

# Biološki učinak polifenola iz mahune graška i ljuske luka kao sekundarnih izvora fitokemikalija

---

Stanečić, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:647177>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2020.

Željka Stanečić

1321/MB

**BIOLOŠKI UČINAK POLIFENOLA  
IZ MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE  
LUKA KAO SEKUNDARNIH  
IZVORA FITOKEMIKALIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ksenije Durgo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (IP-2018-01-9717), voditelj: prof.dr.sc. Božidar Šantek.

Neizmjerne sam zahvalna mentorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo na nesebično podijeljenom znanju i pomoći, a prije svega na izrazitoj volji, upornosti i trudu zahvaljujući kojima smo, unatoč izvanrednoj situaciji, uspjele privesti kraju jedno poglavlje mog života.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci tijekom svih uspona i padova kroz moje obrazovanje.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### BIOLOŠKI UČINAK POLIFENOLA IZ MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA KAO SEKUNDARNIH IZVORA FITOKEMIKALIJA

*Željka Stanečić, 1321/MB*

**Sažetak:** Prehrambena industrija proizvodi veliku količinu otpadne biomase koja predstavlja ekološki rizik, stoga se danas intenzivno istražuju novi načini valorizacije otpadnih materijala. Nusproizvodi poput mahune graška i ljuske luka nedovoljno su iskorišteni izvori bioaktivnih spojeva, među kojima se ističu polifenoli, sekundarni biljni metaboliti koji posjeduju visok antioksidacijski potencijal te pružaju značajnu zaštitu od razvoja raznih kroničnih bolesti. Cilj rada je istražiti biološki učinak ekstrakata mahune graška i ljuske luka na stanične makromolekule te humane stanične linije karcinoma epitela usne šupljine Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 u koncentracijama pri kojima se ovi spojevi mogu naći u realnim uvjetima u probavnom sustavu čovjeka. Rezultati su pokazali da polifenoli sadržani u mahuni graška djeluju protektivno na stanične makromolekule sprečavajući štetne učinke UV zračenja i slobodnih radikala na genetički materijal te oksidacijske promjene na proteinima i lipidima, dok je ljuska luka bogata polifenolima koji u određenim uvjetima mogu ispoljiti prooksidacijsko i genotoksično djelovanje.

**Ključne riječi:** sekundarni izvori polifenola, antioksidacijsko djelovanje, genotoksičnost, stanične makromolekule, stanične linije karcinoma epitela usne šupljine (Cal27) i hepatokarcinoma (HepG2)

**Rad sadrži:** 62 stranice, 20 slika, 82 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Ksenija Durgo

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Draženka Komes
2. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo
3. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
4. Prof.dr.sc. Ksenija Marković (zamjena)

**Datum obrane:** 25. studenoga 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### BIOLOGICAL EFFECT OF POLYPHENOLS FROM PEA PEEL AND ONION SKIN AS A SECONDARY SOURCE OF PHYTOCHEMICALS

*Željka Stanečić, 1321/MB*

**Abstract:** The food industry produces a large amount of waste biomass that poses as an environmental risk, hence today new ways of valorizing waste materials are being intensively researched. By-products such as pea peel and onion skin are underutilized sources of bioactive compounds, such as polyphenols, secondary plant metabolites that have high antioxidant potential and provide significant protection against the development of various chronic diseases. The aim of this study is to determine the biological effect of pea peel and onion skin extracts on cellular macromolecules, human oral epithelial carcinoma cell line Cal27 and hepatocellular liver carcinoma cell line HepG2 in concentrations at which these compounds can be found in the human digestive system. The results showed that polyphenols contained in the pea peel have a protective effect on cellular macromolecules by preventing the harmful effects of UV radiation and free radicals on genetic material and oxidative changes on proteins and lipids, while onion skin is rich in polyphenols that can exert prooxidative and genotoxic effects.

**Keywords:** *secondary sources of polyphenols, antioxidant effect, genotoxicity, cellular macromolecules, oral epithelial carcinoma (Cal27) and hepatocarcinoma (HepG2) cell lines*

**Thesis contains:** 62 pages, 20 figures, 82 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD Ksenija Durgo, Full Professor*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Božidar Šantek*, Full professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 25 November 2020

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. GRAŠAK ( <i>Pisum sativum</i> ) .....	2
2.2. LUK ( <i>Allium cepa</i> ).....	3
2.3. FITOKEMIKALIJE.....	5
2.3.1. Polifenoli .....	5
2.3.2. Kvercetin .....	7
2.4. POLISAHARIDI .....	8
2.5. SLOBODNI RADIKALI .....	9
2.5.1. Oštećenje nukleinskih kiselina .....	10
2.5.2. Oksidacija proteina.....	10
2.5.3. Lipidna peroksidacija .....	11
2.6. ANTIOKSIDANSI .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
3.1. MATERIJALI .....	14
3.1.1. Uzorci.....	14
3.1.2. Modelne makromolekule .....	15
3.1.3. Biološki test sustavi.....	16
3.1.4. Laboratorijska oprema.....	17
3.1.4.1. Kemikalije .....	17
3.1.4.2. Otopine.....	18
3.1.4.3. Pribor.....	21
3.1.4.4. Uređaji.....	22
3.2. METODE.....	23
3.2.1. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na humanim staničnim linijama Cal27 i HepG2 klonogenim testom (eng. <i>clonogenic assay</i> ).....	23
3.2.2. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na modelnoj DNA i staničnom genetičkom materijalu.....	24
3.2.2.1. Učinak na modelni plazmid <i>phiX174 RFI DNA</i> .....	24
3.2.2.2. <i>Tretman stanica Cal27 i HepG2 ekstraktima mahune graška i ljuske luka</i> .....	25



3.2.2.3. Određivanje oštećenja DNA u stanicama Cal27 i HepG2 komet testom (eng. <i>single cell gel electrophoresis</i> ili <i>comet assay</i> , SCGE).....	25
3.2.3. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na modelnim i staničnim proteinima .....	27
3.2.3.1. Određivanje stupnja oksidacije na modelu proteina albumina iz goveđeg seruma .....	27
3.2.3.2. Određivanje ukupnih proteina metodom po Bradfordu.....	28
3.2.3.3. Određivanje stupnja oksidacije proteina u stanicama Cal27 i HepG2 .....	29
3.2.4. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na modelnim i staničnim lipidima .....	30
3.2.4.1. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije na modelu linoleinske kiseline .....	30
3.2.4.2. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije u stanicama Cal27 i HepG2 .....	31
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	33
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>34</b>
4.1. CITOTOKSIČNI I PROLIFERATIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA HUMANIM STANIČNIM LINIJAMA CAL27 I HEPG2 ODREĐEN KLONOGENIM TESTOM (eng. <i>clonogenic assay</i> ) .....	35
4.2. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA MODELNOJ DNA I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU .....	36
4.2.1. Biološki učinak na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA .....	36
4.2.2. Oštećenje DNA u stanicama Cal27 i HepG2 određeno komet testom (eng. <i>single cell gel electrophoresis</i> ili <i>comet assay</i> , SCGE).....	38
4.3. PROOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA MODELNIM I STANIČNIM PROTEINIMA .....	44
4.3.1. Stupanj oksidacije modelnog proteina albumina iz goveđeg seruma .....	44
4.3.2. Stupanj oksidacije proteina na staničnim linijama Cal27 i HepG2 .....	45
4.4. PROOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA MODELNIM I STANIČNIM LIPIDIMA .....	47
4.4.1. Stupanj lipidne peroksidacije na modelu linoleinske kiseline.....	47
4.4.2. Stupanj lipidne peroksidacije određen metodom TBARS na staničnim linijama Cal27 i HepG2 .....	48
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>54</b>

# 1. UVOD

Prehrambena industrija proizvodi masivan otpad koji zbog svoje količine stvara probleme u okolišu, stoga se intenzivno istražuju novi načini vrednovanja otpadnih materijala. Danas se provode mnoga istraživanja za učinkovito iskorištavanje otpadne biomase koje bi istovremeno rezultiralo inovativnim funkcionalnim prehrambenim proizvodima s povećanom antioksidativnom i prebiotičkom kvalitetom. Na taj način bi dio proizvedene otpadne biomase ponovno pronašao primjenu u prehrambenom lancu pokazujući poboljšana i učinkovita svojstva. Sukladno tome, posljednjih desetljeća raste važnost otpadne biomase različitog biljnog podrijetla kao novog obnovljivog izvora, kako za proizvodnju biokemikalija, tako i za ekstrakciju važnih primarnih i sekundarnih metabolita kojima je moguće povećati kvalitetu prehrambenih proizvoda (Choi i sur., 2015). Grašak (*Pisum sativum*) i luk (*Allium cepa*) zastupljeni su u prehrani ljudi zbog visokog sadržaja vlakana, proteina, škroba, elemenata u tragovima te mnogih fitokemijskih tvari (Rungruangmaitree i Jiraungkoorskul, 2017). Nusproizvodi poput mahune graška i ljuske luka prepoznati su kao neiskorišteni potencijalni izvor bioaktivnih spojeva, od koji se ističu polifenoli, sekundarni biljni metaboliti koji se sintetiziraju kao odgovor na stresne čimbenike u okolišu. Karakterizira ih izrazito antioksidacijsko djelovanje te zaštitna uloga u borbi protiv kardiovaskularnih i neuroloških bolesti te disfunkcije izazvane oksidacijskim stresom (Griffiths i sur., 2002).

S obzirom na navedeno, očekuje da će ekstrakti mahune graška i ljuske luka pokazati protektivno djelovanje na stanične makromolekule u smislu sprečavanja štetnog učinka UV zračenja i slobodnih radikala na genetički materijal, kao i sprečavanje nastanka jednolančanih i dvolančanih lomova DNA te sprečavanja oksidacijskih promjena na proteinima i lipidima. Cilj ovog rada je ispitati učinak bioaktivnih molekula iz liofiliziranih ekstrakata mahune graška i ljuske luka pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam tijekom 24 sata. Biološki učinak pratit će se djelovanjem na genetički materijal, određivanjem stupnja karbonilacije proteina i lipidne peroksidacije. Kao test sustavi koristit će se modeli staničnih makromolekula (plazmid phiX174 RF1 DNA, protein albumin iz goveđeg seruma i lionoleinska kiselina) te kontinuirane humane stanične linije karcinoma epitela usne šupljine Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2. Iz dobivenih rezultata moći će se zaključiti koja je optimalna koncentracija istraživanih ekstrakata koja će djelovati protektivno na stanične makromolekule i koja bi se mogla upotrijebiti u prehrambenoj industriji za oplemenjivanje i dobivanje funkcionalne hrane.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. GRAŠAK (*Pisum sativum*)

*Pisum sativum*, poznat kao zeleni ili vrtni grašak, zeljasta je jednogodišnja biljka iz porodice *Fabaceae* (Rungruangmaitree i Jiraungkoorskul, 2017). Biljka graška je vrlo izdržljiva te sadrži šuplju stabljiku koja se penje i može narasti do 1,8 m duljine. Stabljike imaju završne vitice koje olakšavaju penjanje i nose složene listove. Na stabljici se mogu uočiti crvenkasto ljubičasti, ružičasti ili bijeli cvjetovi oblikom nalik leptiru. Plod graška čini mahuna koja može narasti do 10 cm, a unutar mahune je kratkim peteljčkama pričvršćeno 5 do 10 sjemenki (slika 1). Sjeme može biti zeleno, žuto, bijelo ili šareno (Encyclopaedia Britannica, 2019).



Slika 1. Grašak (*Pisum sativum*) (Anonymous 1, 2020).

Jedna je od najvažnijih mahunarki, a može rasti samostalno ili u kombinaciji sa žitaricama u umjerenim klimatskim regijama, a širom svijeta se konzumira kao povrće za prehranu ljudi te u svrhu hranjenja životinja (Upasana i Vinay, 2018). Grašak je važan u prehrani zbog visokog sadržaja vlakana, proteina, škroba, elemenata u tragovima i mnogih fitokemijskih tvari. Dokazano je da posjeduje antibakterijsko, antidijabetičko, antifungalno, protuupalno i antioksidativno djelovanje (Rungruangmaitree i Jiraungkoorskul, 2017). Grašak, poput ostalih mahunarki, sadrži razne fitokemikalije, uključujući fenolne spojeve, fitate, saponine i oksalate. Glavni fenolni sastojci mahunarki su tanini, fenolne kiseline i flavonoidi. Fenolni spojevi prepoznati su po svojoj sposobnosti da djeluju kao antioksidansi i najbolje su karakterizirane

fitokemikalije u grašku. Grašak sadrži razne fenole, s najvišim koncentracijama većine u ovojnici sjemena, posebno u sortama sa tamnim sjemenkama (Dahl i sur., 2012).

Zbog sezonske i pokvarljive prirode graška, njegova je dostupnost ograničena samo na određeni dio godine. Konzerviranjem, zamrzavanjem i skladištenjem u hladnjaku, razne industrije prerade graška nastoje ih sačuvati i plasirati na tržište, tako da su sezonski usjevi postali dostupni tijekom cijele godine. Unatoč tome, ove industrije proizvode vrlo veliku količinu otpada od mahune graška kao nusproizvoda. Takva količina otpada graška mogla bi postati ozbiljan ekološki problem i predstavljati gubitak vrijedne biomase i hranjivih sastojaka. Osim aspekata onečišćenja i opasnosti, otpad od prerade graška je jeftin i lako dostupan i to u velikim količinama te bi se, nakon biološke obrade, mogao koristiti bez velikog gubitka kvalitete i pretvoriti u korisne proizvode veće vrijednosti (Upasana i Vinay, 2018). Mahuna graška jedan je od podcijenjenih, neiskorištenih izvora energije koji može poslužiti kao potencijalna sirovina za proizvodnju celulaze (Verma i sur., 2011). Tijekom posljednjih godina lignocelulozna biomasa koristi se za proizvodnju bioetanola. Tehnologija koja najviše obećava u pretvorbi lignocelulozne biomase u gorivo etanol temelji se na enzimskoj razgradnji celuloze pomoću celulaznih enzima. Stoga je vrlo česta uporaba poljoprivrednog otpada, a upravo se mahuna graška, kao jeftini lignocelulozni otpad, pokazala dobrim kandidatom za proizvodnju bioetanola (Rehman i sur., 2015).

## 2.2. LUK (*Allium cepa*)

Luk (*Allium cepa*) je zeljasta dvogodišnja biljka iz porodice *Amaryllidaceae*, a razne vrste rasprostranjene su na širokom rasponu geografskih širina i nadmorskih visina u Europi, Aziji, Sjevernoj Americi i Africi (Griffiths i sur., 2002). Obično ima jednu ili više peteljki bez lišća koje dosežu visinu od 75 do 180 cm završavajući sferičnim nakupinama malih zeleno bijelih cvjetova. Koncentrične lisne baze biljke tijekom razvoja bubre i tvore podzemnu jestivu lukovicu (slika 2). Luk je vrlo izdržljiv i može preživjeti u raznim uvjetima uzgoja. Lukovice se razlikuju po veličini, obliku, boji i oštini, premda toplija klima obično daje luk blažeg, slađeg okusa. Karakteristična oština luka rezultat je prisutnosti hlapljivog ulja bogatog sumporom, a oslobađanje ovog ulja tijekom guljenja ili usitnjavanja izaziva suze u očima (Encyclopaedia Britannica, 2020). Luk posjeduje snažne karakteristične arome koji ga čine važnim sastojkom u hrani (Ifesan, 2017).



Slika 2. Luk (*Allium cepa*) (Anonymous 2, 2018).

Tijekom prerade hrane uklanjaju se vanjske ljuske i korijeni lukovice koji se smatraju otpadom (Ifesan, 2017). Osušena vanjska ljuska luka sadrži mnoštvo obojenih bioaktivnih fenola, od kojih se neki ne nalaze u jestivom dijelu povrća. Luk sadrži visoku razinu fenolnih spojeva koji imaju izrazita antioksidativna svojstva, pokazuju korisne učinke u borbi protiv kardiovaskularnih i neuroloških bolesti te disfunkcije izazvane oksidacijskim stresom (Griffiths i sur., 2002). Jedan je od glavnih izvora prehrambenih flavonoida koji sadrži antocijane, spojeve koji su odgovorni za crvenu ili ljubičastu boju kod nekih sorti te flavonole koji mogu doprinijeti stvaranju žutih i smeđih spojeva, a koji su prisutni u ljusci (Ifesan, 2017). Istraživanja su pokazala da su kvercetin i njegovi glukozidi najzastupljeniji fenoli u vanjskim suhim slojevima luka, što objašnjava snažne antioksidativne učinke te sposobnost zaštite od kardiovaskularnih bolesti (Pucciarini i sur., 2019). Konkretno, kvercetin-4-glukozid i kvercetin-3,4-diglukozid često su istaknuti kao glavni flavonoli prisutni u ekstraktima luka (Slimestrad i sur., 2007). Budući da prehrambena industrija proizvodi veliku količinu otpada od luka koji može predstavljati smetnju za okoliš ako se ne odlaže pravilno, potrebno je istražiti antioksidativna i antimikrobna svojstva ljuske luka i njegovu potencijalnu primjenu u prehranbenom sustavu (Ifesan, 2017).

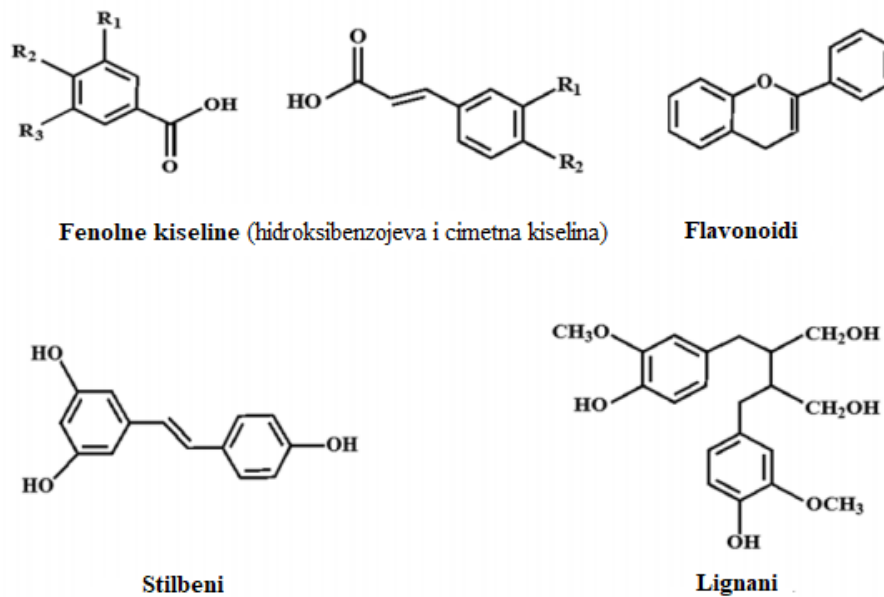
## 2.3. FITOKEMIKALIJE

Fitokemikalije su velika skupina bioaktivnih spojeva koji pripadaju sekundarnim biljnim metabolitima i imaju važnu ulogu u razvoju biljaka te zaštiti od različitih patogenih agenasa (Forni i sur., 2019). Bioaktivne fitokemikalije mogu se podijeliti na pet skupina spojeva: polifenole, karotenoide, alkaloidne, spojeve koji sadrže dušik i organosumporne spojeve. Polifenoli i karotenoidi uključuju nekoliko stotina spojeva i najviše su proučavane skupine (Ramos i sur., 2011). Iako se većina ovih spojeva sintetizira konstitutivno, njihova se sinteza može pojačati u stresnim uvjetima, ovisno o uvjetima rasta i stresoru (Forni i sur., 2019). Fitokemikalije pokazuju izrazite farmakološke učinke primjenjive na liječenje bakterijskih i gljivičnih infekcija, kao i kronično degenerativnih bolesti (Mendoza i sur., 2018).

### 2.3.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se sintetiziraju kao odgovor na stresne čimbenike u okolišu. Djeluju kao antioksidansi koji neutraliziraju razarajuću reaktivnost neželjenih reaktivnih kisikovih ili dušikovih vrsta koje nastaju kao nusprodukti tijekom metaboličkih procesa u tijelu (Pandey i Rizvi, 2009). Osim toga, pružaju učinkovitu zaštitu od UV zračenja te inhibiraju razvoj patogena (Kondratyuk i Pezzuto, 2004). Epidemiološke studije pokazale su da polifenoli pružaju značajnu zaštitu od razvoja nekoliko kroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinom, dijabetes, infekcije, starenje i astma (Pandey i Rizvi, 2009).

Do sada je u različitim biljnim vrstama identificirano više od 8000 polifenolnih spojeva (Cory i sur., 2018). Svi biljni fenolni spojevi potječu od uobičajenog intermedijera, fenilalanina ili bliskog prekursora, šikiminske kiseline. Mogu nastati iz dva glavna sintetska puta: šikimatnog i acetatnog. Javljaju se prvenstveno u konjugiranim oblicima s jednim ili više šećernih ostataka povezanih s hidroksilnim skupinama, iako postoje i izravne veze šećera (monosaharidi, disaharidi ili oligosaharidi) s aromatskim ugljikom. Često su vezani i s drugim spojevima, poput karboksilnih i organskih kiselina, amina, lipida te drugim fenolima (Kondratyuk i Pezzuto, 2004). Polifenoli se klasificiraju na temelju njihove strukture, a najčešće se dijele u 4 skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane, kao što je prikazano na slici 3 (Spencer i sur., 2008).



Slika 3. Kemijske strukture različitih skupina polifenola (prilagođeno prema Pandey i Rizvi, 2009).

Bioraspoloživost svakog polifenola u tijelu se razlikuje, no međutim ne postoji korelacija između količine polifenola u hrani i njihove bioraspoloživosti u ljudskom tijelu. Većina polifenola prisutna je u hrani u obliku estera, glikozida ili polimera koji se ne mogu apsorbirati u nativnom obliku (D'Archivio i sur., 2007). Prije procesa apsorpcije, takvi spojevi moraju se hidrolizirati crijevnim enzimima ili mikroflorom debelog crijeva. Tijekom apsorpcije polifenoli prolaze razne modifikacije. U stanicama crijeva podliježu konjugaciji, a kasnije u jetri metilaciji, sulfacijom i/ili glukuronidaciji. Posljedično, oblici koji dopiru u krv i tkiva različiti su od onih prisutnih u hrani i vrlo je teško identificirati sve metabolite i procijeniti njihove biološke aktivnosti. Najčešći polifenoli u našoj prehrani nisu nužno oni koji pokazuju najveću koncentraciju aktivnih metabolita u ciljanim tkivima, stoga se biološka svojstva polifenola poprilično razlikuju (Pandey i Rizvi, 2009).

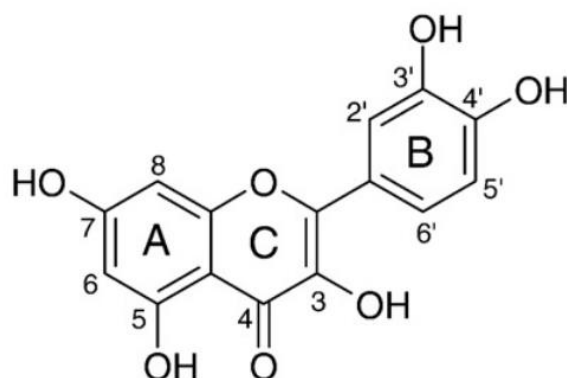
Polifenoli se također razlikuju po mjestu apsorpcije kod ljudi. Neki od polifenola dobro se apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu, dok se drugi u crijevima ili drugom dijelu probavnog trakta. U hrani svi flavonoidi, osim flavanola, postoje u glikoziliranim oblicima. Sudbina glikozida u želucu još nije potpuno utvrđena. Većina glikozida vjerojatno se opire kiseloj hidrolizi u želucu i tako dolazi netaknuta u crijeva gdje se mogu apsorbirati samo aglikoni i nekoliko glukozida (Gee i sur., 1998). Eksperimentalna ispitivanja provedena na štakorima

pokazala su da je apsorpcija na želučanoj razini moguća samo za neke flavonoide, poput kvercetina, ali ne i za njihove glikozide (Crespy i sur., 2002).

### 2.3.2. Kvercetin

Kvercetin je glavni polifenolni flavonoid koji se nalazi u više od dvadeset biljaka, uključujući jabuke, maline, luk, crveno grožđe, trešnje, agrume i zeleno lisnato povrće. Naziv kvercetin (3,3',4,5,7-pentahidroksiflavon) potječe od latinske riječi *quercetum*, što znači hrastova šuma, a pripada skupini flavonola koji se ne mogu proizvesti u ljudskom tijelu. Žute je boje, slabo je topljiv u vrućoj vodi, prilično je topljiv u alkoholu i lipidima, a netopljiv je u hladnoj vodi (David i sur., 2016). Među povrćem i voćem u kojem je zastupljen, sadržaj kvercetina najveći je upravo u luku, a odlučujući faktor za koncentraciju kvercetina u luku su boja i vrsta lukovice (Shankar i sur., 2015).

Kvercetin se sastoji od dva aromatska prstena A i B, međusobno povezana heterocikličkim prstenom C koji sadrži kisik (slika 4). Kad kvercetin reagira sa slobodnim radikalima, sam postaje radikalom donirajući proton. Ovaj kvercetinski radikal ima premalo energije da bi mogao biti reaktivan zbog delokalizacije elektrona rezonancijom. O-dihidroksilne skupine B prstena, 4-okso skupina u konjugaciji s 2,3-alkenom i 3- i 5-hidroksilna skupina odgovorne su za održavanje kvercetinske stabilnosti i antioksidativnog djelovanja u reakciji sa slobodnim radikalima (Shankar i sur., 2015).



Slika 4. Strukturna formula kvercetina (Boots i sur., 2008).



Neki životinjski modeli te *in vitro* istraživanja pokazali su da kvercetin ima širok spektar biološkog djelovanja, uključujući antikancerogena, protuupalna i antivirusna djelovanja, a također utječe i na smanjenje peroksidacije lipida (Li i sur., 2016). Smatra se da je jedan od najčešće korištenih bioflavonoida za liječenje metaboličkih i upalnih poremećaja (David i sur., 2016). Poznato je da kvercetin smanjuje sadržaj malondialdehida (MDA), istodobno povećavajući aktivnost katalaze i superoksid dismutaze (SOD) za kontrolu protuupalnih i antiapoptoznih procesa radi učinkovite zaštite srca od sekundarne srčane disfunkcije uslijed oksidacijskog stresa i upale. Kvercetin također smanjuje prekomjernu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta te može učinkovito spriječiti ozljede uzrokovane oksidativnim stresom (Batiha i sur., 2020).

#### 2.4. POLISAHARIDI

Polisaharidi su polimerni ugljikohidrati sastavljeni od dugih lanaca monosaharidnih jedinica povezanih glikozidnim vezama. Mogu se okarakterizirati kao netoksični, prirodni biorazgradivi biopolimeri (Udayan i sur., 2017). Predstavljaju strukturno raznoliku grupu makromolekula relativno raširenih u prirodi (Wang i sur., 2013). Struktura molekule može biti linearna ili jako razgranata, sastavljena od istih (homopolisaharid) ili različitih (heteropolisaharid) monosaharidnih jedinica. Zbog strukturnih razlika posjeduju različita fizikalna i kemijska svojstva. Nutritivno se polisaharidi mogu podijeliti u dvije skupine: škrob i neškrobni polisaharidi. Škrob je polimer glukoze koji može postojati u obliku ravnog (amiloza) ili razgranatog lanca (amilopektin). Neškrobne polisaharide čini raznolika skupina spojeva koji nisu probavljivi u ljudskom organizmu (Lunn i Buttriss, 2007).

Brzim razvojem analitičkih tehnika razvijen je i velik broj metoda za identifikaciju i kvantifikaciju polisaharida. Polisaharidi privlače sve veću pozornost u raznim istraživanjima biološke aktivnosti te se općenito ističu snažnim antioksidativnim djelovanjem. Molekularna težina utječe na antioksidativnu sposobnost polisaharida. Uz to, optimalna antioksidativna sposobnost varira ovisno o vrsti polisaharida (Wang i sur., 2018).

## 2.5. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikal definira se kao bilo koja kemijska vrsta koja posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci i sposobna je za neovisno postojanje (Desai i sur., 2014). Prisutnost nesparenog elektrona rezultira određenim zajedničkim svojstvima koje dijeli većina radikala. Mnogi radikali su nestabilni i vrlo reaktivni te mogu donirati ili primiti elektron od drugih molekula, ponašajući se kao oksidansi ili reducensi (Lobo i sur., 2010).

Reaktivne kisikove vrste (ROS), kao što su superoksidni anion ( $O^{2-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $HO\bullet$ ) reaktivne su molekule nastale djelomičnom redukcijom kisika. Proizvode se endogeno kao prirodni nusprodukti u procesu mitohondrijske oksidativne fosforilacije, no mogu ih inducirati i egzogeni izvori poput UV svjetla, ionizirajućeg zračenja, načina života, prehrane, stresa i pušenja (Ray i sur., 2012). Pri niskim i umjerenim koncentracijama potrebni su za odvijanje fizioloških aktivnosti kao što su unutarstanična signalizacija i homeostaza, stanična smrt, imunološka obrana od patogena te indukcija mitogenog odgovora (Katerji i sur., 2019). Za pravilno odvijanje fizioloških funkcija u organizmu nužno je održavanje ravnoteže između redukcijskog i oksidacijskog stanja, zbog čega živi organizmi sadrže antioksidativne sustave koji reguliraju razinu slobodnih radikala. Narušavanje ravnoteže između proizvodnje ROS-a i sposobnosti antioksidativnih sustava da detoksiciraju ove reaktivne međuprodukte rezultira oksidativnim stresom (Ray i sur., 2012). Slobodni radikali stvoreni u prekomjernim i nekontroliranim količinama u uvjetima oksidacijskog stresa uzrokuju oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida, što posljedično može ozbiljno ugroziti zdravlje i pridonijeti razvoju bolesti (Katerji i sur., 2019).

Izravno mjerenje razine ROS-a s velikom točnošću i preciznošću poprilično je teško zbog njihovog kratkog vijeka trajanja i brze reaktivnosti. Peroksilni radikal ( $RO_2\bullet$ ) i vodikov peroksid relativno su stabilne molekule s poluvijekom od nekoliko sekundi do minuta, za razliku od hidroksilnih radikala koji su vrlo reaktivni te imaju poluvijek kraći od nanosekunde. Stoga je obećavajući alternativni pristup za procjenu oksidacijskog stresa u određenim uzorcima neizravno mjerenje ROS-a ispitivanjem oksidativnog oštećenja koje ovi radikali nanose nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima u stanicama (Katerji i sur., 2019).

### 2.5.1. Oštećenje nukleinskih kiselina

Mnogi eksperimenti dokazuju da su deoksiribonukleinska (DNA) i ribonukleinska (RNA) kiselina osjetljive na oksidativna oštećenja (Woo i sur., 1998). Kao rezultat okolišnih čimbenika i uobičajenih metaboličkih procesa unutar stanice, oštećenja DNA mogu se klasificirati u dvije glavne kategorije, endogena i egzogena oštećenja.

Endogena oštećenja su ona koja proizvode agensi unutar same stanice, odnosno proizvodi normalnog staničnog metabolizma, poput reaktivnih vrsta kisika. Postoje četiri glavne vrste oštećenja DNA uslijed endogenih staničnih procesa: oksidacija baza, alkiliranje baza (stvaranje 7-metilgvanina), hidroliza baza (deaminacija i depirimidinacija) te naposljetku neusklađenost baza zbog pogrešaka u replikaciji DNA (Alsulami i sur., 2018). 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG) jedna je od glavnih oksidativnih modifikacija baza u DNA koja nastaje hidrosilacijom ostataka deoksigvanozina (Katerji i sur., 2019). Utvrđeno je da su oksidativni nukleotidi, kao glikol, dTG i 8-hidroksi-2-deoksigvanozin, povišeni tijekom oksidativnog oštećenja DNA pod UV zračenjem ili oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Predloženo je da se 8-hidroksi-2-deoksigvanozin koristi kao biološki marker za oksidativni stres (Hattori i sur., 1997). Egzogena oštećenja uzrokovana su fizikalnim ili kemijskim sredstvima u okolišu, kao što su ultraljubičasto (UV) zračenje sunca, X-zrake, gama zrake, kemoterapija i radioterapija, hidroliza, biljni toksini i mutagene kemikalije, posebno aromatski spojevi koji djeluju kao interkalirajući agensi (Alsulami i sur., 2018).

### 2.5.2. Oksidacija proteina

Proteini se mogu oksidativno modificirati na tri načina: oksidativnom modifikacijom specifičnih aminokiselina, cijepanjem peptida posredovanim slobodnim radikalima i umrežavanjem proteina zbog reakcije s produktima peroksidacije lipida. Proteini koji sadrže aminokiseline poput metionina, cisteina, arginina i histidina skloniji su oksidaciji (Lobo i sur., 2010).

Oksidacija proteina utječe na promjenu mehanizma transdukcije signala, aktivnost enzima, toplinsku stabilnost i osjetljivost na proteolizu, što dovodi do starenja. Oksidativno oštećeni proteini mogu sadržavati vrlo reaktivne skupine koje pridonose oštećenju membrane i mnogih

staničnih funkcija. Peroksilni radikal obično se smatra slobodnim radikalom za oksidaciju proteina. (Lobo i sur., 2010).

Najčešća i obično ireverzibilna oksidativna modifikaciju koja zahvaća proteine je karbonilacija. Ova modifikacija je kemijski stabilna, što je posebno važno za čuvanje i detekciju karboniliranih proteina. Tijekom posljednjih trideset godina razvijene su mnoge biokemijske i analitičke metode za ispitivanje karbonilacije proteina (Colombo i sur., 2016). Najuspješnija metoda podrazumijeva reakciju karboniliranog proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu dolazi do nastajanja stabilnog produkta dinitrofenilhidrazona čija se koncentracija može odrediti spektrofotometrijski na 370 nm te može korelirati s koncentracijom oksidiranih proteina (Katerji i sur., 2019).

### 2.5.3. Lipidna peroksidacija

Svojstvo slobodnih radikala da 'izvlače' elektrone iz membrana lipida, uzrokujući oštećenje membrane i rezultirajući povećanom proizvodnjom slobodnih radikala, definirana je kao peroksidacija lipida (Desai i sur., 2014). Većinu bioloških membrana čini dvosloj amfipatskih lipida gdje su hidrofobnim dijelovi usmjereni prema unutrašnjosti membrane, dok su hidrofilne skupine okrenute prema vanjskoj strani. Peroksidacija lipida odvija se na polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) smještenim na staničnim membranama, a zatim nastavlja s radikalnom lančanom reakcijom (Ayala i sur., 2014). Polinezasićene masne kiseline iznimno su osjetljive na peroksidaciju koja predstavlja nenadoknativ događaj u životu stanice koji se može podijeliti u tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju (Desai i sur., 2014).

Proces inicijacije započinje napadom ROS-a koji izdvoji atom vodika iz metilenske skupine, stvarajući tako slobodni lipidni radikal. Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  te  $\text{RO}_2\cdot$ , dok je  $\text{O}_2$  nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika. Nastali ugljikovi radikali se nastoje stabilizirati oblikujući konjugirane diene. U aerobnim uvjetima konjugirani dieni se spajaju s kisikom i tvore visoko reaktivni peroksilni radikal ( $\text{LOO}\cdot$ ) koji napada drugu masnu kiselinu pri čemu se stvara lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ) te novi radikal. Na taj način se širi lančana reakcija procesa peroksidacije lipida (Lovell i sur., 1995). Tijekom propagacije  $\text{LOOH}$  u prisutnosti željeza disocira do  $\text{LO}\cdot$  i  $\text{LOO}\cdot$  koji dovode do reinicijacije peroksidacije. Disocijacijom  $\text{LOOH}$  dolazi do nastanka konačnih produkata peroksidacije:

aldehida i ugljikovodika. Za terminaciju je potreban antioksidans koji donira vodikov atom  $\text{LOO}\cdot$ . Pri tom nastaje odgovarajući radikal antioksidansa koji s drugim radikalom tvori neradikalne produkte (Štefan i sur., 2007).

Niske razine peroksidacije lipida prirodni su metabolički proces u normalnim uvjetima. Unutarstanična neravnoteža antioksidansa dovodi do oksidativnog stresa, što rezultira peroksidacijom lipida koja dovodi do stvaranja proizvoda peroksidacije koji zauzvrat mogu eskalirati nespecifične reakcije slobodnih radikala. Na visokim temperaturama lipidni peroksidi se razlažu dajući niz proizvoda neugodnog okusa i neugodnog mirisa kao što su epoksidi, ketoni, kiseline i aldehidi (Desai i sur., 2014).

Peroksidacija lipida jedno je od najistraženijih posljedičnih djelovanja reaktivnih vrsta kisika (ROS) na strukturu i funkciju membrane. Može se odrediti kvantitativno ili kvalitativno različitim metodama. Najpopularniji testovi za mjerenje peroksidacije lipida su test tiobarbiturne kiseline (TBARS) i određivanje konjugacije diena (Desai i sur., 2014).

## 2.6. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su tvari koje mogu spriječiti ili usporiti oštećenje stanica uzrokovano djelovanjem slobodnih radikala. Ljudsko tijelo sadrži složeni antioksidativni obrambeni sustav za zaštitu staničnih spojeva od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima, ROS-om i drugim reaktivnim vrstama (Boots i sur., 2008). Stanična antioksidativna obrana može se kategorizirati u primarni i sekundarni obrambeni sustav. Primarna obrana sastoji se od različitih antioksidativnih enzima i širokog raspona malih antioksidativnih molekula. Sekundarna obrana uključuje proteolitičke i lipolitičke enzime, kao i sustave za popravak DNA (Cadenas, 1997).

Antioksidansi mogu smanjiti oksidativno oštećenje izravno reakcijom sa slobodnim radikalima ili neizravno inhibiranjem aktivnosti ili ekspresije enzima koji stvaraju slobodne radikale ili pojačavanjem aktivnosti ili ekspresije unutarstaničnih antioksidativnih enzima (Lü i sur., 2009). Antioksidansi koji izravno reagiraju s radikalima ili drugim reaktivnim vrstama kako bi spriječili oksidaciju staničnih spojeva mogu se podijeliti u enzimске i neenzimске antioksidanse (Boots i sur., 2008). Enzimski antioksidansi se nakon reakcije s reaktivnim vrstama učinkovito regeneriraju. Zapravo, enzim djeluje kao katalizator pa su potrebne male količine ovih enzima

kako bi se osigurao zaštitni učinak. Važni antioksidativni enzimi su superoksid dismutaze, katalaze i glutaciona peroksidaze (Diplock i sur., 1998). Neenzimski antioksidansi mogu se podijeliti na hidrofilne i hidrofobne. Hidrofobni antioksidansi, poput  $\alpha$ -tokoferola, karoteinoida i koenzima Q10 prisutni su u lipoproteinima i membranama, dok se hidrofilni antioksidansi, poput glutaciona i askorbata, pretežno se mogu naći u citosolnim, mitohondrijskim i nuklearnim vodenim odjeljcima (Chaudiere i Ferrari-Iliou, 1999).

Oksidativni stres i oksidativna modifikacija biomolekula uključeni su u brojne fiziološke i patofiziološke procese poput starenja, ateroskleroze, upale i karcinogeneze te toksičnosti lijekova (Lovell i sur., 1995). Tijelo ima nekoliko mehanizama za suzbijanje oksidativnog stresa stvaranjem antioksidansa, bilo prirodno generiranih *in situ* (endogeni antioksidansi), bilo unesenih hranom (egzogeni antioksidansi). Uz bezbroj prirodnih i sintetičkih antioksidativnih spojeva, teško je predvidjeti jedan molekularni mehanizam kojim bi objasnilo njihovo antioksidativno djelovanje. Mogu se razlikovati najmanje tri vrste molekularnih mehanizama antioksidativnih aktivnosti: prvo, postupak koji uključuje prijenos radikalnog karaktera stvaranjem 'reaktivnog' radikala izvedenog iz antioksidansa. Drugo, sličan postupak u kojem se prijenos radikalnog karaktera postiže stvaranjem "stabilnog" ili "inertnog" radikala izvedenog iz antioksidansa. Treće, male molekule koje oponašaju enzimsku aktivnost, poput superoksid dismutaze i glutaciona peroksidaze (Cadenas, 1997).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci

Priprema ekstrakata iz mahune graška i ljuske luka korištenih u ovom radu provedena je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorci ljuske luka prikupljeni su u studentskoj kantini, dok su mahune graška sakupljene na poljoprivrednom zemljištu neposredno nakon berbe graška. Prikupljeni uzorci sušeni su na zraku kroz 3 dana, nakon čega je uslijedilo usitnjavanje, a potom prosijavanje. Za ekstrakciju mahune graška kao otapalo je korištena destilirana voda, pri čemu je omjer uzorak:otapalo iznosio 1:20 (w/v). Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 °C kroz 20 min. Nakon ekstrakcije slijedi centrifugiranje na 9500 rpm kroz 15 min te filtracija. Pripremljen je i ekstrakt mahune graška u kojem su precipitirani polisaharidi dodatkom 4 x većeg volumena etanola (96 %) u ekstrakt. Ekstrakti graška s polisaharidima i bez polisaharida koncentrirani su pod vakuumom, nakon čega se podvrgavaju liofilizaciji (-47 °C, 24 h) kako bi se dobili ekstrakti u praškastom obliku. Ekstrakcija ljuske luke se provodila s etanolom (70 %, v/v) kao otapalom, pri čemu je omjer uzorak:otapalo iznosio 1:20 (w/v). Ekstrakcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi kroz 30 min. Nakon ekstrakcije slijedilo je centrifugiranje na 9500 rpm kroz 15 min, a potom filtracija. Dobiveni filtrat uparava se do suhog pod vakuumom.

Za provođenje eksperimenata korištene su ishodišne otopine ekstrakata koje su sadržavale 10 mg mL<sup>-1</sup> polifenola te su iz njih pripremljene radne otopine u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> polifenola. Odabrani raspon koncentracija temelji se na preporučenom dnevnom unosu polifenola.

### 3.1.2. Modelne makromolekule

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

Za ispitivanje učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na DNA koristi se plazmid phiX174 RF1 DNA. To je dvolančani kružni plazmid dugačak 5386 pb s molekulskom masom od  $3,5 \times 10^6$  Da, a izoliran je iz *E. coli* (Sanger i sur., 1977). Ukoliko nastupi oštećenje, dolazi do razmatanja plazmida koji u gelu putuje sporije od neoštećenog superzavijenog plazmida.

Protein albumin iz goveđeg seruma (BSA) je najzastupljeniji protein krvne plazme s molekulskom masom 66,5 kDa te je građen od 585 aminokiselinskih ostataka (Bujacz, 2012). BSA se koristi zbog svoje stabilnosti i niske cijene jer se velike količine mogu lako pročistiti iz goveđe krvi, nusproizvoda stočarske industrije. Zbog široke dostupnosti koristi se u raznim laboratorijskim primjenama, uključujući njegovu funkciju kao standarda prilikom određivanja koncentracije proteina (Chruszcz i sur., 2013). Multifunkcionalni je protein s izvanrednim kapacitetom vezanja liganda, što ga čini transportnom molekulom za širok raspon metabolita, lijekova, hranjivih sastojaka, metala i drugih molekula. Zbog svojstava vezanja liganda ima široku kliničku, farmaceutsku i biokemijsku primjenu (Majorek i sur., 2012).

Linoleinska kiselina ( $C_{18}H_{32}O_2$ ) je esencijalna nezasićena omega-6 masna kiselina koja se obično nalazi u orašastim plodovima, sjemenkama i rafiniranim biljnim uljima. Sadrži dvije dvostruke veze na 9. i 12. ugljikovom atomu od funkcionalne karbonilne skupine (Whelan i Fritsche, 2013). Najzastupljenija je polinezasićena masna kiselina u staničnim membranama sisavaca te ima ulogu u održavanju razine fluidnosti membrane (Spiteller, 1998), stoga može poslužiti kao modelna makromolekula za određivanje stupnja lipidne peroksidacije u ovom radu.



### 3.1.3. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustavi u ovom radu korištene su kontinuirane humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2.

Cal27 kontinuirana je stanična linija izolirana iz pločastog epitela karcinoma jezika. Stanice su izolirane 1982. godine iz lezije jezika oralnog karcinoma 56-godišnjeg muškarca bijele rase (Gioanni i sur., 1988). Jedna je od najčešće korištenih staničnih linija za proučavanje utjecaja ispitivanih spojeva i kemikalija na pločaste epitelne stanice oralnih karcinoma (Jiang i sur., 2009).

HepG2 kontinuirana je stanična linija izolirana iz hepatocelularnog karcinoma 15-godišnjeg dječaka bijele rase. Svoju primjenu pronalazi u ispitivanjima djelotvornosti i toksičnosti lijekova, znanstvenim ispitivanjima hepatocelularnog metabolizma i toksičnosti ksenobiotika, otkrivanju prehrambenih i okolišnih citotoksičnih i genotoksičnih agenasa, kao i citoprotektivnih i antigenotoksičnih agenasa (Mersch-Sundermann i sur., 2004).

Navedene stanične linije kultivirane su u monosloju u plastičnim T-bocama u kompletiranom mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) s dodatkom 10 %-tne otopine fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS). Stanice su uzgajane u inkubatoru pri kontroliranim uvjetima atmosfere uz 5 % CO<sub>2</sub> na temperaturi od 37 °C. Nakon uzgoja stanice se odvajaju od podloge pomoću 0,25 %-tne otopine tripsina, a potom se nakon 10-ak minuta djelovanje tripsina zaustavlja dodatkom medija sa serumom. Početna koncentracija stanica od 10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup> koja je potrebna za daljnju provedbu eksperimenta podešena je brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici.

### 3.1.4. Laboratorijska oprema

#### 3.1.4.1. Kemikalije

- Agaroza niske točke tališta (LMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Amonijev tiocijanat ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), *Fisher*, Velika Britanija
- Askorbinska kiselina, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Bromtimol plavo, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Coomassie blue, *Bio-Rad, SAD*
- Dinitrofenil hidrazin (DNPH), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Dimetil sulfoksid (DMSO), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etil-acetat, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etidij-bromid ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ ), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Ekstrakti mahune graška i ljuske luka
- Fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Giemsa boja, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Glicerol, *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (HCl), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Kristal violet, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Linoleinska kiselina, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Malondialdehid, *Sigma Chemical, Steinheim*, Njemačka
- Metanol, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Natrijev-laurilsarkozinat, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Natrijev hidroksid (NaOH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

- Plazmid phiX174 RF1 DNA, *Thermo Scientific, SAD*
- RPMI 1640 medij, *Capricorn Scientific, GmbH, Njemačka*
- Trikloroctena kiselina (TCA), *Fisher, Velika Britanija*
- Tripsin, *Capricorn Scientific GmbH, Njemačka*
- Tween 20, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Tiobarbiturna kiselina (TBA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Željezov sulfat heptahidrat (FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Željezov klorid heksahidrat (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*

#### 3.1.4.2. Otopine

TAE pufer:

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

Agarozni gel, 1,5 %-tni:

- |             |        |
|-------------|--------|
| • Agaroz    | 1,5 g  |
| • TAE pufer | 100 mL |

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

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

Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat, 1 M:

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

Natrijev hidrogenfosfat, 1 M:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7,1 g
- Destilirana voda 50 mL

Fosfatni pufer, 0,2 M:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  1 M
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M
- Razrijedi do 0,2 M

Emulzija linoleinske kiseline:

- Linoleinska kiselina 0,1402 g
- Tween 20 0,1402 g
- Fosfatni pufer, 0,2 M 25 mL

Amonijev tiocijanat, 30 %-tni:

- $\text{NH}_4\text{SCN}$  30 g
- Destilirana voda do 100 mL

Klorovodična kiselina, 3,5 %-tna:

- $\text{HCl}$ , 37% 8,12 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Željezov sulfat, 0,02 M:

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

Željezov klorid, 0,5 mM:

- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  4,3 g
- Destilirana voda 10 mL

Vodikov peroksid, 10 mM:

- $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3 % 0,11 mL
- Destilirana voda 10 mL

Dinitrofenil hidrazin, 10 mM:

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

Otopina Giemsa i Kristal violet boje:

- Kristal violet 0,125 g
- Giemsa boja 1,25 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Pufer za lizu stanica:

- NaCl, 2,5 M 130 g
- EDTA, 10 mM 29,225 g
- Tris, 10 mM 1,078 g
- Natrij-laurilsarkozinat, 1% 8,9 g
- Triton X-100 1 mL
- DMSO 10 mL

Pufer za alkalnu elektroforezu:

- NaOH, 10 M 30 mL
- Na<sub>2</sub>-EDTA, 200 mM 5 mL
- Destilirana voda 965 mL

Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5):

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

Otopina NMP agaroze:

- NMP agarozna 0,15 g
- PBS 10 mL

Otopina LMP agaroze:

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

Bradfordov reagens:

- Coomassie blue 10 mg
- EtOH, 96 % 5 mL
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Otopina tiobarbiturne kiseline:

- TBA 0,8 g
- TCA 100 mL

#### 3.1.4.3. Pribor

- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmayerove tikvice, 20-100 mL
- Falcon epruvete
- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Laboratorijske žlice
- Menzure, 50-1000 mL
- Mikropipete, 10, 20, 200, 1000 µL, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske pločice s 24 i 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- Plastične Petrijeve zdjelice, *Aptaca*, Canelli, Italija
- Propipete
- Staklene čaše
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Stakleni lijevjak

- Špatula
- T-boce, *Falcon, BD Company*, Franklin Lakes, SAD
- Vata za pravljenje čepova

#### 3.1.4.4. Uređaji

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH*, Wetzlar, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, *Forma Scientific*, SAD
- Invertni mikroskop, *Optika Microscopes*, Ponteranica, Italija
- Komora za sterilni rad, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambrige*, Engleska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, *Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd*, UK
- Svjetlosni mikroskop mikroskop, *Carl ZeissJena*, Njemačka
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Vaga, *Sartorius*, Engleska
- Vibromikser EV-102, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Vodena kupelj, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD

## 3.2. METODE

3.2.1. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuške luka na humanim staničnim linijama Cal27 i HepG2 klonogenim testom (eng. *clonogenic assay*)

Klonogeni test predstavlja *in vitro* metodu određivanja preživljenja stanica koja se temelji na sposobnosti pojedinačne stanice da izraste u koloniju vidljivu golim okom, pri čemu se pod pojmom kolonije podrazumijeva skup od barem 50 stanica. Klonogenim testom prati se svaka stanica u populaciji te testira svojstvo neograničene diobe, što je ujedno i važna karakteristika tumorskih stanica. Ovaj test koristi se prilikom određivanja preživljenja stanica nakon tretmana ionizirajućim zračenjem ili za određivanje učinkovitosti citotoksičnih agensa, budući da samo mali dio izloženih stanica zadrži sposobnost stvaranja kolonija (Franken i sur., 2006).

Prethodno uzgojene stanične linije Cal27 i HepG2 podvrgavaju se tripsinizaciji. Zatim slijedi brojanje stanica u Bürker-Türkovoju komorici s ciljem podešavanja koncentracije stanica u suspenziji tako da u Petrijevim zdjelicama promjera 5 cm, u koje se dodaje 5 mL stanične suspenzije, početna koncentracija stanica iznosi 30 stanica mL<sup>-1</sup>. Tako pripremljene suspenzije stanica nacijepljene su u mikrotitarske ploče s 24 jažice. Stanice su inkubirane pri kontroliranim uvjetima atmosfere na temperaturi od 37 °C, a nakon 24 h tretirane su ekstraktima mahune graška i ljuške luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>. Potom se 2 h nakon tretmana uklanja medij s ekstraktom, dodaje 5 mL svježeg medija i stanice se inkubiraju na 37 °C u vremenskom periodu od 7 do 10 dana kako bi se formirale kolonije. Nakon 7 do 10 dana od tretmana uklanja se medij, a porasle kolonije bojaju se 1,25 %-tnom otopinom Giemsa boje te 0,125 %-tnom otopinom kristal violeta. Slijedi inkubacija u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi, a posljednji korak je ispiranje boje PBS puferom te brojanje kolonija golim okom.

Postotak preživljenja stanica izračunava se prema formuli [1]:

$$\% \text{ preživljenja} = \left( \frac{N_{\text{uzorak}}}{N_{\text{kontrola}}} \right) \cdot 100$$

gdje je N - broj poraslih kolonija.



3.2.2. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na modelnoj DNA i staničnom genetičkom materijalu

#### 3.2.2.1. Učinak na modelni plazmid *phiX174 RF1 DNA*

Oksidativna oštećenja DNA generiraju u stanicama reaktivne kisikove vrste kao rezultat staničnog metabolizma i interakcije s egzogenim izvorima poput kancerogenih spojeva, lijekova i ionizirajućeg zračenja. Reaktivne kisikove vrste, s kojima se aerobne stanice najčešće susreću, mogu oštetiti DNA i dovesti do lezija baze i šećera, pucanja lanaca, umrežavanja DNA i proteina te stvaranja apurinskih i apirimidinskih mjesta (Alsulami i sur., 2018).

Biološki učinak ekstrakata na plazmid *phiX174 RF1 DNA* koji je podvrgnut UV zračenju u trajanju od 16 minuta te djelovanju vodikovog peroksida prati se elektroforezom u agaroznom gelu. Elektroforeza u agaroznom gelu najučinkovitiji je način odvajanja fragmenata DNA različitih veličina u rasponu od 100 bp do 25 kb. Fosfatna okosnica molekule DNA negativno je nabijena pa će fragmenti DNA, kad se stave u električno polje, migrirati prema pozitivno nabijenoj anodi. Budući da DNA ima jednoliki omjer mase i naboja, molekule DNA razdvajaju se na temelju veličine unutar agaroznog gela na način da je prijeđena udaljenost obrnuto proporcionalna logaritmu njegove molekularne težine. Nakon provedene elektroforeze, molekule DNA u gelu vizualiziraju se pomoću fluorescentnih boja koje se specifično vežu na nukleinske kiseline, a u tu svrhu najčešće se primjenjuje bojanje etidij bromidom (Lee i sur., 2012).

Za početak je potrebno pripremiti 1,5 %-tni agarozni gel u TAE puferu. Agaroz se u puferu zagrijava u mikrovalnoj pećnici u intervalima od 30 s, sve dok se potpuno ne otopi. Potrebno je pričekati da se agaroz ohladi na 65 °C kako ne bi došlo do oštećenja kalupa za gel. Rastopljena agaroz potom se ulijeva u kalup, postavlja se češalj za formiranje jažica, ostavi da se agaroz stegne na sobnoj temperaturi, a potom se uklanja češalj (Lee i sur., 2012). Uzorci za elektroforezu sadrže 3  $\mu\text{L}$  otopine plazmida u TAE puferu, 1  $\mu\text{L}$  3 %-tnog  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ekstrakte mahune graška i ljuske luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1  $\text{mg mL}^{-1}$  te odgovarajući volumen TAE pufera do konačnog volumena uzorka 30  $\mu\text{L}$ . Svi uzorci izlažu se djelovanju UV zračenja u trajanju od 16 minuta. Također su pripremljene i četiri kontrole: negativna koja sadrži 3  $\mu\text{L}$  otopine plazmida i 27  $\mu\text{L}$  TAE pufera, zatim kontrola koja sadrži 3  $\mu\text{L}$  otopine plazmida, 1  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i 26  $\mu\text{L}$  TAE pufera, potom kontrola koja sadrži 3  $\mu\text{L}$  otopine plazmida i 27  $\mu\text{L}$  TAE

pufera i podvrgnuta je UV zračenju (16 min) te naposljetku pozitivna kontrola koja sadrži 3  $\mu\text{L}$  otopine plazmida, 1  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i 26  $\mu\text{L}$  TAE pufera te je također podvrgnuta UV zračenju (16 minuta). U tako pripremljene uzorke se dodaje 3  $\mu\text{L}$  obojenog pufera za nanošenje (eng. *loading buffer*) koji sadrži bromtimol plavo koji omogućuje praćenje napretka elektroforeze migracijom boje te glicerol koji povećava viskoznost uzorka i tako omogućava da uzorak tone u gel. Pripremljeni uzorci nanose se u jažice gela, nakon čega se dodaje TAE pufer tako da prekrije površinu gela. Pokreće se elektroforeza u trajanju od 60 minuta pri jakosti električne struje od 150 mA. Nakon provedene elektroforeze gel se boji u otopini etidij bromida u koncentraciji 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tijekom 15-20 minuta, izlaže UV zračenju, a zatim slijedi vizualizacija gela pod UV svjetlom.

### 3.2.2.2. *Tretman stanica Cal27 i HepG2 ekstraktima mahune graška i ljuske luka*

U plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm naciepljuje se po 5 mL stanične suspenzije Cal27 i HepG2 u početnoj koncentraciji od  $10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ , koja je podešena brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici, nakon čega slijedi inkubacija na 37 °C u trajanju od 24 h. Potom se medij zamjenjuje svježim i stanice se tretiraju ekstraktima mahune graška i ljuske luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Nakon tretmana od 2 h iz Petrijevih zdjelica uklanja se medij s ekstraktom, stanice se ispiru PBS puferom, tripsiniziraju i prebacuju u Eppendorf epruvete. Slijedi centrifugiranje 5 min na 5000 rpm, nakon čega se odbacuje supernatant, a talog sa stanicama se koristi u daljnjem provođenju eksperimenta.

### 3.2.2.3. *Određivanje oštećenja DNA u stanicama Cal27 i HepG2 komet testom (eng. single cell gel electrophoresis ili comet assay, SCGE)*

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu relativno je jednostavna, ali osjetljiva metoda za brzo otkrivanje i mjerenje razine oštećenja i popravka u molekuli DNA (Kopjar i sur., 2006). U vrlo kratkom vremenu pronašla je široku primjenu u epidemiološkim ispitivanjima i biomonitoringu na ljudima kako bi se utvrdilo oštećenje DNA kao posljedica djelovanja endogenih čimbenika te načina života (Betti i sur., 1995).

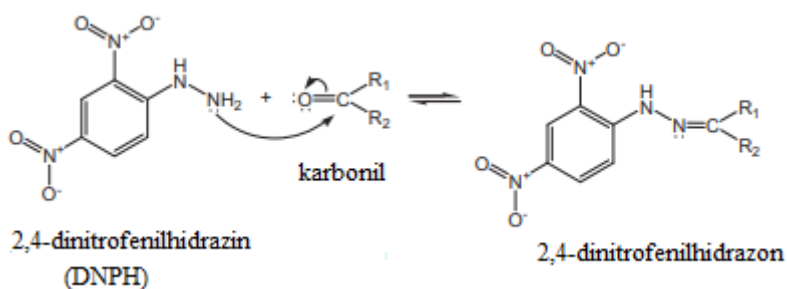
Metoda se sastoji od horizontalne elektroforeze pojedinačnih stanica koje se uklapaju u tanak sloj agaroze na mikroskopskom stakalcu. Citoplazma i membranske strukture u stanici liziraju se pomoću otopine visoke koncentracije etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta što rezultira uklanjanjem staničnih proteina i oslobađanjem ukupne DNA u stanici. Nastali jednolančani i dvolančani lomovi DNA uzrokuju lokalnu relaksaciju superzavijene DNA pri čemu nastaju fragmenti DNA različitih duljina. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel te zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. Kada se kroz gel propusti električni naboj, negativno nabijeni relaksirani dijelovi zavojnice putuju prema anodi formirajući „rep“ kometa. Intaktna DNA zbog velike molekularne mase nema sposobnost kretanja prema anodi te čini „glavu“ kometa (Wong i sur., 2005).

Tretman stanica Cal27 i HepG2 ekstraktima mahune graška sa i bez polisaharida te ekstraktima ljuske luka proveden je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.2. Zatim se na brušena predmetna stakalca nanosi i razmazuje 300  $\mu\text{L}$  otopine 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (eng. *normal melting point*, NMP) dobivene kuhanjem u PBS puferu. Na polimerizirani sloj NMP agaroze nanosi se sloj koji sadrži 2  $\mu\text{L}$  resuspendiranih stanica i 100  $\mu\text{L}$  0,5 %-tne agaroze niske točke tališta (eng. *low melting point*, LMP) temperirane na 37 °C. Nakon polimerizacije LMP agaroze sa resuspendiranim stanicama, nanosi se još jedan sloj od 100  $\mu\text{L}$  LMP agaroze. Nakon polimerizacije zadnjeg sloja, provodi se liza stanica u puferu za lizu preko noći. Potom se stakalca prenose u kadicu za elektroforezu koja je napunjena alkalnim puferom za elektroforezu. Elektroforeza se provodi pri naponu od 25 V i jakosti struje od 300 mA tijekom 10 minuta. Nakon provedene elektroforeze, stakalca se ispiru tri puta u razmaku od 5 minuta 0,4 M Tris-HCl (pH = 7,5) puferom s ciljem neutralizacije. Ovako pripremljeni gelovi bojaju se etidij bromidom u koncentraciji 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  te se nakon 10 minuta kratko ispiru s Tris-HCl puferom (pH = 7,5). Prije analize preparati se drže na hladnom zbog stabilizacije boje. Mjerenje se izvodi pomoću epifluorescencijskog mikroskopa, a za analizu slike koristi se računalni program *Comet Assay II*. Na svakom preparatu izmjereno je po 50 kometa, pri čemu se kao pokazatelji razine oštećenja DNA koriste parametri dužine i intenziteta repa te repni moment.

### 3.2.3. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na modelnim i staničnim proteinima

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

Detekcija i kvantificiranje proteinskih karbonila (PCO) u biološkim uzorcima neizravan je način za određivanje razine oksidacijskog stresa. Karbonilacija proteina široko je prihvaćen biljeg oksidacije proteina. Danas se koriste mnoge metode za procjenu sadržaja karboniliranih proteina, a najzastupljenija je metoda koja se bazira na reakciji 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s karbonilnim skupinama proteina što dovodi do stvaranja stabilnog 2,4-dinitrofenilhidazona, kao što je prikazano na slici 5. Dinitrofenilna skupina (DNP) može se detektirati i kvantificirati spektrofotometrijski s maksimumom apsorpcije na 370 nm (Colombo i sur., 2016).



Slika 5. Reakcija 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s karbonilom (prilagođeno prema Uchiyama i sur., 2011).

U ovom eksperimentu određuje se stupanj oksidacije proteina albumina iz goveđeg seruma (BSA). Uzorci sadrže 60  $\mu\text{L}$  BSA u koncentraciji 4  $\text{mg mL}^{-1}$ , 60  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$ , 60  $\mu\text{L}$  askorbinske kiseline, 60  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , ekstrakte ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1  $\text{mg mL}^{-1}$  te destiliranu vodu do konačnog volumena reakcijske smjese 600  $\mu\text{L}$ . Pozitivna kontrola umjesto ekstrakata sadrži 125  $\mu\text{L}$  troloxa koncentracije 10  $\text{mg mL}^{-1}$ , a negativna kontrola 125  $\mu\text{L}$  metanola. Svi uzorci pripremljeni su u 3 paralele. Tako pripremljeni uzorci se inkubiraju 30 minuta na 37  $^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije dodaje se 500  $\mu\text{L}$  dinitrofenil hidrazina (DNPH) i inkubira na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zatim se u inkubacijsku smjesu dodaje 500  $\mu\text{L}$  10 %-tne trikloroctene kiseline (TCA) kako bi se istaložili

proteini te inkubira na ledu 15 minuta. Uzorci se centrifugiraju tri puta, pri čemu se svaki puta odbacuje supernatant, a naposljetku se talog ispire s 1 mL etil-acetata kako bi se uklonio sav slobodni DNPH koji nije izreagirao. Na kraju se uzorci resuspendiraju u 500  $\mu\text{L}$  6 M gvanidin-HCl i mjeri se apsorbancija na 370 nm.

Za određivanje postotka oksidacije u uzorku koristi se sljedeća formula [2]:

$$\% \text{ oksidacije} = \left[ \frac{A_{370}(\text{uzorak})}{A_{370}(\text{negativna kontrola})} \right] \cdot 100$$

### 3.2.3.2. *Određivanje ukupnih proteina metodom po Bradfordu*

Metoda po Bradfordu je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina koja se bazira na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno s pobočnim grupama arginina te u manjoj mjeri i s pobočnim grupama histidina, lizina, tirozina, triptofana i fenilalanina. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama, pri čemu se sama boja stabilizira u anionskom obliku i dolazi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Pri tome se apsorpcijski maksimum pomiče sa 465 nm na 595 nm, što se prati spektrofotometrijski. Intenzitet razvijene boje u određenom opsegu koncentracija proteina proporcionalan je koncentraciji proteina. Ova metoda je u širokoj upotrebi zbog svoje jednostavnosti, brzine i širokog opsega proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina.

Potrebno je pripremiti otopine proteina albumina iz goveđeg seruma (BSA) miješanjem otopine početne koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> s odgovarajućim volumenom destilirane vode tako da konačne koncentracije proteina u uzorku budu 1, 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Za svaku koncentraciju proteina potrebno je pripremiti dvije paralele te za cijelu seriju mjerenja jednu slijepu probu. Potom se dodaje 1 mL Bradfordovog reagensa, lagano promiješa i ostavi 5 minuta na sobnoj temperaturi. Izmjeri se vrijednost apsorbancije na 595 nm ( $A_{595}$ ) i konstruira baždarni dijagram ovisnosti  $A_{595}$  o koncentraciji proteina u uzorku (Bradford, 1976). Dobivena jednadžba pravca iz baždarnog dijagrama koristi se kasnije u određivanju koncentracije proteina u uzorcima sa stanicama tretiranim ekstraktima. Potom se, također navedenom metodom, mjeri apsorbancija uzoraka sa stanicama tretiranim ekstraktima, pri čemu se uzima 5  $\mu\text{L}$  uzoraka (lizata stanica

tretiranih različitim koncentracijama ekstrakata mahune graška i ljuske luka), 95  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 1 mL Bradfordovog reagensa. Ponovno je za svaki uzorak potrebno pripremiti dvije paralele, kao i slijepu probu.

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

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

gdje je  $\gamma$  (proteina) – koncentracija proteina u uzorku izražena u  $\text{mg mL}^{-1}$ ,

$A_{595}$  – apsorbancija uzorka izmjerena na 595 nm,

b - odsječak na osi y baždarnog dijagrama,

a - koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama.

### 3.2.3.3. Određivanje stupnja oksidacije proteina u stanicama Cal27 i HepG2

Kao što je spomenuto u poglavlju 3.2.3.1., detekcija i kvantificiranje proteinskih karbonila (PCO) u biološkim uzorcima neizravan je način za određivanje razine oksidacijskog stresa, a metoda bazirana na reakciji karboniliranog proteina s DNPH može se primjenjivati za određivanje razine oksidacije u stanicama i tkivima.

Postupak određivanja stupnja oksidacije proteina započinje kako je opisano u poglavlju 3.2.2.2. U tako dobivene uzorke dodaje se 100  $\mu\text{L}$  10 %-tnog natrijevog dodecil-sulfata (SDS) te resuspendira. Zatim se dodaje 10 mM dinitrofenil hidrazin (DNPH) u volumenu od 100  $\mu\text{L}$ , vorteksira te ostavi na inkubaciji oko 1 h na tamnom. Nakon inkubacije dodaje se 0,5 mL 10 %-tne ledene octene kiseline koja uzrokuje taloženje proteina. Nakon inkubacije od 15 minuta na 4 °C slijedi centrifugiranje, odbacuje se supernatant, a talog se ispiri sa smjesom etanol:etil-acetat (1:1) i ponovno centrifugira. Nakon centrifugiranja dodaje se 200  $\mu\text{L}$  6M gvanidin-HCl i mjeri apsorbancija na 370 nm. Koncentracija ukupnih proteina određuje se prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2.

Za izračunavanje koncentracije karbonila u uzorku koristi se sljedeća formula [4]:

$$c (PCO) = \frac{10^6 \cdot \left( \frac{A_{370}}{22000 M^{-1} cm^{-1}} \right)}{\gamma (protein) mg mL^{-1}}$$

gdje je  $A_{370}$  - apsorbancija uzorka pri 370 nm,

M - ekstincijski koeficijent ( $\epsilon$ ) pri 370 nm,

$\gamma$  (protein) - koncentracija ukupnih proteina izražena u  $mg mL^{-1}$  (Colombo i sur., 2016).

3.2.4. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na modelnim i staničnim lipidima

#### 3.2.4.1. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije na modelu linoleinske kiseline

Linoleinska kiselina je najzastupljenija polinezasićena masna kiselina u staničnim membranama sisavaca, stoga proizvodi lipidne peroksidacije ove kiseline dominiraju. Lipidni hidroperoksidi (LOOH) se u biološkom okruženju lako reduciraju u odgovarajuće hidroksi kiseline (LOH) (Spiteller, 1998). U prisutnosti  $Fe^{3+}$  hidroperoksid linoleinske kiseline prolazi daljnju oksidaciju, što dovodi do stvaranja 4-hidroksinonenala (4-HNE),  $\alpha$ -hidroksialdehida i oksokiseline (Spiteller i Spiteller, 1998). Glavni produkt peroksidacije linoleinske kiseline, hidroksialkenal 4-HNE, u većim količinama ima izrazito toksično djelovanje, inhibira stanični rast, modificira lipoproteine te potiče razvoj ateroskleroze (Leonarduzzi i sur., 2005). Hidroksialkenali koji su reaktivni zbog prisutnosti triju funkcionalnih skupina (aldehidne, hidroksilne i dvostruke veze), u fiziološkim uvjetima pokazuju afinitet prema amino skupinama u DNA bazama, proteinima (lizinskim ostacima u lipoproteinima), fosfolipidima (pogotovo prema fofatidil-serinu i fosfatidil-etanolaminu) (Štefan i sur., 2007).

Uzorci sadrže 625  $\mu L$  emulzije linoleinske kiseline koncentracije 0,3  $mg mL^{-1}$ , ekstrakte ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 02 i 1  $mg mL^{-1}$  te natrijev fosfatni pufer do konačnog volumena 1250  $\mu L$ . Pozitivna kontrola umjesto ekstrakata sadrži 125  $\mu L$  troloxa koncentracije 10  $mg mL^{-1}$ , a negativna kontrola 125  $\mu L$  metanola. Svi uzorci pripremljeni su u 3 paralele. Uzorci su podvrgnuti UV zračenju u trajanju od 1 h. Iz reakcijske smjese se pomiješa 25  $\mu L$  uzorka s 1 mL EtOH (75 %) i 25  $\mu L$  amonijevog tiocijanata (30 %).

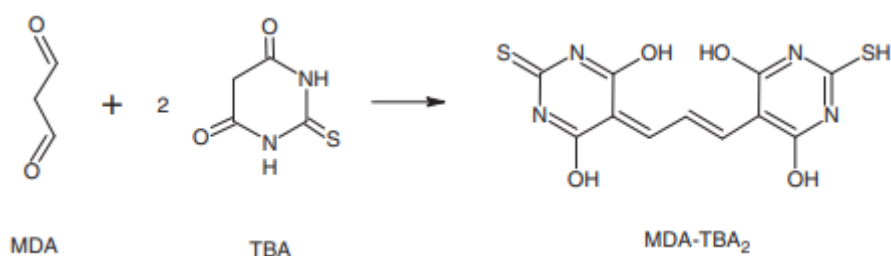
Na kraju se u reakcijsku smjesu dodaje 25  $\mu\text{L}$   $\text{FeSO}_4$  (0,02 M, razrijeđen u 3,5 % HCl). Nakon 3 minute slijedi mjerenje apsorbancije na 500 nm.

Postotak peroksidacije lipida u linoleinskoj kiselini izračunava se prema formuli [5]:

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

### 3.2.4.2. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije u stanicama Cal27 i HepG2

Lipidi iz mahune graška i ljuske luke mogu biti podvrgnuti oksidacijskom oštećenju zbog izloženosti UV zrakama (Pucciarini i sur., 2019). Kvantifikacija lipidne peroksidacije ključna je za procjenu oksidacijskog stresa u patofiziološkim procesima. Peroksidacija lipida rezultira formiranjem malondialdehida (MDA) kao prirodnog produkta, a mjerenje krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije jedno je od najprihvaćenijih ispitivanja oksidativnog oštećenja. Razine MDA mogu se izmjeriti pomoću tiobarbiturne kiseline (TBA), pri čemu MDA reagira s TBA u kiselom mediju na 100 °C dajući kompleks ljubičaste boje (slika 6) koji se može lako kvantificirati kolorimetrijski pri  $\lambda=532$  nm ili fluorimetrijski pri  $\lambda_{\text{ekscitacije}}=515$  nm i  $\lambda_{\text{emisije}}=555$  nm (Katerji i sur., 2019). Gustoća boje povezana je sa stupnjem peroksidacije lipida. Zbog svoje jednostavnosti i ekonomičnosti, ova se metoda intenzivno koristi u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima (Desai i sur., 2014).



Slika 6. Prikaz reakcije malondialdehida s tiobarbiturnom kiselinom (Desai i sur., 2014).



## Određivanje TBA-MDA kompleksa u uzorcima

Postupak određivanja stupnja lipidne peroksidacije započinje kao postupak određivanja stupnja oksidacije proteina, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.2. U tako dobivene uzorke dodaje se 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode te staklene kuglice i provodi razbijanje stanica vorteksiranjem 3 puta po 30 sekundi s ciljem liziranja stanica. Kako bi se izbjegla degradacija proteina i inicijacija kemijskih reakcija uzrokovana povišenjem temperature, nakon svakog razbijanja stanice se hlade 30 sekundi u ohlađenom termobloku. Potom se iz uzoraka uzimaju alikvoti od 2 puta po 5  $\mu\text{L}$  za određivanje ukupnog sadržaja proteina, a u preostali sadržaj uzorka dodaje se 600  $\mu\text{L}$  tiobarbiturne kiseline otopljene u trikloroctenoj kiselini [TBA(TCA)] kako bi se stvorili kiseli uvjeti u kojima malondialdehid prelazi iz acetatnog u aldehidni oblik, a ujedno u tim uvjetima trikloroctena kiselina uzrokuje taloženje svih staničnih proteina. Uzorci se stavljaju na vodenu kupelj na 95 °C kroz 1 h, nakon čega slijedi centrifugiranje te se dobiveni supernatant koristi u daljnjem provođenju eksperimenta. Na crne mikrotitarske pločice sa 96 jažica nanosi se 100  $\mu\text{L}$  uzoraka te se mjeri intenzitet fluorescencije pri  $\lambda_{\text{ex/em}}=560/585$  nm. Osim toga, potrebno je pripremiti otopine proteina albumina iz goveđeg seruma kako bi konstruirali baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih proteina prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2.

### Baždarni dijagram za određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Pripremi se 0,2 mM ishodišna otopina malondialdehida koja se razrjeđuje s destiliranom vodom kako bi se dobile otopine s konačnom koncentracijom malondialdehida 4, 8, 12, 16 i 20  $\mu\text{M}$ . Otopine malondialdehida reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom otopljenom u trikloroctenoj kiselini u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95 °C kroz 1 h. Malondialdehid koji se nalazi u acetilnom obliku prevodi se u aldehidni oblik. Nakon reakcije s tiobarbiturnom kiselinom nastaje kompleks ljubičaste boje, a intenzitet nastalog MDA-TBA kompleksa mjeri se fluorimetrijski pri valnoj duljini emisije od 585 nm i ekscitacije od 560 nm.

Koncentracija kompleksa MDA-TCA određuje se prema jednadžbi iz baždarnog dijagrama koji prikazuje ovisnost specifične fluorescencije MDA-TBA kompleksa o koncentraciji malondialdehida [6]:

$$\gamma (\text{kompleks MDA} - \text{TCA}) = \frac{A_{560/585} - b}{a} \mu\text{M}$$

gdje je  $\gamma$  (kompleks MDA-TCA) – koncentracija kompleksa MDA-TCA u uzorku izražena u  $\mu\text{M}$

$A_{560/585}$  – apsorbanacija uzorka izmjerena na  $\lambda_{\text{ex/em}}=560/585$  nm,

b - odsječak na osi y baždarnog dijagrama,

a - koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama.

Koncentracija proteina određuje se prema jednadžbi iz baždarnog dijagrama [3] dobivenoj određivanjem ukupnih proteina metodom po Bradfordu.

Na kraju, koncentracija malondialdehida (MDA) izražava se prema formuli [7]:

$$\gamma(\text{MDA}) = \frac{\gamma(\text{kompleks MDA} - \text{TCA}) \mu\text{g L}^{-1}}{\gamma(\text{proteina}) \text{mg mL}^{-1}} \mu\text{M}$$

### 3.2.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati su obrađeni u statističkom programu JASP 0.14.0, korištenjem Classical ANOVA statističke analize sa Scheffe i Tukey *post hoc* testom usporedbe. Odabrana razina značajnosti (p-vrijednost) je bila 0,001, tako da se svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,001 smatra statistički značajnim. Osim toga, rezultati su prikazani grafički pomoću programa Microsoft Excel 2016 kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije.

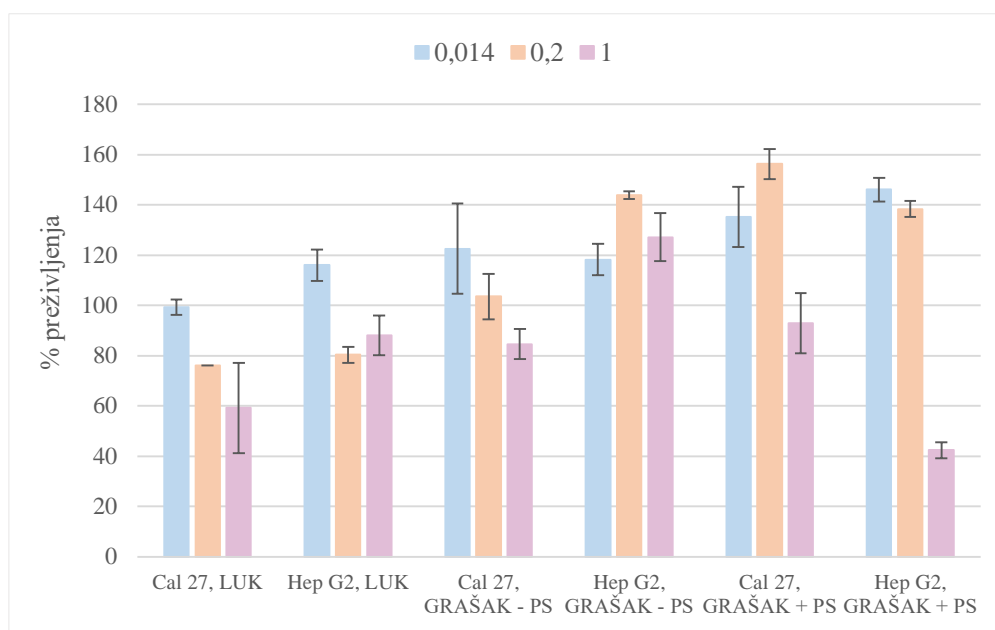
## 4. RASPRAVA

Učinak bioaktivnih molekula iz ekstrakata mahune graška i ljuske luka pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam tijekom 24 sata ispitan je na modelima staničnih makromolekula (plazmid phiX174 RF1 DNA, protein albumin iz goveđeg seruma i linoleinska kiselina) te kontinuiranim humanim staničnim linijama karcinoma epitela usne šupljine Cal27 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2.

Biološki učinak prati se djelovanjem na genetički materijal te određivanjem stupnja karbonilacije proteina i lipidne peroksidacije. Citotoksični i proliferativni učinak na Cal27 i HepG2 staničnim linijama određen je klonogenim testom. Genotoksični i protektivni učinak na modelnom plazmidu praćen je elektroforezom u agaroznom gelu, dok je oštećenje genetičkog materijala određeno komet testom. Prooksidativni i protektivni učinak na modelnom i staničnim proteinima određen je metodom koja se bazira na reakciji karboniliranih proteina s DNPH. Također, navedeni učinci određeni su na modelu linoleinske kiseline mjerenjem koncentracije produkta lipidne peroksidacije, 4-HNE, dok su stanični lipidi određeni TBARS metodom. Dobiveni rezultati prikazani su grafički slikama 7. – 20.

#### 4.1. CITOTOKSIČNI I PROLIFERATIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA HUMANIM STANIČNIM LINIJAMA CAL27 I HEPG2 ODREĐEN KLONOGENIM TESTOM (eng. *clonogenic assay*)

Nakon tretmana staničnih linija Cal27 i HepG2 ekstraktima mahune graška i ljuske luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>, preživjele stanice koje su zadržale svojstvo proliferacije počele su stvarati kolonije tijekom 7 dana rasta u kulturi.



LUK – ekstrakt ljuske luka; GRAŠAK – PS – ekstrakt mahune graška bez polisaharida; GRAŠAK + PS – ekstrakt mahune graška sa polisaharidima.

Slika 7. Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na stanice Cal27 i HepG2.

Iz slike 7. vidljivo je da preživljenje stanične linije Cal27 tretirane ekstraktima ljuske luka i mahune graška bez polisaharida pada s porastom koncentracije ekstrakta, pri čemu ekstrakt mahune graška u najmanjoj koncentraciji 0,014 mg mL<sup>-1</sup> ima proliferativno djelovanje na rast stanica. Ekstrakti ljuske luka u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> i ekstrakt mahune graška bez polisaharida u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> djeluju citotoksično, pri čemu je najizraženije toksično djelovanje ekstrakta luka u najvišoj koncentraciji. Rezultati preživljenja stanica tretiranih ekstraktom mahune graška sa polisaharidima poprilično variraju, gdje je pri koncentraciji ekstrakta od 1 mg mL<sup>-1</sup> izraženo pomalo citotoksično djelovanje, dok koncentracije 0,014 i 0,2 mg mL<sup>-1</sup> potiču proliferaciju stanica.

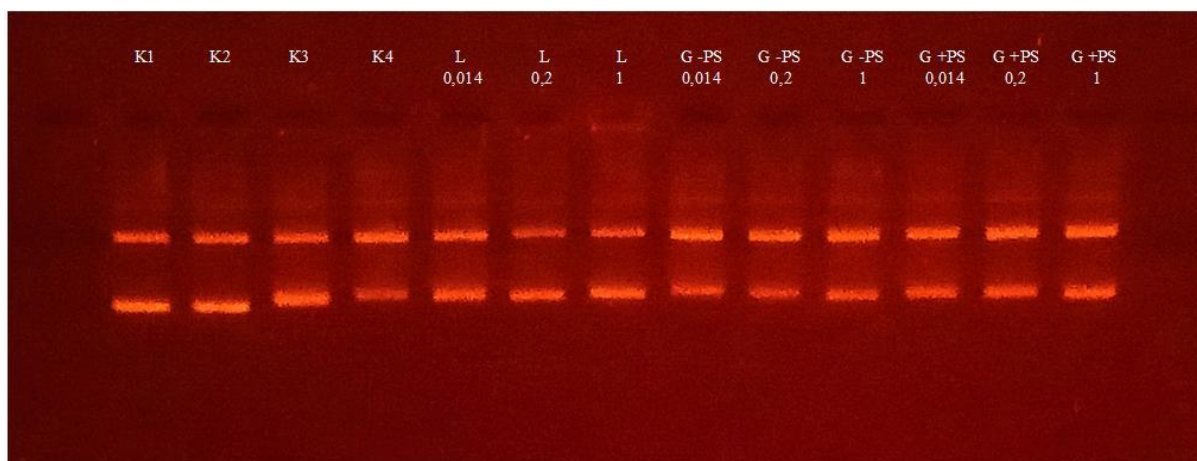
Ekstrakti ljuske luka u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> na stanice HepG2 djeluju citotoksično. Ukoliko rezultate dobivene na staničnoj liniji jetre usporedimo s djelovanjem navedenih ekstrakata na stanice Cal27, toksični učinak je manji, budući da su HepG2 stanice, za razliku od Cal27 stanica, metabolički aktivne te se metabolizira kvercetin koji je najzastupljeniji flavonoid u ljusci luka. Većina eksperimenata *in vivo* pokazala je da kvercetin nije kancerogen i da ima zaštitnu ulogu u odnosu na genotoksične spojeve. Kvercetin se, u crijevima i jetri, gotovo u potpunosti metabolizira smanjujući potencijal toksičnosti. Kod oralnih doza viših od 1000 mg na dan konzumiranih do tri mjeseca nisu pronađeni dokazi toksičnosti, međutim nedostaju podaci o dugoročnoj sigurnosti u visokim dozama (Harwood i sur., 2007). Ekstrakti mahune graška bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama pokazuju izraženo proliferativno djelovanje. Ekstrakti mahune graška sa polisaharidima u koncentracijama 0,014 i 0,2 mg mL<sup>-1</sup> djeluju proliferativno na rast HepG2 stanica, dok isti ekstrakt u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> djeluje izrazito citotoksično dajući najmanje preživljenje koje iznosi 42,38 %.

## 4.2. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA MODELNOJ DNA I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU

### 4.2.1. Biološki učinak na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA

Reaktivne kisikove vrste glavni su izvor oštećenja DNA. Svako oštećenje DNA, kao genetičkog materijala stanice, može rezultirati promjenama u kodiranim proteinima što posljedično može dovesti do oštećenja ili potpune inaktivacije proteina. (Sharma i sur., 2012).

Ispitivanje potencijalno protektivnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka na genetički materijal u koncentracijama 0,014, 0,2 te 1 mg mL<sup>-1</sup> provedeno je tretmanom phiX174 RF1 DNA plazmida koji je osim istraživanim ekstraktima, bio izložen i UV zračenju te vodikovom peroksidu koji oštećuju plazmid. Nakon tretmana, provedena je elektroforeza u agaroznom gelu. Ukoliko nastupi oštećenje, dolazi do konverzije inače superzavijenog plazmida u cirkularni ili linearni oblik koji posljedično u gelu putuje sporije.



K1 – negativna kontrola; K2 – kontrola s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; K3 – kontrola s UV zračenjem; K4 – pozitivna kontrola; L 0,014, L 0,2, L 1 – uzorci tretirani ekstraktima ljuske luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>; G –PS 0,014, G –PS 0,2, G –PS 1 – uzorci tretirani ekstraktima mahune graška bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>; G +PS 0,014, G +PS 0,2, G +PS 1 – uzorci tretirani ekstraktima mahune graška sa polisaharidima u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Slika 8. Protektivni učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na plazmid phiX174 RF1 DNA.

Iz slike 8. vidljivo je da u kontrolama K1, K2 i K3 razmotani plazmid daje relativno slabi signal u odnosu na zavijeni. Pozitivna kontrola K4 pokazuje upravo suprotno, zavijeni plazmid daje slab signal, dok je glavina plazmida razmotana. Iz priloženog se može zaključiti da sami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i samo UV zračenje ne uzrokuju značajno oštećenje DNA, no u kombinaciji rezultiraju puno jačim signalom u korist razmotanog plazmida. U usporedbi s pozitivnom kontrolom, svi uzorci tretirani ekstraktima mahune graška i ljuske luka sadrže više zavijene DNA, što dovodi do zaključka da ispitivane aktivne tvari sadržane u ekstraktima u određenoj mjeri štite DNA od oštećenja. Većina eksperimenata na životinjama u kojima su istraživani učinci polifenola (često u visokim dozama) u kombinaciji s poznatim agensima koji oštećuju DNA, općenito su pokazala njihovu zaštitnu ulogu. Visoke koncentracije polifenola mogu izazvati oštećenje DNA, što je pokazano u brojnim pokusima na staničnim kulturama, dok niske koncentracije, s druge strane, imaju tendenciju smanjenja oštećenja DNA (Azqueta i Collins, 2016).

Ukoliko se fokusiramo na djelovanje ekstrakta ljuske luka, može se primijetiti dozni odgovor. Kako se povećava koncentracija ekstrakta, veći je i protektivni učinak na DNA. Općenito se smatra da kvercetin, flavonoid koji je u velikoj mjeri zastupljen u ljusci luka, pruža snažnu zaštitu od oksidacijskih oštećenja. Mondal i sur. (2017) istraživali su zaštitni učinak kvercetina protiv oštećenja DNA posredovanih vodikovim peroksidom. Spektrofotometrijska analiza

interakcije kvercetina s DNA *in vitro* pokazala je da je klasična interkalacija mogući dominantni način vezanja kvercetina kojim se sprječava oštećenje DNA izazvano oksidativnim stresom.

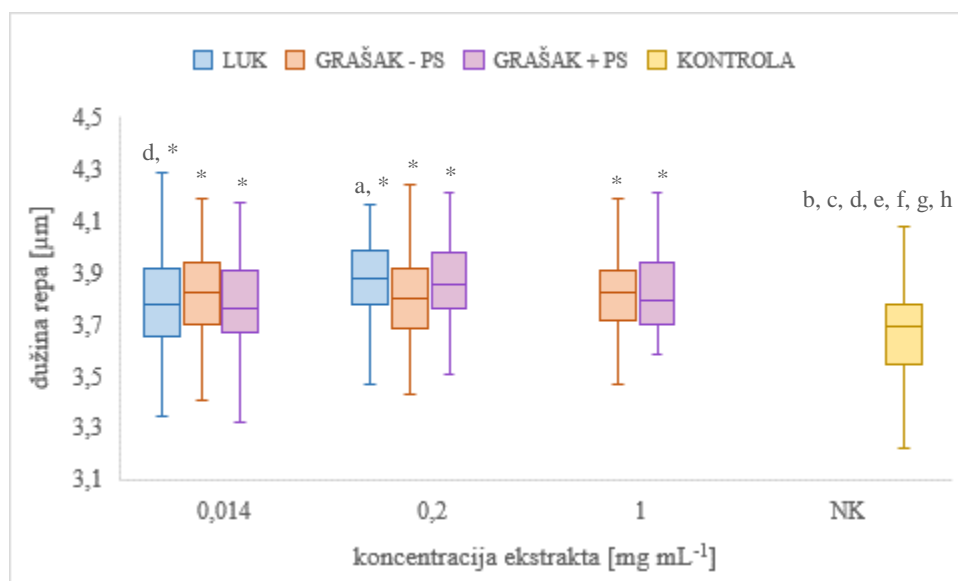
Kod tretmana plazmida sa ekstraktom mahune graška bez polisaharida relativno je visok postotak razmotanog plazmida. Aktivne tvari donekle štite DNA od oštećenja u odnosu na pozitivnu kontrolu, ali uglavnom nema značajne koncentracijske razlike. U slučaju ekstrakata mahune graška sa polisaharidima, vidljivo je da najveća koncentracija ima najveći protektivni učinak na DNA. Polisaharidi sprječavaju udar u ključna mjesta na DNA i na taj način doprinose smanjenju oštećenja. Unatoč tome što polisaharidi privlače sve veću pozornost u istraživanjima jer pokazuju antioksidativno djelovanje (Wang i sur., 2018), njihov osnovni mehanizam još nije sustavno razjašnjen (Wang i sur., 2016). Slična istraživanja pokazala su bioaktivnost polisaharida iz tinte lignje pri čemu je korišten je pEGFP-N1 DNA plazmid koji je tretiran UV zračenjem i vodikovim peroksidom. Rezultati su pokazali da polisaharidi imaju antioksidativno i snažno redukcijsko djelovanje te zaštitni učinak na oštećenja DNA (Luo, 2013). Također, istraživanja su pokazala da polifenoli iz mahune graška imaju zaštitnu ulogu u očuvanju integriteta DNA od djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta, no ova protektivna uloga dokazana je samo kada je DNA tretirana polifenolima pri niskim koncentracijama (Azqueta i Collins 2016).

#### 4.2.2. Oštećenje DNA u stanicama Cal27 i HepG2 određeno komet testom (eng. *single cell gel electrophoresis* ili *comet assay*, SCGE)

Ispitivanje učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka pri koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> na DNA provedeno je na staničnim linijama Cal27 i HepG2 komet testom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.3. na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Zbog razlika u izgledu i karakteristikama pojedinog kometa značajno je rasipanje dobivenih rezultata, stoga su rezultati zbog lakše statističke obrade normalizirani prirodnim logaritmom. Rezultati su prikazani grafički (slika 9 – slika 14) kao ovisnost dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta o koncentracijama ekstrakata mahune graška i ljuske luka.

Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći fragmenti DNA te se izražava u  $\mu\text{m}$ . Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu. Što je rep kometa dulji i što je intenzitet repa veći, došlo

je do većih oštećenja genetičkog materijala stanice. Kao prihvatljiva razina oštećenja smatraju se vrijednosti do 10 % DNA u repu kometa (Collins i sur., 2008).

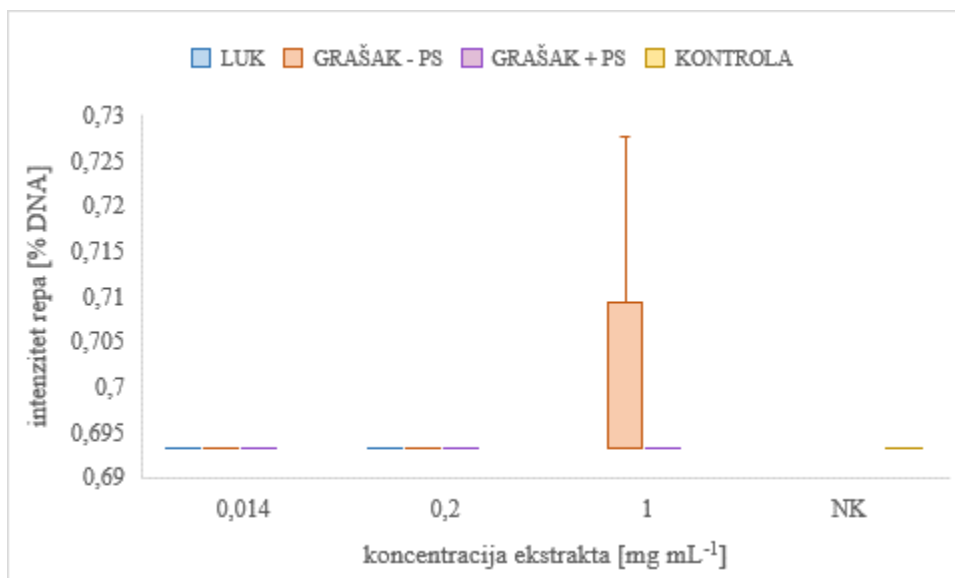


Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: \* - negativnu kontrolu; a – LUK 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; b – GRAŠAK – PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; c – GRAŠAK + PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; d – LUK 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; e – GRAŠAK – PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; f – GRAŠAK + PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; h – GRAŠAK – PS 1 mg mL<sup>-1</sup>; i – GRAŠAK + PS 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Slika 9. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na promjenu dužine repa DNA u Cal27 stanicama.

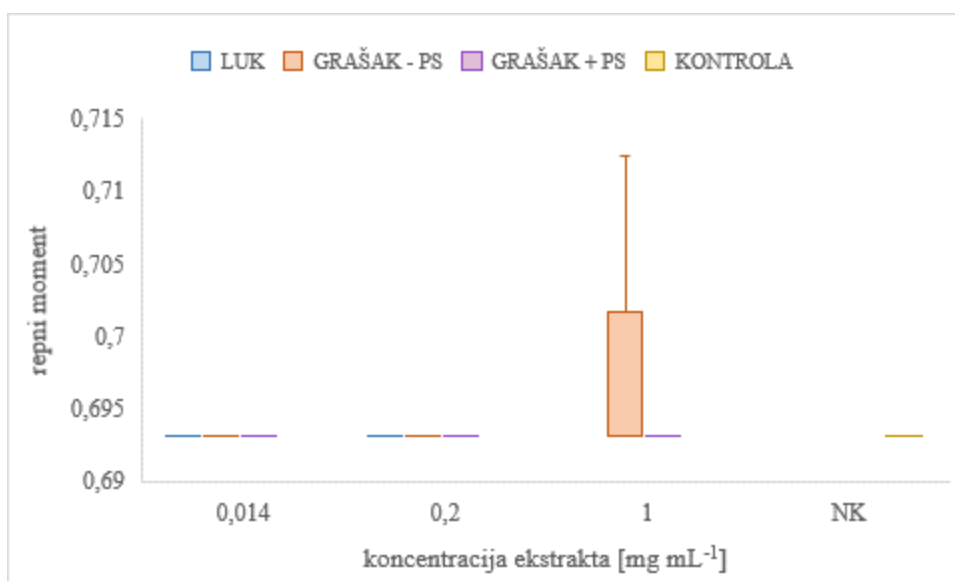
Iz slike 9. vidljivo je da ekstrakti ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama izazivaju statistički značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu. Povećanjem koncentracije ekstrakta ljuske luka dolazi do porasta dužine repa kometa, pri čemu je iz slike vidljivo da nedostaje podatak o dužini repa pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji. Tretman stanica Cal27 ekstraktom ljuske luka u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> doveo je do značajnih promjena u morfologiji kometa. Analizom na epifluorescencijskom mikroskopu vidljivo je da je genetički materijal stanica potpuno uništen kao posljedica citotoksičnog djelovanja kvercetina, stoga nije bilo moguće izbrojati komete. Iako ekstrakti graška sa i bez polisaharida utječu na povećanje dužine repa kometa, nema značajne razlike u djelovanju ispitivanih koncentracija.





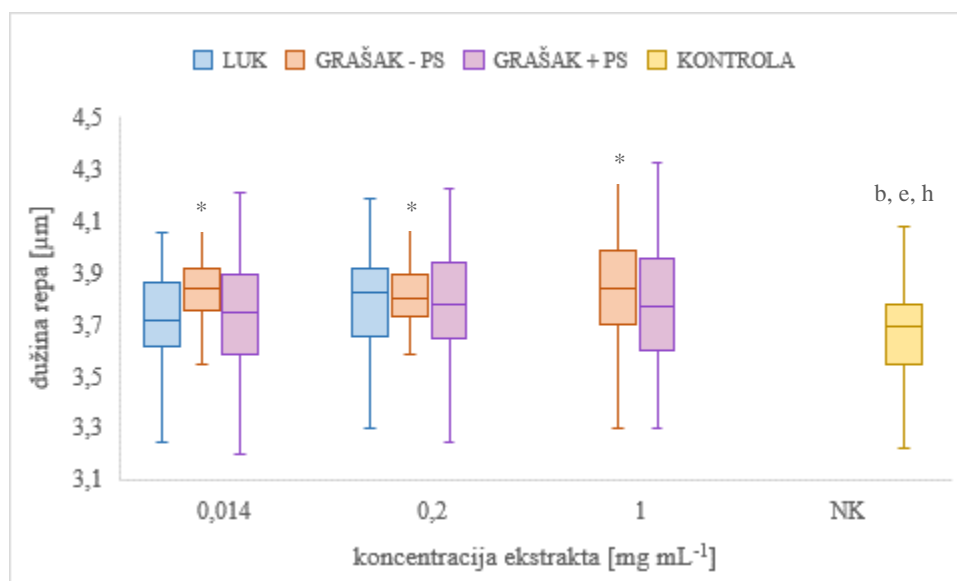
Slika 10. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na promjenu intenziteta repa DNA u stanicama Cal27.

Ekstrakti ljuske luka i mahune graška u svim ispitivanim koncentracijama ne pokazuju statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu. Naprotiv, vrijednosti intenziteta repa u ispitivanim uzorcima jednake su vrijednosti intenziteta repa u negativnoj kontroli, pri čemu se jedino ističe povećanje intenziteta repa u uzorku tretiranom ekstraktom mahune graška bez polisaharida, ali ne značajno. Može se zaključiti da gotovo nema oštećenja genetskog materijala, odnosno da DNA nije migrirala u rep kometa.



Slika 11. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na promjenu repnog momenta DNA stanične linije Cal27.

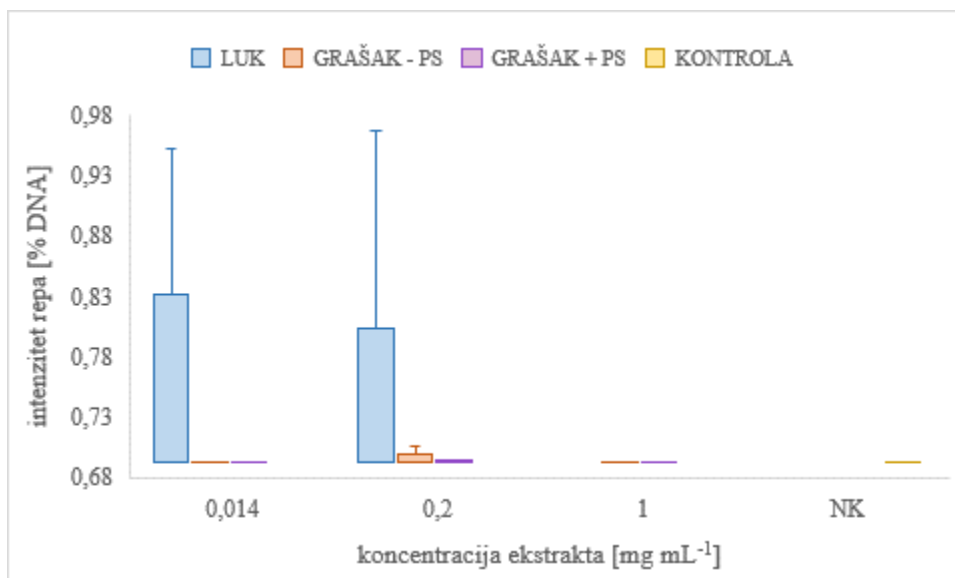
Vrijednosti repnog momenta u svim ispitivanim uzorcima, osim uzorku tretiranom ekstraktom mahune bez polisaharida u najvećoj koncentraciji, jednake su vrijednostima repnog momenta u kontroli. Repni moment se definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu pa sukladno prethodno dobivenim vrijednostima intenziteta repa kometa, vrijednosti repnog momenta kometa su u skladu s očekivanjima.



Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: \* - negativnu kontrolu; a – LUK 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; b – GRAŠAK – PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; c – GRAŠAK + PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; d – LUK 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; e – GRAŠAK – PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; f – GRAŠAK + PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; h – GRAŠAK – PS 1 mg mL<sup>-1</sup>; i – GRAŠAK + PS 1 mg mL<sup>-1</sup>.

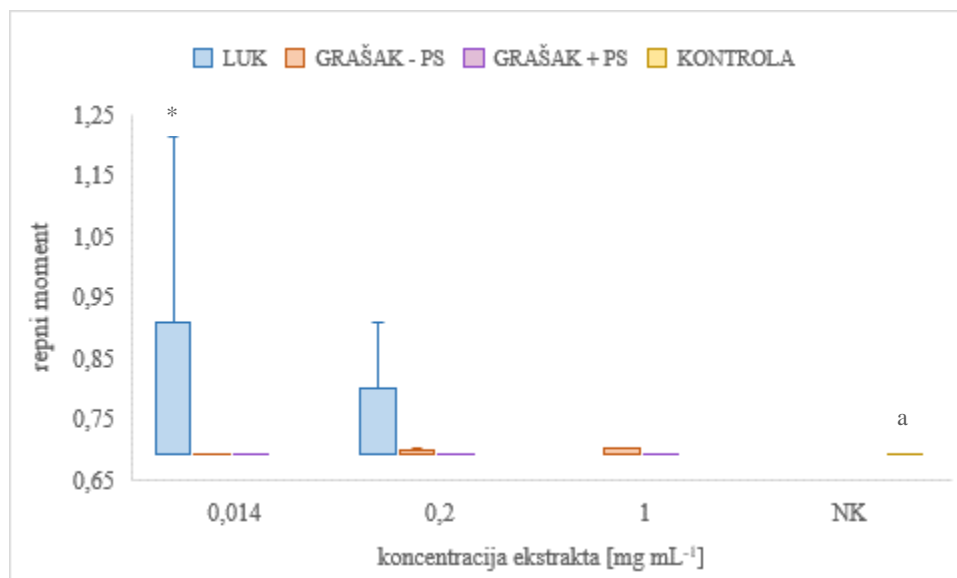
Slika 12. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na promjenu dužine repa DNA u HepG2 stanicama.

Iz slike 12. vidljivo je da samo ekstrakti mahune graška bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama pokazuju statistički značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu. Kao što je navedeno u prethodnom slučaju sa staničnom linijom Cal27, tretman stanica HepG2 ekstraktom ljuske luka u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> doveo je do značajnih promjena u morfologiji kometa zbog čega ih nije bilo moguće izbrojati.



Slika 13. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na promjenu intenziteta repa DNA u stanica HepG2.

Ekstrakti ljuske luka i mahune graška u svim ispitivanim koncentracijama ne pokazuju statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu, kao što je slučaj i sa stanicama Cal27. Vrlo malu promjenu intenziteta repa, odnosno oštećenje genetskog materijala pokazuju ekstrakti ljuske luka, pri čemu se intenzitet repa smanjuje s povećanjem koncentracije ekstrakta.



Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: \* - kontrolu; a – LUK 0,014 mg mL<sup>-1</sup>.

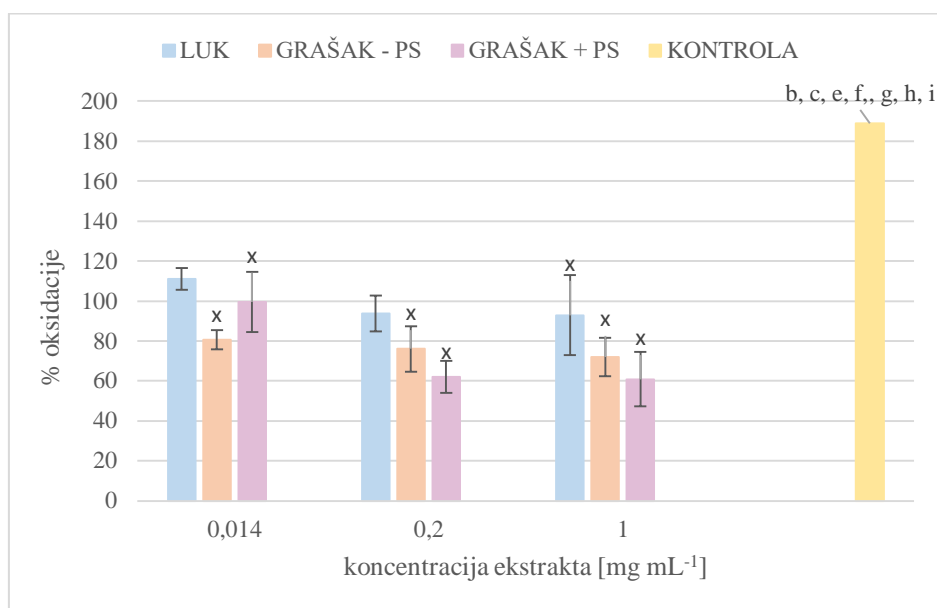
Slika 14. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na promjenu repnog momenta DNA stanične linije HepG2.

Vrijednost repnog momenta kometa dobivenog tretmanom HepG2 stanica s ekstraktom luka statistički je značajna u odnosu na kontrolu, dok se vrijednosti repnog momenta u preostalim uzorcima ne razlikuje značajno od kontrole, što je i za očekivati obzirom na dobivene vrijednosti intenziteta repa kometa.

#### 4.3. PROOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA MODELNIM I STANIČNIM PROTEINIMA

##### 4.3.1. Stupanj oksidacije modelnog proteina albumina iz goveđeg seruma

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



Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: x - pozitivnu kontrolu; b – GRAŠAK – PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; c – GRAŠAK + PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; e – GRAŠAK – PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; f – GRAŠAK + PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; g – LUK 1 mg mL<sup>-1</sup>; h – GRAŠAK – PS 1 mg mL<sup>-1</sup>; i – GRAŠAK + PS 1 mg mL<sup>-1</sup>.

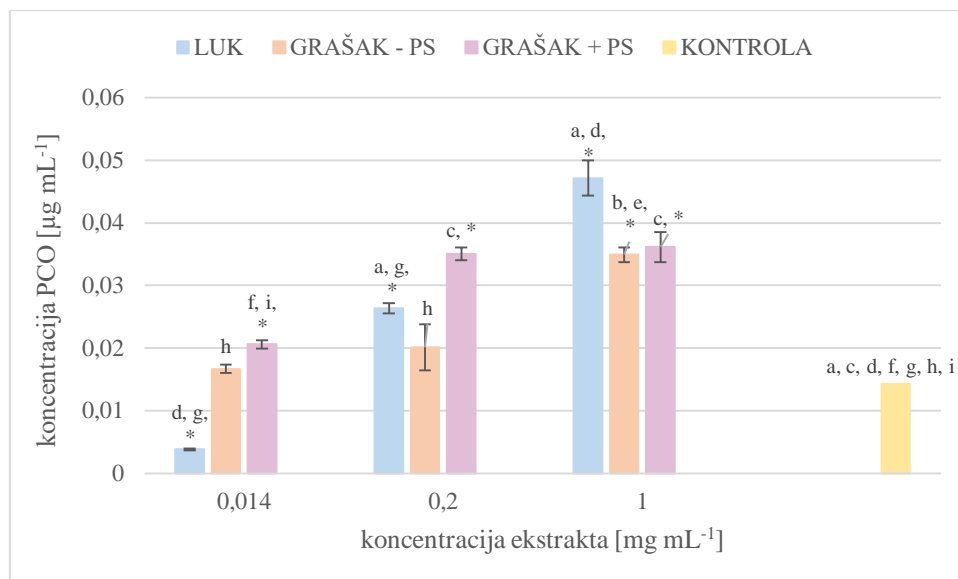
Slika 15. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na karbonilaciju proteina.

Statistički značajnu promjenu u % oksidacije proteina u odnosu na pozitivnu kontrolu pokazuju ekstrakti mahune graška sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama te ekstrakt ljuske luka u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>. Svi navedeni ekstrakti smanjuju % oksidacije, odnosno pokazuju antioksidativno djelovanje, dok ekstrakt ljuske luka u najnižoj koncentraciji pokazuje blago prooksidativno djelovanje. Postotak oksidacije smanjuje se s povećanjem koncentracije svih ekstrakata, odnosno svi ekstrakti pokazuju dozni odgovor. Lakhanpal i Rai (2007) pokazali su da kombinirani učinak kvercetina s drugim antioksidansima, kao što je primjerice askorbinska kiselina korištena u ovom eksperimentu, smanjuje prevalenciju

oksidativnog oštećenja u ljudskim limfocitima i neurovaskularnim strukturama u koži i inhibira ozljedu neurona. Štoviše, zabilježeno je da ima snažan učinak protiv Alzheimerove bolesti štiteći moždane stanice od oksidacijskog stresa koji inducira oštećenje tkiva. Osim toga, Hadrich i sur. (2014) istraživanjem su pokazali da ekstrakt mahune graška predstavlja izvor aktivnih spojeva, esencijalnih fenola i flavonoida s antioksidativnim djelovanjem i *in vitro* inhibicijskim djelovanjem  $\alpha$ -amilaze.

#### 4.3.2. Stupanj oksidacije proteina na staničnim linijama Cal27 i HepG2

Ispitivanje oksidativnog učinka ekstrakata mahune graška i ljuske luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> provedeno je na staničnim linijama Cal27 i HepG2 metodom koja se temelji na reakciji oksidiranih proteina s DNPH, opisanom u poglavlju 3.2.3.3. Oksidativni učinak ispitivan je u trajanju izloženosti stanica od 2 h, nakon čega je određena koncentracija nastalog karbonila. Na slikama 16 i 17 prikazan je učinak ekstrakata ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida na oksidirane proteine Cal27 i HepG2 stanica.

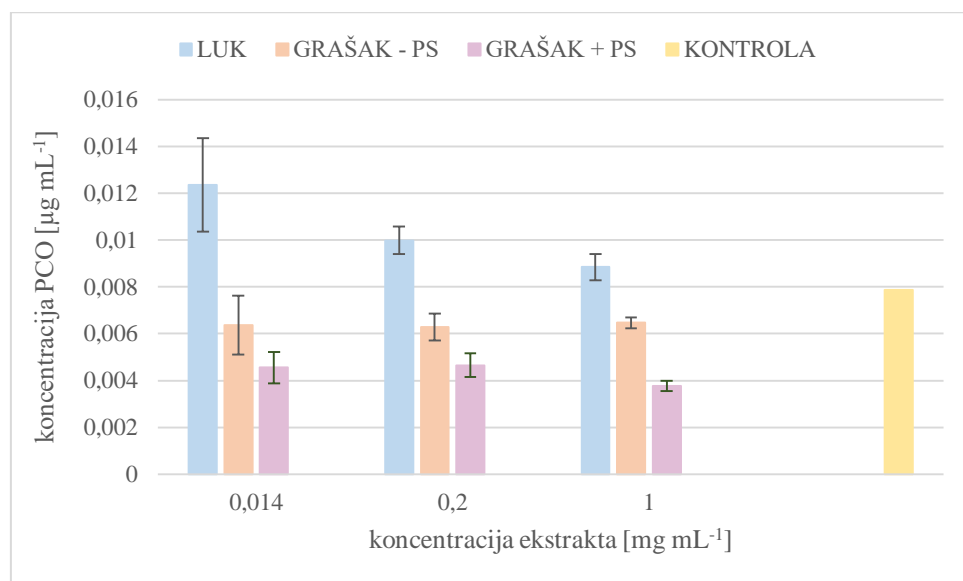


Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: \* - kontrolu; a – LUK 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; b – GRAŠAK – PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; c – GRAŠAK + PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; d – LUK 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; e – GRAŠAK – PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; f – GRAŠAK + PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; g – LUK 1 mg mL<sup>-1</sup>; h – GRAŠAK – PS 1 mg mL<sup>-1</sup>; i – GRAŠAK + PS 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Slika 16. Karbonilacija proteina u stanicama Cal27 uzrokovana ekstraktima ljuske luka i mahune graška.

Statistički značajnu promjenu u oksidaciji proteina u odnosu na kontrolu pokazuju ekstrakti mahune graška sa polisaharidima i ekstrakti ljuske luka u svim ispitivanim koncentracijama te ekstrakt mahune graška bez polisaharida u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup>. Najveći stupanj karbonilacije proteina izmjeren je u stanicama tretiranim ekstraktom ljuske luka u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup>, a iznosio je 0,047 ± 0,003 µg mL<sup>-1</sup>.

Ekstrakti mahune graška sa i bez polisaharida te ekstrakti ljuske luka pokazuju dozni odgovor. Povećanjem koncentracije ekstrakta, raste i koncentracija nastalog karbonila. Ekstrakt ljuske luka u koncentraciji 0,014 mg mL<sup>-1</sup> jedini pokazuje izraženo antioksidativno djelovanje u odnosu na kontrolu te ujedno se tretmanom s navedenom koncentracijom postiže najmanji postotak karbonilacije koji iznosi 26,81 %. Ekstrakti ljuske luka u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup>, ekstrakt graška bez polisaharida u najvećoj ispitivanoj koncentraciji te ekstrakti graška sa polisaharidima u svim ispitivanim koncentracijama u odnosu na kontrolu ističu se prooksidativnim djelovanjem te pokazuju značajno visoku koncentraciju nastalog karbonila.



Slika 17. Karbonilacija proteina u stanicama HepG2 uzrokovana ekstraktima ljuske luka i mahune graška.

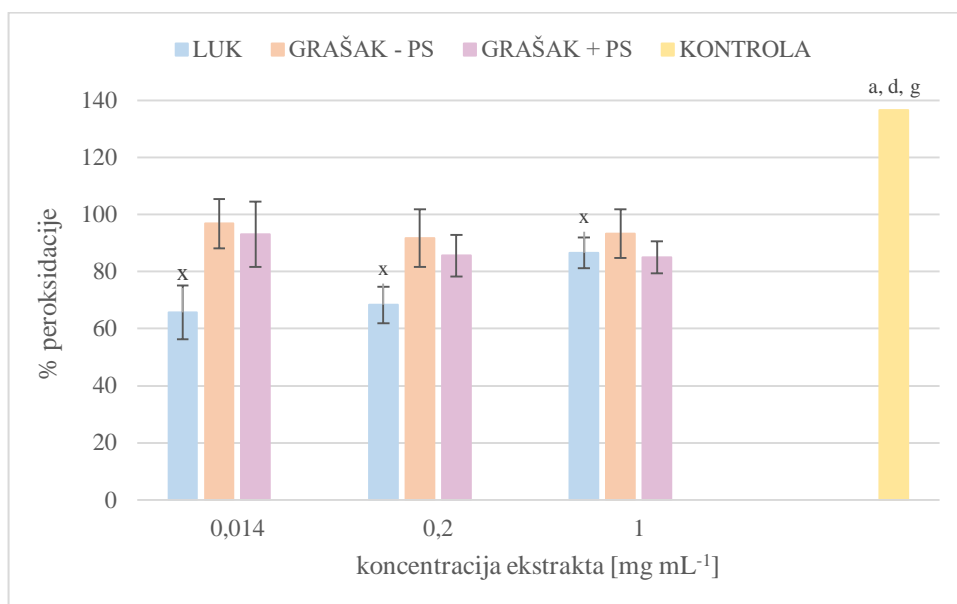
Ispitivani ekstrakti ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida ne pokazuju statistički značajnu promjenu u oksidaciji proteina u odnosu na kontrolu. Svi ispitivani ekstrakti pokazuju dozni odgovor, pri čemu se koncentracija karbonila smanjuje povećanjem koncentracije ekstrakta. Ekstrakt ljuske luka, u usporedbi s kontrolom, pokazuje prooksidativno djelovanje, dok ekstrakti mahune graška u svim ispitivanim koncentracijama imaju izraženo

antioksidativno djelovanje. Najmanji % oksidacije postignut je tretmanom sa ekstraktom mahune graška sa polisaharidima u koncentraciji  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , a iznosi 47,81 %. El-Feky i sur. (2018) pokazali su da je mahuna graška bogata fenolima i flavonoidima koji su imaju važnu ulogu kao antioksidansi i antikancerogeni agensi.

#### 4.4. PROOKSIDACIJSKI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA I LJUSKE LUKA NA MODELNIM I STANIČNIM LIPIDIMA

##### 4.4.1. Stupanj lipidne peroksidacije na modelu linoleinske kiseline

Glavni produkt peroksidacije linoleinske kiseline, najzastupljenije masne kiseline u staničnim membranama sisavaca, je hidroksialkenal 4-HNE. Određivanje koncentracije krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije jedno je od najprihvaćenijih ispitivanja oksidativnog oštećenja (Spiteller i Spiteller, 1998). Postupak je proveden kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1., a rezultati su prikazani kao % peroksidacije lipida u linoleinskoj kiselini u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta kojim su tretirani uzorci.



Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: x – pozitivnu kontrolu; a – LUK  $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ; b – GRAŠAK – PS  $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ; c – GRAŠAK + PS  $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ; d – LUK  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; e – GRAŠAK – PS  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; f – GRAŠAK + PS  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; g – LUK  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; h – GRAŠAK – PS  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; i – GRAŠAK + PS  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Slika 18. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na peroksidaciju linoleinske kiseline.

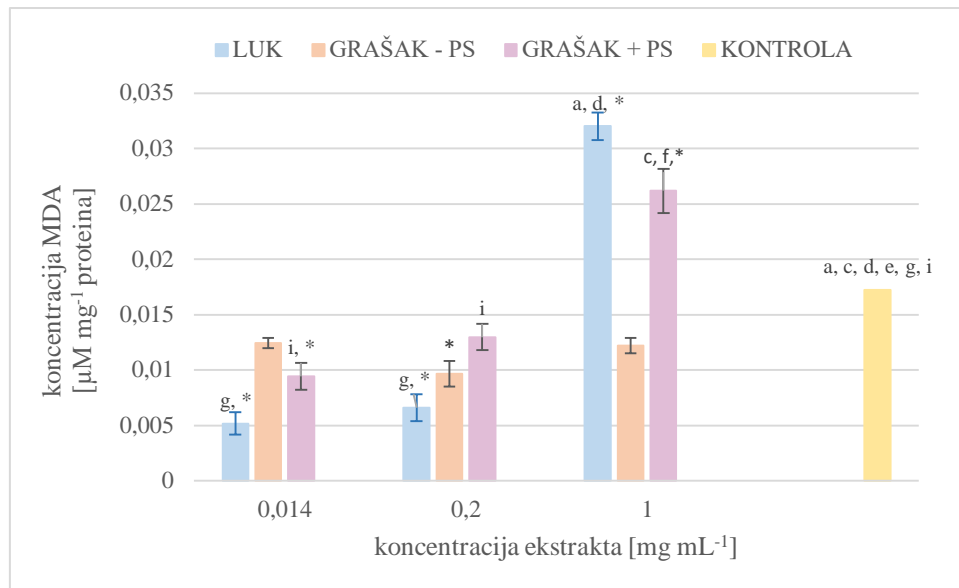


Ekstrakti ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama smanjuju postotak lipidne peroksidacije, pri čemu se najviše ističe antioksidativno djelovanje ekstrakta ljuske luka u koncentracijama 0,014 i 0,2 mg mL<sup>-1</sup>, a koje iznosi 65,71 % i 68,32 %.

#### 4.4.2. Stupanj lipidne peroksidacije određen metodom TBARS na staničnim linijama Cal27 i HepG2

Peroksidacija lipida najčešće se koristi kao pokazatelj oštećenja staničnih membrana posredovanih djelovanjem ROS-a (Katerji i sur., 2019). Malondialdehid, kao jedan od glavnih produkata peroksidacije lipida, odgovoran je za oštećenja stanične membrane uzrokujući promjene intrinzičnih faktora, poput fluidnosti, transporta iona, gubitka aktivnosti enzima i unakrsnog povezivanja proteina. Navedene promjene posljedično dovode do smrti stanice (Sharma i sur., 2012).

Određivanje stupnja lipidne peroksidacije provedeno je testom tiobarbiturne kiseline na staničnim linijama Cal27 i HepG2 prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4.2. Stanične linije tretirane su ekstraktima mahune graška sa i bez polisaharida te ekstraktima ljuske luka u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2 h, a rezultati su izraženi kao koncentracija malondialdehida u  $\mu\text{M mg}^{-1}$  proteina. Na slikama 19 i 20 prikazan je učinak ekstrakata ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida na lipide Cal27 i HepG2 stanica.



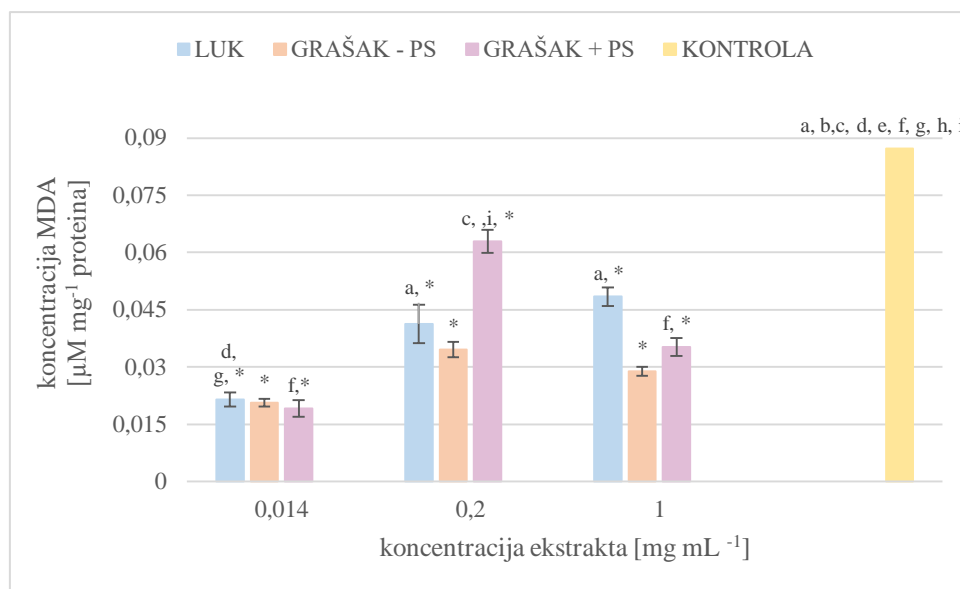
Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: \* - kontrolu; a – LUK 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; b – GRAŠAK – PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; c – GRAŠAK + PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; d – LUK 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; e – GRAŠAK – PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; f – GRAŠAK + PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; g – LUK 1 mg mL<sup>-1</sup>; h – GRAŠAK – PS 1 mg mL<sup>-1</sup>; i – GRAŠAK + PS 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Slika 19. Učinak ekstrakta ljske luka i mahune graška na lipidnu peroksidaciju u Cal27 stanicama.

Statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu pokazuju ekstrakti ljske luka u svim ispitivanim koncentracijama, ekstrakt mahune graška bez polisaharida u koncentraciji 0,2 mg mL<sup>-1</sup> te ekstrakti mahune graška sa polisaharidima u koncentracijama 0,014 i 1 mg mL<sup>-1</sup> (slika 19). Najveća koncentracija malondialdehida izmjerena je nakon tretmana stanica s ekstraktom ljske luka u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> te iznosi  $0,032 \pm 0,001 \mu\text{M mg}^{-1}$  proteina.

Kod tretmana Cal27 stanica ekstraktima ljske luka i mahune graška sa polisaharidima vidljiv je dozni odgovor. Kako se povećava koncentracija ekstrakta, veća je i koncentracija nastalog malondialdehida. Nakon tretmana navedenim ekstraktima u koncentracijama 0,014 i 0,2 mg mL<sup>-1</sup> vrijednosti koncentracije MDA poprilično su niže od vrijednosti kontrole, stoga se može zaključiti kako ekstrakti u navedenim koncentracijama smanjuju stupanj peroksidacije lipida. Moretti i sur. (2012) također su dokazali učinkovitost kvercetina u prevenciji lipidne peroksidacije uzrokovane tert-butil hidroperoksidom u ljudskim stanicama sperme *in vivo*. Za razliku od toga, isti ekstrakti u koncentraciji od 1 mg mL<sup>-1</sup> povećavaju koncentraciju nastalog MDA iznad razine kontrole pa se može zaključiti da induciraju lipinu peroksidaciju. Kod

tretmana stanica sa ekstraktom mahune graška bez polisaharida nije vidljiva razlika u djelovanju u ispitivanim koncentracijama te navedeni ekstrakt ne pokazuje statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu.



Statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na: \* - kontrolu; a – LUK 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; b – GRAŠAK – PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; c – GRAŠAK + PS 0,014 mg mL<sup>-1</sup>; d – LUK 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; e – GRAŠAK – PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; f – GRAŠAK + PS 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; g – LUK 1 mg mL<sup>-1</sup>; h – GRAŠAK – PS 1 mg mL<sup>-1</sup>; i – GRAŠAK + PS 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Slika 20. Učinak ekstrakta ljuske luka i mahune graška na lipidnu peroksidaciju u HepG2 stanicama.

Ekstrakti ljuske luka i mahune graška sa i bez polisaharida u svim ispitivanim koncentracijama pokazuju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, točnije smanjuju stupanj peroksidacije lipida. Najveća koncentracija malondialdehida izmjerena je nakon tretmana stanica s ekstraktom mahune graška sa polisaharidima u koncentraciji 0,2 mg mL<sup>-1</sup> te iznosi  $0,063 \pm 0,003 \mu\text{M mg}^{-1}$  proteina.

Ekstrakt ljuske luka pokazuje dozni odgovor, odnosno povećanjem koncentracije ekstrakta povećava se i koncentracija nastalog MDA, no i dalje je ispod razine koncentracije MDA u kontroli. Nuutila i sur. (2003) ispitivali su antioksidacijsko djelovanje mjerenjem inhibicije peroksidacije lipida izazvane terc-butil hidroperoksidom u izoliranim hepatocitima štakora te sposobnost hvatanja difenilpikrilhidrazil radikala. Ekstrakti žutog luka učinkovito su inhibirali

peroksidaciju lipida u hepatocitima štakora, pri čemu je najučinkovitiji bio upravo ekstrakt ljuske luka. Koncentracije od 10 do 80 mg mL<sup>-1</sup> (na temelju suhe mase originalnog ekstrahiranog uzorka) rezultirale su inhibicijom peroksidacije lipida 20–80%. Kod tretmana ekstraktima mahune graška sa i bez polisaharida najveći stupanj lipidne peroksidacije postignut je pri koncentraciji ekstrakta 0,2 mg mL<sup>-1</sup>. Prema rezultatima prikazanim na slici 14 vidljivo je da ekstrakti u svim ispitivanim koncentracijama smanjuju stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da biološki aktivne tvari u ljusci luka imaju značajno citotoksično djelovanje te iako se nalaze u koncentracijama koje su očekivane za dnevni unos u organizam, njihova aktivnost i djelovanje se reflektira na stabilnost DNA, proteina i lipida, a posljedice su vidljive i u smanjenom preživljenju stanica. Iako je ekstrakt luka imao protektivno djelovanje na modelnu molekulu DNA koja je bila izložena UV zračenju i vodikovom peroksidu u ovisnosti o koncentraciji, ovaj ekstrakt je povećanjem koncentracije uzrokovao oštećenja genetičkog materijala u obje korištene stanične linije. Unatoč tome što djeluje protektivno na aktivne grupe proteina smanjujući stupanj karbonilacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma, ekstrakt ljuske luka pokazuje prooksidativno djelovanje na proteine stanica Cal27 i HepG2, povećavajući stupanj karbonilacije u doznom odgovoru. Rezultati su pokazali da inhibira lipidnu peroksidaciju na modelu linoleinske kiseline i stanicama HepG2, pri čemu se protektivni učinak smanjuje povećanjem koncentracije, dok u stanicama Cal 27 povećanje koncentracije ekstrakta rezultira ispoljavanjem citotoksičnog djelovanja.

Biološki aktivne tvari sadržane u mahuni graška, neovisno o prisutnosti polisaharida, štite DNA od oštećenja, istovremeno pokazujući protektivna svojstva smanjenjem stupnja karbonilacije proteina i lipidne peroksidacije na modelnim makromolekulama. Ekstrakt mahune graška bez polisaharida ne pokazuje značajnu razliku u djelovanju povećanjem koncentracije, dok ekstrakt mahune graška sa polisaharidima porastom koncentracije ispoljava citotoksično djelovanje, što posljedično utječe na smanjenje preživljenja obje ispitivane stanične linije. Ekstrakti mahune graška bez polisaharida pokazuju antioksidativno djelovanje kako na modelni protein albumin, tako i na stanice HepG2 smanjujući stupanj karbonilacije, iako bez koncentracijske razlike, dok na stanice Cal27 djeluje suprotno povećavajući stupanj karbonilacije u ovisnosti o koncentraciji. Aktivne tvari sadržane u mahuni graška bez polisaharida inhibiraju lipidnu peroksidaciju te tako djeluju protektivno i na modelnoj makromolekuli i na obje ispitivane

stanične linije. Iako ekstrakt mahune graška koji sadrži polisaharide iskazuje protektivno djelovanje na protein albumin kao modelu makromolekulu te HepG2 stanice, na stanice Cal 27 djeluje suprotno pri čemu se povećanjem koncentracije ispoljava citotoksično djelovanje. Aktivne tvari u mahuni graška sa polisaharidima povećavaju protektivni učinak na proteine u modelnom proteinu albuminu te proteinima u stanicama HepG2 u ovisnosti o koncentraciji, dok iste djeluju suprotno u Cal27 stanicama na način da povećanjem koncentracije ekstrakta pokazuju citotoksično djelovanje. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da polisaharidi imaju važnu ulogu u biološkoj aktivnosti ispitivanog ekstrakta mahune graška.

## 5. ZAKLJUČAK

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

1. Ekstrakti ljuske luka u koncentracijama 0,2 i 1 mg mL<sup>-1</sup> te ekstrakt mahune graška s polisaharidima u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> djeluju citotoksično na stanične linije Cal27 i HepG2, dok ekstrakt mahune graška bez polisaharida u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> pokazuje citotoksično djelovanje samo na stanice Cal27 ukazujući na to da polisaharidi imaju važnu ulogu u povećanju toksičnosti.
2. Svi ekstrakti pokazuju protektivno djelovanje na DNA u obje ispitivane stanične linije.
3. Ekstrakti mahune graška, bez obzira na prisustvo polisaharida, djeluju protektivno na aktivne grupe proteina i lipida, smanjujući stupanj karbonilacije i lipidne peroksidacije u koncentracijskoj ovisnosti. Ekstrakt ljuske luka sadrži polifenole čijim porastom koncentracije dolazi do ispoljavanja jakog prooksidacijskog djelovanja.
4. Polifenoli u mahuni graška djeluju protektivno na stanične makromolekule, dok je ljuska luka bogata polifenolima koji u određenim uvjetima mogu ispoljiti prooksidacijsko i genotoksično djelovanje.

## 6. LITERATURA

Abd El Azim, M. H. (2015) Phenolic Compounds and Cytotoxic Activities of Methanol Extract of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Microb. Biochem. Technol.* **7**, 182-185.

Alsulami, R. N., Budkina, D. S., Sallans, L., Khisamutdinov, E. F., Pandey, U., Glusac, K., Wilson, R. M. (2018) Oxidation of nucleic acids: Chemistry of pyrene quinone (PQ 1) and development of dihydrodioxins (DHD 2) as DNA photooxidizing agents. *J. Photoch Photobio. A.* **376**, 224-237.

Anonymous 1 (2020) How to grow peas: What to plant, when to plant it, and how quickly you'll be dishing it up, <<https://www.countrylife.co.uk/gardens/gardening-tips/how-to-grow-peas-what-to-plant-when-to-plant-it-and-how-quickly-youll-be-dishing-it-up-215248>>. Pristupljeno 22. listopada 2020.

Anonymous 2 (2018) Science Photo Library Art, <<https://fineartamerica.com/featured/onion-allium-cepa-bjorn-svenssonscience-photo-library.html>>. Pristupljeno 22. listopada 2020.

Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med, Cell. Longev.* **2014**, 1–31.

Azqueta, A., Collins, A. (2016) Polyphenols and DNA Damage: A Mixed Blessing. *Nutrients.* **8**, 1-21.

Batiha, G. E. S., Beshbishy, A. M., Mulla, Z. S., Ikram, M., El-Hack, M. E. A., Taha, A. E., Elewa, Y. H. A. (2020) The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods.* **9**, 374-389.

Berlett, B. S., Stadtman, E. R. (1997) Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313–20316.

- Betti, C., Davini, T., Giannessi, L., Loprieno, N., Barale, R. (1995) Comparative studies by comet assay and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat. Res.* **343**, 201–207.
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* **585**, 325–337.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bujacz, A. (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr. D.* **68**, 1278–1289.
- Cadenas, E. (1997) Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors.* **6**, 391–397.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 949–962.
- Choi, I. S., Cho, E. J., Moon, J. H., Bae, H. J. (2015) Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chem.* **188**, 537–542.
- Chruszcz, M., Mikolajczak, K., Mank, N., Majorek, K. A., Porebski, P. J., Minor, W. (2013) Serum albumins - Unusual allergens. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**, 5375–5381.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* **23**, 143-151.
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I. (2016) A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J. Chromatogr. B.* **1019**, 178–190.
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018) The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* **5**, 1-5.



Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. (2002) Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 618–621.

Dahl, W. J., Foster, L. M., Tyler, R. T. (2012) Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *Brit. J. Nutr.* **108**, 3–10.

D'Archivio, M., Filesi C., Benedetto, R. D., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **43**, 348–361.

David, A.V. A, Arulmoli, R., Parasuraman, S. (2016) Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn. Rev.* **10**, 84-89.

Desai, S. N., Farris, F. F., Ray, S. D. (2014) Lipid Peroxidation. U: Encyclopedia of Toxicology, 3. izd. (Wexler, P., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam, str. 89–93.

Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. (1998) Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Brit. J. Nutr.* **80**, 77-112.

El-Feky, A. M., Elbatanony, M. M., Mounier, M. M. (2018) Anti-cancer potential of the lipoidal and flavonoidal compounds from *Pisum sativum* and *Vicia faba* peels. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* **5**, 258-264.

Encyclopaedia Britannica (2019) Entertainment & Pop Culture – Food – Pea, <<https://www.britannica.com/plant/pea>>. Pristupljeno 19. listopada 2020.

Encyclopaedia Britannica (2020) Entertainment & Pop Culture – Food – Onion, <<https://www.britannica.com/plant/onion-plant>>. Pristupljeno 19. listopad 2020.

Forni, C., Facchiano, F., Bartoli, M., Pieretti, S., Facchiano, A., D'Arcangelo, D., Jadeja, R. N. (2019) Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *BioMed. Res. Int.* **2019**, 1–16.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **1**, 2315–2319.

Gee, J. M., DuPont, M. S., Rhodes, M. J., Johnson, I. T. (1998) Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 19–25.

Gioanni, J., Fischel, J. L., Lambert, J. C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., Ettore, F., Formento, P., Chauvel, P., Lalanne, C. M., Courdi, A. (1988) Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: Establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* **24**, 1445-1455.

Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., Smith, B. (2002) *Onions?A global benefit to health.* *Phytother. Res.* **16**, 603–615.

Hadrich, F., Arbi, M. E., Boukhris, M., Sayadi, S., Cherif, S. (2014) Valorization of the Peel of Pea: *Pisum sativum* by Evaluation of Its Antioxidant and Antimicrobial Activities. *J. Oleo Sci.* **63**, 1177-1183.

Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Ushida, K., Nikaido, O., Osawa, T. (1997) 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J. Invest. Dermatol.* **89**, 10405–10409.

Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., Lines, T. C. (2007) A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2179–2205.

Ifesan Beatrice (2017) Chemical Composition of Onion Peel (*Allium cepa*) and its Ability to Serve as a Preservative in Cooked Beef. *Int. J. Sci. Res. Methodol.* **7**, 25-34.

Jiang, L., Ji, N., Zhou, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Z., Chen, Q., Zeng, X. (2009) CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral. Oncol.* **45**, 204-207.

Kalantari, H., Forouzandeh, H., Khodayar, M. J., Siahpoosh, A., Saki, N., Kheradmand, P. (2018) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Capparis spinosa* L. fractions and quercetin on tert-butyl hydroperoxide- induced acute liver damage in mice. *J. Tradit. Complement. Med.* **81**, 120–127.

Katerji, M., Filippova, M., Duerksen-Hughes, P. (2019) Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 1–29.

Kondratyuk, T. P., Pezzuto, J. M. (2004) Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharm. Biol.* **42**, 46–63.

Kopjar, N., Želježić, D., Garaj-Vrhovac, V. (2006) Evaluation of DNA damage in the white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim. Pol.* **53**, 321-336.

Lakhanpal, P., Rai, D. K. (2007) Quercetin: A versatile flavonoid. *Int. J. Med.* **2**, 22–37.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* **62**, 3923-3927.

Leonarduzzi, G., Chiarpotto, E., Biasi, F., Poli, G. (2005) 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 1044-1049.

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S., Yin, Y. (2016) Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, **8**, 167-180.

Liguori, L., Califano, R., Albanese, D., Raimo, F., Crescitelli, A., Di Matteo, M. (2017) Chemical Composition and Antioxidant Properties of Five White Onion (*Allium cepa* L.) Landraces. *J. Food Quality.* **2017**, 1–9.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118-126.

Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Buffer, B. M., Markesberry, W. R. (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*. **45**, 1594–601.

Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C. (2009) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 840–860.

Lunn, J., Buttriss, J. L. (2007) Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin*. **32**, 21–64.

Luo, P. (2013) Antioxidant ability of squid ink polysaccharides as well as their protective effects on deoxyribonucleic acid DNA damage in vitro. *Afr. J. Pharm Pharmacol.* **7**, 1382–1388.

Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Minor, W. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182.

Mendoza, N., Silva, E. M. E. (2018) Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance. U: Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention (Asao, T., Asaduzzaman, M, ured.), IntechOpen, London, str. 25-47.

Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. **198**, 329-340.

Mondal, T., Pal, S., Dey, S. K. (2017) Quercetin Mediated Inhibition of Hydrogen Peroxide-induced Genomic DNA Damage and Toxicity. *J. Biol. Act Prod. Nat.* **7**, 200–213.

Moretti, E., Mazzi, L., Terzuoli, G., Bonechi, C., Iacoponi, F., Martini, S., Rossi, C., Collodel, G. (2012) Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod. Toxicol.* **34**, 651–657.

Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., Oksman-Caldentey, K. M. (2003) Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem.* **8**, 485–493.

Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278.

Pucciarini, L., Ianni, F., Petesse, V., Pellati, F., Brighenti, V., Volpi, C., Sardella, R. (2019) Onion (*Allium cepa* L.) Skin: A Rich Resource of Biomolecules for the Sustainable Production of Colored Biofunctional Textiles. *Molecules*, **24**, 634-651.

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

Ray, P. D., Huang, B.-W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, 981–990.

Rehman, A., Gulfranz, M., Raja, G. K., Inam Ul Haq, M., Anwar, Z. (2015) A Comprehensive Approach to Utilize an Agricultural Pea peel (*Pisum sativum*) Waste as a Potential Source for Bio-ethanol Production. *Rom. Biotech.l Lett.* **20**, 10422-10430.

Rungruangmaitree, R., Jiraungkoorskul, W. (2017) Pea, *Pisum sativum*, and Its Anticancer Activity. *Pharmacogn Rev.* **11**, 39–42.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature.* **265**, 687–695.

Shankar, G. M., Antony, J., Anto, R. J. (2015) Quercetin and Tryptanthrin: Two Broad Spectrum Anticancer Agents for Future Chemotherapeutic Interventions. U: The Enzymes (Tamanoi, F., Kaguni, L. S., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam, str. 43–72.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Am. J. Bot.* **54**, 1-26.

Slimestad, R., Fossen, T., Vågen, I. M. (2007) Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids. *J. Agr. Food Chem.*, **55**, 10067–10080.

Spencer, J. P. E., Abd El Mohsen, M. M., Minihaie, A. M., Mathers, J. C. (2008) Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Brit. J. Nutr.* **99**, 12-22.

Spiteller, G. (1998) Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids.* **95**, 105–162.

Spiteller, P., Spiteller, G. (1998) Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether  $Fe^{2+}/O_2$  or  $Fe^{3+}/O_2$  is used as oxidant. *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**, 23–40.

Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis.* **43**, 84-93.

Uchiyama, S., Inaba, Y., Kunugita, N. (2011) Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **879**, 1282–1289.

Udayan, A., Arumugam, M., Pandey, A. (2017) Nutraceuticals From Algae and Cyanobacteria. U: *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology* (Rastogi, R., Madamwar, D., Pandey, A., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam, str. 65–89.

Upasana, Deepa Vinay (2018) Nutritional evaluation of pea peel and pea peel extracted byproducts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **3**, 65-67.

Verma, N., Bansal, M.C., Kumar, V. (2011) Pea peel waste: a lignocellulosic waste and its utility in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *Bioresources.* **6**, 1505-1519.

Wang, H., Liu, Y., Qi, Z., Wang, S., Liu, S., Li, X., Xia, X. (2013) An Overview on Natural Polysaccharides with Antioxidant Properties. *Curr. Med. Chem.* **20**, 2899-2913.

Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016) Reviews on Mechanisms of *In Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–13.

Wang, J. M., Sun, X. Y., Ouyang, J. M. (2018) Structural Characterization, Antioxidant Activity, and Biomedical Application of Astragalus Polysaccharide Degradation Products. *Int. J. Polym. Sci.* **2018**, 1–13.

Whelan, J., Fritsche, K. (2013) Linoleic Acid. *Adv. Nutr.* **4**, 311–312.

Wong, V. W. C., Szeto, Y. T., Collins, A. R., Benzie, I. F. F. (2005) The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Curr. Top. Nutraceut. R.* **3**, 1-14.

Woo, R.A., Melure, K.G., Lee, P.W. (1998) DNA dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature.* **394**, 700–704.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Željka Staudić