

Biološka aktivnost spojeva iz repičinog ulja

Brkan, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:165524>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2016.

Veronika Brkan 592/MB

**BIOLOŠKA AKTIVNOST
SPOJEVA IZ REPIČINOG ULJA**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Kristine Radošević.

Najiskrenije hvala doc. dr. sc. Kristine Radošević, na uloženom trudu i vremenu, susretljivosti i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i profesorici dr. sc. Višnji Gaurini Srček te ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na savjetima, dobrom raspoloženju i ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno hvala mojoj obitelji na podršci, razumijevanju i svemu što čini za mene.

Hvala mojem Nikoli, na ljubavi, pomoći i motivaciji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Biološka aktivnost spojeva iz repičinog ulja

Veronika Brkan 592/ MB

Sažetak: Uljana repica i njeno ulje izvor su mnogih biološki aktivnih spojeva, osobito fenolnih spojeva za koje je potvrđeno da imaju antioksidacijsko, antimutageno i antitumorsko djelovanje. Iz sirovog ulja izoliran je 4-vinil-2,6-dimetoksifenol ili kanolol, a iz jestivog njegov dimer, fenilindan. U ovom radu ispitana je biološka aktivnost navedenih spojeva određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom te *in vitro* testom citotoksičnosti na humanim tumorskim staničnim linijama (MCF-7, HeLa) te na normalnoj staničnoj liniji sisavaca (HEK293T). Ispitano je mogu li kanolol i fenilindan imati zaštitni učinak na stanice u kojima je izazvan oksidativni stres. Rezultati istraživanja pokazali su citotoksičan učinak kanolola i fenilindana na sve tri stanične linije, s tim da fenilindan ima jači citotoksični učinak. Također, fenilindan ima veći antioksidacijski potencijal nego kanolol. Nije zabilježen zaštitni učinak kanolola i fenilindana na MCF-7, HeLa i HEK293T stanice u kojima je potaknut oksidativni stres.

Ključne riječi: : uljana repica, polifenoli, kanolol, fenilindan, biološka aktivnost, antioksidacijski potencijal

Rad sadrži: 47 stranica, 24 slike, 4 tablice, 56 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

Pomoć pri izradi:

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Dubravka Škevin
2. Doc.dr.sc. Kristina Radošević
3. Izv.prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
4. Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič (zamjena)

Datum obrane: 2. lipanja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

The biological activity of compounds from rapeseed oil

Veronika Brkan 592/MB

Abstract: Rapeseed and its oil are the source of many biologically active compounds, especially phenolic compounds that have been confirmed to have antioxidant, antimutagenic and anticancer activity. From crude oil is isolated 4-vinyl-2,6-dimethoxysiphenol or canolol and from edible oil its dimer, phenylindan. In this study, we tested the biological activity of these compounds by determination of the antioxidant capacity by ORAC method and *in vitro* cytotoxicity in human tumor cell lines (MCF-7, HeLa) and in normal mammalian cell line (HEK). We examined whether canolol and phenylindane have a protective effect on the cells with induced oxidative stress. The results showed a cytotoxic effect of canolol and phenylindane on all three cell lines, however phenylindane has a stronger cytotoxic effect. Also, phenylindane has a greater antioxidant potential than canolol. There had been no record of protective effect of canolol and phenylindane on the cells with induced oxidative stress.

Keywords: rapeseed, polyphenols, canolol, phenylindan, biological activity, antioxidative capacity

Thesis contains: 47 pages, 24 figures, 4 tables, 56 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and digital version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph.D. Kristina Radošević, Assistant professor

Assistance:

Reviewers:

1. Ph.D. Dubravka Škevin, Associate Professor
2. Ph.D. Kristina Radošević, Assistant Professor
3. Ph.D. Višnja Gaurina Srček, Associate Professor
4. Ph.D. Ivana Kmetič, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 2nd of June, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIOLOŠKI AKTIVNI SASTOJCI HRANE	2
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	3
2.2.1 Polifenoli i zdravlje	4
2.3. POLIFENOLI U ULJIMA I MASTIMA	5
2.3.1. Polifenoli uljane repice	5
2.3.2. Polifenoli sirovog repičinog ulja	7
2.3.3. Polifenoli jestivog repičinog ulja	8
2.4. BIOLOŠKI UČINCI KANOLOLA	10
2.4.1. Potencijal fenilindana	12
2.5. <i>IN VITRO</i> TESTOVI ODREĐIVANJA CITOTOKSIČNOSTI	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Uzorci	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Otopine i puferi	17
3.1.4. Humane stanične linije	18
3.1.5. Uređaji i oprema	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Izolacija i identifikacija polifenola sirovoga i jestivoga repičinoga ulja	20
3.2.2. Priprema otopine kanolola i fenilindana	21
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti kanolola i fenilindana na MCF-7, HeLa i HEK293T staničnim linijama	21
3.2.3.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	22
3.2.3.2. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto	23
3.2.3.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom	24
3.2.4. Određivanje mogućeg zašitnog utjecaja kanolola i fenilindana na MCF-7, HeLa i HEK293T stanice u kojima je potaknut oksidativni stres dodatkom H_2O_2	25
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. UVOD	27
4.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST KANOLOLA NA MCF-7, HeLa I HEK293T STANIČNIM LINIJAMA	29

4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST FENILINDANA NA MCF-7, HeLa I HEK293T STANIČNIM LINIJAMA	32
4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET KANOLOLA I FENILINDANA.....	37
4.5. ZAŠTITNI UTJECAJ KANOLOLA I FENILINDANA NA MCF-7, HeLa I HEK293T STANICE U KOJIMA JE POTAKNUT OKSIDATIVNI STRES	386
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA.....	42

1.UVOD

Danas ljudi sve više konzumiraju hranu čiji sastojci povoljno utječu na zdravlje (Jašić, 2010). Biljke se još od antičkog vremena koriste za poboljšanje zdravlja u preventivnom smislu te kao ljekovita sredstva u terapiji bolesti. Procijenjeno je da se 80-85 % svjetske populacije oslanja na tradicionalnu medicinu za primarne zdravstvene potrebe te se pretpostavlja da glavnu ulogu u tradicionalnoj terapiji imaju ekstrakti biljaka i njihovi biološki aktivni sastojci (Elujoba i sur., 2005). Biološki aktivni sastojci hrane imaju ulogu u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja, a među njih se ubrajaju vitamini i minerali, karotenoidi, fenolni spojevi, flavonoidi, fitosteroli, izoflavoni, enzimi, tanini, glikozidi, alkaloidi, i drugi (Jašić, 2010).

Glavni uzrok smrtnosti kod ljudi u cijelom svijetu je bolest karcinoma i to je razlog što se tijekom posljednjeg desetljeća velika pozornost usmjerava prema prirodnim biljnim proizvodima. Tijekom 2012. godine, 41% antitumorskih lijekova bili su prirodni ili modificirani prirodni proizvodi. Antioksidansi su biljni sastojci koji imaju antitumorski učinak jer djeluju kao redukcijska sredstva, donori vodika, potiskuju slobodne radikale i odlažu oksidativne reakcije. Najvažniji biljni antioksidansi su polifenolni spojevi, kojih ima više od 8 000 (Elansary, 2014).

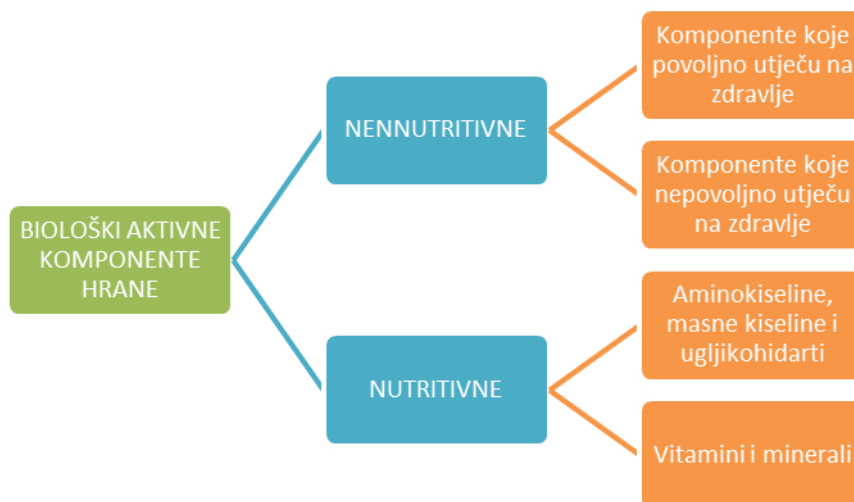
Među namirnicama biljnog podrijetla, *Brassica napus* poznatija kao uljana repica i njeno ulje su potencijalni bogati izvori prirodno prisutnih fenolnih spojeva kao što su derivati sinapinske i klorogenske kiseline (Naczki i sur., 1998). Najvažniji fenolni spoj izoliran iz repičinog ulja je 4-vinil-2,6-dimetoksifenol ili kanolol koji ima snažno antioksidacijsko i antimutageno djelovanje (Wakamatsu i sur., 2005). U procesiranom repičinom ulju identificiran je novi spoj, dimer kanolola nazvan fenilindan i istraživanje Harbaum-Piayda i suradnika (2010) je potvrdilo da ima veliki antioksidacijski potencijal.

Cilj ovog rada bio je ispitati *in vitro* biološku aktivnost 4-vinil-2,6-dimetoksifenola (kanolola) dobivenog izolacijom iz jestivog repičinog ulja, i njegovog dimera (fenilindana), na humanim tumorskim staničnim linijama (MCF-7, HeLa) te na normalnoj staničnoj liniji sisavaca (HEK293T). Istražit će se također i potencijalni protektivni učinak dvaju spojeva na stanice u kojima je izazvan oksidativni stres vodikovim peroksidom, te odrediti antioksidacijski potencijal.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOLOŠKI AKTIVNI SASTOJCI HRANE

Biološki aktivni sastojci hrane definirani su kao fiziološki aktivne tvari u hrani ili dodacima prehrani koji potječu iz biljnih i životinjskih izvora te imaju povoljan učinak na zdravlje ako se konzumiraju u razumnim količinama. Sam izraz biološki aktivni sastojak hrane odnosi se najčešće na spojeve koji imaju funkcionalna svojstva u organizmu i djeluju na različite organske sustave kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, nervni, imunološki i drugi te mogu biti pomoćna sredstva u prevenciji i liječenju bolesti (Jašić, 2010). Izvori biološki aktivnih tvari su namirnica biljnog (žitarice, uljarice, voće, povrće i začini) i animalnog porijekla (proizvodi od mlijeka, jaja, mesa i ribe) kao i iz mikroorganizama (funkcionalne mikrobne kulture). Osim povoljnog učinka na zdravlje, konzumacija određenih sastojka hrane može imati i štetne učinke na organizam. Negativan učinak na zdravlje ljudi se često povezuje s onim tvarima koje imaju veću biološku aktivnost u raznim metaboličkim procesima. Zbog toga se za većinu biološki aktivnih tvari nastoji odrediti i definirati preporučeni (RDA¹) i referentni (DRI²) dnevni unosi, kao i maksimalne granice unosa (UL³), jer prekomjerne količine mogu imati negativan učinak na organizam.



Slika 1. Podjela biološki aktivnih sastojaka hrane (Jašić, 2010).

¹ Eng. Recommended Dietary Allowances- RDA ili preporučeni dnevni unosi nutrijenata (proteini, ugljični hidrati, lipidi, vitamini i minerali)

² Dnevni referentni unos eng Dietary Reference Intakes, DRI) utemeljen na znanstveno potvrđenoj povezanosti unosa nutrijenata i optimalnog zdravlja, te prevenciji kroničnih bolesti u zdravih populacija

³ najveći sigurnosni dnevni unos eng. Tolerable Upper Intake Level ili UL

Biološki aktivni sastojci hrane međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi, porijeklu, funkciji u organizmu te prema obliku ili farmaceutskom obliku ako se konzumiraju kao dodaci prehrani. Razlikujemo ne nutritivne i nutritivne biološki aktivne sastojke hrane (Slika 1). Nutritivni sastojci hrane su npr. aminokiseline, masne kiseline, neki ugljikohidrati (npr.β-D-glukani, inozitol, sorbitol), vitamini, minerali, dok se u ne nutritivne sastojke hrane ubrajaju polifenoli, flavonoidi, klorofil, izotiocijanati, alkaloidi, steroli, karotenoid, i drugi. Visoku biološku aktivnost mogu imati fitokemikalije iz voća, povrća i začinskog bilja kao što su klorofil, karotenoidi, polifenoli, flavonoidi, glikozidi, tanini, alkaloidi, fitosteroli, lignani i drugi (Jašić, 2010). Do danas je identificiran veliki broj biološki aktivnih sastojaka hrane, ali to područje se i nadalje intenzivno istražuje te raste broj bioaktivnih tvari za koje se pretpostavlja da mogu djelovati kao antioksidansi, inhibitori ili induktori enzima i receptora te djelovati na nivou ekspresije gena. Također, nije neuobičajeno da je biološki učinak neke tvari iz hrane posljedica aktivacije više različitih staničnih procesa te da ovisno o količini unesene tvari učinak na organizam bude dvojak. Stoga, se pri konzumaciji i primjeni biološki aktivnih tvari iz hrane treba pridržavati već spomenutih RDA, DRI i UL vrijednosti (Naczki i sur., 1998).

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli su velika skupina sekundarnih metabolita i rasprostranjeni su u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Najvažniji izvori fenolnih spojeva su povrće, voće, žitarice, zeleni čaj, crno vino, čokolada i sl. Polifenolni spojevi imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, zaštiti protiv patogena i predatora, utječu na senzorska svojstva (boja, aroma ili okus), sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima te štite osjetljive stanične dijelove od štetnog zračenja (Balasundram i sur., 2006). Već nekoliko desetaka godina znanstvenici i prehrambena industrija pridodaju mnogo pažnje istraživanju polifenolnih spojeva, jer su prepoznali antioksidacijski potencijal ovih spojeva i njihovu moguću ulogu u prevenciji kroničnih bolesti. Naime, istraživanja su pokazala da su tumori, kardiovaskularne bolesti te neurodegenerativne bolesti često povezani s oksidativnim stresom te da polifenoli, kao jaki antioksidansi, mogu biti učinkoviti u sprječavanju tih bolesti (Manach i sur.,2004).

Riječ polifenol je nastala od stare grčke riječi *poli-*, što znači "mnogo", i riječ *fenol* što je molekula formirana od fenilne grupe ($-C_6H_5$) vezane s hidroksi grupom ($-OH$) (Jašić, 2010). Polifenoli sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno mogu biti jednostavne fenolne molekule do visoko polimeriziranih spojeva (Balasundram i sur., 2006). Uglavnom su građeni od 12 do 16 fenolnih skupina s 5 do 8 aromatskih prstenova (Jašić, 2010). Prema broju i rasporedu ugljikovih atoma klasificiraju se u flavonoide (flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, antocijanidi, flavani, izoflavani i drugi) i ne-flavonoide (fenolna kiselina, hidroksicinamati, stilbeni i drugi). Obično dolaze kao konjugati povezani s mono- i polisaharidima povezani s jednom ili više fenolnih skupina te se mogu pojavljivati kao funkcionalni derivati, esteri i metilesteri (Cartea i sur., 2010). Polifenoli su topljivi u vodi, mnogi od njih se nalaze u obliku glikozida, imaju sposobnost taloženja alkaloida i proteina. Obzirom na biološku aktivnost, među aktivnijim spojevima su fenolne kiseline, koje se nalaze u vanjskim slojevima biljaka, i mogu stupati u kovalentne veze s policikličkim aromatskim ugljikohidratima i tako potisnuti njihovo kancerogeno djelovanje (Jašić, 2010).

2.2.1 Polifenoli i zdravlje

Polifenoli uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture, od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina (Jašić, 2010). Osim antioksidativnog djelovanja, polifenoli imaju antialergeni, antimikrobni, protuupalni, kardioprotektivni i vazodilatatorski učinak (Balasundrum i sur., 2006). Zbog mogućnosti da uklone kisikove radikale i druge reaktivne vrste djeluju kao antimutageni i antikarcinogeni. Polifenoli također imaju važnu funkciju u tehnologiji hrane, jer su odgovorni za mnoga senzorska svojstva, pa tako utječu na gorčinu, boju i okus hrane. Zbog svog antioksidacijskog djelovanja mogu povećati nutritivnu vrijednost hrane (El Gharras, 2009). Zdravstveni učinak polifenola ovisi o konzumiranoj količini i njihovoj biodostupnosti (Jašić, 2010).

Iako se ulja ne smatraju dobrim izvorom fenolnih spojeva (Koski i sur., 2003), repičino ulje sadrži velike količine fenola koja ovisi o procesu proizvodnje ulja (Nowak i sur., 1992). Fenoli zbog svog antioksidativnog djelovanja mogu imati antikancerogeni učinak, a osim toga djeluju kao redukcijska sredstva, donori vodika te sprječavaju oksidativne reakcije potiskujući

slobodne radikale. Tanini, koji također spadaju u grupu fenola, djeluju na zdravlje tako da pozitivno utječu na imunost sustav. Određeni flavonoidi pokazuju citotoksičnu aktivnost na tumorskim stanicama, a drugi pak inhibitorno djeluju na rast i proliferaciju tumorskih stanica (Elansary, 2014).

Polifenoli kao antioksidansi pokazuju profilaktični i terapijski učinak, te sprječavaju oksidativni stres, koji se definira kao neravnoteža između oksidansa i antioksidansa, u korist oksidansa koji dovode do štete (Harbaum-Piayda i sur., 2010). Oksidativni stres uzrokuje visoko reaktivne molekule i kemijski spojevi koji sadrže nesparene elektrone poznatije kao slobodni radikali. Antioksidansi mogu znatno smanjiti štetu oksidansa tako da ih zarobe prije nego reagiraju sa spojevima i uzrokuju lančanu reakciju ili sprječavaju aktivaciju kisika u visoko reaktivne produkte. U prehrani, antioksidansi su tvari koje mogu uhvatiti kisik ili dušik kako bi spriječili lančanu reakciju ili mogu inhibirati reaktivni oksidans (Thiyam-Holländer i sur., 2012).

2.3. POLIFENOLI U ULJIMA I MASTIMA

Polifenolni spojevi su hidrofilnog karaktera, te se vrlo mali dio polifenola prisutnih u uljaricama otapa u ulju. Ulja se općenito ne smatraju dobrim izvorom polifenola u ljudskoj prehrani, jer iako su neke sjemenke uljarica bogate fenolnim spojevima, njihova ulja sadrže niske koncentracije fenola zbog slabe topljivosti u nepolarnom mediju (Kraljić i sur., 2015). Od svih uljarica masline su najbogatije fenolnim spojevima, koji se većinom nalaze u tzv. vegetabilnoj vodi ploda. (Servili i Montedoro, 2002).

2.3.1. Polifenoli uljane repice

Uljana repica (*Brassica napus*) (Slika 2) najvažnija je uljarica u kontinentalnim područjima i u svjetskoj proizvodnji uljarica zauzima drugo mjesto. U većem djelu svijeta uzgojene su nove sorte uljane repice, kao što su kanadska i europska sorta, koje sadrže niske količine eruka kiseline (<2%) i glukozinolata (<30 mmol g⁻¹) (Zheng i sur., 2014).



Slika 2. Uljana repica a) cvijet, b) sjeme (Anonymous 1 i 2, 2016).

Uljana repica i njeno ulje sadrži niske koncentracije zasićenih masnih kiselina (5-10%), visoke koncentracije mononezasićenih masnih kiselina (44-75%), nešto linolne kiseline (18-22%) i α -linolne kiseline (9-13%) (Zheng i sur., 2014). Repičino ulje sadrži najviše fenolnih spojeva od svih drugih uljarica (Nowak i sur., 1992), ali njihova koncentracija u ulju značajno ovisi o postupku proizvodnje (Kraljić i sur., 2015). Dominantni spojevi detektirani u repici su fenolne kiseline i kondenzirani tanini. Oni mogu doprinijeti gorkom okusu i trpkosti nusprodukata, a u kompleksu s proteinima smanjuju nutritivnu vrijednost pogače i sačme (Naczki i sur., 1992).

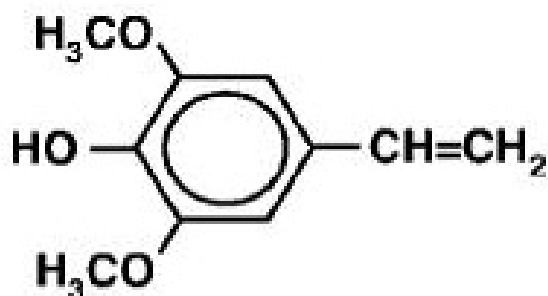
Najvažnija fenolna kiselina uljane repice je sinapinska kiselina i njeni derivati: sinapoil glukoza i sinapin te kolin ester sinapinske kiseline (Hüsken i sur., 2005). Od ukupnih fenola u repici, 80% čine esterificirane fenolne kiseline odnosno sinapin, dok slobodni fenolni spojevi čine 9-16% (Naczki, 1992). Siger, Nogala-Kalucka i Lampart-Szczapa (2008) su identificirali sinapinsku kiselinu kao najvažniji fenolni spoj u hladno prešanom repičinom ulju, te ferulinsku kiselinu i p-kumarinsku kiselinu u tragovima. Međutim, Koski i sur. (2002) su pronašli veće količine fenolnih spojeva u rafiniranom repičinom ulju. U procesiranom repičinom ulju pronađeni su jaki antioksidativni spojevi kao što je 4-vinilsiringol, dekarboksilacijski derivat sinapinske kiseline koji nastaje povišenjem temperature tijekom tiješnjenja uljane repice (Koski i sur., 2003), što potvrđuje činjenicu da koncentracija fenolnih spojeva u ulju značajno ovisi o načinu proizvodnje.

Za vrijeme dozrijevanja sjemena uljane repice, sadržaj fenolnih spojeva u repici se povećava. Sadržaj fenola topljivih u vodi, uključujući sinapin, je najveći u završnoj fazi zelenih sjemenki i u početku njihovog posmeđivanja, kada u fazi zrelosti postižu konstantnu

količinu. Nasuprot tome, sadržaj fenola topljivih u dietil-eteru se može ili ne mora povećavati tijekom sazrijevanja sjemena, ovisno o sorti uljane repice (Rotkiewicz i sur., 1987). Fenolne kiseline su derivati benzojeve i cimetine kiseline, a u repici su prisutne u slobodnom, esterificiranom i netopljivom-vezanom obliku. Od svih fenolnih kiselina u repici je najprisutnija trans-sinapinska kiselina. Prisutnost cis-sinapinske kiseline u proizvodima repice je rezultat izomerizacije, koja se postiže izlaganjem sjemenki i/ili proizvoda repice UV zračenju (Schulz i Hermann, 1980).

2.3.2. Polifenoli sirovog repičinog ulja

4-vinilsiringol ili kanolol (Slika 3) prirodno se ne nalazi u sjemenkama uljane repice, niti u drugim *Brassica* biljkama (Wakamatsu i sur., 2005). On je glavni fenolni spoj u sirovom repičinom ulju i derivat je sinapinske kiseline, koja nastaje tijekom kondicioniranja ulja iz sinapina, zbog pucanja esterske veze. Kanolol nastaje u repičinom ulju dekarboksilacijom sinapinske kiseline koja se događa tijekom prešanja ulja pri visokoj temperaturi i tlaku (Kuwahara i sur., 2004; Koski i sur., 2003) ili prženjem sjemenki, pri čemu se značajno povećava sadržaj kanolola od 6-58 mg kg⁻¹ prije prženja do 549-1536 mg kg⁻¹ nakon prženja pri 260°C (Wakamatsu i sur., 2005). Iako nastaje djelovanjem povišene temperature, kanolol je termički nestabilan. Tako se njegov sadržaj u ulju smanjuje s 81,4 µg g⁻¹ na samo 11.0 µg g⁻¹ kada je izložen temperaturi od 180 °C tijekom 20 minuta (Thiyam-Holländer i sur., 2012). Obzirom da kanolol potpuno nestaje za vrijeme rafinacije ulja, predlaže se njegova izolacija iz sačme i dodavanje natrag u ulje, koje bi se tako obogatilo ovom biološki aktivnom tvari.



Slika 3. Kemijska struktura kanolola (Dong i sur.,2011).

Kanolol je poznat kao snažan antioksidans i antimutageni spoj topljiv u lipidima (Koski i sur., 2003). Kanolol je bolje topljiv u ulju od sinapinske kiseline, jer ne sadrži karboksilnu skupinu (Kraljić i sur., 2013). Visoki afinitet kanolola za staničnu membranu i druge biološke membrane pripisuje se upravo njegovom lipofilnom karakteru (Khattab i sur., 2014). Antioksidacijsko djelovanje kanolola, koje je definirano kao sposobnost hvatanja slobodnih radikala, mnogo je veće nego za neke poznate antioksidanase uključujući vitamin C, β -karoten, α -tokoferol, rutin i kvercetin (Wakamatsu i sur., 2005).

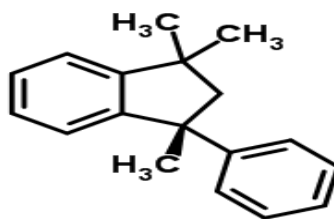
Visoki udio kanolola u sirovom ulju objašnjava relativno dobru oksidativnu stabilnost sirovih ulja, ali tijekom procesa rafinacije dolazi do njegovog potpunog uklanjanja (Koski i sur., 2003). U sirovom ulju u većim koncentracijama su prisutni kanolol i sinapinska kiselina (Koski i sur., 2003), a u niskim koncentracijama još mogu biti određeni: siringaldehid, ferulinska kiselina, p-kumarinska kiselina, pirolidon-karboksilna kiselina, hidroksitirosol i tirosol (Kraljić i sur., 2015). Općenito, koncentracije polifenola u rafiniranim biljnim uljima su znatno manje u odnosu na sirova ulja (Koski i sur., 2002. i Koski i sur., 2003). Međutim, rafinirana ulja mogu biti dobar izvor polifenola, ako se uzme u obzir visoko reaktivna funkcionalna skupina kanolola, on može biti pretača drugih fenolnih derivata, koji se dobivaju rafinacijom i mogu biti prisutni u jestivom repičinom ulju (Harbaum-Piayda i sur., 2010).

2.3.3. Polifenoli jestivog repičinog ulja

Jestiva ulja su rafinirana kako bi se uklonile nepoželjne tvari koje bi negativno mogle utjecati na stabilnost ulja. Proces rafinacije je podijeljen u nekoliko koraka u kojima se uklanjaju fosfolipidi, boje, prooksidativni metali i ostaci pesticida, ali se pri tome također uklone i vrijedni sastojci kao što su steroli, tokoferoli i fenoli (Thiyam-Holländer i sur., 2012). Kako repičina sačma sadrži više fenolnih kiselina u formi estera od repičine pogače (Naczki i sur., 1998), polifenoli ekstrahirani iz pogače mogli bi se dodati natrag u rafinirano ulje, kako bi se zadržao visok udio fenolnih spojeva u ulju (Thiyam i sur., 2006).

Harbaum-Piayda i suradnici (2010) su istražili koji spojevi nastaju rafinacijom ulja i prisutni su u jestivom repičinom ulju. Pokazali su da su u komercijalnom repičinom ulju i njegovom deodestilatu prisutni cis- i trans-distereoisomeritrimeri 4-vinilsiringola te dimer i trimer 4-vinilsiringola. Identificirani dimer kanolola (fenilindan) (Slika 4) prisutan je u znatnoj količini u deodestilatu procesiranog repičinog ulja, a također je bio detektiran i u

komercijalnom repičinom ulju. Istraživanje je pokazalo da ima veliki antioksidacijski potencijal (Harbaum-Piayda i sur., 2010).



Slika 4. Kemijska struktura fenilindana (Anonymous 3, 2016).

4-vinilsiringol dimer (fenilindan) nastaje tijekom rafinacije ulja, jer dolazi do dimerizacije kanolola. Fenilindan čini skoro dvije trećine svih fenolnih spojeva u jestivom repičinom ulju (Harbaum-Piayde i sur., 2010). Istraživanje Kraljić i sur. (2015), pokazalo je da fenilindan može nastati tijekom faze neutralizacije ili tijekom faze bijeljenja. Dodavanje fosforne kiseline u sirovo repičino ulje prethodno zagrijano na 95 °C značajno smanjuje količinu 4-vinilsiringol monomera i istovremeno povećava količinu dimera. Dodavanje natrijeva hidroksida dodatno smanjuje koncentraciju 4-vinilsiringola, ali također smanjuje koncentraciju dimera, što ukazuje da se dimerizacija događa samo u kiselim uvjetima.

Kraljić i suradnici (2015) su predložili mehanizam dimerizacije 4-vinilsiringola. Protoniranjem 4-vinilsiringola nastaje stabilni karbokation, koji prolazi kroz kationsku dimerizaciju s drugom molekulom 4-vinilsiringola. Nakon toga slijedi intramolekulsko zatvaranje prstena i tvorba indanske strukture dimera putem elektrofilne aromatske supstitucije. Kiselinska reakcija se provodila na temperaturi oko 100 °C što ukazuje na to da je dimer 4-vinilsiringola, odnosno fenilindan termički stabilniji od monomera, ali i drugih fenolnih spojeva koji najčešće podliježu oksidaciji na visokim temperaturama tijekom rafinacije. Udio ukupnih fenolnih spojeva u repičinom ulju smanjuje se svakim korakom procesa rafinacije. U fazi bijeljenja dolazi do gubitka fenolnih spojeva, jer može doći do toplinski inducirane oksidacije ili adsorpcije na zemlju za bijeljenje ili neki drugi adsorbens (Zschau, 2001). U fazi deodorizacije dodatno se snižava razina polifenola, jer para koja se koristi u deodorizacijskoj fazi uklanja fenolne spojeve iz ulja i time komercijalni deodestilat postaje izvor antioksidacijskih spojeva (Harbaum-Piyade i sur., 2010). Na kraju procesa rafinacije, fenilindan čini više od 60% ukupnih fenola, a svi ostali identificirani spojevi prisutni su u koncentracijama manjim od 1mg kg⁻¹ (Kraljić i sur., 2015).

2.4. BIOLOŠKI UČINCI KANOLOLA

Kanolol je jedan od najvažnijih fenolnih spojeva dobiven iz uljane repice, iz sinapinske kiseline kao prekursora. Od njegovog otkrića u ranim 2000. (Koski i sur., 2003) kanolol je privukao pažnju znanstvenika, prehrambene industrije i potrošača. Otkriveno je da ima veći kapacitet uklanjanja alkil-peroksil radikala od nekih poznatih antioksidansa kao što su α -tokoferol, vitamin C, β -karoten, rutin i kvarcetin (Wakamatsu i sur., 2005). Za kanolol je također dokazano da posjeduje antikancerogeni, antimutageni i citotoksični učinak.

Alkilhidroperoksidi su nepoželjni spojevi u oksidiranim uljima, jer postaju alkilperoksilni radikali (ROO•) u prisutnosti hema, hemoglobina ili mioglobina u crvenom mesu. ROO• su reaktivni radikali koji oštećuju nukleinske kiseline i proteine te time štete živim stanicama. „Čistači“ ROO• radikala imaju glavnu ulogu u sprječavanju nastanka štete na DNK, RNK i proteinima. Istraživanje je pokazalo kako je kanolol vrlo snažan čistač ROO• radikala, a ta anti-ROO• aktivnost bila je najviša u sirovom ulju. Dokazalo se također da se anti-ROO• aktivnost kanolola u repičinom ulju smanjuje u procesima degumiranja ulja, alkalnog pranja s 10% NaOH, bijeljenjem pri izlaganju visokim temperaturama (260°C) (Wakamatsu i sur., 2005).

Kanolol može inhibirati ne samo ROO• već i peroksinitrit (ONOO-) (Kuwahara i sur., 2004), vrlo snažan oksidirajući i nitrirajući spoj koji može uzrokovati štetu u DNK, RNK i proteinima, a povezuje se i s upalama, karcinomom, aterosklerozom i neurodegenerativnim bolestima (Wakamatsu i sur., 2005). Da kanolol ima veliki kapacitet vezanja endogenog i mutagenog peroksinitrita pokazalo je istraživanje Kuwahara i suradnika (2004) na bakterijskom soju *Salmonelle* TA 102 jer se mutageni učinak peroksinitrita smanjio, nakon što su se bakterijske stanice „zaštitile“ dodatkom kanolola. Kuwahara i suradnici (2004) su istraživali utjecaj peroksinitrita na plazmidnu DNA *Escherichie coli*. Rezultat istraživanja su pokazali da peroksinitrit kida DNA u linearne fragmente, a pri većim koncentracijama DNA poptuno nestaje. Istraživao se protektivni učinak kanolola u rasponu koncentracija od 0,1 do 100 μ M, te je dokazano da kanolol u koncentraciji većoj od 1 μ M štiti DNA od kidanja u prisutnosti 1 μ M peroksinitrita (Kuwahara i sur., 2004).

Kako bi se objasnio antioksidativni mehanizam kanolola, provedeno je istraživanje na staničnoj liniji koja potječe od humanog epitelnog pigmenta mrežnice (ARPE-19) tretiranoj s t-BH (tercijarni-butilirani hidroksid) koji stvara reaktivne kisikove radikale i tako izaziva

oštećenje stanice (Giddabasappa i sur., 2010). U istraživanju koje su provodili Dong i sur. (2011) stanice su tretirane s različitim koncentracijama kanolola i t-BH, a preživljenje stanica se mjerilo MTT metodom. Rezultati su pokazali da predtretman s kanololom smanjuje % smrtnosti stanica tretiranih s t-BH i da nastaje znatno manje reaktivnih kisikovih spojeva. Tijekom istog istraživanja mjerena je razina ekspresije različitih antioksidativnih enzima: hem oksigenaze (HO-1), katalaze, glutation S-transferaze-pi (GST-pi) nakon inkubacije stanica s različitim koncentracijama kanolola (0, 50, 100, i 200 μM) tijekom 24 sata. Rezultati istraživanja su pokazali povišenu razinu mRNA katalaze i hem oksigenaze u usporedbi sa stanicama koje nisu inkubirane s kanololom, što ukazuje na to da HO-1, katalaza i GST-pi mogu imati vrlo važnu ulogu u protektivnom djelovanju kanolola (Dong i sur., 2011).

Zaštita kanolola od oksidativnog stresa ispitana je *in vitro* na stanicama raka debelog crijeva SW480 koje su tretirane s tertbutil hidroperoksidom (t-BuOOH) ili pegiliranim cink protoporfirinom (PEG-ZnPP), induktorima unutarstaničnog oksidativnog stresa. Tertbutil hidroperoksid djeluje tako da potiče stvaranje peroksil radikala nakon kontakta s hemom ili spojevima koji sadrže hem, uključujući proteine hema, dok PEG-ZnPP koči unutarstaničnu generaciju bilirubina. Stanice su uzgajane sa ili bez oksidanasa i tretirane različitim koncentracijama kanolola. Navedeno istraživanje je pokazalo da kanolol ima antioksidativni učinak pri vrlo niskim koncentracijama (5,6 μM), jer je inhibirao nastanak ROS-ova djelovanjem PEG-ZnPP-a i spriječio apoptozu stanica uzrokovanu oksidativnim stresom potaknutim djelovanjem t-BuOOH (Kuwahara i sur., 2004).

Ekstracelularnim signalom regulirana kinaza (ERK) je jedna od glavnih mitogen-aktivirajućih protein kinaza (MAPK) i aktivira se u procesima preživljenja stanice. ERK je također dio signalne kaskade tijekom prijenosa signala sa ciljem obrane stanice od oksidativnog stresa (Thiyam-Holländer i sur., 2012). Radom Donga i suradnika (2011) pokazano je da kanolol može aktivirati fosforilaciju ERK-a u epitelnim stanicama pigmenta mrežnice (ARPE stanicama) te imati terapeutski učinak na senilnu makularnu degeneraciju i ostale bolesti mrežnice povezane s oksidativnim stresom.

Rak želuca je četvrti najčešće dijagnosticirani rak u svijetu i drugi po smrtnosti, stoga je biološki potencijal kanolola ispitivan vezano za oboljenja probavnog sustava. Istraživanjem Cao i suradnika (2008) ispitana je *in vivo* učinkovitost kanolola u sprječavanju kroničnog gastritisa i želučane kancerogeneze kao posljedica infekcije bakterijom *H. Pylori*. Razina ekspresije mRNA za iNOS, COX-2 te upalne citokine IL-1 β , IL-12 i TNF- α znatno je

zmanjena nakon primjene kanolola *in vivo* te je pokazano da kronični gastritis i razvoj karcinoma želuca mogu biti smanjeni „terapijom hranom“ s udjelom 0,1% kanolola. Protuupalni učinak kanolola potvrdili su Fang i suradnici (2013) u istraživanju na miševima kod kojih je izazvan rak debelog crijeva pomoću azoksimetana/DDS-a. Razine citokina IL-2 i TNF- α , bila je značajno snižena kod miševa nakon tretmana s kanololom. Osim toga, kanolol inhibira aktivaciju makrofaga koji pogoduju napredovanju upale, a time se smanjuje sinteza i lučenje upalnih citokina iz makrofaga (Fang i sur., 2013).

In vitro istraživanje Jianga i suradnika (2013) pokazalo je da kanolol inhibira proliferaciju i inducira apoptozu ljudskih stanica raka želuca (SGC-7901) ovisno o dozi, no istovremeno nije toksičan za normalnu staničnu liniju epitela ljudske želučane sluznice (GES-1). Navedenim istraživanjem na SCG-7901 stanicama pokazano je da kanolol smanjuje nivo ekspresije mRNA za COX-2, koji se povezuje s procesima mutageneze, mitogeneze, anti-apoptoze, angiogeneze, metastaziranja i imunosupresije. Rezultati Jiang i suradnika (2013) su pokazali 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.

2.4.1. Potencijal fenilindana

Istraživanjem Harbaum-Piayda i suradnika (2010) otkriveni su novi fenolni spojevi u komercijalnom deodestilatu i repičinom ulju, a među njima je bio najzastupljeniji dimer 4-vinilsiringola ili fenilindan. Komercijalni deodestilat je nusproizvod u procesu rafinacije ulja (deodorizacije) i sadrži visoku koncentraciju polifenolnih spojeva, najviše cis- i trans-fenilindana. Određivan je oksidativni potencijal (AOP) izoliranih fenolnih spojeva i komercijalno raspoloživih standardnih spojeva primjenom TEAC testa (*trolox equivalent antioxidant capacity*) i DPPH metodom. Izmjerene TEAC vrijednosti bile su nešto više od onih određenih DPPH metodom, ali redoslijed je bio isti: 4-vinilsiringol < sinapinska kiselina < fenilindan. TEAC vrijednost određena za fenilindan, iznosila je 3,9 i usporediva je s TEAC vrijednostima drugih polifenola u literaturi. Na primjer, flavonol kvarcetin poznat je kao snažan antioksidans, a njegova TEAC vrijednost je u rasponu 4,4 - 4,7. Aktivost i potencijal fenilindana slabo je istražen, no na temelju njegovog antioksidativnog potencijala može se pretpostaviti njegova važnost kao biološki aktivnog sastojka hrane.

2.5. IN VITRO TESTOVI ODREĐIVANJA CITOTOKSIČNOSTI

In vivo testiranja neizostavna su u procjeni toksičnosti, pri ispitivanju biološke aktivnosti prirodnih i sintetskih spojeva, ali i pri registraciji novih lijekova ili stavljanju nove kemikalije na tržište. U toksikološkim ispitivanjima, od velike je važnosti primjena *in vitro* testova toksičnosti, jer omogućuju praćenje utjecaja ispitivane tvari na razini stanice te uvid u mehanizam djelovanja te tvari. Njihovom primjenom smanjuje se broj laboratorijskih životinja potrebnih za *in vivo* ispitivanja novih kemikalija i ksenobiotika. Stoga Europska komisija potiče razvoj i primjenu alternativnih *in vitro* testova (Castaño i Gómez-Lechón, 2005) kao etički i financijski povoljniji način ispitivanja kemikalija, a u svrhu provedbe nove europske legislative za registraciju, evaluaciju i odobravanje uporabe novih kemikalija (REACH - *Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals*). Također, svjetske organizacije poput OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), FRAME (*Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments*) i ECVAM (*European Centre for Validation of Alternative Methods*) značajno doprinose i potiču razvoj, validaciju i primjenu alternativnih *in vitro* testova toksičnosti.

Alternativne *in vitro* metode, koje djelomično zamjenjuju *in vivo* istraživanja, mogu se provoditi na primarnim staničnim kulturama, konačnim i kontinuiranim staničnim linijama ili kulturama tkiva. Ovisno o predmetu izučavanja, *in vitro* metode u kombinaciji sa znanjem o testiranim spojevima te drugim metodama, kao što su fizikalno-kemijske tehnike, QSAR (*Quantitative structure–activity relationship*) modeli, metabolički i farmako-kinetički modeli, omogućuju učinkovitu procjenu toksičnosti i procjenu rizika za ljude i okoliš. Kao što je već rečeno, glavna prednost *in vitro* testova je smanjenje broja potrebnih pokusnih životinja, ali i kontrolirani uvjeti testiranja, visoka razina standardizacije, smanjenje varijabilnosti između eksperimenata, nastajanje manje količine potencijalno štetnog otpada, kraće vrijeme provođenja testiranja i smanjenje cijene cjelokupnog postupka. Naravno, postoje i nedostaci ovakvih istraživanja kao što su nemogućnost ispitivanja interakcija ispitivane tvari unutar tkiva i organa, farmako-kinetičkih parametara te određivanja kroničnog učinka (Kandárová i Letašiová, 2011). No unatoč tome, može se postići dobra korelacija između rezultata dobivenih *in vivo* i *in vitro* testovima, pri čemu je nužno provesti ispitivanja na više različitih staničnih linija primjenom različitih metoda.

Mjerenje toksičnosti *in vitro* bazira se na odgovoru stanice na djelovanje ispitivane tvari pri čemu se najčešće mjere promjene u preživljenju ili u metabolizmu stanica. Mosmann

(1983) je razvio jednostavan kolorimetrijski pristup kao test proliferacije i preživljavanja stanica. Metoda je modificirana za mjerenja kemosenzibilnosti i citotoksičnosti na humanim tumorskim staničnim linijama. To je ujedno i najčešće korišteni test koji se naziva MTT (Arisanty, 2013). MTT test se bazira na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. U primijeni su i brojni drugi testovi citotoksičnosti kao što su: bojanje bojom kristal-ljubičasto, neutral red metoda, otpuštanje laktat dehidrogenaze, test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a (Fent, 2001).

Postoji velik broj *in vitro* metoda za testiranje odgovora humanih tumorskih stanica na potencijalne kemoterapeutike. Nacionalni institut za rak (NCI, *National Cancer Institute*) je 1990. predložio primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari od malih sintetskih molekula do prirodnih ekstrakata ili čistih izoliranih tvari u definiranim rasponima koncentracija. Cilj takvog pristupa je ustanoviti relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju, a u prvih pet godina primjene ovog testa ispitano je više od 30 000 različitih sastojaka (Boyd i Paull, 1995). Budući u prirodi postoji mnoštvo biološki aktivnih tvari, od kojih mnoge posjeduju antitumorska svojstva, alternativni *in vitro* testovi koriste se u ispitivanjima potencijalno ljekovitog bilja. Pri tome se provode ispitivanja biljnih ekstrakata, frakcija ili izoliranih i pročišćenih sastojaka kako bi se odredila njihova sposobnost smanjenja rasta tumora (Arisanty, 2013). Velika raznolikost i brojnost prirodnih spojeva iz voća i povrća, odnosno općenito biljaka, već je rezultirala razvojem nekoliko antitumorskih lijekova iz prirodnih produkata koji su u kliničkoj primjeni.

Stanične linije koje se koriste u *in vitro* testovima dostupne su od strane dvije najveće kolekcije kultura stanica: *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Uzgoj životinjskih stanica u kulturi ovisi o tipu stanične linije. Većina staničnih linija je prvotno ovisna o površini za rast na koju se moraju prihvatiti da bi mogle proliferirati i to su tzv. adherentne stanice, dok su neke stanične linije prilagođene za rast u suspenziji. Za uzgoj staničnih kultura koristi se kompleksni tekući medij koji mora zadovoljavati potrebe stanica jednako kao u odgovarajućem *in vivo* sustavu. Medij je neophodan za rast i razvoj životinjskih stanica, a najvažnije komponente medija su glukoza, aminokiseline, anorganske soli i vitamini. Hranjivom mediju najčešće se dodaje i serum sisavaca (5-10 % v/v) čija su glavna komponenta različiti proteini. Serum predstavlja izvor hormona, različitih faktora kao što su faktori rasta, faktori prihvatanja i širenja stanica i

drugih specifičnih tvari potrebnih za rast stanica u kulturi. Radi sprječavanja mogućih kontaminacija, koje su najveći problem pri radu sa stanicama u kulturi, u medij za uzgoj se često dodaje smjesa antibiotika i antimikotika. Osim hranjivog medija za uzgoj, stanicama je potrebno osigurati i optimalne fizikalno-kemijske uvjete kao što su pH, temperatura, osmolalnost te odgovarajuća atmosfera. Za uspješan rast stanica sisavaca potreban je pH medija u rasponu od 7,2 -7,5, a osmolalnost u rasponu od 280-320 mOsmol/kg. Kulture stanica se najčešće uzgajaju u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂. Optimalna temperatura za uzgoj pojedine vrste stanica odgovara tjelesnoj temperaturi organizma iz kojeg su te stanice potekle pa je tako optimalna temperatura za uzgoj stanica sisavaca 37 °C .

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ovom diplomskom radu ispitan je učinak kanolola i fenilindana, spojeva izoliranih u Laboratoriju za tehnologiju masti i ulja, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Navedeni polifenolni spojevi izolirani su iz sirovog repičinog ulja izuzetog iz pogona rafinerije tvornice ulja Zvijezda d.d., Zagreb, te jestivog repičinog ulja istog proizvođača komercijalno dostupnog na hrvatskom tržištu. Njihova identifikacija i kvantifikacija provedeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV detekciju (DAD detektor) kako je opisano u radu Kraljić i sur. (2015)(Bertoša, 2015).

3.1.2. Kemikalije

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

2, 2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD

6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka

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

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

Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

MTS3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, Promega, Madison, USA

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

3.1.3. Otopine i puferi

▪ PBS PUFER (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

▪ ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC METODOM

Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7)

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode)	39 mL
Dinatrijev hidrogenfosfat (5,687 g do 200 mL destilirane vode)	61 mL
Destilirana voda	do 200 mL

Otopina fluoresceina

Ishodna otopina 1: otopiti 15 mg fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Ishodna otopina 2: 100 µL ishodne otopine 1 nadopuniti sa 10 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Ishodna otopina 3: 50 µL ishodne otopine 2 nadopuniti sa 50 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Otopina AAPH

AAPH	0,207 g
Fosfatni pufer (0,075 M)	do 5 mL

▪ ZA BOJANJE STANICA KRISTAL LJUBIČASTIM

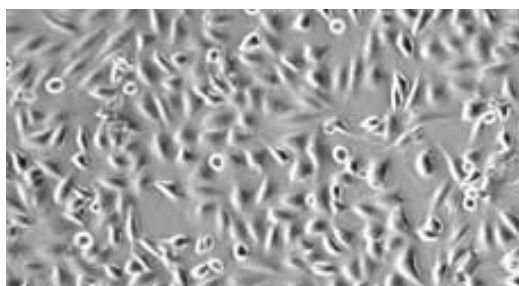
0,2 % otopina kristal-ljubičasto

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

3.1.4. Humane stanične linije

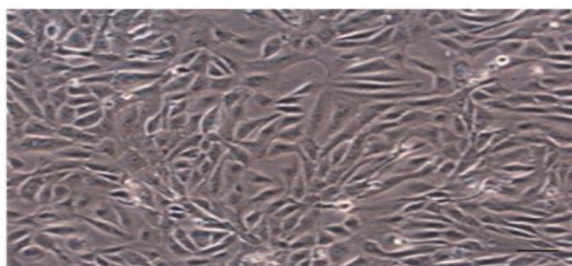
Dvije najveće kolekcije kultura stanica su *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC), a u ovom istraživanju korištene su tri humane stanične linije, dvije tumorske HeLa i MCF-7 i „normalna“ HEK293T, dobivene iz ATCC banke stanica.

HeLa stanice (Slika 5) potječu od karcinoma cerviksa pacijentice Henriette Lacks po kojoj su stanice i dobile ime. To su prve ljudske stanice uspješno uzgojene u laboratoriju i od tada su najviše korištene ljudske stanice u biologiji. Stanice se neprestano repliciraju i zbog toga su odlične za eksperimentalnu biologiju (Anonymous 4, 2016).



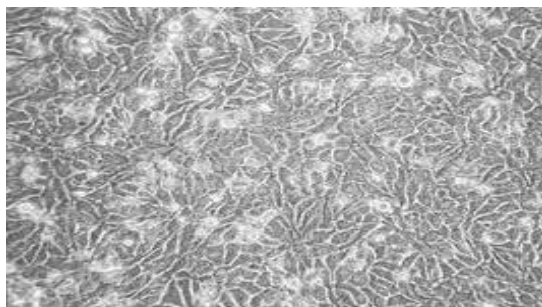
Slika 5. HeLa stanice (Anonymous 5, 2016) .

MCF-7 stanična linija (Slika 6) je prvi put izolirana 1970. iz tkiva dojke šezdesetogodišnje žene. Stanice potječu od malignog pleuralnog izljeva pacijentice sa metastaznom bolešću. Naziv stanica potječe od *Michigan Cancer Foundation-7*, instituta u Detroitu gdje je stanična linija i uspostavljena 1973.g (Anonymous 6, 2016).



Slika 6. MCF-7 stanice (Anonymous 7, 2016.)

HEK293T stanična linija (Slika 7) dobivena je iz stanice bubrega humanog embrija uzgojene u kulturi tkiva. Izvor stanica je bio zdrav, abortirani fetus. Ime HEK293T su dobile jer je to bio 293. eksperiment Franka Grahama (Anonymous 8, 2016).



Slika 7. HEK293T stanice (Anonymous 8, 2016).

Uzgoj stanica provodi se u plastičnim T-bocama ravnih stjenki ili u Petrijevim zdjelicama za održavanja biomase stanica te u pločama s jažicama za postavljanje pojedinačnih pokusa i ispitivanje biološke aktivnosti kanolola i fenilindana. Uzgoj stanica provodi se u kontrolirani uvjeti u inkubatoru s atmosferom koja se sastoji od 95 % zraka i 5 % CO₂ i pri temperaturi 37°C. Stanice su uzgajane u DMEM mediju uz dodatak 10% (v/v) FBS-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

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

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

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Neubauer-ova komorica

Petrijeve zdjelice

UV spektrofotometar, Cary 3, Varian, Madison, SAD

Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka

Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija i identifikacija polifenola sirovoga i jestivoga repičinoga ulja

Izolacija i identifikacija polifenola sirovog i jestivog repičinog ulja (Tablica 1) provedena je u Laboratoriju za tehnologiju masti i ulja, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu (Bertoša, 2015). Korišteno je sirovo repičino ulje izuzeto iz pogona rafinerije Zvijezda d.d., Zagreb, te jestivo repičino ulje istog proizvođača komercijalno dostupno na hrvatskom tržištu.

Tablica 1. Iskorištenje procesa izolacije i pročišćavanja polifenolnih spojeva iz sirovoga i jestivoga repičinoga ulja (RU)

Vrsta ulja/spoj	Masa izolata (mg)	Teorijski prisutno u ulju uzetom za ekstrakciju (mg)	Masa izoliranog spoja određena HPLC-om (mg)	Iskorištenje procesa izolacije (%)
Sirovo RU/ Kanlolol	77,0	56,1	22,04	39,29
Jestivo RU/ Fenilindan	49,3	8,9	2,15	24,16

Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva provedeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV detekciju (DAD detektor). U tu svrhu uzorak je pripremljen modificiranom metodom International Olive Council-a (IOC, 2009). Identifikacija polifenolnih spojeva (Tablica 2) provedena je usporedbom retencijskih vremena razdvojenih pikova (Rt) s vremenom zadržavanja standarda.

Tablica 2. Sastav polifenola sirovoga i jestivoga repičinoga ulja (RU)

Fenolnispoj (mg sinapinske kiseline kg⁻¹ulja)	Sirovo RU	Jestivo RU
Vanilin	0,19	nd
Siringaldehid	3,22	nd
Kanolol	233,93	nd
Fenilindan	nd**	18,43
n.i.*	26,22	nd
Ukupno	263,55	18,43

* nije identificirano; ** nije detektirano

3.2.2. Priprema otopine kanolola i fenilindana

Kanolol i fenilindan smo dobili kao liofilizirane uzorke. Liofilizirani kanolol mase 24,3 mg otopljen je u 2 mL etanola, sterilno profiltriran i čuvan na -20 °C. Tako pripremljena ishodna otopina kanolola molarne koncentracije 67,5 mM korištena je u pokusima ispitivanja njegove biološke aktivnosti. Otopina fenilindana pripremljena je tako da je liofilizirani fenilindan mase 6,1 mg otopljen u 1 mL etanola, sterilno profiltriran i čuvan na -20 °C. Molarna koncentracija ishodne otopine fenilindana iznosila je 16,94 mM. Daljnja razrjeđenja ishodnih otopina kanolola i fenilindana rađena su direktno u mediju za uzgoj, neposredno prije svakog pokusa.

3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti kanolola i fenilindana na MCF-7, HeLa i HEK293T staničnim linijama

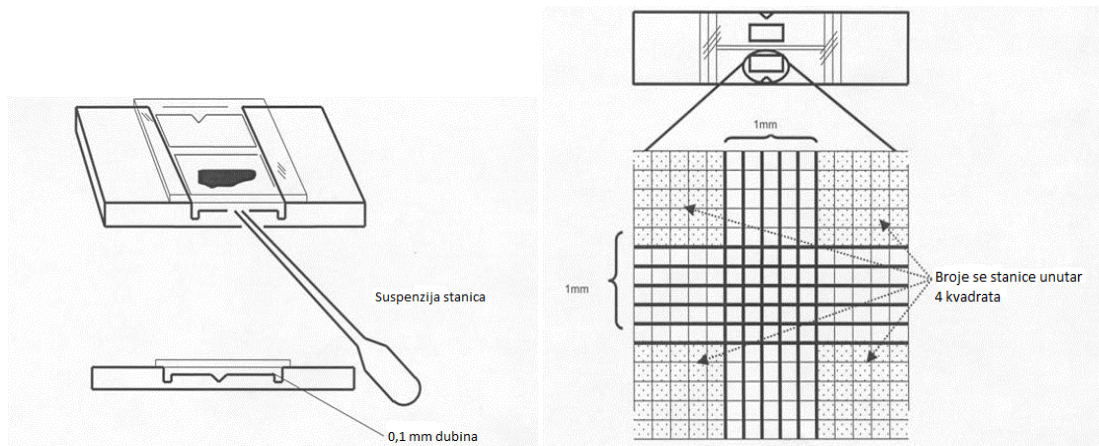
Prilikom rada u laboratoriju za tehnologiju životinjskih stanica potrebno je primjenjivati sterilne tehnike rada i održavati aseptične uvjete kako ne bi došlo do neželjene kontaminacije mikroorganizmima. MCF-7, HeLa i HEK293T stanice su održavane u

Petrijevim posudama za potrebe umnožavanja biomase stanica i postavljanja pojedinačnih pokusa. Morfologija stanica, njihovo opće stanje i brojnost provjerava se pod inverznim mikroskopom, a precjepljivanje stanica nužno je provesti kad je gustoća stanica oko 80%. Stoga su stanice pasazirane otprilike svaka 4 dana kako bi se održavale u eksponencijalnoj fazi rasta. MCF-7, HeLa i HEK293T su stanice adherentnog tipa te su prije postavljanja pokusa tretirane tripsinom kako bi se odvojile od podloge. Nakon toga je izbrojan ukupan broj stanica metodom tripan-plavo te je izračunat volumen suspenzije stanica potreban za nacjepljivanje ploče s 96 jažica za svaku staničnu liniju. U svaku je jažicu nacijepljeno po 100 μL suspenzije stanica početne koncentracije oko 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu, odnosno 24 sata nakon nacjepljivanja, tretirane su s različitim koncentracijama kanolola (50 μM , 200 μM , 350 μM , 500 μM) i fenilindana (5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200, 350, 500 μM). U svakom pokusu za svaku koncentraciju postavljeno je pet paralela, a svaki pokus ponovljen je tri puta. Kontrolnim stanicama je dodan odgovarajući volumen etanola, koji je korišten za otapanje kanolola i fenilindana. Nakon 72 sata tretmana stanica, MTS metodom određena je vijabilnost stanica i izražena kao % preživljenja u odnosu na kontrolne stanice. Eksperimentalni podaci dobiveni pri određivanju citotoksičnog učinka navedenih spojeva aproksimirani krivuljom koja ih najbolje opisuje. Regresijskom analizom odabrana je ona krivulja koja najmanje odstupa od eksperimentalnih podataka tj. ona čija je vrijednost koeficijenta determinacije R^2 bliža 1 ($R^2 \sim 1$). Rješavanjem pripadajuće jednadžbe izračunata je EC_{50} vrijednost, koja definira onu koncentraciju ispitivane tvari koja inhibira rast 50% stanica u kulturi.

3.2.3.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Ukupan broj stanica određuje se brojanjem stanica uz dodatak boje tripan-plavo (0,4% m/v), koja omogućuje razlikovanje mrtvih, plavih stanica od živih stanica koje ostaju neobojane i svjetlije. Stanice se pripreme za brojanje tako da se najprije ukloni hranjivi medij i zatim doda potreban volumen otopine tripsina koji odvaja stanice od podloge. Stanice se vrate natrag u inkubator na oko 5 min kako bi tripsin djelovao, a povremeno se pod inverznim mikroskopom pogleda jesu li se stanice zaokružile i odvojile od površine. Nakon toga, dodaje se određen volumen medija sa serumom, koji je jednak volumenu tripsina, kako bi se zaustavilo njegovo daljnje djelovanje na stanice. Stanice se resuspendiraju te se uzme 20 μL

aliquota suspenzije stanica i pomiješa se s 20 μL boje tripan-plavo. Zatim se sa 20 μL tako pripremljene suspenzije napuni Neubauer-ova komorica za brojanje (Slika 8).



Slika 8. Neubauer-ova komorica (Anonymous 11, 2016).

Brojanje se vrši unutar četiri kvadratića, a broj stanica po mL suspenzije se izračuna iz izraza:

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

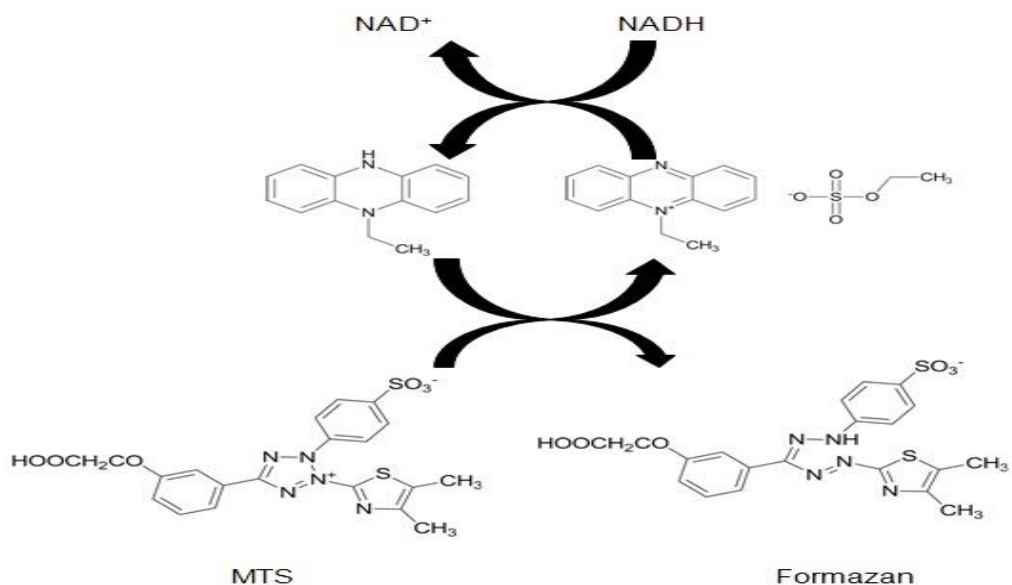
3.2.3.2. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Kako bismo lakše uočili i fotografirali promjene u izgledu MCF-7, HeLa i HEK293T stanica tijekom tretmana kanololom i fenilindanom, stanice su nacičepljene u ploču s 12 jažica i tretirane kanololom (50 i 500 μM) i fenilindanom (10 i 200 μM). Nakon 72 sata tretmana uklonjen je medij za uzgoj te su stanice isprane dodatkom PBS pufera, a zatim je dodana otopina boje kristal-ljubičasto u dovoljnoj količini da prekrije dno jažice za uzgoj stanica. Ploča je je vraćena u inkubator na 20-tak min do pola sata, nakon čega je uklonjena boja, stanice su isprane PBS puferom te slikane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

3.2.3.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

MTS test je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, kao i za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva te za određivanje protutijela koja inhibiraju rast. Princip testa je baziran na MTT metodi koju je opisao Mosmann (1983) kao brzu kolorimetrijsku metodu za praćenje stanične proliferacije i citotoksičnosti. Danas se koriste razne tetrazolijeve soli (MTS, WST-1 te XTT) koje su supstrati za djelovanje mitohondrijskih dehidrogenazau živim stanicama. Veći broj živih stanica rezultira većom aktivnošću mitohondrijskih dehidrogenaza u uzorku što je proporcionalno povećanju inteziteta boje koje daje obojeni produkt formazan i direktno upućuje na broj metabolički aktivnih tj. živih stanica u kulturi. Prednost navedenih tetrazolijevih soli naspram klasičnog MTT-a je da se one djelovanjem enzima reduciraju do formazana ljubičaste boje koji je otopljen u mediju, čime je izbjegnuta dodatni korak otapanja kristala formazana primjenom organskog otapala.

Ova skupina tetrazolijevih reagenasa koristi se u kombinaciji s intermedijarnim akceptorom elektrona poput fenazin metil sulfata (PMS) ili fenazin etil sulfata (PES), koji mogu ući u žive stanice, reducirati se u citoplazmi ili na površini stanice i izaći iz stanice gdje onda prevode tetrazolijevu sol u topljivi formazanski produkt. Opća reakcijska shema za ovaj razred tetrazolijevih reagenasa prikazana je na slici 9 (Anonymous 12, 2016).



Slika 9. Intermedijarni akceptor elektrona fenazin etil sulfat (PES) prenosi elektrone iz NADH u citoplazmi i reducira MTS dodan u mediju za uzgoj u topljivi oblik formazana (Anonymous 13, 2016).

HEK293T, HeLa i MCF-7 stanice bile su izložene različitim koncentracijama kanolola i fenilindana tijekom 72 sata, kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.2. Nakon toga se ukloni medij iz jažica i doda svježi medij s MTS reagensom (10 μ L MTS reagens/100 μ l medija) u svaku jažicu. Ploča se potom vrati u inkubator i inkubira sljedeća 2-4 sata na temperaturi 37 °C. Intenzitet razvijene boje očitava se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri 490 nm u odnosu na slijepu probu. Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica.

3.2.4. Određivanje mogućeg zašitnog utjecaja kanolola i fenilindana na MCF-7, HeLa i HEK293T stanice u kojima je potaknut oksidativni stres dodatkom H₂O₂

Sve tri stanične linije nacijepnjene su na ploče s 96 jažica. U svaku je jažicu nacijepnjeno po 100 μ L suspenzije stanica početne koncentracije 3×10^4 stanica mL⁻¹. Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu, odnosno 24 sata nakon nacijepnjivanja, tretirane su s odabranom koncentracijom kanolola (50 μ M) i fenilindana (5 μ M), koja nije pokazala inhibitorni učinak na te iste stanice. Nakon 24 sata u stanicama je potaknut oksidativni stres dodatkom H₂O₂ (50 μ M). 24 sata nakon dodatka H₂O₂, MTS metodom određena je vijabilnost stanica i izražena kao % preživljenja u odnosu na kontrolne stanice. Na istoj ploči su bile po 4 paralele stanica koje su tretirane samo kanololom (50 μ M), samo fenilindanom (5 μ M), samo H₂O₂ (50 μ M) te naravno kontrolne, netretirane stanice.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip ORAC metode temelji se na inhibiciji peroksil radikala (ROO[•]), koji nastaje iz substrata AAPH. Peroksil radikal oksidira fluorescein pri čemu nastaje produkt koji ne fluorescira što se prilikom mjerenja manifestira smanjenjem inteziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala i oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993).

Mjerenje ORAC vrijednosti

Mjerenje se provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz λ_{eks} = 485 nm i λ_{em} =520 nm. Ishodne otopine kanolola (67,5 mM) i fenilindana (16,94 mM) razrijeđene su i to kanolol 3000 puta, odnosno fenilindan 6000 puta. U kivetu za mjerenje doda se 2,250 mL

fluoresceina i 0,375 mL uzorka kojem se određuje ORAC vrijednost. Otopine se termostatiraju 30 min na 37 °C u vodenoj kupelji. Nakon 30 min dodaje se 0,375 mL otopine AAPH te se spektrofotometrijski mjeri promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu. Na isti način pripravi se i slijepa proba, za čije se mjerenje umjesto uzorka rabi fosfatni pufer (0,075 mol L⁻¹). Kao standard se koristi otopina Trolox-a (25 μmol L⁻¹), pripravljena iz ishodne otopine (500 μmol L⁻¹).

Izračun ORAC-vrijednosti

ORAC–vrijednosti računaju se prema formulama:

$$\text{Relativna ORAC-vrijednost} = \left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}} \right) \times k \times a \times h [\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1} \text{ uzorka}]$$

$$AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n/R_1) \quad [3]$$

pri čemu je:

- AUC_U = antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC_{SP} = antioksidacijski kapacitet slijepa probe
- AUC_{TRX} = antioksidacijski kapacitet Troloxa
- k = faktor razrjeđenja
- a = molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{V_{ekstrakta}}{g_{uzorka}}$

3.3. OBRADA PODATAKA

Sva mjerenja su provedena u paralelama, tako da su rezultati prosječne vrijednosti dva ili više mjerenja, ovisno o pokusu, te su iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (\pm S.D.).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

Brassica napus L., spp. *Oleifera* poznata kao uljana repica jedna je među 100 vrsta *Brassica* roda i izvrstan je izvor fenolnih spojeva. Uljana repica sadrži više fenolnih spojeva nego ijedna druga uljarica (Naczki i sur., 1998), ali njihova koncentracija u ulju značajno ovisi o postupku proizvodnje (Kraljić i sur., 2015). Najvažnija fenolna kiselina uljane repice je sinapinska kiselina i njeni derivati: sinapoil glukoza i sinapin, kolin ester sinapinske kiseline (Hüsken i sur., 2005).

4-vinilsiringol izoliran je iz sirovog kanola ulja, jedne od sorti uljane repice, te su navedeni spoj Wakamatsu i sur. (2005) nazvali kanolol. Kanolol je glavni fenolni spoj u sirovom repičinom ulju i derivat je sinapinske kiseline. Formira se u repičinom ulju putem dekarboksilacije sinapinske kiseline tijekom prešanja ulja na visokoj temperaturi i tlaku. Topljiv je u lipidima, ima snažno antitumogeno i antioksidacijsko djelovanje, odnosno veliku sposobnost vezanja radikala. Zbog svog lipofilnog karaktera ima veliki afinitet za staničnu membranu i druge biološke membrane, što mu omogućuje i veću reaktivnost (Khattab i sur., 2014). Nažalost, kanolol se potpuno izgubi tijekom prerade ulja, stoga se predlaže njegova izolacija iz pogače i dodavanje natrag u ulje. Prženjem sjemenki uljane repice povećava se sadržaj kanolola, a temperatura u velikoj mjeri utječe na količinu kanolola koji nastaje. Idealna temperatura od 160 °C dovodi do povećanja sadržaja kanolola, a više temperature dovode do njegove redukcije (Zheng i sur., 2014).

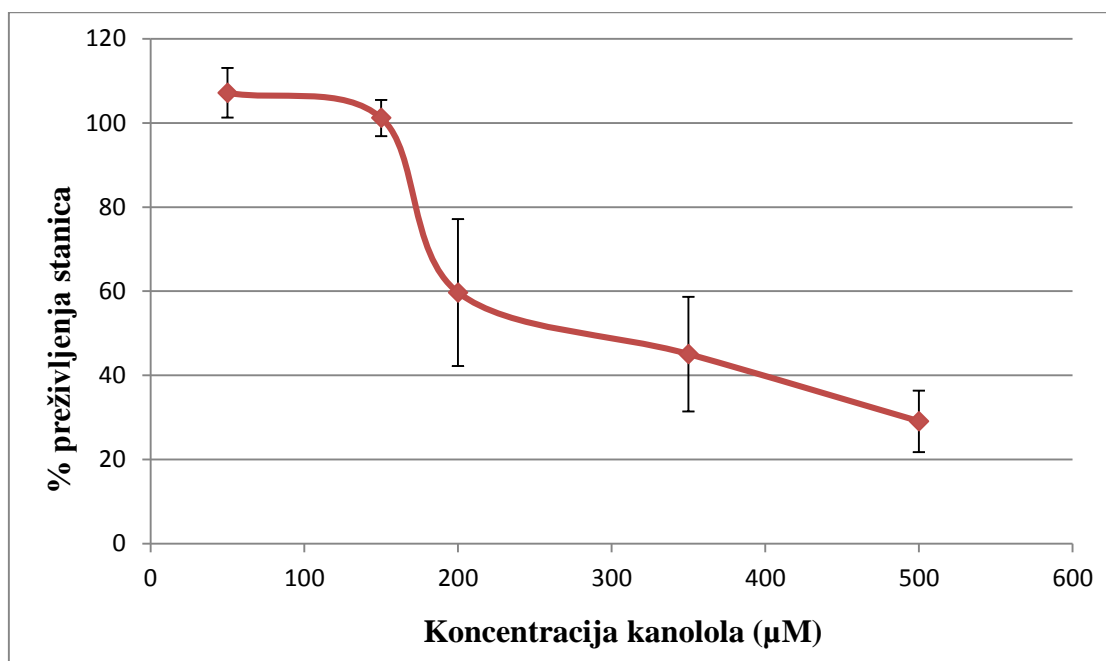
Kanolol zbog svoje funkcionalne skupine ima visoku reaktivnost te može biti prekursor za formiranje novih fenolnih derivata. Harbaum-Piayda i suradnici (2010) su istražili koji spojevi nastaju iz kanolola u komercijalnom repičinom ulju i njegovom deodestilatu te su potvrdili prisutnost cis-i trans-diastereoizomera 4-vinilsiringol dimera kao i vinilsiringol trimera. Novo identificirani dimer kanolola, nazvan fenilindan, prisutan je u znatnoj količini u deodestilatu precesiranog repičinog ulja, a također je detektiran i u komercijalnom repičinom ulju. Navedeno istraživanje pokazalo je da ima veliki antioksidacijski potencijal, no njegovo biološko djelovanje tek treba ispitati. Fenilindan nastaje tijekom rafinacije ulja jer dolazi do dimerizacije kanolola, a Kraljić i suradnici (2015) su otkrili da fenilindan može nastati i tijekom faze neutralizacije ulja i tijekom faze bijeljenja.

Polifenolni spojevi, kanolol i fenilindan, ispitani u ovom radu ekstrahirani su u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu prema metodi objavljenoj u radu Kraljić i suradnici (2015). Sastav i udjel polifenola određen je HPLC metodom uz UV detekciju. Polifenolni spojevi identificirani su usporedbom vremena zadržavanja i njihovih UV spektara dobivenih nakon injektiranja standarada.

Nakon izolacije i pročišćavanja kanolola i fenilindana iz sirovog i jestivog repičinog ulja, provedeno je ispitivanje njihove biološke aktivnosti na trima humanim staničnim linijama (HEK293T, MCF-7 i HeLa). Također, spektrofluorimetrijskom ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet kanolola i fenilindana.

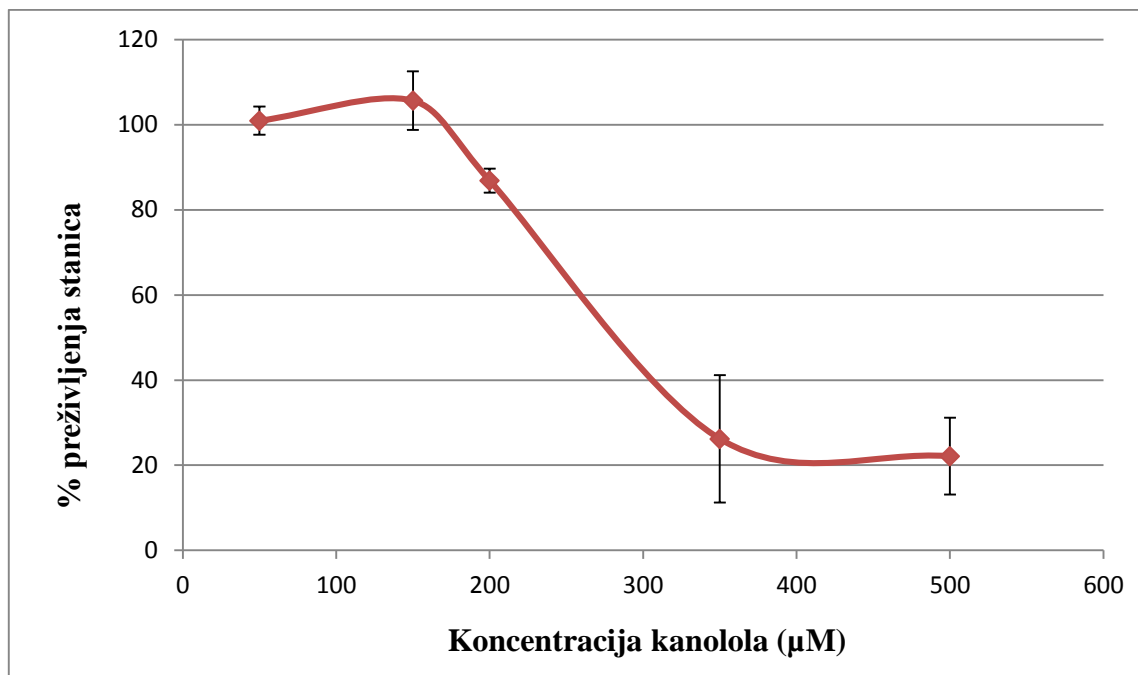
4.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST KANOLOLA NA MCF-7, HeLa I HEK293T STANIČNIM LINIJAMA

MCF-7, HeLa i HEK293T stanice nacijepnjene su u ploče s 96 jažica. Početna koncentracija stanica je iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata stanice su tretirane s pet različitih koncentracija kanolola (50, 150, 200, 350, 500 μM), dok je kontrolnim stanicama dodan etanol, koji je korišten kao sredstvo za otapanje liofiliziranog kanolola. Nakon 72 sata tretmana, MTS metodom određena je vijabilnost stanica. Rezultati mjerenja izraženi su kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice i prikazani su na slikama 10, 11 i 12.



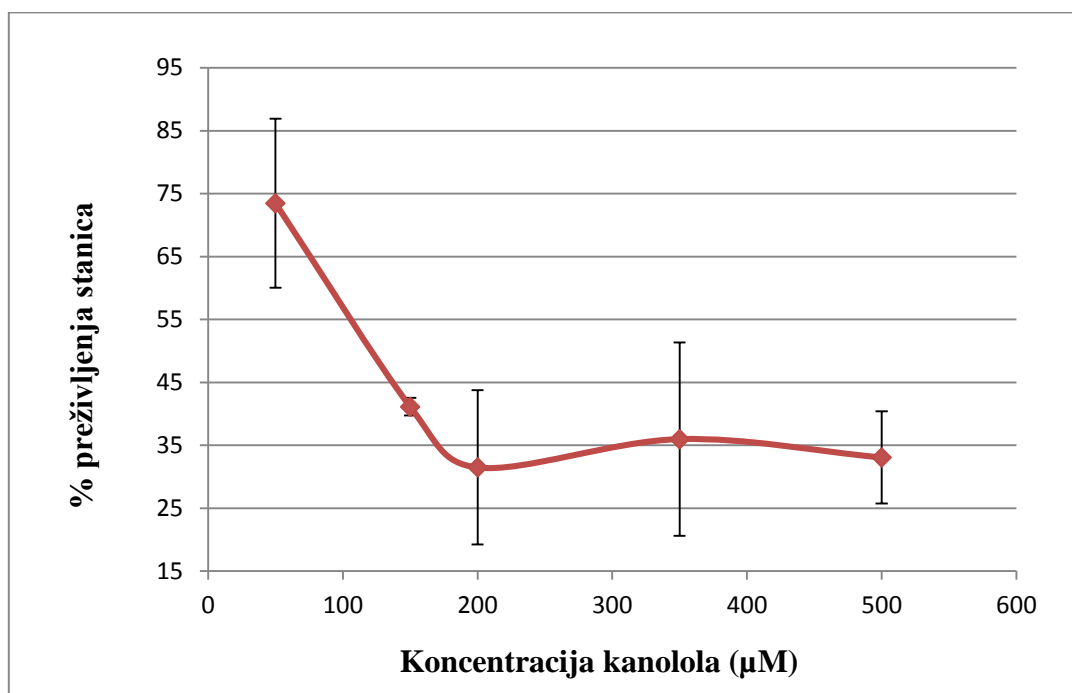
Slika 10. Utjecaj kanolola na MCF-7 stanice pri koncentracijama 50-500 μM

Iz dobivenih rezultata može se uočiti da kanolol pokazuje citotoksični učinak na proliferaciju MCF-7 stanica pri koncentracijama $\geq 150 \mu\text{M}$. Zapaženi učinak ovisan je o primjenjenoj koncentraciji, a najjači je pri koncentraciji 500 μM kanolola.



Slika 11. Utjecaj kanolola na HeLa stanice pri koncentracijama 50-500 µM

Na temelju prikazanih rezultata može se uočiti da kanolol pokazuje inhibitoran učinak na rast HeLa stanica pri koncentracijama većim od 200 µM. Postotak preživljenja stanica smanjuje s porastom koncentracije kanolola, a pri koncentraciji 500 µM postotak preživljenja stanica je 20%. Dobiveni rezultati su sukladni rezultatima koje su dobili Cao i suradnici (2008) kada su istraživali biološku aktivnost kanolola na životinjskom modelu pustinjaškog skočimiša i rezultatima koje su dobili Jiang i suradnici (2013) na ljudskim stanicama raka želuca (SCG-7091). Za kanolol je dokazano kako sprječava gastritis i želučanu karcinogenezu uzrokovanu bakterijom *H. Pylorikod* pustinjaškog skočimiša (Cao i sur., 2008). Jiang i suradnici (2013) su dokazali da kanolol inhibira proliferaciju i inducira apoptozu ljudskih stanica raka želuca ovisno o dozi *in vitro*.



Slika 12. Utjecaj kanolola na HEK293T stanice pri koncentracijama 50-500 µM

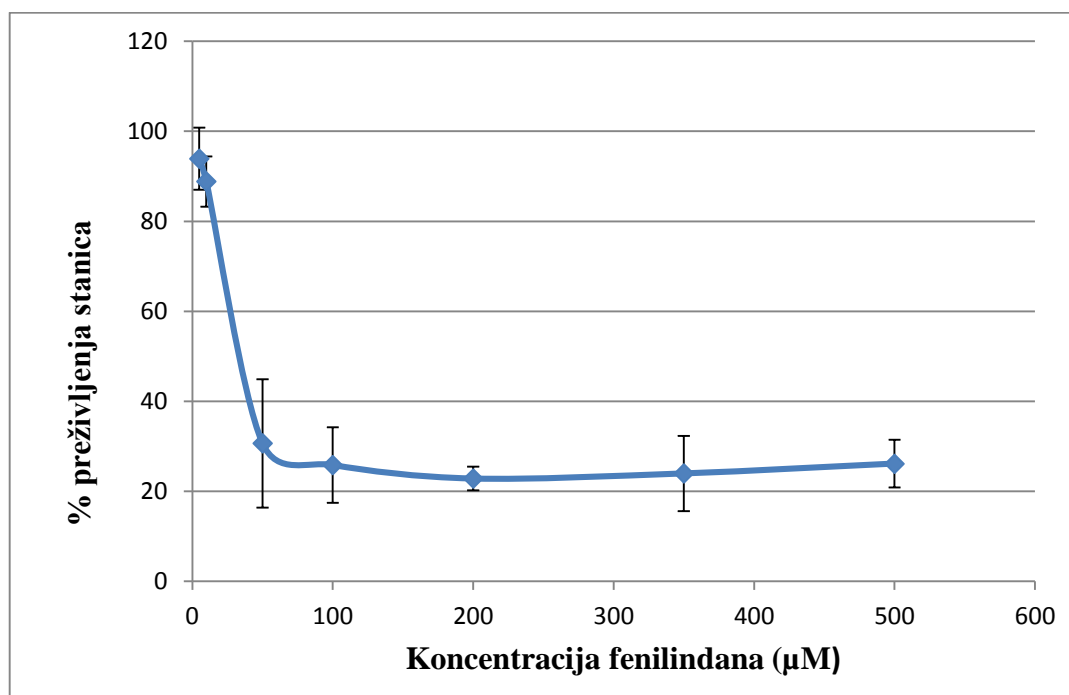
Iz dobivenih rezultata možemo uočiti da kanolol djeluje citotoksično na HEK293T stanice pri koncentracijama većim od 50 µM, a postotak preživljenja stanica smanjuje se s porastom koncentracije. U tablici 3 prikazane su EC_{50} vrijednosti kanolola za sve tri stanične linije tj. koncentraciju kanolola pri kojoj je inhibiran rast 50% stanica.

Tablica 3. EC_{50} vrijednosti kanolola za MCF-7, HeLa i HEK293T staničnu liniju

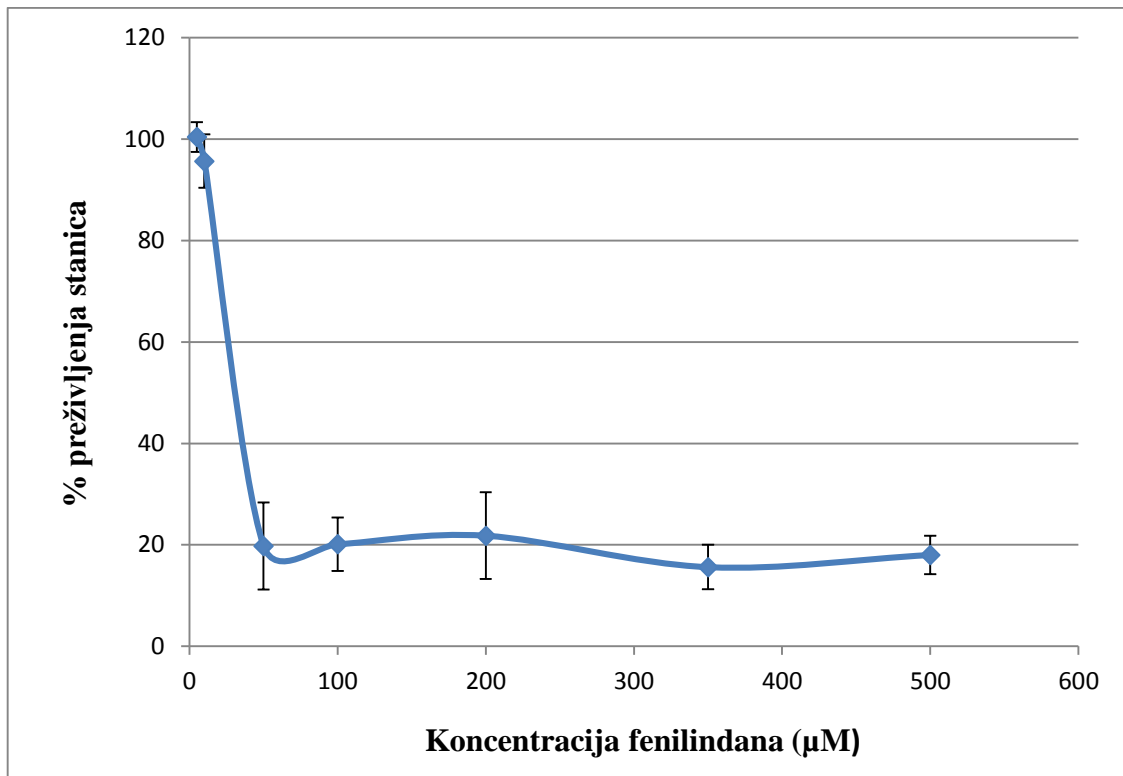
STANIČNA LINIJA	EC_{50} VRIJEDNOST (µM)
MCF-7	318,247
HeLa	282,833
HEK293T	131,406

4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST FENILINDANA NA MCF-7, HeLa I HEK293T STANIČNIM LINIJAMA

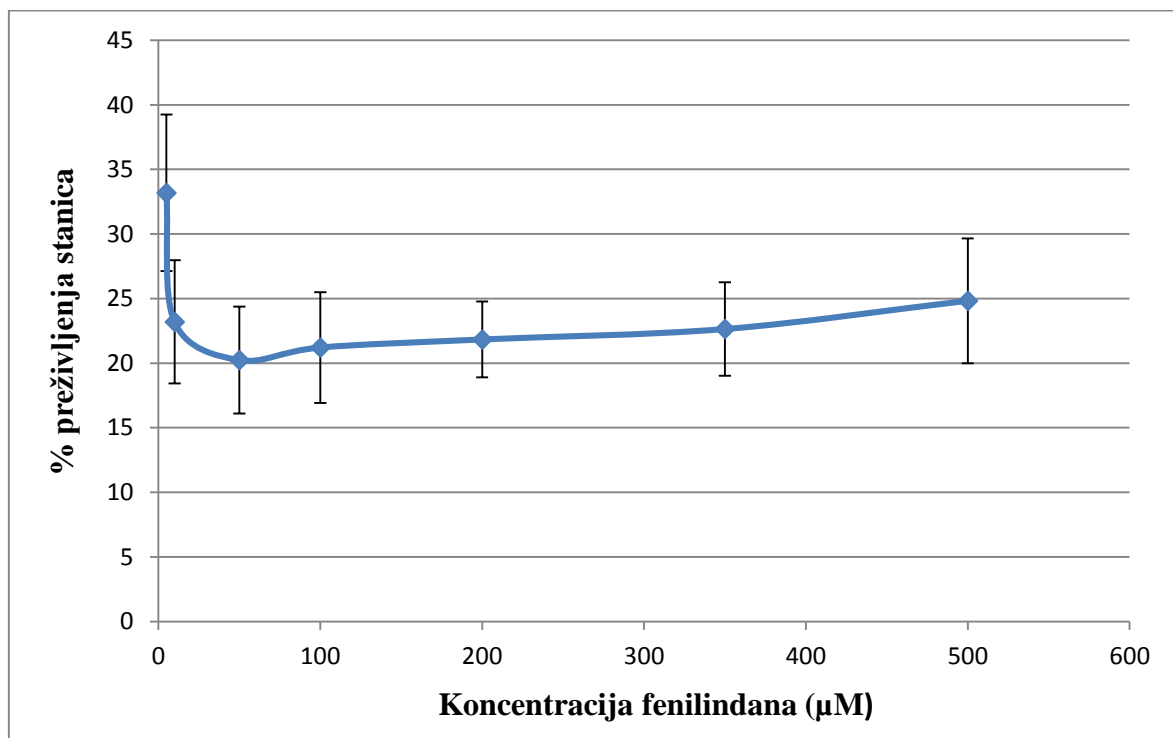
MCF-7, HeLa i HEK293T stanice nacijepljene su u ploče s 96 jažica. Početna koncentracija stanica je iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata stanice su tretirane s različitim koncentracijama fenilindana (5, 10, 50, 100, 200, 350, 500 μM) dok je kontrolnim stanicama dodan etanol, koji je korišten kao sredstvo za otapanje liofiliziranog fenilindana. Nakon 72 sata tretmana, MTS metodom određena je vijabilnost stanica. Rezultati mjerenja su izraženi kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice i prikazani su na slikama 13, 14, 15.



Slika 13. Utjecaj fenilindana na MCF-7 stanice pri koncentracijama 5-500 μM



Slika 14. Utjecaj fenilindana na HeLa stanice pri koncentracijama 5-500 µM



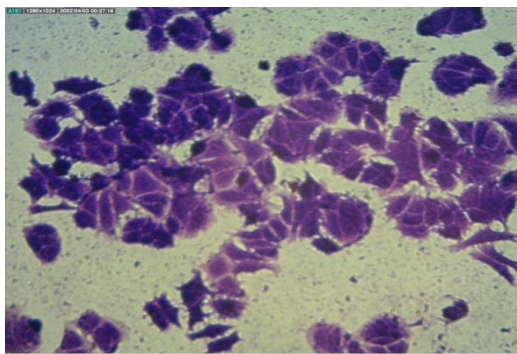
Slika 15. Utjecaj fenilindana na HEK293T stanice pri koncentracijama 5-500 µM

Iz rezultata prikazanih na slikama 13, 14 i 15 vidljivo je da fenilindan pokazuje citotoksičan utjecaj na sve tri stanične linije pri znatno nižim koncentracijama nego kanolol. Obzirom na malo podataka i radova o citotoksičnom djelovanju fenilindana u prvom pokusu su ispitane iste koncentracije kao za kanolol (50-500 μM) no budući je kod 50 μM fenilindana postotak preživljenja stanica bio izrazito nizak (oko 20%) u narednim pokusima ispitane su koncentracije $<50 \mu\text{M}$. Na slici 15. prikazani su rezultati utjecaja fenilindana na HEK293T staničnu liniju gdje je najmanja ispitana koncentracija fenilindana (5 μM) izazvala veliku smrtnost stanica te je postotak preživljenja bio samo 30-35 %. Iz ovih rezultata možemo zaključiti kako fenilindan ima veći citotoksični utjecaj na MCF-7, HeLa i HEK293T stanice od kanolola, jer pri nižim koncentracijama uzrokuje puno veću smrtnost stanica. U tablici 4 prikazane su EC_{50} vrijednosti fenilindana izračunate za sve tri stanične linije.

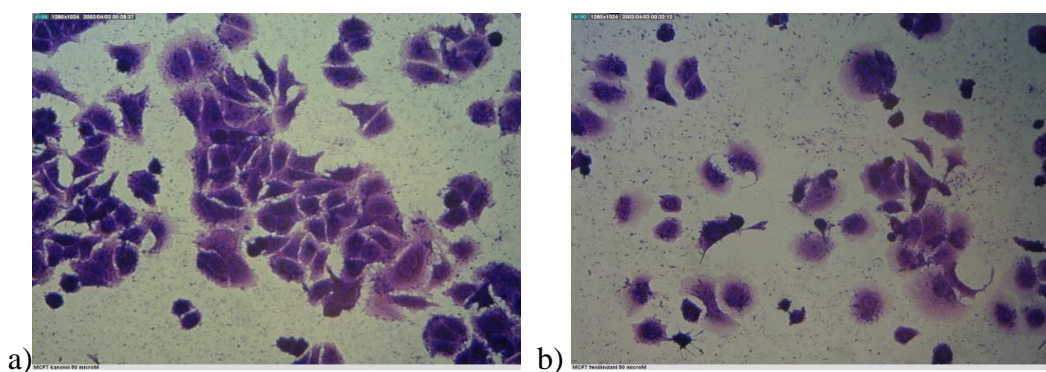
Tablica 4. EC_{50} vrijednost fenilindana za MCF-7, HeLa i HEK293T stanične linije

STANIČNA LINIJA	EC_{50} VRIJEDNOST (μM)
MCF-7	51,187
HeLa	46,453
HEK293T	2,87365

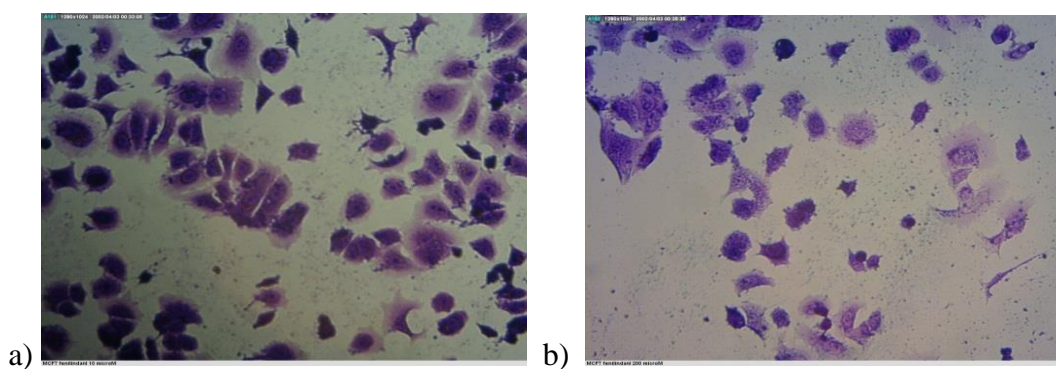
Pri radu sa staničnim linijama izgled stanica svakodnevno se prati pod svjetlosnim mikroskopom. Kada su stanice tretirane nekom ispitivanom tvari u svrhu ispitivanja citotoksičnosti moguće je uočiti promjene na stanicama koje se događaju kao posljedica tretmana. Da bi uočene morfološke promjene bile bolje vidljive MCF-7 i HeLa stanice su nacičepšene u ploču s 12 jažica i tretirane s odabranim koncentracijama kanolola (50 i 500 μM) i fenilindan (10 i 200 μM) tijekom 72 sata. Nakon tretmana, stanice su obojane kristal ljubičastom bojom i fotografirane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom, što je prikazano na slikama 16,17,18,19,20 i 21.



Slika 16. Kontrolne MCF-7 stanice, netretirane



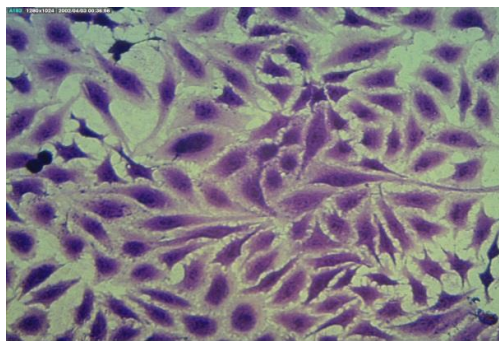
Slika 17. MCF-7 stanice tretirane s a) 50 μM i b) 500 μM kanolola



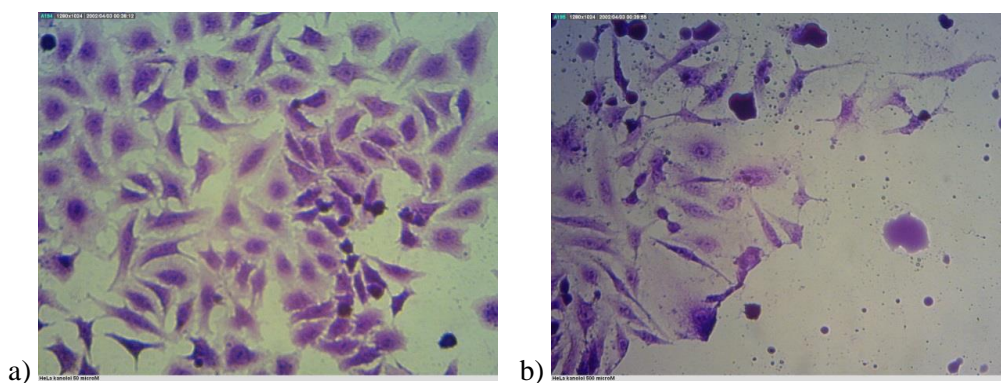
Slika 18. MCF-7 stanice tretirane s a) 10 μM i b) 200 μM fenilindana

Na slikama 16, 17 i 18 možemo uočiti razliku između kontrolnih, netretiranih MCF-7 stanica i stanica tretiranih s kanololom i fenilindanom. Na slikama 17 i 18 vidljiva je u odnosu na kontrolne stanice (slika 16) manja gustoća stanica, koja je to manja što je

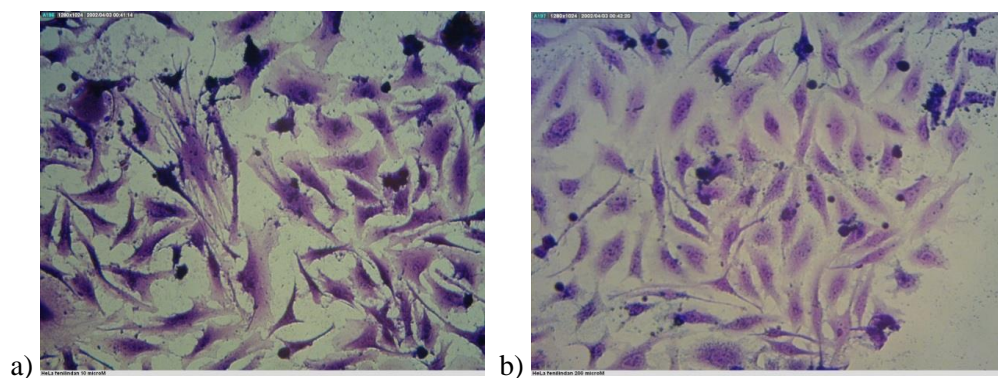
koncentracija spoja veća, što je u skladu s rezultatima citotoksičnosti. Također, vidljiv je gubitak kontakata stanica te se mogu uočiti tamnije obojane i zaokružene stanice (slika 17b i 18b), što možemo pripisati kondenzaciji kromatina u procesu apoptoze. Stoga bi u nastavku istraživanja svakako bilo zanimljivo ispitati je li zapažena citotoksičnost kanolola i fenilindana posljedica odumiranja stanica procesom programirane stanične smrti.



Slika 19. Kontrolne HeLa stanice, netretirane



Slika 20. HeLa stanice tretirane s a) 50 μM i b) 500 μM kanolola



Slika 21. HeLa stanice tretirane s a) 10 μM i b) 200 μM fenilindana

Na slikama 19, 20 i 21 vidljiva je razlika između kontrolnih HeLa stanica i onih tretiranih s kanololom i fenilindanom. Slično kao kod MCF-7 stanica i ovdje je vidljivo smanjenje gustoće monosloja ovisno o koncentraciji ispitivanog spoja, a u odnosu na gustoću netretiranih HeLa stanica. Također je vidljiva pokoje tamnije obojana i zaokružena stanice (slika 20b i 21b) što može ukazivati na smrt stanica procesom apoptoze.

4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET KANOLOLA I FENILINDANA

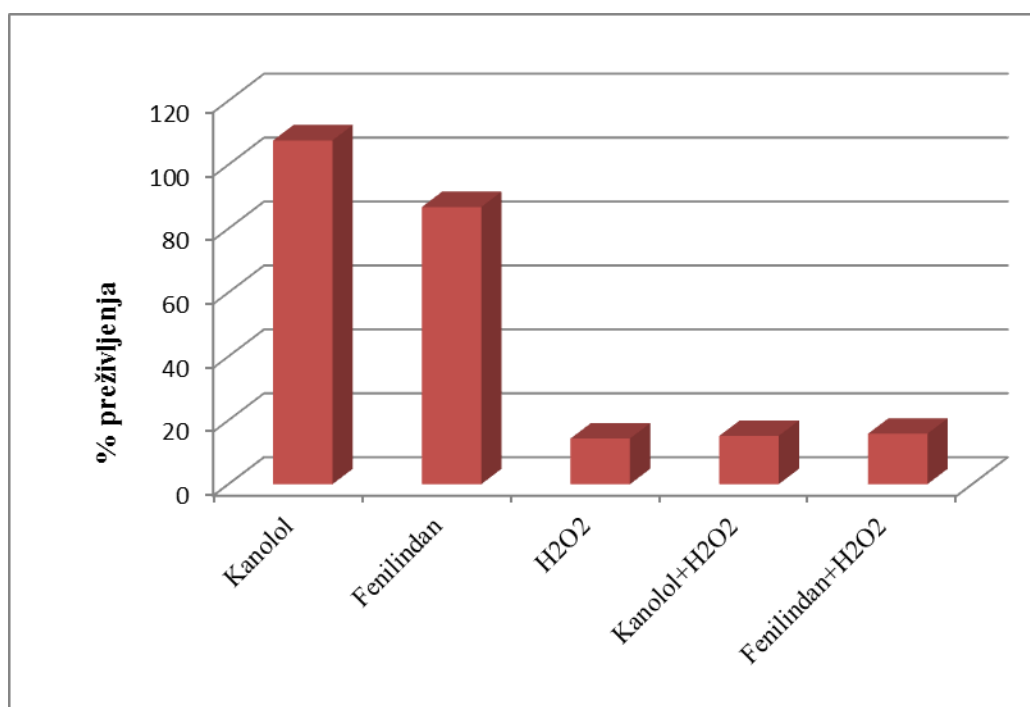
ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet (AUC) kanolola i fenilindana praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog radikala AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid) na fluorescentni spoj fluorescein. Rezultati su izraženi u ekvivalentima Troloxa (TE), tj. kao $\mu\text{mol TE mg}^{-1}\text{spoja}$. Provedenim mjerenjem ORAC vrijednost određena za kanolol iznosila je $17,84268211 \mu\text{M TE mg}^{-1}$ kanolola, a za fenilindan $84,01928732 \mu\text{M TE mg}^{-1}$ fenilindana. Veća ORAC vrijednost znači veći antioksidacijski potencijal, odnosno fenilindan ima mnogo veći antioksidacijski potencijal u odnosu na kanolol i to skoro 5 puta. Takvi rezultati u skladu su s rezultatima Harbaum-Piayda i suradnika (2010) koji su mjerili antioksidacijski potencijal polifenola TEAC i DPPH metodom. Izmjerena vrijednost antioksidacijskog potencijala kanolola bila je 2,2 kod TEAC tj. 0,6 kod DPPH metode, dok su te vrijednosti za fenilindan bile 3,9 odnosno 1,2. Antioksidacijski potencijal fenilindana određen navedenim metodama skoro je dvostruko veći od onog izmjenjenog za kanolol.

Szydłowska-Czerniak i suradnici (2010) su istraživali antioksidacijski kapacitet sedam sorti uljane repice i rezultati istraživanja su pokazali da su ORAC vrijednosti za metanolne ekstrakte uljane repice $4092\text{-}12989 \text{ mmol Trolox}100 \text{ g}^{-1}$ uzorka. Izmjerenim vrijednostima u velikoj mjeri pridonose upravo polifenolni spojevi kao što su kanolol i fenilindan, čiji je izniman antioksidacijski kapacitet prvi put utvrđen u istraživanju Harbaum-Piayda i suradnika (2010).

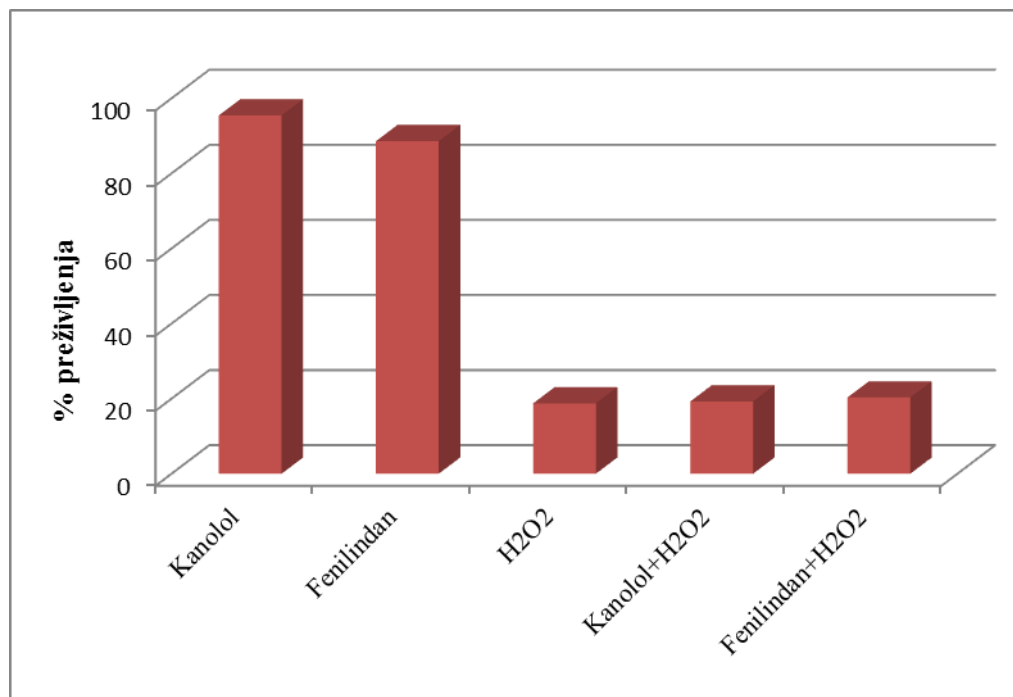
4.5. ZAŠTITNI UTJECAJ KANOLOLA I FENILINDANA NA MCF-7, HeLa I HEK293T STANICE U KOJIMA JE POTAKNUT OKSIDATIVNI STRES

Obzirom na određene ORAC vrijednosti kanolola i fenilindana te njihov antioksidacijski potencijal željeli smo ispitati njihov moguć zaštitni utjecaj na stanice u kojima je potaknut oksidativni stres djelovanjem vodikovog-peroksida. Sve tri stanične linije nacičepjene su u ploče s 96 jažica. Početna koncentracija stanica je iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} .

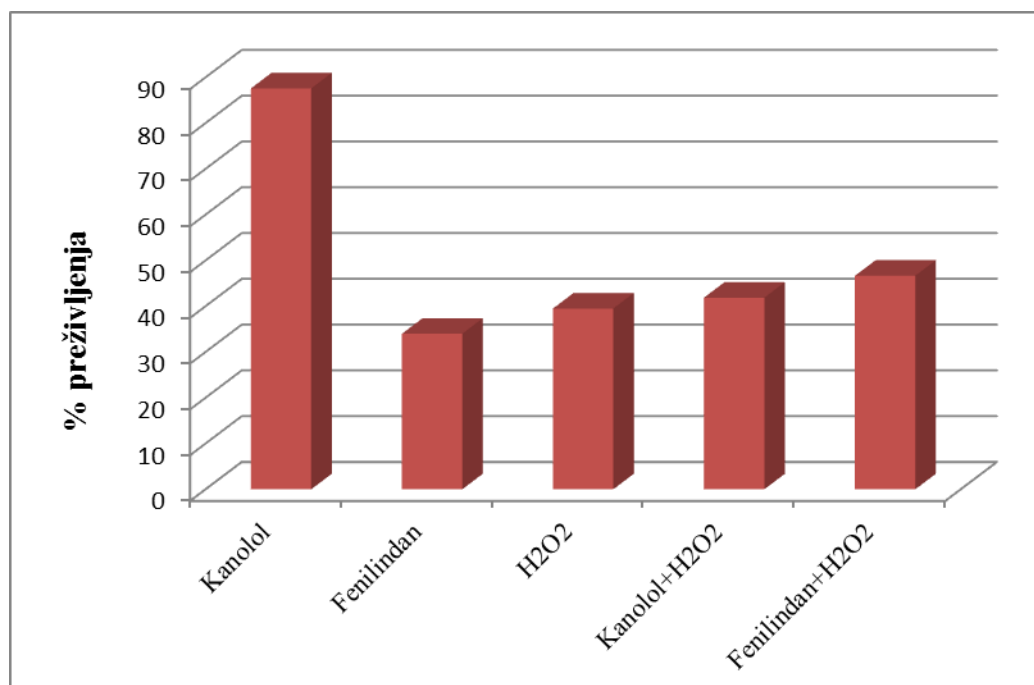
Nakon 24 sata stanice su tretirane kanololom ($50 \mu\text{M}$) odnosno fenilindanom ($5 \mu\text{M}$). Takav predtretman trajao je 24 sata nakon čega je u MCF-7, HeLa i HEK293T stanicama induciran oksidativni stres dodatkom H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$). Nakon slijedeća 24 sata MTS metodom određena je vijabilnost stanica. Rezultati mjerenja izraženi su kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice i prikazani su na slikama 22, 23 i 24.



Slika 22. Zaštitni utjecaj kanolola ($50 \mu\text{M}$) i fenilindana ($5 \mu\text{M}$) na MCF-7 stanice u kojima je izazvan oksidativni stres dodatkom H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$)



Slika 23. Zaštitni utjecaj kanolola (50 μM) i fenilindana (5 μM) na HeLa stanice u kojima je izazvan oksidativni stres dodatkom H_2O_2 (50 μM)



Slika 24. Zaštitni utjecaj kanolola (50 μM) i fenilindana (5 μM) na HEK293T stanice u kojima je izazvan oksidativni stres dodatkom H_2O_2 (50 μM)

Rezultatima prikazanim na slikama 22, 23 i 24 nismo dokazali zaštitno djelovanje kanolola i fenilindana na stanice u kojima je potaknut oksidativni stres. Iako smo pretpostavili da će zbog izmjerene antioksidacijskog potencijala oba spoja pozitivno djelovati na preživljenje MCF-7, HeLa i HEK293T stanica tretiranih s H_2O_2 , predtretman s kanololom i fenilindanom nije pokazao očekivane rezultate, te je postotak preživljenja i dalje nizak, kao kod stanica koje su tretirane samo H_2O_2 . Takvi rezultati ne znače da kanolol i fenilindan nemaju antioksidativno djelovanje, koje je poznato i iz literature (Cao i sur., (2008); Harbaum-Piayda (2010); Jiang i sur. (2013)), već da u ovako postavljenom pokusu nismo uspjeli „pogoditi“ ili optimalno trajanje tretmana ili koncentracije kanolola i fenilindana da bi taj učinak na stanice bio vidljiv i mjerljiv te je potrebno nadalje istražiti.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitivanjem biološke aktivnosti kanolola (50-500 μM) na MCF-7, HeLa i HEK293T staničnim linijama uočen je citotoksičan učinak. Pri koncentracijama većim od 150 μM kanolol djeluje citotoksično na MCF-7 i HeLa stanice, a citotoksičan učinak na HEK293T stanice zabilježen je već pri koncentraciji 50 μM .
2. Prema izračunatim EC_{50} vrijednostima za kanolol on pokazuje najjači učinak na HEK293T stanice, a najslabiji na MCF-7 stanice, u odnosu na tri stanične linije korištene u ovom radu. Jak citotoksični učinak fenilindana (5-500 μM) zabilježen je na sve tri stanične linije, s tim da je do inhibicije rasta MCF-7 i HeLa stanica došlo pri koncentraciji većoj od 50 μM , a kod HEK293T stanica već pri 5 μM .
3. Prema izračunatim EC_{50} vrijednostima za fenilindan on pokazuje najjači učinak na HEK293T stanice, a najslabiji na MCF-7 stanice. Antioksidativni potencijal kanolola iznosi 17,84268211 $\mu\text{M TE mg}^{-1}$ kanolola, a fenilindana 84,01928732 $\mu\text{M TE mg}^{-1}$ fenilindana. Pretpostavljeni zaštitni učinak kanolola i fenilindana, zbog njihovog antioksidacijskog kapaciteta, na stanice u kojima je potaknut oksidativni stres nije uočen.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016): https://c2.staticflickr.com/4/3734/11007614915_4f004a57ab_b.jpg .

Pristupljeno: 19.03.2016.

Anonymous 2 (2016): http://s2.pticica.com/foto/0000773308_1_0_px1jsl.jpg . Pristupljeno:

19.03.2016.

Anonymous 3 (2016): <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21194584.html>.

Pristupljeno: 19.03.2016.

Anonymous 4 (2016):

https://www.embl.de/aboutus/communication_outreach/media_relations/2013/130311_Heidelberg/ . Pristupljeno 22.03.2016.

Anonymous 5 (2016):

http://www.lonza.com/~media/Images/Products%20and%20Services/Bioresearch/BioResearch%20Product%20Images/body/HeLa_nuc_kit_01.ashx?w=230&h=130&as=1&la=en .

Pristupljeno: 22.03.2016.

Anonymous 6 (2016): <http://www.mcf7.com/> . Pristupljeno: 22.03.2016.

Anonymous 7 (2016): <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/783690.fig.001c.jpg> ,

pristupljeno 22.03.2016.

Anonymous 8 (2016): <http://www.hek293.com/> . Pristupljeno 22.03.2016.

Anonymous 9 (2016): [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3216.aspx?geo_country=hr#characteristics)

[3216.aspx?geo_country=hr#characteristics](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3216.aspx?geo_country=hr#characteristics) . Pristupljeno: 22.03.2016.

Anonymous 10 (2016): [http://www.celeromics.com/en/resources/images/cell-lines/hek293-](http://www.celeromics.com/en/resources/images/cell-lines/hek293-2.png)

[2.png](http://www.celeromics.com/en/resources/images/cell-lines/hek293-2.png) . Pristupljeno 22.03.2016.

Anonymous 11 (2016):

http://www.ufrgs.br/immunovet/molecular_immunology/counting%20chamber.jpg .

Pristupljeno 22.03.2016.

Anonymous 12 (2016): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Pristupljeno: 21.02.2016.

Anonymous 13, (2016):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F6/?report=objectonly>.

Pristupljeno: 21.02.2016.

Arisanty D. (2013) In vitro cytotoxic study and detection of apoptosis on breast cancer cell lines MDA-MB 231 after exposed to *Azadirachta indica* a. juss (neem) extract. *JK Andalas*. **2**, 80-84.

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

Bertoša, K. (2015) Izolacija polifenola iz repičinog ulja. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

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.

Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med*. **14**, 303-311.

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.

Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P. (2010) Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*. **16**, 251-280.

Castaño A., Gómez-Lechón, M., J. (2005) Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey. *Toxicol. in Vitro*. **19**, 695-705.

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.

El Gharras, H. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *Int. J. Food. Sci. Technol.* **44**, 2512–2518.

Elansary H.,O. (2014) Natural Antioxidants and their Role against Human Cancer. *J Plant Biochem Physiol* e125. doi:[10.4172/2329-9029.1000e125](https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000e125).

Elujoba A. A., Odeleye O. M., Ogunyemi C. M. (2005) Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2**. 46.

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.

Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assesment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicol. in Vitro.* **15**, 477-488.

Giddabasappa, A., Bauler, M., Yepuru, M., Chaum, E., Dalton, J.T., Eswaraka, J. (2010) 17- β estradiol protects ARPE-19 cells from oxidative stress through estrogen receptor- β . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 5278-5287.

Harbaum-Piayda, B., Oehlke, K., Sönnichsen, F. D., Zacchi, P., Eggers, R., Schwarz, K. (2010) New polyphenolic compounds in commercial deodistillate and rapeseed oils. *Food Chem.* **123**, 607-615.

Hüsken, A., Baumert, A., Strack, D., Becker, H.C., Möllers, C., Milkowski C. (2005) Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of BnSGT1 gene expression. *Molecular Breeding.* **16**, 127–138.

IOC (International Olive Council) (2009) COI/T.20/Doc.29 - Determination of biophenols in olive oils by HPLC.

Jašić, M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane.

<http://prirodnamedicina.org/knjige/M.Jasic-->

[Uvid u aktivne bioloski aktivne komponente hrane.pdf](#) . Pristupljeno 21.2.2016.

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.* **5**, 1562-1566.

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

Khattab, R., Eskin, M., Thiyam, U. (2014) Production of Canolol from Canola Meal Phenolics via Hydrolysis and Microwave-Induced Decarboxylation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **91**, 89–97.

Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Hopia, A., Kefalas, P., Wähälä, K. (2002) Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 294–298.

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., Pospišil, M., Obranović, M., Nederal, S., Bosolt, T. (2013) Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 589-599.

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.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**,727-747.

- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *M. J. Immunol eth.* **65**, 55-63.
- Naczki, M., Wanasundara, P. and Shahidi, F. (1992) Facile spectroscopic determination of sinapic acid in Brassica seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **40**, 444-448.
- Naczki, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F. (1998) Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* **26**, 489-502.
- 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.
- Rotkiewicz, D., Kozłowska, H., Zadernowski, R., Budzinski, W. and Horodyski, A. (1987) Zmiany zawartosci związkow fenolowych i fityn podczas rozwoju i dojrzewania nasion rzepaku. *Acta Agric. Technol. Ols. Technologia Alimentorum.* **21**, 153-163.
- Schulz, J. and Hermann, K. (1980) Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. II. Determination by gas-liquid chromatography. *Chromatography.* **195**, 95-104.
- Servili, M., Montedoro, G.F. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 602-613.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E. (2008) The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids.* **15**, 137–149.
- Szydłowska-Czerwik, A., Trokowski, K., Karlovits, G., Szlyk, E. (2010) Determination of Antioxidant Capacity, Phenolic Acids, and Fatty Acid Composition of Rapeseed Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7502–7509.
- Thiyam, U., Stöckmann, H., Schwarz, K. (2006) Antioxidant Activity of Rapeseed Phenolics and Their Interactions with Tocopherols During Lipid Oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83**, 523-528.
- Thiyam, U., Stöckmann, H., Zum Felde, T., Schwarz K. (2006) Antioxidative effect of the main sinapic acid derivatives from rape seed and mustard oil by-products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, 238–248.

Thiyam-Holländer, U., Michael Eskin, N.A., Matthäus, B. (2012) *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*, Taylor & Francis, London.

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.

Zheng, C., Yang, M., Zhou, Q., Liu, C., Huang, F. (2014) Changes in the content of canolol and total phenolics, oxidative stability of rapeseed oil during accelerated storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 1675–1684.

Zschau, W. (2001) Bleaching of edible fats and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 501-508.