

Ispitivanje antioksidacijske, antimikrobne i citotoksične aktivnosti ekstrakta bijele imele (*Viscum album L.*)

Hasanbegović, Alisa

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:985476>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Alisa Hasanbegović

1327/MB

**ISPITIVANJE
ANTIOKSIDACIJSKE,
ANTIMIKROBNE I
CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI
EKSTRAKTA BIJELE IMELE
(*Viscum album* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić te uz pomoć mag. ing. Karle Hanousek Čiča.

ZAHVALA

Zahvaljujem se roditeljima i bratu na neizmjerne podršci tijekom studiranja i kolegicama koje su NSK učinile našim drugim domom gdje se u pauzama od druženja i učilo.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jasni Mrvčić i asistentici mag. ing. Karli Hanousek Čiča na mentorstvu, stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE, ANTIMIKROBNE I CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA BIJELE IMELE (*Viscum album L.*)

Alisa Hasanbegović, 1327/MB

Sažetak: Bijela imela (*Viscum album L.*) je višegodišnja, zimzelena, grmolika, poluparazitska biljka koja raste na različitim stablima. Od 1917. godine imelini pripravci se koriste u antitumorskim terapijama i danas se često koriste u komplementarnoj medicini u liječenju tumora. Glavne citotoksične komponente imele su lektini i viskotoksini. Istraživanja imele pokazala su njene brojne biološke učinke. Osim antitumorskih pokazuje i antimikrobne, antioksidacijske, antivirusne te imunomodulatorne aktivnosti. Cilj istraživanja bio je odrediti antioksidacijsku, antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost ekstrakata bijele imele pripremljenih maceracijom u vodeno-etanolnoj bazi pri čemu su u obzir uzeti sljedeći parametri maceracije: masena koncentracija biljnog materijala 20, 40 i 80 g L⁻¹ i volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi 25, 40, 55 i 70 %. S obzirom da eksperimenti za određivanje antimikrobne i citotoksične aktivnosti nisu provedeni zbog pandemije uzrokovane virusom SARS-CoV-2 u laboratoriju, u radu su prikazani dosadašnji rezultati objavljeni u literaturi.

Ključne riječi: bijela imela, viskotoksini, lektini, maceracija

Rad sadrži: 44 stranica, 22 slika, 5 tablica, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Jasna Mrvčić*

Pomoć pri izradi: *Karla Hanousek Čiča, mag.ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Jasna Mrvčić*
2. Izv.prof.dr.sc. *Kristina Radošević*
3. Prof.dr.sc. *Damir Stanzer*
4. Prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac* (zamjena)

Datum obrane: 30. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

ANALYSIS OF ANTIOXIDATIVE, ANTIMICROBIAL AND CITOTXIC ACTIVITY OF WHITE MISTLETOE EXTRACT (*Vsicum album L.*)

Alisa Hasanbegović, 1327/MB

Abstract: White mistletoe (*Viscum album L.*) is a perennial, evergreen, shrubby, semi-parasitic plant that grows on various host trees. Since 1917, mistletoe preparations have been used in antitumor therapies and today are often used in complementary medicine in the treatment of tumors. The main cytotoxic components of mistletoe are lectins and viscotoxins. Mistletoe research has shown its numerous biological effects. In addition to anticancer, it also shows antimicrobial, antioxidant, antiviral and immunomodulatory activities. The aim of the study was to determine the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of white mistletoe extracts prepared by maceration of water-ethanol base, taking into account the following maceration parameters: mass concentration of plant material 20, 40 and 80 g L⁻¹ and volume fraction of ethanol in water-ethanol bases 25, 40, 55 and 70 %. Since experiments to determine antimicrobial and cytotoxic activity in the laboratory have not been conducted due to a pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, this part of the paper provides an overview of the results published so far in the literature for the said experiments.

Keywords: white mistletoe, viscotoxins, lectins, maceration

Thesis contains: 44 pages, 22 figures, 5 tables, 55 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. Jasna Mrvčić, full professor*

Technical support and assistance: *Karla Hanousek Čiča, mag. ing.*

Reviewers:

1. PhD. *Jasna Mrvčić*, Full professor
2. PhD. *Kristina Radošević*, Associate professor
3. PhD. *Damir Stanzer*, Full professor
4. PhD *Verica Dragović-Uzelac* (substitute)

Thesis defended: September 30th, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. UPOTREBA LJEKOVITOG I AROMATIČNOG BILJA U PROIZVODNJI	2
TRAVARICA	2
2.2. MACERACIJA	3
2.3. BIJELA IMELA (<i>VISCUM ALBUM L.</i>)	3
2.4. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI BIJELE IMELE (<i>VISCUM ALBUM L.</i>)	5
2.5. ANTIOKSIDACIJSKI, ANTIMIKROBNI I CITOTOKSIČNI UČINAK	12
EKSTRAKTA BIJELE IMELE (<i>VISCUM ALBUM L.</i>)	12
2.6. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE, ANTIMIKROBNE I	13
CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Biljni materijal	16
3.1.2. Macerati bijele imele <i>Viscum album L.</i>	16
3.1.3. Kemikalije, aparatura i pribor	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. FRAP metoda (<i>engl. Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	19
3.2.2. DPPH metoda	22
3.2.3. ABTS metoda (2,2-azinobis(3-etil-benzotiazoline-6-sulfonate) radikal kation)	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKTA IMELE	27
4.2. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA IMELE	29
4.3. CITOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKTA IMELE	32
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Bijela imela (*Viscum album* L.) je višegodišnja, zimzelena, grmolika, poluparazitska biljka koja raste na različitim stablima. Još od vremena stare Grčke i Rima, ova vrsta se smatra ljekovitom biljkom.

Travarice su specijalne rakije koje se proizvode maceracijom ljekovitog i aromatičnog bilja, među njima i bijele imele (*Viscum album* L.) u komovici ili rafiniranom alkoholu ili destilacijom tog macerata. Najčešće se kombinira veći broj biljaka različitih karakteristika koje se međusobno slažu i nadopunjuju (Mihaljević Žulj, 2019).

Maceracija je metoda izdvajanja ili ekstrahiranja biološki aktivnih tvari iz bilja u vodeno-alkoholnu bazu, čime krajnji proizvod poprima karakterističnu aromu bilja (Lučić, 1986).

Istraživanja imele pokazala su njene brojne biološke učinke, poput antikancerogenih, antimikrobnih, antivirusnih, imunomodulatornih aktivnosti te poticanja stanične smrti procesom apoptoze (Önay-Uçar i sur., 2006).

Polifenolni spojevi prisutni u ekstraktima imele mogu inhibirati oksidativno oštećenje, mutagenezu i karcinogenezu uzrokovanu uporabom antineoplastičnih lijekova pri liječenju karcinoma (Brito i sur., 2015).

Uočeni su i antidijabetički, vazodilacijski, protuupalni, antiepileptički, antipsihotički i mnogi drugi učinci imele. Njeni se ekstrakti nerijetko koriste u kombinaciji s kemoterapijom (Brito i sur., 2015).

Ovaj rad predstavlja trenutna saznanja o imeli, s naglaskom na njen utjecaj na ljudsko zdravlje, točnije na njenu antioksidacijsku, antimikrobnu i citotoksičnu (antitumorsku) aktivnost. Pripremljeno je 12 uzoraka macerata imele maceracijom tri različite masene koncentracije imele i četiri različita volumna udjela etanola u vodeno-etanolnim bazama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. UPOTREBA LJEKOVITOG I AROMATIČNOG BILJA U PROIZVODNJI TRAVARICA

Od mnogih vrsta biljaka samo je nekoliko stotina zanimljivo u gospodarskom pogledu. U posljednje vrijeme prednost se daje uzgoju pojedinih vrsta ljekovitih i aromatičnih biljaka čiji su biološki aktivni sastojci osnovne sirovine za proizvodnju mnogih lijekova, kozmetičkih pripravaka i aroma za prehrambene proizvode.

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, u ljekovito bilje ubrajaju se one biljne vrste čiji jedan dio ili više dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili za kemijsko farmaceutske sinteze. Često se aromatično i ljekovito bilje naziva zajedničkim imenom ljekovito bilje. Ljekovito i aromatično bilje ima višestruku ulogu:

1. Ljekovito bilje samoniklo ili kultivirano zbog sadržaja biološki aktivnih tvari primjenjuje se u liječenju ljudi i životinja.
2. Aromatično bilje se zbog sadržaja aktivnih tvari koje poboljšavaju okus, upotrebljava u prehrambenoj industriji, a služi i za dobivanje eteričnog ulja.

Travarice su specijalne rakije koje se proizvode maceracijom ljekovitog i aromatičnog bilja u komovici ili rafiniranom alkoholu ili destilacijom tog macerata. U proizvodnji travarice najčešće se kombinira veći broj biljaka različitih karakteristika koje se međusobno slažu i nadopunjuju. Proizvodi se maceracijom različitih vrsta ljekovitog bilja u razrijeđenom etilnom alkoholu ili u rakiji komovici, pri čemu se biološki aktivni spojevi ljekovitog i aromatičnog bilja (tanini, saponini, flavonoidi i gorke tvari) ekstrahiraju u alkoholnu bazu. Najčešće je to rakija komovica. Biljke se obično dodaju u suhom, a rjeđe u svježem stanju. Za aromatične biljke je važno da su ubrane u pravo vrijeme, da su pravilno osušene i čuvane tako da ne izgube svoje aromatične sastojke. Vrlo je važno kod proizvodnje aromatiziranih rakija da osušene biljke nisu starije od nekoliko mjeseci. Biljke stare dvije ili više godina sasvim su neprikladne za dodavanje rakijama. Promjena okusa biljaka koje stoje dulje vrijeme naročito je uočljiva kod biljaka s vrlo jakim aromom, kao što su matičnjak, mažuran, pelin itd. Kompozicija biljaka je raznovrsna ovisno o tome kakva se rakija traži na tržištu (gorka,

slatkasta ili neutralna). Tipične biljke za proizvodnju gorkih rakija su pelin, srčanik i čkalj. Biljke za proizvodnju slatkastih rakija su anis, komorač i rabarbara. U aromatiziranim rakijama tipa dalmatinska travarica uglavnom se nalaze aromatične biljke karakteristične za to područje, kao npr.: pelin, komorač, smilje, borovica obična, pukinja, smreka, despik, lovor, mažuran, ružmarin, rutvica, žalfija, vrijesak, dupčac, divlji ružmarin, popunac, rogač i smokva. Tijekom dozrijevanja travarica mijenja svoj miris i okus, koji se djelomično ustali nakon 2-3 mjeseca. Upravo zato je poželjno da rakija travarica odleži 2-3 mjeseca radi harmonizacije i stabilizacije njenih organoleptičkih svojstava (Mihaljević Žulj, 2019).

2.2. MACERACIJA

Maceracija je metoda izdvajanja ili ekstrahiranja biološki aktivnih tvari iz bilja u vodeno alkoholnu bazu, čime krajnji proizvod poprima karakterističnu aromu bilja. Maceracijom biljaka u alkoholu ili rakiji ekstrahiraju se hlapivi sastojci (eterična ulja) kao i nehlapivi sastojci (tvari boje, glikozidi, fenolni spojevi i drugi nehlapivi spojevi) prisutni u biljci. Za maceraciju se koriste cijele biljke ili njihovi pojedini dijelovi poput listova, cvjetova, plodova, stabljike, kore i korijena, pri čemu je bitno da su korištene sirovine pravilno osušene. Bilje se stavlja u spremnik zajedno s vodenom-alkoholnom otopinom pri čemu je potrebno povremeno miješanje kako se poboljšala ekstrakcija i kako bi bilje bilo konstantno u kontaktu s otopinom. Postupak se često provodi u spremnicima s miješalicama i može trajati do nekoliko tjedana, osobito ako se macerira korijenje ili drugi drvenasti dijelovi biljke. Korištenjem svježeg bilja dobiva se kvalitetnija travarica. Dužim maceriranjem dobije se rakija loše boje i suviše jakog okusa. Rakije dobivene maceracijom aromatičnih biljaka su više ili manje obojene zeleno ako prevladava boja lišća, a smeđe ako prevladava boja stabljike. Boja macerata duljim stajanjem se redovito mijenja, zelenkasta boja većinom prelazi u smeđe nijanse (Lučić, 1986).

2.3. BIJELA IMELA (*Viscum album* L.)

Bijela imela (*Viscum album* L.) (slika 1) je višegodišnja, zimzelena, grmolika biljka. Još od vremena stare Grčke i Rima, ova vrsta se smatra ljekovitom biljkom. Mišljenja o terapijskoj primjeni imele promijenila su se zajedno s razvojem i napretkom medicinskih znanosti.

Tradicionalno, rod *Viscum* smješten je u porodicu *Viscaceae*, ali nedavna genetska istraživanja APG II (The Angiosperm Phylogeny Group, 2003) pokazuju kako je ova obitelj pravilno smještena u porodicu *Santalaceae* (Vicas i sur., 2012).



Slika 1. Bijela imela *Viscum album* L. (Anonymous 1)

Tablica 1. Opis cvijeta i lista *Viscum album* L.

Cvijet	Više cvjetova u cimoznom ili paštastom cvatu, neugledni, veličine 2 mm, žuto-zelene boje
List	Više listova, voštani, zelene boje, nasuprotni, duljine od 2 do 10 cm

U konačnici naraste kao grm promjera 150 cm sa voštanim listovima i cvjetovima u cimoznom cvatu (Tablica 1). Raste kao poluparazit na crnogoričnom boru ili listopadnom drveću kao što je hrast, brijest i jabuka i crnogoričnim vrstama poput bora, gdje pomoću sisaljki crpi hranjive tvari. Plod je bobica sa zelenim perikarpom, koji nakon sazrijevanja postaje svjetliji. Sadrži ljepljivu masu – *viscin*. Plodovi sazrijevaju krajem jeseni ili početkom zime i sadrže jednu sjemenku (Zuber, 2004).

Rasprostranjivanje sjemena je pticama ili plodovi otpadaju i dospijevaju u niže dijelove krošnje biljke domaćina. Jedna od ptica dobila je ime po tome što se hrani bobicama imele (*Turdus viscivorus* L., drozd imelaš). Ptice koje jedu bobice izbacuju sjemenke zajedno s izmetom i one se lijepe za površinu kore grana (Usčuplić, 1996).

Životni ciklus imele je složen i ima dvije faze, parazitska i neparazitska. Prva životna faza (neparazitska) uključuje tri koraka: širenje sjemena, klijanje sjemena i razdoblje prvog pričvršćivanja parazita na stablo. U drugoj životnoj fazi (parazitska) razlikuju se pet različitih stadija: trajno pričvršćivanje parazita i njegovo ukorjenjivanje u vaskularni sustav domaćina, rast prvih listova, razdoblje razvoja izbojka u parazitu i formiranje sustava sposobnog da apsorbira vodu iz domaćina, nakon čega slijedi cvjetanje i razvoj ploda. Veliki je broj vrsta biljaka domaćina na kojima se imela može razviti i postati parazit (Stypinski, 1997).

Imela sintetizira većinu svojih komponenata, ali ista može apsorbirati određene nutrijente iz biljke domaćina. Pretpostavlja se da farmakološki aktivne komponente mogu prelaziti sa biljke domaćina na biljku parazit (Büssing i Schietzel, 1999).

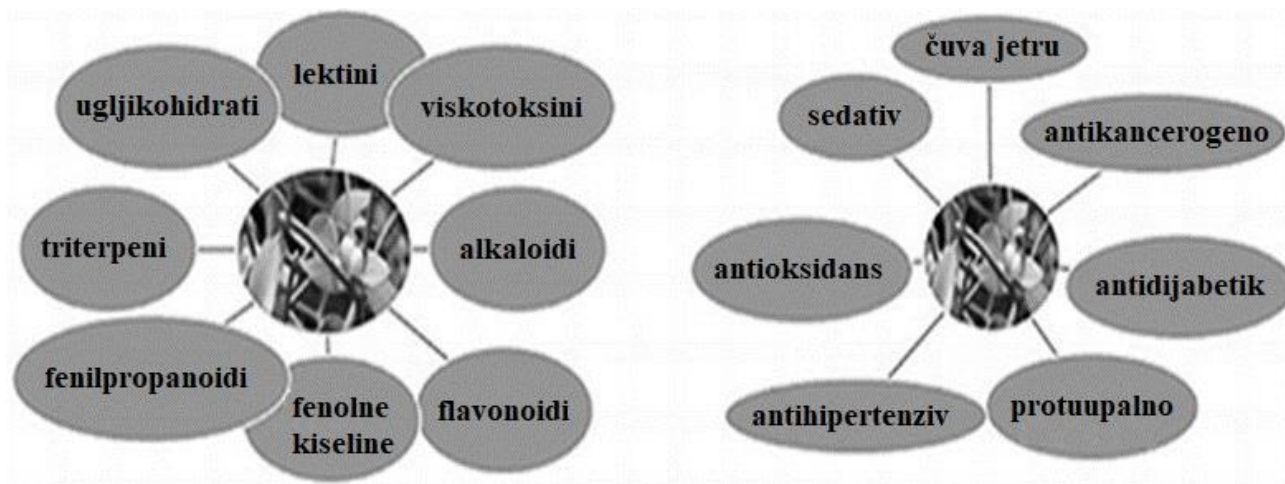
Imela sadrži brojne fitokemikalije koje su se pokazale efikasne u liječenju humanih tumora. Osim antitumorskog djelovanja, uočeni su i antidijabetički, vazodilatacijski, protuupalni, antiepileptički, antipsihotički i mnogi drugi učinci imele. Njeni se ekstrakti nerijetko koriste u kombinaciji s kemoterapijom (Brito i sur., 2015).

Ekstrakti biljke, posebno vodeni, primjenjuju se u tradicionalnoj i službenoj medicini, među ostalim u liječenju hipertenzije ili artritisa. Potencijalno se može koristiti i kao hepatoprotektivni ili kao sedativ (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Tradicionalno, biljka europske imele koristi se dugi niz godina u liječenju hipertenzije, tjeskobe, nesanice, unutarnjeg krvarenja ili ateroskleroze i u komplementarnim terapijama raka (Skidmore-Roth, 2004).

2.4. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI BIJELE IMELE (*Viscum album* L.)

Neki od značajnijih do sada identificiranih biološki aktivnih spojeva (slika 2):

- a. Polifenoli
- b. Lektini i viskotoksini
- c. Terpeni
- d. Fitosteroli
- e. Oligosaharidi, polisaharidi

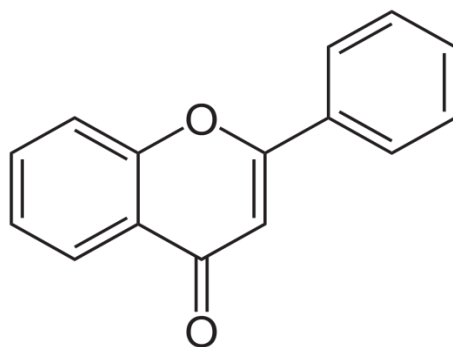


Slika 2. Biološki aktivne komponente *Viscum album* L. i njihov utjecaj na čovjeka (Nazaruk i Orlikowski, 2016)

a. Polifenoli imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost. Daleko najveći izvor polifenola upravo su biljke pa je tako više od 8000 polifenolnih spojeva otkriveno u raznim biljnim vrstama. Oni kao njihovi sekundarni metaboliti čine vrlo raznoliku skupinu kemijskih spojeva, koji se mogu na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava svrstati u nekoliko definiranih grupa, a svi nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora, šikiminske kiseline (Pandey i sur., 2009). Biljkama primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, pigmentaciju, rast i razmnožavanje (Manach i sur., 2004). Fenolni spojevi imaju najmanje jedan aromatski prsten s priključenom jednom ili više hidroksilnih skupina te se svrstavaju pod flavonoide i ne-flavonoide (Del Rio i sur., 2013). Polifenoli imaju više od jedne polifenolne hidroksilne skupine vezane na jedan ili više benzenskih prstena.

FLAVONOIDI

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji obuhvaćaju petnaest ugljikovih atoma raspoređenih unutar dva aromatska prstena povezanih s piranskim prstenom (slika 3). Glavni podrazredi flavonoida su flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijanidini. Ostale grupe flavonoida koji se u hrani nalaze u vrlo malim količinama su halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auronni (Pandey i sur., 2009; Manach i sur., 2004).



Slika 3. Opća formula flavonoida (Anonymous 2)

NEFLAVONOIDI

Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe od flavonoida i sastoje se od jednog benzenskog prstena. Glavni podrazredi su fenolne kiseline, stilbeni, legnani.

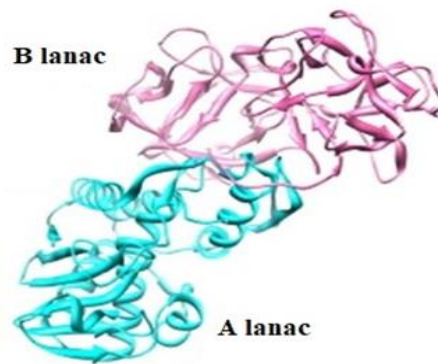
Glavna odrednica polifenolske sposobnosti keliranja metalnih kationa i gašenja radikala je njihova struktura. Utjecaj strukturnih karakteristika na antioksidacijsku aktivnost kod fenolnih kiselina (Balasundram i sur., 2006):

- broj i položaj hidroksilnih skupina u odnosu na funkcionalnu karboksilnu skupinu utječe na antioksidacijsku aktivnost
- monohidroksibenzojeve kiseline s hidroksilnom skupinom na o ili p-položaju u odnosu na karboksilnu skupinu ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost dok u slučaju m-položaja pokazuju
- antioksidacijski kapacitet fenolnih kiselina povećava se s povećanjem stupnja hidroksilacije
- supstitucija hidroksilnih grupa na 3- i 5- položaju s metoksilnim skupinama smanjuje aktivnost
- hidroksicimetne kiseline pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline što može biti povezano s $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ skupinom, koja doprinosi većoj mogućnosti doniranja atoma vodika i stabilizaciju radikala nego $-\text{COOH}$ skupina u hidroksibenzojevim kiselinama

Utjecaj strukturnih karakteristika na antioksidacijsku aktivnost kod flavonoida (Balasundram i sur., 2006):

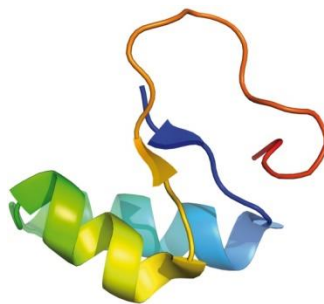
- stupanj hidroksilacije i položaj -OH skupina u prstenu B utječu na antioksidacijsku aktivnost
 - dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma, zajedno s 4-okso-skupinom u prstenu C povećava sposobnost gašenja radikala
 - dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma, u kombinaciji s 3-OH skupinom u prstenu C također povećava sposobnost gašenja radikala. Supstitucija 3-OH skupine dovodi do povećanja torzije kuta i gubitka koplanarnosti što dovodi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti
 - supstitucija hidroksilnih skupina u prstenu B s metoksi-skupinama mijenja redoks potencijal što utječe na sposobnost gašenja radikala
 - glikozilacija flavonoida i stupanj polimerizacije također utječu na antioksidacijsku aktivnost
- Flavonoidi izolirani iz ekstrakta metanola pripadaju čalkonima i flavanonima. Svi su u glikozidnoj formi i imaju metoksilne grupe u strukturi (Fukunaga i sur., 1987).

b. Lektine i viskotoksine je zbog izraženog apoptotičnog i citotoksičnog utjecaja na stanice moguće koristiti u liječenju tumora (slika 4) (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Lektini su obrambeni biljni proteini koji imaju sposobnost vezanja na ugljikohidrate ili na proteine koji sadrže ugljikohidrate, a nalaze se prvenstveno u sjemenkama (Pevalek Kozlina, 2003). Lektini su glavna skupina kemikalija izoliranih iz imele (ML I, ML II, ML III). Klasificirani su kao tip II ribosom- inaktivirajući proteini. Sastavljeni su od dva peptidna lanca, A-lanca (29,5, 27 i 25 kDa) koji sadrže tri domene i B-lanac (32, 32 i 25 kDa) koji sadrži dvije domene slične strukture. Lanac B se specifično veže za D-galaktozu (ML I), D-galaktozu/N-acetil-D-galaktozamin (ML II) i N-acetil-D-galaktozamin (ML III) (Franz, 1985). Europska biljka imele dobivena iz listopadnih stabala sadrži uglavnom ML I, a pri uzgoju na planini i borovima - ML III. Njihova količina ne dostiže ni 2 % ukupnih polipeptida i proteina prisutnih u imelama (Peumans i sur., 1996).

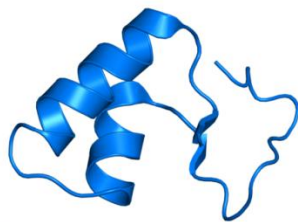


Slika 4. Struktura lektina 1 u *Viscum album* L. (Fu i sur., 2011)

Viskotoksini su amfipatski proteini male molekulske mase koji se nalaze u listovima i stabljikama biljaka. Najpoznatiji izomeri su viskotoksin A3 (slika 5), A2 (slika 6) koji pokazuje najveću i B koji ima nešto slabiju citotoksičnu aktivnost. Viskotoksini imeli omogućuju kompaktnu strukturu i visoku stabilnost tijekom denaturirajućih uvjeta kao što su toplina i djelovanje proteaza. Nađeno je 7 različitih izomera viskotoksina koji ovise o podvrsti same imele - A1, A2, A3, B, B1, C1 i 1PS, međutim uočeno je da najčešće prevladavaju viskotoksini A2 i A3 (Nazaruk i Orlikowski, 2016).



Slika 5. Struktura viskotoksina A3 (Debreczeni i sur., 2003)



Slika 6. Struktura viskotoksina A2 (EBI, 2003)

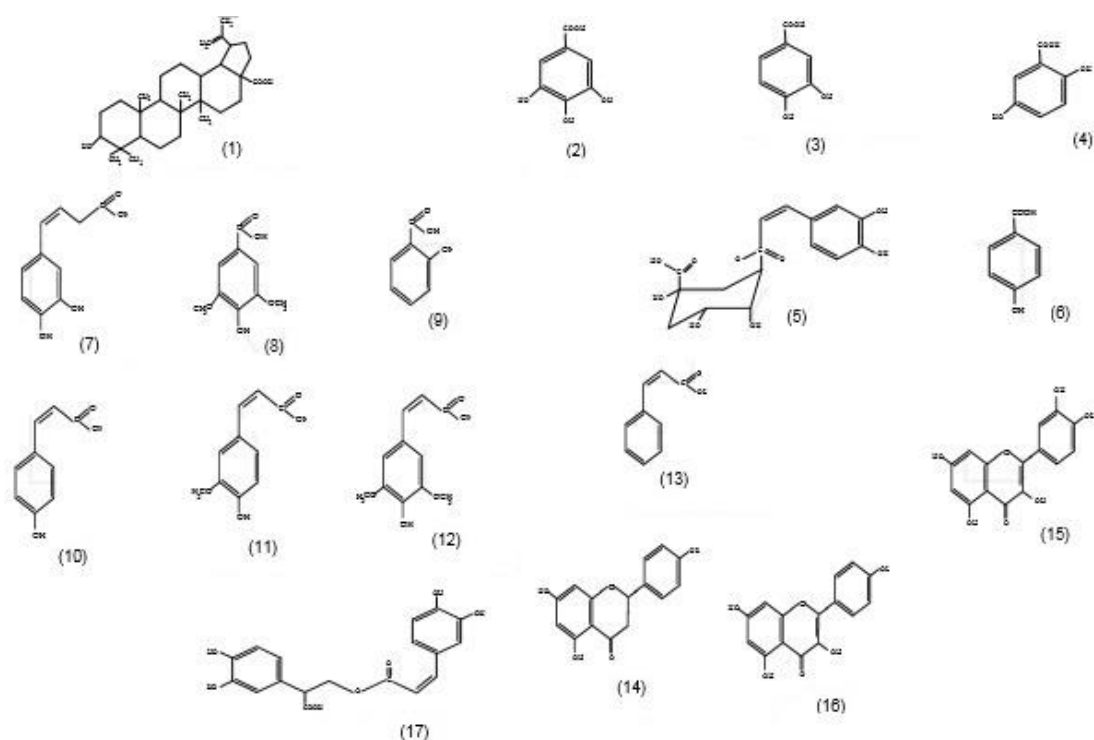
c. Terpeni su velika grupa prirodnih spojeva opće formule $(C_5H_8)_n$. Kroz povijest su se upotrebljavali i još se upotrebljavaju u razne svrhe i u svim područjima života kao što su: proizvodnja parfema, medicina, prehrambena industrija. Poznato je oko 30000 različitih terpena (Maimone i Baran, 2007). Terpeni izolirani iz imele su triterpeni poput β -amirin acetata, oleanolične kiseline, betulinske kiseline (slika 7) i smjese fitosterola (stigmasterol, β -sitosterol) i njihovih glikozida (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Triterpeni su važni antitumorski konstituenti imele, no isti su slabo topljivi u vodi. Stoga je razvijena ekstrakcijska metoda natrijevim sulfatom pri pH 7,3. Jedna od metoda izolacije triterpena iz imele je korištenje 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina kao otapala (Strüh i sur., 2012).



Slika 7. Derivati triterpena iz *Viscum album* L. (Nazaruk i Orlikowski, 2016)

d. Fitosteroli je zajednički naziv za skupinu biološki aktivnih steroidnih alkohola biljnog porijekla. Najznačajnije svojstvo fitosterola je njihov učinak na smanjenje apsorpcije endogenog i egzogenog kolesterola u organizmu.

Vicas i sur., (2012) identificirali su i kvantificirali različite spojeve (slika 8) iz uzoraka imele uključujući pentaciklični triterpen (betulinska kiselina), fenolne kiseline (galna kiselina, protokatekajska kiselina, gentizična kiselina, klorogena kiselina, p-OH benzojeva kiselina, kafeinska kiselina, salicilna kiselina, p-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina i trans-kinaminska kiselina) i 4 polifenola (naringenin, kvercetin, kaemferol i ružmarinska kiselina).



Slika 8. Bioaktivne komponente detektirane u lišću i stabljikama *V. album* L.: (1) betulinska kiselina, (2) galna kiselina, (3) protokatehinska kiselina, (4) gentizična kiselina, (5) kafeinska kiselina, (6) 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina, (7) salicilna kiselina, (8) klorogenska kiselina, (9) parahidroksibenzojeva kiselina, (10) p-kumarinska kiselina, (11) ferulinska kiselina, (12) sinapinska kiselina, (13) cimetna kiselina, (14) naringenin, (15) kvercetin, (16) kempferol, (17) ružmarinska kiselina (Vicas i sur., 2012)

2.5. ANTIOKSIDACIJSKI, ANTIMIKROBNI I CITOTOKSIČNI UČINAK EKSTRAKTA BIJELE IMELE (*Viscum album* L.)

Istraživanja imele pokazala su njene brojne biološke učinke, poput antikancerogenih, antimikrobnih, antivirusnih, imunomodulatornih aktivnosti te poticanja stanične smrti procesom apoptoze (Önay-Uçar i sur., 2006). Skupina spojeva koja se nalaze u imeli su fenolne kiseline, fenilpropanoidi i flavonoidi s antioksidacijskim i protuupalnim djelovanjem, koji smanjuju krvni tlak (Brito i sur., 2015). Fenolni spojevi privukli su interes mnogih istraživača jer su snažni antioksidanti i mogu zaštititi ljudsko tijelo od oksidativnog stresa. Antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina uglavnom je posljedica njihovog redoks potencijala (Vicas i sur., 2012). Biološki aktivne tvari u imeli poput polifenola nemaju nutritivnu funkciju, ali pozitivno utječu na ljudsko zdravlje – imaju jako antioksidacijsko djelovanje te štite organizam od oksidacijskog stresa i time od različitih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i bolesti jetre (Gupta i sur., 2013).

Potvrđeno je da antimikrobnu aktivnost posjeduju brojni polifenolni spojevi (jednostavni polifenoli, fenolne kiseline, lignani, hinoni, flavonoidi, tanini, kumarini), terpenoidi i etarska ulja, alkalodi, lektini, polipeptidi, poliacetileni, masne kiseline pa čak i neki jednostavni šećeri ili organske kiseline (Cowan, 1999).

Polifenolni spojevi prisutni u ekstraktima imele mogu inhibirati oksidativno oštećenje, mutagenezu i karcinogenezu uzrokovanu uporabom antineoplastičnih lijekova pri liječenju karcinoma. Pojedini flavonoidi poput kvercetina pojačavaju citotoksični učinak kemoterapeutskih lijekova tako što povećavaju osjetljivost tumorskih i otpornost normalnih, zdravih stanica susjednog tkiva (Brito i sur., 2015). Vodeni ekstrakti europske imele već se desetljećima široko koriste za alternativno liječenje i kao pomoćna terapija protiv raka, osobito u Njemačkoj, Austriji i Švicarskoj. Ekstrakti europske imele koriste se u adjuvantnoj terapiji raka, s ciljem uništenja eventualno preostalih tumorskih stanica nakon primarnog liječenja, zbog njihovih imunostimulirajućih i istovremeno citotoksičnih svojstava. Ovi učinci su jače izraženi kod ekstrakata nego za pročišćene lektine i viskotoksine (Eggenschwiler i sur., 2007). Većina istraživanja bijele imele (*Viscum album* L.) bavi se njenom antitumorskom aktivnošću. U mnogim kliničkim studijama uočeno je da je terapija imelom poboljšala kvalitetu života, produžila vrijeme života, a i dovela do regresije tumora. Ovisno o stadiju, u terapiji raka koriste se različite doze i načini primjene (Jurin i sur., 1993). U brojnim

kliničkim ispitivanjima, znanstvenici i liječnici pokazali su dobrobiti ekstrakta imele. Lektini, koji uzrokuju i apoptozu i izravno citotoksično djelovanje na stanice raka, igraju važnu ulogu u ovom procesu. Lektini induciraju apoptotički put i aktivnost ML III koja se sastoji od smanjenja sinteze p53 i Bcl-2 proteina. Ti su spojevi u netoksičnim koncentracijama inducirali aktivaciju transkripcije i izlučivanje proupalnih citokina interleukina (IL) -1, IL-6, TNF (*tumor necrosis factor*) a. Ovo sugerira mogućnost inhibiranja rasta tumorskih stanica (Ribereau-Gayon, 1996). Mnoge studije na životinjama, kao i ne-randomizirane, randomizirane i kohortne studije pokazale su da ekstrakti imele pokazuju potencijalne terapijske učinke kod karcinoma dojke i ginekoloških bolesti. Dokazano je poboljšanje kvalitete života, ublažavanje nuspojava nakon konvencionalne terapije i povećanje stopa preživljavanja (Kienle i sur., 2009). Antitumorska aktivnost ekstrakta imele je također posljedica njegovih antiangiogenih svojstava. Ovo je prikazano u *in vitro* i *in vivo* modelima (Elluru i sur., 2009). Važan učinak ekstrakta imele je poboljšanje kvalitete života oboljelih od karcinoma i smanjenje nuspojava konvencionalnog liječenja. Međutim, najnovija istraživanja pokazala su da primjena visokih doza ekstrakta imele ne prati imunosupresiju. Primijećene su nuspojave poput gripe, vrućice i reverzibilne hepatotoksičnosti (Kienle i Kiene, 2010).

2.6. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE, ANTIMIKROBNE I CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Slobodni radikali su bilo koji atom, molekula ili ion s nesparenim elektronom zbog čega su kemijski reaktivni pa su niskospecifični za reaktante. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Kao posljedica toga u kemijskoj reakciji oksidacije, brzo se i nepredvidivo spajaju s bilo kojom prostorno bliskom organskom molekulom kako bi postigli stabilnu elektronsku konfiguraciju. Vezanjem slobodnih radikala na organske molekule mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija (Halliwell i sur., 2007).

Prisutnost slobodnih radikala može izazvati citotoksični učinak, induciranje mutacija i kromosomskih aberacija te kancerogenezu (Štefan i sur., 2007).

Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata ovisi o sastavu ekstrakta i o uvjetima metoda koje se provode za određivanje kapaciteta. Metode koje se koriste mogu se podijeliti u 2 skupine: test baziran na prijenosu atoma vodika (*hydrogen atom transfer* - HAT) i test baziran na prijenosu elektrona (*electron transfer* - ET). Testovi bazirani na prijenosu atoma vodika primjenjuju sustav kompetitivne reakcije u kojoj se antioksidans i supstrat natječu za peroksil radikale. Testovi bazirani na prijenosu elektrona mjere sposobnost antioksidansa da reducira oksidans, pri čemu dolazi do promjene boje. Stupanj promjene boje je u korelaciji s koncentracijom antioksidansa u uzorku (Dudonné i sur., 2009).

Neke od metoda koje se koriste za određivanja antioksidacijske aktivnosti su: 2,2-azinobis(3-etil-benzotiazoline-6-sulfonate) radikal kation (ABTS+), CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Zajednička karakteristika prethodno navedenih metoda je kromogena komponenta radikalne prirode koja u prisustvu antioksidansa nestaje, a popraćena je spektrometrijskim mjerenjem (Pyrzyska i Pękal, 2013).

Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Ekstrapolacija sastojaka biljaka *in vitro* nije tako jednostavna pa zato i nema velike količine biljnih lijekova potvrđene efikasnosti kod infektivnih bolesti. Također i pored intenzivnih istraživanja viših biljaka, farmaceutska industrija nije otkrila široki spektar biljaka sa antimikrobnim djelovanjem koje bi vrijedilo dalje istraživati i modificirati s ciljem otkrića novog antibiotika (Lewis i Ausubel, 2006).

Difuzija s diskom i razrjeđivanje bujona ili agara su dobro poznate i često se koriste, ali druge vrste kao što su protočne citofluorometrijske i bioluminescentne metode se ne koriste učestalo zbog zahtjeva za specifičnom opremom i standardizacijom (Balouiri *et al.*, 2016).

Metode određivanja citotoksične aktivnosti

Testovi toksičnosti značajniji su za ispitivanje toksičnosti spojeva, a temelje se na izlaganju organizma, organa ili stanica ispitivanoj tvari. (Eisenbrand i sur., 2002).

Testovi toksičnosti mogu se provoditi 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.

Neke od najčešće korištenih metoda koje se koriste za ispitivanje *in vitro* citotoksičnosti primjenom kultura životinjskih stanica su:

- Kenacid Blue
- Trypan blue
- Neutral Red
- MTT

Kenacid Blue je boja koja prolazi kroz staničnu membranu i veže se za proteine u stanicama.. Jednostavna je i točna metoda koja daje reproducibilne rezultate. Kenacid Blue metodom se mjeri ukupna biomasa stanica putem bojanja staničnih proteina bojom Commassie Brilliant Blue R-250.

Trypan Blue 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 oštećenu staničnu membranu, dok žive stanice ostaju nebojane.

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.

Stanična vijabilnost i proliferacija određuje je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. Žuta tetrazolijeva sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) je prah koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). MTT se reducira u metabolički aktivnim stanicama. Stoga se ovim testom određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja ispitivanoj tvari. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Rezultirajući intracelularni ljubičasti spoj formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

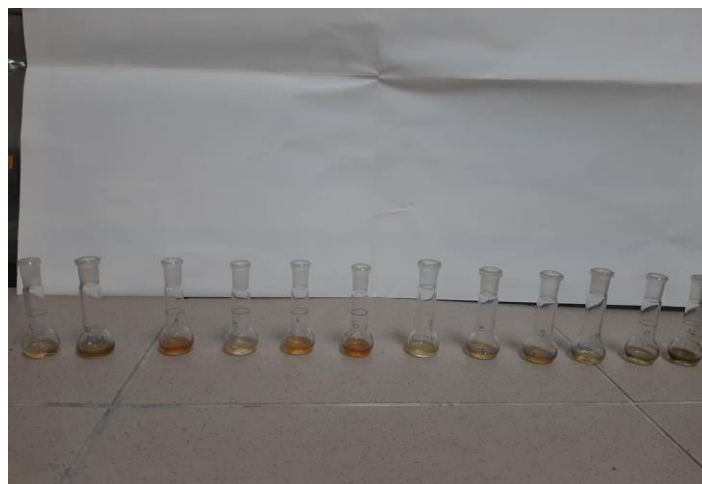
3.1.1. Biljni materijal

Kao biljni materijal korištene su sušene i usitnjene grančice i listovi bijele imele (*Viscum album* L.) proizvođača „Travar MB“ iz Bjelovara.

3.1.2. Macerati bijele imele *Viscum album* L.

Za istraživanje je korišteno 12 macerata bijele imele dobivenih postupkom maceracije osušenih i usitjenih grančica i listova bijele imele u vodeno-etanolnoj bazi pri čemu su u obzir uzeti sljedeći parametri maceracije (Tablica 2): masena koncentracija biljnog materijala 20, 40 i 80 g L⁻¹ i volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi 25, 40, 55 i 70 % (slika 9).

Maceracija biljnog materijala provedena je tako da je odvagana određena masa imele koja je potom prelivena s 0,5 L vodeno-etanolne baze. Postupak maceracije provodio se pri sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu te uz povremeno miješanje. Kraj maceracije određen je na temelju ustaljene koncentracije ukupnih fenolnih spojeva. Nakon završetka maceracije biljni materijal je odstranjen filtracijom kroz filter papir, a dobiveni macerati spremljeni su na + 4 °C do analiza.



Slika 9. Macerati dobiveni ekstrakcijom različitog udjela bilja i etanola u vodeno-etanolnoj bazi (vlastita fotografija)

Tablica 2. Uzorci dobiveni ekstrakcijom različitog udjela bilja i etanola u vodeno-etanolnoj bazi

UZORAK	MASENA KONCENTRACIJA BILJA (g L^{-1})	UDIO ETANOLA (%)
1	20	25
2	40	25
3	80	25
4	20	40
5	40	40
6	80	40
7	20	55
8	40	55
9	80	55
10	20	70
11	40	70
12	80	70

*Za uzorke 1-5 i 7 maceracija je trajala 4 tjedna, a za uzorke 6, 8-12 trajala je 5 tjedana

3.1.3. Kemikalije, aparatura i pribor

Kemikalije

- natrijev acetat
- ledena octena kiselina
- 40mM klorovodična kiselina
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)
- etanol 96 % (v/v)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)
- ABTS (2,2-azinobis(3-etil-benzotiazoline-6-sulfonat) radikal kation)
- kalijev persulfat

- destilirana voda

- željezo (III) klorid heksahidrat
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)

Aparatura i pribor

- analitička vaga (OHAUS Adventurer AX224)
- vortex
- termostat
- spektrofotometar (Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation)

- odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL)
- menzure (50 mL, 100 mL)
- staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- erlenmeyerova tikvica (500 mL)
- stakleni lijevci
- pipetman (100 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L)
- staklene epruvete i stalak za epruvete

- staklene kivete
- stakleni štapići
- kapaljke
- aluminijska folija

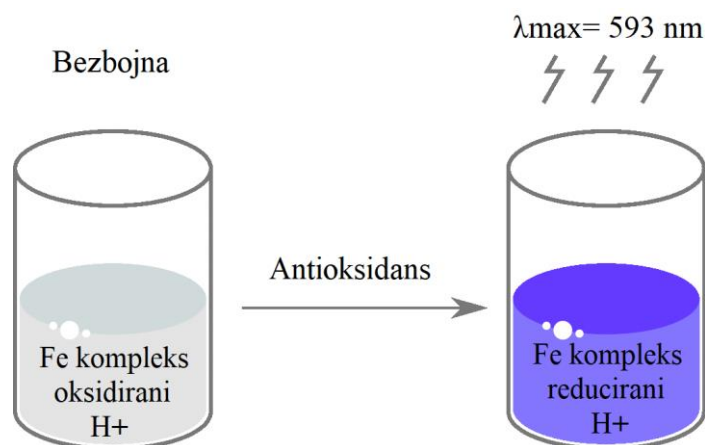
3.2. METODE RADA

3.2.1. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda

Princip metode

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridilstriazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (slika 10) (Shortle i sur., 2014).

Reakcija je popraćena povećanjem intenziteta obojenja koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri čemu se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućava prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) jest 0,77 V. Svi spojevi s nižim redoks potencijalom će doprinijeti konačnom izražavanju antioksidacijske aktivnosti. Reakcija prijenosa elektrona odvija u trajanju od 4 do 6 minuta. FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1999).



Slika 10. FRAP metoda (Anonymous 3)

Postupak metode

Primarno je potrebno pripremiti FRAP reagens. FRAP reagens je dobiven miješanjem 50 mL acetatnog pufera, 5 mL 20 mM otopine TPTZ reagensa i 5 mL 20 mM otopine željezovog (III) klorida.

Acetatni pufer je dobiven otapanjem 0,93 g bezvodnog (0,186 g 100 mL) natrijevog acetata i 8 mL ledene octene kiseline u tikvici od 500 mL. Tikvica je potom nadopunjena do oznake sa destiliranom vodom.

20 mM TPTZ reagens dobiven je vaganjem 0,0624 g TPTZ-a u odmjerne tikvici od 10 mL te je tikvica nadopunjena do oznake sa 40 mM HCl.

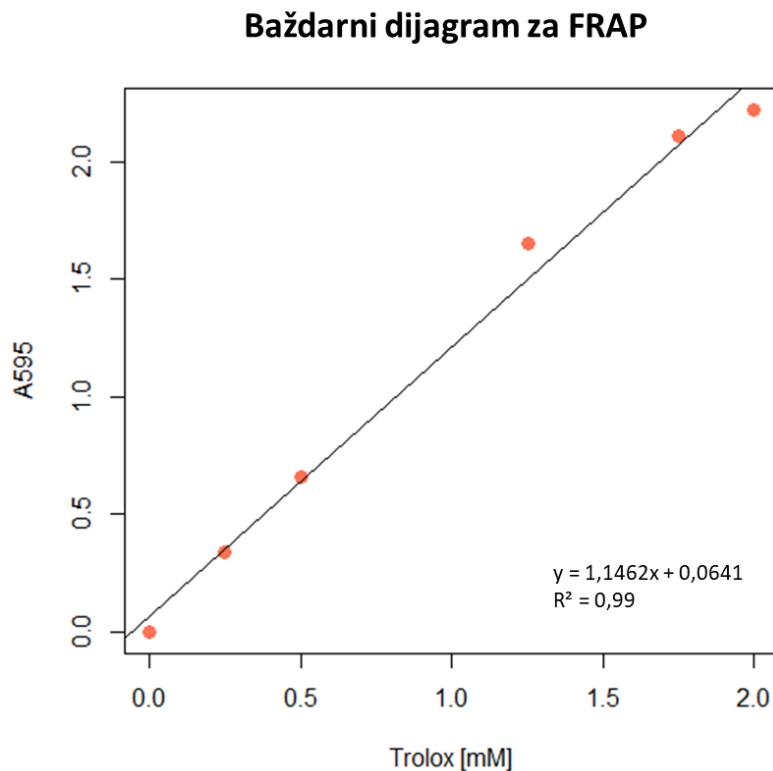
Otopina željezovog (III) klorida pripremljena je vaganjem 0,0541 g istog u odmjerne tikvici od 10 mL te je do oznake nadopunjena destiliranom vodom.

U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirano je 240 μ L destilirane vode, 80 μ L uzorka i 2080 μ L FRAP reagensa. Uzorci (ekstrakti biljke imele) razlikuju se na temelju masene koncentracije biljke imele te udjela etanola tijekom postupka ekstrakcije. Svi uzorci su razrijeđeni pet puta. Svaki uzorak pripremljen je u tri paralele.

Sadržaj u odmjerne tikvici je vorteksiran na vorteksu te je nakon 5 min termostiranja na 37 °C izmjerena apsorbancija uzoraka (1 – 12) na 595 nm. U slijepu probu je umjesto uzorka dodano 80 μ L etanola (96 %).

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama potrebno je pripremiti 20 mM otopinu Trolox-a u 96 % etanolu. Iz tako pripremljene otopine se prirede razrijeđenja otopine Trolox-a koncentracija 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,75 mM, 2,0 mM. Priprema uzoraka opisana je prethodno u postupku rada, ali se umjesto uzorka dodaju priređene koncentracije standardne otopine Troloxa. Iz izmjerenih apsorbancija za pojedinu koncentraciju otopine Trolox-a nakon provedene reakcije s FRAP reagensom nacrtava se baždarni pravac tako da se na os apscise nanesu koncentracije standardne otopine Trolox-a (mM), a na ordinatu pripadajuće im vrijednosti apsorbancije na 595 nm (slika 11).



Slika 11. Ovisnost $A_{595\text{nm}}$ o različitim koncentracijama standardne otopine Trolox-a nakon provedene reakcije s FRAP reagensom

3.2.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) metoda

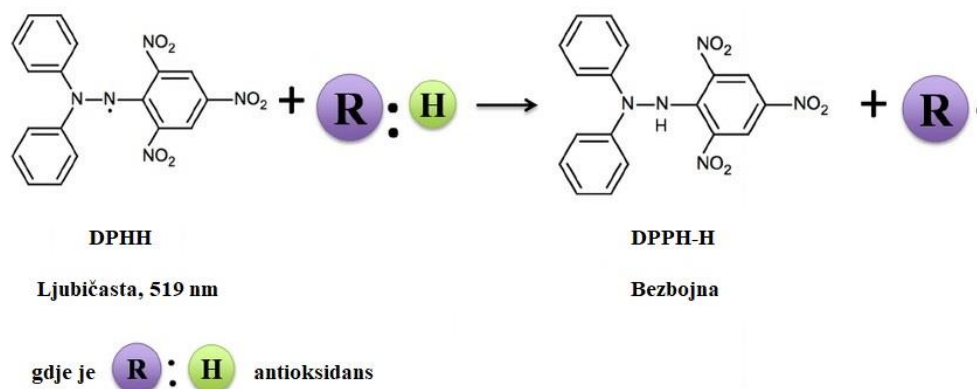
Princip metode

DPPH metodom se ispituje sposobnost komponenata kao stabilizatora radikala ili donora vodika te na temelju toga se vrši procjena antioksidacijske aktivnosti. DPPH radikal je organski dušikov radikal ljubičaste boje i komercijalno je dostupan. Otopina koja sadrži DPPH radikal se pomiješa s otopinom koja sadrži komponentu koja je antioksidans te dolazi do promjene boje iz ljubičaste u svijetlo žutu određenog hidrazina (slika 12). Redukcijska moć DPPH radikala može se mjeriti apsorbancijom na valnim duljinama od 515 do 528 nm (Pyrzynska i Pełal, 2013).

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

A_0 -apsorbancija otopine DPPH radikala, A_t -apsorbancija reakcijske smjese.



Slika 12. DPPH metoda (Liang i Kitts, 2014)

Postupak metode

10 mM DPPH reagens je dobiven otapanjem 0,03943 g DPPH sa 96 % etanolom u tikvici od 10 mL. Potrebno je svaki puta prije provođenja metode pripremiti svježu 0,1 mM otopinu DPPH reagensa tako da se uzme 0,5 mL originalne otopine te se tikvica nadopuni do oznake sa 96 % etanolom u tikvici od 50 mL.

Postupak pripreme uzoraka za DPPH metodu prije spektrofotometrijskog određivanja na 517 nm nakon 30 min odvijanja reakcije na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi prikazan je u Tablica 3. U slijepu probu je umjesto ispitivanih uzoraka dodan 96 % etanol.

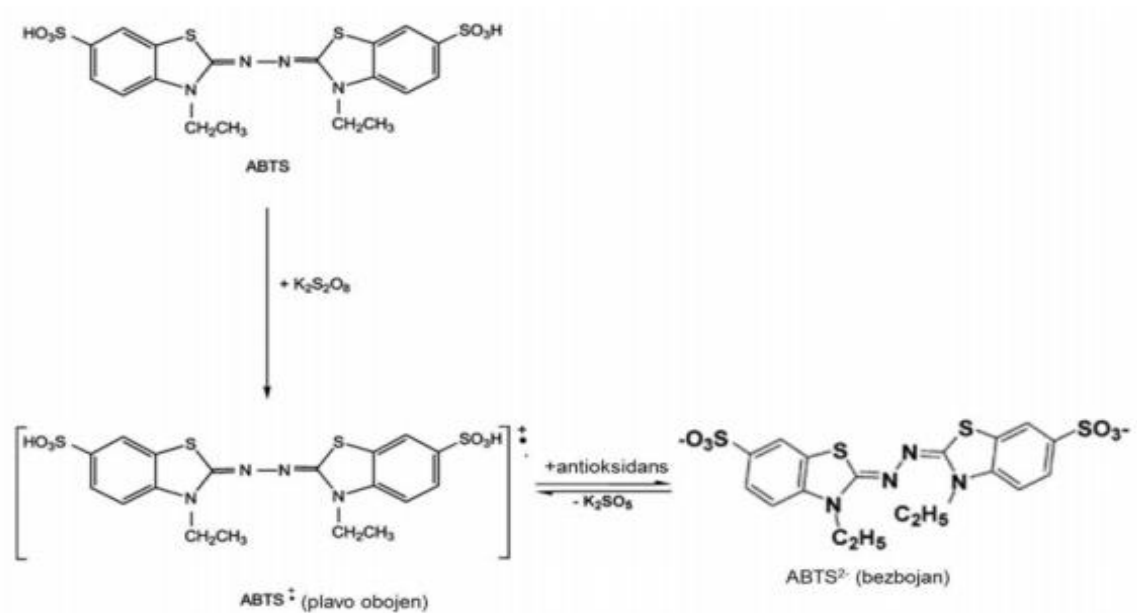
Tablica 3. Postupak pripreme uzoraka za DPPH metodu

Uzorak	Priprema uzoraka (At)	Priprema slijepe probe	Priprema Troloxa
1-12	200 μ L uzorka + 2 mL etanola + 2 mL DPPH (0,5 mL 10 mM DPPH u 50 mL)	200 μ L etanola + 2 mL etanola + 2 mL DPPH	200 μ L Troloxa (0.025mM) + 2 mL etanola + 2 mL DPPH

3.2.3. ABTS (2,2-azinobis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonat) radikal kation) metoda

Princip metode

ABTS metoda se temelji na “utišavanju“ plavo-zelenog ABTS radikal-kationa (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Reakcijom ABTS-a s kalijevim persulfatom nastaje kromoforni ABTS• radikal koji daje plavo-zelenu boju otopine s maksimumom apsorpcije pri valnim duljinama od 415, 645, 734 i 815 nm. Antioksidansi dodani u pripremljenu otopinu reduciraju ABTS• čime se gubi obojenje (slika 13). Razina obojenja odražava postotak inhibicije ABTS• radikala i određuje se kao funkcija koncentracije i vremena te uspoređuje sa standardom ekvivalenta. Metoda je primjenjiva za tvari topljive u vodi, mastima za čiste tvari i ekstrakte prehrambenih proizvoda (Re i sur., 1999).



Slika 13. Mehanizam oksidacije ABTS radikala i reakcija s antioksidansom (Re i sur., 1999).

Postupak metode

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta imele potrebne su:

1. 7 mM otopina ABTS reagensa koji se priprema otapanjem 0,0384 g ABTS-a u odmjernoj tikvici od 10 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

2. 140mM otopina kalijeva persulfata koja se priprema otapanjem 0,37846 g kalijeva persulfata (K₂S₂O₈) u odmjernoj tikvici od 10 mL i nadopuni se do oznake destiliranom vodom.

Pomiješa se 89 μL kalijeva persulfata sa 5 mL ABTS-a. Tikvica se potom obloži s aluminijskom folijom i čuva se u mraku 12 do 16 sati. Tako pripremljen reagens je stabilan dva dana. Sljedeći dan je potrebno pripremiti 1 % otopinu ABTS tako da se 1 mL ABTS otopi u 96 % etanol i nadopuni se do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL. Daljnjim dodavanjem ABTS ili 96 % etanola potrebno je postići apsorbanciju pri 734 nm u iznosu od 0,700 ± 0,02.

Uzorci se pripremaju dodavanjem 20 μL uzorka te 2 mL ABTS. Reakcija se odvija 6 min u mraku te se na kraju apsorbancija tako pripremljenih uzoraka mjeri na 734 nm.

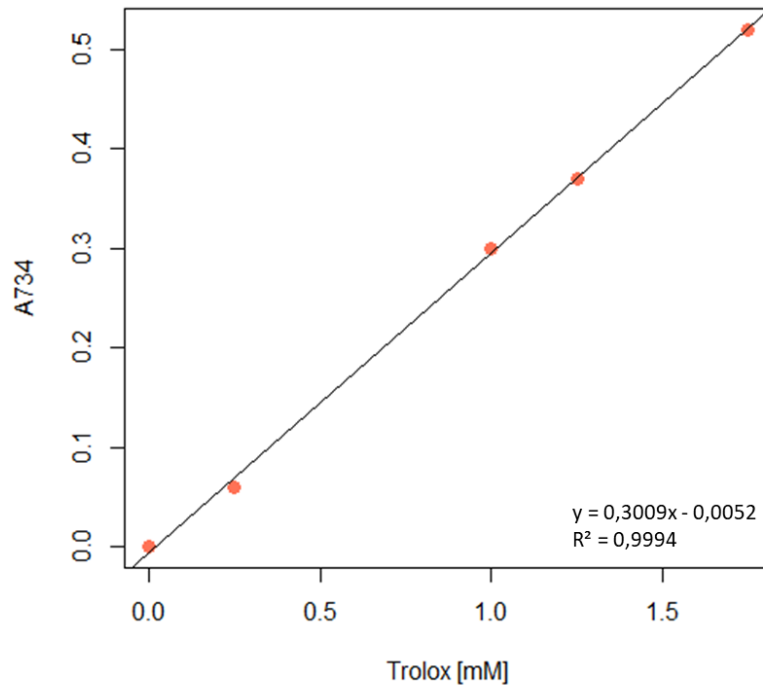
Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama potrebno je pripremiti 5 mM otopinu Trolox-a u 96 % etanolu. Iz tako pripremljene otopine se prirede razrijeđenja otopine Trolox-a koncentracija 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,75 mM, 2,0 mM (slika 14). Priprema uzoraka opisana je prethodno u postupku rada, ali se umjesto uzorka dodaju priređene koncentracije standardne otopine Troloxa. Iz izmjerenih apsorbancija za pojedinu koncentraciju otopine Trolox-a nacrtava se baždarni pravac tako što se na os apscise nanese koncentracije standardne otopine Trolox-a (mM), a na ordinatu pripadajuće im vrijednosti apsorbancije na 734 nm nakon provedene reakcije (slika 15).



Slika 14. Priređene koncentracije standardne otopine Troloxa nakon provedene reakcije za izradu baždarnog pravca (vlastita fotografija)

Baždarni dijagram za ABTS



Slika 15. Baždarni dijagram za ABTS metodu

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKTA IMELE

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta imele korištene su tri metode: FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) i ABTS+ (2,2-azinobis (3-etil-benzotiazoline-6-sulfonate) radikal kation) (tablica 4).

Tablica 4. Antioksidacijska aktivnost macerata imele određena FRAP, DPPH i ABTS metodom

Uzorak	FRAP (mM Trolox)	DPPH (% inhibicije)	ABTS (mM Trolox)
1.	0,471 ± 0,069	6,6 ± 53,9	1,163 ± 0,106
4.	0,876 ± 0,046	22,7 ± 0,6	1,413 ± 0,110
7.	0,876 ± 0,089	30 ± 40,4	1,446 ± 0,261
10.	1,147 ± 0,052	21,6 ± 14,6	1,845 ± 0,263
2.	1,225 ± 0,083	6,7 ± 8,2	1,728 ± 0,069
5.	2,699 ± 0,037	34,4 ± 1,1	2,991 ± 0,216
8.	2,420 ± 0,234	39,9 ± 13,25	2,825 ± 0,072
11.	4,710 ± 2,882	53,9 ± 8,01	3,058 ± 5,007
3.	2,459 ± 0,093	13,1 ± 1,7	3,174 ± 0,035
6.	3,951 ± 0,118	38,1 ± 2,4	4,09 ± 0,099
9.	0,588 ± 0,149	60 ± 23,1	5,401 ± 0,377
12.	5,116 ± 0,016	42,4 ± 165,2	8,093 ± 2,101

***1,4,7,10-** 20 gL⁻¹ bilja te redom sve veći udio etanola u uzorcima (25, 40, 55, 70 %)

2,5,8,11- 40 gL⁻¹ bilja te redom sve veći udio etanola u uzorcima (25, 40, 55, 70 %)

3,6,9,12- 80 gL⁻¹ bilja te redom sve veći udio etanola u uzorcima (25, 40, 55, 70 %)

Najveću antioksidacijsku aktivnost za FRAP metodu pokazao je uzorak 12 (80 g L⁻¹ bilja i 70 % etanola) s najvećim udjelom bilja i etanola u vodeno-etanolnoj bazi od 5,116 ± 0,016 mM Troloxa, a najmanju uzorak 1 (20 g L⁻¹ bilja i 25 % etanola) s najmanjim udjelom bilja i etanola u vodeno-etanolnoj bazi od 0,471 ± 0,069 mM Troloxa. Za DPPH metodu najveći postotak inhibicije DPPH radikala pokazao je uzorak 9 (80 g L⁻¹ bilja i 55 % etanola) od 60 ± 23,1 % , a najmanji uzorak 1 od 6,6 ± 53,9 %. Za ABTS metodu najveću

antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak 12 od $8,093 \pm 2,101$ mM Troloxa, a najmanju uzorak 1 od $1,163 \pm 0,106$ mM Troloxa, isto kao i za FRAP metodu.

Očekivano ekstrakti imele s većim udjelom bilja i volumnog udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi pokazali su veću antioksidacijsku aktivnost.

Tahirović i Bašić (2017) ispitivali su antioksidacijska svojstva lišća i grančica imele *Viscum album* ssp. Beck sakupljene s četiri različita domaćina (*Betula* L., *Tilia cordata* Mill., *Robina pseudoacacia* L. i *Salix alba* L.). Ista su ispitana FRAP, DPPH i ABTS metodom koristeći Trolox kao standard (slika 16).

	DPPH ($\mu\text{molTE g}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{molTE g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{molTE g}^{-1}$)
VAR(l)	68.93 \pm 0.12	72.21 \pm 0.10	86.89 \pm 0.60
VAT(l)	34.01 \pm 0.86	43.39 \pm 0.11	54.39 \pm 0.51
VAB(l)	32.12 \pm 0.27	41.20 \pm 0.14	48.13 \pm 0.18
VAS(l)	31.25 \pm 0.19	43.79 \pm 0.31	42.78 \pm 0.24
VAR(s)	67.28 \pm 0.12	67.28 \pm 0.42	81.72 \pm 0.11
VAT(s)	42.41 \pm 0.29	51.59 \pm 0.41	67.71 \pm 0.44
VAB(s)	45.00 \pm 0.20	46.92 \pm 0.46	59.12 \pm 0.15
VAS(s)	30.13 \pm 0.21	36.86 \pm 0.26	38.04 \pm 0.34

(l)-list, (s)-stabljika, (VAR)-*V. album* s domaćina *Robina pseudoacacia* L., (VAT)-*V. album* s domaćina *Tilia cordata*, (VAB)-*V. album* s domaćina *Betula* L., (VAS)-*V. album* s domaćina *Salix alba*

Slika 16. Antioksidacijska svojstva imele *Viscum album* ssp. Beck sakupljene s četiri različita domaćina (*Betula* L., *Tilia cordata* Mill., *Robina pseudoacacia* L. i *Salix alba* L.) (Tahirović i Bašić, 2017)

U lišću je antioksidacijska aktivnost metanolnog ekstrakta imele varirala od 31,25 do 68,93 $\mu\text{molTrolox g}^{-1}$ s.t. za DPPH, od 41,20 do 72,21 $\mu\text{molTrolox g}^{-1}$ s.t. za ABTS te od 42,78 do 86,89 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.t. za FRAP metodu. Općenito je antioksidacijska aktivnost opadala u

slijedu FRAP>ABTS>DPPH. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je metanolni ekstrakt lišća (68,93-86,89 $\mu\text{molTrolox g}^{-1}$ s.t.) te stabljike (67,28-81,72 $\mu\text{molTrolox g}^{-1}$ s.t.) imele sakupljene sa domaćina *Robina pseudoacacia* L. Ovakvi rezultati potvrđuju zaključke prethodnih istraživanja (Önay-Uçar i sur., 2006) da antioksidacijski kapacitet biljke ovisi o njezinom domaćinu. Metanolni ekstrakt nije usporediv s vodeno-etanolnim u ovom radu no može se pretpostaviti da se u sličnim istraživanjima imele mora uzeti u obzir i domaćin s kojeg je ista sakupljena.

4.2. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA IMELE

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost ekstrakata bijele imele pripremljenih maceracijom u vodeno-etanolnoj bazi pri čemu su u obzir uzeti sljedeći parametri maceracije: masena koncentracija biljnog materijala 20, 40 i 80 gL^{-1} i volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi 25, 40, 55 i 70 %. Budući da eksperimenti u laboratoriju nisu provedeni zbog pandemije uzrokovane virusom SARS-CoV-2, u nastavku je naveden pregled dosadašnjih rezultata objavljenih u literaturi.

Antibakterijska aktivnost imele ispitivana je na širokoj lepezi bakterija. Dobivene rezultate teško je usporediti jer su korištena različita otapala, različite metode dobivanja ekstrakata, neki su dobiveni iz cijele biljke, neki iz njenih pojedinačnih dijelova kao što su plod, list i stabljika te nadalje različiti domaćini na kojima imela raste. U nastavku je naveden pregled rezultata dobivenih pomoću ekstrakata imele u vodenoj ili etanolnoj bazi.

Hussain i sur. (2011) su ispitivali antimikrobnu aktivnost ekstrakata listova i grančica imele maceriranih u različitim otapalima. Kao otapala su korišteni aceton, etil acetat, kloroform, petroleter, etanol, metanol, voda, a kao test mikroorganizme su koristili Gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, Gram negativne bakterije *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i plijesan *Aspergillus flavus* (slika 17).

	Mikroorganizmi	AC	PE	EA	CH	ET	MT	WT	CF	NS
1	<i>S. aureus</i>	---	---	24.33±0.17	---	15.9±0.35	15.16±0.08	9.66±0.13	32.13±0.13	---
2	<i>B. subtilis</i>	---	---	19.66±0.33	---	15.83±0.16	15.83±0.17	10.66±0.33	31.93±0.06	---
3	<i>E. faecium</i>	---	---	---	---	15.9±0.1	19.83±0.17	9.83±0.17	30.03±0.03	---
4	<i>E. coli</i>	---	---	24.96±0.23	19.76±0.23	16.66±0.33	16.93±0.06	9.16±0.17	31.83±0.17	---
5	<i>B. bronchisiptica</i>	---	---	24.83±0.17	---	16.9±0.2	16.13±0.06	10.00±0.00	31.5±0.1	---
6	<i>P. aeruginosa</i>	---	---	19.66±0.33	10.00±0.00	13.83±0.16	19.83±0.17	9.9±0.1	29.83±0.17	---
7	<i>P. syringae</i>	---	---	19.66±0.33	15.16±0.16	13.66±0.33	20.93±0.06	9.83±0.17	30.83±0.17	---
8	<i>S. typhae</i>	---	---	---	---	15.83±0.17	15.26±0.13	9.00±0.00	29.93±0.06	---
9	<i>S. cerevisiae</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	23.00
10	<i>A. flavus</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	15.00

AC: Aceton, PE: Petrolej Eter, EA: Etilacetat, CH: Kloroform, ET: Etanol, MT: Metanol, WT: Voda, CP: Ciprofloksacin, NS: Nistatin

Slika 17. Antimikrobna aktivnost ekstrakata listova i grančica imele *Viscum album L.* maceriranih u različitim otapalima prikazana kao prosječna duljina zone inhibicije (mm ± SD) (Hussain i sur., 2011)

Rezultati (slika 17) dokazuju antimikrobno djelovanje ekstrakta imele. Istraživanja Hussain i sur. (2011) pokazala su da su najbolju antimikrobnu aktivnost pokazali ekstrakti imele macerirani u etil acetatu. Za ovaj diplomski rad ipak će detaljnije biti komentirani rezultati za etanol i vodu budući da su to otapala najsličnija otapalu koje je korišteno za pripremu macerata u ovom radu. Etanolni ekstrakti pokazali su najveću zonu inhibicije od $16,9 \pm 0,2$ mm prema Gram negativnoj bakteriji *Bordetella bronchisiptica* što je duplo manje u odnosu na korišteni standard (antibiotik) ciprofloksacin, ali zavidan rezultat u odnosu na antibiotik nistatin koji ne inhibira rast *B. bronchisiptica*. Vodeni ekstrakti pokazali su najveću zonu inhibicije prema Gram pozitivnoj bakteriji *Bacillus subtilis* od $10,66 \pm 0,33$ mm, skoro tri puta manje u odnosu na antibiotik ciprofloksacin, ali deset puta više u odnosu na antibiotik nistatin koji ne inhibira rast *B. subtilis*. Kako je bolju antimikrobnu aktivnost prema svim test mikroorganizmima pokazao etanolni ekstrakt u odnosu na vodeni ekstrakt može se pretpostaviti da bi od macerata pripremljenih u laboratoriju za potrebe ovog rada bolju antimikrobnu aktivnost imali macerati pripremljeni u više postotnom alkoholu, odnosno macerati 10, 11, 12. Isto tako, može se pretpostaviti da bi bolju antimikrobnu aktivnost pokazali macerati s većim udjelom bilja, odnosno macerati 6, 9, 12.

Turker i sur. (2012) su ekstrakte *V. album L.* pripremljene u vodeno-etanolnoj bazi različitih omjera uzgojene na trinaest različitih stabala domaćina testirali kako bi se pokazao njihov

antibakterijski potencijal (voda (%):etanol (%): 56,7:8,0, 5,3:8,9, 4,7:6,7, 5,0:10,0, 4,0:4,3, 6,7:8,0, 11,3:9,6, 4,8:11,5, 9,2:10,7, 14,3:12,0, 9,6:8,9, 16,2:12,3, 16,8:6,5). Mikroorganizmi korišteni u istraživanju su: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* koje su Gram-pozitivne bakterije i *Escherichia coli* te *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella pneumoniae* koje su Gram negativne bakterije. Svi ekstrakti imele nisu pokazali antibakterijsku aktivnost prema ispitivanim bakterijama.

Nacsa-Farkas i sur. su 2014. godine s etanolnim ekstraktom (30 % v/v) različitog bilja, među njima i *V. album*, ispitivali antifungalno djelovanje istog na različite *Candida* vrste (slika 18). Ekstrakt imele nije pokazivao antifungalnu aktivnost. Time se može pretpostaviti djelovanje uzoraka u ovom radu maceriranih u etanolu (25 i 40 % v/v) na *Candida* vrste (oportunistički patogeni koji uzrokuju kandidijazu). Isti rezultat dobili su i Hussain i sur. (2011) na ispitivanim kvascima *S. cerevisiae* i *A. flavus* zbog čega se može pretpostaviti da ekstrakt imele nema potencijalno antifungalno djelovanje.

Minimalna fungicidna koncentracija (MFC) u mg/mL etanolnih biljnih ekstrakata 30% v/v protiv *Candida* vrsta. ND-nije detektirano

<i>Candida</i> vrste	<i>Allium ursinum</i>	<i>Aristolochia clematitis</i>	<i>Melilotus officinalis</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
<i>C. albicans</i>	3.52	ND	-	ND	ND
<i>C. guilliermondii</i>	1.76	ND	19.3	ND	ND
<i>C. glabrata</i>	ND	ND	-	ND	ND
<i>C. inconspicua</i>	0.88	ND	-	ND	ND
<i>C. krusei</i>	1.76	ND	-	ND	ND
<i>C. lusitanae</i>	0.88	ND	-	ND	ND
<i>C. metapsilosis</i>	14.06	ND	-	ND	ND
<i>C. norvegica</i>	0.88	ND	19.3	ND	ND
<i>C. orthopsilosis</i>	14.06	ND	-	ND	ND
<i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	-	ND	ND
<i>C. pulcherrima</i>	1.76	ND	19.3	ND	ND
<i>C. zeylanoides</i>	0.88	ND	9.65	6.6	ND

Slika 18. Minimalna fungicidna koncentracija etanolnih biljnih ekstrakata protiv *Candida* vrsta (Nacsa-Farkas i sur., 2014)

Također su 2018. godine Holandino Quaresma i sur. ispitivali antimikrobnu aktivnost ekstrakata listova, grančica i bobica imela maceriranih u etanolu (45 % v/v) zbog čega se može pretpostaviti antimikrobno djelovanje uzoraka u ovom radu maceriranih u etanolu (40%

v/v), odnosno uzoraka 4, 5 i 6. Ishodni macerat (IM) je pripremljen od triju imela *V. album* (*V. album*, *V. album* ssp. *austriacum*, *V. album* ssp. *abietis*) koje rastu na različitim domaćinima. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti provedeno je na sljedećim mikroorganizmima: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherchia coli* i *Staphylococcus aureus*. Antimikrobni test pokazao je minimalnu inhibitornu koncentraciju od $7,25 \text{ mgmL}^{-1}$ *V. album* ssp. *austriacum* prema navedena dva bakterijska soja.

4.3. CITOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKTA IMELE

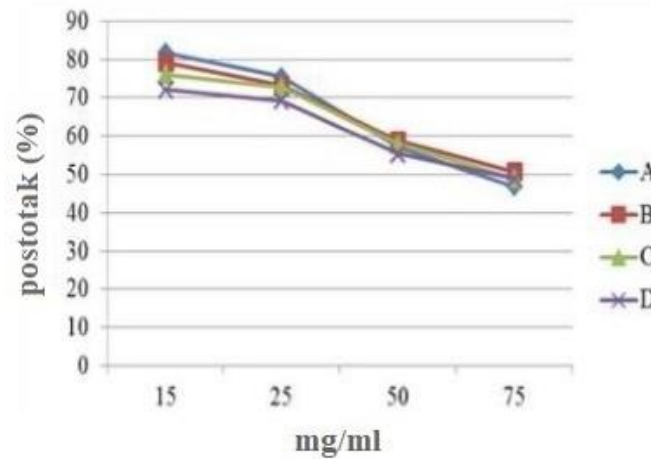
Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je odrediti citotoksičnu (antitumorsku) aktivnost ekstrakata bijele imele pripremljenih maceracijom u vodeno-etanolnoj bazi pri čemu su u obzir uzeti sljedeći parametri maceracije: masena koncentracija biljnog materijala 20, 40 i 80 gL^{-1} i volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi 25, 40, 55 i 70 %. S obzirom da eksperimenti u laboratoriju nisu provedeni zbog pandemije uzrokovane virusom SARS-CoV-2, u nastavku je pregled dosadašnjih rezultata objavljenih u literaturi.

Turker i sur. (2012) su različite ekstrakte *V. album* pripremljene u vodeno-etanolnoj bazi različitih omjera, uzgojenih na trinaest različitih stabala domaćina testirali kako bi se pokazao njihov antitumorski potencijal (voda (%):etanol (%): 56,7:8,0, 5,3:8,9, 4,7:6,7, 5,0:10,0, 4,0:4,3, 6,7:8,0, 11,3:9,6, 4,8:11,5, 9,2:10,7, 14,3:12,0, 9,6:8,9, 16,2:12,3, 16,8:6,5). Najizraženija citotoksična aktivnost dobivena je s vodenim ekstraktom *V. album* prikupljene sa stabla *P. divaricata* (87,3 % inhibicija), vodenim ekstraktom imele s *P. elaeagnifolia* (69,0 % inhibicije) i etanolnim ekstraktom imele prikupljene s *P. sylvestris* (inhibicija od 67,6 %) (tablica 5).

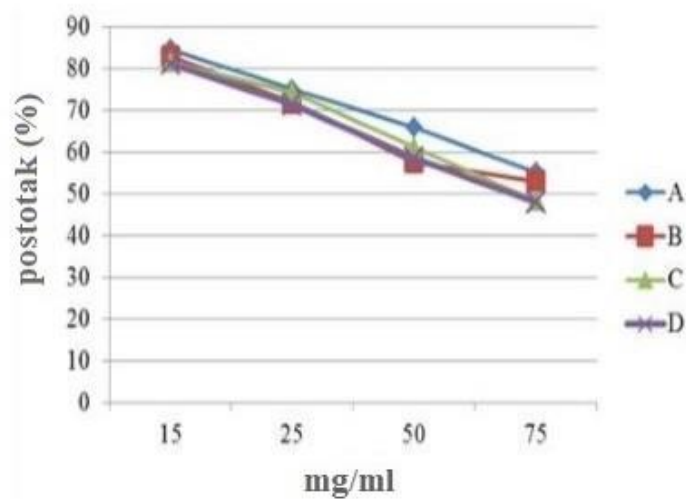
Tablica 5. Ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakta *Viscum album* L. (Turker i sur., 2012)

Tretman	Prosječni broj tumorskih stanica		Postotak inhibicije
voda	70,58±5,15	a	-
kamptotekin	0±0		100
Ex 1W	48,42±5,50	bc	32,4
Ex 1E	37,83±3,12	cdef	46,5
Ex 2W	29,29±3,83	efghi	59,2
Ex 2E	39,92±3,82	cde	43,7
Ex 3W	39,17±4,84	cde	45,1
Ex 3E	37,54±3,08	cdefg	46,5
Ex 4W	28,63±4,27	efghi	59,2
Ex 4E	26,71±4,29	fghi	62,0
Ex 5W	42,13±5,31	cd	40,8
Ex 5E	38,33±2,46	cdef	46,5
Ex 6W	9,46±1,31	j	87,3
Ex 6E	26,92±1,99	fghi	62,0
Ex 7W	21,54±1,71	i	69,0
Ex 7E	34,88±3,54	defgh	50,7
Ex 8W	35,71±2,61	defg	49,3
Ex 8E	23,38±2,77	hi	67,6
Ex 9W	28,17±2,03	efghi	60,6
Ex 9E	29,54±3,83	efghi	57,7
Ex 10W	36,58±3,48	defg	47,9
Ex 10E	29,92±2,83	efghi	57,7
Ex 11W	25,79±3,01	ghi	63,4
Ex 11E	52,54±4,62	b	25,4
Ex 12W	31,08±2,26	defghi	56,3
Ex 12E	34,75±2,42	defgh	50,7
Ex 13W	39,92±2,66	cde	43,7
Ex 13E	34,92±3,02	defgh	50,7

Vlad i sur. (2016) su ispitivali vodene i alkoholne ekstrakte listova i grana imele s ciljem identifikacije najvažnijih sastojaka koji potvrđuju njenu biološku aktivnost. Oba ekstrakta pokazala su prisutnost važnih terpenoida, masnih kiselina i prirodnih antioksidanata poput vitamina E.



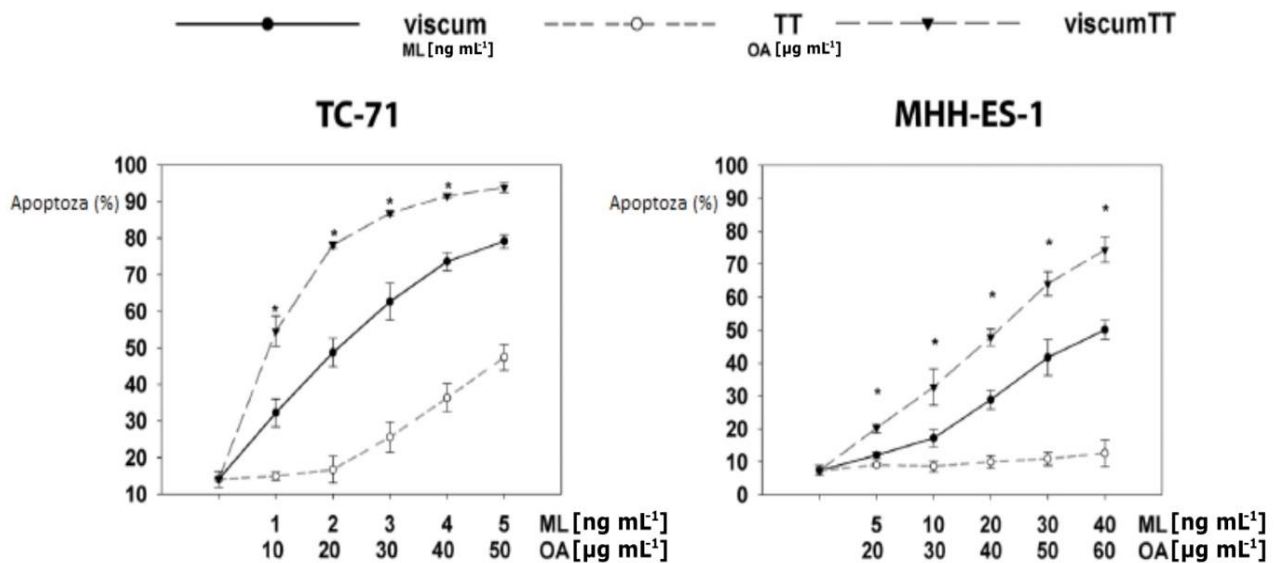
Slika 19. Učinak različito pripremljenih ekstrakata imele na rast MCF-7 stanica: A-vodeni ekstrakt suspendiran u mediju, B-vodeni ekstrakt resuspendiran u DMSO, C-alkoholni ekstrakt resuspendiran u mediju, D-alkoholni ekstrakt resuspendiran u DMSO (Vlad i sur., 2016)



Slika 20. Učinak različito pripremljenih ekstrakata imele na rast HepG2 stanica: A-vodeni ekstrakt suspendiran u mediju, B-vodeni ekstrakt resuspendiran u DMSO, C-alkoholni ekstrakt resuspendiran u mediju, D-alkoholni ekstrakt resuspendiran u DMSO (Vlad i sur., 2016)

Citotoksični potencijal dobivenih ekstrakata istražen je na staničnim linijama HepG2 (humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma) i MCF-7 (humana stanična linija adenokarcinoma dojke). Rezultati citotoksičnosti izraženi su kao IC_{50} , a to je koncentracija uzorka koja je uzrokovala inhibiciju rasta 50 % stanica. U obje stanične linije, MCF-7 i HepG2 pokazano je značajno smanjenje i inhibiciju proliferacije stanica uz tretman alkoholnim ekstraktom ovisno o dozi. Alkoholni ekstrakt bio je učinkovitiji i pokazao je značajan citotoksični učinak pri koncentraciji od 75 mg mL^{-1} , što može biti posljedica većeg sadržaja tetralinskih derivata, kao i sadržaja masnih kiselina, u usporedbi s vodenim ekstraktom. Kako je bolju citotoksičnu aktivnost prema svim test mikroorganizmima pokazao alkoholni ekstrakt u odnosu na vodeni ekstrakt može se pretpostaviti da bi od macerata pripremljenih u laboratoriju za potrebe ovog rada bolju citotoksičnu aktivnost imali macerati pripremljeni u više postotnom alkoholu, odnosno macerati 10, 11, 12. Isto tako, može se pretpostaviti da bi bolju citotoksičnu aktivnost pokazali macerati s većim udjelom bilja, odnosno macerati 6, 9, 12. Značajna inhibicija stanične proliferacije opažena je i u slučaju vodenih ekstrakata, u koncentracijama od 50 mg mL^{-1} i 75 mg mL^{-1} (slika 19 i 20).

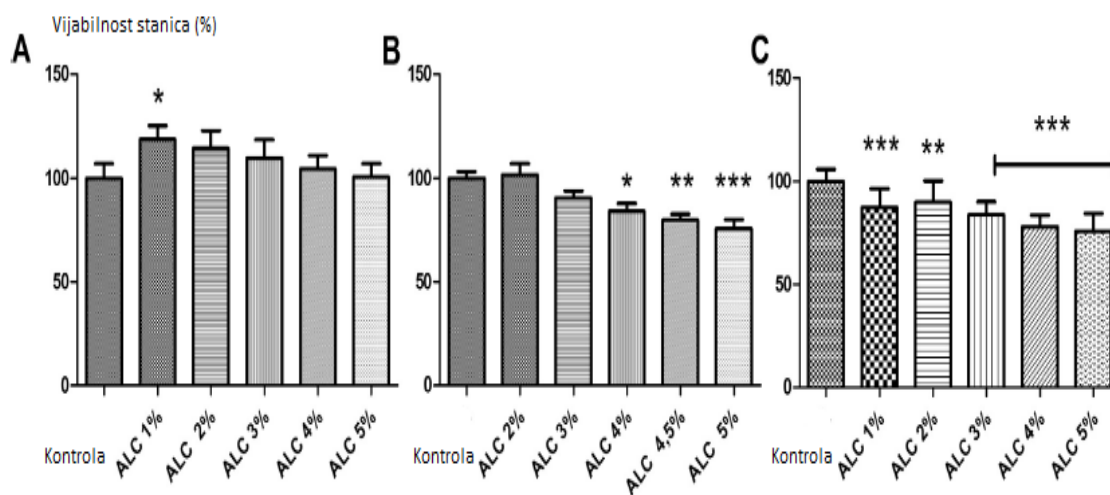
Twardziok i sur. su 2016. godine ispitivali citotoksičnu aktivnost ekstrakta *V. album* L. na staničnim linijama Ewing sarkoma. Komercijalni ekstrakti *V. album* L. su vodeni i ne sadrže netopive triterpene. Ostvaren je željeni efekt imele kombiniranjem vodenog ekstrakta (*viscum*) i ekstrakta triterpena (TT) solubiliziranog ciklodekstrinima. Stanične linije Ewing sarkoma su tretirane sa *viscum*, TT i *viscum*TT. Tretman *in vitro* stanica Ewing sarkoma sa *viscum* rezultirao je inhibicijom proliferacije tumorskih stanica i indukcijom apoptoze na način ovisan o dozi, dok je kombinirani tretman *viscum*TT imao sinergistički utjecaj (slika 21). Može se pretpostaviti djelovanje uzoraka u ovom radu s najnižim postotkom etanola tijekom maceracije (25 % v/v), točnije uzoraka 1, 2, 3.



viscum-vodeni ekstrakt imele, TT-ekstrakt triterpena, viscumTT- vodeni ekstrakt imele i ekstrakt triterpena solubiliziranog ciklodekstrinima ML (lektini imele) i OA (oleanolna kiselina)-mjera koncentracije vodenog ekstrakta imele (viscum) i ekstrakta triterpena (TT)

Slika 21. Citotoksična aktivnost ekstrakta *V. album* L. na stanične linije Ewing sarkoma (Twardziok i sur., 2016)

Melo i sur. su 2018. godine ispitivali citotoksičnu aktivnost ekstrakta *V. album* na staničnim linijama B16F10 stanice (mišji melanom), K562 (humana stanična linija kronične mijeloične leukemije), MA-104 (bubreg majmuna, netumorske stanice). Kao što je prikazano na slici 23A i slici 23B, vodeno-etanolni ekstrakti imele su smanjili vijabilnost stanica B16F10 i K562 ovisno o primjenjenoj dozi pri čemu je B16F10 pokazao veću osjetljivost. Suprotno tome, stanična linija MA-104 je bila otporna na sve korištene ekstrakte (slika 22). U istraživanju je korišten vodeno-etanolni ekstrakt imele (40 % v/v) čime se može pretpostaviti i djelovanje vodenno-etanolnih ekstrakata (40 % v/v) u ovom radu, točnije uzoraka 4, 5, 6.



MTT test nakon tretmana staničnih linija sa 45% (v/v) vodeno-alkoholnim ekstraktom (ALC). Završna koncentracija ALC varirala je od 1-5% (v/v). A-stanična linija MA 104, B-stanična linija K562, C-stanična linija B16F10

Slika 22. Citotoksična aktivnost ekstrakta *V. album* na staničnim linijama B16F10 stanice (mišji melanom), K562 (humana stanična linija kronične mijeloične leukemije), MA-104 (bubreg majmuna, netumorske stanice) (Melo i sur., 2018)

Holandino Quaresma i sur., (2018) su ispitivali citotoksičnu aktivnost ekstrakata listova, grančica i bobica imele macerirane u etanolu (45 % v/v) čime se može pretpostaviti djelovanje uzoraka u ovom radu maceriranih u etanolu (40 % v/v), odnosno uzoraka 4, 5 i 6. Ishodni macerat (IM) je pripremljen od triju imela *V. album* koje rastu na različitim domaćinima (*V. album*, *V. album* ssp. *austriacum*, *V. album* ssp. *abietis*). Ispitivanje ciljne aktivnosti provedeno je na tumorskim stanicama Yoshida (stanice sarkoma Yoshida ascites) i Molt4 (tumorske stanice T-stanične linije). Generalno, Yoshida stanična linija bila je osjetljivija od Molt4. Maksimalan citotoksičan efekt (stopostotna smrtnost ispitivanih stanica) postignut je sa 1 % IM *V. album* ssp. *abietis*. U IM kvalitativno i kvantitativno je određeno najviše fenolnih kiselina i lignana koji imaju važnu ulogu pri antiproliferativnom djelovanju na rast stanica.

5. ZAKLJUČCI

1. Najveću antioksidacijsku aktivnost očekivano su pokazali macerati bijele imele *Viscum album* L. s većim udjelom bilja (80 g L⁻¹) i većim volumnim udjelom etanola u vodeno-etanolnoj bazi (55 % i 70 %). Veći volumni udio etanola omogućava ekstrakciju manje polarnih spojeva koji se pri manjem volumnom udjelu etanola ne ekstrahiraju.
2. Domaćin imele je važan parametar u procjeni imele kao vrste materijala u medicinskoj i farmaceutskoj primjeni jer ovisno o njemu mijenja se i fitokemijski sastav imele.
3. Stabljike, lišće i plodovi bijele imele (*Viscum album* L.) sadrže velike količine antimikrobnih bioaktivnih komponenata koje čine tu biljku mogućim kandidatom za buduća istraživanja s ciljem češće upotrebe u inhibiciji nepoželjnih bakterija.
4. Stabljike, lišće i plodovi bijele imele (*Viscum album* L.) nemaju potencijalno antifungalno djelovanje.
5. Alkoholni ekstrakt imele je na tumorskim stanicama pokazao značajnu inhibiciju stanične proliferacije ovisno o dozi. U mnogim kliničkim studijama uočeno je da je terapija imelom poboljšala kvalitetu života, produžila životni vijek te dovela do regresije tumora. Ovisno o stadiju, u antitumorskoj terapiji koriste se različite doze imele i načini primjene. Stoga, kao takva ima potencijal za daljnje istraživanje s ciljem poboljšanja antitumorske terapije kao komplementarne metode uz konvencionalno liječenje.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2020) Vorsicht in der Schwangerschaft: 10 Pflanzen, die Sie meiden sollten, <<https://www.plantura.garden/gruenes-leben/vorsicht-in-der-schwangerschaft-10-pflanzen-die-sie-meiden-sollten>>. Pristupljeno 09. travnja 2020.

Anonymous 2 (2019) Flavonoids Market to Witness Robust Expansion by 2024 <<https://www.openpr.com/news/1885069/flavonoids-market-to-witness-robust-expansion-by-2024>>. Pristupljeno 19. svibnja 2020.

Anonymous 3 (2020) Fast FRAP Assay Kit | Antioxidant Capacity, <<https://bioquochem.com/products/oxidative-stress/>>. Pristupljeno 10. lipnja 2020.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99(1), 191–203. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6(2), 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999) [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, 15–27. doi:10.1016/s0076-6879(99)99005-5

Brito, A.F., Ribeiro, M., Abrantes, A.M., Pires, A.S., Teixo, R.J., Tralhão, J.G., Botelho, M.F. (2015) Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 22(26), 3025-3039.

Büssing, A., Schietzel, M. (1999) Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins, 19(1), 23-28.

Cowan, M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4), 564–582. doi:10.1128/cmr.12.4.564

- Debreczeni, J. É., Girmann, B., Zeeck, A., Krätzner, R., Sheldrick, G. M. (2003) Structure of viscotoxin A3: disulfide location from weak SAD data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59(12), 2125–2132. doi:10.1107/s0907444903018973
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid. & Redox Signal.* 18(14), 1818–1892. doi:10.1089/ars.2012.4581
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M. (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Gric. Food Chem.* 57(5), 1768–1774. doi:10.1021/jf803011r
- EBI (2003) European Molecular Biology Laboratory. EBI – The European Bioinformatics Institute, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1jmn/portfolio/1?view=protein_index#ad-image-0>. Prisupljeno 19. svibnja 2020.
- Eggenschwiler, J., Balthazar, L., Stritt, B., Pruntsch, D., Ramos, M., Urech, K., Rist, L., Simões-Wüst, A.P., Viviani, A. (2007) Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complement. Alternat. Med.* 7(1). doi:10.1186/1472-6882-7-14.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 40(2-3), 193–236. doi:10.1016/s0278-6915(01)00118-1
- Elluru, S.R., Duong van Huyen, J.P., Delignat, S., Prost, F., Heudes, D., Kazatchkine, M.D., Friboulet, A., Kaveri, S.V. (2009) Antiangiogenic properties of *Viscum album* extracts are associated with endothelial cytotoxicity. *Anticancer Res.* **29**, 2945–2950.
- Franz, H. (1985) The components of mistletoe (*Viscum album* L.) as potential drugs. *Pharmazie*, 40(2), 97–104.
- Fu, L., Zhou, C., Yao, S., Yu, J., Liu, B., Bao, J. (2011) Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43(10), 1442–1449. doi:10.1016/j.biocel.2011.07.004

- Fukunaga, T., Kajikawa, I., Nishiya, K., Watanabe, Y., Takeya, K., Itokawa, H. (1987) Studies on the constituents of the european mistletoe, *Viscum album* L. *Chem. Pharm. Bull.* 35(8), 3292–3297. doi:10.1248/cpb.35.3292
- Gupta, A., Ellis, M.E., Oduse, K.A. (2013) The roles of phytochemicals in red wine as a protective agent against alcohol damage. *Int. Food Res. J.* 20(3), str. 1191-1197.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5. izd., Oxford University Press, London.
- Holandino Quaresma, C., Batista, J.V.C., Melo, M.N.O., Hosmani, F., Oliveira, A.P., Rocha, L.M., Veiga, V.F., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Grazi, M., Ramm, H., Kunz, M., Urech, K., Weissenstein, U., Baumgartner, S. (2018) Biological activity and phytochemical analysis of homeopathic preparations of *Viscum album* L. *Int. J. High Dillution Res.* 17(1), 23-24.
- Hussain, M. A., Khan, M. Q., Hussain, N., Habib, T. (2011) Antibacterial and antifungal potential of leaves and twigs of *Viscum album* L. *Acad. J.* 23, 5545-5549.
- Jurin, M., Žarković, N., Hrženjak, M., Ilić, Z. (1993) Antitumorous and Immunomodulatory Effects of the *Viscum album* L. *Preparation Isorel. Oncology*, 50(6), 393–398. doi:10.1159/000227217
- Kienle, G. S., Glockmann, A., Schink, M., Kiene, H. (2009) *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28(1), 79. doi:10.1186/1756-9966-28-79
- Kienle, G. S., Kiene, H. (2010) Review Article: Influence of *Viscum album* L. (European Mistletoe) Extracts on Quality of Life in Cancer Patients: A Systematic Review of Controlled Clinical Studies. *Integr. Cancer Ther.* 9(2), 142–157. doi:10.1177/1534735410369673
- Lewis, K., Ausubel, F. M. (2006) Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24(12), 1504–1507. doi:10.1038/nbt1206-1504
- Liang, N., Kitts, D. (2014) Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208. doi:10.3390/molecules191119180
- Lučić, R. (1986) *Proizvodnja jakih alkoholnih pića*, 1. izd., Nolit, Beograd.

- Maimone, T. J., Baran, P. S. (2007) Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nat. Chem. Biol.* 3(7), 396–407. doi:10.1038/nchembio.2007.1
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5), 727–747. doi:10.1093/ajcn/79.5.727
- Melo, M. N. de O., Oliveira, A. P., Wiecikowski, A. F., Carvalho, R. S., Castro, J. de L., de Oliveira, F. A. G., Pereira, H. M. G., de Veiga, V. F., Capella, M. M., A., Rocha, L., Holandino, C. (2018) Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. *Saudi Pharm. J.* 26(3), 311–322. doi:10.1016/j.jsps.2018.01.011
- Mihaljević Žulj M. (2019) Aromatične rakije i travarice. *Gospodarski list* [online], 8, 64, <<https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/aromaticne-rakije-travarice>>. Pristupljeno 10. travnja 2020.
- Nacsá-Farkas, E., Kerekes, E., Kerekes, E. B., Krisch, J., Roxana, P., Vlad, D. C., Ivan, P., Vágvölgyi, C. (2014) Antifungal effect of selected European herbs against *Candida albicans* and emerging pathogenic non-albicans *Candida* species. *Acta Biol. Szeged.* 58(1), 61-64.
- Nazaruk, J., Orlikowski, P. (2016) Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L. *Nat. Pro. Res.* 30(4), 373–385. doi:10.1080/14786419.2015.1022776
- Önay-Uçar, E., Karagöz, A., Arda, N. (2006) Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. album. *Fitoterapia*, 77(7-8), 556–560. doi:10.1016/j.fitote.2006.08.001
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2(5), 270–278. doi:10.4161/oxim.2.5.9498
- Peumans, W. J., Verhaert, P., Pfüller, U., Van Damme, E. J. M. (1996) Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS J.* 396(2-3), 261–265. doi:10.1016/0014-5793(96)01108-8
- Pevalek-Kozlina, B. (2003) Fiziologija bilja, 1. izd., Profil, Zagreb.
- Pyrzynska, K., Pełkal, A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal. Methods*, 5(17), 4288. doi:10.1039/c3ay40367j

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9-10), 1231–1237. doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- Ribéreau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M.-L., Poindron, P., Anton, R. (1996) Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* 109(1-2), 33–38. doi:10.1016/s0304-3835(96)04401-1
- Santa Maria, A., Lopez, A., Diaz, M., Albán, J., Galán de Mera, A., Vicente Orellana, J., Pozuelo, J. (1997) Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 57(3), 183–187. doi:10.1016/s0378-8741(97)00067-6
- Shortle, E., O’Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* 98(4), 828–834. doi:10.1016/j.meatsci.2014.07.001
- Skidmore-Roth, L. (2004) Mosby’s handbook of herbs and natural supplements, 4.izd., Mosby, St Louis, str. 663.
- Strüh, C. M., Jäger, S., Schempp, C. M., Scheffler, A., Martin, S. F. (2012) A Novel Triterpene Extract from Mistletoe Induces Rapid Apoptosis in Murine B16.F10 Melanoma Cells. *Phytother. Res.* 26(10), 1507–1512. doi:10.1002/ptr.4604
- Stypinski, P. (1997) Biology and ecology of mistletoe in Poland. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Kraków.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidic, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija, uzroci i posljedice: sustavni pregled. *Medicina Flum.* 43(2), 84-93.
- Tahirović, A., Bašić, N. (2017) Determination of phenolic content and antioxidant properties of methanolic extracts from *Viscum album* ssp. *album* Beck. *Glas. hem. tehnol. Bosne Herceg.* 49, 25-30.
- Turker, A. U., Yildirim, A. B., Karakas, F. P. (2012) Antitumor and antibacterial activities of *Viscum album* L. grown on different host trees. *Spatula DD*, 2(4), 229-236.
- Twardziok, M., Kleinsimon, S., Rolff, J., Jäger, S., Eggert, A., Seifert, G., Delebinski, C. I. (2016) Multiple Active Compounds from *Viscum album* L. synergistically Converge to

Promote Apoptosis in Ewing Sarcoma. *PloS ONE*, 11(9), e0159749. doi:10.1371/journal.pone.0159749

Usčuplić, M. (1996) Patologija šumskog i ukrasnog drveća, Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu.

Vicas, S.I., Rugina, D., Socaciu, C. (2012) Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*). U: Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health, (Rao, V. ured.), IntechOpen, London, str. 115-134.

Vlad, D. C., Popescu, R., Dumitrascu, V., Cimporescu, A., Vlad, C. S., Vágvölgyi, C., Krisch, J., Dehelean, C., Horhat, F. G. (2016) Phytocomponents identification in mistletoe (*Viscum album*) young leaves and branches, by GC-MS and antiproliferative effect on HEPG2 and MCF7 cell lines. *Farmacologia*, 64(1), 82-87.

Zuber, D. (2004) Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(3), 181–203. doi:10.1078/0367-2530-00147

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Alisa H

Ime i prezime studenta