

Ispitivanje učinka biološki aktivnih tvari iz kore cikle i kore banane na stanične linije i makromolekule

Komljenović, Anamaria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:116706>

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 2021.

Anamaria Komljenović
1288/USH

**ISPITIVANJE UČINKA BIOLOŠKI
AKTIVNIH TVARI IZ KORE
CIKLE I KORE BANANE NA
STANIČNE LINIJE I
MAKROMOLEKULE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom prof.dr.sc. Ksenije Durgo kao dio projekta Hrvatske zaklade za znanost „*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*” (HRZZ-IP-2018-01-9717), voditelj: prof.dr.sc. Božidar Šantek.

Neizmjerne sam zahvalna mentorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo na stručnom vodstvu, uloženom trudu, razumijevanju i dijeljenju savjeta tijekom izrade ovog rada. Voljela bih se zahvaliti i kolegici Magdaleni Latacz na pomoći pri provođenju eksperimentalnog dijela.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima što su bili uz mene tijekom svih uspona i padova tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ISPITIVANJE UČINKA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI IZ KORE CIKLE I KORE BANANE NA STANIČNE LINIJE I MAKROMOLEKULE

Anamaria Komljenović, 1288/USH

Sažetak: Prilikom prerade cikle i banane proizvodi se velika količina otpada koja se može iskoristiti u različite svrhe. Kora cikle i banane kao nusproizvod sadržava fitokemikalije koje imaju izraženo antioksidacijsko djelovanje koje ima ulogu u zaštiti od različitih kroničnih i kardiovaskularnih bolesti. Cilj rada je istražiti biološki učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na stanične makromolekule te humane stanične linije karcinoma debelog crijeva (Caco-2), karcinoma usne šupljine (Ca27) i hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 u koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam tijekom 24 sata. Rezultati su pokazali da fitokemikalije iz kore cikle i kore banane djeluju protektivno na lipide, da izazivaju genotoksični učinak samo na staničnoj liniji jetre te da pri višim koncentracijama induciraju glutation. Istraživani uzorci nisu pokazali značajno antioksidativno djelovanje na modelnim molekulama DNA i proteina dok u određenim uvjetima imaju i prooksidativno djelovanje.

Ključne riječi: kora cikle, kora banane, biološki aktivne tvari, stanične linije, stanične makromolekule

Rad sadrži: 61 stranica, 26 slika, 83 literaturna 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. Ksenija Durgo*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
2. prof.dr.sc. Ksenija Durgo
3. prof.dr.sc. Draženka Komes
4. prof.dr.sc. Ksenija Marković (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemicals Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

EFFECTS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM BANANA PEEL AND RED BEETROOT PEEL ON CELL LINES AND MACROMOLECULES

Anamaria Komljenović, 1288/USH

Abstract: A large amount of waste is produced when red beetroot and bananas are processed. Their by-products can be used for various purposes and they contain phytochemicals that have antioxidative effect that has a role in protection of various chronic and cardiovascular diseases. The aim of this study is to determine biological effect of beetroot peel and banana peel extracts on cellular macromolecules, human colon cancer cell line Caco-2, human oral carcinoma cell line Cal27 and hepatocellular liver carcinoma cell line Hep G2 in concentrations that are expected to be consumed over a 24 hour period. The results showed that phytochemicals contained in the beetroot peel and banana peel have a protective effect on lipids while they do have genotoxic effect only on HepG2 cell line and they induce glutathione at higher concentrations. Used extracts did not show a significant antioxidative effect on DNA model and protein molecules, while under certain conditions they also have a prooxidative effect.

Keywords: red beetroot peel, banana peel, biologically active compounds, cell lines, macromolecules

Thesis contains: 61 pages, 26 figures, 83 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 Ksenija Durgo, Full Professor*

Reviewers:

1. PhD. Višnja Gaurina Srček, Full professor
2. PhD. Ksenija Durgo, Full professor
3. PhD. Draženka Komes, Full professor
4. PhD. Ksenija Marković, Full professor (substitute)

Thesis defended: 23 September 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. CIKLA (<i>Beta vulgaris</i>).....	2
2.2. BANANA (<i>Musaceae</i>).....	3
2.3. FITOKEMIKALIJE.....	4
2.3.1. Flavonoidi.....	5
2.3.2. Karotenoidi.....	7
2.3.3. Betalaini.....	8
2.4. POLISAHARIDI.....	9
2.5. SLOBODNI RADIKALI.....	10
2.5.1. Oštećenje nukleinskih kiselina.....	10
2.5.2. Oksidacija proteina.....	11
2.5.3. Lipidna peroksidacija.....	11
2.6. ANTIOKSIDANSI.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Uzorci.....	13
3.1.2. Modelne makromolekule.....	14
3.1.3. Biološki test sustavi.....	15
3.1.3.1. <i>Određivanje broja stanica pomoću Bürker-Türkove komorice.....</i>	<i>15</i>
3.1.4. Laboratorijska oprema.....	17
3.1.4.1. <i>Kemikalije.....</i>	<i>17</i>
3.1.4.2. <i>Otopine.....</i>	<i>18</i>
3.1.4.3. <i>Pribor.....</i>	<i>22</i>
3.1.4.4. <i>Uređaji.....</i>	<i>23</i>

3.2. METODE.....	24
3.2.1. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na humanim staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2.....	24
3.2.1.1. Određivanje citotoksičnosti <i>Neutral red</i> metodom.....	24
3.2.1.2. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) DCFDA metodom (2',7'-diklordihidrofluorescein diacetat).....	25
3.2.2. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na modelnoj DNA i staničnom genetičkom materijalu.....	25
3.2.2.1. Učinak na modelni plazmid <i>phiX174 RF1</i> DNA.....	25
3.2.2.2. Određivanje oštećenja DNA u stanicama Caco-2, Cal27 i Hep G2 komet testom (eng. <i>comet assay</i>).....	26
3.2.3. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na modelnim proteinima i lipidima.....	27
3.2.3.1. Određivanje stupnja oksidacije na modelu proteina albumina iz govedeg seruma.....	27
3.2.3.1.1. Određivanje ukupnih proteina metodom po Bradfordu.....	28
3.2.3.2. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na modelnim lipidima - linoleinska kiselina.....	29
3.2.4. Određivanje glutationa u stanicama Caco-2, Cal27 i Hep G2.....	30
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1. CITOTOKSIČNI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA HUMANIM STANIČNIM LINIJAMA CACO-2, CAL27 I HEP G2.....	33
4.1.1. Citotoksični učinak određen <i>Neutral red</i> metodom.....	33
4.1.2. Antioksidativni učinak određen DCFDA metodom.....	35
4.2. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA MODELNOJ DNA I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU.....	38

4.2.1. Biološki učinak na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA.....	38
4.2.2. Oštećenje DNA u stanicama Caco-2, Cal27 i Hep G2 određeno komet testom (eng. <i>comet assay</i>)..	39
4.3. PROOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA MODELNIM PROTEINIMA.....	46
4.3.1. Stupanj oksidacije modelnog proteina albumina iz goveđeg seruma.....	46
4.4. PROOKSIDACIJSKI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA MODELNIM LIPIDIMA.....	47
4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUTATIONA NA STANIČNIM LINIJAMA CACO-2, CAL27 i HEP G2 TRETIRANIM EKSTRAKTIMA KORE CIKLE I KORE BANANE.....	48
5. ZAKLJUČAK.....	52
6. LITERATURA.....	53

1. UVOD

S obzirom na veliku količina otpada koju proizvodi prehrambena industrija, znanstvenici otkrivaju nove načine iskorištenja otpada. Cikla i banana obiluju prehrambenim vlaknima te mnogim fitokemikalijama (Luca i sur., 2019) zbog čega se nusproizvodi iz kore cikle i kore banane mogu iskoristiti za proizvodnju bojila (Lombardelli i sur., 2021) te za proizvodnju biogoriva koje služi kao alternativni izvor energije (Rana i sur., 2018).

S obzirom na navedeno, cilj ovog rada je ispitati citotoksični, prooksidacijski i protektivni učinak ekstrakata kore cikle i kore banane pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam tijekom 24 sata. Biološki učinak pratit će se djelovanjem na genetički materijal, određivanjem karbonilacije proteina, lipidne peroksidacije te koncentracije glutaciona. Kao test sustavi koristit će se modeli staničnih makromolekula (plazmid phiX RF1 DNA, protein albumin iz goveđeg seruma i linoleinska kiselina) te kontinuirane humane stanične linije karcinoma debelog crijeva Caco-2, karcinoma epitela usne šupljine Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2.

Iz dobivenih rezultata zaključit će se optimalna koncentracija istraživanih ekstrakata koja će djelovati protektivno na stanične makromolekule i koja bi se mogla upotrijebiti u prehrambenoj industriji za dobivanje funkcionalne hrane.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CIKLA (*Beta vulgaris*)

Beta vulgaris, poznatija kao cikla, jestiva je dvogodišnja biljka koja pripada porodici *Amaranthaceae* (štirovke) (Nikan i Manayi, 2019). Ciklu svrstavamo u korjenasto povrće (slika 1), poznata je po zagasicrvenoj boji i po slatkastom okusu. Veličina cikle varira, no visina joj doseže i do 120 cm, a promjer joj je najčešće 3 do 7 cm. Cikla se može jesti sirova, od nje se može napraviti cijedeni sok, može biti kuhana, pečena, ukiseljena, te se od nje može napraviti salata. Cikla je popularna u centralnoj i istočnoj Europi, osobito u Ukrajini gdje se koristi kao glavni sastojak boršča, juhe od cikle (Ceclu i Nistor, 2020). Cikla se stotinama godina koristi za konstipaciju te tretiranje peruti, a suvremena farmakologija dokazuje da ekstrakti cikle imaju antihipertenzivno i hipoglikemijsko djelovanje (Babarykin i sur., 2019).



Slika 1. Cikla (*Beta vulgaris*) (Anonymous 1, 2019)

Prema znanstvenim istraživanjima uočeno je kako povećana konzumacija povrća, poput cikle, znatno smanjuje rizik od pretilosti, dijabetesa tip 2 i kardiovaskularnih bolesti te pokazuje razne pozitivne učinke kod tretiranja raka i kod zaštite od srčanih bolesti. Upravo se zbog ovih učinaka fitokemikalija u cikli uočava prilika da cikla postane nova funkcionalna hrana (Clifford i sur., 2015). Cikla sadrži nitrate koji se preporučaju osobama s povišenim krvnim tlakom te fitokemikalije, odnosno biološki aktivne spojeve koji uključuju askorbinsku i fenolnu kiselinu, karotenoide i flavonoide (Murphy i sur., 2012).

Cikla je jedna od rijetkih vrsta povrća koja sadrži veliku količinu betalaina. Betacijanini i betaksantini su podvrste betalaina koje su zaslužne za specifičnu zagasitocrvenu boju cikle i imaju snažno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (Clifford i sur., 2015). Cikla također sadrži prehrambena vlakna koja mogu smanjiti razinu kolesterola u krvi (Kumar, 2015). Cikla je odličan izvor mineralnih tvari, poput magnezija, kalija, natrija, željeza, cinka i mangana koji je dobar za zdravlje kosti. (Ceclu i Nistor, 2020). Ekstrakt betanina u Europskoj Uniji se koristi kao prehrambeni aditiv pod nazivom E162 te je klasificiran kao bojilo (Sigurdson i sur., 2017).

Otpad cikle nastao tijekom prerade u prehrambenoj industriji može se osušiti na 70 ° C čime se dobiva brašno od cikle koje ima značajnu antioksidacijsku aktivnost i količinu betalaina kao sirova cikla, no kora cikle sadrži značajno veću količinu betalaina u odnosu na samu ciklu (Kujala i sur., 2002) te visok udjel vlakana topljivih i netopljivih u vodi ili se od otpada cikle pomoću etanola može ekstrahirati bojilo kojem je također uočena značajna antioksidacijska aktivnost, ali smanjena količina betalaina u odnosu na sirovu ciklu (Lombardelli i sur., 2021).

2.2. BANANA (*Musaceae*)

Banana (*Musaceae*) je opći naziv za voće iz porodice *Musaceae* (slika 2), dijeli se na tri roda, *Musa*, *Ensete* i *Musella*. Raste na tropskim područjima te je višegodišnja biljka. Najraširenija vrsta banane na tržištu je Cavendish (Encyclopedia Britannica, 2020). Banane su odličan izvor topivih vlakana, poput pektina. Zrelim bananama je povećan udio pektina, te je to jedan od glavnih razloga zašto zrenjem banane pomekane. Iako banane imaju visok udjel šećera, preporučaju se osobama s dijabetesom zbog niskog glikemijskog indeksa što znači da se razina glukoze u krvi ne povisuje naglo (Pua, 2007). Banane su dobar izvor vitamina B₆ koji sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata, masti i aminokiselina. Banane se preporučaju osobama s povišenim krvnim tlakom jer sadrže kalij koji ga pomaže regulirati (Pérez-Hernández i sur., 2006).



Slika 2. Banana (*Musaceae*) (Pérez-Hernández i sur., 2006)

Biološki aktivne tvari koje se nalaze u banani uključuju fenole, flavonoide i karotenoide koji imaju razne pozitivne učinke na zdravlje. Karotenoidi koji su prisutni u značajnoj količini pomažu kod tretiranja noćnog sljepila i ostalih bolesti, a redovno konzumiranje banana može značajno smanjiti rizik od raka mokraćnog mjehura zbog antioksidacijskih svojstava biološki aktivnih tvari (Elayabalan i sur., 2017).

Što se tiče iskorištenja otpada od banane trenutno je vrlo popularna proizvodnja biogoriva iz fermentabilnih šećera koji se konvertiraju u etanol pomoću kojeg se proizvodi bioetanol. Time se maksimalno iskorištava otpad od kore od banane jer sadržava 20 puta više vlakana od same banane (Hassan i sur., 2018) te služi kao alternativni izvor energije (Rana i sur., 2018). Iz kore banane se pomoću starter kulture *Lactobacillus plantarum* može proizvesti mliječna kiselina koju je US FDA odobrila kao prehrambeni aditiv pomoću kojeg se može produžiti rok trajanja određenih proizvoda (Rana i sur., 2018). Iz kore banane se također može proizvesti amilaza koja se koristi u prehrambenoj i tekstilnoj industriji (de Souza i de Oliveira Magalhães, 2010).

2.3. FITOKEMIKALIJE

Fitokemikalije su biološki aktivne tvari koje su prisutne u biljkama te su nehranjivi sekundarni biljni metaboliti. Fitokemikalije su važne za biljni metabolizam zato što pomoću

njih odbijaju štetočine i reguliraju brzinu rasta (Al-Ishaq i sur., 2020). Također pomoću fitokemikalija preživljavaju različite stresne utjecaje iz okoliša uključujući UV svjetlo, ekstremni pH i temperature te nedostatak vode, štite biljke od virusnih, bakterijskih i gljivičnih infekcija i brane biljke od napada insekata, ali privlače oprašivače (Leonov i sur., 2015). Znanstvenici se ne mogu dogovoriti oko točne podjele fitokemikalija, ali jedna od glavnih podjela je na temelju njihove kompleksne strukture te se tako dijele na polifenole, karotenoide, alkaloide, organosumporne spojeve te spojeve koji sadrže dušik (Ramos i sur., 2011).

Polifenoli su najraznovrsnija skupina fitokemikalija, nalaze se u voću, povrću, maslinovom ulju, vinu i sl. i imaju širok raspon zaštitnih uloga u organizmu, poput antioksidacijskog, protuupalnog i hipolidemijskog učinka (Maraldi i sur., 2014). Mnoge studije potvrđuju da hrana bogata polifenolima značajno smanjuje rizik od hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti te dijabetesa tip 2 (Rasines-Perea i Teissedre, 2017), no pojedina skupina polifenola, poput tanina, koji se nalaze u crvenom vinu, imaju suprotni efekt u ljudskom organizmu. Smanjuju aktivnost probavnih enzima te dostupnost proteina, aminokiselina i mineralnih tvari (Dillard i German, 2000). Polifenoli se dijele na glavne skupine koje čine flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Fraga i sur., 2019). Polifenoli su jaki antioksidansi topljivi u vodi i čine osnovnu strukturu vitamina i enzima koji sudjeluju u obrani od oksidativnog stresa koji uzrokuje višak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Tsao, 2010).

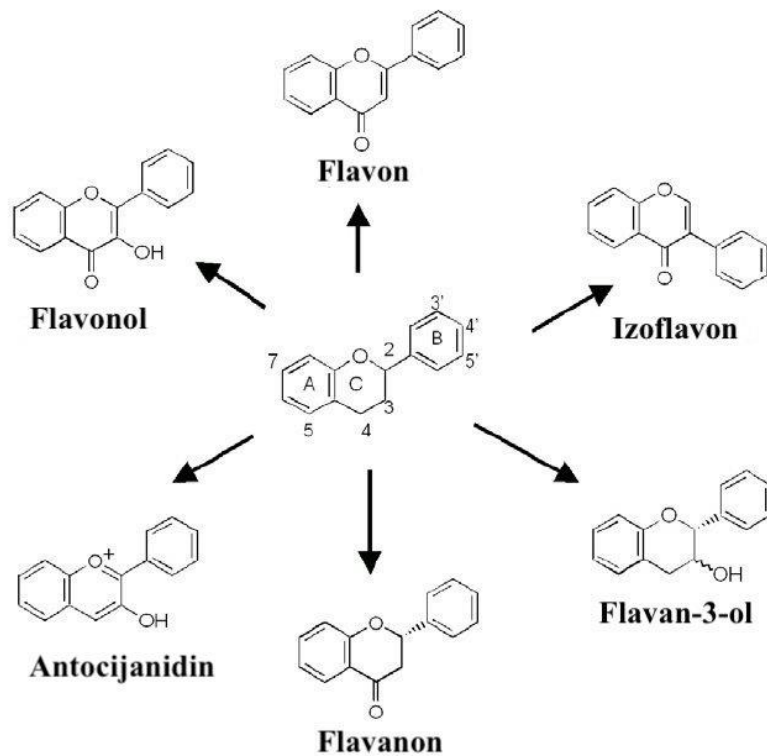
U banani su najzastupljenije ferulna, sinapinska, salicilna, galna, p-hidroksibenzojeva, vanilinska, gentizična i p-kumarna kiselina te katehin, epikatehin, tanini i antocijanini dok se u kori banane nalazi značajna količina kvercetina, miricetina i kempferola (Sidhu i Zafar, 2018).

Kora cikle sadrži značajnu količinu betacijanina i ferulinske kiseline, dok sama cikla sadrži katehin, vanilinsku, ferulnu, p-kumarnu i p-hidroksibenzojevu kiselinu te betacijanine i betaksantine (Salamatullah i sur., 2021)

2.3.1. Flavonoidi

Najistraženija skupina polifenola su flavonoidi, njihov osnovni kostur čini 15 ugljikovih atoma koji su raspoređeni u dva aromatska prstena povezana mostom od tri ugljikova atoma.

Flavonoidi se mogu podijeliti u skupine, uključujući flavan-3-ole, flavone, flavonole, izoflavone, antocijanine i flavanone (Fraga i sur., 2019) (slika 3). Flavonoidi se u prirodi nalaze pohranjeni u biljkama, najčešće u obliku glikozida. Što se tiče bioraspodivnosti flavonoida, manja količina se apsorbira u tankom crijevu gdje ih metaboliziraju enzimi reakcije faze II prije nego uđu u sistemsku cirkulaciju, a značajna količina flavonoida ulazi u debelo crijevo gdje ih nastanjena mikrobiota razgrađuje do fenolne kiseline koja se lako apsorbira (Luca i sur., 2019).



Slika 3. Kemijske strukture različitih skupina flavonoida (prilagođeno prema Nishiumi i sur., 2011)

Antocijanini su sekundarni biljni metaboliti, topljivi u vodi, odgovorni za crvene i plave pigmente u brojnom voću i povrću poput cikle, ribiza, grožđa i borovnica. Na stabilnost i boju ovih pigmenata najviše utječu pH, svjetlost, kompleksi metalnih iona, enzimi, kisik i temperatura, npr. pri niskom pH antocijanini su u crvene boje, a pri visokom pH postaju plavi, dok su pri neutralnom pH ljubičaste boje (Dillard i German, 2000).

Cijanidin-3-glukozid jedan je od najvažnijih antocijanina pronađenih u biljkama jer se koristi kao prirodno bojilo za hranu. Antocijanini poboljšavaju neurološko zdravlje i štite od raznih nezaraznih bolesti. Niska bioraspoloživost antocijanina uzrokuje nisku apsorpciju određenih spojeva u krvožilni sustav i visoku brzinu izlučivanja antocijanina u izmet i mokraću, čime se smanjuje učinkovitost uklanjanja slobodnih radikala (Khoo i sur., 2017).

2.3.2. Karotenoidi

Karotenoidi su narančasti, žuti i crveni lipofilni pigmenti prisutni u brojnom voću i povrću. Ne mogu se sintetizirati u ljudskom organizmu, stoga ti spojevi moraju biti integrirani putem hrane biljnog porijekla. Do sada je u prirodi otkriveno preko 600 karotenoida, a samo 40 ih je prisutno u ljudskoj prehrani. Karotenoidi su zaslužni za normalan rast i razvoj biljke, ali su odgovorni i za raznolikost žutih i crvenih boja koje su vidljive u lišću i cvijeću (Langi i sur., 2018).

Karotenoidi se dijele na dvije glavne vrste, karotene i ksantofile. Pod karotene se svrstavaju neoksigenirani terpeni kao što su α -karoten, β -karoten i likopen, ali i ostale, manje proučavane vrste kao što su zeta-karoten i neurosporen, dok se pod ksantofile svrstavaju oksigenirani terpeni kao što su lutein, zeakstantin i β -kripoksantin (Moran i sur., 2018). Karoteni, uključujući γ -karoten, likopen i lutein, štite od raka maternice, dojke, prostate, debelog crijeva i pluća. Oni također mogu zaštititi od raka probavnog trakta, a da bi bili učinkoviti, moraju se apsorbirati i distribuirati u tkiva (Dillard i German, 2000). Karotenoidi zbog svojih antioksidacijskih svojstava štite stanice od slobodnih radikala, lipidne peroksidacije te poboljšavaju fluidnost stanične membrane pod visokom temperaturom (Langi i sur., 2018).

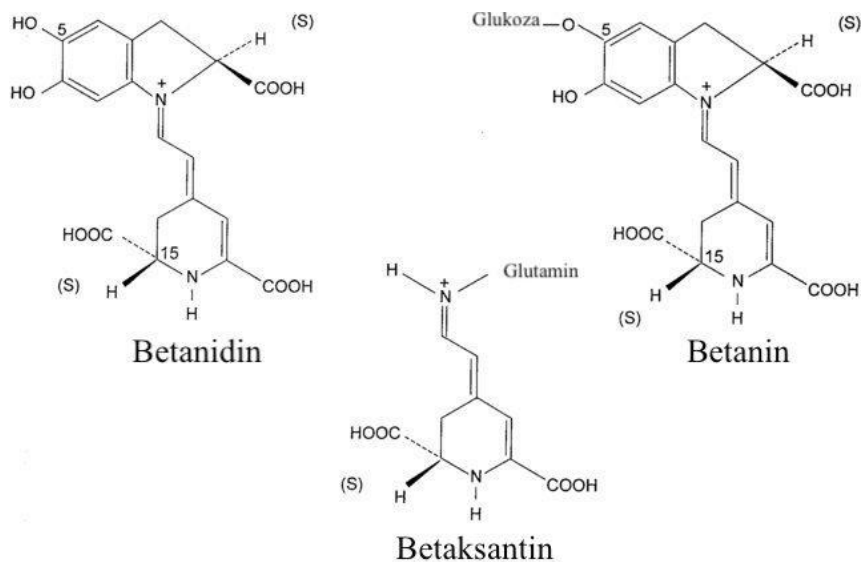
Vanjski čimbenici koji utječu na bioraspoloživost karotenoida uključuju konzumiranje lipida, njihova interakcija s lijekovima, pušenje ili konzumacija alkohola, a unutarnji fiziološki čimbenici povezani su s koncentracijom karotenoida u krvi i tkivu te su ovisni o dobi, tjelesnom sastavu, hormonalnoj fluktuaciji i metabolizmom karotenoida (Moran i sur., 2018).

β -karoten koji je najzastupljeniji od karotenoida u cikli i banani je provitamin vitamina A, što znači da jednom kad se konvertira u vitamin A ima zdravstvene učinke kao što su održavanje normalnog zdravlja oči i imunološkog sustava. Mnoge znanstvene studije potvrđuju da

konzumiranje hrane koja je bogata β -karotenom značajno smanjuje rizik od raka (Boon i sur., 2010).

2.3.3. Betalaini

Betalaini su pigmenti, topljivi u vodi, crvene i žute boje. Dobili su ime po cikli (*Beta vulgaris*) jer su iz nje prvi put bili ekstrahirani. Dijele se na betacijanine, pigmente crveno-ljubičaste boje i betaksantine, žute boje (slika 4). Na stabilnost betalaina utječu pH, temperatura, svjetlost te prisutnost kisika. Betalaini mogu zaštititi stanice od peroksidacije i oštećenja DNA (Moreno-Ley i sur., 2021) te mogu smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti i poremećaja uzrokovanih kroničnim upalama (Fu i sur., 2020). Najznačajniji betacijanin koji se nalazi u cikli je betanin, on pokazuje određenu inhibiciju rasta tumorskih stanica želuca, dojke, pluća, debelog crijeva i središnjeg živčanog sustava. Betanin se ekstrahira iz cikle u obliku praha i koristi kao antioksidans u prehrambenoj industriji (Fu i sur., 2020) kako bi se odgodili oksidacijski procesi koji uzrokuju senzorske promjene i smanjenje nutritivnih vrijednosti hrane te kako bi se smanjilo formiranje sekundarnih spojeva koji su potencijalno štetni za zdravlje tijekom skladištenja (Madadi i sur., 2020).



Slika 4. Kemijske strukture različitih skupina betalaina (prilagođeno prema Kanner i sur., 2001)

U istraživanju Presley i sur. (2011) sudjelovali su volonteri 75-godišnjaci koji su kroz određeni vremenski period konzumirali sok od cikla. Pomoću magnetske rezonancije mozga otkriveno je da se volonterima značajno poboljšala cirkulacija krvi na područjima za kognitivne funkcije.

U istraživanju Nade i sur. (2015) štakori, kojima je inducirana Parkinsonova bolest kroz određeni vremenski period, konzumirali su različite količine cikla (100, 200 i 300 mg kg⁻¹) te su zaključili da zbog antioksidacijske aktivnosti betalaina cikla može zaštititi od Parkinsonove bolesti.

2.4. POLISAHARIDI

Polisaharidi su dugolančani polimerni ugljikohidrati sastavljeni od monosaharidnih jedinica koje povezuje glikozidna veza. Polisaharidi koji se pojavljuju u prirodi razlikuju se prema molekularnoj masi, sastavu i konfiguraciji monosaharida te stupnju grananja (razgranati ili nerazgranati). Polisaharidi mogu biti netopljivi u vodi (npr. celuloza), topljivi samo u vrućoj vodi (npr. škrob) i topljivi u hladnoj vodi (npr. guma arabika). Do sada je identificirano više od 300 polisaharidnih spojeva (Zeng i sur., 2019).

Postoje razne analitičke metode pomoću kojih se mogu identificirati polisaharidi, poput nuklearne magnetske rezonancije, masene spektrometrije, te pomoću kemijskih metoda poput Smithove degradacije. Studije u kojima su objavljeni rezultati istraživanja učinaka biljnih polisaharida na reakcije makrofaga, ukazuju na to da polisaharidi izolirani iz biljaka aktiviraju makrofage odnosno njihovo citotoksično djelovanje protiv tumorskih stanica i mikroorganizama, te aktiviraju fagocitnu aktivnost (Schepetkin i Quinn, 2006).

Celuloza, hemiceluloza i lignin su bitni za ljudski organizam jer su prehrambena vlakna, netopljiva u vodi i mogu potaknuti peristaltiku crijeva, ubrzati prolazak otpadnih tvari kroz probavni trakt i spriječiti zatvor i nastanak hemoroida. Mnoge studije potvrđuju da unos hrane koja je bogata prehrambenim vlaknima može značajno smanjiti rizik od dijabetesa tip II, kardiovaskularnih bolesti i hipertenzije (Liu i sur., 2015). Polisaharidi se već desetljećima koriste u raznim industrijskim primjenama, npr. proizvodnji farmaceutskih proizvoda, biomaterijala i biogoriva, a sve intenzivnija istraživanja potiču znanstvenike na razvoj polisaharida za nove primjene (Li i sur., 2018).

2.5. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su molekule koje su izrazito reaktivne zbog nesparenog elektrona u vanjskoj ljusci. Takve molekule ulaze u interakcije s drugim molekulama (poput proteina, lipida, nukleinskih kiselina i sl.) te uzrokuju oksidativni stres. (Kopáni i sur., 2006). Slobodne radikale u manjoj koncentraciji stanice proizvode jer im služe kao vrsta obrambenog mehanizma, neutrofilni proizvode slobodne radikale kako bi uništili patogene, dok ih jetra koristi za detoksikaciju, no prisutnost slobodnih radikala u većoj koncentraciji ima značajnu ulogu u rastu i razvoju mnogih bolesti kao što su kongestivno zatajenje srca, hipertenzija i dijabetičke komplikacije (Scheibmeir i sur., 2005).

Slobodni radikali koji sadrže kisik nazivaju se reaktivne kisikove vrste (ROS) poput superoksidnog anion radikala (O_2^-), vodikovog peroksida (H_2O_2), peroksilnog radikala (ROO) i vrlo reaktivnog hidroksilnog radikala (OH). Slobodni radikali koji sadrže dušik nazivaju se reaktivne dušikove vrste (RNS) poput dušikovog oksida (NO). Štetni učinci koje uzrokuju ROS i RNS su oksidativni i nitrozativni stres. Kako bi se postigla ravnoteža između korisnog i štetnog učinka slobodnih radikala, organizam održava tzv. redoks regulaciju, odnosno održava ravnotežu između proizvodnje i eliminacije slobodnih radikala u organizmu (Phaniendra i sur., 2015). Izvori slobodnih radikala mogu biti endogeni i egzogeni. U endogene izvore ubrajamo mitohondrij koji proizvodi ROS u procesu oksidativne fosforilacije, i peroksisome i endoplazmatski retikulum koji proizvode ROS i RNS, te u egzogene izvore ubrajamo UV zračenje, ksenobiotike (lijekovi), intenzivnu tjelesnu aktivnost, dugotrajno izlaganje stresu i nepravilnu prehranu (di Meo i Venditti, 2020). Prevelika količina slobodnih radikala u organizmu dovodi do oksidativnog stresa, što uzrokuje oštećenja na staničnoj i molekularnoj razini. ROS uzrokuju oštećenja nukleinskih kiselina (promjene u DNA strukturi), proteina (agregacija i denaturacija) i lipida (lipidna peroksidacija) (Jakubczyk i sur., 2020).

2.5.1. Oštećenje nukleinskih kiselina

Oštećenja deoksiribonukleinske (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA) dijele se na endogena i egzogena. Endogena oštećenja DNA su prisutna u samoj stanici i odnose se na hidrolitičke i oksidacijske reakcije DNA s vodom i ROS. Egzogena oštećenja mogu biti uzrokovana fizikalnim čimbenicima, kao što su UV zračenje Sunca, ionizirajuće zračenje, gama zrake i sl., te kemijskim faktorima, poput alkilirajućih agensa i mutagenih kemikalija (Zheng i sur.,

2014). U endogena oštećenja DNA ubrajaju se alkiliranje (adicija metilne ili etilne skupine na DNA baze), deaminacija i oksidacija baza te pogreške u replikaciji DNA (Chatterjee i Walker, 2017). Tijekom oksidativnog oštećenja DNA prisutna je značajna količina 8-hidroksi-2-deoksigvanozina (8-OHdG) koji se zato koristi kao biološki marker za oksidativni stres i kancerogenezu (Valavanidis i sur., 2009). DNA ima važnu ulogu u biološkim procesima zato oštećena DNA može dovesti do mutacije gena, što dovodi do promijenjene strukture proteina (Basu, 2018).

2.5.2. Oksidacija proteina

Oksidativni stres glavni je uzrok oksidacije proteina koja se može vršiti na tri različita načina. Prvi uzrokuje oksidativnu modifikaciju određenih aminokiselina, drugi se provodi cijepanjem peptida pomoću slobodnih radikala te treći način koji zbog produkta peroksidacije lipida dovodi do umrežavanja proteina (Hawkins i Davies, 2019). Oksidacija proteina značajno ovisi o bočnim lancima aminokiselina zato što su pojedine aminokiseline osjetljive na oksidaciju poput cisteina, arginina, metionina i histidina. Oksidacijom proteina dolazi do modifikacije njihove funkcije (npr. gubitak enzimske aktivnosti) (Stadtman i Berlett, 1998).

Karbonilacija proteina prisutna je u mnogim tkivima kao posljedica akutnog oksidativnog stresa. Mjerenjem količine karboniliranih proteina može se procijeniti stupanj oksidativnog stresa staničnog oštećenja. Najpoznatija analitička metoda za ispitivanje karbonilacije proteina odnosi se na reakciju karboniliranog proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) pri čemu dolazi do dinitrofenilhidrazona čija se koncentracija može odrediti spektrofotometrijski na 370 nm te tako korelirati s koncentracijom oksidiranih proteina (Suzuki i sur., 2010).

2.5.3. Lipidna peroksidacija

Peroksidaciju lipida uzrokuju slobodni radikali koji zbog svog nesparenog elektrona uzimaju elektrone iz membrana lipida i proizvode sve više slobodnih radikala. U lipidnim sustavima peroksidacija započinje na polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) koje su smještene na staničnoj membrani na način da ROS kreću s napadom pri čemu se izdvaja atom vodika iz

metilenske skupine i stvaraju se slobodni lipidni radikali koji se stabiliziraju oblikujući konjugirane diene. Konjugirani dieni zajedno s kisikom tvore peroksilni radikal koji napada drugu masnu kiselinu pri čemu se stvara lipidni hidroperoksid i novi radikal te tako započinje lančana reakcija lipidne peroksidacije. Niska razina peroksidacije lipida je prirodni metabolički proces, no zbog unutarstanične neravnoteže antioksidansa dolazi do oksidativnog stresa pri čemu se stvaraju proizvodi peroksidacije (Sevanian i Ursini, 2000).

2.6. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su tvari koje mogu spriječiti štetno djelovanje slobodnih radikala. S obzirom na mehanizam djelovanja, dijele se na enzimске i neenzimске. Enzimski poput superoksid dismutaze (SOD) i katalaze su odgovorni za sprječavanje nastanka ROS-a. SOD katalizira dismutaciju superoksida do vodikovog peroksida, ova reakcija se općenito smatra primarnom obranom tijela jer sprječava daljnje stvaranje slobodnih radikala. Jetra, bubrezi i crvene krvne stanice sadrže veliku količinu katalaze koja pomaže u detoksikaciji organizma. Neenzimski antioksidansi prekidaju lančanu reakciju doniranjem elektrona slobodnom radikalima te ga na taj način stabiliziraju (Scheibmeir i sur., 2005). Neenzimski antioksidansi mogu biti hidrofilni (glutathion) i hidrofobni (α -tokoferol). Hidrofilni se nalaze u mitohondrijima, a hidrofobni u staničnim membranama i lipoproteinima (Bouayed i Bohn, 2010).

Mehanizmi kojima tijelo smanjuje djelovanje oksidativnog stresa uključuju endogene antioksidanse koji se proizvedu *in situ* i egzogeni antioksidansi koji se unose hranom. Najznačajniji primjeri egzogenih antioksidansa su β -karoten i likopen (Uddin i Ahmad, 1995). Razne studije *in vivo* i *in vitro* potvrđuju da egzogeni antioksidansi sprječavaju oštećenje slobodnih radikala koji su povezani s razvojem raka, s toga mnogi znanstvenici preporučaju suplemente koji sadrže antioksidanse kako bi se smanjio rizik od razvoja raka. β -karoten i vitamini E i C smanjuju rizik od raka dojke, a lutein i zeakstantin od raka jajnika (Elias i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Priprema ekstrakata kore cikle i kore banane korištenih u ovom radu provedena je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorci kore banane, bili su podvrgnuti blanširanju (100 °C, 7 min) s ciljem inaktivacije enzima polifenol-oksidade te zatim liofilizaciji (~30 h). Uzorci kore cikle sušili su se na sobnoj temperaturi. Nakon provedenog sušenja, uzorci kore banane i kore cikle bili su usitnjeni u prah u kuhinjskom mlincu te prosijani kroz sito promjera 450 µm kako bi se postigla ujednačena veličina čestica praha.

Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz kore cikle i kore banane provodila se konvencionalnom metodom zagrijavanja. Kao otapalo korištena je destilirana voda, a omjer uzorak:otapalo iznosio je 1:20. Ekstrakcija se provodila na 80 °C kroz 30 min uz konstantno miješanje staklenim štapićem. Nakon ekstrakcije, slijedilo je centrifugiranje (9 500 rpm, 10 min) kako bi se odvojio talog od tekućeg dijela (supernatant). Pripremani su ekstrakti sa i bez percipitacije polisaharida. Percipitacija polisaharida provodila se dodatkom 4x većeg volumena 96 %-tnog etanola u odnosu na volumen ekstrakta. Percipitacija se provodila na sobnoj temperaturi 1 h nakon čega je slijedila filtracija u svrhu odvajanja percipitiranih polisaharida i ekstrakta. Dobivenim ekstraktima se uz pomoć rotavapora uklonio veći dio vode, a ostatak je prebačen u Petrijeve zdjelice te se pokrio parafilmom s probušenim rupicama i stavio na liofilizaciju (~24 h). Nakon završene liofilizacije, ekstrakt je prebačen u tarionik gdje se usitnio. Ekstrakt je do daljnjih analiza čuvan u frižideru na +4 °C.

Za provođenje eksperimenta korištene su ishodišne otopine ekstrakata koju su sadržavale 10 mg mL⁻¹ polifenola te su iz njih pripremljene radne otopine u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹ polifenola.

3.1.2. Modelne makromolekule

Kao modelne makromolekule u ovom radu korišteni su plazmid phiX174 RF1 DNA, protein albumin iz govedeg seruma (BSA) te linoleinska kiselina.

Za ispitivanje učinka ekstrakata kore cikla i kore banane na DNA koristi se dvolančani plazmid phiX RF1 DNA dugačak 5 386 parova baza s molekulskom masom od $3,5 \times 10^6$ Da, a izoliran je iz *E. coli* (Sanger i sur., 1977).

Protein albumin iz govedeg seruma (BSA) je najzastupljeniji protein krvne plazme. Ima mnoge bitne funkcije kao što su transport iona metala i održavanje osmotskog tlaka. Zbog niske cijene, lake dostupnosti i sličnosti s humanim serumskim albuminom često se koristi kao standard prilikom određivanja koncentracije proteina (Xu i sur., 2018).

Linoleinska kiselina ($C_{18}H_{32}O_2$) je esencijalna nezasićena omega-6 masna kiselina koja sadrži dvije dvostruke veze na 9. i 12. ugljikovom atomu od karbonilne skupine i jedna je od najviše konzumiranih polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u ljudskoj prehrani. Sastavni je dio membranskih fosfolipida i djeluje kao strukturna komponenta za održavanje razine fluidnosti membrane te se zato koristi za određivanje stupnja lipidne peroksidacije (Whelan, 2013).

3.1.3. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustavi u ovom radu korištene su kontinuirane humane stanične linije primarnog karcinoma debelog crijeva Caco-2, pločastog epitela karcinoma jezika Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2.

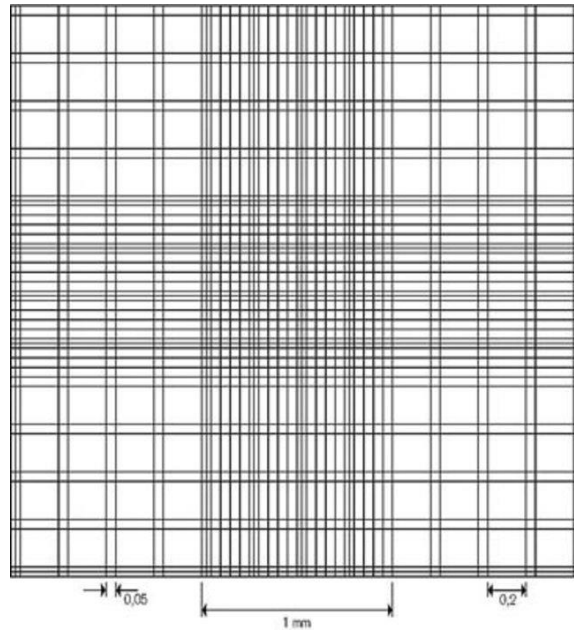
Caco-2 je kontinuirana stanična linija izolirana iz primarnog karcinoma debelog crijeva 72-godišnjeg muškarca bijele rase (Lea, 2015). Koristi se za proučavanje utjecaja ispitivanih spojeva i kemikalija na epitelne stanice karcinoma debelog crijeva (van Breemen i Li, 2005). Cal27 je kontinuirana stanična linija izolirana iz pločastog epitela karcinoma jezika 56-godišnjeg muškarca bijele rase (Wu i sur., 2019). Hep G2 je kontinuirana stanična linija izolirana iz hepatocelularnog karcinoma jetre 15-godišnjeg dječaka bijele rase. Koristi se za proučavanje citotoksičnosti različitih spojeva i kemikalija (Choi i sur., 2015).

Navedene stanične linije kultivirane su u monosloju u plastičnim T-bocama u kompletiranom mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) s dodatkom 10 %-tne otopine fetalnog govedeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS). Stanice su uzgajane u kontroliranim uvjetima atmosfere uz 5 % CO₂ na temperaturi od 37 °C. Stanice se nakon uzgoja odvajaju od podloge pomoću 0,25 %-tne otopine tripsina, te se nakon 10-ak min dodatkom medija sa serumom zaustavlja djelovanje tripsina. Početna koncentracija stanica od 10⁵ stanica mL⁻¹ koja je potrebna za daljnju provedbu eksperimenta podešena je brojanjem stanica u Bürker-Türkovoju komorici.

3.1.3.1. Određivanje broja stanica pomoću Bürker-Türkove komorice

Brojanje stanica se provodi pomoću Bürker-Türkove komorice pod svjetlosnim mikroskopom što je potrebno kako bi se utvrdio broj stanica koje je potrebno nasaditi da bi u konačnici usporedivi broj stanica bio izložen djelovanju ispitivanog spoja. Nakon što se provedla tripsinizacija, nanosi se 10 µL uzorka stanične suspenzije na predmetnicu postavljenu u Bürker-Türkovoju komorici te je na nju postavljeno pokrovno stakalce. Potrebno je izbrojati stanice u četiri velika kvadrata, a svaki veliki kvadrat se sastoji od 16 malih kvadrata (slika 5). Volumen velikog kvadrata je 10⁻⁴ mL, visina prostora između predmetnice i pokrovnog stakalca iznosi 0,1 mm, odnosno površina svakog kvadrata je 1 mm². Nakon što se izbroje

stanice, odredi se njihova srednja vrijednost, i konačan rezultat se izražava kao broj stanica po 1 mL stanične suspenzije (Christensen i sur., 2005).



Slika 5. Brojanje stanica pomoću Bürker-Türkove komorice (prilagođeno prema Christensen i sur., 2005)

Formula za određivanje ukupnog broja stanica [1]:

$$\text{ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} \times 10^4 \text{ (stanica mL}^{-1}\text{)}$$

3.1.4. Laboratorijska oprema

3.1.4.1. Kemikalije

- Agarozna niske točke tališta (LMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Agarozna normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Amonijev tiocijanat (NH_4SCN), *Fischer*, Velika Britanija
- Askorbinska iselina, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Bromtimol plavo, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Coomassie blue, *Bio-Rad*, SAD
- Dinitrofenil hidrazin (DNPH), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Dimetil sulfoksid (DMSO), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Ellmanov reagens, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etil-acetat, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etidij-bromid ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Ekstrakti kore cikla i kore banane
- Fetalni goveđi serum, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Fosforna kiselina (H_3PO_4), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Glutation, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Glutation-reduktaza, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Krista violet, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Linoleinska kiselina, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Malondialdehid, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Metanol, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- NADPH (tetranatrijeva sol), *Merck*, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Natrijev-laurilsarkozinat, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Natrijev hidroksid (NaOH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

- *Neutral red*, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Octena kiselina (CH₃COOH), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Plazmid phiX174 RF1 DNA, *Thermo Scientific, SAD*
- RPMI 1640 medij, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Trikloroctena kiselina (TCA), *Fischer, Velika Britanija*
- Tripsin, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Tween 20, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Tiobarbiturna kiselina (TBA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Vodikov peroksid (H₂O₂), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Željezov sulfat heptahidrat (FeSO₄ x 7H₂O), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Željezov klorid heksahidrat (FeCl₃ x 6H₂O), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka

3.1.4.2. Otopine

Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat, 1 M:

- | | |
|--|--------|
| • NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O | 7,89 g |
| • Destilirana voda | 50 mL |

Ishodišna otopina *Neutral red*:

- | | |
|----------------------|-----------|
| • <i>Neutral red</i> | 0,125 g |
| • Destilirana voda | do 100 mL |

Otopina za odbojavanje *Neutral red*:

- | | |
|--------------------------|----------|
| • EtOH | 50 mL |
| • Ledena octena kiselina | 1 mL |
| • Destilirana voda | do 50 mL |

Ishodišna otopina 2',7'-diklordihidrofluorescein diacetata (DCFDA)

- | | |
|---------|--------|
| • DCFDA | 1,5 mg |
| • DMSO | 1,5 mL |

TAE pufer:

- TRIS 48,4 g
- Ledena octena kiselina 11,4 mL
- EDTA 3,7 g
- Destilirana voda do 1000 mL

Agarozni gel, 1,5 %-tni:

- Agaroz 1,5 g
- TAE pufer 130 mL

Obojeni pufer za nanošenje (eng. *loading buffer*):

- Bromtimol plavo 0,2 g
- Glicerol, 50% 6 mL
- Destilirana voda 4 mL

Vodikov peroksid, 10 mM:

- H₂O₂, 3% 0,11 mL
- Destilirana voda 10 mL

Otopina NMP agaroze:

- NMP agaroz 0,15 g
- PBS 10 mL

Otopina LMP agaroze:

- LMP agaroz 0,05 g
- Destilirana voda 10 mL

Pufer za lizu stanica:

- NaCl, 2,5 M 65 g
- EDTA, 10 mM 14,61 g
- Tris, 10 mM 0,539 g
- Narijev-laurilsarkozinat, 1 % 4,45 g
- Triton X-100 1 mL

- DMSO 10 mL

Pufer za alkalnu elektroforezu:

- NaOH, 10 mL 30 mL
- Na₂-EDTA, 200 mM 5 mL
- Destilirana voda 965 mL

Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5):

- Tris 48,5 g
- Destilirana voda 1000 mL
- HCl do pH = 7,5

Dinitrofenil hidrazin, 10 mM:

- DNPH 0,198 g
- EtOH, 96 % 100 mL

Željezov klorid, 0,5 mM:

- FeCl₃ x 6H₂O 4,3 g
- Destilirana voda 10 mL

Otopina tiobarbiturne kiseline:

- TBA 0,8 g
- TCA 100 mL

Bradfordov reagens:

- Coomassie blue 10 mg
- EtOH, 96 % 5 mL
- H₃PO₄ 10 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Emulzija linoleinske kiseline:

- Linoleinska kiselina 0,1402 g
- Tween 20 0,1402 g

- Fosftani pufer, 0,2 M 25 mL

Fosfatni pufer, 0,2 M:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1 M
- Na_2HPO_4 1 M

Amonijev tiocijanat, 30%-tni:

- NH_4SCN 30 g
- Destilirana voda do 100 mL

Željezov sulfat, 0,02 M:

- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- Destilirana voda do 100 mL

Klorovodična kiselina, 3,5 %-tna:

- HCl , 37% 8,12 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Natrijev hidrogenfosfat, 1 M:

- Na_2HPO_4 7,1 g
- Destilirana voda 50 mL

Fosfatni pufer/0,005 M EDTA:

- 10 mM Na_2HPO_4 80 mL
- 10 mM NaH_2PO_4 15 mL
- EDTA (0,5 M) 1 mL

Ellmanov reagens:

- Ellmanov reagens 17,85 mg
- Fosfatni pufer/0,005 M EDTA 15 mL

NADPH otopina:

- NADPH 5 mg

- Fosfatni pufer/0,005 M EDTA 6 mL

Otopina glutationa:

- Glutation 3 mg
- Fosfatni pufer/0,005 M EDTA 1 mL

Otopina glutation-redukataze:

- Glutation-reduktaza (500 U/0,43 mL) 24 μ L
- Fosfatni pufer/0,005 M EDTA 1 mL

3.1.4.3. Pribor

- Brušena predmetna stakalca
- Brüker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmeyerove tikvicve, 20-100 mL
- Falcon epruvete
- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Laboratorijske žlice
- Menzure, 50-1000 mL
- Mikropipete, 10, 20, 200, 1000 μ L, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske pločice s 24 i 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- Plastične Petrijeve zdjelice, *Aptaca*, Canelli, Italija
- Propipete
- Staklene čaše
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Stakleni lijevak
- Špatula
- T-boce, *Falcon*, *BD Company*, Franklin, Lakes, SAD
- Vata za pravljenje čepova

3.1.4.4. Uređaji

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH*, Wetzlar, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific*, SAD
- Invertni mikroskop, *Optika Microscopes*, Ponteranica, Italija
- Komora za sterilni rad, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd*, *Technical Centre Cambridge*, Engleska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, *Comet Assay II*, *Perceptive Instruments Ltd*, UK
- Svjetlosni mikroskop, *Carl Zeiss Jena*, Njemačka
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Vaga, *Sartorius*, Engleska
- Vibromiker EV-102, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Vodena kupelj, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na humanim staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2

3.2.1.1. Određivanje citotoksičnosti *Neutral red* metodom

Neutral red je kationska boja koja prolazi kroz staničnu membranu i akumulira se u lizosomima te se primjenom boje *Neutral red* može odrediti aktivnost lizosoma. Ovom jednostavnom metodom se utvrđuje citotoksičnost potencijalnih ksenobiotika (Repetto i sur., 2008).

Ekstrakti kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida su pripremljeni u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹. Prethodno uzgojene stanične linije se podvrgavaju se tripsinizaciji i slijedi brojanje stanica u Bürker-Türkovoju komorici te se početna koncentracija stanica u suspenziji podešava na 10⁵ stanica mL⁻¹. Tako pripremljene suspenzije stanica se nacijepe u mikrotitarske pločice s 96 jažica te se nakon 24 sata (vrijeme koje je potrebno da dođe do pričvršćivanja stanica za površinu bunarića) stanice tretiraju s otopinama polifenola prethodno navedenih koncentracija. Nakon 2 sata tretmana, medij s ispitivanim uzorcima se uklanja, svaka jažica ispiru s 1 mL PBS pufera kako bi se uklonili tragovi medija. Nakon ispiranja u svaku jažicu se dodaje 1 mL otopine *Neutral red* te slijedi inkubacija 2 sata pri 37 °C. Nakon inkubacije iz jažica se uklanja otopina *Neutral red* te se stanice ispiru s 100 µL PBS pufera te se dodaje 2 mL otopine za odbojavanje *Neutral red* boje. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski te se mjeri apsorbancija na 520 nm u donosu na slijepu probu koja sadrži sve sastojke kao i ostali uzorci bez ekstrakata. Postotak preživljenja stanica izračunat je prema formuli [2].

Formula za određivanje postotka preživljenja stanica [2]:

$$\% \text{ preživljenja} = \left(\frac{A_{520} \text{ tretiranih uzoraka}}{A_{520} \text{ kontrole}} \right) \times 100$$

3.2.1.2. *Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) DCFDA metodom (2',7'-diklordihidrofluorescein diacetat)*

Ekstrakti kore cikla i kore banane sa i bez polisaharida su pripremljeni u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹. S ciljem određivanja reaktivnih kisikovih vrsta, 100 µL stanične suspenzije koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹ se najepljuju u crnu mikrotitarsku ploču s 96 jažica te se nakon 24 sata inkubacije na stanice dodaje medij s odgovarajućim koncentracijama polifenola te se provodi tretman stanica u trajanju od 2 sata na 37 °C. Nakon inkubacije uklanja se medij i ispiru s 100 µL PBS pufera te se dodaje 100 µL 50 µM otopine 2',7'-diklordihidrofluorescein diacetata (DCFDA). Slijedi inkubacija u mraku u trajanju od 45 min na 37 °C. Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija ($\lambda_{emisija}$ 585; $\lambda_{ekscitacija}$ 495). Paralelno je pripremljena i negativna kontrola koja sadrži sve sastojke kao i ostali uzorci osim ekstrakata kore cikla i kore banane sa i bez polisaharida te su vrijednosti fluorescencije izražene kao relativne u usporedbi s negativnom kontrolom.

3.2.2. *Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakata kore cikla i kore banane na modelnoj DNA i staničnom genetičkom materijalu*

3.2.2.1. *Učinak na modelni plazmid phiX174 RFI DNA*

Priprema se 1 %-tni agarozni gel u TAE puferu. Agaroz i pufer se otapaju u mikrovalnoj pećnici do par ključa te se hlade do 60 °C kako ne bi oštetili aparaturu jer je od plastike. Homogena agarozna se prebacuje u kalup te se odmah namješta češljic za formiranje jažica, ostavlja par minuta na sobnoj temperaturi kako bi se formirao čvrsti gel i uklanja se češljic.

Uzorci za elektroforezu sadrže 3 µL 0,1 mg mL⁻¹ otopine plazmida u TAE puferu, 1 µL 3 %-tnog H₂O₂, ekstrakte kore cikla i kore banane u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL⁻¹ te odgovarajući volumen TAE pufera do konačnog volumena uzorka od 30 µL. Uzorci su izlagani UV zračenju do 3 minute s 2 J/m²s. Zračena su također i negativna kontrola koja sadrži 4 µL otopine plazmida i 26 µL TAE pufera, kontrola koja sadrži 4 µL otopine plazmida, 1 µL H₂O₂ i 25 µL TAE pufera, kontrola koja sadrži 4 µL otopine plazmida i 26 µL TAE pufera i zračena jednu minutu i kontrola koja sadrži 4 µL otopine plazmida, 1 µL H₂O₂, 25 µL TAE pufera i zračena je dvije minute. U pripremljene uzorke se dodao tzv. *loading buffer* odnosno pufer za nanošenje koji sadrži bromtimol plavu kako bi se kretanjem boje

mogla pratiti elektroforeza, a pomoću glicerola se povećava viskoznost uzorka čime uzorci mogu lakše tonuti u gel.

Nakon što su se formirale jažice u agaroznom gelu, nanose se pripremljeni uzorci te se dodaje TAE pufer da se prekrije površina gela. Tada započinje postupak elektroforeze koji traje 60 minuta pri jakosti električne struje od 110 mA. Nakon provedene elektroforeze gel se boji otopinom etidij bromida u koncentraciji $20 \mu\text{L mL}^{-1}$ u trajanju od 15 min, zrači se UV zračenjem 10 min i tada je spremno za vizualizaciju gela pod UV svjetlom.

3.2.2.2. Određivanje oštećenja DNA u stanicama Caco-2, Cal27 i Hep G2 komet testom (eng. comet assay)

Stanične suspenzije Caco-2, Cal27 i Hep G2 u početnoj koncentraciji od 10^5 stanica mL^{-1} (određena brojanjem stanica u Bükler-Türkovoju komorici) nacjepljuje se po 1,5 mL u plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm te inkubira na 37°C u trajanju od 24 h. Tada se medij zamjenjuje svježim, a stanice se tretiraju ekstraktima kore cikle i kore banane u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL^{-1} u trajanju od 2 sata te se tada medij i ekstrakt uklanjaju iz Petrijevih zdjelica, ispiru se stanice s PBS puferom, tripsiniziraju i prebacuju u Eppendorf epruvete. U epruvetama se centrifugiraju na 5 000 rpm u trajanju od 5 minuta te se talog koristi u daljnjim eksperimentima, a supernatant odbacuje.

Komet test je jednostavna metoda za određivanje razine oštećenja i popravka DNA u eukariotskim stanicama. Test se zato primjenjuje za testiranje novih kemikalija na genotoksičnost te se proučava onečišćenje okoliša genotoksinima. Test je ujedno i niske cijene, a ima visoku reproducibilnost (Collins, 2004).

Metodu karakterizira uklanjanje staničnih proteina i oslobađanje DNA u stanici pomoću etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), odnosno iz superzavijene DNA nastaju jednolančani i dvolančani fragmenti DNA koji su različitih duljina i prema tome, kraći fragmenti putuju brže kroz gel, a duži fragmenti sporije, te se tako fragmenti odvajaju prema svojoj veličini odnosno brzini kretanja. Metoda je dobila ime po kometu, zato što se formira oblik koji slični kometu u trenutku kad se električni naboj propusti kroz gel, tada komet ima „rep“ koji čine negativno nabijeni dijelovi DNA koju putuju prema anodi, a ostatak DNA, tzv. intaktna DNA zbog svoje velike molekularne mase se ne može kretati prema anodi, ostaje na mjestu i formira „glavu“ kometa (Collins, 2004)

Tretman stanica Caco-2, Cal27 i Hep G2 ekstraktima kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida proveden je prema protokolu opisan u poglavlju 3.2.1.2. Nakon tretmana stanica, na brušena predmetna stakalca nanosi se 300 μL otopine 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (eng. *normal melting point*, NMP). Zatim se nanosi 2 μL resuspendiranih stanica i 100 μL 0,5 %-tne agaroze niske točke tališta (eng. *low melting point*, LMP) na polimerizirani sloj NMP agaroze temperirane na 37 °C. Nakon što se LMP agarosa polimerizirala, nanosi se 100 μL LMP agaroze, te nakon što se ona polimerizirala provodi se liza stanice, odnosno razaranje stanice koje uzrokuje oštećenje membrane, a provodi se u puferu za lizu preko noći. Nakon lize se stakalca prenose u kadicu za elektroforezu. Kadica je napunjena alkalnim puferom, a elektroforeza se provodi 20 minuta pri naponu od 25 V i jakosti struje od 300 mA. Stakalca se nakon provedene elektroforeze ispiru tri puta s 0,4 M Tris-HCl (pH = 7,5). Nakon ispiranja gelovi se bojaju etidij bromidom u koncentraciji 20 mg mL⁻¹ te se nakon 15 min ispiru s Tris-HCl puferom kako bi se povećala topljivost. Mjerenje se provodi pomoću epifluorescencijskog mikroskopa, a pomoću računalnog programa *Comet Assay II* se provodi analiza slika za koju je potrebno izbrojati do 55 kometa za svaki preparat. Parametri koji se koriste su dužina i intenzitet repa te repni moment koji određuju razinu oštećenja DNA.

3.2.3. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na modelnim proteinima i lipidima

3.2.3.1. Određivanje stupnja oksidacije na modelu proteina albumina iz goveđeg seruma

Stupanj oksidacije proteina može se odrediti pomoću raznih metoda, ali jedna od najčešće korištenih se temelji na stvaranju 2,4-dinitrofenilhidrazona iz reakcije 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s karbonilnim skupinama proteina. Nastali 2,4-dinitrofenilhidrazon sadrži dinitrofenilnu skupinu (DNP) koja se detektira spektrofotometrijski s apsorpcijom na 370 nm (Soglia i sur., 2016).

Stupanj oksidacije proteina albumina se određuje iz goveđeg seruma (BSA). Svi uzorci sadrže ekstrakte kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL⁻¹, 60 μL BSA u koncentraciji 40 mg mL⁻¹, 60 μL FeCl₃ koncentracije 0,5 mM, 60 μL askorbinske kiseline, 60 μL H₂O₂ koncentracije 10 mM i destiliranu vodu u volumenu potrebnom da bi se postiglo 600 μL reakcijske smjese. Pripremljene su pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna

kontrola sadrži 12 μL Troloxa koncentracije $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ umjesto ekstrakata, a negativna kontrola 60 μL metanola umjesto ekstrakata.

Svi uzorci su pripremljeni u tri paralele i inkubiraju se 30 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije se dodaje 500 μL DNPH i inkubira se na sobnoj temperaturi 15 minuta. Tada se dodaje 500 μL 10 %-tne trikloroetene kiseline (TCA) i 15 minuta se inkubira na ledu. Nakon inkubacije uzorci se centrifugiraju kako bi se supernatant mogao odbaciti, a talog isprati s 1 mL etilacetata. Svi uzorci se resuspendiraju u 1 mL 6 M gvanidin-HCl te se mjeri apsorbancija na 370 nm.

3.2.3.1.1. Određivanje ukupnih proteina metodom po Bradfordu

Metoda po Bradfordu je kolorimetrijska metoda koja služi za određivanje koncentracije proteina, a temelji se na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira s pobočnim grupama određenih aminokiselina te se veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama pri čemu se mijenja boja iz smeđe u plavu. Intenzitet plave boje se mjeri spektrofotometrijski na 595 nm i proporcionalan je koncentraciji proteina (Bradford, 1976).

Otopina proteina albumina iz goveđeg seruma se priprema u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} te joj se dodaje destilirana voda u volumenu potrebnom da konačna koncentracija proteina u uzorku bude 1, 2, 4, 6, 8 i $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pripremila se jedna slijepa proba koja sadrži samo destiliranu vodu. U svaki uzorak se dodaje 1 mL Bradfordovog reagensa, promiješa i nakon 5 minuta provedenog na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija na 595 nm (A_{595}). Na temelju izmjerenih apsorbancija konstruira se baždarni dijagram koji se kasnije koristi kako bi se mogla odrediti koncentracija proteina u uzorcima koji su tretirani s ekstraktima kore cikla i kore banane.

Istom metodom se mjeri apsorbancija uzoraka stanica tretiranih s ekstraktima u koncentracijama $0,2$ i 1 mg mL^{-1} . Nanose se u volumenu od 5 μL , dodaje se 95 μL destilirane vode i na kraju 1 mL Bradfordovog reagensa i mjeri apsorbancija na 595 nm. Svi uzorci se pripremaju u dvije paralele, uključujući i slijepu probu koja sadrži sve osim ekstrakata.

Koncentracija proteina se određuje prema jednadžbi baždarnog dijagrama [3]:

$$\gamma(\text{protein}) = \frac{A_{595} - b}{a}$$

γ (protein) - koncentracija proteina u uzorku izražena u mg mL⁻¹

A₅₉₅ - apsorbancija uzorka izmjerena na 595 nm

b - odsječak na osi y baždarnog dijagrama

a - koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama

3.2.3.2. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata kore cikle i kore banane na modelnim lipidima – linoleinska kiselina

Hidroksialkenal 4-HNE je glavni produkt peroksidacije linoleinske kiseline i kada je prisutan u većoj količini dovodi do modifikacija lipoproteina, oštećenja tkiva te do patoloških stanja, poput raka, Alzheimerove bolesti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i sl. (Riahi i sur., 2010).

Svi uzorci sadrže 625 µL emulzije linoleinske kiseline koncentracije 0,3 mg mL⁻¹, ekstrakte kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹ te natrijev fosfatni pufer do konačnog volumena 1 250 µL. Pozitivna kontrola sadrži 125 µL Troloxa koncentracije 10 mg mL⁻¹ umjesto ekstrakata, a negativna kontrola 125 µL metanola. Iz reakcijske smjene se pomiješa 50 µL uzorka s 2 mL EtOH (75 %) i 50 µL amonijevog tiocijanata (30 %). Na kraju se u reakcijsku smjenu dodaje 50 µL FeSO₄ (0,02 M, razrijeđen u 3,5 % HCl). Nakon 3 minute mjeri se apsorbancija na 500 nm. Svi uzorci su pripremljeni u 3 paralele. Apsorbancije su ponovno mjerene nakon 5, 24 i 50 sati inkubacije uzoraka.

Postotak peroksidacije lipida u linoleinskoj kiselini izračunava se prema formuli [4]:

$$\% \text{ peroksidacije} = \left[\frac{A_{500}(\text{uzorak})}{A_{500}(\text{negativna kontrola})} \right] \times 100$$

3.2.4. Određivanje glutaciona u stanicama Caco-2, Cal27 i Hep G2

Glutation je endogeni stanični tripeptid koji ima ulogu staničnog antioksidansa što znači da štiti stanice od oksidativnih oštećenja, na način da „hvata“ slobodne radikale pri čemu dolazi do njihove oksidacije i do stvaranja glutation disulfida, ali glutation ima i bitnu ulogu u održavanju redoks homeostaze (Forman i sur., 2008).

Određivanje koncentracije glutaciona provedeno je na staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2 s ekstraktima kore cikla i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL⁻¹. Stanice se nasaduju u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm u koncentraciji od 10⁵ stanica mL⁻¹ medija. Nakon što su se stanice vezale za podlogu, uklanja se medij, nanosi se 1,5 mL ekstrakata kore cikla i kore banane te se inkubiraju 2 sata. Nakon inkubacije, vraća se medij te se inkubira 24 h pri 37 °C, nakon čega se stanice skupljaju u obliku suhog taloga i liziraju. Kao negativna kontrola koristi se medij.

Skupljanje taloga:

Nakon 2 sata inkubacije pri 37 °C stanice se skupljaju u obliku suhog taloga. Medij iz Petrijevih zdjelica se prenosi u kivete. Stanice se ispiru dva puta s PBS-om te se odljepljuju s dna Petrijeve zdjelice dodatkom 1 mL 0,025 %-tne otopine EDTA-tripsina. Nakon tripsiniziranja, vraća se medij u kojem se stanice resuspendiraju. Pri tome se određuje broj stanica u ukupnom volumenu. Ukupni sadržaj se vraća u kivete koje se centrifugiraju na 2 000 rpm/10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se odlijeva, a na talog se dodaje isti volumen PBS-a. Stanice se resuspendiraju i centrifugiraju na 2 000 rpm/10 minuta. Supernatant se odlije, a na talog se dodaje 1 mL PBS-a, resuspendira se te prenosi u Eppendorf epruvete koje se centrifugiraju na 2 000 rpm/10 minuta. Supernatant se odbacuje, a istaložene stanice se pažljivo odvajaju.

Liziranje stanica:

Uzorci staničnih taloga se prije liziranja stavljaju na led. Na talog se dodaje lizirajući pufer (10 mM NaHPO₄) uz dodatak inhibitor proteinaza PMSF koji čini 1 % ukupnog volumena na način da se na 5 x 10⁶ stanica dodaje 250 µL pufera. Stanice se u lizirajućem puferu drže 15 minuta na ledu. Stanice se nakon toga centrifugiraju 30 min na 15 000 rpm na + 4 °C. Supernatant čini stanični citosol u kojem se određuje koncentracija glutaciona.

Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glutaciona:

Pripremi se 10 mM ishodišna otopina glutaciona u 100 mM NaHPO₄/5 mM EDTA pufera. Iz ishodišne otopine pripreme se otopine koncentracija 5, 10, 20, 50 i 100 μM te se u bunariće stavlja po 147,5 μL pripremljenih otopina određenih koncentracija, 40 μL Ellmanovog reagensa i 2 μL glutation reduktaze (12 U/mL) (Kaumpawat i sur., 2003). Neposredno prije mjerenja dodaje se 20 μL NADPH. U slijepu probu stavlja se Ellmanov reagens i NADPH. Nastaje žuto obojeni produkt, a intenzitet obojenja se određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije svakih 15 sekundi na 412 nm kroz dvije minuta. Iz dobivenih podataka crta se baždarni dijagram koji se koristi za određivanje nepoznatih koncentracija glutaciona u uzorcima s obzirom na poznatu vrijednost apsorbancije u određenom vremenu.

Određivanje koncentracije glutaciona u uzorcima:

Uzorci staničnog lizata (po 7,5 μL) stavlja se u bunariće zajedno s 140 μL pufera (100 mM NaHPO₄/5 mM EDTA) te se dodaje po 40 μL Ellmanovog reagensa i 2 μL glutation-reduktaze. Neposredno prije mjerenja dodaje se 20 μL NADPH. Apsorbancija se mjeri svakih 15 sekundi u vremenu od dvije minute na 412 nm. Koncentracija glutaciona se određuje pomoću baždarnog dijagrama, unošenjem vrijednosti izmjerenih apsorbancija. Koncentracija se izražava u μM mg⁻¹ proteina. Koncentracija proteina određuje se metodom po Bradfordu (3.2.2.4.1.).

3.2.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su u statističkom programu JASP 0.14.0 korištenjem Classical ANOVA statističke analize sa Scheffe i Tukey *post hoc* testom usporedbe. Odabrana razina značajnosti (p-vrijednost) bila je 0,001, tako da svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,001 smatra statistički značajnim. Rezultati su također prikazani grafički pomoću Microsoft Excel 2007 kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Učinak biološki aktivnih spojeva iz ekstrakta kore cikle i kore banane pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam tijekom 24 sata ispitan je na modelima staničnih makromolekula (plazmid phiX174 RF1 DNA, protein albumin iz govedeg seruma i linoleinska kiselina) te kontinuiranim humanim staničnim linijama karcinoma debelog crijeva Caco-2, pločastog epitela karcinoma jezika Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2.

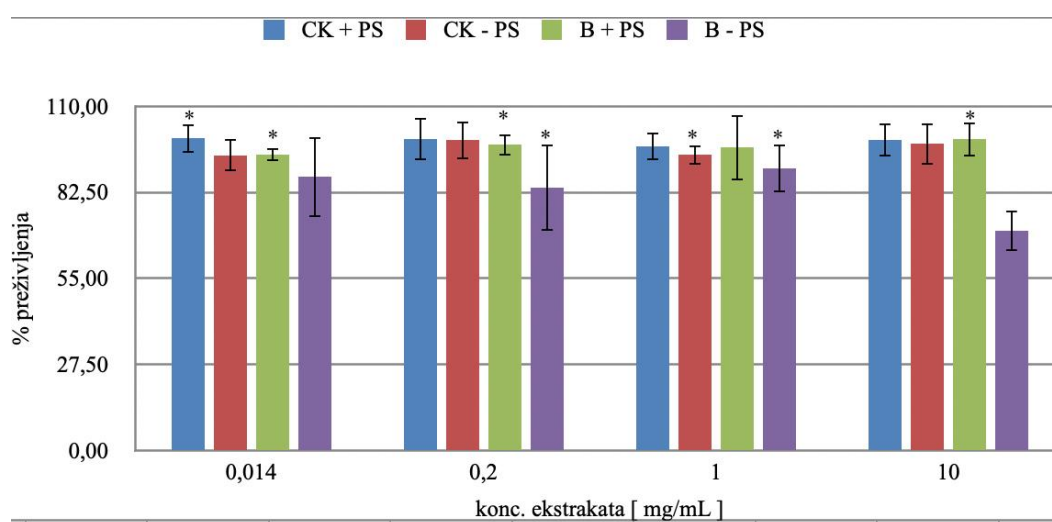
Biološki učinak prati se djelovanjem na genetički materijal te određivanjem stupnja karbonilacije proteina i lipidne peroksidacije. Citotoksični učinak na staničnu liniju Caco-2 određen je *Neutral red* i DCFDA metodom. Genotoksični i protektivni učinak na modelnom plazmidu praćen je elektroforezom u agaroznom gelu, dok je oštećenje genetičkog materijala određeno komet testom. Prooksidativni i protektivni učinak na modelnom proteinu određen je metodom koja se bazira na reakciji karboniliranih proteina s DNPH. Navedeni učinci određeni su na modelu linoleinske kiseline mjerenjem koncentracije produkta lipidne peroksidacije, 4-HNE, određivanje koncentracije ukupnog glutationa provedeno je na staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički slikama 6. – 26.

4.1. CITOTOKSIČNI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA HUMANIM STANIČNIM LINIJAMA CACO-2, CAL27 I HEP G2

4.1.1. Citotoksični učinak određen *Neutral red* metodom

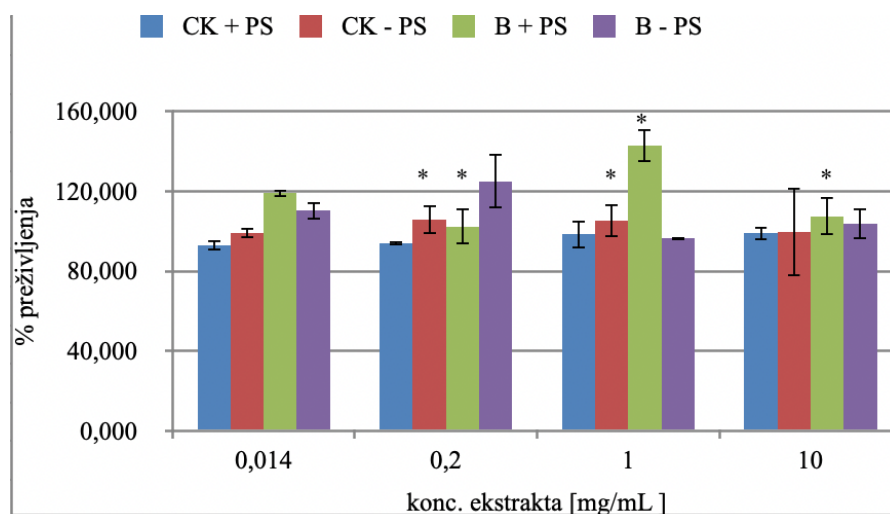
Citotoksični učinak ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama od 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹ ispitan je na humanim staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2 korištenjem *Neutral red* metode, a vrijeme tretmana je bilo 2 sata. Rezultati su prikazani grafički slikama 6. – 8.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

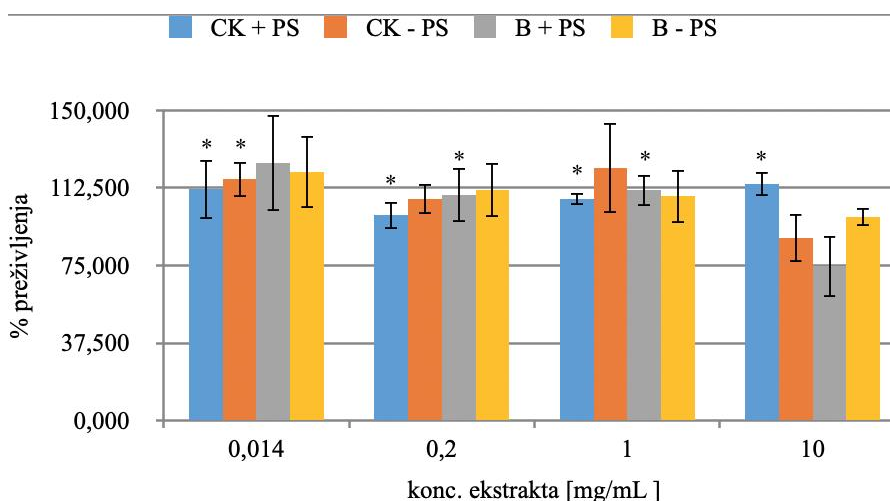
Slika 6. Prikaz postotka preživljenja Caco-2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u trajanju od 2 sata

Rezultati pokazuju da ekstrakti kore cikle sa i bez polisaharida te ekstrakti kore banane s polisaharidima u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹ ne djeluju citotoksično na staničnu liniju Caco-2 jer je postotak preživljenja stanica bio iznad 95 %, dok su ekstrakti kore banane bez polisaharida koncentracija 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹ djelovali blago citotoksično jer je postotak preživljenja stanica bio oko 85%, a koncentracija od 10 mg mL⁻¹ je imala jači citotoksični učinak jer je postotak preživljenja stanica bio oko 70 %.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 7. Prikaz postotka preživljenja Cal27 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u trajanju od 2 sata. Rezultati pokazuju da ekstrakti kore cikle s polisaharidima u svim koncentracijama te ekstrakt kore banane bez polisaharida koncentracije 1 mg mL⁻¹ djeluju blago citotoksično, svi ostali ekstrakti u svim ostalim koncentracijama ne djeluju citotoksično na staničnu liniju Cal27.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

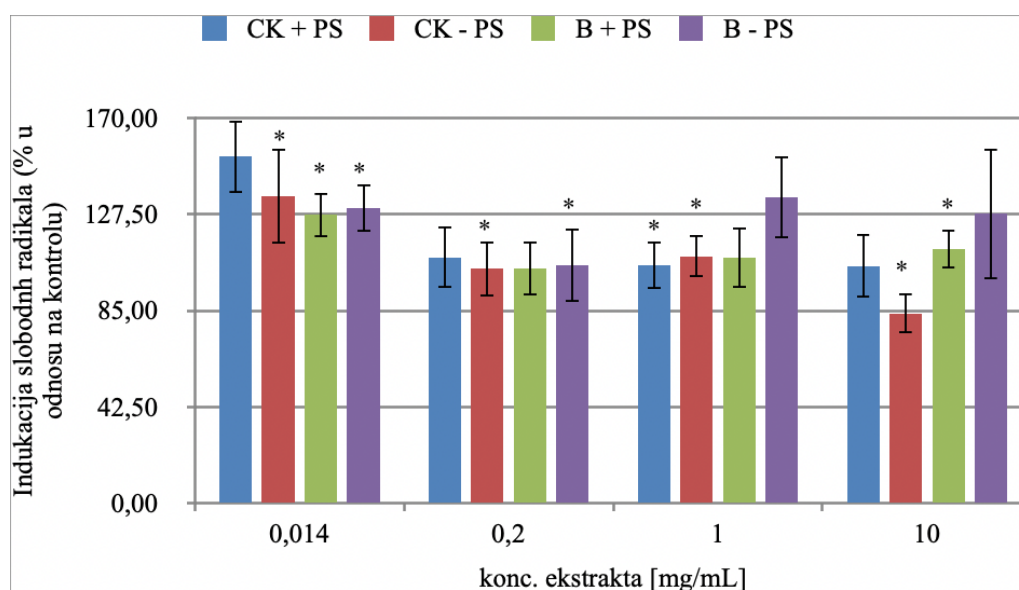
Slika 8. Prikaz postotka preživljenja Hep G2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u trajanju od 2 sata

Rezultati pokazuju ekstrakt kore cikle s polisaharidima koncentracije $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, ekstrakti kore cikle bez polisaharida, kore banane sa i bez polisaharida koncentracije 10 mg mL^{-1} djeluju blago citotoksično, svi ostali ekstrakti ne djeluju citotoksično na staničnu liniju Hep G2.

Do sličnog zaključka došli su Udonkang i sur. (2018) proučavajući utjecaj ekstrakta cikle na različite stanične linije albino štakora. Njihovi rezultati su pokazali da tretman stanica debelog crijeva albino štakora ekstraktom cikle koncentracije 38 mg mL^{-1} ne djeluje citotoksično. Time se može zaključiti da ekstrakti kore cikle sa i bez polisaharida pri niskim i visokim koncentracijama ne djeluje citotoksično na stanične linije.

4.1.2. Antioksidativni učinak određen DCFDA metodom

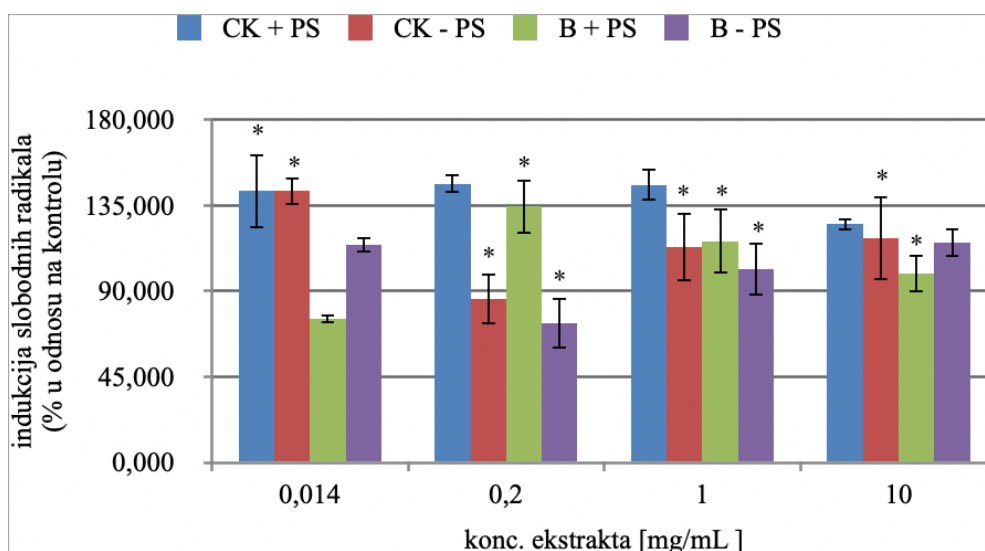
Antioksidativno djelovanje ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama $0,014$, $0,2$, 1 i 10 mg mL^{-1} ispitivano je na humanim staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2 korištenjem DCFDA metode, a vrijeme tretmana je bilo 2 sata. Dobivena indukcija slobodnih radikala je korigirana u odnosu na postotak preživljenja stanica koji je prethodno određen *Neutral red* metodom. Rezultati su prikazani grafički slikama 9. – 11.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 9. Prikaz utjecaja ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u različitim koncentracijama na indukciju slobodnih radikala na Caco-2 stanice nakon tretmana od 2 sata

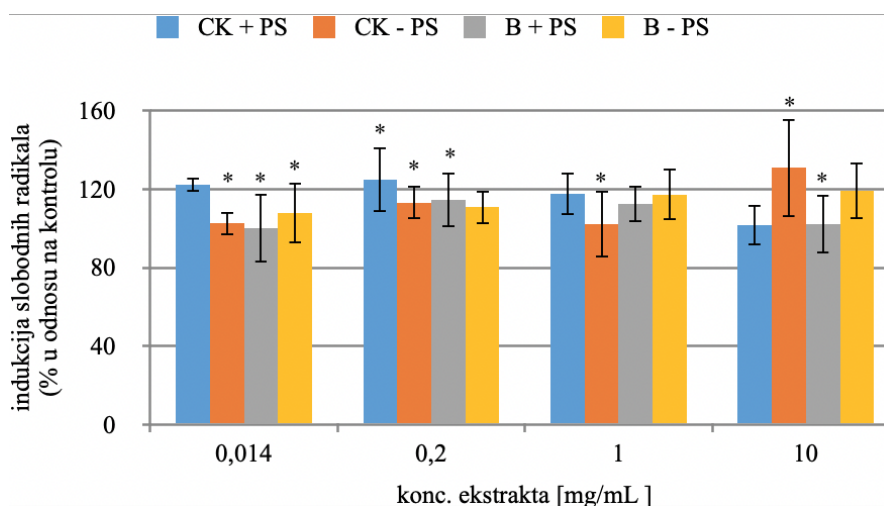
Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti kore cikle sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL⁻¹, s polisaharidima koncentracije 10 mg mL⁻¹, ekstrakti kore banane sa polisaharidima koncentracije 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹ te ekstrakti banane bez polisaharida koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ ne uzrokuju značajnu promjenu u indukciji slobodnih radikala. Ekstrakti kore cikle sa i bez polisaharida koncentracije 0,014 mg mL⁻¹, kore banane sa i bez polisaharida koncentracije 0,014 mg mL⁻¹ te ekstrakti kore banane bez polisaharida koncentracije 1 i 10 mg mL⁻¹ uzrokuju povećanje postotka indukcije slobodnih radikala, dok ekstrakt kore cikle bez polisaharida koncentracije 10 mg mL⁻¹ uzrokuje smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala, na temelju čega se zaključuje da ekstrakti kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u manjim koncentracijama mogu djelovati blago prooksidativno, dok ekstrakt kore cikle bez polisaharida u većoj koncentraciji djeluje antioksidativno.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 10. Prikaz utjecaja ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u različitim koncentracijama na indukciju slobodnih radikala na Cal27 stanice nakon tretmana od 2 sata

Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti kore banane s polisaharidima koncentracije 0,014 mg mL⁻¹, kore banane i cikle bez polisaharida koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ imaju blago prooksidativno djelovanje na staničnu liniju Cal27, dok svi ostali ekstrakti imaju antioksidativno djelovanje.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 11. Prikaz utjecaja ekstrakata kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u različitim koncentracijama na indukciju slobodnih radikala na Hep G2 stanice nakon tretmana od 2 sata

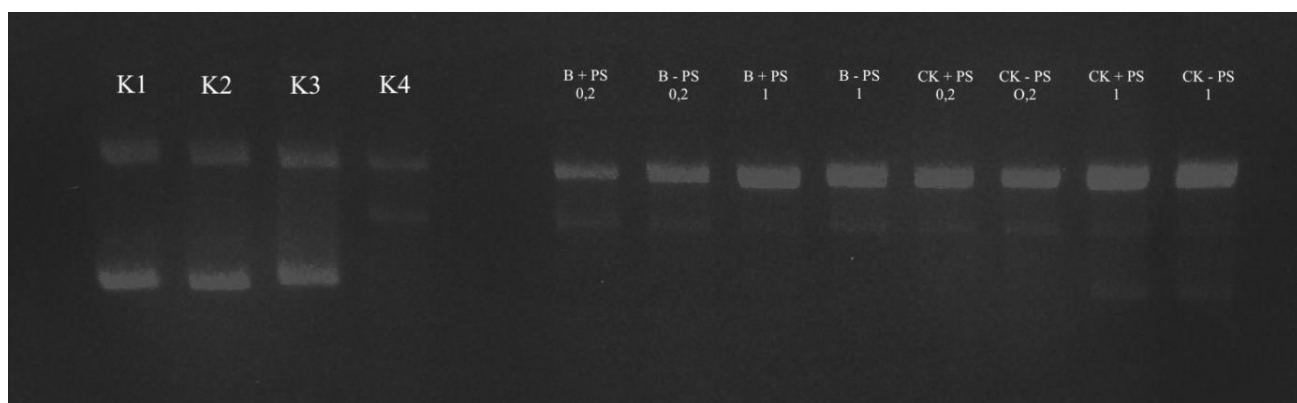
Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u svim koncentracijama imaju blago antioksidativno djelovanje na staničnu liniju Hep G2.

Slične rezultate dobili su Wan i sur. (2015) koji su proučavali utjecaj ekstrakta ljute paprike (*Capsicum annuum*) na staničnu liniju Caco-2. Ekstrakt ljute paprike sadrži flavonoide i fenolne kiseline u sličnom sastavu kao i banana. Rezultati su pokazali da ekstrakt ljute paprike nema utjecaja na indukciju slobodnih radikala Caco-2 pri nižim koncentracijama što se može povezati s utjecajem ekstrakta kore banane sa i bez polisaharida pri nižim koncentracijama.

4.2. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA MODELNOJ DNA I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU

4.2.1. Biološki učinak na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA

Ispitivanje potencijalno protektivnog učinka ekstrakta kore cikle i kore banane na genetički materijal u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL⁻¹ provedeno je tretmanom phiX174 RF1 DNA plazmida, koji je osim ekstraktima, bio izložen hidroksilnim radikalima koji su nastali djelovanjem UV zračenja na vodikov peroksid koji se nalazi u reakcijskoj smjesi koji oštećuju plazmid. Nakon tretmana provedena je elektroforeza u agaroznom gelu. Ukoliko nastupi oštećenje, dolazi do konverzije superzavijenog plazmida u cirkularni oblik koji posljedično u gelu putuje sporije (Zheng i sur., 2014).



K1 – negativna kontrola; K2 – kontrola s H₂O₂; K3 – kontrola s UV zračenjem; K4 – pozitivna kontrola; B + PS – ekstrakti kore banane sa polisaharidima koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹; B – PS – ekstrakti kore banane bez polisaharida koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹; CK + PS – ekstrakti kore cikle sa polisaharidima koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹; CK – PS – ekstrakti kore cikle bez polisaharida koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹

Slika 12. Genotoksični učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na plazmid phiX RF1 DNA

Iz slike 12. je vidljivo da u kontrolama K1, K2 i K3 razmotani plazmid daje relativno slabi signal u odnosu na zavijeni odnosno sami H₂O₂ i samo UV zračenje ne uzrokuju značajno oštećenje DNA no kontrola K4 koja je sadržavala i H₂O₂ i bila zračena imala je znatno jači

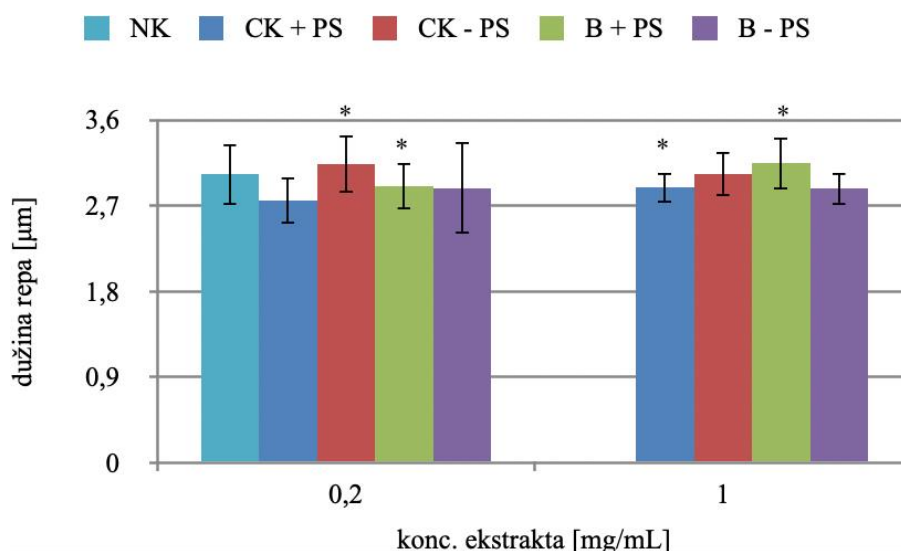
signal u korist razmotanog plazmida. Svi ostali uzorci koji su tretirani ekstraktima kore cikla i kore banane sa i bez polisaharida koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹ sadrže više zavijene DNA, čime se može zaključiti da ekstrakti u određenoj mjeri štite DNA od oštećenja.

Poznato je da fitokemikalije imaju zaštitni učinak na oštećenje DNA jer su brojna istraživanja pokazala da fitokemikalije posjeduju svojstva modificiranja epigenetskih mehanizama te imaju ključnu ulogu u prevenciji raka (Chikara i sur., 2018).

4.2.2. Oštećenje DNA u stanicama Caco-2, Cal27 i Hep G2 određeno komet testom (eng. *comet assay*)

Ispitivanje učinka ekstrakata kore cikla i kore banane u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL⁻¹ na DNA provedeno je na staničnim linijama Caco-2, Cal27 i Hep G2 komet testom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.3. na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Rezultati su prikazani grafički (slika 13 – slika 21) kao ovisnost dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta o koncentracijama ekstrakata kore cikla i kore banane. Zbog značajnog rasipanja dobivenih rezultata, podaci su normalizirani prirodnim logaritmom radi lakše statističke obrade.

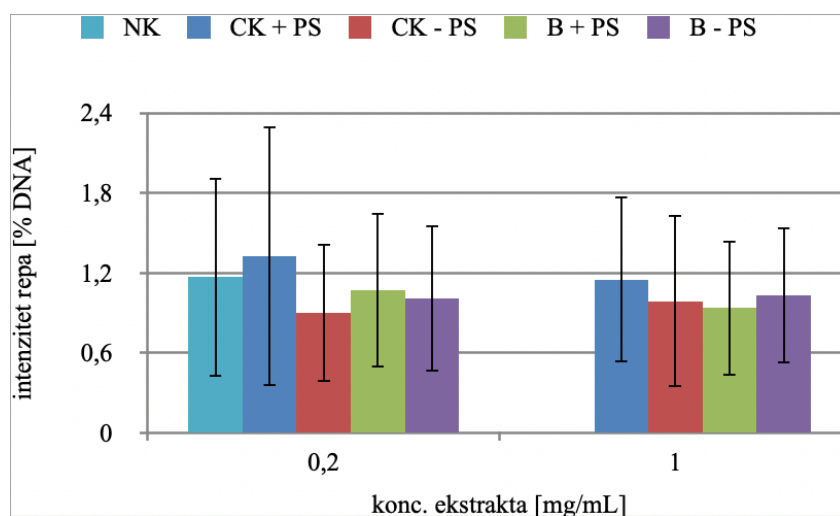
Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći fragmenti DNA te se izražava u μm . Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu. Što je rep kometa dulji i što je intenzitet repa veći, došlo je do većih oštećenja genetičkog materijala stanice.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 13. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu dužine repa DNA u Caco-2 stanicama

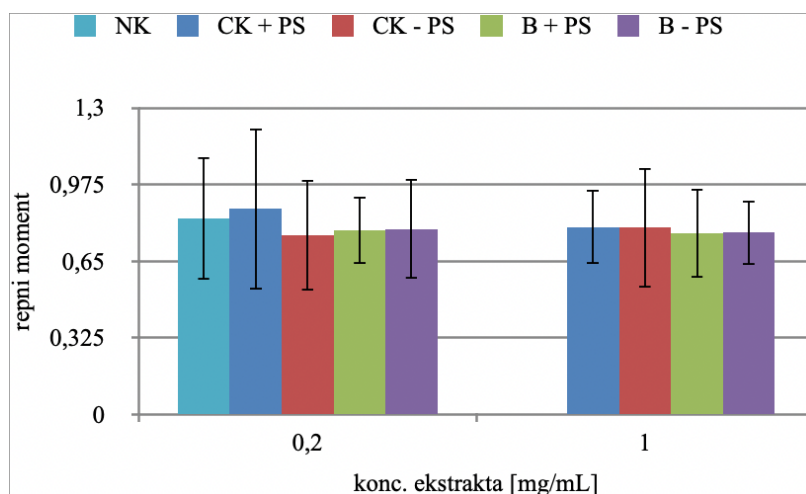
Iz slike 13. vidljivo je da ekstrakti kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama ne izazivaju značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 14. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu intenziteta repa DNA u stanicama Caco-2

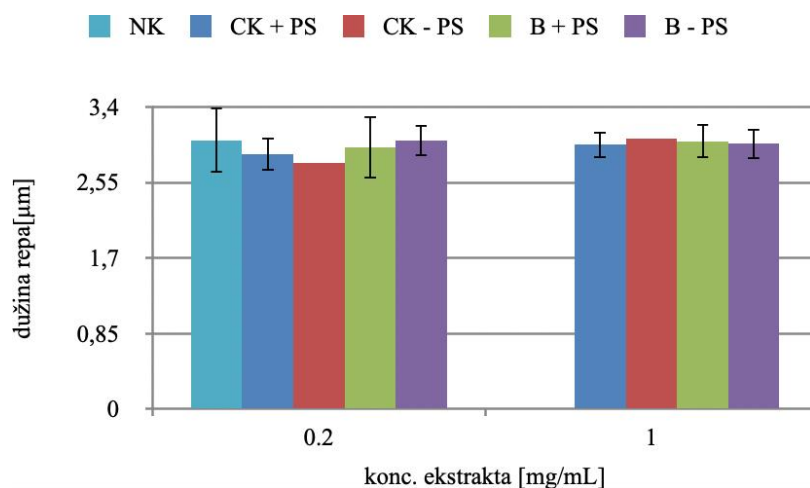
Iz slika 14. vidljivo je da ekstrakt kore cikle s polisaharidima koncentracije $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ uzrokuje povećanje intenziteta repa u odnosu na kontrolu, što znači da uzrokuje blago oštećenje genetičkog materijala stanica Caco-2, dok ostali ekstrakti kore cikle i kore banane imaju vrijednosti sličnima vrijednosti negativne kontrole čime se može zaključiti da nema oštećenja genetičkog materijala stanice Caco-2.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 15. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu repnog momenta DNA stanica Caco-2

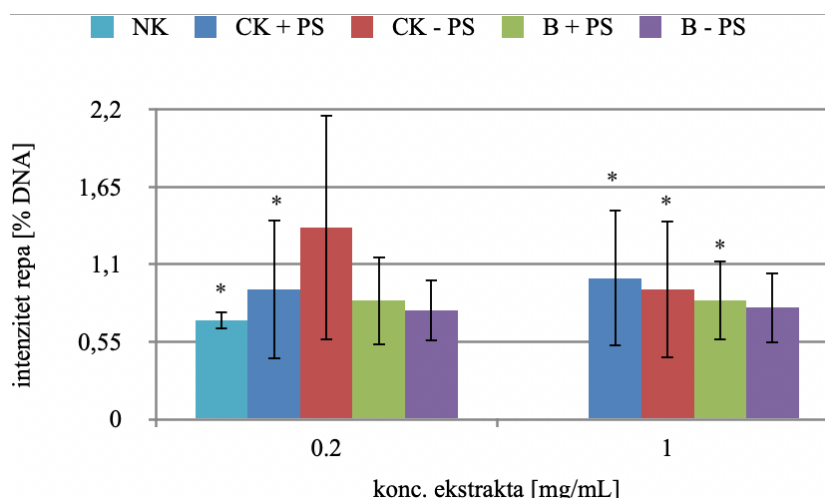
Iz slike 15. može se zaključiti da su vrijednosti repnog momenta u kontroli jednake vrijednostima repnog momenta svih ekstrakata kore cikle i kore banane, osim ekstrakta kore cikle s polisaharidima koncentracije $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ što je u skladu s prethodno dobivenim vrijednostima dužine repa i intenziteta repa jer repni moment predstavlja umnožak dužine repa i % DNA u repu.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 16. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu dužine repa DNA u Cal27 stanicama

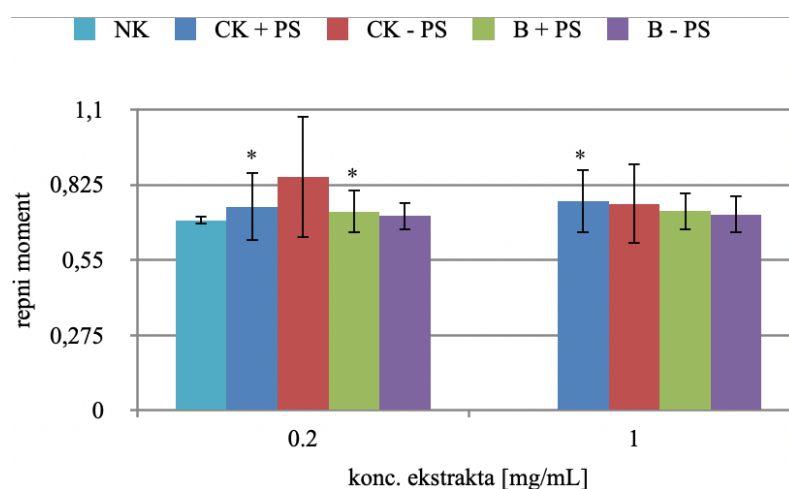
Iz slike 16. vidljivo je da ekstrakti kore cikle i kore banane u svim ispitivanim koncentracijama ne izazivaju značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu, iako svi ekstrakti kore cikle i kore banane utječu na povećanje dužine repa kometa, nema značajne razlike u djelovanju ispitivanih koncentracija.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 17. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu intenziteta repa DNA u stanicama Cal27

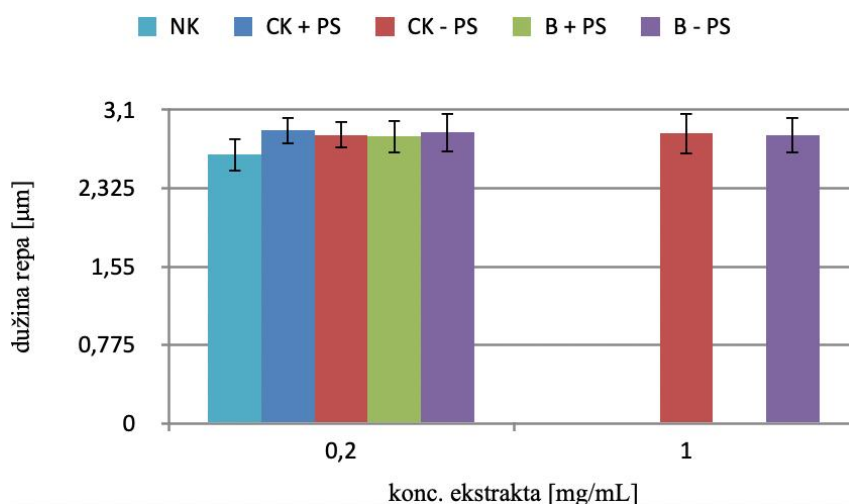
Iz slike 17. vidljivo je da ekstrakti kore cikle i kore banane s polisaharidima u koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹, ekstrakti kore banane bez polisaharida koncentracija 0,2 i 1 mg mL⁻¹ te ekstrakt kore cikle bez polisaharida koncentracije 1 mg mL⁻¹ imaju vrijednosti intenziteta repa sličnima vrijednostima intenziteta repa u negativnoj kontroli, osim ekstrakta kore cikle bez polisaharida koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ koja ima značajno veću vrijednost intenziteta repa na temelju čega se zaključuje da svi ekstrakti kore cikle i kore banane nemaju učinak na genetički materijal stanica Cal27, osim ekstrakta kore cikle koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ koja dovodi do oštećenja.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 18. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu repnog momenta DNA stanica Cal27

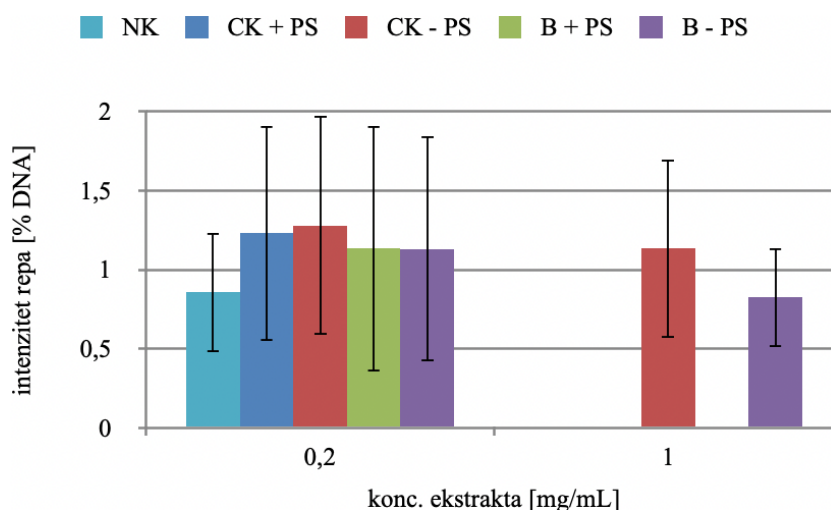
Iz slike 18. vidljivo je da sve vrijednosti repnog momenta u svim ispitivanim uzorcima, osim uzorku tretiranom ekstraktom kore cikle bez polisaharida koncentracije 0,2 mg mL⁻¹, imaju jednake vrijednosti repnog momenta kontrole, što je i u skladu s očekivanjima s obzirom na dobivene vrijednosti dužine repa i promjene intenziteta repa (slika 16 i slika 17)



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikla s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikla bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 19. Učinak ekstrakta kore cikla i kore banane na promjenu dužine repa DNA u Hep G2 stanicama

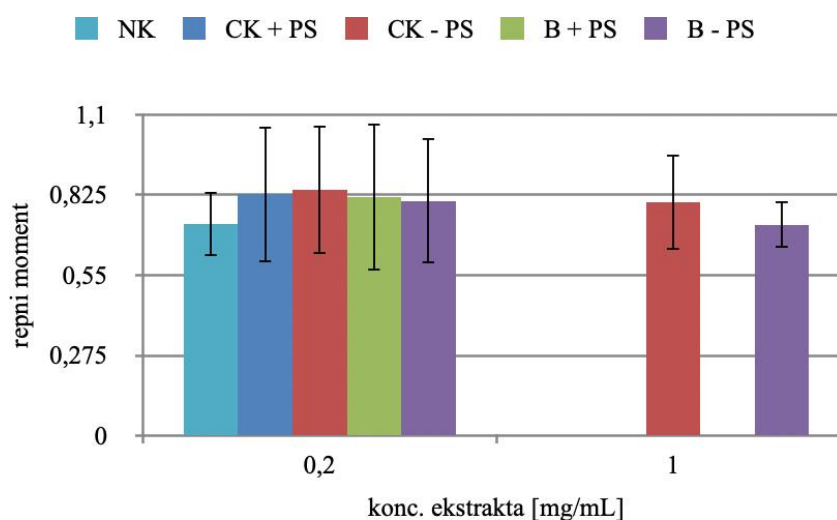
Iz slike 19. vidljivo je da nedostaje podatak o dužini repa kometa za ekstrakt kore cikla i kore banane s polisaharidima koncentracije 1 mg mL⁻¹ zbog dezintegriranog genetičkog materijala. Sve ostale ispitivane koncentracije ekstrakta kore cikla i kore banane dovode do porasta dužine repa kometa u odnosu na kontrolu.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikla s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikla bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 20. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu intenziteta repa DNA u stanicama Hep G2

Iz slike 20. vidljivo je da ekstrakti kore cikle i kore banane u svim ispitivanim koncentracijama uzrokuju povećanje vrijednosti intenziteta repa u odnosu na kontrolu, osim ekstrakta kore banane bez polisaharida koja je slična vrijednosti intenziteta repa negativne kontrole. Može se zaključiti da je DNA migrirala u rep kometa, odnosno došlo je do oštećenja genetičkog materijala.



* - statistička značajna razlika u odnosu na kontrolu; NK – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS – ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 21. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na promjenu repnog momenta DNA stanica Hep G2

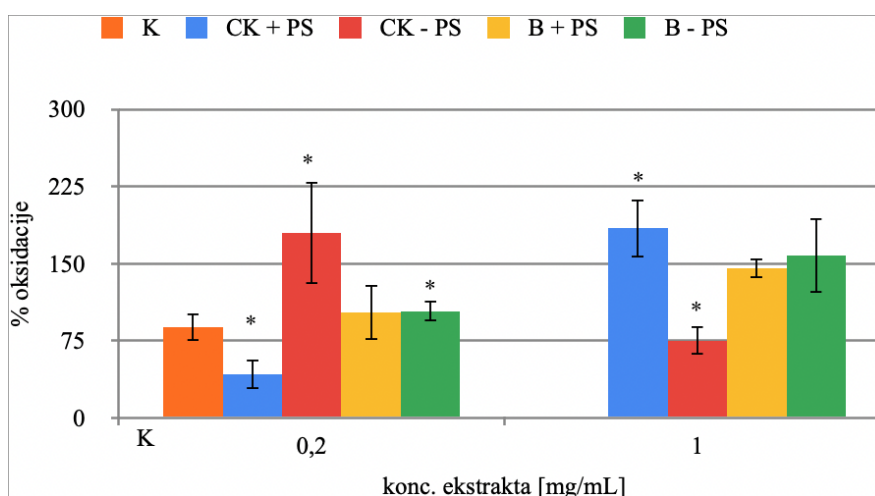
Iz slike 21. vidljivo je da vrijednosti repnog momenta kometa dobivenog tretmanom Hep G2 stanica s ekstraktom kore cikle i kore banane u svim ispitivanim koncentracijama značajne su u odnosu na kontrolu osim ekstrakta kore banane bez polisaharida koncentracije 1 mg mL⁻¹ koja se ne razlikuje značajno u odnosu na kontrolu, što je u skladu s dobivenim vrijednostima za promjenu dužine repa kometa te promjenu intenziteta repa.

Bacanli i sur. (2017) istraživali su utjecaj pojedinih fitokemikalija na oštećenje DNA te su došli do zaključka da flavonoidi koji dominiraju u banani i karotenoidi koji dominiraju u cikli štite stanice sisavaca od oštećenja DNA.

4.3. PROOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA MODELNIM PROTEINIMA

4.3.1. Stupanj oksidacije modelnog proteina albumina iz goveđeg seruma

Postotak oksidacije proteina albumina iz goveđeg seruma određen je metodom koja se temelji na reakciji DNPH s oksidiranim proteinima prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3.1. Rezultati su prikazani kao ovisnost % oksidacije (u odnosu na negativnu kontrolu) o koncentraciji ekstrakta kojom su tretirani uzorci (slika 22).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; K – pozitivna kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS - ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

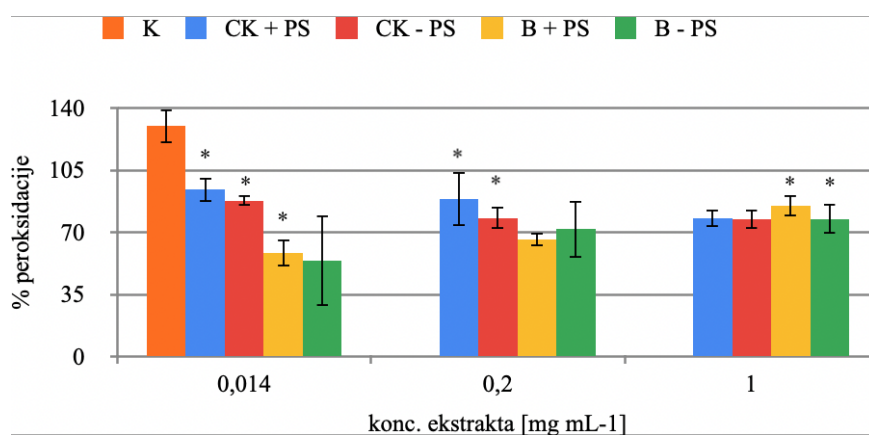
Slika 22. Učinak ekstrakta kore cikle i kore banane na karbonilaciju proteina

Statistički značajnu promjenu u % oksidacije proteina u odnosu na pozitivnu kontrolu pokazuju ekstrakti kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama. Ekstrakt kore cikle s polisaharidima koncentracije 0,2 mg mL⁻¹, kore cikle bez polisaharida koncentracije 1 mg mL⁻¹, kore banane sa i bez polisaharida koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ imaju antioksidativno djelovanje zato što navedeni ekstrakti smanjuju % oksidacije, dok ostali ekstrakti, kore cikle bez polisaharida koncentraciji 0,2 mg mL⁻¹, kore cikle s polisaharidima koncentracije 1 mg mL⁻¹, kore banane sa i bez polisaharida koncentracije 1 mg mL⁻¹ povećavaju % oksidacije, odnosno imaju blago prooksidativno djelovanje.

Poznato je da su polifenoli, kao glavne fitokemikalije cikla i banane, uključeni u brojne mehanizme i da kroz interakcije s drugim staničnim komponentama, poput proteina, sudjeluju u različitim signalnim putevima (Arora i sur., 2019). Gupta i Prakash (2014) proučavali su ulogu polifenola u ljudskom zdravlju i došli su do zaključka da polifenoli mogu spriječiti nastanak različitih vrsta raka, te da imaju važnu ulogu u održavanju snažnog imuniteta.

4.4. PROOKSIDACIJSKI UČINAK EKSTRAKATA KORE CIKLE I KORE BANANE NA MODELNIM LIPIDIMA

Glavni produkt peroksidacije linoleinske kiseline je hidroksialkenal 4-HNE. Ispitivanje oksidativnog oštećenja se provodi određivanjem koncentracije krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije. Postupak je proveden kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1., a rezultati su prikazani kao % peroksidacije lipida u linoleinskoj kiselinu u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta kojim su tretirani uzorci (slika 23).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; K – pozitivna kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikla s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikla bez polisaharida; B + PS - ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

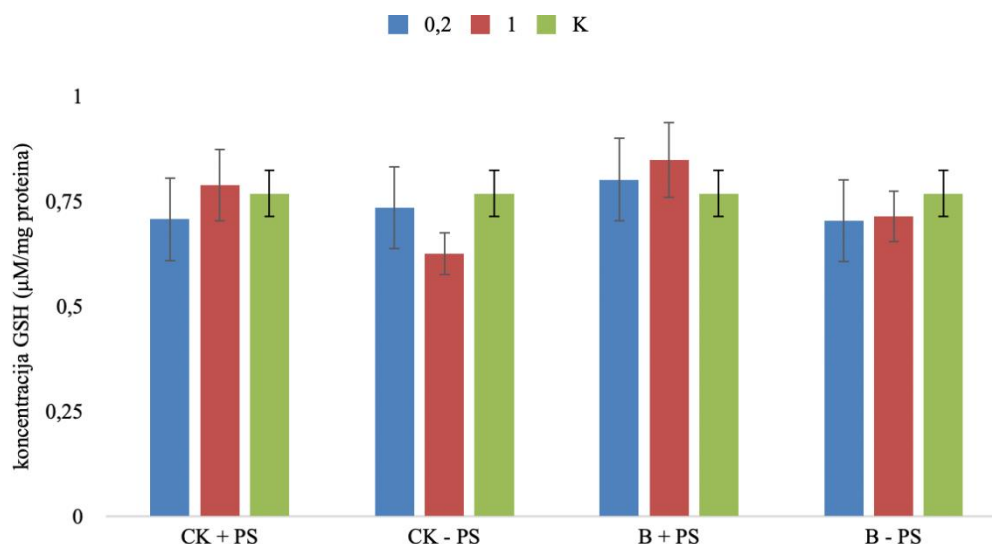
Slika 23. Učinak ekstrakta kore cikla i kore banane na peroksidaciju linoleinske kiseline nakon 50 sati inkubacije

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ekstrakti kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama smanjuju % lipidne peroksidacije, pri čemu se ekstrakt kore banane sa i bez polisaharida koncentracije $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ističe s antioksidativnim djelovanjem.

Guan i sur. (2021) dokazali su učinkovitost flavonoida i karotenoida prevenciji lipidne peroksidacije linoleinske kiseline uzrokovane slobodnim radikalima, a Zhu i sur. (2013) su proučavali promjene na modelu proteina iz goveđeg serumskog albumina (BSA) koje je bilo inkubirano s polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA), te su proučavali utjecaj polifenola (uključujući flavonoide i karotenoide) na PUFA. Došli su do zaključka da su polifenoli učinkoviti u usporavanju lipidne peroksidacije te da imaju izraženu sposobnost u sprječavanju djelovanja slobodnih radikala i modifikacije BSA koje uzrokuje lipidna peroksidacija.

4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUTATIONA NA STANIČNIM LINIJAMA Caco-2, Cal27 i Hep G2 TRETIRANIM EKSTRAKTIMA KORE CIKLE I KORE BANANE

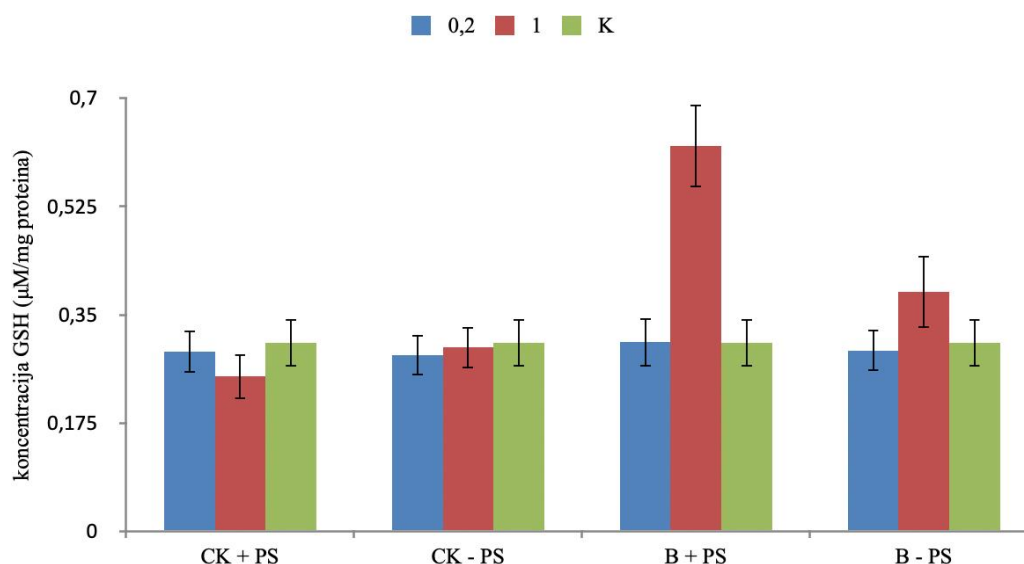
Određivanje koncentracije glutaciona provedeno je na staničnim linijama Caco-2, Cal 27 i Hep G2 tretiranim ekstraktima kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama $0,2$ i 1 mg mL^{-1} opisano je postupkom u poglavlju 3.2.5. Na slikama 24.– 26. su prikazani dobiveni rezultati.



0,2 – koncentracija ekstrakta od 0,2 mg mL⁻¹; 1 – koncentracija ekstrakta od 1 mg mL⁻¹; K – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS - ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 24. Koncentracija ukupnog glutationa u Caco-2 stanicama nakon 2 sata tretmana ekstraktima kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida

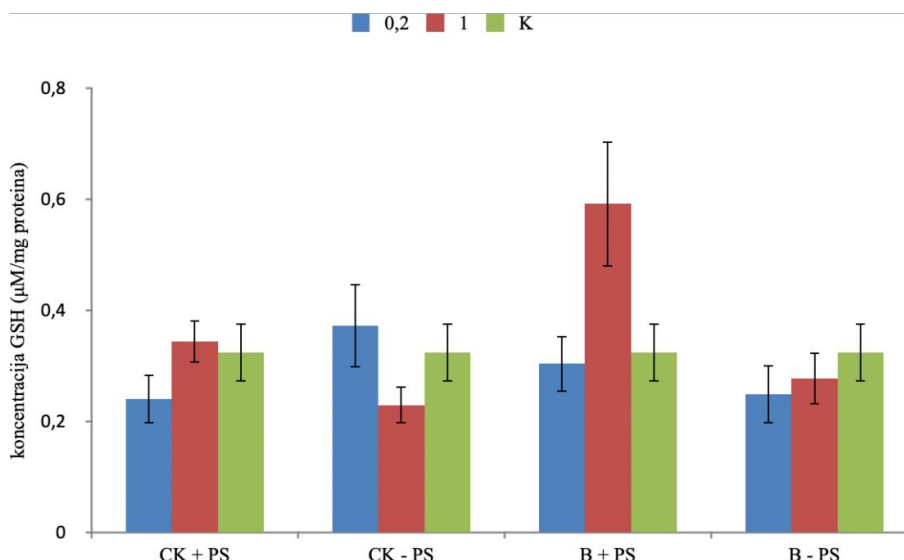
Pri tretmanu Caco-2 stanica ekstraktima kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u vremenu od 2 sata, sve vrijednosti ukupnog glutationa u stanici statistički se značajno razlikuju od kontrolnih vrijednosti. Ekstrakti kore cikle i kore banane sa polisaharidima u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ dovode do najvećeg porasta koncentracije glutationa u stanicama Caco-2, dok ekstrakt kore cikle bez polisaharida u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ dovodi do najmanjeg porasta koncentracije glutationa.



0,2 – koncentracija ekstrakta od 0,2 mg mL⁻¹; 1 – koncentracija ekstrakta od 1 mg mL⁻¹; K – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikle s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikle bez polisaharida; B + PS - ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 25. Koncentracija ukupnog glutationa u Cal27 stanicama nakon 2 sata tretmana ekstraktima kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida.

Pri tretmanu Cal27 stanica ekstraktima kore cikle i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama od 0,2 i 1 mg mL⁻¹ u vremenu od 2 sata, svi ekstrakti su doveli do proizvodnje približno slične koncentracije glutationa u stanicama, dok je ekstrakt kore banane koncentracije 1 mg mL⁻¹ doveo do izrazitog porasta razine glutationa u stanici u odnosu na sve ostale vrijednosti.



0,2 – koncentracija ekstrakta od 0,2 mg mL⁻¹; 1 – koncentracija ekstrakta od 1 mg mL⁻¹; K – kontrola; CK + PS – ekstrakt kore cikla s polisaharidima; CK – PS – ekstrakt kore cikla bez polisaharida; B + PS - ekstrakt kore banane s polisaharidima; B – PS – ekstrakt kore banane bez polisaharida

Slika 26. Koncentracija ukupnog glutationa u Hep G2 stanicama nakon 2 sata tretmana ekstraktima kore cikla i kore banane sa i bez polisaharida

Pri tretmanu Hep G2 stanica ekstraktima kore cikla i kore banane sa i bez polisaharida u koncentracijama od 0,2 i 1 mg mL⁻¹ u vremenu od 2 sata, svi ekstrakti su doveli do proizvodnje približno slične koncentracije glutationa u stanicama, dok je ekstrakt kore banane u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ doveo do izrazitog porasta razine glutationa u stanici u odnosu na sve ostale vrijednosti.

Prijašnja istraživanja dokazuju da glutation ima ključnu ulogu u različitim fiziološkim procesima, poput održavanja redoks ravnoteže, smanjenje oksidativnog stresa, poboljšanje metaboličke detoksikacije i regulacije funkcije imunološkog sustava. S toga mnoga istraživanja sugeriraju da hrana bogata fitokemikalijama ima važne učinke na povećanje koncentracije glutationa u organizmu (Minich i Brown, 2019).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakt kore banane bez polisaharida u koncentraciji 10 mg mL^{-1} djeluje citotoksično na stanične linije Caco-2, Cal27 i Hep G2, dok ostali ekstrakti kore cikle i kore banane s polisaharidima djeluju proliferativno čime se zaključuje da polisaharidi imaju zaštitno djelovanje na stanice te ekstrakti kore cikle i kore banane pri nižim koncentracijama imaju antioksidativno djelovanje dok pri višim koncentracijama imaju blago prooksidativno djelovanje na stanične linije pri čemu se zaključuje da polisaharidi nemaju važnu ulogu u antioksidativnom djelovanju na stanice.
2. Ni jedan ekstrakt ne pokazuje antioksidacijsko djelovanje na modelnoj DNA
3. Ekstrakti kore cikle i kore banane s polisaharidima u koncentracijama $0,2$ i 1 mg mL^{-1} povećavaju koncentraciju glutaciona u stanicama u odnosu na ekstrakte kore cike i kore banane bez polisaharida, čime se zaključuje da ekstrakti s polisaharidima dovode do indukcije glutaciona.
4. Ekstrakti kore cikle i kore banane bez obzira na prisutnosti polisaharida smanjuju stupanj lipidne peroksidacije u svim ispitivanim koncentracijama.

6. LITERATURA

Al-Ishaq, R. K., Overy, A. J., Büsselberg, D. (2020) Phytochemicals and Gastrointestinal Cancer: Cellular Mechanisms and Effects to Change Cancer Progression. *Biomolecules* **10**, 105-135.

Anonymous 1 (2019) What are the benefits of beetroot?, <<http://www.medicalnewstoday.com/asrticles/277432>>. Pristupljeno 12. travnja 2021.

Arora, I., Sharma, M., Tollefsbol, T. O. (2019) Combinatorial Epigenetics Impacts of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4567-4579.

Babarykin, D., Smirnova, G., Pundinsh, I., Vasiljeva, S., Krumina, G., Agejchenko, V. (2019) Red Beet (*Beta vulgaris*) Impact on Human Health. *J. Biosci.* **7**, 61-79.

Bacanli, M., Aydin, S., Başaran, A. A., Başaran, N. (2017) Are all phytochemicals useful in the preventing of DNA damage? *Food Chem. Toxicol.* **109**, 210-217.

Basu, A. K. (2018) DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 970-978.

Boon, C. S., McClements, J., Weiss, J., Decker, E. A. (2010) Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit .Rec. Food Sci. Nutr.* **6**, 515-532.

Bouayed, J., Bohn, T. (2010) Exogenous Antioxidants- Double-edged Swords in Cellular Redox State. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 228-237.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Ceclu, L., Nistor, O.V. (2020) Red Beetroot: Composition and Health Effects - A Review. *J. Nutri. Med. Diet. Care.* **6**, 11-19.

Chatterjee, N., Walker, G. (2017) Mechanisms of DNA Damage, Repair and Mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **58**, 235-263.

Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., Singhal, S. S. (2018) Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett.* **413**, 122-134.

Choi, J. M., Oh, S. J., Lee, S. Y., Im, J. H., Oh, J. M., Ryu, C. S., Kwak, H. C., Lee, J. Y., Kang, K. W. Kim, S. K. (2015) Hep G2 cells as an in vitro model for evaluation cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 691-704.

Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C. (2005) Discrepancies in the determination of concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* **63**, 992-1003.

Clifford, T., Howatson, G., West, D. J., Stevenson, E. J. (2015) The Potential Benefits of Red Beetroot Supplementation in Health and Disease. *Nutrients* **4**, 2801-2822.

Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* **26**, 249-261.

de Souza, P. M., de Oliveira Magalhães, P. (2010) Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 850-861.

di Meo, S., Venditti, P. (2020) Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **20**, 176-186.

Dillard, C. J., German, J. B. (2000) Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1744-1756.

Elayabalan, S., Subramaniam, S., Shobhana, V. G., Ashokkumar, K. (2017) An Overview on Phytochemical Composition of Banana (*Musa* spp.). *J. Nat. Sci. Res.* **42**, 12 408-12 419.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., Decker, E. A. (2008) Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 430-441.

Encyclopedia Britannica (2020) Entertainment & Pop Culture - Food - Pea, <<http://www.britannica.com/plant/food>>. Pristupljeno 12. travnja 2021.

Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A. (2008) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 1-12.

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., Tomás-Barberán, F. A. (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* **2**, 514-528.

Fu, Y., Shi, J., Xie, S. Y., Zhang, T. Y., Soladoye, O. P., Aluko, R. E. (2020) Red Beetroot Betalains: Perspectives on Extraction, Processing, and Potential Health Benefits. *J. Agr. Food Chem.* **42**, 68-82.

Guan, R., Van Le, Q., Yang, H., Zhang, D., Gu, H., Yang, Y., Sonne, C., Lam, S. S., Zhong, J., Jianguang, Z., Liu, R., Peng, W. (2021) A review of dietary phytochemicals and their relation to oxidative stress and human diseases. *Chemosphere* **271**, 129-141.

Gupta, C., Prakash, D. (2014) Phytonutrients as therapeutic agents. *J. Complement. Integr. Med.* **11**, 151-169.

Hassan, H. F., Hassan, U. F., Usher, O. A., Ibrahim, A. B., Tabe, N. N. (2018) Exploring the Potentials of Banana (*Musa Sapientum*) Peels in Feed Formulation. *Int. J. Adv. Chem.* **5**, 10-14.

Hawkins, C. L., Davies, M. J. (2019) Detection, Identification and Quantification of Oxidative Protein Modifications. *J. Biol. Chem.* **294**, 83-108.

Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., Janda, K. (2020) Reactive Oxygen Species - Sources, Functions, Oxidative Damage. *Pol. Merkur. Lekarski* **22**, 124-127.

- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. (2001) Betalains- A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178-5185.
- Kaumpawat, K., Deb, S., Ray., S., Chatterjee, A. (2003) Genotoxic effect of raw betel-nut extract in relation to endogenous glutathione levels and its mechanism of action in mammalian cells. *Mutat. Res.* **538**, 1-12.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S., T., Meng Lim, S. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colors pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **61**, 79-100.
- Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., Biró, C. (2006) Oxidative Stress and Electron Spin Resonance. *Clin. Chim.* **364**, 61-66.
- Kujala, T. S., Vienola, M. S., Klika, K. D., Loponen, J. M., Pihlaja, K. (2002) Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 505-510.
- Kumar, Y. (2015) Beetroot: A Super Food. *J. Technol. Eng. Stud.* **3**, 20-26.
- Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., Proestos, C. (2018) Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. *Methods. Mol. Biol.* **18**, 57-71.
- Lea, T. (2005) Caco-2 Cell Line. U: The Impact of Food Bioactives on Health (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., ured.) Springer Publishing, New York, str. 103-111.
- Leonov, A., Arlia-Ciommo, A., Piano, A., Svistkova, V., Lutchman, V., Medkour, Y., Titorenko, V. I. (2015) Longevity extension by phytochemicals. *Molecules* **4**, 6544-6572.
- Li, Q., Niu, Y., Xing P., Wang, C. (2018) Bioactive Polysaccharides from Natura Resources Including Chinese Medicinal Herbs on Tissue Repair. *Chin. Med.* **13**, 35-42.

- Liu, J. Willför, S., Xu, C. (2015) A Review of Bioactive Plant Polysaccharides: Biological Activities, Functionalization, and Biomedical Applications. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **5**, 31-61.
- Lombardelli, C., Benucci, I., Mazzocchi, C., Esti, M. (2021) Betalain Extracts from Beetroot as Food Colorants: Effect of Temperature and UV-Light on Stability. *Plant Foods Hum. Nutr.* **76**, 122-135.
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoaie, A. C., Trifan, A. (2019) Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit. Rev. Food* **60**, 626-659.
- Madadi, E., Mazloun-Ravasan, S., Sik Yu, J., Won Ha, J., Hamishekhar, H., Hyun Kim, K. (2020) Therapeutic Application of Betalains: A Review. *Plants* **9**, 1219-1228.
- Maraldi, T., Vauzour, D., Angeloni C. (2014) Dietary Polyphenols and Their Effects on Cell Biochemistry and Pathophysiology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **5**, 63-69.
- Minich, D. M., Brown, B. I. (2019) A Review of Dietary Phytonutrients for Glutathione Support. *Nutrients* **11**, 2073-2085.
- Moran, N. E., Mohn, E. S., Hason, N., Erdman, J. W., Johnson, E. J. (2018) Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Absorption, Metabolism, and Health Effects of Dietary Carotenoids. *Adv. Nutr.* **9**, 465-492.
- Moreno-Ley, C. M., Osorio-Revilla, G., Hernández-Martínez, D. M., Ramos-monroy, O. A., Gallardo-Velázquez, T. (2021) Anti-inflammatory activity of betalains: A comprehensive review. *Nutr. Metab.* **25**, 126-133.
- Murphy, M., Elijor, K., Heuertz, R. M., Weiss, E. (2012) Whole beetroot consumption acutely improves running performance. *J. Acad. Nutr. Diet.* **112**, 548-552.
- Nade, V. S., Kawale, L. A., Zambre, S. S., Kapure, A. B. (2015) Neuroprotective Potential of *Beta vulgaris* L. in Parkinsons Disease. *Curr. Genom.* **15**, 11-17.

Nikan, M., Manayi, A. (2019) Beta vulgaris L. U: Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements (Nabavi, S. M. i Sanches Silva, A., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 153-158.

Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., Terao, J. (2011) Dietary Flavonoids as Cancer-protective and Therapeutic Biofactors. *Front. Biosci.* **4**, 1332-1362.

Pérez-Hernández, J. B., Remy, S., Swennen, R., Sagi, L. (2006) Banana (*Musa* sp.). *Meth. Mol. Biol.* **344**, 167-175.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication on Various Diseases. *Ind. J. Clin. Biochem.* **30**, 11-26.

Presley, T. D., Morgan, A. R., Bechtold, E., Clodfelter, W., Dove, R. W., Jennings, J. M., Kraft, R. A., King, S. B., Laurienti, P. J., Rejeski, W. J. (2011) Acute Effect of a High Nitrate Diet on Brain Perfusion in Older Adults. *Nitric. Oxide* **24**, 32-42.

Pua, E. C. (2007) Banana. U: Biotechnology in Agriculture and Forestry (Pua, E. C. i Davey, M. R., ured.), Springer, New York City, str. 3-34.

Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira-Wilson, C. D. N. A. (2011) Damage Protection and Induction of Repair by Dietary Phytochemicals and Cancer Prevention: What Do We Know? U: Selected Topics in DNA Repair (Chen, C., ured.), IntechOpen, London, str. 237-270.

Rana, G. K., Singh, Y., Mishra, S. P., Rahangdale, H. K. (2018) Potential Use of Banana and Its By-products: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **7**, 1827-1832.

Rasines-Perea, Z., Teissedre, P. L. (2017) Grape Polyphenols Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules* **22**, 68-87.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125-1131.

Riahi, Y., Cohen, G., Shamni, O., Sasson, S. (2010) Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **6**, 879-886.

Salamatullah, A. M., Hayat, K., Alkaltham, M. S., Ahmed, M. A., Arzoo, S., Husain, F. M., Al-Dossari, A. M., Shamlan, G., Al-Harbi, L. N. (2021) Bioactive and Antimicrobial Properties of Over-Dried Beetroot (Pulp and Peel) Using Different Solvents. *Processes.* **9**, 588-599.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.

Scheibmeir, H., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R., Pierce, J. D. (2005) A Review of Free Radicals and Antioxidants for Critical Care Nurses. *Crit. Care Nurs.* **21**, 24-28.

Schepetkin, I. A., Quinn, M. T. (2006) Botanical Polysachharides: Macrophage Immunomodulation and Therapeutic Potential. *Immunopharmacol* **6**, 317-333.

Sevanian, A., Ursini, F. (2000) Lipid Peroxidation in Membranes and Low-Density Lipoproteins: Similarities and Differences. *Free. Radic. Biol. Med.* **29**, 306-311.

Sidhu, J. S., Zafar, T. A. (2018) Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Qual. Saf.* **2**, 183-188.

Sigurdson, G. T., Tang, P., Giusti, M. M. (2017) Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **28**, 261-280.

Soglia, F., Petracchi, M., Ertbjerg, P. (2016) Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. *Food Chem.* **197**, 670-675.

Stadtman, E. R., Berlett, B. S. (1998) Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease. *Drug Metab. Rev.* **30**, 225-243.

Suzuki, Y. J., Carini, M., Butterfield, D. A. (2010) Protein Carbonylation. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 323-325.

Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **12**, 1231-1246.

Uddin, S., Ahmad, S. (1995) Antioxidants Protection Against Cancer and Other Human Diseases. *Compr. Ther.* **21**, 41-45.

Udonkang, M. I., Inyang, I. J., Ukorebi, A. N., Effiong, F., Akpan, U., Bassey, I. E. (2018) Spectrophotometry, Psyciochemical Properties, and Histological Staining Potential of Aqueous and Ethanol Extracts of Beetroot on Various Tissues of an Albino Rat. *Biomed. Hub.* **3**, 1-10.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009) 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **27**, 120-139.

van Breemen, R. B., Li, Y. (2005) Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1**, 175-185.

Wan, H., Liu, D., Yu, X., Sun, H., Li, Y. (2015) A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. *Food Chem.* **175**, 601-608.

Whelan, J. (2013) Linoleic Acid. *Adv. Nutr.* **4**, 311-312.

Wu, J., Li, L., Wang, Y., Ren, X., Lin, K., He, Y. (2019) The HSP90/Akt pathway may mediate arthemether-induced apoptosis of Cal27 cells. *FEBS. Open. Bio.* **9**, 1726-1733.

Xu, G., Hao, C., Zhang, L., Sun, R. (2018) The Interaction between BSA and DOTAP at the Air-Buffer Interface. *Sci. Rep.* **8**, 407-417.

Zeng, P., Li, J., Chen, Y., Zhang, L. (2019) The Structure and Biological Functions of Polysaccharides From Traditional Chinese Herbs. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **163**, 423-444.

Zheng, G., Fu, Y., He, C. (2014) Nucleic Acid Oxidation in DNA Damage Repair and Epigenetics. *Chem. Rev.* **114**, 4602-4620.

Zhu, Q., Qian, Y., Zheng, Z. P., Lo, C., Chen, F., Wang, M. (2013) Natural polyphenols alleviated lipid peroxidation-induced modification on BSA. *J. Funct. Foods* **5**, 355-361.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A. Komljenović

Anamaria Komljenović