Ispitivanje antitumorske aktivnosti lignana na HepG2 i HeLa ćelije

---

*Ispitivano je citotoksično dejstvo ekstrakta lignana iz semena lana, *Linum usitatissimum*, na HepG2 i HeLa ćelijama. Ćelije su bile podeljene u pet grupa, kontrolnu i četiri grupe koje su tretirane različitim koncentracijama ekstrakta. Vijabilitet ćelija određen je MTT testom i predstavljen je kao odnos živih ćelija i netretirane kontrole. Za HeLa ćelije rađeno je PI/DAPI bojenje i uzorci su snimljeni na konfokalnom mikroskopu. Ekstrakt koncentracije 5 mg/mL je pokazao statistički značajno antitumorsko dejstvo kod oba tipa ćelija.*

---

### Uvod

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najčešći primarni tumor jetre. Zbog povećane stope alkoholizma, hepatitisa B i C kao i sve učestalije gojaznosti povezane sa masnom jetrom povećava se i broj ljudi obolelih od HCC (Gomaa *et al.* 2008). Na membrani ćelija HCC nalazi se veliki broj estrogenskih receptora (ER) (Wang *et al.* 2006). Pokazano je da estrogen igra značajnu ulogu u patogenezi hepatocelularnog karcinoma koji je nastao nakon ciroze jetre (Lei *et al.* 2002). HepG2 ćelije, kao ćelijske linije HCC, su adherentne, epitelne ćelije koje imaju 55 hromozoma. Pored ćelija HCC, ER imaju i ćelije drugih karcinoma, kao i ćelije karcinoma cerviksa. Karcinom cerviksa je drugi najčešći karcinom kod ženske populacije (Zhai *et al.* 2010; Tiro *et al.* 2007). Kao ćelijska linija karcinoma cerviksa koriste se

HeLa ćelije. Istraživanja su pokazala da smanjenje broja ER ima ulogu u progresiji karcinoma cerviksa (Zhai *et al.* 2010). Pored estrogena, za ER se mogu vezati i fitoestrogeni, biljni hormoni koji su slični humanom estrogenu. Istraživanja su pokazala da su fitoestrogeni selektivni modulatori ER i da mogu ispoljiti estrogeno i antiestrogeno dejstvo (Moutsatsou 2007). Ova saznanja upućuju na mogući antitumorski efekat fitoestrogena na HCC i karcinom cerviksa. Najčešći fitoestrogeni su izoflavoni i lignani, a dosadašnja istraživanja su pokazala da je najbogatiji izvor lignana laneno seme (Lei *et al.* 2002).

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita antitumorsko dejstvo ekstrakta lignana iz semena lana (*Linum usitatissimum*) na ćelijskim linijama HCC i karcinoma cerviksa.

### Materijal i metode

**Ekstrakcija lignana iz semena lana.** Masa od 15 g semena lana mehanički je pulverizovano, a potom odmašćeno sa 56 mL petroletra na 55°C. Petroletar je filtriran, suvi ostatak isušen i ekstrahovan sa 90 mL metanola. Metanol je uparen, a ostatak suspendovan u 4 mL destilovane vode i odvajan pet puta sa po 4 mL etil-acetata, koji je zatim uparen.

**Ćelijske kulture.** Ispitivanja su rađena na HepG2 i HeLa ćelijama. Ćelije su gajene u RPMI 1640 medijumu sa 10% FBS, 1% Pen/Strep. Čuvane su na 37°C i vlažnosti vazduha od 95% i 5% CO<sub>2</sub>.

**Tretiranje ćelija ekstraktom lignana.** Ekstrakt je rastvoren u medijumu u koncentracijama 5, 1, 0.5 i 0.05 mg/mL. Ćelije su tretirane 20 sati u inkubatoru na 37°C i vlažnosti vazduha od 95% i 5% CO<sub>2</sub>.

**MTT test.** MTT esej meri oksidativnu aktivnost ćelija. Ćelije su gajene u pločama sa 96 bu-

---

*Jovan Traparić (1996), Beograd, Vidikovački venac 77/19, učenik 3. razreda XV beogradske gimnazije*

*MENTOR: Marija Jeremić, student Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

narčića, tako da je u svakom bunarčiću bilo  $10^4$  ćelija. Ćelije su isprane rastvorom PBS-a, a potom je dodat medijum sa MTT bojom (0.5 mg MTT/mL medijuma), 200  $\mu$ L po bunarčiću. Ćelije sa MTT rastvorom su inkubirane sat vremena. Medijum je potom odliven, i dodat je DMSO. Što je intenzitet boje veći to je i oksidativna aktivnost veća i obrnuto, što indirektno govori o ćelijskoj vijabilnosti. Apsorbanca je očitana na 570 nm, odnosno maksimumu apsorpcije MTT boje.

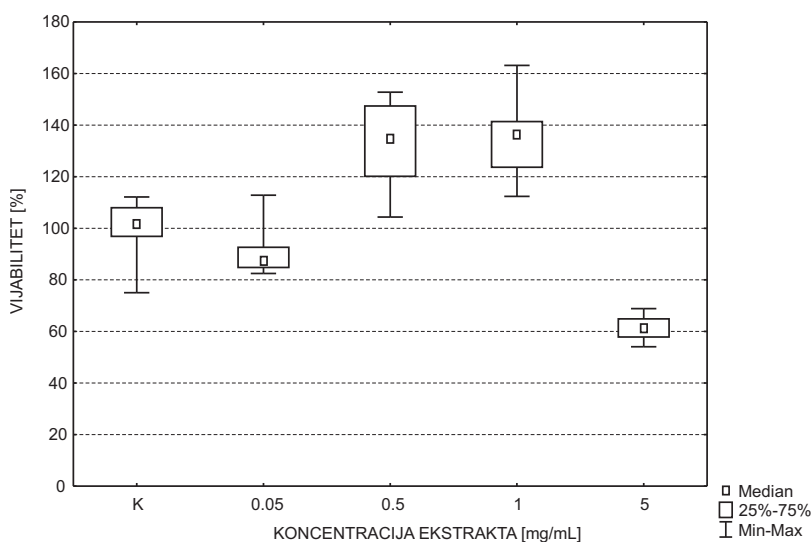
**Propidijum-jodid (PI) i 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) bojenje.** Ćelije su gajene u pločama sa 24 bunarčića, tako da je u svakom bunarčiću bilo  $10^5$  ćelija. Oprane su dva puta PBS-om a potom je dodat tripsin radi odvajanja ćelija od podloge. Dodata je ista količina medijuma kao i tripsina. Preživele ćelije presađene su na sterilno staklo u mikrotitar ploči sa 6 bunara. Potom su ćelije inkubirane dva sata. Ćelije su pažljivo isprane sa 2 mL PBS-a nakon čega su fiksirane sa 2 mL 4% formaldehida. Mikrotitar ploča sa ćelijama inkubirana je 20 minuta na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Potom je formaldehid izvađen i dodato je 3 mL PBS-a. Ćelije su obojene sa 1.5 mL 125 nM propidijum jodida, 20 minuta. Zatim su ćelije isprane sa 2 mL PBS-a. Nakon ispiranja ćelije su obojene DAPI rastvorom (1:1000). Preparati su čuvani u 4 mL PBS-a nakon čega su pregledani na konfokalnom mikroskopu.

## Rezultati

U cilju ispitivanja antitumorskog dejstva supstance, eksperiment je obuhvatio ispitivanje vijabiliteta u širokom opsegu koncentracija. Vijabilitet ćelija je predstavljen kao procenat živih ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu (100% vijabilitet) i određen je MTT testom. Nakon testa vijabiliteta pokazano je da je pri tretmanu HepG2 ćelija ekstraktom lignana koncentracije 5 mg/mL došlo do statistički značajnog pada vijabiliteta (60%). Pri tretmanima ekstraktima koncentracije 1 mg/mL i 0.5 mg/mL dolazi do statistički značajnog porasta vijabiliteta (131% pri koncentracijama 1 mg/mL i 0.5 mg/mL) u odnosu na kontrolu. Pri tretmanu ekstraktom koncentracije 0.05 mg/mL dolazi do statistički značajnog pada vijabiliteta u odnosu na kontrolu (86%) (slika 1).

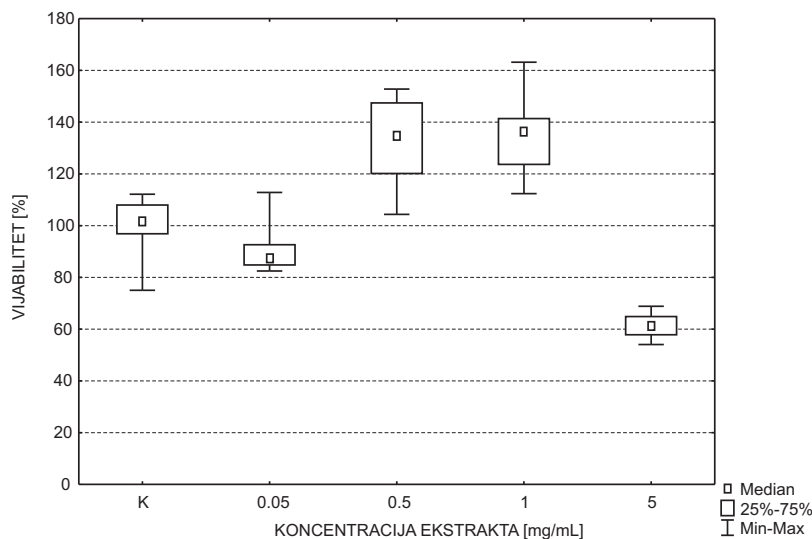
Pri tretmanu HeLa ćelija ekstraktom lignana koncentracije 5 mg/mL dolazi do statistički značajnog pada vijabiliteta (39%) u odnosu na kontrolu. Pri tretmanima ekstraktom koncentracija 1 mg/mL, 0.5 mg/mL i 0.05 mg/mL dolazi do porasta vijabiliteta u odnosu na kontrolu, ali on nije statistički značajan (109% pri koncentraciji 1 mg/mL, 108% pri koncentracijama 0.5 mg/mL i 0.05 mg/mL) (slika 2).

Na HeLa ćelijama rađeno je i PI/DAPI bojenje. Uzorci su posmatrani na konfokanom mik-



Slika 1.  
Vijabilitet HepG2 ćelija  
određen MTT testom

Figure 1.  
Cell viability of HepG2  
cells measured by MTT  
assay



Slika 2.  
Vijabilitet HeLa ćelija  
određen MTT testom

Figure 2.  
Cell viability of HeLa  
cells measured by MTT  
assay

roskopu, a rezultati odgovaraju rezultatima MTT testa (slika 3). Na snimcima se uočava statistički značajan pad vijabiliteta grupe ćelija tretiranih ekstraktom koncentracije od 5 mg/mL u odnosu na kontrolu, dok je kod koncentracija 0.5 mg/mL i 0.05 mg/mL vijabilitet približno isti.

## Diskusija i zaključak

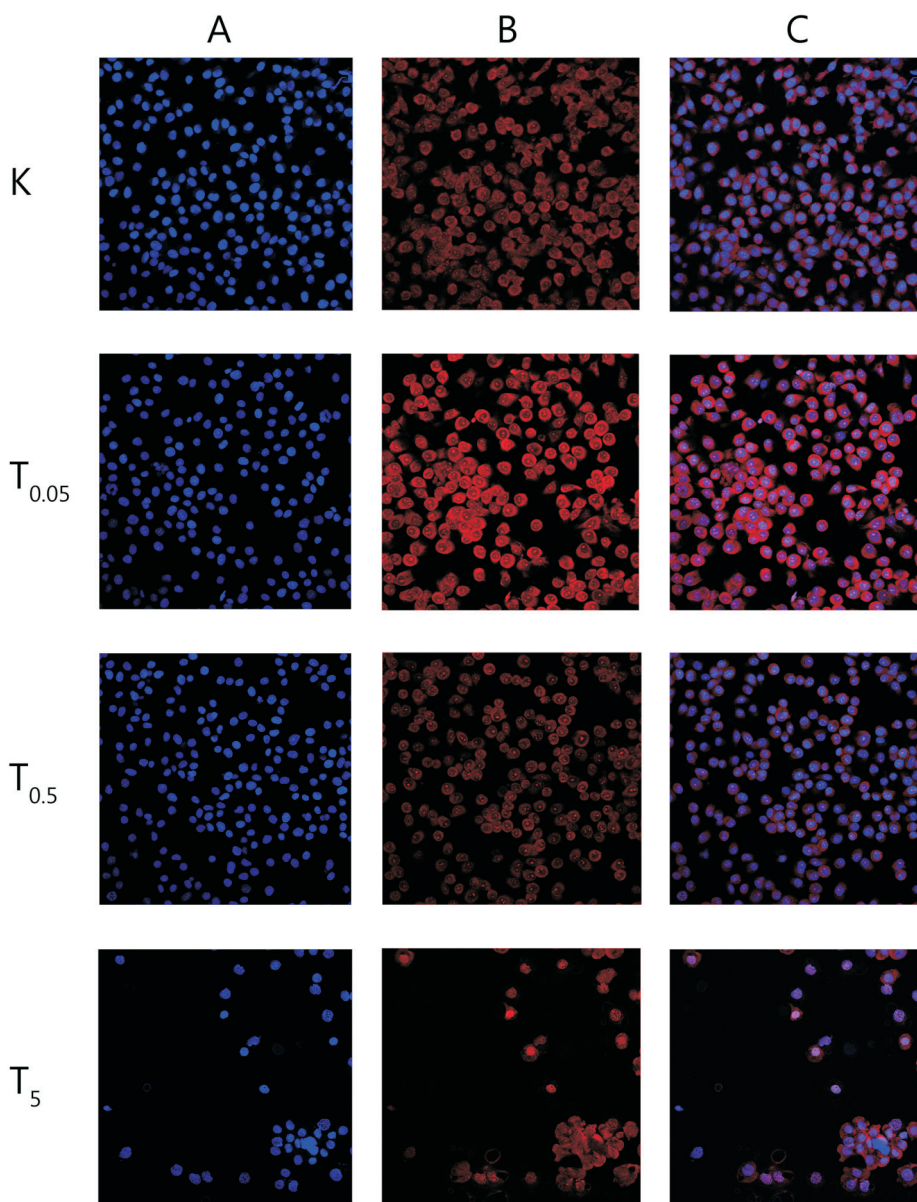
HCC je primarni maligni tumor jetre. Zbog napretka oboljenja koja uzrokuju HCC, broj osoba koje boluju je u porastu. ER se nalaze na membranama ćelija velikog broja tumora, pa tako i na ćelijama karcinoma cerviksa i HCC. Sa napretkom tumora kod ćelija HCC dolazi do porasta broja ER na membranama, dok kod karcinoma cerviksa dolazi do njihovog gubitka. U poslednje vreme ispituju se antitumorska dejstva mnogih agenasa, ali nijedan se nije pokazao dovoljno efikasnim, te se i dalje traga za najboljim.

Vijabilitet je određen MTT testom i predstavljen je kao odnos živih ćelija i netretirane kontrole (100%). Pri tretmanu ekstraktom lignana koncentracije 5 mg/mL i kod HeLa i kod HepG2 dolazi do statistički značajnog pada vijabiliteta (60% kod HepG2 i 39% kod HeLa). Pri tretmanima ekstraktom koncentracija 1 mg/mL i 0.5 mg/mL dolazi do porasta vijabiliteta koji je kod HepG2 statistički značajan, a kod HeLa nije (130% kod HepG2, a nešto ispod 110% kod

HeLa, za obe koncentracije). Pri tretmanu ekstraktom koncentracije 0.05 mg/mL kod HepG2 dolazi do statistički značajnog pada, a kod HeLa dolazi do porasta vijabiliteta koji nije statistički značajan (koji iznosi 86% kod HepG2 i 108% kod HeLa).

Na osnovu MTT testa može se primetiti da rezultati nisu isti za HepG2 i HeLa ćelije. Ovim se može zaključiti da ekstrakt ima različite mehanizme dejstva na ove tipove ćelije. Razlika u dejstvu može se pripisati i različitom broju ER na membranama ova dva tipa ćelija. HeLa ćelije gotovo i da nemaju ER na svojim membranama, dok je broj ER na HepG2 ćelijama veliki (Lei *et al.* 2002; Moutsatsou 2007).

Rezultati MTT testa na HeLa ćelijama slični su rezultatima bojenja PI/DAPI. Pri tretmanu ekstraktom koncentracije 5 mg/mL dolazi do statistički značajnog smanjenja broja ćelija. Na ovoj populaciji ćelija primećuje se fragmentacija DNK u jedru, što ukazuje da je veliki broj apoptotičan. Pri tretmanima ekstraktom u koncentracijama 1 mg/mL, 0.5 mg/mL i 0.05 mg/mL ne dolazi do smanjenja broja ćelija, već suprotno dolazi do porasta broja ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, na snimcima uzoraka tretiranih koncentracijama ekstrakta od 0.5 mg/mL i 0.05 mg/mL primećena je početna faza fragmentacije DNK, što ukazuje da su populacije ovih ćelija započele apoptozu (programirana ćelijska smrt). Primećeno je da pad vijabiliteta ima



Slika 3. Snimak HeLa ćelija, tretiranih ekstraktom lignana, na konfokalnom mikroskopu

Legenda: A – PI bojenje; B – DAPI bojenje; C – preklapljena slika PI i DAPI bojenja; K – kontrolna grupa;  $T_{0.05}$  – grupa ćelija tretiranih koncentracijom ekstrakta 0.05 mg/mL;  $T_{0.5}$  – grupa ćelija tretiranih koncentracijom ekstrakta 0.5 mg/mL;  $T_5$  – grupa ćelija tretiranih koncentracijom ekstrakta 5 mg/mL.

Figure 3. Recording of HeLa cells treated with lignan extract on confocal microscope

Legend: K – control group;  $T_{0.05}$  group of cells treated with extract concentration of 0.05 mg/mL;  $T_{0.5}$  group of cells treated with extract concentration of 0.5 mg/mL;  $T_5$  group of cells treated with extract concentration of 5 mg/mL.

dozno-zavisni efekat. Iz rezultata dobjenih ovim istraživanjem može se videti da tip ćelijske smrti pri tretmanu od 5 mg/mL ne odgovara apoptozi, te bi to trebalo dodatno ispitati.

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da ekstrakt lignana u koncentraciji 5 mg/mL ima jako antiproliferativno dejstvo na oba tipa ćelija. Pad vijabiliteta ima dozno-zavisni efekat.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se svom mentoru Mariji Jeremić na pomoći u pripremi i realizaciji istraživanja i pisanju rada, kao i Ivi Pruner na njenom angažmanu oko obezbeđivanja ćelijskih kultura koje su se koristile u radu i na konsultacijama oko realizacije rada.

## Literatura

Gomaa A-I., Khan S. A., Toledano M. B., Waked I., Taylor-Robinson S. D. 2008. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, **14**: 4300.

Lei B., Roncaglia V., Viganó R., Cremonini C., De Maria N., Del Buono M. G., Manenti F., Villa E. 2002. Phytoestrogens and liver disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **193**: 81.

Moutsatsou P. 2007. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones (Athens)*, **6**: 173.

Tiro J. A., Meissner H. I., Kobrin S., Chollette V. 2007. What do women in the U.S. know about human papillomavirus and cervical cancer? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **16**: 288.

Wang A. G., Lee K. Y., Kim S. Y., Choi J. Y., Lee K. H., Kim W. H., Wang H. J., Kim J. M., Park M. G., Yeom Y. I., Kim, N. S., Yu D. Y., Lee D. S. 2006. The Expression of Estrogen Receptors in Hepatocellular Carcinoma in Korean Patients. *Yonsei Medical Journal*, **47**: 811.

Zhai Y., Bommer G. T., Feng Y., Wiese A. B., Fearon E. R., Cho K. R., 2010. Loss of Estrogen Receptor 1 Enhances Cervical Cancer Invasion. *The American Journal of Pathology*, **177**: 884.

---

Jovan Traparić

## Antitumor Activity of Lignans in HepG2 and HeLa Cells

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common malignancy of liver. Previous research has shown that estrogen has an important role in pathogenesis HCC. HCC cells unlike hepatocytes have increased the number of estrogen receptors (ER) in cell membranes. Beside HCC, cervical carcinoma cells have ER too. Cervical carcinoma is malignancy of the cervix. Research has shown that estrogen plays an important role in the inhibition of apoptosis of cervical carcinoma cells. Beside estrogens, phytoestrogens can bind to ER. Phytoestrogens are substances which have a hormonal effect but their effect is weaker than the effect of estrogen. Phytoestrogens can exhibit estrogenic or antiestrogenic activity and it depends on the quantity of binded estrogens to ER. If the quantity is less, then phytoestrogens will exhibit estrogenic activity. Otherwise they will exhibit antiestrogenic activity. There are two classes of phytoestrogens – isoflavones and lignans. Flaxseed is the richest source of lignans (Lei *et al.* 2002). The aim of this paper was to explore antitumor effect of lignan extracted from flaxseed (*Linum usitatissimum*) on HCC and cervical cancer.

Ethyl-acetate extract of lignan was made from flaxseed. All tests were made on HepG2 cells as cell lines of HCC and HeLa cells as cell lines of cervical carcinoma. Cells were cultivated in RPMI media and distributed into five groups, control group and four experimental groups. Experimental groups were treated with different concentrations of the extract, 5, 1, 0.5 and 0.05 mg/mL. Cells have been treated after 20 hours. Cell viability was measured with MTT assay. Analysis of cell cycle was performed after propidium-iodide (PI) and DAPI staining. Viability has been measured in regard to control which had 100% viability.

This research showed that lignan extracts has strong antitumor effect on both cell lines at highest concentration (5 mg/mL). Higher concentration of extract has stronger antitumor effect. It has been noticed that cell death mechanism after treatment with concentration of 5 mg/mL is not apoptosis.