

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Martina Bagović

6399/BT

Učinak kanolola iz repičinog ulja na kulture stanica
ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: Doc.dr.sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Učinak kanolola iz repičinog ulja na kulture stanica

Martina Bagović 6399/BT

Sažetak: 4-vinil-2,6-dimetoksifenol ili kanolol je polifenolni spoj izoliran iz nerafiniranog repičinog ulja. Prema dosadašnjim studijama kanolol je pokazao izrazita antioksidacijska svojstva, te je dokazano da ima antimutagenu, antikancerogenu i protuupalnu aktivnost. U ovome radu ispitivao se antitumorski utjecaj kanolola *in vitro*, odnosno u kulturi stanica. Kulture stanica se često koriste za ispitivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva, kao i citotoksičnosti istih. Korištene su dvije humane stanične linije, tumorska (HeLa) i stanična linija izvedena iz zdravih stanica (HEK293T). Obje linije su bile izložene različitim koncentracijama kanolola tijekom 72 sata kako bi se potvrdila njegova antitumorska aktivnost i odredile EC_{50} vrijednosti spoja. Učinak kanolola na HeLa i HEK293T stanice određen je primjenom kolorimetrijske Neutral Red metode, te vizualiziran bojanjem bojom kristal-ljubičasto. Citotoksičan učinak kanolola zapažen je na obje stanične linije pri koncentracijama $>50\mu\text{M}$, proporcionalan je povećanju koncentracije kanolola, a izračunate EC_{50} vrijednosti iznose $268,431\ \mu\text{M}$ za HEK293T stanice te $333,569\ \mu\text{M}$ za HeLa stanice.

Ključne riječi: kanolol, repičino ulje, antitumorski aktivnost, kulture stanica

Rad sadrži: 24 stranice, 7 slika, 1 tablicu, 19 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Kristina Radošević

Rad predan: 4.srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

THE EFFECT OF CANOLOL FROM RAPESEED OIL ON THE CELL CULTURE

Martina Bagović, 6399/BT

Abstract: 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol or canolol is a phenolic compound extracted from crude rapeseed oil. The latest studies show that canolol has strong antioxidative effect, as well as antimutagenic, anticancerogenic and anti-inflammatory activity. The goal of this final thesis was to determine antitumor activity of canolol *in vitro*, by using cell culture. Cell culture is a frequently used method in the examination of biological active natural compounds, as well as their cytotoxicity. Two human cell lines were used, tumor cell line (HeLa) and normal one conducted from healthy cells (HEK293T). Both of the lines were exposed to different concentrations of canolol in the period of 72 hours in order to prove its antitumor activity and determine its EC₅₀ value. The effect of canolol on HeLa and HEK293T cells was determined by application of colorimetric Neutral Red method, and visualized by colouring with crystal-purple colour. Cytotoxic effect of canolol was noted on both cell lines at concentration >50µM, and it's proportionate to the canolol dose, EC₅₀ values are 268.431 µM for HEK293T cells and 333.569 µM of HeLa cells.

Keywords: canolol, rapeseed oil, antitumor activity, cell culture

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 1 table, 19 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in : Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb, Croatia

Mentor: Ph.D. Kristina Radošević, Assistant professor

Thesis delivered: 4th of July, 2016

Svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević najiskrenije hvala na nesebičnoj pomoći, uloženom trudu i vremenu, srdačnosti, te prenesenom znanju pri izradi ovog rad.

Zahvaljujem se i profesorici dr.sc. Višnji Gaurini Srček te ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija za ugodnu radnu atmosferu i udjeljene savjete.

Ponajviše hvala mojoj obitelji na stalnoj podršci, razumijevanju i svemu što čine za mene.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Primjena kultura stanica.....	3
2.1.1. Parametri uzgoja.....	4
2.1.2. Stanične linije	4
2.2. Kanolol izrepičinog ulja.....	4
2.2.1. Biološki učinci kanolola.....	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. Uzorci.....	8
3.1.2. Kemikalije.....	8
3.1.3. Otopine i puferi.....	9
3.1.4. Humane stanične linije.....	9
3.1.5. Uređaji i oprema.....	10
3.2. METODE.....	10
3.2.1. Priprema otopina kanolola.....	10
3.2.2. Ispitivanje biološke aktivnosti kanolola na HeLa i HEK293T staničnim linijama.....	11
3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	11
3.2.4. Određivanje preživljenja stanica Neutral Red metodom.....	12
3.2.5. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto.....	12
4. REZULTATI.....	13
4.1. Biološka aktivnost kanolola na HeLa i HEK293T staničnim linijama.....	13
4.2. Morfologija HeLa i HEK293T staničnih linija tretiranih kanololom.....	15
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČAK.....	21
7. LITERATURA.....	22

1. UVOD

Brassica napus, poznatija kao uljana repica među najvažnijim je uljaricama u kontinentalnim zeljama, a njeno ulje se nalazi na drugom mjestu svjetske proizvodnje. Repičino ulje ima veliku nutritivnu vrijednost, te obiluje bioaktivnim komponentama, poput tokoferola, fitosterola i polifenola. Nedavno izolirani polifenoli spoj iz sirovog repičinog ulja je 4-vinil-2,6-dimetoksifenol, tj. kanolol. Od njegovog otkrića 2000. g. intenzivno se izučava, budući je pokazao izrazit antioksidativni učinak, puno veći nego dosada poznatih antioksidansa (vitamin C, α -tokoferol, β -karoten). Također je dokazana njegova antimutagena, antikancerogena i antiupalna aktivnost.

Kako su karcinomi vrlo visoko na listi uzroka smrtnosti ljudi širom svijeta te činjenice da se prirodni spojevi s antitumorskim potencijalom istražuju s ciljem razvoja novih antitumorskih lijekova, antitumorska aktivnost kanolola i nadalje se ispituje. Za tu svrhu se među ostalim koriste *in vitro* testovi citotoksičnosti na kulturi stanica, kao alternativa *in vivo* testovima na životinjama. Korištenjem kulture stanica dobivaju se rezultati visokog stupnja standardizacije i reproducibilnosti. Da bi rezultati ispitivanja novih potencijalnih lijekova iz prirodnih izvora bili što potpuniji trebali bi se primjenjivati primarni *in vitro* testovi, kako sugerira NCI (*Nacional Cancer Institute*).

Cilj ovoga rada bio je odrediti učinak kanolola u različitim koncentracijama na tumorskoj humanoj staničnoj linij (HeLa) i normalnoj humanoj staničnoj linij (HEK293T) uz pretpostavku da će biti pokazan jači citotoksičan učinak na tumorske stanice u odnosu na normalne stanice, čime bi se potvrdila njegova antitumorska aktivnost i ukazalo na mogućnost njegove primjene.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Primjena kultura stanica

Tehnologija kulture stanica podrazumjeva uzgoj prokariotskih, eukariotskih i biljnih stanica u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Najčešće se pod kulturom stanica podrazumijeva uzgoj životinjskih stanica (Anonymous 1, 2016). Začeci tehnologije kulture stanica sežu u 1880.g. kada je Roux održavao pileće embrije u otopini soli, te 1890.g. kada je Harrison uzgajao stanice živaca embrija žabe.

Kulture stanica potječu iz pojedinačnih stanica koje su izolirane iz organa i/ili tkiva raznih organizama i pri takvom prvom uspostavljanju kulture *in vitro* govorimo o primarnoj kulturi stanica. Kada stanice potroše sve hranjive tvari nužne za rast, stanice se pasažiraju u svježi hranjivi medij čime dobivamo sekundarnu kulturu, koja ima ograničeni životni vijek. Rezultat daljnjeg precjepljivanja su stanične linije koje imaju neograničeni životni vijek *in vivo*, ali su i genetički nestabilne.

Danas kulture životinjski stanica imaju široku primjenu. U biotehnologiji se koriste kao proizvodne stanične linije za dobivanje korisnih proizvoda kao što su rekombinatni proteini, monoklonska protutijela i cjepiva. Osim toga koriste se za temeljna i primjenjena znanstvena istraživanja u područjima proteomike, genetičkog i tkivnog inženjerstva. Koriste kao modelni sistemi u staničnoj i molekularnoj biologiji, za proučavanje normalne fiziologije i biokemije stanica, gdje se ujedno proučavaju interakcije stanica-stanica te u području imunologije. Vrlo važnu ulogu imaju i u farmakologiji za ispitivanje djelovanja lijekova i metaboliziranje istih, kao i u toksikologiji za ispitivanje citotoksičnosti. Primjena kultura stanica se potiče kao djelomična zamjena za *in vivo* testiranja toksičnosti i ispitivanja biološke aktivnosti prirodnih i sintetskih spojeva. Prednost takvih *in vitro* testova je njihova visoka razina standardizacije, smanjenje varijabilnosti između eksperimenata, manja količina potencijalno toksičnog otpada, i možda najvažnije, smanjenje broja potrebnih pokusnih životinja. Nedostaci primjene kultura stanica je nemogućnost određivanja kroničnog učinka, kao i interakcija ispitivane tvari unutar tkiva i organa budući stanice imaju izmjenjena svojstva u odnosu na ishodne *in vivo* stanice. Također se ne mogu definirati farmako-kinetičkih parametri (Kandárová i Letašiová, 2011). Unatoč tome, postiže se zadovoljavajuća korelacija između rezultata dobivenih *in vivo* i *in vitro* testovima. Vrlo je važno sva ispitivanja ponoviti na više različitih staničnih linija primjenom različitih metoda. Korištenjem različitih staničnih linija dobiva se uvid u vrste ciljanih stanica

na koje sama tvar djeluje. Primjenom različitih metoda, osim informacija o bazalnoj toksičnosti ispitivane supstance, dobiva se ideja o mogućem mehanizmu djelovanja iste.

Nacionalni institut za rak (NCI, *Nacional Cancer Institute*) je 1990. predložio primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih komponenata, kako novo sintetiziranih molekula tako i prirodnih spojeva izoliranih ili dobivenih postupkom ekstrakcije. Ispitivana tvar se testira u određenim rasponima koncentracija te se tako ispituje relativan stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju. Cilj ovakvih i drugih *in vitro* testova je otkrivanje potencijalnih antitumorskih lijekova koji kasnije idu na daljnja na *in vivo* istraživanja. U prvih pet godina primjene testa ispitano je više od 30 000 različitih sastojaka (Boyd i Paul, 1995).

2.1.1. Parametri uzgoja stanica

Uvjeti uzgoja različiti su za različite stanične linije, no uvijek se nastoje postići i osigurati uvjeti koji odgovaraju *in vivo* sustavu, odnosno, organizmu iz kojeg su stanice podrijetlom. Stanične linije se mogu uzgajati kao stanice u suspenziji, ili mogu biti stanice adherentnoga tipa koje zahtijevaju čvrstu površinu za rast. Medij za uzgoj stanica mora osigurati sve nutrijente nužne za rast i razvoj stanica, poput aminokiselina, glukoze, lipida, anorganskih soli i vitamina. Osim kemijskih parametara, moraju biti osigurani i odgovarajući fizikalno-kemijski uvjeti poput pH, temperature, osmolarnosti i primjerene atmosfere. Za stanične linije sisavaca standardna temperatura uzgoja je 37 °C, pH u rasponu 7,2-7,5 i osmolarnost u rasponu od 280-320 mOsmo kg⁻¹.

Hranjivom mediju se često dodaje i serum sisavaca (5-10% v/v) koji je bogat različitim proteinima. Tako serum životinjskog podrijetla predstavlja važan izvor faktora rasta, hormona, faktora širenja stanica i faktora prihvaćanja na čvrstu podlogu, inhibitore proteaza i drugih specifičnih tvari.

Od velike je važnosti prilikom uzgoja kultura životinjskih stanica održavati aseptične uvjete rada, kako nebi došlo do kontaminacija. Iz tog razloga se i u medij za uzgoj često dodaju smjesa antibiotika i antimikotika. Nacjepljivanje, pasažiranje, dodavanje uzoraka i sav drugi rad s kulturama stanica provode se u komori za sterilan rad ili tzv. laminaru. U laminaru prije početka rada gori UV-lampa, površina se prebriše 70%-tnim etanolom, a sav laboratorijski

pribor koji se pri tome koristi prethodno se sterilizira. Također, prilikom manipulacije s kulturama stanica i osoba koja radi mora oprati, te dezinficirati ruke.

2.1.2. Stanične linije

Stanične linije korištene u ovome radu nabavljene su iz jedne od najvećih kolekcija kultura stanica *American Type Cell Culture* (ATCC). Korištene su dvije stanične linije HeLa i HEK293T.

Stanična linija HeLa je prva humana tumorska stanična linija uspješno kultivirana u laboratoriju 1952.g. Potječe od pacijentice, po kojoj i dobiva ime, Henriette Lacks kojoj je bio dijagnosticiran rak vrata maternice. To je najčešće korištena stanična linija pošto, iako je tumorska, posjeduje osnovne značajke normalnih stanica, eksprimira i regulira gene, proizvodi proteine, osjetljiva je na infekcije. Uz to, umnažanje HeLa stanica je relativno brzo, jeftino i jednostavno. Korištena je kao modelni sustav za razumijevanje temeljnih bioloških procesa (Anonymous 2., 2016), te također za niz značajnih otkrića u područjima biotehnologije i biomedicine, uključujući istraživanja tumora, AIDS-a te razvoj cjepiva protiv dječje paralize.

Stanična linija HEK293T dobivena je iz bubrega humanog embrija, potječe iz zdravog, abortivnog fetusa. Jednostavne su za uzgoj i transfekciju, te se zato HEK293T stanice često koriste u biološkim istraživanjima. Ime su dobile po 293. pokusu Franka Grahma (Anonymous 3, 2016).

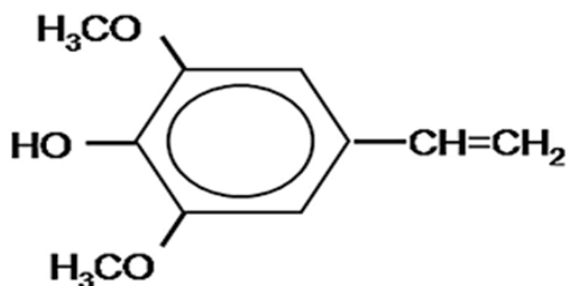
Obje stanične linije su morfološki epitelne stanice i spadaju u skupinu adherentnih stanica. Uvjeti uzgoja su jednaki. Optimalna temperatura iznosi 37 °C, atmosfera mora sadržavati 95% zraka i 5% CO₂. Medij za rast je DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) uz dodatak 10% (v/v) FBS (*Foetal Bovine Serum*).

2.2. Kanolol iz repičinog ulja

Kanolol ili 4-vinilsiringol (slika 1) je fenolni spoje ekstrahiran iz nerafiniranog ulja uljane repice. Sama biljka uljane repice (*Brassica napus*) zauzima drugo mjesto u svjetskoj proizvodnji i najvažnija je uljarica u kontinentalnim područjima. Njeno ulje sadrži najviše fenolnih spojeva od svih drugih uljarica (Nowak i sur., 1992). Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji se nalaze u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Imaju veliki

utjecaj na ljudsko zdravlje zbog svojeg antioksidativnog učinka. Uz to, pripisuje im se antialergeni, antimikrobni, protuupalni, kardioprotektivni i vazodilatatorni učinak (Balasundrum i sur., 2006). Primjenjuju se i u prehrambenoj industriji, budući doprinose senzorskim svojstvima hrane (gorčina, boja, okus).

Kanolol je derivat sinapinske kiseline i nastaje njenom dekarboksilacijom koja se odvija prilikom prešanja repičinog ulja pri visom tlaku i temperaturi (Kuwahra i sur., 2004). Dobiva se i prženjem sjmeneki, tim se postupkom značajno povećava količina kanolola u ulju s 6-58 mg kg⁻¹ na 549-1536 mg kg⁻¹ (Wakamatsu i sur., 2005). Usprkos tome, kanolol je termički nestabilan spoj. Postupkom rafinacije ulja gubi se njegova značajna količina, te se predlaže izolacija iz sačme i naknadno dodavanje kanolola u rafinirano ulje za njegovo obogaćivanje.



Slika 1. Kemijska struktura kanolola (Dong i sur., 2011)

2.2.1. Biološki učinci kanolola

Kanolol je polifenolni spoj izoliran iz nerafiniranog repičinog ulja. Prema dosadašnjim studijama kanolol je pokazao izrazita antioksidacijska svojstva, puno veća nego kod dosada poznatih antioksidansa poput α -tokoferola, β -karotena, vitamina C, rutina i kvercetina (Kuwahara i sur., 2004). Uz to, dokazano je da ima antimutagenu, antikancerogenu, protuupanu aktivnost, kao i citotoksičan učinak.

Reaktivne vrste kisika (ROS), poput vodikovog perokisda, alkilhidroperoksida (i njegov radikal ROO•), peroksinitrita (ONOO⁻), nastaju u organizmu tijekom oksido-redukcijskih procesa. U uvjetima stresa razine ROS-a se dramatično povećavaju i predstavljaju opasnost po zdravlje, jer dovode do oštećenja stanične strukture i funkcije. Takvo nakupljanje slobodnih radikala se naziva oksidacijski stres, koji u konačnici pridonosi inicijaciji i napredovanju raznih bolesti i poremećaja, poput kardiovaskularnih bolesti, upalnih procesa, ishemičke reperfuzije, itd. Zato je bitno razine ROS-a držati pod kontrolom i spriječiti razvitak bolesti inhibicijom

same produkcije ROS-a (Fang i sur., 2009), u čemu važnu ulogu imaju upravo antioksidansi, odnosno tvari s antioksidacijskim kapacitetom.

Istraživanja Kuwahara i suradnika (2004) dokazala su da kanolol neutralizira alkilhidroperoksid radikale (ROO•), tj. pokazao se kao njegov vrlo snažan čistač, a ta anti-ROO• aktivnost bila je najviša u sirovom ulju. Rezultati su pokazali da se anti-ROO• aktivnost kanolola u repičinom ulju značajno smanjila svakom fazom procesa rafinacije ulja. U istom istraživanju kanolol je pokazao značajan učinak na uništavanje endogenog mutagena (ONOO-), tako štiteći DNA od oksidativnog oštećenja i inhibirajući učinak na oksidaciju lipida i proteina.

AMD (makularna degeneracija izazvana starošću) je jedan od najčešćih uzroka teških gubitaka vida kod starijih ljudi u razvijenim zemljama (Congdon i sur., 2003). U ranim stadijima razvoja bolesti utvrđeno je da ROS doprinosi staničnoj disfunkciji epitela retinalnog pigmenta (RPE) koja uzrokuje AMD (Winkler i sur., 2000). Dong i suradnici (2011) su proveli istraživanje s ciljem ispitivanja učinka kanolola u zaštiti RPE od oksidativnog oštećenja u kulturi stanica. Humana stanična linija epitela retinskog pigmenta (ARPE-19) bila je izložena staničnom stresu pomoću t-BH (tercijarni-butilirani hidroksid). Rezultati istraživanja su pokazali da je kanolol siguran za primjenu u ARPE-19 stanicama, te da su se stanice tretirane kanololom uspješno oporavile od oštećenja izazvanih t-BH-om. Ujedno je dokazano kako kanolol smanjuje razinu unutarstaničnog generiranog ROS-a koji je induciran s t-BH.

Rak želuca je drugi po smrtnosti i četvrti najčešće dijagnosticirani rak u svijetu. Iz tog razloga provedena su istraživanja biološkog potencijala kanolola kao antitumorske tvari s mogućnošću primjene kao lijeka. Jiang i suradnici (2013) su istraživali citotoksičnost kanolola na kulturi stanica, kako bi dokazali da je potencijalni prirodni lijek za karcinom želuca. Korištene su tumorska humana stanična linija (SCG-7901) i zdrava humana stanična linija (GED-1). Pokazalo se da kanolol inhibira proliferaciju i inducira apoptozu kod SCG-7901 stanične linije ovisno o dozi. Ujedno je zapažena mala toksičnost spram normalnih GED-1 stanica. Navedenim istraživanjem na SCG-7901 stanicama pokazano je da kanolol smanjuje ekspresiju mRNA za COX-2. COX-2 se povezuje s procesima mutageneze, mitogeneze, antiapoptoze, angiogeneze, metastaziranja i imunosupresije. Rezultati pokazuju da je inhibicija COX-2 povezana sa zapaženom apoptozom tumorskih SCG-7901 stanica te da se djelovanjem na taj enzim može potaknuti apoptoza malignih stanica i spriječiti neoplastični rast.

Fang i suradnici (2013) proveli su *in vivo* istraživanje protuupalnog učinka kanolola na miševima kojima je bio izazvan rak debelog cijeva pomoću azoksimetana/DDS-a. Kod miševa tretiranih kanolom bila je značajno snižena razina citokina TNF- α i IL-2. U istom istraživanju je dokazano da kanolol inhibira aktivaciju makrofaga, koji potiču širenje upale i tako smanjuje lučenje citokina iz makrofaga.

Još jedno *in vivo* istraživanje proveli su Cao i suradnici (2008), gdje su primjenjivali terapiju hranom s udjelom 0,1% kanolola na mongolske gerbile zaražene *Helicobacter pylori*, s kroničnim gastritisom i želučanom karcinogenezom. Rezultati su ukazali da kanolol smanjuje upale, proliferaciju stanica želučanog epitela i želučanu karcinogenezu kod zaraženih mongolski gerbila. Broj samih bakterijskih stanica *H.pylori* ostao je nepromijenjen primjenom prehrane bogatom kanololom.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ovom radu ispitan je učinak kanolola, izoliran u Laboratoriju za tehnologiju masti i ulja, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Navedeni spoj je izoliran iz sirovog repičinog ulja uzetog iz pogona rafinerije tvornice Zvijezda d.d., Zagreb. Njegova identifikacija i kvantifikacija provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) uz UV detekciju (DAD detektor) kako je opisano u radu Kraljić i sur.(2015).

3.1.2. Kemikalije

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley,UK

FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Neutral Red, E. Merk AG, Darmstadt, Njemačka

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Kristal-ljubičasto, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Natrijev acetat, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev nitrit, Kemika, Zagreb, RH

Tripan- plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

Octena kiselina, Kemika, Zagreb, RH

3.1.3. Otopine i puferi

- PBS PUFER (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,4381 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,2372 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- OTOPINA NEUTRAL RED-a

4% (m/v) ishodne otopine Neutral Red

Neutral Red	4 g
Destilirana voda	100 mL

- OTOPINA ZA ODBOJAVANJE ZA NEUTRAL RED METODU

Etanol	50% (v/v)
Octena kiselina	1% (v/v)
Destilirana voda	49% (v/v)

- 0,2 % OTOPINA KRISTAL-LJUBIČASTO

Boja kristal-ljubičasto	0,02 g
2% etanol	10,00 mL

3.1.4. Humane stanične linije

Humane stanične linije korištene u ovome radu su tumorska stanična linija HeLa i „normalna“ humana stanična linija HEK293T. Uzgoj se provodi u plastičnim T-bocama ili Petrijevim posudama za rast i održavanje biomase stanica, ili u pločama s jažicama za pojedinačne pokuse. Sami uzgoj se odvija u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂, pri temperaturi 37 °C, u DMEM mediju uz dodatak 10% (v/v) FSB-a.

3.1.5. Uređaji i oprema

Čitač ploča, Tecan Sunrise, Mannedorf, Švicarska

Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan

Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

T-boce 25 cm², Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, pipete, kivete, menzure, odmjerne tikvice)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema otopine kanolola

Kanolol je dobiven liofiliziran, mase 24,3 mg. Uzorak je otopljen u 2 mL etanola, sterilno profiltriran kroz 0,2 μm filter i čuvan na -20 °C. Molarna masa tako dobivenog uzorka iznosila je 67,5 mM i korištena je u pokusima ispitivanja biološke aktivnosti kanolola. Raspon primjenjenih koncentracija kanolola na stanične linije je 25 μM - 500μM. Razrjeđenja ishodne otopine rađena su direktno u mediju za uzgoj prije svakog pokusa.

3.2.2. Ispitivanje biološke aktivnosti kanolola na HeLa i HEK293T staničnim linijama

HeLa i HEK293T su stanične linije adherentnoga tipa, njihovo umnožavanje i postavljanje pojedinih pokusa odvija se u Petrijevim posudama i pločama s 96 jažica, u inkubatoru pri ranije opisanim uvjetima (poglavlje 2.3.). Rast se održava dok se ne postigne gustoća stanica oko 80%, tada je potrebno precjepljivanje da stanice ne bi ušle u stacionarnu fazu rasta, zbog kontaktne inhibicije. Pasažiranje je provedeno svaka 4 dana, kako bi se stanice održale u eksponencijalnoj fazi rasta. Tijekom uzgoja stanica bitno je pratiti njihovu brojnost kao i morfologiju te opće stanje stanica, što se provjerava korištenjem inverznog mikroskopa. Prije postavljanja pokusa, stanice je potrebno odvojiti od podloge tripsinizacijom. Nakon odvajanja stanica određen je broj stanica metodom tripan-plavo i izračunat je volumen stanica potreban za nacjepljivanje ploče s 96 jažica tako da početna koncentracija stanica iznosi 3×10^4 stanica mL^{-1} . U svaku jažicu je nacjepljeno 100 μL stanica spomenute početne koncentracije. Nakon prihvaćanja stanica za podlogu, odnosno prekonoćnog uzgoja, stanice su tretirane različitim koncentracijama kanolola (25 μM , 50 μM , 200 μM , 350 μM i 500 μM). Za svaku koncentraciju za obje stanične linije postavljeno je 5 paralela, pokusi su ponovljeni 2 puta. Kontrolnim stanicama je dodavan odgovarajući volumen etanola, koji je korišten kao otapalo za pripremu ishodne otopine kanolola.

Vrijeme djelovanja kanolola na stanice je bilo 72h, nakon čega se mjerilo preživljenje stanica metodom Neutral Red. Eksperimentalni podaci citotoksičnosti su prikazani grafički i aproksimirani pomoću krivulje. Primjenjena je regresijska analiza kako bi dobili krivulju koja najmanje odstupa od dobivenih podataka, te se iz jednadžbe krivulje izračuna EC_{50} vrijednost, što je koncentracija kod koje je 50% stanica u kulturi inhibirano.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Određivanje broja stanica provodi se bojanjem stanica bojom tripan-plavo i brojanjem u Neubauer-ovoj komorici. Sama boja omogućava razlikovanje živih od mrtvih stanica. Zbog propusnosti membrane, mrtve stanice postaje plavo obojene, dok žive stanice ostaju neobojene. Prije primjene boje, dodaje se tripsin i stanice se par minuta inkubiraju, mikroskopom se provjeri jesu li se stanice odvojile od podloge, potom se dodaje medij sa serumom (jednakog

volumena kao i tripsin), radi njegove inhibicije. Stanice se resuspendiraju, te se 20 μL suspenzije stanica pomiješa s 20 μL boje tripan plavo. Tako pripremljena suspenzija se stavlja u Neubauer-ovu komoricu volumena 20 μL . U komorici se broje neobojane stanice u 4 kvadratića, te se računa broj stanica po mL prema formuli:

$$\text{Br.stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{Zbroj izbrojenih st. u 4 kvadratića} \times 5\,000$$

3.2.4. Određivanje preživljenja stanica Neutral Red metodom

Neutral Red metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi kao alternativni test za utvrđivanje citotoksičnosti potencijalnih ksenobiotika. Princip metode je prolazak kationske Neutral Red boje kroz staničnu membranu živih stanica i akumuliranje u lizosomima. Čime se, uz citotoksični učinak, može odrediti aktivnost lizosoma u stanici.

Postupak započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica i ispiranjem prethodno pripremljenim i sterilno profiltriranim PBS puferom. U jažice se dodaje 15 μL Neutral Red otopine (125 μL ishodne otopine NR/100 mL medija za uzgoj s 5% (v/v) FBS). Stanice se inkubiraju 3 sata na 37 °C, potom se ukloni otopina boje. Prije dodatka otopine za odbojavanje, stanice se ponovno ispiru PBS puferom. Odbojavanje se provodi na tresilici kroz 20 minuta. Završno se mjeri apsorbancija pri 540 nm u odnosu na slijepu probu. Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancija kontrolnih i tretiranih stanica.

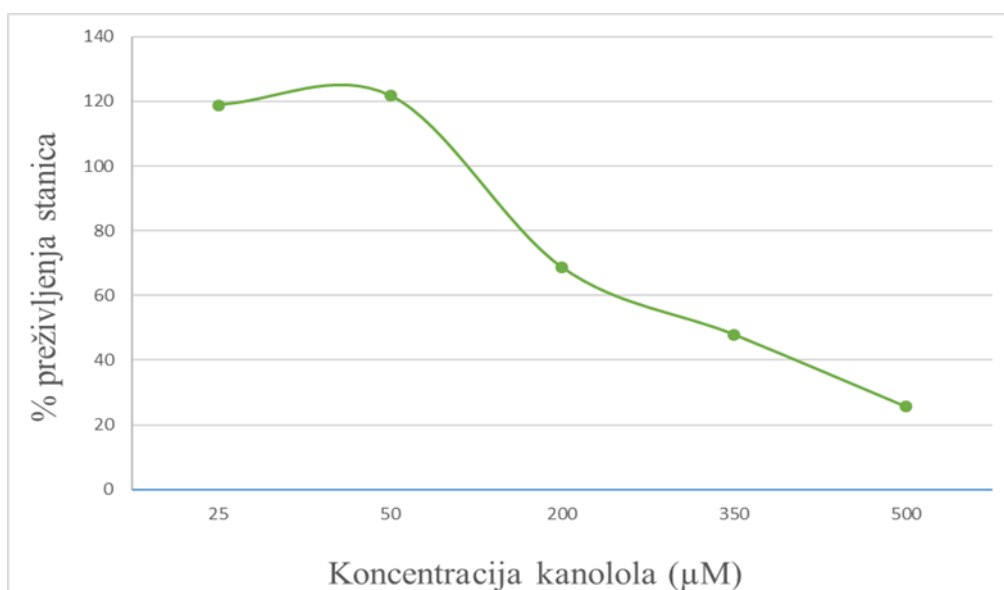
3.2.5. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Otopinom boje kristal-ljubičasto bojane su stanice s ciljem lakšeg uočavanja i fotografiranja morfoloških promjena u stanicama. Na taj način vidljiv je utjecaj različitih koncentracija kanolola na stanice, te je moguća usporedba s netretiranim stanicama. HeLa i HEK293T stanice se naciepljuju u volumenu 1 mL na ploču s 12 jažica. Stanice su tretirane s kanololom u koncentraciji 25 μM i 350 μM . Nakon 72h djelovanja kanolola, stanice su ispirane PBS puferom, i dodaje se boja kristal-ljubičasto. Nakon inkubacije s bojom (do 30 min), ista se uklanja i stanice se još jednom ispiru PBS puferom. Slikanje se provodi pomoću Dyno-Eye kamere pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

4. REZULTATI

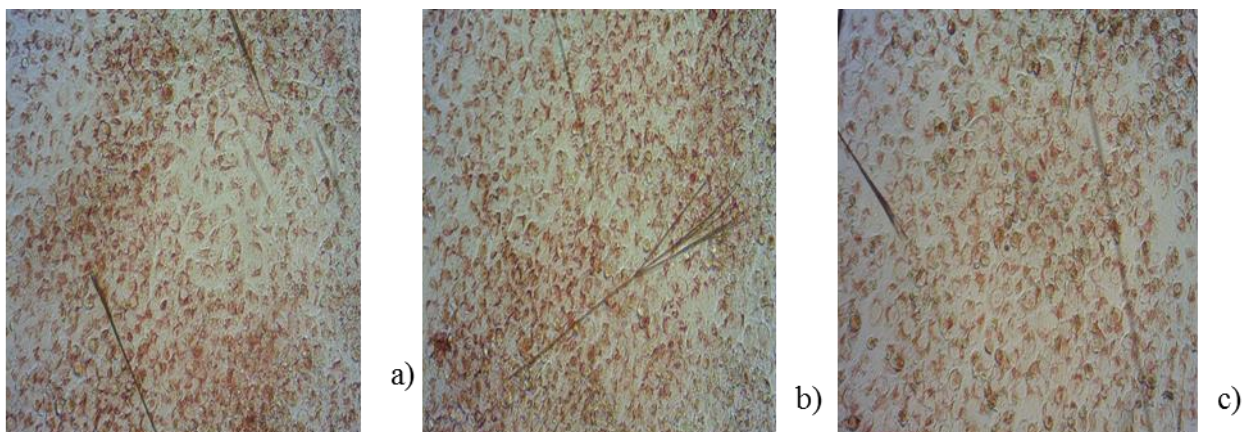
4.1. Biološka aktivnost kanolola na HeLa i HEK293T staničnim linijama

HeLa i HEK293T stanične linije nacjepljene su u ploče s 96 jažica, na način da im je početna koncentracija iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon perioda prihvaćanja stanica za podlogu, od otprilike 24 sata, stanice su tretirane različitim koncentracijama kanolola (25, 50, 250, 300 i $500\mu\text{M}$). Kontrolnim stanicama je istovremeno, umjesto kanolola, dodan etanol. Vrijeme djelovanja kanolola na kulture stanica je 72h, nakon čega je određeno preživljenje stanica Neutral Red metodom. Rezultati su izraženi kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice i prikazani su grafički na slikama 2 i 4. Tretirane stanice s kanololom u koncentraciji od $25\mu\text{M}$ i $350\mu\text{M}$ i kontrolne stanice su fotografirane i prikazane na slikama 3 i 5.



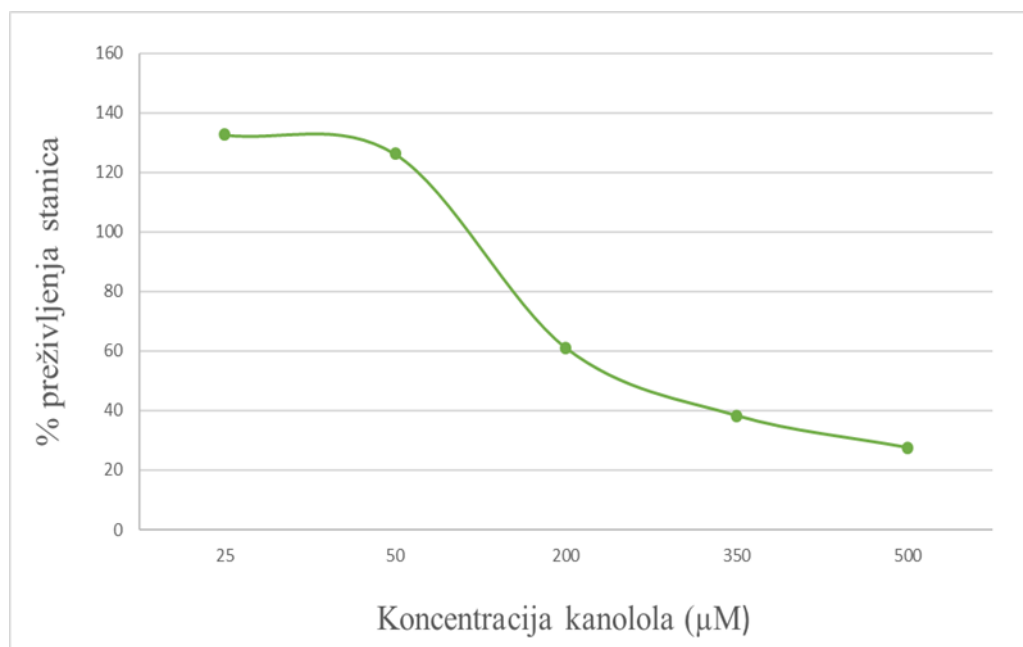
Slika 2. Utjecaj kanolola na HeLa staničnu liniju pri koncentracijama $25\mu\text{M}$ - $500\mu\text{M}$

Iz rezultata prikazanih na slici 2 uočava se citotoksičan učinak kanolola na rast HeLa stanica pri koncentracijama $\geq 50\mu\text{M}$. Rezultati također pokazuju da je inhibitorski učinak na stanice ovisan o primjenjenoj dozi, odnosno što je veća doza veća je i inhibicija rasta HeLa stanica.



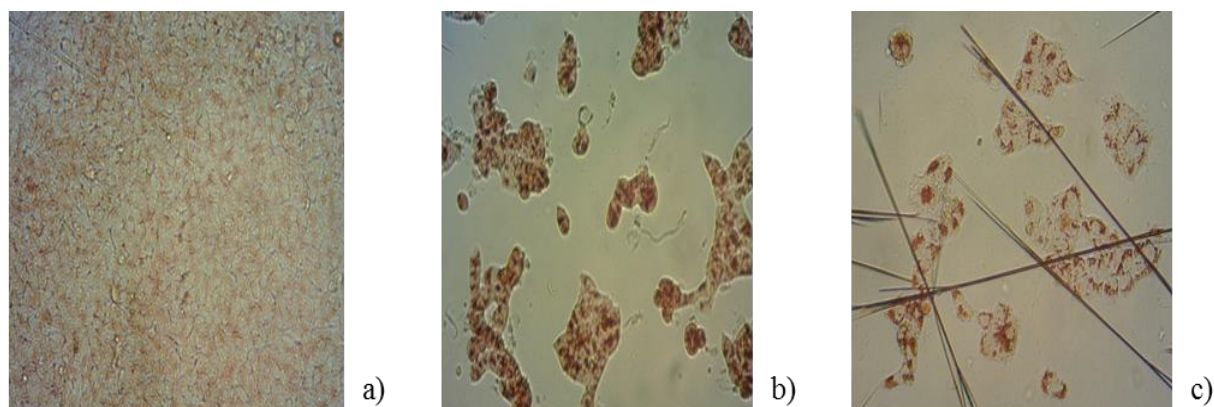
Slika 3. Izgled HeLa stanica tijekom provođenja Neutral red metode (povećanje 400x). Kontrolne stanice (a), stanice tretirane s 25 μM (b) i 350 μM (c) kanolola.

Na slici 3 vidljivo je da su kontrolne Hela stanice crvenije od tretiranih stanica, pošto boja Neutral Red boja žive stanice odnosno metabolizira se u lizosomima živih stanica. Također je vidljivo da što je veća primjenjena koncentracija kanolola to je broj stanica manji.



Slika 4. Utjecaj kanolola na HEK293T stanične linije pri koncentracijama 25 μM -500 μM

Na slici 4 vidljivo je da kanolol djeluje citotoksično i na HEK293T stanice pri koncentracijama većim od 50 μM . Kao i kod HeLa stanica vidljivo je da je inhibitorni učinak veći što je veća koncentracije kanolola.



Slika 5. Izgled HEK293T stanica tijekom provođenja Neutral red metode (povećanje 400x). Kontrolne stanice (a), stanice tretirane s 25 μM (b) i 350 μM (c) kanolola.

Na slici 5 vidljivo je da su stanice HEK293T najgušće u kontrolnom uzorku (a). Povećanjem koncentracije gustoća i broj stanica se izrazito smanjuje, kao i intenzitet boje, koji je najslabiji kod stanica tretiranih s 350 μM kanolola.

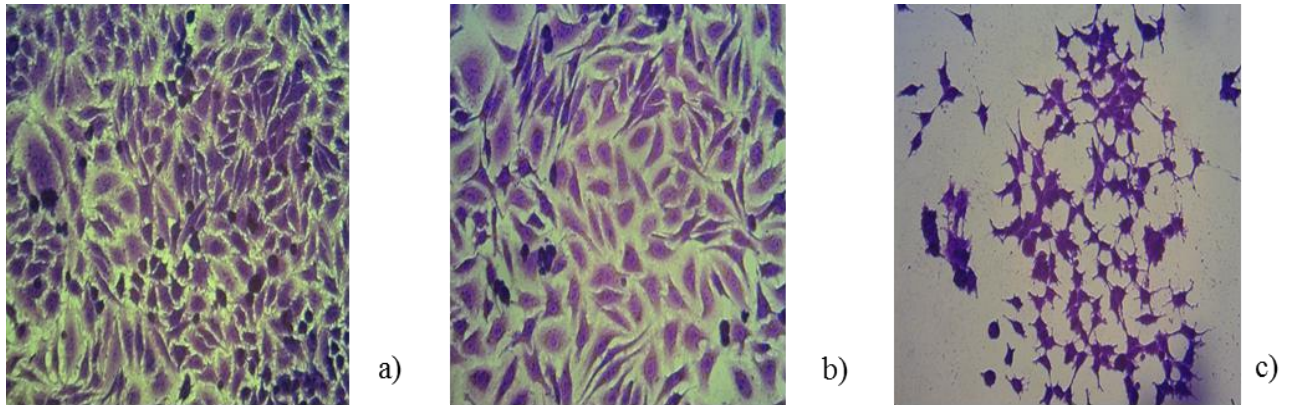
Iz krivulja prikazanih na slikama 2 i 4 izračunate su EC_{50} vrijednosti kanolola za obje stanične linije i prikazane u tablici 1.

Tablica 1. EC_{50} vrijednosti za učinak kanolola na HeLa i HEK293T stanice

STANIČNA LINIJA	EC_{50} VRIJEDNOSTI (μM)
HeLa	333,569
HEK293T	268,431

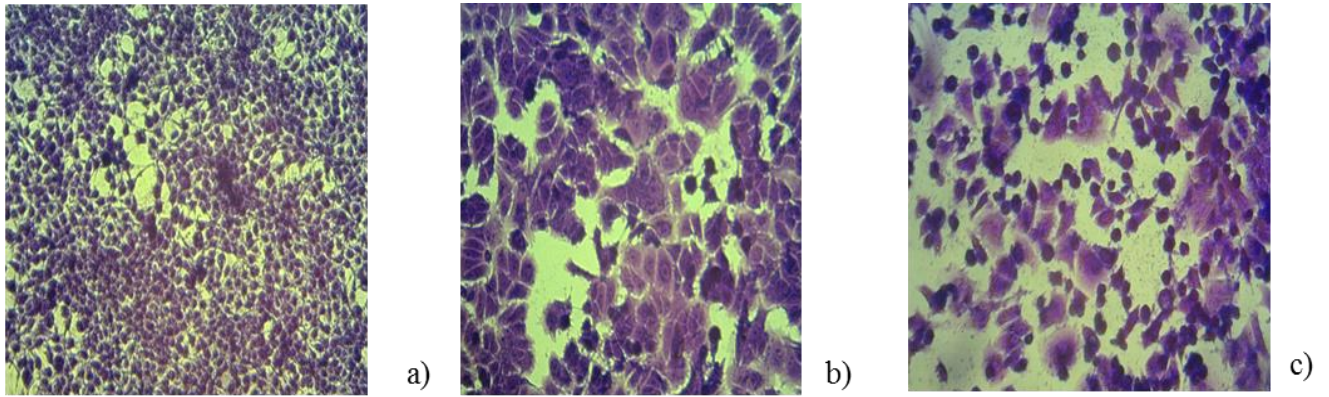
4.2. Morfologija HeLa i HEK293T stanica tretiranih kanololom

Prilikom tretmana HeLa i HEK293T stanica kanololom i praćenjem izgleda stanica pod inverznim mikroskopom, uočene su promjene u izgledu stanica, te su one obojane bojom kristal-ljubičasto i fotografirane, što je prikazano na slikama 6 i 7.



Slika 6. Izgled HeLa stanica obojanih kristal-ljubičastim i fotografiranih pod inverznim svjetlosnim mikroskopom (povećanje 400x). Kontrolne stanice (a), stanice tretirane s 25 μM (b) i 350 μM (c) kanolola.

Na slici 6 jasno je vidljiva razlika u izgledu tretiranih i netretiranih HeLa stanica. Kontrolne stanice imaju pravilnu morfologiju, visokog su stupnja povezanosti i velike su gustoće. Stanice tretirane s 25 μM imaju nešto manju gustoću monosloja od kontrolnih HeLa stanica, dok je kod stanica tretiranih s 350 μM kanolola vidljiv citotoksičan učinak kanolola kao znatno smanjena gustoća i povezanost stanica, neke stanice su zaokružene i jače obojane, što može ukazivati na kondenzaciju kromatina kao jedno od obilježja smrti stanice procesom apoptoze.



Slika 7. Izgled HEK293T stanica obojanih kristal-ljubičastim i fotografiranih pod inverznim svjetlosnim mikroskopom (povećanje 400x). Kontrolne stanice (a), stanice tretirane s 25 μM (b) i 350 μM (c) kanolola.

Slično kao kod HeLa stanica i kod HEK293T stanica su vidljive izrazite razlike u morfologiji tretiranih i kontrolnih stanica. Kontrolne stanice su velike gustoće i dobre povezanosti. Što je veća koncentracija kanolola to je gustoća stanica manja, kao i njihov međusobni kontakt. Na slici 6c vidljivo je da ima više zaokruženih i tamnijih stanica, odnosno da je citotoksični učinak kanolola veći, nego kod HEK293T stanica na slici 6b tretiranih s 25 μM kanolola, što je u skladu s rezultatima preživljenja stanica dobivenim primjenom Neutral Red metode.

5. RASPRAVA

Ulje uljane repice izrazito je bogato fenolnim spojevima. Otkriveno je da su polifenoli vrlo jaki antioksidansi, te da doprinose smanjenju oksidativnog stresa, koji doprinosi razvoju tumora, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Najvažniji fenolni spoj izoliran iz nerafiniranog repičinog ulja je kanolol. Kanolol je derivat sinapinske kiseline i stvara se prilikom prešanja ulja pri visokoj temperaturi i tlaku. U današnje vrijeme tumori su sve češći uzročnik smrti i oboljenja diljem svijeta, te se ulažu intenzivni naponi u pronalasku novih sintetskih lijekova i/ili prirodnih tvari s antitumorskim djelovanjem. Za ispitivanje antitumorske aktivnosti primjenjuju se *in vitro* testovi citotoksičnosti na kulturama stanica. Takvi testovi predstavljaju alternativu *in vivo* testovima na pokusnim životinjama, a rezultati su reproducibilni s visokim stupanjem standardizacije. Neophodna je primjena primarnih testova citotoksičnosti, kako nalaže NCI, za dobivanje što potpunijih rezultata i uvida u djelovanje potencijalnog lijeka. Kanolol je pokazao da ima antitumorski potencijal, no nužna su daljnja ispitivanja njegovog djelovanja u raznim *in vivo* i *in vitro* modelnim sustavima prije moguće primjene kao antitumorskog lijeka. Stoga je u ovom radu ispitan citotoksični učinak kanolola na dvije stanične linije HeLa i HEK293T.

Stanice su uzgajane u kontroliranim uvjetima u inkubatoru te su u eksponencijalnoj fazi rasta tripsinizirane i korištene za postavljanje pokusa. HeLa i HEK293T stanice tretirane su s 5 različitih koncentracija kanolola (25 μM , 50 μM , 200 μM , 350 μM i 500 μM) koji je djelovao 72 sata. Primjenom Neutral Red metode određen je citotoksični učinak, a ekstrapolacijom dobivenih eksperimentalnih rezultata izračunate su EC_{50} vrijednosti za HeLa i HEK293T stanice, koje pokazuju koncentraciju kanolola koja inhibira 50% stanica.

Rezultati prikazani na slici 2 su pokazali citotoksičan učinak kanolola na tumorske HeLa stanice pri koncentracijama većim od 50 μM , gdje je postotak inhibicije rasta stanica bio to veći što je primjenjena veća koncentracija kanolola. Takav rezultat je bio očekivan, obzirom da je u literaturi pokazano da kanolol ima antitumorski potencijal. Jiang i sur. (2013) su dokazali *in vitro* antitumorski učinak kanolola na tumorskoj staničnoj liniji SCG-7901, gdje su također primjenom većih koncentracija dobivali veću inhibiciju rasta tumorskih stanica. Dakle, naši rezultati su u skladu s dosadašnjim saznanjima o kanololu i ovim ispitivanjem je antitumorsko djelovanje kanolola dokazano na još jednoj tumorskoj staničnoj liniji, odnosno, možemo reći da kanolol djeluje citotoksično na stanice raka u *in vitro* sustavima. Rezultat dobiven kolorimetrijskom Neutral red metodom, potvrđuju fotografije kontrolnih i tretiranih HeLa

stanica prikazanih na slikama 3 i 6. Vidljiv je citotoksičan učinak kanolola kao smanjena gustoća i povezanost stanica tretiranih kanololom (Slike 6b i c) u usporedbi s netretiranim stanicama (6a) gdje imaju visok stupanj povezanosti i gustoće. Citotoksičan učinak je vidljiv i na slici 3, netretirane stanice (3a) su crvenije i ima ih brojačano više, a tretiranih (3b i c) ima manje i s manjim intenzitetom obojenja.

Kanolol je pokazao i citotoksičan učinak na normalnu staničnu liniju HEK293T (Slika 4). Inhibitorni učinak na rast HEK293T stanica proporcionalan je primjenjenoj koncentraciji kanolola, odnosno što je veća koncentracija kanolola citotoksični učinak je jači. Slike 5 i 7 su u skladu s rezultatima određivanja preživljenja stanica Neutral red metodom, budući je vidljiva razlika u gustoći i brojnosti kontrolnih i tretiranih HEK293T stanica, koja je to izraženija što je koncentracija kanolola veća. Na slici 5b i c puno je manja gustoća stanica nego kod istih primjenjenih koncentracija na HeLa stanice (slika 3b i c). Po čemu možemo zaključiti da kanolol ima jači inhibitorni učinak na HEK293T stanice. Sličan efekt se može primjetiti i na slikama 6b i 7b, gdje je pri koncentraciji kanolola od 25 μM puno veći citotoksični učinak na HEK293T stanice u odnosu na HeLa stanice, što se vidi u smanjenoj brojnosti i povezanosti HEK293T stanica.

Eksperimentalno dobiveni rezultati su primjenom regresijske analize aproksimirani krivuljom koja najmanje odstupa od dobivenih podataka, te je na temelju eksponencionalne jednadžbe izračunata EC_{50} vrijednost za kanolol za obje stanične linije što je prikazano u tablici 1. Manja EC_{50} vrijednost znači jači citotoksičan učinak stoga je prema rezultatima u ovom radu kanolol pokazao jači citotoksičan učinak na HEK293T stanice ($EC_{50} = 268,431 \mu\text{M}$) nego na HeLa stanice ($EC_{50} = 333,569 \mu\text{M}$), što je suprotno od onoga što bismo željeli i očekivali. Međutim, slični rezultati na HeLa i HEK293T stanicama dobiveni su u diplomskom radu Brkan (2016) primjenom MTS kolorimetrijske metode, gdje su dobivene EC_{50} vrijednosti 282,833 μM za HeLa, odnosno 131,406 μM za HEK293T stanice. U već spomenutom radu Jiang i sur. (2013) dobiveni su drugačiji rezultati. Kanolol primjenjen na zdravoj GED-1 staničnoj liniji pokazao je znatno manji citotoksičan učinak nego na tumorske SCG-7901 stanice, što ukazuje na njegovu moguću terapijsku primjenu, sigurnu za zdrave stanice i ciljanu za tumorske stanice.

U ovom radu je dokazana antitumorska aktivnost kanolola, ali nije potvrđen njegov slabiji inhibitorni učinak na normalnim stanicama, kako je bilo očekivano. Razlog tome može biti činjenici da, iako su HEK293T stanice podrijetlom iz zdravog organizma, one su transformirane i genetički drugačije u odnosu na primarnu kulturu stanica *in vitro*, odnosno na

in vivo organizam. Stoga su nužna daljnja istraživanja učinka kanolola koja bi potvrdila mogućnost njegove primjene kao antitumorske tvari s mogućom terapijskom primjenom. Potrebno je provesti još puno primarnih testova citotoksičnosti na drugim tumorskim staničnim linijama, kako nalaže NCI te svakako pomnije istražiti njegov učinak u *in vivo* sustavima.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata u ovome radu, može se zaključiti:

1. Ispitivanjem učinka kanolola u koncentracijama od 25 μM -500 μM na HeLa i HEK293T stanicama uočen je citotoksični učinak na obje stanične linije. U obje stanične linije inhibicija rasta stanica započinje pri koncentracije kanolola od otprilike 50 μM , te je ovisna o dozi.
2. Određene su EC_{50} vrijednosti koje iznose 268,431 μM za HEK293T stanice te 333,569 μM za HeLa stanice, čime je potvrđen antitumorski učinak kanolola *in vitro*, ali nije potvrđena njegova sigurnost za zdrave stanice budući je u jednakoj mjeri djelovao i na normalne HEK293T stanice.

7. LITERATURA

Anonymous 1 (2016): http://aquafind.com/articles/Cell_Culture.php. Pristupljeno 20. lipnja 2016.

Anonymous 2 (2016):
https://www.embl.de/aboutus/communication_outreach/media_relations/2013/130311_Heidelberg/. Pristupljeno 25. lipnja 2016.

Anonymous 3 (2016): <http://www.hek293.com/>. Pristupljeno 25. lipnja 2016.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-product: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.

Boyd, M.R., Paull, K.D. (1995) Some practical considerations and applications of the Nacional Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Develop. Res.* **34**, 91-109.

Brkan, V. (2016) Biološka aktivnost spojeva iz repičinog ulja. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Cao, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P. Jr., Jones, D.P. (2000) Oxidative stress and protection of the RPE. *Prog. Retin Eye Res.* **19**, 205-21.

Cao, X., Tsukamoto, T., Seki, T., Tanaka, H., Morimura, S., Cao, L., Mizoshita, T., Ban, H., Toyoda, T., Maeda, H., Tatematsu, M. (2008) 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *Int. J. Cancer.* **122**, 1445-1454.

Congdon, N.G., Friedman, D.S., Lietman, T. (2003) Important causes of visual impairment in the world today. *JAMA* **290**, 2057-60.

Dong, X., Li, Z., Wang, W., Zhang, W., Liu, S., Zhang, X., Fang, J., Maeda, H., Matsukura, M. (2011) Protective effect of canolol from oxidative stress-induced cell damage in ARPE-19 cells via an ERK mediated antioxidative pathway. *Mol. Vis.* **17**, 2040-2048.

Fang, J., Seki, T., Tsukamoto, T., Qin, H., Yin, H., Liao, L., Nakamura, H., Maeda, H. (2013) Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) involves suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Carcinogenesis*. **34**, 2833-2841.

Fang, J., Seki, T., Maeda, M. (2009) Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **61**, 290–302.

Jiang, J., Cao, D., Tsukamoto, T., Wang, G., Jia, Z., Suo, J., Cao, X. (2013) Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncol. lett.* **4**, 1563-1566.

Kandárová, H., Letašiová, S. (2011) Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 107–113.

Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wähälä, K., Heinonen, M. (2003) Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 110-114.

Kraljić, K., Škevin, D., Barišić, L., Kovačević, M., Obranović, M., Jurčević I. (2015) Changes in 4-vinylsyringol and other phenolics during rapeseed oil refining. *Food Chem.* **187**, 236-242.

Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatsu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T., Maeda, H. (2004) Antioxidative and Antimutagenic Activities of 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (Canolol) Isolated from Canola Oil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4380-4387.

Nowak, H., Kujawa, K., Zadernowski, R., Rocznik, B., Kozłowska H. (1992) Antioxidative and antibacterial properties of phenolic compounds in rapeseeds. *Fat Sci Technol.* **71**, 149–152.

Wakamatsu, D., Morimura, S., Sawa, T., Kida, K., Nakai, C., Maeda, H. (2005) Isolation, identification, and structure of a potent alkyl-peroxyl radical scavenger in crude canola oil. *Canolol. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1568-1574.

Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., Sternberg, P. (2000) Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* **5**, 32-42.

