

Djelovanje ekstrakata iz otpada proizvodnje kakaa na in vitro rast stanica i stanični ciklus

Kolak, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:237243>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Martina Kolak
6892/BT

**DJELOVANJE EKSTRAKATA IZ OTPADA PROIZVODNJE
KAKAA NA *IN VITRO* RAST STANICA I STANIČNI CIKLUS**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Kristine Radošević te uz pomoć Manuele Panić, mag.ing.bioproc.

Mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević najiskrenije hvala na uloženom trudu i vremenu, srdačnosti te prenesenom znanju pri izradi ovog rada.

Ponajviše hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i svemu što čine za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

DJELOVANJE EKSTRAKATA IZ OTPADA PROIZVODNJE KAKAA NA *IN VITRO* RAST STANICA I STANIČNI CIKLUS

Martina Kolak, 0058204942

Sažetak: Nizom istraživanja pokazano je da otpad nastao nakon proizvodnje kakaa sadrži visok udio polifenolnih komponenata koje imaju značajan antioksidacijski kapacitet te sveukupno pozitivno djelovanje na zdravlje čovjeka. Obzirom na potrebu učinkovitog zbrinjavanja otpada iz industrije te moguće dodatne valorizacije sve češće se nastali otpad dodatno iskorištava kako bi se proizveli novi visokovrijedni proizvodi. Budući da se industrija okreće zelenim, održivim tehnologijama, izolacija polifenola iz otpada trebala bi biti bazirana na alternativnim metodama ekstrakcije. Stoga je u ovom radu proučavano djelovanje ekstrakata koji su pripremljeni pomoću prirodnih eutektičnih otapala (NADES) koji zadovoljavaju principe zelene kemije. Biološka aktivnost pripremljenih ekstrakata ispitana je u *in vitro* uvjetima na „normalnoj“ humanoj staničnoj liniji HaCaT i tumorskoj humanoj staničnoj liniji HeLa. Ispitano je preživljenja stanica te utjecaj na stanični ciklus 48h nakon tretmana pripremljenim ekstraktima. Zaključno, ekstrakti su pokazali inhibitorno djelovanje na HeLa tumorsku staničnu liniju dok su na rast normalne HaCaT stanične linije djelovali pozitivno. Zapaženi učinak na rast stanica u korelaciji je sa staničnim ciklusom.

Ključne riječi: otpad od proizvodnje kakaa, antioksidacijski kapacitet, stanični ciklus, stanične linije, protočna citometrija

Rad sadrži: 25 strana, 11 slika, 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag.ing.bioproc.

Datum obrane: Rujan, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF EXTRACTS FROM COCOA WASTE ON *IN VITRO* CELL GROWTH AND CELL CYCLE

Abstract: A series of studies have shown that waste, produced after cocoa production, contains a high proportion of polyphenolic components that have significant antioxidant capacity and an overall positive effect on human health. Due to the need for efficient disposal of waste from industry and possible additional valorisation, the collected waste is increasingly exploited in order to produce new high value products. As the industry turns to green, sustainable technologies, the isolation of polyphenols from waste should be based on alternative extraction methods. Therefore, the action of extracts prepared using natural eutectic solvents (NADES) that satisfy the principles of green chemistry is studied in this paper. The biological activity of the prepared extracts was examined under in vitro conditions on a "normal" human HaCaT cell line and a tumor human HeLa cell line. Cell viability and the effect on the cell cycle 48h after treatment with the extracts were examined. In conclusion, the extracts showed an inhibitory effect on the HeLa tumor cell line, while they had a positive effect on the growth of normal HaCaT cell line. The observed effect on cell growth is correlated with the cell cycle.

Keywords: waste from cocoa production, antioxidant potential, cell cycle, cell lines, flow cytometry

Thesis contains: 25 pages, 11 figures, 22 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Kristina Radošević, Associate professor

Technical support and assistance: M.Sc. Manuela Panić

Defence date: September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KAKAO I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA KAKAA.....	2
2.2. PRIMJENA KULTURE STANICA.....	4
2.2.1. Stanični ciklus	6
2.2.2. In vitro testovi citotoksičnosti	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. Ekstrakti iz otpada od proizvodnje kakaa	9
3.1.2. Kemikalije.....	9
Otopine i puferi	10
3.1.3. Uređaji i oprema	10
3.2. METODE.....	11
3.2.1. Humane stanične linije.....	11
3.2.2. In vitro ispitivanje djelovanja ekstrakata kakaa na HeLa i HaCaT staničnim linijama.....	11
3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	12
3.2.4. Praćenje proliferacije stanica primjenom MTS metode.....	13
3.2.5. Primjena protočne citometrije za određivanje staničnog ciklusa	14
3.2.6. Obrada rezultata	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. UČINAK EKSTRAKATA KAKAA NA PREŽIVLJENJE HELA I HACAT STANICA.....	17
4.2. UČINAK EKSTRAKATA KAKAA NA STANIČNI CIKLUS HELA I HACAT STANICA.....	19
5. ZAKLJUČCI.....	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Velike količine otpada proizvedene od strane industrije koja nastoji zadovoljiti neprestani rast ljudske populacije i njihovih potreba te općenito štetan utjecaj čovjeka na okoliš potaknuo je razvoj zelenih, održivih tehnologija koji se očituje u razumnom raspolaganju prirodnim resursima. Kao posebno područje interesa može se izdvojiti otpad nastao preradom prehrambenih sirovina, čije zbrinjavanje s jedne strane može predstavljati ekološki problem, a s druge strane ima veliki potencijal u njegovom dodatnom iskorištavanju za dobivanje vrijednih spojeva i proizvoda. U tu kategoriju se svakako ubraja otpad nastao preradom biljke *Theobroma cacao L.* koja obiluje spojevima s antioksidacijskom aktivnošću uključujući fenolne spojeve od kojih su najzastupljeniji katehini ili flavan-3-oli (37 %), proantocijanidini (58 %) i antocijani (4 %).

Nizom istraživanja dokazano je da otpad od proizvodnje kakaa još uvijek sadrži velik udio prirodnih antioksidanasa. Također, zbog njihovog antikancerogenog, protuupalnog, antimikrobnog te ukupnog pozitivnog djelovanja na ljudski imunološki i kardiovaskularni sustav (Baharum i sur., 2016), povećan je interes za dodatnim iskorištavanjem otpada kakaa.

Za pripremu ekstrakata iz otpada od proizvodnje kakaa korištena su prirodna eutektična otapala koja ispunjavaju zahtjeve zelene tehnologije jer imaju svojstva jeftinih, obnovljivih i netoksičnih otapala, čijom se uporabom smanjuje utrošak energije pri proizvodnji, postoji mogućnost korištenja samih ekstrakata bez zahtjevnog koraka pročišćavanja, a moguća je i reciklacija tog otapala.

Cilj ovog rada bio je proučavanje djelovanja prethodno pripremljenih ekstrakata iz otpada proizvodnje kakaa dobivenih pomoću eutektičkih otapala betain:glukoze i kolin-klorid:saharoze. Biološka aktivnost i njihova potencijalna toksičnost ispitana je *in vitro* testovima na rast stanica i stanični ciklus kod tumorske stanične linije (HeLa) i „normalne“ stanične linije (HaCaT). Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakata kakaa određena je primjenom MTS metode, a učinak ekstrakata kakaa na stanični ciklus stanica određen je primjenom protočne citometrije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kakao i antioksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva kaka

Tropska biljka *Theobroma cacao*, poznatija kao kakao, pripada porodici *Sterculiaceae*, rodu *Malvales*, a podrijetlom je iz Centralne Amerike, gdje su je Maje i Asteci kultivirali prvenstveno zbog njenog sjemena (Slika 1) kojeg su ekstrahirali u piće nazvano *chocolatl*, preteča današnje čokolade (Baharum i sur., 2016).

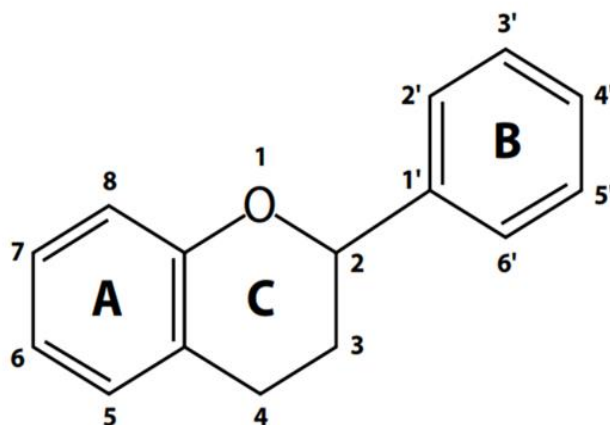


Slika 1. Zrna kaka (Anonymous 1,2019)

Više od 200 spojeva pronađenih u kakaovu zrnu imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, a znanstvenici su posebnu pažnju posvetili polifenolima, posebno flavonolima, kojim obiluje navedena drevna biljka (Visioli i sur., 2009).

Svi polifenoli nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora šikiminske kiseline (Fiocchetti i sur.,2018) te ih na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava možemo podijeliti u nekoliko definiranih skupina: flavonoidi, lignani, fenolne kiseline i stilbeni.

Flavanoidi čine najveću i najviše izučavanu skupinu polifenola prisutnih, kako u drugim biljkama, tako i u kakaovu zrnu, a osnovna kemijska struktura (Slika 2) im je sačinjena od dva aromatska prstena (A i B) povezana trima ugljikovim atomima koji tvore oksigenirani heterocikl (C). Ovisno o varijacijama tog heterocikla, flavonoidi se dalje mogu podijeliti na šest podskupina: flavonoli, flavoni, flavononi, flavanoli, antocijani i izoflavoni (Oracz i sur.,2015).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Stefek, 2011).

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti pohranjeni u pigmentiranim stanicama kotiledona te, ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi, imaju mnoge bitne uloge u biljkama kao što su utjecaj na rast i reprodukciju biljke, zaštita od UV zračenja, herbicida te inhibicija razvoja patogena. Uz navedeno, kada govorimo o kakau, bitno utječu i na senzorska svojstva kakaova zrna i produkata dobivenih njegovom preradom formirajući komplekse s polisaharidima i proteinima (Oracz i sur.,2015). Visok udio flavonoida u kakaovu zrnu i općenito proizvodima nastalim preradom kakaia čine ih produktima visoke nutritivne, farmakološke pa čak i kozmetičke važnosti (Oracz i sur.,2015).

U nizu epidemioloških istraživanja iskazuje se veliko zanimanje za polifenole zbog utvrđene povezanosti visokog dnevnog unosa polifenola sa smanjenjem rizika za razvoj kroničnih bolesti poput neurodegenerativnih i kardiovaskularnih oboljenja te određenih tipova raka (Fiocchetti i sur.,2018).

Zapaženi i u literaturi opisani brojni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje se velikim dijelom pripisuju antioksidacijskoj aktivnosti flavonoida, tj. polifenola. Tako je npr. U istraživanju kojemu je cilj bilo mjerenje ukupne koncentracije redoks spojeva u 1113 različita prehrambena proizvoda, među top-50 s najvišim antioksidacijim kapacitetom, čak 5 ih je bilo na bazi kakaia (Halvorsen i sur., 2006).

Antioksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva rezultira smanjenjem oksidativnog stresa u kojem dolazi do povećanog stvaranja izuzetno reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica (O⁻), koje nazivamo „reaktivne kisikove vrste“ ili ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*). Smatra se da antioksidansi najčešće sprječavaju nastajanje tumora u početnoj fazi budući da inaktiviraju

slobodne radikale koji doprinose mutanogenezi putem destabilizacije membrana i oštećenja DNA, ali njihova uloga u nastajanju tumora još nije jednoznačno razjašnjena. Polifenolni spojevi mogu djelovati i kao antioksidansi i kao prooksidansi, ovisno o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala te o prisutnosti prijelaznih metala poput bakra koji potiče njihovu prooksidativnu aktivnost. U tom slučaju dolazi do povećanog nastanka slobodnih radikala u tumorskim stanicama koji potom djeluju kao regulacijske molekule, dovode do zastoja staničnog ciklusa i apoptoze u tumorskim stanicama te tako sprječavaju rast i širenje tumora. Iako još nedovoljno istraženim, mogućim mehanizmom citotoksičnosti polifenola spram tumorskih stanica smatra se njihovo prooksidativno djelovanje (Radošević i sur.,2016).

Vjeruje se da polifenoli u kakaovu zrnu imaju mogućnost modificiranja enzima odgovornih za imunološke reakcije i antimutagenu aktivnost smanjivanja rizika od nastajanja i razvoja tumora. Uz to je dokazano i da proantocijanidini inhibiraju nastanak tumora dojke kod žena. Također, jedno istraživanje je pokazalo da prehrana bogata antioksidansima iz kakaova zrna pomaže bubrezima i imunološkom sustavu te regulira razinu inzulina u krvi (Oracz i sur., 2015).

2.2. Primjena kulture stanica

Tehnologija kulture stanica je relativno mlada eksperimentalna metoda prihvaćena tek 1952.g. dok njezini počeci sežu u 1880.g. kada je Roux u otopini soli održavao pileće embrije te 1890.g. kada je Harrison uzgajao stanice živaca embrija žabe. Ključan događaj u razvoju tehnologije životinjskih stanica dogodio se 1952.g. kada je Gey uzgojio HeLa stanice, prvu humanu staničnu liniju.

Kulturu životinjskih stanica definiramo kao pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva ili organa, koje je moguće održavati u umjetnom okolišu i smatrati zasebnim organizmom u uvjetima *in vitro*. Prijenos stanica iz kontroliranih uvjeta u kojima su bile diferencirane i obično se nisu dijelile rezultira njihovom prilagodbom na nove uvjete okoliša i brzim rastom. Posljedica navedene prilagodbe je dediferencijacija, tj.gubitak njihovih visokospecijaliziranih funkcija.

Prvi korak je uspostavljanje primarne kulture životinjskih stanica, odnosno izolacija stanica iz željenog organa ili organizma i njihovo nacjepljivanje u hranjivom mediju te održavanje kulture u optimalnim uvjetima. Primarna kultura najbolje odražava *in vivo* uvjete jer stanice zadržavaju većinu specifičnih funkcija i svojstva tkiva iz kojeg su potekle te je stoga najprikladnija za ispitivanje svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice. Postupkom subkultiviranja, precjepljivanja ili pasažiranja primarne kulture razvija se

sekundarna stanična kultura te dolazi do nastanka velike količine jednolikog materijala pogodnog za dugotrajnu uporabu. Nakon nekoliko precjepljivanja, stanična kultura ulazi u fazu replikativne senescencije čija je završna faza karakterizirana odumiranjem stanica te takve stanice nazivamo konačnom ili smrtnom staničnom linijom.

Spontane mutacije, tretman stanica fizikalnim i kemijskim agensima, stvaranje hibridnih stanica, transfekcija virusnim genima ili transdukcija virusima i overekspresija gena regulatora staničnog ciklusa su načini kojim se uspostavljaju besmrtne stanice, a taj postupak pretvorbe u kontinuiranu ili beskonačnu staničnu liniju nazivamo imortalizacijom.

Svojstva koja su nužna za rad s kulturama stanica i jamče potrebnu stabilnost i predvidljivost u ponašanju kulture su besmrtnost i klonalnost stanica što znači da sve stanice imaju svojstvo neograničenog broja dioba i sve su stanice iz jedne stanične linije genotipski identične. Dvije najveće banke stanica koje obuhvaćaju preko 3000 različitih staničnih linija su: *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC), a velika većina staničnih linija jesu besmrtne i klonalne.

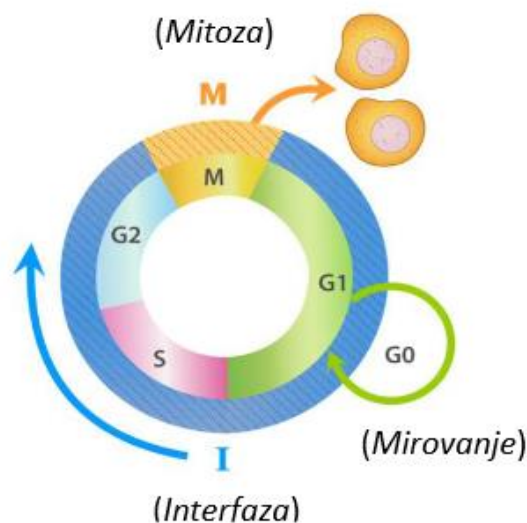
Kulture životinjskih stanica danas imaju široku primjenu u toksikološkim ispitivanjima novih lijekova, kozmetičkih pripravaka, industrijskih spojeva i onečišćenja okoliša s ciljem smanjenja broja pokusnih životinja, a u biotehnologiji se koriste za dobivanje rekombinantnih proteina, monoklonskih protutijela i cjepiva. Koriste se i u staničnoj i molekularnoj biologiji kao modelni sustavi te u farmakologiji za ispitivanje djelovanja lijekova i metaboliziranje istih. Brojne su prednosti testova na kulturama stanica poput relativno brze i rutinske analize, visoke razine standardizacije, smanjenje vijabilnosti između eksperimenata te nastajanje manje količine potencijalno toksičnog otpada te u konačnici i smanjenje broja pokusnih životinja.

Ono što razlikuje rad s kulturama stanica i tkiva od ostalih laboratorijskih tehnika su aseptični uvjeti kojima se osigurava sprječavanje kontaminacije najčešće bakterijama, virusima i plijesnima. Najveći problem predstavljaju bakterije kojima je vrijeme udvostručavanja otprilike 30 min, dok za stanice iznosi 24h, stoga je pri radu s kulturama stanica potrebno obratiti pozornost na to da se predviđeni prostor nalazi u području gdje nema prašine i velikog kretanja ljudi, da ima dovoljno mjesta za pripremu i sterilizaciju pribora i svu potrebnu opremu koju čine: komora za sterilan rad (laminar), CO₂ inkubator, autoklav, svjetlosni mikroskop, hladnjaci, zamrzivači, centrifuge itd. Prvi pokazatelj kontaminacije je nagli pad pH vrijednosti medija, ako medij za uzgoj stanica sadrži indikator, zbog čega dolazi do promjene boje indikatora fenol-crveno u narančastu pa žutu te dolazi do zamućenja kulture.

Prema načinu uzgoja, kulture životinjskih stanica možemo podijeliti na adherentne stanice ili stanice koje rastu jedino ako su prihvaćene na površinu i suspenzijske stanice ili stanice koje mogu rasti neovisno o površini.

2.2.1. Stanični ciklus

Staničnim ciklusom naziva se niz događaja u životu stanice koji, sastavljeni od faze diobe, faze staničnog rasta te faza pripreme stanice za narednu diobu, rezultiraju udvostručenjem stanica na dvije stanice kćeri. Međusobno povezani koraci staničnog ciklusa dijele se u četiri glavne faze (Slika 3): G1 (G znači *gap* faza), S (sinteza DNA), G2 i M (mitoza ili dioba stanica). Samo 10% vremena staničnog ciklusa čini proces diobe dok preostalih 90% vremena, u kojem nema vidljivih promjena na strukturi stanice, čini interfazu. Kad su stanice u tzv. G0 fazi, one se ne dijele, ali ne možemo reći da nemaju metaboličku aktivnost. Vraćanjem kulture stanica na optimalnu temperaturu i uklanjanjem određenih faktora koji inhibiraju rast te dodatkom faktora rasta možemo pozitivno djelovati na stanice u mirovanju i ponovno potaknuti njihovu diobu.



Slika 3. Faze staničnog ciklusa (Slivac I., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. str. 28)

Tijekom G1 faze stanica je metabolički aktivna, raste te sintetizira proteine i fosfolipide koji izgrađuju membrane uz velik broj drugih makromolekula koje su stanici potrebne za ulazak u S fazu. S faza, odlikovana visokom preciznošću, je faza u kojoj stanica kopira svoj genetski

materijal i dolazi do udvostručenja molekule DNA, a nakon nje slijedi G2 faza u kojoj se stanica priprema za diobu sintetizirajući neophodne specifične proteine. U navedenim fazama stanica konstantno povećava svoj obujam, a nakon što dosegne određeni, stanica se dijeli i nastupa M faza koju čine procesi kondenzacije kromosoma, pucanja jezgrine membrane, pružanja kondenziranog kromosoma u mitotičkom aparatu, razdvajanja dva seta kondenziranih kromosoma na suprotne polove stanice, stvaranja dviju jezgrinih membrana oko dva seta podijeljenih kromosoma, dekonenzacije kromosoma, uvlačenje membrana i odjeljivanja dviju stanica kćeri. Kinaze ovisne o ciklinu (CDKs), od kojih svaka mora biti povezana s malom molekulom ciklina kako bi razvile specifičnu aktivnost, reguliraju specifične procese M faze (Morgan, 1995). Navedeni regulatori staničnog ciklusa imaju važnu ulogu u razvoju bolesti tumora koju karakterizira nekontrolirani rast stanica.

2.2.2. *In vitro* testovi citotoksičnosti

Za određivanje toksičnosti novosintetiziranih kemikalija izvodi se niz testova na temelju kojih se procjenjuje njihov utjecaj na ljude i okoliš, a provode se u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) ili na različitim organizmima (*in vivo*). Postoji nekoliko pristupa i metoda koji imaju u cilju zamijeniti ispitivanja na pokusnim laboratorijskim životinjama alternativnim *in vitro* metodama poput takozvanog 3R pristupa (engl. *Reduce, Refine, Replace*), zatim metode poput QSAR (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*), genomike, proteomike te metaboličkog i kinetičkog modeliranja. Istraživanjem toksičnosti primjenom različitih *in vitro* i *in vivo* testova, dokazana je podudarnost za oko 80% rezultata što apsolutno ide u prilog navedenoj težnji, ali potpuna zamjena nije moguća zbog tkivno-specifične toksičnosti, pojave adaptivnog odgovora te metaboličkih promjena koje se događaju u živom organizmu. Također, ovisno o metaboličkoj aktivnosti stanica, sastavu medija za uzgoj, temperaturi inkubacije i vremenu izlaganja, citotoksični odgovor između različitih staničnih linija može značajno varirati.

Kod provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu. Na različite načine možemo odrediti citotoksičnost kemikalija uključujući mjerenje stanične smrti, preživljenja i funkcionalnosti, morfologije, energetskog metabolizma, prihvaćanja i proliferacije stanica.

Neutral red (NR) test i test redukcije tetrazolijevе soli MTT spadaju u najčešće korištene testove za praćenje citotoksičnosti u adherentim kulturama. MTT test je kolorimetrijska metoda koja

se temelji na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netoljivi formazan.

Pri provođenju *in vitro* testova kreće se od pretpostavke da većina toksičnih spojeva djeluje na nivou stanice i ometa njezin normalan rad te razumijevanjem toksičnosti na razini stanice moguće je pretpostaviti toksičnost na razini čitavog organizma.

Rezultati u *in vitro* testovima najčešće se prikazuju kao % živih stanica u kulturi ili % preživljenja stanica pa se takvi testovi često primjenjuju i za ispitivanje djelovanja spojeva i ekstrakata izoliranih iz biljaka.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Ekstrakti iz otpada od proizvodnje kakaa

U istraživanju su upotrebljeni uzorci otpada dostavljeni iz industrije kojoj je primarna djelatnost proizvodnja čokolade.

Ekstrakte kakaa za potrebe ovog eksperimenta pripremila je mag. ing. Manuela Panić pomoću prirodnih eutektnih otapala (NADES) i ultrazvuka u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu koristeći dva otapala: betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorid:saharoza (ChScu).

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-tetratilroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Destilirana voda, PBF
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Lonza, Verviers, Belgija
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Flourescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- The Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, Madison, WI, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Otopine i pufferi

PBS puffer (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

0,4 % otopina tripan-plavo

Boja tripan-plavo	0,04 g
PBS puffer	10 mL

0,2 % otopina kristal-ljubičasto

Boja kristal-ljubičasto	0,02 g
Etanol	10 mL

3.1.3. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Petrijeve posude za uzgoj stanica, Corning, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga Tehnica ET-1111, Železnik, Slovenija
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichart Bright-line, Buffalo, NY, SAD
- Muse™ analizator staničnog zdravlja, Merk Millipore
- Centrifuga

3.2. Metode

3.2.1. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su dvije humane stanične linije od kojih je jedna tumorska stanična linija HeLa, a druga „normalna“ stanična linija HaCaT. Obje stanične linije su dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica.

George Gey je bio prvi znanstvenik kojemu je 1952.g. uspio uzgoj prve besmrtno kulture humanih stanica izoliranih iz tumora vrata maternice pacijentice Henriette Lacks, koje su nazvane HeLa po početnim slovima njezina imena i prezimena. Od tada su korištene kao biološki model u mnogim istraživanjima i izuzetno su dobar *in vitro* model jer posjeduju osnovne značajke kao i normalne stanice (proizvode proteine, ekspimiraju i reguliraju gene, komuniciraju jedne s drugima i osjetljive su na infekcije).

HaCaT je transformirana aneuploidna stanična linija besmrtnih keratinocita izolirana iz kože odraslog čovjeka koja se pokazala kao dobar *in vitro* model u istraživanjima jer, uz visoku sposobnost diferencijacije i proliferacije, vrlo dobro izražavaju karakteristike humanih keratinocita.

Uzgoj humanih staničnih linija se provodi na temperaturi od 37 °C u plastičnim T-bocama ili u Petrijevim posudama za održavanje biomase stanica, ili u pločama s jažicama za pojedinačne pokuse, u ovom slučaju za ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata iz otpada kakaa. Stanice su uzgajane u Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) uz dodatak 10% (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS) u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂.

3.2.2. *In vitro* ispitivanje djelovanja ekstrakata kakaa na HeLa i HaCaT staničnim linijama

HeLa i HaCaT stanice se čuvaju na -70 °C u mediju za smrzavanje, a uzgojim im počinje odmrzavanjem. Zamrznute stanice u ampulama od 1 mL, koncentracije oko 1x10⁷ stanica mL⁻¹, odmrznu se naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 30 °C. Stanice se zatim centrifugiraju, supernatant se pažljivo odvoji pomoću pipete, a talog se resuspendira u mediju za uzgoj koji

sadrži 10% FBS. Nakon toga, stanice su prebačene u petrijevku i stavljene u inkubator s reguliranom atmosferom. Svaka 3-4 dana stanice je potrebno pasažirati kako bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta u kojoj su najvitalnije i najpovoljnije za postavljanje pokusa. Njihovo opće stanje i brojnost te morfologija svakodnevno su promatrane pod inverznim mikroskopom. Moguća kontaminacija u kulturi ili prerastanje podloge za uzgoj očituju se naglom promjenom boje medija, a posebna pozornost se pridaje aseptičnim uvjetima rada. U komori za sterilni rad gdje se izvode pokusi koristi se sterilni laboratorijski prostor, a prije početka eksperimenta radnu podlogu i ruke potrebno je obrisati 70%-tnim etanolom.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

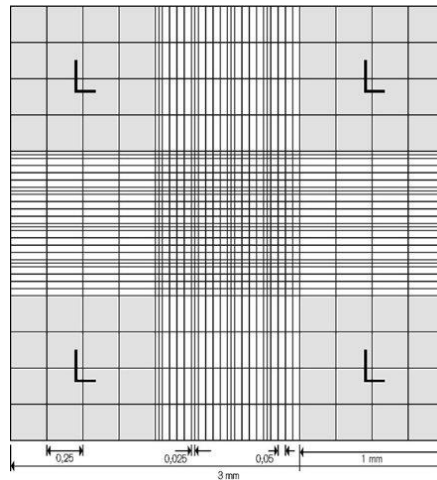
Otopina boje tripan-plavo koristi se za određivanje broja stanica prihvaćenih na površinu petrijevke i omogućuje razlikovanje živih od mrtvih stanica. Žive stanice ostaju neobojene, a mrtve stanice zbog propusnosti membrane imaju plavo obojenje.

Najprije se iz petrijevki uklanja hranjivi medij i dodaje 1 mL prethodno zagrijane otopine tripsina. Nakon toga, petrijevka je vraćena u inkubator 4-5 min kako bi se stanice odvojile od površine. Inverznim mikroskopom provjereno je djelovanje tripsina, a nakon što su se stanice odvojile i zaokružile, na tripsin je dodano 1 mL medija, stanice su resuspendirane i spremne za određivanje njihova broja. Alikvot suspenzije stanica od 20 μL pomiješan je s 20 μL boje te je 20 μL nanešeno na Neubauer komoru za brojanje (Slika 4).



Slika 4. Neubauer-ova komora (Anonymous 2, 2019)

Komora je podijeljena na četiri velika kvadrata, a u svakom velikom se nalazi po 16 kvadratića (Slika 5).



Slika 5. Prikaz velikih i malih kvadrata Neubauer komore (Anonymous 3, 2019)

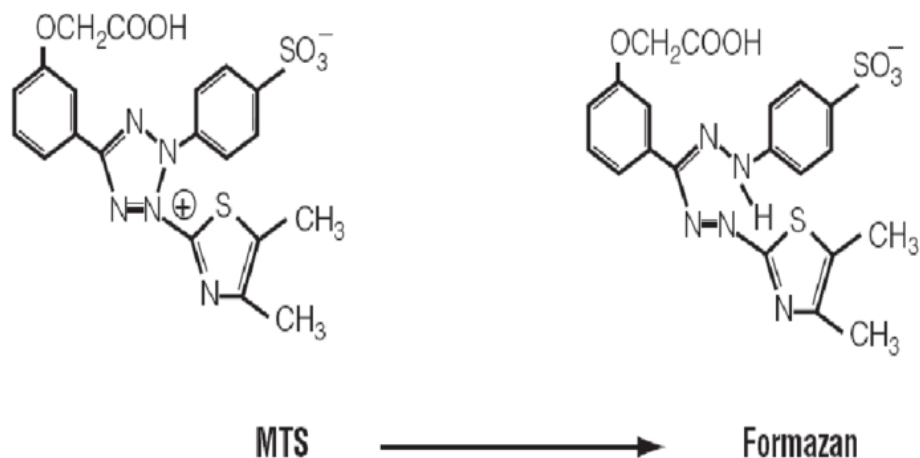
Izbrojane su i žive i mrtve stanice obojane plavo u sva četiri velika kvadrata, a njihova koncentracija izračunata je prema formuli 1:

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{broj stanica u 4 velika kvadrata} \times 5000 \quad [1]$$

3.2.4. Praćenje proliferacije stanica primjenom MTS metode

Nakon određivanja broja stanica metodom tripan-plavo, HeLa i HaCaT stanice su nacijepljene u ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji od 3×10^4 stanica mL^{-1} i volumenu od $100 \mu\text{L}$ po jažici. Nakon 24h od nacijepljivanja, stanice su tretirane različitim volumnim udjelima ekstrakata 1-5% (v/v), a za svaki volumni udio postavljene su četiri paralele. Inkubacija stanica trajala je 48h na 37°C nakon čega je određen citotoksični učinak MTS metodom.

MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, za određivanje antitijela koja inhibiraju rast te za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva. MTS reagens se sastoji od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] i PES [phenazine ethosulfate]. MTS se reducira do formazana ljubičaste boje koji je otopljen u mediju djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza pri čemu se NADPH ili NADH oksidira do NADP^+ ili NAD^+ (Slika 6).



Slika 6. Struktura tetrazolijeve soli MTS i produkta formazan (Anakok, 2010)

U svaku se jažicu nakon perioda od 48h dodaje 100 μ L MTS reagensa te se zatim ploča vraća u inkubator na 3-4h nakon čega se spektrofotometrijski, upotrebom čitača ploča, mjeri intenzitet obojenja pri valnoj duljini od 490nm.

Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih, tj.kontrolnih stanica prema formuli 2:

$$\text{preživljenje (\%)} = \left[\frac{\text{srednja vrijednost } A_{490} (\text{uzorka})}{\text{srednja vrijednost } A_{490} (\text{kontrola})} \right] \times 100 \quad [2]$$

3.2.5. Primjena protočne citometrije za određivanje staničnog ciklusa

Protočna citometrija je vrlo pouzdana kvantitativna metoda kojom u vrlo kratkom vremenu možemo analizirati velik broj stanica (5000-10000 događaja ili stanica/uzorak) koje specifičnim obilježavanjem stanica fluorescentnim bojama razlikujemo na temelju njihova izgleda i volumena.

Citotoksičnost, zapažena ispitivanjem učinaka novosintetiziranih kemikalija prilikom *in vitro* ispitivanja primjenom kultura stanica, je najčešće posljedica djelovanja ispitivane tvari na staničnu diobu (mitozu) i staničnu smrt (odumiranje stanica nekim od mehanizama stanične smrti).

Muse™ analizator staničnog zdravlja radi na principu „mini“ protočnog citometra i omogućuje praćenje broja i preživljenja stanica, stanične proliferacije, stanične diobe, apoptoze i oksidativnog stresa. Brzo i jednostavno mjerenje uređaja temelji se na analizi 3 parametra uz primjenu optimiranih kitova te omogućuje kvantifikaciju podataka na razini pojedinačne stanice.



Slika 7. Muse™ analizator staničnog zdravlja (Anonymus 4, 2019)

Princip određivanja učinka raznih agenasa ili kemikalija na stanicu bazira se na mjerenju količine DNA u stanici čime dobivamo bitne informacije o staničnom ciklusu. Budući da se za vizualizaciju stanica pri analizi staničnog ciklusa koristi boja (najčešće propidij-jodid, PI) koja interkalira u DNA i fluorescira nakon pobuđivanja laserom, stanice je potrebno fiksirati etanolom ili nekim drugim sredstvom koje djeluje na propusnost stanične membrane. Intenzitet fluorescencije je u proporcionalnom odnosu s količinom DNA u stanici što nam omogućuje klasificiranje stanica u G0/G1, S i G2/M fazi.

3.2.5.1. Priprema stanica

Priprema stanica za analizu provedena je prema protokolu dobivenom uz Muse® Cell Cycle kit. Budući da se radi o adherentnim stanicama, uklonjen je medij u kojem su kultivirane i dodan tripsin (250 µL) kako bi se stanice odvojile od podloge te je dodano 750 µL medija, a nakon resuspendiranja, uzorak je prebačen u Eppicu od 1,5 mL. Centrifugiranjem (300g/5 min) je odvojen supernatant, a na talog je dodano 500 µL PBS te je, nakon ponovnog centrifugiranja i odvajanja supernatanta, na dnu ostavljeno otprilike 50 µL PBS-a u kojem su stanice

resuspendirane. U novu Eppicu stavljeno je 1 mL ledeno hladnog (-20 °C) 70%-tnog EtOH u koji je dodavano kap po kap suspenzije stanica uz vortexiranje nakon čega je Eppica zatvorena i ostavljena na fiksiranje u zamrzivaču najmanje 3 sata, a može i preko noći. Fiksirane stanice ostaju stabilne do 3 mjeseca na -20 °C.

Na dan kada će stanice biti analizirane treba ih obojati. 200 µL stanica fiksiranih u EtOH (5×10^5 - 1×10^6 stanica mL⁻¹) prebačeno je u Eppicu od 1,5 mL i centrifugirano, a nakon što je odvojen supernatant, stanice su resuspendirane u 0,25 mL PBS. Nakon ponovnog centrifugiranja i uklanjanja supernatanta, stanice su resuspendirane u 200 µL reagensa te inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, folijom zaštićene od svjetla.

3.2.5.2. Analiza na Muse™ uređaju

Uređaj prije rada treba isprati, a sustav se testira primjenom System Check Kit-a te se potom postavljaju parametri analize s pozitivnom i negativnom kontrolom. Kada se kreće s analizom pojedinačnih uzoraka potrebno je svaki uzorak lagano resuspendirati kako agregirane stanice ne bi začepile cjevčice, odnosno, kako bismo imali uzorak pojedinačnih stanica u suspenziji.

3.2.6. Obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [3]$$

s pripadajućim standardnim devijacama S.D.:

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [4]$$

gdje je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati kako ekstrakti iz otpada od proizvodnje kakaa djeluju na rast i stanični ciklus zdrave „normalne“ humane stanične linije (HaCaT) i tumorske humane stanične linije (HeLa). Navedeni otpad se dodatno iskorištava jer još uvijek sadrži određene količine biološki aktivnih komponenata (polifenola) sa značajnim antioksidacijskim djelovanjem kojima se osim toga pripisuju antikancerogeni, antimikrobni, protuupalni i drugi pozitivni učinci na zdravlje ljudi.

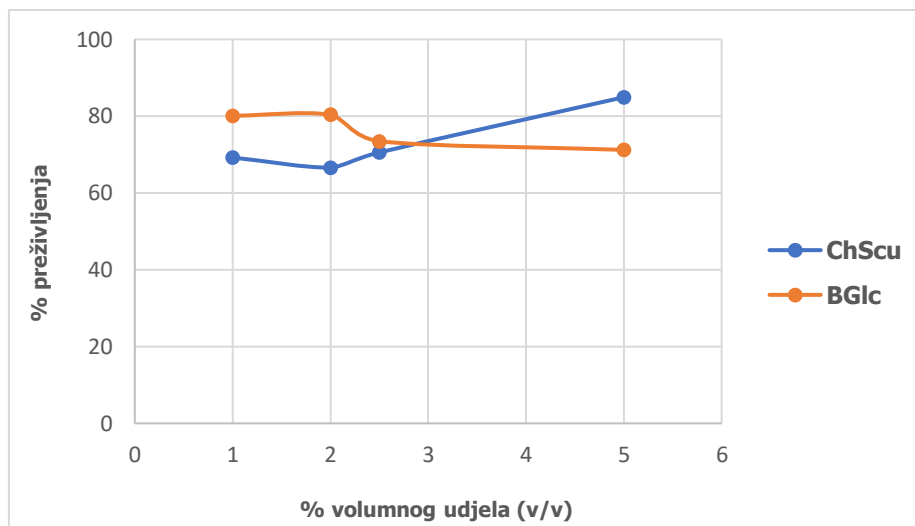
U cilju smanjenja količine otpada nastalog tradicionalnom preradom i pripremom proizvoda od kakaa, korišteni ekstrakti su pripremljeni iz otpada kakaa pomoću prirodnih eutektičnih otapala što ide u prilog održivim tehnologijama zelene kemije.

Prethodno je ispitano 6 različitih eutektičkih otapala za pripremu ekstrakata iz otpada kakaa, a u ovom radu predmet istraživanja su bila dva ekstrakta pripremljena pomoću otapala betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorid:saharozna (ChScu), budući su upravo ti ekstrakti imali najviši antioksidacijski kapacitet u usporedbi s ostalim ekstraktima (Belavić, 2019).

4.1. Učinak ekstrakata kakaa na preživljenje HeLa i HaCaT stanica

HeLa i HaCaT stanice su nacijepljene na ploče od 96 jažica te su nakon 24 sata tretirane ekstraktima iz otpada kakaa pripremljenim u eutektičnim otapalima ChScu i BGlc u volumnim udjelima od 1 do 5% (v/v) ekstrakata. Nakon inkubacije koja je trajala 48 sati, MTS kolorimetrijskom metodom je određeno preživljenje stanica, a rezultat je izražen kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice. Rezultati djelovanja ekstrakata na rast HeLa i HaCaT stanica prikazani su na slikama 8 i 9.

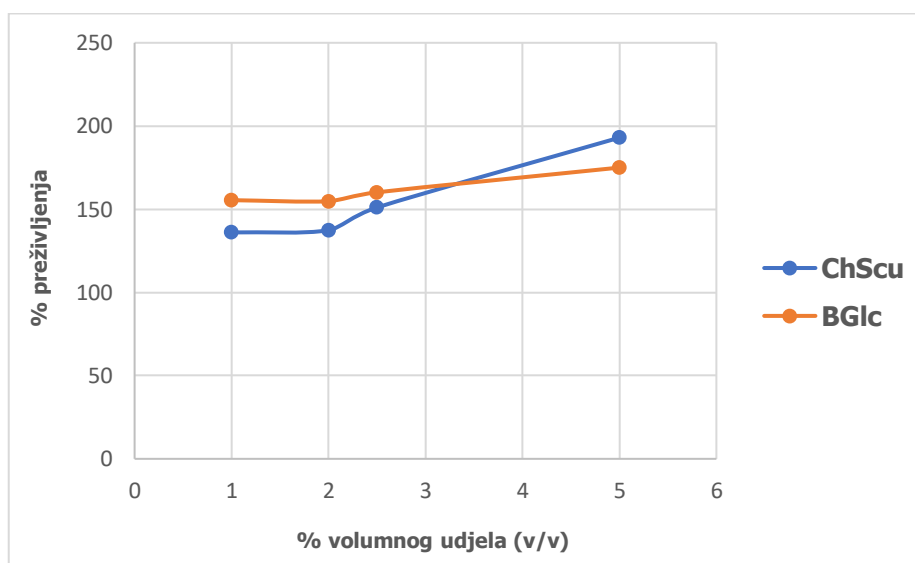
Na temelju rezultata prikazanih na slici 8 može se uočiti da ekstrakti u BGlc u volumnom udjelu od 1 do 2 % (v/v) nisu imali inhibitorni učinak na rast tumorske stanične linije dok je već malim povećanjem udjela na 2,5% (v/v) uočen značajniji inhibicijski učinak koji raste i daljnjim povećanjem volumnog udjela do 5% (v/v). Ekstrakti u ChScu pokazali su blagi inhibitorni učinak pri najnižim udjelima 1-2% (v/v).



Slika 8. Utjecaj ekstrakata otpada kakaa pripravljenih u betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorid:saharoza (ChScu) otapalu na HeLa staničnu liniju

Oba ispitana ekstrakta ne pokazuju na HeLa stanicama klasičan doza-učinak odnos, odnosno povećanjem volumnog udjela ne smanjuje se proporcionalno preživljenje stanica, što ukazuje na to da bi za eventualnu primjenu tih ekstrakata trebale dodatno ispitati različite koncentracije i volumni udjeli.

Nadalje, ekstrakti otpada kakaa pripravljeni korištenjem eutektičnih otapala pokazali su pozitivan učinak na rast normalne stanične linije HaCaT i njenu proliferaciju što je vidljivo na slici 9.

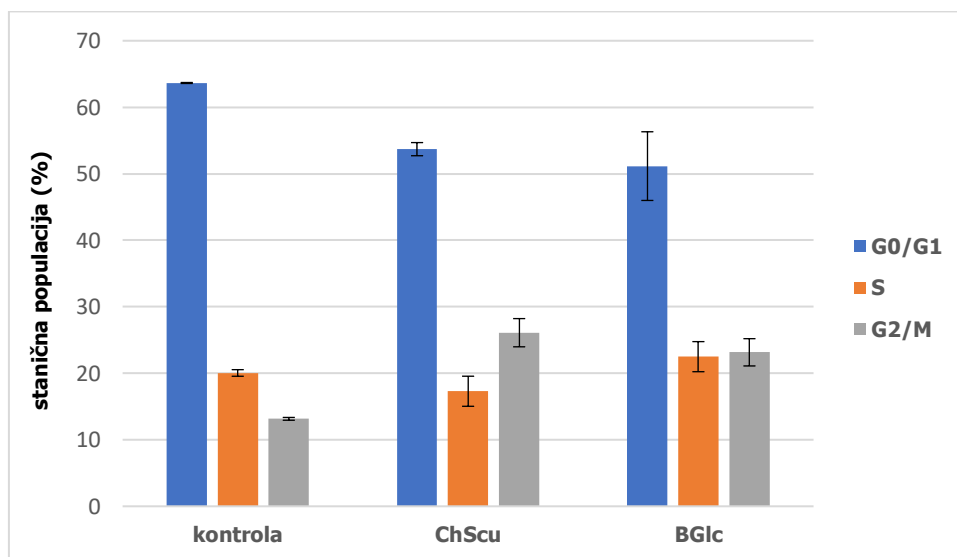


Slika 9. Utjecaj ekstrakata otpada kakaa pripravljenih u betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorid:saharoza (ChScu) otapalu na HaCaT staničnu liniju

Svi volumni udjeli oba ekstrakta su pozitivno djelovali na rast HaCaT stanica, što zajedno s rezultatima na tumorskim HeLa stanicama, gdje je zapažen inhibicijski učinak, može ukazivati na moguću primjenu u antitumorskoj alternativnoj terapiji.

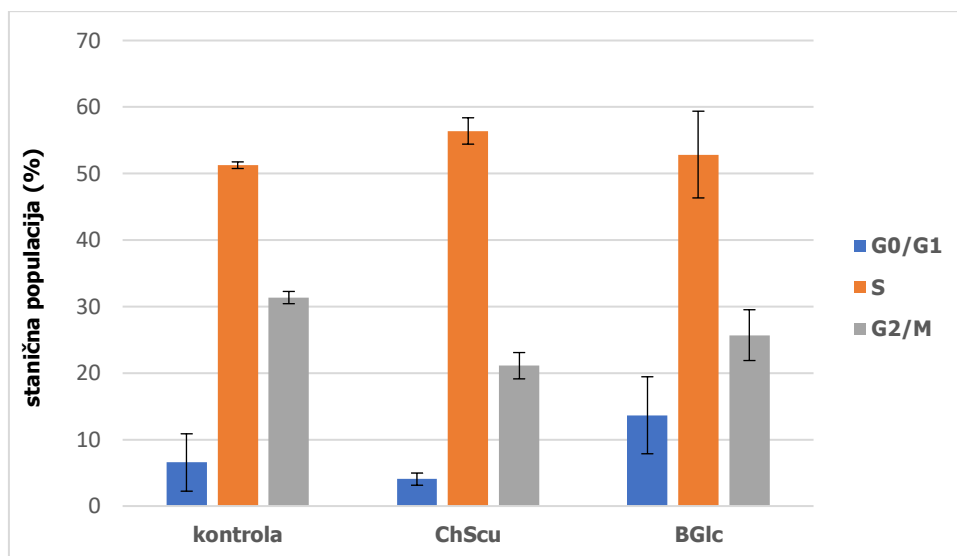
4.2. Učinak ekstrakata kakaa na stanični ciklus HeLa i HaCaT stanica

Priprema HeLa i HaCaT stanica za analizu provedena je prema protokolu dobivenom uz Muse[®] Cell Cycle kit, a analiza je provedena primjenu Muse[®] analizatora staničnog zdravlja. Rezultati na slici 10 prikazuju udio stanične populacije kontrolnih HeLa stanica koje nisu tretirane ekstraktima i HeLa stanice koje su tretirane 2% (v/v) ekstraktima ChScu i BGlc u različitim fazama njihove stanične diobe. U G0/G1 fazi možemo zamijetiti manji udio tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, a u S fazi, neovisno o tretmanu, postotak je otprilike sličan. Značajan statistički porast udjela stanica u fazi G2/M zapažamo kod tretiranih HeLa stanica, s oba ekstrakta, što ukazuje na zastoj staničnog ciklusa u navedenoj fazi. Pri provođenju testa citotoksičnosti zapaženo je manje preživljenje tretiranih HeLa stanica što je vjerojatno posljedica djelovanja ekstrakata na staničnu diobu tj. zastoj u G2/M fazi.



Slika 10. Utjecaj ekstrakata otpada kakaa pripremljenih u betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorid:saharoza (ChScu) otapalu na faze staničnog ciklusa kod HeLa stanične linije

Na isti način, ispitano je djelovanje 2%-tnih (v/v) ekstrakata na stanični ciklus kod HaCaT stanica što je prikazano na slici 11.



Slika 11. Utjecaj ekstrakata otpada kakaa pripravljenih u betain:glukoza (BGlc) i kolin-klorid:saharoza (ChScu) otapalu na faze staničnog ciklusa kod HaCaT stanične linije

Uspoređujući razdiobu HaCaT stanica po fazama staničnog ciklusa (slika 11), možemo uočiti da nema značajne razlike u % stanica u G0/G1 i S fazi između kontrolnih i tretiranih stanica, a jedina razlika u odnosu na kontrolne stanice je smanjenje udjela stanica u G2/M fazi kod HaCaT stanica tretiranih s ekstraktom pripravljenim s ChScu.

Positivan učinak ekstrakata na rast HaCaT stanica pokazali su i Zillich i sur. (2015), koji su rast keratinocita objasnili pozitivnim djelovanjem polifenola iz ekstrakata. Ovakav rezultat je na neki način indirektna potvrda da otpad iz proizvodnje kakaa sadrži još uvijek značajne količine polifenola koji su uspješno ekstrahirani primjenom eutektičnih otapala ChScu i BGlc.

Bauer i sur. (2016) su ispitali utjecaj zrna kakaa podvrgnutih različitim uvjetima obrade na preživljenje stanica i indukciju apoptoze na humanim tumorskim stanicama pluća (A549). MTT test je pokazao smanjenje vijabilnosti A549 stanica nakon tretmana ekstraktima kaka zrna, dok je analiza protočnim citometrom pokazala povećani udio stanica u G1 fazi te dvostruko veći postotak apoptotskih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom. Navedeni rezultati su slični našima dobivenim na HeLa stanicama te obje studije zajedno ukazuju da ekstrakt kaka zrna, ali i otpada iz proizvodnje kaka, može imati zaštitni učinak protiv raka pluća, odnosno, grlića vrata maternice.

Dobiveni rezultati mogu se, obzirom na potencijalnu primjenu navedenih ekstrakata u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, promatrati na dva načina. S jedne strane činjenica da navedeni ekstrakti inhibiraju rast tumorskih HeLa stanica, a potiču rast normalnih HaCaT stanica, zanimljivo bi bilo istražiti njihovu moguću antitumorsku aktivnost pri čemu svakako treba dobro optimirati količinu ekstrakta koji bi se koristio zbog toga što krivulje ovisnosti preživljenja stanica o volumnom udjelu ne slijede pravilno trend doza-učinak. Nadalje, obzirom na udio ukupnih polifenola u ChScu i BGlc ekstraktima iz otpada kaka te njihov antioksidacijski kapacitet (Belavić, 2019) i činjenicu da ekstrakti ne pokazuju citotoksično djelovanje na normalnu HaCaT staničnu linju mogla bi se istražiti njihova moguća primjena kao dodatka prehrani s antioksidativnim djelovanjem. Navedeno nadilazi cilj ovog rada, no svakako će biti predmet daljnjih istraživanja u cilju dodatne vaorizacije i iskorištenja otpada iz proizvodnje kaka.

5. ZAKLJUČCI

1. Učinak ekstrakata iz otpada kakaa pripremljenih primjenom eutektičkih otapala betain:glukoza i kolin-klorid:saharoza ispitana je *in vitro* primjenom MTS kolorimetrijske metode u volumnim udjelima 1-5 % (v/v). Ekstrakti pokazuju inhibitorno djelovanje na HeLa tumorsku staničnu liniju te pozitivno djelovanje na rast normalne HaCaT stanične linije.
2. Zapaženi učinak na rast stanica u korelaciji je sa staničnim ciklusom. Kod HeLa stanica zabilježen zastoj stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa, dok kod HaCaT stanica nije bilo značajne razlike u razdiobi populacije stanica po fazama staničnog ciklusa.
3. Dobiveni rezultati ukazuju na moguću primjenu navedenih ekstrakata iz otpada kakaa u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog njihovog sadržaja polifenola, antioksidacijskog i drugih dokazanih bioloških učinaka.

6. LITERATURA

Angeles Martin, M., Goya, L., Ramos, S. (2013) Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology* **56**: 336-351.

Anonymus 1 (2019) Zrna kaka, <https://www.bastabalkana.com/2019/01/kakao-theobroma-cacao-postoje-li-lekovita-svojtva-kakao/>

Anonymus 2 (2019) Neubauer-ova komora, <https://www.amazon.com/Sigma-Aldrich-BR717805-1EA-Counting-BLAUBRAND-Neubauer/dp/B074PBGRFW>

Anonymus 3 (2019) Neubauer-ova mrežica, <https://www.fishersci.at/shop/products/blaubrand-neubauer-counting-chambers/10360141>

Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y. Y., Hamid, R. A., Kasran, R. (2016) *Theobroma cacao*: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds. *Tropical Life Science Research* **27**: 21 - 42.

Bauer, D., Pimentel de Abreu, J., Oliveira, H. S. S., Goes-Neto, A., Koblitz, M. G. B., Junger Teodoro, A. (2016) Antioxidant Activity and Cytotoxicity Effect of Cocoa Beans Subjected to Different Processing Conditions in Human Lung Carcinoma Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 1 - 11.

Belavić, V. (2019) Biološka aktivnost ekstrakata iz otpada proizvodnje kaka. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Cipolletti, M., Solar Fernandez, V., Montalesi, E., Morano, M., Fiocchetti, M. (2018) Beyond the Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols in Cancer: the Modulation of Estrogen Receptors (ERs) Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 2624.

Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry* **200**: 159 - 166.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioprocess Processing* **109**: 52 - 73.

Kwon, Y. (2018) Food-derived polyphenols inhibit the growth of ovarian cancer cells irrespective of their ability to induce antioxidant responses. *Heliyon* **4**: No~e00753.

- Li, W., He, N., Tian, L., Shi, X. (2016) Inhibitory effects of polyphenol-enriched extract from Ziyang tea against human breast cancer MCF-7 cells through reactive oxygen species-dependent mitochondria molecular mechanism. *Journal of Food and Drug Analysis* **24**: 527-533.
- Mocanu, M. M., Nagy, P., Szollosi, J. (2015) Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Polyphenols. *Molecules* **20**: 22578-22620.
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., Nebesny, E. (2013) The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao L.*), Depending on Variety, Growing Region and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**: 1176 - 1192.
- Panić, M., Radić Stojković, M., Kraljić, K., Škevin, D., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chemistry* **283**: 628 - 636.
- Panić, M. (2016) Priprava ekstrakata komine grožđa pomoću eutetičkih otapala, izolacija antocijana te njihova in vitro biološka aktivnost. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 169-175.
- Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Cvjetko Bubalo, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research* **14**: 14188 - 14196.
- Radošević, K., Čurko, N., Gaurina-Srček, V., Cvjetko-Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević-Ganić, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *Food Science and Technology* **73**: 45 - 51.
- Slivac I., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. str. 25-28.
- Young Shin, S., Yoon, H., Ahn, S., Kim, D. W., Bae, D., Koh, D. H., Han Lee, Y., Lim, Y. (2013) Structural Properties of Polyphenols Causing Cell Cycle Arrest at G1 Phase in HCT116

Human Colorectal Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 16970-16985.

Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Kersch, M. (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science* **37**: 455-464.

Izjava o izvornosti

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

Ime i prezime studenta