

Učinak polifenola iz ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea*) na humanu mikrobiotu i stanice epitela gastrointestinalnog trakta

Kosanović, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:280725>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Jelena Kosanović

1324/MB

**UČINAK POLIFENOLA IZ
EKSTRAKTA DOBRIČICE
(*Glechoma hederacea*) NA HUMANU
MIKROBIOTU I STANICE
EPITELA
GASTROINTESTINALNOG
TRAKTA**

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.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „*Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda*“ (IP-2019-04-5879) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, voditelj: prof.dr.sc. Draženka Komes.

Prije svega, beskrajno sam zahvalna, prvenstveno predivnoj osobi, a potom i svojoj mentorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada i svom stručnom znanju, savjetima i kritikama koje je nesebično podijelila sa mnom i pomogla mi da uspješno privedem kraju jedno poglavlje svog života. Od srca Vam hvala na ogromnom razumijevanju, strpljenju i podršci koju ste mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada. Druženje s Vama kao stručnjakom, ali i kao izuzetnom osobom zauvijek će mi ostati u iznimno lijepom sjećanju.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su me uvelike ohrabivali i uveseljavali tijekom cijelog studija.

Posebno se zahvaljujem svom Dejanu na svakom osmijehu koji mi je izmamio na lice u lijepim, a posebice u teškim trenucima. Beskrajno ti hvala na izuzetnoj podršci i pažnji koju mi daješ.

Najveće hvala mojim roditeljima i sestri Lani na bezgraničnoj ljubavi, podršci i razumijevanju prema meni, ne samo tijekom obrazovanja, već tijekom cijelog mog dosadašnjeg života. Hvala vam što ste se veselili svakom mom uspjehu i što ste mi nesebično pomagali da prevladam svaki svoj pad.

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

UČINAK POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea*) NA HUMANU MIKROBIOTU I STANICE EPITELA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Jelena Kosanović, 1324/MB

Sažetak: Ekstrakt dobričice se već stoljećima upotrebljava u narodnoj medicini za ublažavanje i liječenje raznih zdravstvenih tegoba. Glavne farmakološki aktivne tvari ekstrakta dobričice čine polifenolni spojevi, koje karakterizira izniman antioksidacijski i antimikrobni potencijal, čime pružaju zaštitu ljudskom organizmu od bakterijskih infekcija, kao i od razvoja kroničnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Cilj ovog rada je ispitati biološki učinak ekstrakta dobričice na stanične makromolekule, odabrane tumorske stanične linije epitela probavnog sustava, kao i na glavne predstavnike humane mikrobiote te utjecaj ekstrakta na njihovo vezanje za epitelne stanice gastrointestinalnog trakta. Dobiveni rezultati pokazali su da citotoksičnost ekstrakta ovisi o vrsti tretiranih stanica te da se prooksidativni učinak uglavnom smanjuje s produljenjem vremena izloženosti stanica. Utvrđen je i protektivni učinak ekstrakta od oksidacijskih oštećenja induciranih hidroksilnim radikalima na genetički materijal. Biološki aktivni spojevi prisutni u ekstraktu dobričice pokazali su snažnu antimikrobnu aktivnost prema patogenim bakterijama *E. coli* i *S. aureus* te sposobnost da dovedu do promjena u adheziji bakterija za epitelne stanice gastrointestinalnog trakta.

Ključne riječi: *dobričica, antioksidacijsko djelovanje, citotoksičnost, humane stanične linije, bakterijska adhezija*

Rad sadrži: 83 stranice, 30 slika, 4 tablice, 94 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. *Ksenija Marković*
4. Prof.dr.sc. *Višnja Gaurina Srček* (zamjena)

Datum obrane: 24. rujna 2021.

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

THE EFFECT OF POLYPHENOLS FROM GROUND IVY (*Glechoma hederacea*) EXTRACT ON HUMAN MICROBIOTA AND GASTROINTESTINAL EPITHELIAL CELLS

Jelena Kosanović, 1324/MB

Abstract: The ground ivy extract has been used for centuries in folk medicine to alleviate and treat various health ailments. The main pharmacologically active substances of ground ivy extract are polyphenolic compounds, which are characterized by exceptional antioxidant and antimicrobial potential, thus providing protection to the human body from bacterial infections as well as from the development of chronic diseases associated with oxidative stress. The aim of this study is to examine the biological effect of ground ivy extract on cellular macromolecules, selected tumor cell lines of the digestive epithelium, as well as on the representatives of the human microbiota and the influence of the extract on their adherence to gastrointestinal epithelial cells. The obtained results showed that the cytotoxicity of the extract depends on the type of treated cells and the prooxidative effect generally decreases with prolongation of cell exposure time. The protective effect of the extract from oxidative damages induced by hydroxyl radicals on genetic material was also determined. Biologically active compounds present in the ground ivy extract showed strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria *E. coli* and *S. aureus* and the ability to change bacterial adhesion to epithelial cells of the gastrointestinal tract.

Keywords: *ground ivy, antioxidant effect, cytotoxicity, human cell lines, bacterial adhesion*

Thesis contains: 83 pages, 30 figures, 4 tables, 94 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. *Ksenija Marković*, Full professor
4. PhD. *Višnja Gaurina Srček*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 24th September, 2021

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. DOBRIČICA (<i>Glechoma hederacea</i> L.) | 3 |
| 2.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI DOBRIČICE | 5 |
| 2.2.1. Polifenoli | 6 |
| 2.2.1.1. Ružmarinska kiselina | 7 |
| 2.2.1.2. Klorogenska kiselina | 9 |
| 2.3. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES | 11 |
| 2.3.1. Oštećenja DNA..... | 12 |
| 2.3.2. Oksidacija proteina..... | 13 |
| 2.3.3. Antioksidansi..... | 14 |
| 2.4. ADHEZIJA BAKTERIJA NA HUMANE STANICE | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 19 |
| 3.1.1. Biljni materijal..... | 19 |
| 3.1.2. Modelne makromolekule..... | 19 |
| 3.1.3. Biološki test sustavi | 20 |
| 3.1.3.1. Radni mikroorganizmi..... | 20 |
| 3.1.3.2. Humane stanične linije..... | 21 |
| 3.1.4. Kemikalije | 21 |
| 3.1.4.1. Otopine..... | 23 |
| 3.1.4.2. Hranjive podloge..... | 26 |
| 3.1.5. Laboratorijska oprema..... | 28 |
| 3.1.5.1. Laboratorijski uređaji | 28 |
| 3.1.5.2. Laboratorijski pribor | 28 |
| 3.2. METODE..... | 29 |
| 3.2.1. Ispitivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNA i staničnom genetičkom materijalu | 29 |
| 3.2.1.1. Antioksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelni plazmid <i>phiX174 RF1</i> DNA..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.1.2. Određivanje oštećenja DNA u stanicama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 komet testom (eng. comet assay ili single-cell gel electrophoresis, SCGE)..... | 31 |
| 3.2.2. Određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma | 32 |
| 3.2.3. Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na bakterijskim kulturama | 34 |
| 3.2.4. Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama Neutral red metodom | 34 |
| 3.2.5. Ispitivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama DCFH-DA metodom | 36 |
| 3.2.6. Ispitivanje utjecaja ekstrakta dobričice na promjenu adhezije bakterija za humane stanice..... | 37 |
| 3.2.7. Statistička obrada podataka | 38 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 39 |
| 4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG UČINKA EKSTRAKTA DOBRIČICE | 40 |
| 4.1.1. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama | 40 |
| 4.1.2. Citotoksični/proliferativni učinak ekstrakta dobričice na bakterije <i>L. plantarum</i> , <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> | 45 |
| 4.2. PROOKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK EKSTRAKTA DOBRIČICE..... | 47 |
| 4.2.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta dobričice na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma..... | 47 |
| 4.2.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama..... | 49 |
| 4.3. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKTA DOBRIČICE NA MODELNOJ DNA I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU | 55 |
| 4.3.1. Antioksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA | 55 |
| 4.3.2. Određivanje stupnja oštećenja DNA uzrokovanih ekstraktom dobričice u kontinuiranim humanim staničnim linijama | 56 |
| 4.4. UTJECAJ EKSTRAKTA DOBRIČICE NA PROMJENU ADHEZIJE BAKTERIJA ZA HUMANE STANICE | 69 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 72 |
| 6. LITERATURA | 73 |

1. UVOD

Razni biljni pripravci od davnina se upotrebljavaju u narodnoj medicini za prevenciju i liječenje mnogih bolesti. Ekstrakti biljaka iz porodice Lamiaceae poznati su po bogatom sastavu različitih farmakološki aktivnih spojeva koji blagotvorno djeluju na zdravlje ljudi (Oalde i sur., 2020). Unutar spomenute biljne porodice nalazi se i samonikla biljka dobričica (*Glechoma hederacea*), zimzelena, aromatična puzavica, rasprostranjena diljem Europe, Azije i Sjeverne Amerike, koja se već stoljećima upotrebljava u tradicionalnoj orijentalnoj i kineskoj medicini za ublažavanje simptoma upala, dijareje, žutice te u liječenju žučnih i bubrežnih kamenaca. Biološki aktivne tvari prisutne u ekstraktu dobričice, zbog kojih ima izniman terapijski potencijal, uglavnom čine polifenolni spojevi (Judzentiene i sur., 2015; Matkowski, 2008; Wang i sur., 2017). Polifenoli dokazano djeluju kao snažni antioksidansi te imaju odličnu sposobnost moduliranja rasta mikroorganizama. Konzumacija biljaka bogatih fenolnim spojevima može dovesti do smanjenja oksidacijskih oštećenja genetičkog materijala i drugih staničnih komponenti, čime se dodatno smanjuje rizik od kroničnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom kao što su rak, dijabetes i neurodegenerativne bolesti (Oalde i sur., 2020). Međutim, iako prirodne fitokemikalije unesene u organizam u niskim količinama pružaju mnoge zdravstvene blagodati, konzumacija većih doza može ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje i uzrokovati sveopću zabrinutost.

S obzirom na navedeno, očekuje se da će ekstrakt dobričice pokazati antioksidacijsko djelovanje na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta, kao i antimikrobni učinak putem inhibicije rasta patogenih bakterija te spriječavanjem njihovog vezanja na odgovarajuće epitelne stanice.

Cilj ovog rada je ispitati djeluje li ekstrakt dobričice citotoksično na humane stanice karcinoma pločastog epitela jezika Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2, adenokarcinoma epitela želuca AGS i adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2, kao i na glavne predstavnike humane mikrobiote, u rasponu doza za koje je očekivano da budu unesene u organizam tijekom 24 sata. Ujedno ispitat će se i utjecaj ekstrakta na promjenu adhezije bakterija za spomenute epitelne stanice, kao i potencijalno antioksidacijsko djelovanje određivanjem stupnja karbonilacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma i praćenjem indukcije slobodnih radikala u navedenim staničnim linijama, te mogući genoprotektivni učinak od oksidacijskih oštećenja induciranih hidroksilnim radikalima na

modelnom (plazmid phiX174 RF1 DNA) genetičkom materijalu. Također, utvrdit će se i potencijalni genotoksični učinak ekstrakta dobričice na gore navedenim staničnim linijama. Rezultati ovog istraživanja pokazat će djeluje li ekstrakt protektivno na stanične makromolekule te da li inhibira rast patogenih mikroorganizama i njihovo vezanje na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta. Na temelju dobivenih rezultata moći će se zaključiti je li preporučena doza ujedno i optimalna doza unosa ekstrakta u organizam.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DOBRIČICA (*Glechoma hederacea* L.)

Dobričica (Slika 1.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (Lamiaceae). Ova aromatična, zimzelena biljka ima četvrtastu stabljiku s puzajućim i uzdignutim dijelovima, koja naraste do 30 cm u visinu, a nosi listove čak i zimi. Listovi su nasuprotni, okruglog do bubrežastog oblika sa zaobljenim rubovima, a u blizini baze lista nalikuju na srce. Na licu su listovi znatno tamniji i sjajniji nego na naličju, te često sadrže i primjesu crvenkaste boje. Listovi koji se nalaze na puzajućim dijelovima stabljike imaju dužu peteljku, nego listovi pozicionirani na uspravljenim ograncima. Cvjetovi su usnati i duguljasti, ljubičaste do plave boje, te formiraju pršljenove (do 6 cvjetova) u pazušcima listova (Mitch, 1994; North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox). Vrijeme cvatnje je uglavnom od travnja do lipnja, a ponekad cvate i po drugi put u jesen (Grlić, 1990). Razmnožavanje je prvenstveno vegetativno, na način da se stabljike nakon cvatnje spuštaju prema tlu te u podnožju biljke i čvorištima listova formiraju novo vlaknasto korijenje. Biljka se može razmnožavati i putem sjemena, jer nakon cvatnje svaki cvijet oslobađa četiri oraščića (ploda), ali to se događa rjeđe (Mitch, 1994; North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox).



Slika 1. Dobričica (*Glechoma hederacea*) (Mikšik, 2020).

Prirodno raste na područjima diljem Europe i Azije, a s vremenom se udomaćila i na prostorima Sjeverne Amerike. Vrlo je rasprostranjena i u našoj zemlji izuzevši primorske krajeve s mediteranskom florom. Preferira rast na izrazito plodnim tlima i umjerenom klimi

sjeverne hemisfere (Matkowski, 2008). Obitava u prirodnim i sinantropskim staništima, pa ju je moguće pronaći uz ceste, na travnjacima, na sjenovitim područjima, u pustoši te u šikarama. Budući da može biti izrazito korovita biljka koja se agresivno širi, teško ju je uništiti bez uporabe herbicida (Kumarasamy i sur., 2006; North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox).

Dobričica je poznata ljekovita biljka koja pokazuje diuretička, ekspektorantna, adstringentna, analgetska i antihelminthska svojstva, stimulira probavu i apetit te djeluje kao tonik. Stoga se ekstrakti ove biljke stoljećima koriste u narodnoj medicini za liječenje raznih bolesti poput astme, bronhitisa, prehlade, upala, dijabetesa, hemeroida, bubrežnog i žučnog kamenca, infekcija mokraćnog mjehura te probavnih smetnji (Judzentiene i sur., 2015; Matkowski, 2008). Neki ljudi, primjerice, nanose listove dobričice direktno na kožu kako bi ublažili rane, opekline, čireve i druge kožne nepravilnosti (Anonymus). U novije vrijeme, brojne *in vitro* i *in vivo* studije, dokazale su da ekstrakti ove biljke imaju i antioksidativno, antiviralno, antibakterijsko, antikancerogeno, antimelanogeno i hepatoprotektivno djelovanje (Chou i sur., 2019; Kumarasamy i sur., 2003).

Svježi ili sušeni listovi dobričice upotrebljavaju se u kulinarstvu te kao začim. Mladi listovi, specifičnog aromatičnog i gorkog okusa, koriste se za pripremu juha, čaja, salata, u proizvodnji sira, te kao začim u varivima i drugim jelima. Prije popularizacije hmelja, također se upotrebljavala u proizvodnji piva kao aroma, bistrilo i konzervans (Judzentiene i sur., 2015). Konzumacija dobričice smatra se sigurnom kada se koristi u malim količinama kao začim ili terapijsko sredstvo, dok prekomjerno oralno konzumiranje može izazvati iritaciju želuca i bubrega ili kod preduge dermalne primjene, peckanje i svrbež. Zbog nedovoljno podataka, trudnicama i dojiljama, epileptičarima, te ljudima koji imaju poremećaje jetre i bubrega preporučuje se izbjegavanje korištenja ove biljke kako bi se spriječile dodatne komplikacije (Anonymus). Osim za ljudsku konzumaciju, mnogi beskralješnjaci koriste ju kao izvor hrane. Međutim, nekolicina studija utvrdila je da konzumacija svježih listova može biti toksična za stoku, osobito za konje, kao i za neke vrste glodavaca (Waggy, 2009).

2.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI DOBRIČICE

Do danas je iz brojnih biljaka, uključujući voće, povrće, žitarice, ali i druge biljne izvore, izolirano i identificirano preko 5000 različitih bioaktivnih, nenutritivnih komponenti, poznatih pod nazivom fitokemikalije, a za koje je dokazano da mogu imati široki spektar blagotvornih učinaka na zdravlje ljudi, kao i na smanjenje rizika od razvoja brojnih kroničnih bolesti. Ovi spojevi pripadaju sekundarnim biljnim metabolitima i nisu ključni za neposredni opstanak biljaka, ali povećavaju ukupnu sposobnost preživljavanja i prevladavanja lokalnih izazova omogućujući im interakciju s okolinom, tako što sudjeluju u važnim fiziološkim procesima biljke, kao što je reprodukcija, pigmentacija te zaštita od raznih patogena, parazita, predatora i UV zračenja (Kennedy i sur., 2011; Liu, 2013).

Dobričica obiluje različitim biološki aktivnim spojevima, koji uglavnom uključuju fenolne kiseline, flavonoide i triterpenoide (Jin i sur., 2019). Ružmarinska kiselina, inače karakteristična za biljne vrste iz porodice Lamiaceae, i klorogenska kiselina, predstavljaju dva glavna fenolna spoja prisutna u dobričici (Döring i Petersen, 2014). Udio ovih kiselina razlikuje se ovisno o dijelu biljke u kojem se nalaze, pa je tako ružmarinska kiselina najkoncentriranija u cvjetovima, zatim u korijenu, dok je u puno manjoj količini zastupljena u listovima i stabljici dobričice (Šeremet i sur., 2020). Među fenolnim spojevima još se ističu kofeinska i ferulinska kiselina, te flavonoidi rutin, apigenin, luteolin, kvercetin, genistin i genistein, dok su od triterpenoide uglavnom zastupljene ursolična i oleanolinska kiselina (Uritu i sur., 2018; Varga i sur., 2016). U dobričici su identificirana i dva jedinstvena alkaloida, hederacin A i hederacin B, koji pokazuju umjereni citotoksični učinak protiv stanica raka debelog crijeva. Iako nisu idealni kandidati za terapijsku primjenu, zbog svoje zanimljive kemijske strukture predstavljaju dobar temelj za razvoj antitumornih spojeva s pojačanom aktivnosti (Kumasamary i sur., 2006). S druge strane, u sastavu eteričnih ulja dobričice dominiraju seskviterpeni i monoterpeni, poput germacrena D, germacrena B, β -elemena, 1,8-cineola i (*Z*)- β -ocimena, koji se zbog dobrih farmakoloških svojstava koriste, primjerice, u sintezi lijekova protiv raka (Mockutė i sur., 2005). Brojne studije također pokazuju da listovi dobričice sadrže i polinezasićene masne kiseline, jednu vrstu insekticidnog lektina zvanog Gleheda, kao i spojeve poput askorbinske kiseline i α -, β - i γ -tokoferola (Uritu i sur., 2018; Varga i sur., 2016).

2.2.1. Polifenoli

Polifenoli predstavljaju najbrojniju skupinu fitokemikalija, koja do danas broji preko 8000 različitih spojeva. Produkti su sekundarnog metabolizma biljaka, koji imaju važnu ulogu u razvoju biljke, te služe kao obrambeni mehanizam biljke od štetnog UV zračenja ili napada raznih parazita i predatora (Liu, 2013; Pandey i Rizvi, 2009).

Fenolni spojevi obuhvaćaju široki raspon različitih tvari, od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline, do visoko polimeriziranih spojeva, poput kondenziranih tanina, ali u osnovi, svima je zajedničko da sadrže barem jedan aromatski prsten na koji je supstituirana jedna ili više hidroksilnih skupina (González-Sarrías i sur., 2020.). Biosinteza svih fenolnih spojeva započinje od zajedničkog prekursora, fenilalanina, ili njemu srodnog spoja, šikiminske kiseline. Uglavnom se javljaju u konjugiranim oblicima s jednim ili više šećernih ostataka vezanih na hidroksilnu skupinu, iako postoje i konjugati s izravno vezanim šećernim jedinicama (monosaharidima ili polisaharidima) na aromatski ugljik. Osim s ugljikohidratima, često su vezani i s drugim spojevima, kao što su organske i karboksilne kiseline, amini, lipidi te drugi fenoli (Pandey i Rizvi, 2009). Unatoč velikoj strukturnoj raznolikosti, mogu se podijeliti u dvije glavne skupine, a to su flavonoidi i neflavonoidi (González-Sarrías i sur., 2020).

Epidemiološke studije pokazale su da različiti polifenolni spojevi imaju antioksidacijska, protuupalna te antitumorna svojstva, zbog čega pružaju zaštitu organizmu od razvoja brojnih kroničnih bolesti poput karcinoma, dijabetesa te kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja (Pandey i Rizvi, 2009). Zbog prisustva jedne ili više hidroksilnih skupina vezanih na osnovnu strukturu fenolnog prstena, oni sudjeluju u prijenosu elektrona i tako neutraliziraju ili uklanjaju slobodne radikale. Što je veći broj hidroksilnih skupina u strukturi polifenola, to je jači njihov antioksidacijski kapacitet. Polifenoli također smanjuju koncentraciju slobodnih radikala tako što induciraju ekspresiju gena koji kodiraju za antioksidativne enzime poput hem-oksigenaze-1, glutation-peroksidaze, superoksid-dismutaze, katalaze i glutamat-cistein-liaze. Ova svojstva polifenola zajedno doprinose sprječavanju oksidativnog oštećenja stanica izazvanih slobodnim radikalima, koji su glavni uzročnici razvoja brojnih kroničnih bolesti (Martinez i sur., 2017).

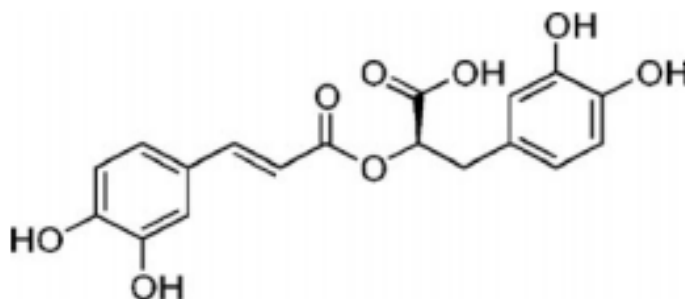
Danas se polifenoli koriste kao funkcionalni sastojci hrane ili dodaci prehrani. Zbog njihovog doprinosa organoleptičkim svojstvima hrane i ljudskom zdravlju, jako je važno

razumjeti poveznicu između njihove strukture te apsorpcije, metabolizma i bioraspoloživosti u ljudskom organizmu u svrhu razvoja potencijalnih terapijskih sredstava, ali i za predviđanje i kontrolu kvalitete hrane (Chen i sur., 2018). U hrani su polifenoli uglavnom prisutni u obliku estera, glukozi i polimera, zbog čega se ne mogu izravno apsorbirati u nativnoj formi, već prije apsorpcije podliježu hidrolizi potpomognutoj crijevnim enzimima ili bakterijama crijevne mikroflore. Međutim, kada je u proces apsorpcije uključena crijevna mikroflora, učinkovitost apsorpcije se značajno smanjuje, jer bakterije crijevne mikroflore razgrađuju oslobođene aglikone i prevode ih u jednostavnije aromatske kiseline. Tijekom apsorpcije polifenoli podliježu reakcijama konjugacije, prvotno u tankom crijevu, a zatim u jetri. Taj proces uglavnom uključuje reakcije metilacije, sulfacije i glukuronidacije. Budući da prolaze razne modifikacijske reakcije tijekom ovog detoksifikacijskog procesa, dobiveni metaboliti prisutni u krvi i ciljnim tkivima mogu se uvelike razlikovati u biološkoj aktivnosti u usporedbi s nativnim molekulama (Manach i sur., 2004). Osim toga, stabilnost polifenola u medijima za stanične kulture drastično je lošija u odnosu na organska otapala ili vodu, što upućuje na činjenicu da su u ljudskom organizmu izrazito podložni razgradnji, što posljedično dovodi do niske biodostupnosti i smanjene biološke aktivnosti polifenola. Također, zbog niske topljivosti u lipidima imaju smanjenu transmembransku aktivnost i nestabilni su u crijevnoj mikrookolini što ih čini vrlo osjetljivima na oksidativni stres. S ciljem poboljšanja biodostupnosti polifenola, znanstvenici zadnjih nekoliko godina primjenjuju metode poput inkluzije, krute disperzije, liposoma, mikroemulzijske tehnologije te formulacije flavonoidnih aglikona u nanočestice, kako bi povećali stabilnost i topljivost polifenola u vodi, te tako prevladali prethodno navedene nedostatke i iskoristili izniman potencijal ovih spojeva (Chen i sur., 2018).

2.2.1.1. Ružmarinska kiselina

Ružmarinska kiselina smatra se jednim od najvažnijih predstavnika polifenolnih spojeva, a prema kemijskoj strukturi (Slika 2.) je ester kofeinske i 3,4-dihidroksifenilmliječne kiseline (Alagawany i sur., 2017). Prekursori za biosintezu ružmarinske kiseline su aromatske aminokiseline L-fenilalanin i L-tirozin, koje se pomoću osam enzima uključenih u ovaj biosintetski put prevode do ružmarinske kiseline. Dva talijanska kemičara, Scarpati i Oriente, izolirala su je prvi put kao čisti spoj 1958. godine iz ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), po kojemu je i dobila ime (Petersen i Simmonds, 2003). Zastupljena je u 39 biljnih porodica,

osobito u biljnim vrstama iz porodica usnača (Lamiaceae) i boražinovki (Boraginaceae) (Gonçalves i sur., 2020). Crna kopriava predstavlja najbogatiji izvor ružmarinske kiseline, dok brojne aromatične biljke poput ružmarina, metvice, origana, bosiljka, kadulje, majčine dušice i timijana također obiluju ovom polifenolnom kiselinom. Prisutnost ružmarinske kiseline u začinima, travama i ljekovitom bilju, koje se koristi za ljudsku konzumaciju, pokazuje blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje (Alagawany i sur., 2017).



Slika 2. Strukturna formula ružmarinske kiseline (Alagawany i sur., 2017).

Ružmarinska kiselina je snažan antioksidans i ima važnu ulogu u obrani biljke od patogena i biljojeda (Khojasteh i sur., 2020). Brojne studije pokazale su da ružmarinska kiselina posjeduje široki raspon bioloških aktivnosti te ispoljava višestruke pozitivne učinke na zdravlje ljudi. Neke od tih aktivnosti su antiviralno, antimutageno, protuupalno, antibakterijsko, adstrigentno i antioksidativno djelovanje. Ujedno djeluje i kao stimulator endokrinog i imunskog sustava, te poboljšava lučenje endogenih probavnih enzima, pokretljivost crijeva, pokretljivost spermija, kao i dokazane antialergene, antiangiogene, antidijabetičke, antitumorne i neuroprotektivne funkcije (Alagawany i sur., 2017; Khojasteh i sur., 2020; Petersen i Simmonds, 2003). Koristi se u liječenju peptičkih čireva, artritisa, mrene, reumatoidnog artritisa, bronhijalne astme, karcinoma i mnogih drugih bolesti, te pokazuje potencijal primjene u terapiji brojnih neurodegenerativnih i kožnih oboljenja (Khojasteh i sur., 2020). Izvanredna antioksidativna aktivnost ove kiseline temelji se na njejoj sposobnosti stabiliziranja membrana i sprječavanju kretanja slobodnih kisikovih radikala, što posljedično štiti membrane od oksidacije. Ružmarinska kiselina značajno smanjuje stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i protektivno djeluje na oštećenja DNA, odnosno kromosoma, te poboljšava kapacitet popravka oštećenja DNA. Široko su opisana i protuupalna svojstva ružmarinske kiseline, koja se uglavnom temelje na inhibiciji enzima ciklooksigenaza i lipooksigenaza te inhibitornom djelovanju na stanične puteve i aktivnost protuupalnih

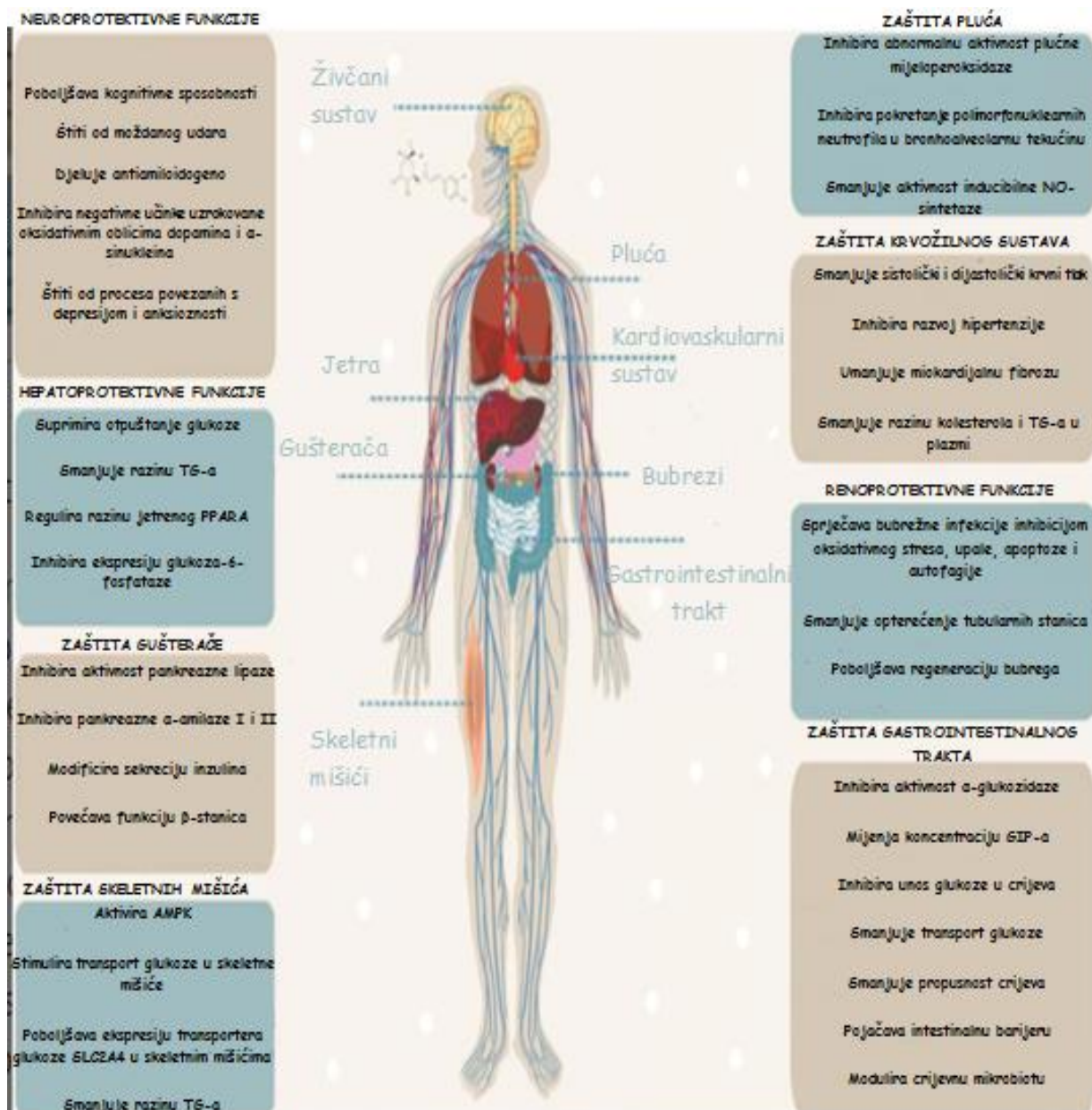
citokina, zbog čega se, primjerice, koristi u liječenju infekcije virusom *Herpes simplex* (Gonçalves i sur., 2020; Petersen i Simmonds, 2003).

Osim u medicinske svrhe, zbog širokog raspona bioaktivnosti koje posjeduje, ružmarinska kiselina ima primjenu i u prehrambenoj industriji, i to prvenstveno u Japanu gdje se koristi kao konzervans za produljenje roka trajanja svježih morskih plodova (Khojasteh i sur., 2020). Ova polifenolna kiselina koristi se i u proizvodnji kozmetičkih pripravaka, jer pojačava antioksidacijski kapacitet biljaka koje se upotrebljavaju u kozmetičkoj industriji, poput milogleda i ružmarina (Peterson i Simmonds, 2003).

2.2.1.2. Klorogenska kiselina

Klorogenske kiseline označavaju grupu estera formiranih između *trans*-cimetnih kiselina (uključujući kofeinsku, *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu) i kvinične kiseline. Iako postoji nekoliko izomernih formi klorogenske kiseline, ovaj izraz najčešće se odnosi na 5-*O*-kofeoilkviničnu kiselinu, koja je najzastupljenija u biljnim izvorima i namirnicama biljnog porijekla, kao što su zrna kave, jabuke, kruške, krumpir, patlidžan te drugo (Lu i sur., 2020). Biološki je aktivan polifenolni spoj, koji prvotno djeluje kao snažan antioksidans i protuupalno sredstvo, jer suprimira brojne upalne signalne puteve i aktivira antioksidacijske mehanizme u organizmu, te posljedično ispoljava brojne farmakološke učinke kao što je prikazano na Slici 3. (Lu i sur., 2020; Naveed i sur., 2018).

U gastrointestinalnom traktu, klorogenska kiselina, kao i njeni metaboliti, izražavaju citoprotektivni učinak prema razvoju želučanih čireva i raznih upalnih stanja crijeva, te djeluju kao potencijalni prebiotici, modulirajući sastav crijevne mikrobiote. *In vitro* studije su pokazale da uporaba ekstrakta pržene kave, koji obiluje klorogenskom kiselinom, inhibira rast humanih tumorskih stanica epitela debelog crijeva (HT-29) i epitela usne šupljine (SCC-25), iz čega proizlazi da konzumacija ekstrakta pržene kave može spriječiti razvoj karcinoma debelog crijeva i usne šupljine (Lu i sur., 2020). Klorogenska kiselina također posjeduje i različite antimikrobne aktivnosti, što ju čini idealnim konzervansom i prehrambenim aditivom. Ova kiselina inhibira rast patogenih bakterija tako što povećava permeabilnost stanične membrane i dovodi do njene disfunkcionalizacije, dok na probiotičke bakterije nema negativan utjecaj zbog čega se smatra još prikladnijim kandidatom za primjenu u prehrambenoj industriji (Lu i sur., 2020; Naveed i sur., 2018).



(AMPK (eng. *5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase*) – 5'-AMP-aktivirana protein kinaza; TG – triacilglicerol; PPAR α (eng. *peroxisome proliferation-activated receptor alpha*) – receptor α aktiviran proliferatorom peroksisoma; GIP (eng. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) – inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozu)

Slika 3. Višestruke funkcije klorogenske kiseline u ljudskom organizmu (preuzeto i prilagođeno prema Lu i sur., 2020).

2.3. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

Slobodni radikali se definiraju kao atomi ili molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci ili vanjskoj orbitali i sposobni su za neovisno postojanje. Neparan broj elektrona, slobodne radikale čini vrlo nestabilnima, kratkotrajnima i izrazito reaktivnima. Zbog visoke reaktivnosti oni mogu akceptirati elektrone od drugih spojeva za postizanje vlastite stabilnosti, pa tako napadnuta molekula gubi elektron i sama postaje slobodni radikal započinjući kaskadnu reakciju što u konačnici dovodi do oštećenja žive stanice (Phaniendra i sur., 2015).

Kisikovi radikali poput superoksidnog ($O_2^{\bullet-}$), peroksilnog (ROO^{\bullet}) i hidroksilnog (OH^{\bullet}) radikala te neradikalni oksidirajući spojevi, kao što je singlet kisik (1O_2), vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3) i hipoklorna kiselina ($HOCl$), koji se lako mogu prevesti u kisikove radikale, objedinjuju skupinu spojeva koji se zajednički nazivaju reaktivne kisikove čestice (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Ghosh i sur., 2018; Phaniendra i sur., 2015). ROS nastaju kao rezultat normalnog unutarstaničnog metabolizma u mitohondrijima i peroksisomima, kao i djelovanjem drugih enzimskih sustava, uključujući NADPH oksidazu. Osim toga, različiti egzogeni izvori poput UV zračenja, okolišnih zagađivača i kemoterapeutika također mogu inducirati nastajanje ROS-a (Noh i Ha, 2011).

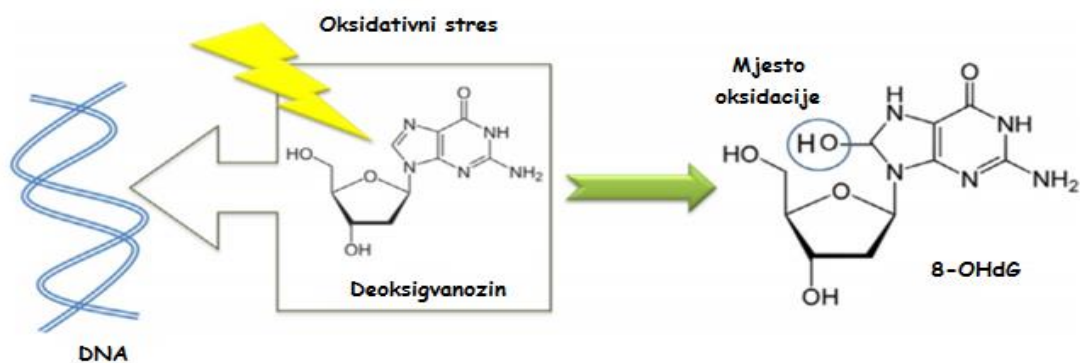
Ovisno o koncentraciji u kojoj su prisutni u organizmu, ROS mogu imati i korisne i štetne učinke na žive sustave. U niskim do umjerenim koncentracijama, ROS su potrebni stanici za odvijanje i održavanje raznih fizioloških procesa poput prijenosa signala, imunološke obrane organizma od patogena, mitogenog odgovora, regulacije redoks reakcija i ekspresije gena (Nita i Grzybowski, 2016; Phaniendra i sur., 2015). U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između stvaranja i uklanjanja ROS-a, zahvaljujući prisustvu antioksidacijskih obrambenih sustava u eukariotskim stanicama, koji reguliraju razinu slobodnih radikala. Međutim, prekomjerna proizvodnja ROS-a koja prevladava kapacitet antioksidacijskih mehanizama, oštećeni antioksidacijski sustavi ili disfunkcionalni mitohondriji rezultiraju oksidativnim stresom, koji označava stanje narušene ravnoteže između proizvodnje ROS-a i sposobnosti bioloških sustava da ih uklone (Nita i Grzybowski, 2016). U stanju oksidativnog stresa, ROS proizvedeni u prekomjernim količinama mogu oksidirati biološke makromolekule poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina, što dovodi do oštećenja stanica ili čak do stanične smrti, te ujedno njihova aktivnost u ljudskom tijelu slabi imunološki sustav i pridonosi razvoju brojnih akutnih i kroničnih patofizioloških stanja, koja

rezultiraju nastankom bolesti poput raka, neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa (Ghosh i sur., 2018; Khojasteh i sur., 2020; Nita i Grzybowski, 2016).

2.3.1. Oštećenja DNA

Iako je DNA relativno stabilna molekula, smatra se najznačajnijom metom oksidativnog napada u biološkim sustavima (Halliwell, 2000). Oštećenje DNA podrazumijeva bilo kakvu modifikaciju u strukturi DNA koja dovodi do promjene njenih kodirajućih svojstava i/ili interferencije sa staničnim procesima, kao što su replikacija i transkripcija (Gonzalez-Hunt i sur., 2018). Postoje brojni mehanizmi za popravak oštećene DNA, ali njihova efikasnost nije 100 %-tna, pa nepopravljena DNA može rezultirati nastankom mutacija. Nepopravljena oštećenja DNA akumuliraju se u visokodiferenciranim stanicama odraslih sisavaca, poput miocita i neurona, što može doprinijeti preuranjenom starenju i razvoju brojnih karcinoma (Shimada i sur., 2014).

Oštećenja DNA mogu se podijeliti na endogena i egzogena oštećenja, ovisno o tome jesu li nastala kao rezultat uobičajenih intracelularnih metaboličkih procesa ili pod utjecajem okolišnih faktora (Chatterjee i Walker, 2017). Glavni uzročnici endogenih oštećenja su ROS, formirane tijekom staničnih procesa poput respiratornog lanca u mitohondrijima i upalnog odgovora, osobito ako su ti procesi disfunkcionalni. ROS mogu potaknuti formiranje različitih lezija na DNA kao što su promjene na dušičnim bazama ili šećeru deoksiribozi u strukturi DNA, ciklizacija šećera i baza, kovalentno povezivanje DNA i proteina, inter- i intralančano povezivanje DNA, te uvođenje jednolančanih i dvolančanih lomova (Gonzalez-Hunt i sur., 2018). Hidroksilacija C-8 gvanina, pri čemu nastaje 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin (8-OHdG), smatra se najučestalijom oksidativnom modifikacijom DNA (Slika 4.), pa se u kliničke svrhe, 8-OHdG koristi kao biomarker oksidativnog stresa (Katerji i sur., 2019). S druge strane, egzogena oštećenja DNA induciraju razni fizikalni i kemijski agensi prisutni u okolišu, poput UV i ionizirajućeg zračenja, biljnih toksina, virusa, prehrane bogate mastima, metala, zagađivača zraka i pesticida (Chatterjee i Walker, 2017; Gonzalez-Hunt i sur., 2018; Shimada i sur., 2014).



Slika 4. Slikovni prikaz procesa nastajanja 8-OHdG-a (preuzeto i prilagođeno prema Emam i sur., 2014).

2.3.2. Oksidacija proteina

Proteini imaju vitalnu ulogu u održavanju stanične strukture, regulaciji stanične signalizacije te odvijanju brojnih enzimskih procesa (Cecarini i sur., 2007). Oksidacija proteina često se povezuje s narušavanjem uobičajenih funkcija proteina, čime posljedično doprinosi starenju i patogenezi brojnih tkiva te razvoju raznih bolesti (Cai i Yan, 2013). Proteini su izrazito osjetljivi na oksidaciju, jer često sudjeluju kao katalizatori brojnih reakcija koje se odvijaju u stanici, a ne kao stehiometrijski posrednici, zbog čega je i efekt oksidacije puno izraženiji (Celi i Gabai, 2015). Međutim, novije studije pokazuju da oksidacija proteina može imati i korisne učinke za stanicu i omogućiti joj stvaranje uvjeta pozitivnog stresa, pri čemu se reprogramiraju mehanizmi preživljavanja stanica, što dovodi do produljenja životnog vijeka ili prevladavanja teških, odnosno letalnih izazova (Cai i Yan, 2013).

Oksidacija proteina definira se kao kovalentna modifikacija proteina potaknuta izravno djelovanjem ROS-a ili neizravno putem sekundarnih nusprodukata oksidativnog stresa. Jedna od najučestalijih ireverzibilnih oksidativnih modifikacija proteina je karbonilacija (Celi i Gabai, 2015). U tkivima s visokom razinom oksidativnog stresa, karbonilirani proteini koriste se kao biomarker oksidacije proteina (Ghosh i sur., 2018). Do karbonilacije proteina dolazi uvođenjem karbonilnih skupina u molekulu proteina oksidacijom aminokiselinskih pobočnih ograna, osobito lizina, histidina i arginina, ili oksidacijom proteinske okosnice koja rezultira cijepanjem peptidne veze. Osim toga, proteini se mogu karbonilirati i sekundarnim reakcijama s reaktivnim karbonilnim spojevima, koji nastaju kao produkti glikoksidacije i

lipidne peroksidacije, poput 4-hidroksinonenala (HNE) ili malondialdehida (MDA) (Cecarini i sur., 2007; Sundar i sur., 2010).

2.3.3. Antioksidansi

Koncept biološkog antioksidansa označava bilo koji spoj, koji ako je prisutan u nižoj koncentraciji u usporedbi sa supstratom koji se oksidira, može odgoditi ili spriječiti njegovu oksidaciju. Antioksidacijske funkcije podrazumijevaju smanjenje oksidativnog stresa, mutacija DNA, malignih transformacija, kao i drugih parametara oštećenja stanica. Epidemiološke studije dokazale su sposobnost antioksidansa da neutraliziraju učinke ROS-a i smanje učestalost pojave raka i drugih neurodegenerativnih bolesti. Međutim, pri trajnom djelovanju slobodnih radikala, funkcioniranje obrambenog sustava protiv ROS-a može biti oslabljeno, što posljedično dovodi do nastanka bolesti (Pisoschi i Pop, 2015).

Primarni sustav antioksidativne obrane u ljudskom tijelu uključuje različite antioksidativne enzime i neenzimske molekule, prisutne u vodenim i membranskim staničnim odjeljcima, koji djeluju tako da sprječavaju proizvodnju slobodnih radikala ili blokiraju i hvataju formirane radikale. Glavni predstavnici enzimskih antioksidansa su enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx), dok neenzimski antioksidansi uključuju spojeve poput glutationa i proteina (transferin, feritin, ceruloplazmin, albumin), te spojeve male molekulske mase kao što je bilirubin, urična kiselina, lipoična kiselina i koenzim Q10. Drugi važan antioksidacijski sustav stanice predstavlja sustav za popravak oštećenja, koji uklanja oštećene biomolekule prije nego što njihova agregacija omogući promjenu staničnog metabolizma. Intervencija sustava za popravak očituje se u aktivnosti proteolitičkih enzima, lipolitičkih enzima, te specifičnih enzima za popravak nukleinskih kiselina (Pisoschi i Pop, 2015).

Osim djelovanja prirodno stvorenih antioksidansa u organizmu (endogeni antioksidansi), brojni spojevi uneseni putem hrane također pokazuju antioksidativnu aktivnost (egzogeni antioksidansi) i pridonose funkcijama endogenih antioksidansa (Sailaja Rao i sur., 2011). Različito voće, povrće, žitarice, mahunarke i druge namirnice biljnog porijekla obiluju antioksidansima, uključujući vitamin C i E, fenolne kiseline, flavonoide, elemente u tragovima (Se, Mn, Zn), karotenoide te ω -3 i ω -6 masne kiseline (Pisoschi i Pop, 2015; Sailaja Rao i sur., 2011).

Antioksidansi mogu djelovati na različite načine, putem pojedinačnih ili kombiniranih mehanizama, a u suštini se klasificiraju na primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni antioksidansi ili antioksidansi prekidači lančane reakcije oksidacije reagiraju izravno sa slobodnim radikalima, transformirajući ih u mnogo stabilnije neradikalne produkte. Stoga imaju važnu ulogu u oksidaciji lipida, jer reagiraju s formiranim lipidnim radikalima prevodeći ih u neradikalne forme i time ometaju daljnju razgradnju lipida i oštećivanje lipidnih komponenti u stanici. Sekundarni ili preventivni antioksidansi neizravno dovode do neutralizacije ROS-a putem nekoliko različitih mehanizama, uključujući keliranje prijelaznih metala, deaktivaciju singletnog kisika, uklanjanje kisika, apsorpciju UV svjetla i inhibiciju prooksidativnih enzima (npr. lipooksigenaze). Sekundarni antioksidansi također mogu djelovati i sinergistički s primarnim antioksidansima, regenerirajući ih i osiguravajući im kontinuirano antioksidativno djelovanje (Hermund, 2018; Pisoschi i Pop, 2015).

Iznenadujuće je da neki poznati antioksidansi pokazuju i prooksidativna svojstva. Brojni faktori mogu utjecati na promjenu funkcije antioksidansa u prooksidans, od kojih su najvažniji prisustvo metalnih iona, koncentracija antioksidansa u biološkom sustavu te njegov redoks potencijal. Primjerice, α -tokoferol se pri visokim koncentracijama ponaša kao prooksidans, jer u reakciji s ROS-ama i sam postaje radikal, koji se u nedostatku vitamina C potrebnog za njegovu regeneraciju zadržava u reaktivnom stanju (Sotler i sur., 2019).

2.4. ADHEZIJA BAKTERIJA NA HUMANE STANICE

Bakterije su se prilagodile načinu života u različitim okruženjima i uvjetima, pa tako i u ljudskom tijelu (Pizzaro-Cerdá i Cossart, 2006). Primjerice, bakterije mliječne kiseline predstavljaju komenzalne mikroorganizme gastrointestinalnog trakta čovjeka, te pokazuju blagotvorni utjecaj na ljudsko zdravlje (Nishiyama i sur., 2016). Međutim, mnoge infektivne bolesti nastaju kao rezultat kolonizacije bakterija na površinama genitourinarnog, gastrointestinalnog ili respiratornog trakta. Kolonizaciji sluznice prethodi vezanje bakterija na epitelne stanice ili mucine koji prekrivaju stanice sluznice. Većina patogenih i komenzalnih bakterija na svojoj površini ekspirira specijalizirane strukture ili makromolekule, adhezine, koji omogućuju interakciju s receptorima na eukariotskim stanicama ili topljivim molekulama (Abraham i sur., 2015). Interakcija adhezina i receptora pokreće signalnu kaskadu u stanicama domaćina, koja može rezultirati aktivacijom imunološkog odgovora stanica domaćina ili

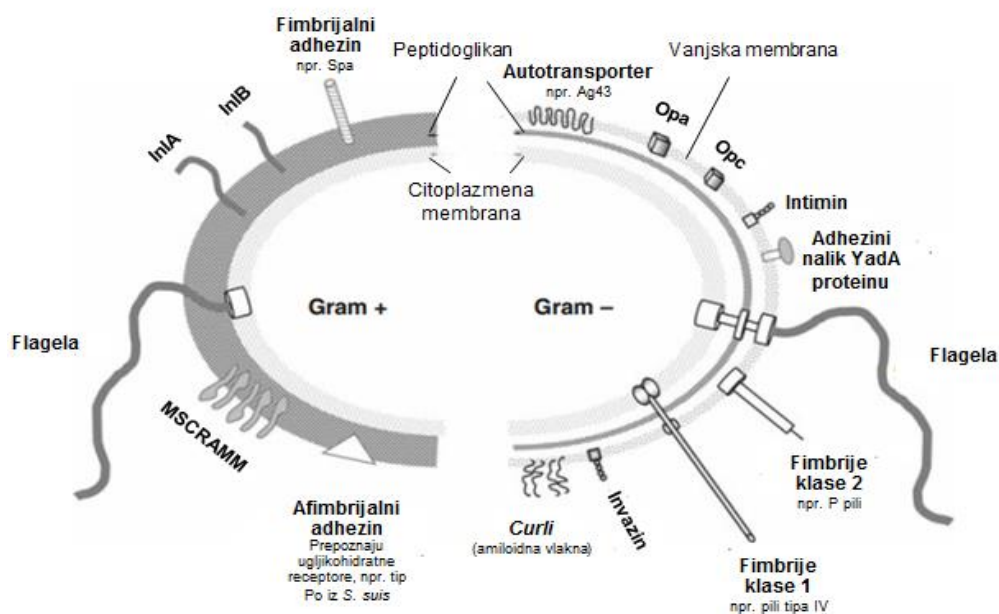
ometanjem staničnih procesa, koji olakšavaju bakterijsku kolonizaciju i invaziju (Soto i Hultgren, 1999).

Molekule koje služe kao receptori bakterijskih adhezina uključuju transmembranske proteine, imunoglobuline, glikolipide i glikoproteine prisutne na površini stanice domaćina, kao i proteine ekstracelularnog matriksa, poput fibronektina i kolagena. Iako se receptor-ligand interakcije koje dovode do adhezije, mogu generalno podijeliti na protein-protein i protein-ugljikohidrat interakcije, važno je biti svjestan raznolikosti meta koje bakterijama služe kao receptori za prihvaćanje na stanice domaćina. Štoviše, neke bakterije, kao što je enteropatogena *E. coli*, injektiraju vlastiti proteinski receptor u stanicu domaćina, koji se nakon lokalizacije u membrani stanice domaćina, veže s afimbrijalnim adhezinima na površini patogena (Wilson i sur., 2002).

Do danas je okarakterizirano mnoštvo bakterijskih adhezina, a mnoge strukture prisutne na površini bakterijske stanice imaju adhezivnu funkciju (Slika 5.) (Klemm i sur., 2010). Najzastupljenija vrsta adhezina na površini bakterijskih stanica, posebice izučavana kod Gram negativnih bakterija, su fimbrijalni adhezini (poznati i pod nazivom pili) (Abraham i sur., 2015; Di Martino, 2018). Fimbrije su vlaknaste polimerne proteinske strukture, sastavljene od velike središnje podjedinice na koju su vezane manje podjedinice, od kojih jedna ili više ima adhezivnu funkciju (Abraham i sur., 2015; Wilson i sur., 2002). Kod većine patogenih bakterija, fimbrije predstavljaju ključne faktore virulencije. Primjerice, uropatogeni soj *E. coli* eksprimira P-fimbrije i fimbrije tipa 1, koji prepoznaju specifične šećerne ostatke na glikolipidnim receptorima i posreduju u vezanju na epitelne stanice urinarnog trakta, što posljedično može dovesti do infekcija mokraćnog sustava (Sarowar i sur., 2016). Gram pozitivne bakterije također ekspimiraju fimbrije, od kojih je važno izdvojiti probiotičke bakterije *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus lactis* (Di Martino, 2018). Međutim, ova vrsta pilusa općenito se razlikuje od spolnog pilusa uključenog u razmjenu genetičkog materijala tijekom procesa konjugacije (Fierer i sur., 2017).

Na površini bakterijske stanice prisutni su i mnogi pojedinačni proteini, koji također imaju adhezivnu ulogu, ali za razliku od fimbrija, ne formiraju dugačke polimerne komplekse (afimbrijalni adhezini) (Klemm i sur., 2010; Wilson i sur., 2002). Veliku skupinu afimbrijalnih adhezina čine lektini, proteini koji prepoznaju i vežu se na ugljikohidratne ostatke glikolipida i glikoproteina na površini eukariotske stanice. Kod enterobakterija, lektini mogu biti vezani na fimbrijalnu strukturu, pozicionirani na vrhu, kako bi omogućili optimalnu

interakciju sa stanicom domaćina (Abraham i sur., 2015; Fierer i sur., 2017). Adhezivnu funkciju također imaju i autotransportni proteini, kao što su AIDA i TibA pronađeni u *E. coli*. Specifično za Gram-pozitivne bakterije je da eksprimiraju površinske proteine MSCRAMM-e (eng. *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), koji sudjeluju u povezivanju bakterija s proteinima ekstracelularnog matriksa, poput fibrinogena, fibronektina, laminina i kolagena (Di Martino, 2018). Osim proteinskih, bakterije proizvode i polisaharidne adhezine, koji su obično sastavni dijelovi bakterijske stanične membrane, stanične stijenke ili kapsule. Teihoične kiseline nađene u staničnoj ovojnici Gram pozitivnih bakterija služe kao adhezini *Streptococcus* sp. i *Staphylococcus* sp. (Wilson i sur., 2002).



Slika 5. Površinske molekule i strukture uključene u adheziju Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (preuzeto i prilagođeno prema Oelschlaeger i sur., 2010).

Budući da je vezanje bakterija na humane stanice usko povezano s nastankom brojnih infekcija, veliki broj znanstvenika zadnjih godina intenzivno radi na otkrivanju i razvoju različitih antiadhezivnih strategija i sredstava, koja sprječavaju bakterijsku patogenezu i kolonizaciju u ranoj fazi (Klemm i sur., 2010). Dosadašnji pristupi uglavnom se temelje na inhibiciji biosinteze adhezina ili na uporabi analoga receptora ili adhezina, koji ometaju proces adhezije. Mnoge prehrambene namirnice pokazuju protektivni učinak prema bakterijskim infekcijama *in vitro*, zbog čega čine dobre kandidate za uporabu u antiadhezivnoj terapiji. Primjerice, dokazano je da sok brusnice štiti organizam od bakterijskih infekcija,

posebice od infekcija urinarnog trakta. Polifenoli i proantocijanidini su bioaktivni spojevi identificirani u soku brusnice, koji onemogućavaju adheziju i formiranje biofilma bakterija *Porphyromonas gingivalis*, *H. pylori* i uropatogene *E. coli*, tako što se vežu na fimbrije ovih bakterija. Međutim, iako prehrambene namirnice mogu biti dobar izvor antiadhezivnih tvari, te tvari ujedno mogu imati baktericidno ili bakteriostatsko djelovanje, a selektivni pritisci kakve takvi spojevi nameću nepoželjni su, pa treba biti oprezan tijekom konzumacije takvih namirnica (Asadi i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

Liofilizirani ekstrakt dobričice priređen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorak od 2 g suhog lišća dobričice preliven je s 200 mL demineralizirane vode. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji na 100 °C u trajanju od 2 h. Udio suhe tvari u uzorku iznosio je 0,25 %. Ekstrakt je potom podvrgnut uparavanju pod vakuumom te liofilizaciji (-47 °C, 24 h).

Za provođenje eksperimenata, dobiveni liofilizat korišten je za pripremu ishodišne otopine ekstrakta ($\gamma = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$), iz koje su potom pripravljene radne otopine ekstrakta ($\gamma = 0,0125, 0,025, 0,075$ i $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Odabrani raspon koncentracija temelji se na preporučenom dnevnom unosu dobričice.

3.1.2. Modelne makromolekule

U svrhu ovog rada kao modelne makromolekule korištene su protein albumin iz govedeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) te superzavijeni plazmid phiX174 RF1 DNA.

Protein albumin iz govedeg seruma je najzastupljeniji protein krvne plazme, koji pokazuje jaka antioksidativna svojstva (Asbaghi i sur., 2020). Dobiva se iz goveđe krvi, nusproizvoda stočarske industrije, uz visoke prinose i nisku cijenu proizvodnje (Rockland Immunochemicals, Inc.). Globularni je, neglikozilirani protein, sastavljen od 583 aminokiseline, molekulske mase približno 66 kDa (Tromelin i sur., 2006). BSA sudjeluje u održavanju osmotskog tlaka u krvi te u vezanju i transportu mnoštva molekula poput raznih lijekova, masnih kiselina, bilirubina, žučnih kiselina te iona metala. Zbog izuzetnih svojstava vezanja različitih liganada, niske cijene i velike dostupnosti ima široku kliničku, farmaceutsku te biokemijsku primjenu (Asbaghi i sur., 2020; Majorek i sur., 2012; Yadav i sur., 2020).

Prema tome, učestalo se koristi kao modelna molekula za proučavanje interakcija lijek-protein *in vitro* (Yadav i sur, 2020). Osim toga, često se upotrebljava za stabilizaciju restriksijskih enzima tijekom digestije DNA, kao nutrijent za uzgoj staničnih i mikrobnih kultura, te kao standard za određivanje koncentracije proteina. Zbog izrazite stabilnosti, također ima primjenu u pojačavanju signala u raznim biokemijskim testovima (Rockland Immunochemicals, Inc.).

Superzavijeni plazmid phiX174 RF1 DNA je dvolančani kružni DNA plazmid dugačak 5386 pb, a dobiven je na temelju sekvence jednolančane kružne DNA prisutne u ikozahedralnom, neobavijenom kolifagu PhiX174 (Verreault i sur., 2010). Ovaj modelni plazmid često se koristi za ispitivanje nikazne aktivnosti restriksijskih enzima. Uslijed oksidacijskog oštećenja, plazmid se relaksira te sporije putuje u agaroznom gelu u odnosu na neoštećenu superzavijenu formu.

3.1.3. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustavi u ovom radu su korištene Gram pozitivne i Gram negativne bakterije te kontinuirane humane stanične linije.

3.1.3.1. Radni mikroorganizmi

Bakterijski sojevi korišteni za potrebe ovog rada su: *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* i *Staphylococcus aureus*. Navedeni bakterijski sojevi dio su Zbirke organizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te se čuvaju na -80 °C u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 10 %-tnog glicerola. U svrhu provedbe željenih eksperimenata, bakterijski sojevi su neposredno prije uporabe inokulirani u odgovarajuću svježu tekuću hranjivu podlogu i inkubirani preko noći pri optimalnoj temperaturi rasta.

3.1.3.2. Humane stanične linije

Za potrebe ovog rada upotrebljene su kontinuirane humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika, Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre, HepG2, adenokarcinoma epitela želuca, AGS te adenokarcinoma epitela debelog crijeva, Caco-2. Navedene stanične linije uzgajane su u monosloju u T-bocama u kompletiranom hranjivom mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) s 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS), izuzev AGS stanične linije za čiju kultivaciju je korišten Ham's F-12 hranjivi medij. Kultivacija stanica provedena je u inkubatoru s kontroliranom atmosferom CO₂ (5 %) i pri temperaturi od 37 °C. U svrhu provedbe željenih eksperimenata, stanice su nakon uzgoja podvrgnute postupku tripsinizacije uz dodatak 0,25 %-tne otopine tripsina, kako bi se odvojile od podloge i prevele u suspenziju radi lakše manipulacije s njima. Nakon 10-ak minuta (ovisno o vrsti stanične linije) zaustavljeno je djelovanje tripsina dodatkom medija sa serumom, čime je spriječena razgradnja staničnih komponenti i disfunkcionalizacija stanica. Na temelju broja stanica u suspenziji, određenog uporabom Bürker-Türkove komorice, podešena je početna koncentracija stanica od 10⁵ stanica mL⁻¹ za daljnju provedbu eksperimenata.

3.1.4. Kemikalije

- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Agar, *Biolife*, Italija
- Agaroza niske točke tališta (LMP), *Invitrogen*, Engleska
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Lonza*, Rockland, SAD
- Albumin iz goveđeg seruma (BSA), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Amonijev klorid (NH₄Cl), *Alkaloid*, Skopje, Makedonija
- Askorbinska kiselina, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Bakto tripton, *Biolife*, Italija
- Bromtimol plavo, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Dimetil sulfoksid (DMSO), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Ekstrakt dobričice

- Etanol (96% (v/v)), *Lach-ner, s.r.o.*, Republika Češka
- Etidij bromid ($C_{21}H_{20}BrN_3$), *Sigma Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Etil acetat, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Glicerol, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Gvanidin-hidroklorid, *Acros Organics*, SAD
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Kalcijev klorid ($CaCl_2$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), *Riedel-de Haën AG Seelze*, Hannover, Njemačka
- Kalijev klorid (KCl), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (37% (v/v)), *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Kvašćev ekstrakt, *Biolife*, Italija
- Ledena octena kiselina (80% (v/v)), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Manitol, *Difco*, SAD
- Metanol, *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- MRS Broth, *Biolife*, Italija
- Natrijev dodecil sulfat (SDS), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid (NaOH), *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Natrijev klorid (NaCl), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev laurilsarkozinat, *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Plazmid phiX174 RF1 DNA, *Promega*, SAD
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, *Corning*, SAD
- Tiamin hidroklorid, *Koch-light Ltd*, Engleska
- Trikloroctena kiselina (TCA), *Fisher Scientific*, Engleska
- Tripsin, *Capricorn Scientific*, Njemačka
- Tris-HCl, *Invitrogen*, SAD

- Triton X-100, *Acros Organics*, SAD
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), *Fluka*, Švicarska
- Vodikov peroksid, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Željezov (III) klorid (FeCl_3), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

3.1.4.1. Otopine

i. Otopine korištene za ispitivanje protektivnog i genotoksičnog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNA molekuli

a) TAE pufer, 10x

| | |
|------------------------|------------|
| Tris-HCl | 48,4 g |
| Ledena octena kiselina | 11,4 mL |
| EDTA | 3,7 g |
| Demineralizirana voda | do 1000 mL |

b) Agarozni gel (1 %)

| | |
|---------------|--------|
| Agaroz | 1,5 g |
| TAE pufer, 1x | 150 mL |

c) Obojeni pufer za nanošenje na agarozni gel (eng. *loading buffer*)

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

d) Radna otopina etidij bromida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$)

- Ishodišna otopina etidij bromida, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ 37,5 μL
- Demineralizirana voda do 750 mL

ii. Otopine korištene za provođenje komet testa

a) Otopina NMP agaroze (1,5 %)

| | |
|----------------------------|--------|
| NMP agaroz | 150 mg |
| PBS pufer (pH = 7,2 - 7,4) | 10 mL |

b) Otopina LMP agaroze (0,5 %)

| | |
|-----------------------|-------|
| LMP agaroz | 50 mg |
| Demineralizirana voda | 10 mL |

c) Pufer za lizu stanica (pH = 7,5; ukupni volumen 890 mL)

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

Čuvanje na sobnoj temperaturi.

Sat vremena prije uporabe u 100 mL ishodišne otopine pufera za lizu dodaje se 1 mL Triton X-100 i 10 mL 10 %-tne otopine DMSO. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku na +4 °C 1 h, te je nakon toga spremna za obradu stanica.

d) Otopina NaOH, 10 M

| | |
|-----------------------|-----------|
| NaOH | 40 g |
| Demineralizirana voda | do 100 mL |

e) Otopina Na₂EDTA, 200 mM

| | |
|-----------------------|----------|
| Na ₂ -EDTA | 2,52 g |
| Demineralizirana voda | do 50 mL |

f) Pufer za alkalnu elektroforezu (pH > 13)

| | |
|-------------------------------|--------|
| NaOH, 10 M | 30 mL |
| Na ₂ -EDTA, 200 mM | 5 mL |
| Demineralizirana voda | 965 mL |

g) Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5)

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

h) Radna otopina etidij bromida, 10 mg mL⁻¹

| | |
|---|-------|
| Ishodišna otopina etidij bromida, 200 mg mL ⁻¹ | 1 mL |
| Demineralizirana voda | 19 mL |

iii. *Otopine korištene za određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma*

a) BSA, 1 mg mL⁻¹

| | |
|-----------------------|--------|
| BSA | 100 mg |
| Demineralizirana voda | 10 mL |

| | | |
|--|--|-----------|
| b) Željezov (III) klorid, 0,5 mM | | |
| FeCl ₃ | | 0,811 mg |
| Demineralizirana voda | | 10 mL |
| c) Askorbinska kiselina, 0,1 mM | | |
| Askorbinska kiselina | | 0,176 mg |
| Demineralizirana voda | | 10 mL |
| d) Vodikov peroksid, 25 mM | | |
| Vodikov peroksid, 3 % | | 0,28 mL |
| Demineralizirana voda | | 10 mL |
| e) Dinitrofenilhidrazin (DNPH), 10 mM | | |
| DNPH | | 0,198 g |
| Apsolutni etanol, 96 % | | 100 mL |
| f) Trikloroctena kiselina (TCA), 10 % | | |
| TCA | | 10 g |
| Demineralizirana voda | | 100 mL |
| g) Klorovodična kiselina (HCl), 2 M | | |
| HCl, 37 % | | 16,65 mL |
| Demineralizirana voda | | 100 mL |
| h) Gvanidin hidroklorid, 6 M | | |
| Gvanidin-HCl | | 56,118 g |
| HCl, 2 M | | do 100 mL |
| iv. <i>Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti</i> | | |
| a) Fosfatni pufer – PBS (pH = 7,2 - 7,4) | | |
| NaCl | | 8,0 g |
| KCl | | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | | 1,16 g |
| K ₂ HPO ₄ | | 0,2 g |
| Demineralizirana voda | | 1000 mL |
| Sterilizacija fosfatnog pufera provodi se 15 minuta pri temperaturi od 120°C i tlaku od 1,01 x 10 ⁵ Pa. | | |
| b) Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL ⁻¹ | | |
| Neutral red | | 50 mg |
| Etanol | | 10 mL |

c) Radna otopina Neutral red-a

| | |
|--|--------|
| Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL ⁻¹ | 0,1 mL |
| RPMI 1640 hranjivi medij | 9,9 mL |

d) Otopina za odbojavanje

| | |
|------------------------|---------------|
| Demineralizirana voda | 100 mL (50 %) |
| Etanol | 98 mL (49 %) |
| Ledena octena kiselina | 2 mL (1 %) |

v. Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih radikala

a) Ishodišna otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 2 mM

| | |
|---------|--------|
| DCFH-DA | 1,5 mg |
| DMSO | 1,5 mL |

b) Radna otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 50 μM

| | |
|---------------------------------|---------|
| Ishodišna otopina DCFH-DA, 2 mM | 0,25 mL |
| PBS pufer (pH = 7,2 – 7,4) | 9,75 mL |

vi. Otopine korištene za ispitivanje utjecaja ekstrakta dobričice na adheziju bakterija za humane stanice

Otopina SDS-a, 10 %

| | |
|----------------------------|----------|
| SDS | 1 g |
| PBS pufer (pH = 7,2 – 7,4) | do 10 mL |

3.1.4.2. Hranjive podloge

U ovom radu korištena je kompletna LB (eng. *Luria-Bertani*) hranjiva podloga za kultivaciju bakterije *Escherichia coli*, odnosno kompletna MRS (eng. *Man, Rogosa and Sharpe broth*) hranjiva podloga za kultivaciju bakterije *Lactobacillus plantarum*, te selektivna M9-minimalna hranjiva podloga s manitolom za uzgoj bakterije *Staphylococcus aureus*. Navedene hranjive podloge pripravljene su prema uputama proizvođača, te je njihov sastav prikazan u Tablicama 1, 2 i 3. Podloge su prije uporabe sterilizirane u autoklavu pri temperaturi 121 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa s vremenom sterilizacije od 15 minuta. Krute hranjive podloge dobivene su dodatkom 15 g L⁻¹ agara u tekuće hranjive podloge prije sterilizacije.

Tablica 1. Sastav LB hranjive podloge u tekućem obliku.

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|-------------------------|----------|
| Bakto-tripton | 10 g |
| Kvašćev ekstrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Destilirana voda | 1000 mL |

Tablica 2. Sastav MRS hranjive podloge u tekućem obliku.

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|-------------------------|----------|
| MRS Broth | 55,2 g |
| Destilirana voda | 1000 mL |

Tablica 3. Sastav M9 minimalne hranjive podloge s manitolom u tekućem obliku.

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|--|----------|
| Na₂HPO₄ | 6 g |
| KH₂PO₄ | 3 g |
| NaCl | 0,5 g |
| NH₄Cl | 1 g |
| Destilirana voda | 1000 mL |
| *1 M MgSO₄ | 2 mL |
| *1 M CaCl₂ | 100 µL |
| *20 %-tni manitol | 10 mL |
| *Tiamin (10 mg mL⁻¹) | 100 µL |

*Označene komponente M9 hranjive podloge steriliziraju se filtracijom kroz membranski filter te se dodaju u ostatak podloge nakon toplinske sterilizacije.

3.1.5. Laboratorijska oprema

3.1.5.1. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, 1712 Mp8 Silver Edition, *Sartorius*, Engleska
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu, HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, *Cecil Instruments Ltd*, Engleska
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH*, Wetzlar, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific*, SAD
- Invertni svjetlosni mikroskop, *Optika Microscopes*, Italija
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd*, Engleska
- Spektrofotometar, *Thermo Fisher Scientific*, Engleska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, *Comet Assay II*, *Perceptive Instruments Ltd*, Engleska
- Svjetlosni mikroskop, *Carl Zeiss*, Jena, Njemačka
- Tehnička vaga, *Sartorius*, Engleska
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Vibromikser EV-202, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD

3.1.5.2. Laboratorijski pribor

- Aluminijska folija
- Automatska propipeta, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena, 20-1000 mL
- Filter papir
- Kivete od kvarcnog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja

- Laboratorijske staklene čaše različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Markeri za pisanje
- Menzure različitih volumena, 50-1000 mL
- Mikropipete od 20, 200 i 1000 μ L, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske ploče s 24 i 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Nastavci za pipete
- Odmjerne tikvice različitih volumena, 25-100 mL
- Pamučna vata
- Plastične Petrijeve zdjelice različitih promjera, *Aptaca*, Canelli, Italija
- Pokrovna stakalca
- Staklena kapaljka
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Stakleni lijevak
- Sterilni filteri
- Špatula
- Štapić za struganje stanica
- T-boce, *Falcon*, *BD Company*, Franklin Lakes, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Ispitivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNA i staničnom genetičkom materijalu

3.2.1.1. Antioksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelni plazmid *phiX174 RF1 DNA*

Biološki učinak ekstrakta dobričice na modelni plazmid *phiX174 RF1 DNA*, koji je podvrgnut UV zračenju u trajanju od 16 minuta i tretmanu s vodikovim peroksidom, pri čemu nastaje hidroksilni radikal odgovoran za prelazak superzavijene forme u kružnu formu, praćen je elektroforezom u agaroznom gelu. Elektroforeza u agaroznom gelu je jednostavna i visoko učinkovita metoda za razdvajanje, identifikaciju i pročišćavanje DNA fragmenata različitih veličina u rasponu od 100 pb do 25 kb (Lee i sur., 2012). Zbog fosfatne okosnice, fragmenti

DNA uvijek imaju negativan neto naboj, koji je ravnomjerno raspoređen cijelom duljinom DNA, pa u električnom polju fragmenti DNA uvijek putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi (Koontz, 2013). Budući da molekula DNA ima jednoliki omjer mase i naboja, fragmenti DNA se u agaroznom gelu razdvajaju na temelju veličine tako da je prijeđena udaljenost obrnuto proporcionalna logaritmu njihove molekulske mase (Lee i sur., 2012). Tijekom određenog vremenskog razdoblja, kraći fragmenti DNA migriraju kroz gel brže u odnosu na dulje fragmente (Koontz, 2013). Vizualizacija rezultata elektroforeze u agaroznom gelu uobičajeno se provodi na dva načina, uključujući fluorofore koji se specifično vežu na molekule DNA, a u tu svrhu najčešće se upotrebljava etidij bromid. Ti fluorofori mogu biti prisutni ili u otopini gela ili u otopini pufera s kojim se gel ispire te se u tom slučaju pufer s interkalirajućom bojom može višestruko koristiti. U oba slučaja potrebno je primijeniti UV svjetlo, koje pobuđuje fluorofor i omogućuje vizualizaciju rezultata eksperimenta (Corthell, 2014).

Za potrebe ovog rada, prvotno je pripremljen 1 %-tni agarozni gel u TAE puferu. Agaroz se zagrijava u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje, dok se potpuno ne otopi, nakon čega se ohladi na približno 65 °C kako ne bi došlo do oštećivanja kalupa za gel. Potom se gel izljeva u kalup i ostavlja se dok ne polimerizira. Uzorci su sadržavali 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida, 0,1 %-tni H_2O_2 , različite koncentracije ekstrakta dobičice od 0,0125, 0,025 i 0,075 mg mL^{-1} , odnosno 0,25 mg mL^{-1} te odgovarajući volumen TAE pufera do konačnog volumena reakcijske smjese od 30 μL . Svi uzorci podvrgnuti su UV zračenju u trajanju od 16 minuta. Negativna kontrola sadržavala je 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida. Druga kontrola sadržavala je 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida, te je bila podvrgnuta UV zračenju u trajanju od 16 minuta. Treća kontrola sadržavala je 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida i 0,1 %-tni H_2O_2 . Posljednja, odnosno pozitivna kontrola sadržavala je 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida, 0,1 %-tni H_2O_2 , te je bila podvrgnuta UV zračenju u trajanju od 16 minuta. Nakon tretmana, u svaki uzorak dodano je po 3 μL obojenog pufera za nanošenje (eng. *loading buffer*) koji sadrži bromtimol plavo, čime je omogućeno praćenje tijekom elektroforeze migracijom boje, te glicerol, koji povećava viskoznost uzorka i omogućava da uzorak tone u gel. Tako pripremljeni uzorci nanoseni su u jažice gela. Površina gela se potom prelijeva s TAE puferom, te se pokreće elektroforeza u trajanju od 1 sat pri jakosti struje od 150 mA. Nakon provedene elektroforeze, gel je bojan u otopini etidij bromida koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u trajanju 15-20 minuta, nakon čega je izložen UV zračenju kako bi se omogućila vizualizacija vrpca na gelu.

3.2.1.2. *Određivanje oštećenja DNA u stanicama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 komet testom (eng. comet assay ili single-cell gel electrophoresis, SCGE)*

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu je danas jedna od standardnih metoda za ispitivanje oštećenja DNA, koja je pronašla primjenu u genotoksikološkim testiranjima, biomonitoringu na ljudima, molekularnoj epidemiologiji i ekogenotoksikologiji, kao i u temeljnim istraživanjima oštećenja i popravka DNA. Metoda je vrlo jednostavna, osjetljiva i ekonomična te omogućuje brzo otkrivanje i mjerenje razine širokog raspona oštećenja DNA (Collins, 2004).

U ovoj metodi, pojedinačne stanice imobiliziraju se u agarozni niske točke tališta na mikroskopskom stakalcu (Beedanagari i sur., 2014) i liziraju se primjenom detergenata što rezultira uklanjanjem stanične membrane i većine staničnih proteina te oslobađanjem cjelokupne DNA u stanici (Tchounwou, 2013). Potom slijedi elektroforeza, gdje negativno nabijeni fragmenti DNA pod utjecajem električnog polja migriraju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi. Nakon završene elektroforeze DNA se boji fluorescentnom bojom i prati se pomoću fluorescentnog mikroskopa (Dmitrieva i Burg, 2007). Tijekom elektroforeze, manji fragmenti DNA (oštećena DNA) migriraju brže od većih, neoštećenih dijelova DNA koji sadrže nukleoidno tjelešce, nalik strukturi komete, pa otuda i naziv komet test. U strukturi komete, intaktna DNA se naziva "glava" kometa, a prateća, oštećena DNA "rep" kometa. Prema tome, veličina repa komete direktno je proporcionalna stupnju oštećenja DNA u pojedinačnoj stanici (Beedanagari i sur., 2014; Tchounwou, 2013).

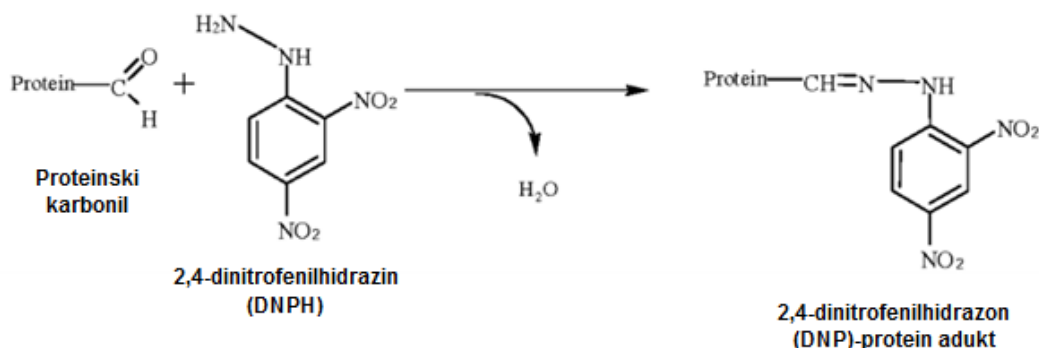
Za potrebe ovog eksperimenta, najprije se u plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm nacijepljuje po 5 mL stanične suspenzije Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 u početnoj koncentraciji od 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice se uzgajaju u inkubatoru 24 sata u uvjetima kontrolirane atmosfere (95 % zraka + 5 % CO_2) pri temperaturi od 37 °C. Potom se ukloni istrošeni hranjivi medij te se stanice tretiraju s po 3 mL ekstrakta dobričice u koncentracijama od 0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL^{-1} , koje su prethodno pripremljene u odgovarajućim medijima za uzgoj. Negativna kontrola sadrži samo 3 mL odgovarajućeg svježeg medija za uzgoj. Tretman stanica traje 2 i 24 h. Nakon tretmana, iz Petrijevih zdjelica uklanja se medij s ekstraktom, a stanice se ispiru s PBS puferom, tripsiniziraju i prebacuju u Eppendorf kivete. Stanice se potom centrifugiraju 5 min na 5000 rpm, pri čemu se supernatant odbacuje, a talog sa stanicama se koristi za daljnje provođenje eksperimenta.

S ciljem provedbe komet testa, prvotno je na brušena predmetna stakalca naneseo po 300 μL otopine 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (eng. *normal melting point*, NMP), koja je pripremljena kuhanjem u PBS puferu. Potom su na polimerizirani sloj NMP agaroze naneseo uzorci, koji su sadržavali 10 μL resuspendiranih stanica i 100 μL 0,5 %-tne agaroze niske točke tališta (eng. *low melting point*, LMP) pripremljene kuhanjem u demineraliziranoj vodi i temperirane na 37 °C. Nakon polimerizacije, stakalca su premazana još jednim slojem LMP agaroze od 100 μL . Kada je polimerizirao zadnji naneseo sloj agaroze, provedena je liza stanica u puferu za lizu na +4 °C preko noći. Stakalca su zatim prenesena u kadu za elektroforezu, koja je prethodno napunjena alkalnim puferom za elektroforezu. Elektroforeza je provedena pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V u trajanju od 20 minuta. Nakon provedene elektroforeze, u svrhu neutralizacije, stakalca su tri puta isprana s Tris-HCl puferom (pH = 7,5) u vremenskim razmacima od 5 minuta. Neposredno prije analize, ovako pripremljeni preparati bojani su otopinom etidij bromida (10 mg mL⁻¹) u vremenskom razdoblju od 10 minuta, nakon čega su isprani Tris-HCl puferom i ostavljeni 15 minuta u mračnim i hladnim uvjetima kako bi se boja stabilizirala. Mjerenja su provedena pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm, dok je za analizu slike korišten računalni program *Comet Assay II*. Na svakom preparatu izmjereno je po 50 kometa, a za potrebe ovog rada kao pokazatelji oštećenja DNA korišteni su parametri dužine i intenziteta repa te repni moment.

3.2.2. Određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma

Proteinska karbonilacija jedna je od najčešćih oksidativnih modifikacija proteina. Sadržaj proteinskih karbonila u biološkim uzorcima stoga se često koristi kao mjera za oksidacijska oštećenja i standardni je biomarker oksidativnog stresa (Luo i Wehr, 2009). Budući da karbonile nije moguće izravno detektirati i kvantificirati, jer ne apsorbiraju svjetlost u specifičnom dijelu UV/VIS spektra, njihova koncentracija određuje se pretežito neizravnim metodama uporabom raznih kemijskih proba. Vrlo često korištena metoda za određivanje proteinskih karbonila temelji se na reakciji derivatizacije karbonilne grupe proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu nastaje stabilni produkt 2,4-dinitrofenilhidrazon (DNP) (Slika 6.). Količina nastalog DNP-a može se odrediti spektrofotometrijski, jer dinitrofenilna grupa apsorbira svjetlost u karakterističnom dijelu UV/VIS spektra s maksimumom apsorpcije na 370 nm, pri čemu je apsorbanca (A_{370}) u

pozitivnoj korelaciji s ukupnim sadržajem proteinskih karbonila u uzorku (Celi i Gabai, 2015; Purdel i sur., 2014).



Slika 6. Reakcija 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s proteinskim karbonilom (preuzeto i prilagođeno prema Purdel i sur., 2014).

Za ispitivanje utjecaja ekstrakta dobričice na oksidaciju proteina korišten je modelni protein albumin iz govedeg seruma (BSA). Reakcijska smjesa sadržavala je 240 μL BSA (1 mg mL^{-1}), 60 μL otopine FeCl_3 , 60 μL askorbinske kiseline, 24 μL H_2O_2 (25 mM), odgovarajuće volumene ekstrakta dobričice s konačnim koncentracijama od 0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL^{-1} te demineraliziranu vodu do konačnog volumena od 600 μL . Negativna kontrola je umjesto ekstrakta sadržavala 125 μL Trolox-a (10 mg mL^{-1}), a pozitivna kontrola 125 μL metanola. Svi uzorci su pripremljeni u tri replike. Uzorci su potom inkubirani 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, dodano je 500 μL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) i smjesa je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. U inkubacijsku smjesu zatim je dodano 500 μL 10 %-tne trikloroetene kiseline (TCA) te je smjesa inkubirana 15 minuta na ledu kako bi se istaložili proteini. Uzorci su potom centrifugirani tri puta, pri čemu je supernatant odbačen, a talog je ispran s 1 mL etil-acetata da se ukloni višak neizreagiranog DNPH-a. Nakon ispiranja, uzorci su resuspendirani u 500 μL gvanidin-hidroklorida (6 M) i ostavljeni preko noći, nakon čega je izmjerena apsorbanacija na 370 nm. Stupanj oksidacije proteina u uzorcima izračunat je prema formuli [1]:

[1]

$$\% \text{ oksidacije} = \frac{A_{370}(\text{uzorak})}{A_{370}(\text{negativna kontrola})} \times 100$$

A_{370} – vrijednost apsorbanacije izmjerene na 370 nm

3.2.3. Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na bakterijskim kulturama

Ispitivane bakterijske kulture (navedene u poglavlju 3.1.3.1.) uzgojene su do eksponencijalne faze rasta u odgovarajućim tekućim hranjivim podlogama. Po 1 mL svake bakterijske kulture centrifugira se 10 minuta na 3000g. Supernatant se odbaci, a talog se ispere s 1 mL PBS pufera, resuspendira i ponovo centrifugira. Supernatant se ponovo odbaci, a dobiveni talog sa stanicama resuspendira se u 1 mL odgovarajuće tekuće hranjive podloge, te su tako priređene suspenzije prikladne za provođenje željenog eksperimenta. U mikrotitarsku ploču s 96 jažica nacijepljeno je po 100 μL odgovarajuće bakterijske suspenzije. Bakterijska suspenzija tretirana je s po 100 μL ekstrakta dobričice određene koncentracije, pri čemu je svaka koncentracija ispitana u tri paralele. Ukupni volumen reakcijske smjese u jažici iznosio je 200 μL , pa su konačne koncentracije ekstrakta bile 0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL^{-1} . Kontrola je bila bakterijska suspenzija tretirana s po 100 μL odgovarajuće tekuće hranjive podloge. Smjesa je potom inkubirana 40 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, rađena su mikrorazrjeđenja, tako da je iz svake jažice izuzeto 10 μL sadržaja jažice i pomiješano s 90 μL PBS pufera. Po 10 μL svakog razrjeđenja potom je nacijepljeno na odgovarajuće krute hranjive podloge i to u dvije paralele. Stanice su uzgajane 24 h na 37 °C nakon čega je izbrojan broj poraslih kolonija (eng. *CFU – Colony-Forming Unit*). Rezultati preživljenja bakterija nakon tretmana s različitim koncentracijama ekstrakta dobričice izračunati su prema formuli [2]:

[2]

$$\text{Preživljenje bakterija (\%)} = \frac{\text{CFU/mL bakterijske suspenzije}}{\text{CFU/mL kontrole}} \times 100$$

3.2.4. Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama Neutral red metodom

U ovom radu je za određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija ekstrakta dobričice na humanim staničnim linijama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 korištena Neutral red metoda. Neutral red metoda jedna je od najkorištenijih metoda za ispitivanje citotoksičnosti ksenobiotika s brojnim primjenama u biomedicini, kao i u zaštiti okoliša. Razvijena je u svrhu određivanja kemosenzitivnosti stanica na Rockfeller Sveučilištu, a temelji se na sposobnosti

metabolički aktivnih stanica da transportiraju i vežu Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) boju. Ova slaba kationska boja prodire kroz staničnu membranu neionskom pasivnom difuzijom i koncentrira se u lizosomima, gdje se veže elektrostatskim hidrofobnim vezama na anionske i/ili fosfatne grupe lizosomskog matriksa. Nakon bojanja Neutral red bojom slijedi ispiranje stanica. Inkorporirana boja se potom oslobađa iz stanica primjenom kisele otopine etanola, a količina ekstrahirane boje kvantificira se spektrofotometrijski na 540 nm. Budući da mrtve ili oštećene stanice ne mogu transportirati i vezati Neutral red boju, količina ekstrahirane boje proporcionalna je broju metabolički aktivnih stanica (Repetto i sur., 2008).

U mikrotitarske ploče s 96 jažica naciijepljeno je po 100 μL određene suspenzije stanica početne koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Nakon 24-satne kultivacije, uklonjen je istrošeni medij, a stanice su tretirane s po 100 μL otopina četiri različite koncentracije ekstrakta dobričice (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL^{-1}), prethodno pripremljenih u odgovarajućem hranjivom mediju. Svaka koncentracija je na svakoj korištenoj staničnoj liniji ispitana u tri paralele. U kontrolne jažice dodano je po 100 μL odgovarajućeg hranjivog medija, bez ekstrakta, što je u slučaju AGS stanica bio Ham's F-12, odnosno RPMI 1640 u slučaju ostalih korištenih staničnih linija. Tretman stanica trajao je 2 i 24 sata.

Nakon završetka tretmana uklonjen je istrošeni hranjivi medij s ekstraktom, te je u svaku jažicu dodano po 100 μL radne otopine Neutral red boje. Stanice su potom inkubirane 45 minuta na 37 °C, kako bi se boja transportirala u stanice i akumulirala u lizosomima. Boja je zatim uklonjena te su stanice isprane dva puta s po 100 μL PBS pufera kako bi se odstranio višak boje. Nakon ispiranja, u svaku jažicu je dodano po 100 μL otopine za odbojavanje, koja povlači boju iz stanica. Intenzitet obojenja izmjereno je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 540 nm, te je proporcionalan preživljenju stanica, koje se računa prema formuli [3]:

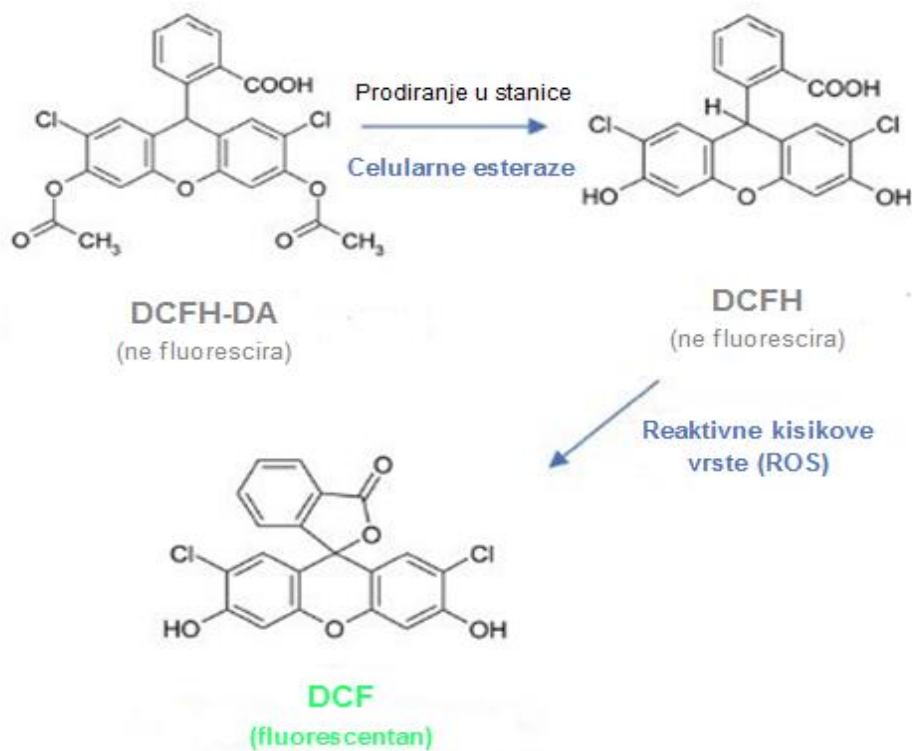
[3]

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540}(\text{ekstrakt})}{A_{540}(\text{kontrola})} \times 100$$

A_{540} – vrijednost apsorbancije izmjerene na 540 nm

3.2.5. Ispitivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama DCFH-DA metodom

Slobodne kisikove čestice nastaju kao produkti staničnog metabolizma, koji u visokoj koncentraciji imaju nepovoljan utjecaj na stanične signalne puteve te u konačnici mogu pridonijeti razvoju raznih patoloških stanja poput upala, tumora i neurodegenerativnih bolesti. Jedna od metoda koja se koristi za određivanje ukupnog sadržaja ROS-a u adherentnom tipu stanica je DCFH-DA metoda (Kim i Xue, 2020). 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) je nefluorescentna boja koja može difundirati kroz staničnu membranu te se unutar stanice hidrolizirati pomoću staničnih esteraza u polarnu, ali i dalje nefluorescentnu formu, 2',7'-diklorodihidrofluorescein (DCFH) i u toj formi se zadržava u stanici (Rajneesh i sur., 2017). U prisustvu unutarstaničnih ROS-a i drugih peroksida, DCFH se oksidira u izrazito fluorescentnu molekulu 2',7'-diklorofluorescein (DCF) (Slika 7.), čija se fluorescencija mjeri pomoću fluorimetra pri valnoj duljini od 485 nm za ekscitaciju, odnosno pri 530 nm za emisiju. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji ukupnih ROS-a u stanici (Kim i Xue, 2020; Rajneesh i sur., 2017).



Slika 7. Formiranje fluorescentnog spoja DCF pomoću ROS-a (preuzeto i prilagođeno prema BioQuoChem, 2020).

Za potrebe ovog rada da bi se ispitao antioksidacijski učinak različitih koncentracija ekstrakta dobričice, u crne mikrotitarske ploče s 96 jažica naciepljeno je po 100 μL određene suspenzije stanica početne koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su kultivirane 24 h u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO_2) i na temperaturi od 37 °C kako bi se adaptirale na novonastale uvjete. Nakon što su stanice formirale subkonfluentni monosloj, uklonjen je stari medij te su stanice tretirane s po 100 μL otopina četiri različite koncentracije ekstrakta dobričice (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL^{-1}), prethodno pripremljenih u odgovarajućem hranjivom mediju. Svaka koncentracija je na svakoj korištenoj staničnoj liniji ispitana u tri paralele. U kontrolne jažice dodano je po 100 μL odgovarajućeg hranjivog medija, bez ekstrakta, što je u slučaju AGS stanica bio Ham's F-12, odnosno RPMI 1640 u slučaju ostalih korištenih staničnih linija. Tretman stanica trajao je 2 i 24 h.

Nakon završetka tretmana uklonjen je istrošeni hranjivi medij s ekstraktom, a stanice su isprane s po 100 μL PBS pufera. U svaku jažicu je potom dodano po 100 μL radne otopine DCFH-DA, te su stanice inkubirane 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini emisije od 485 nm i valnoj duljini ekscitacije od 530 nm. Indukcija slobodnih radikala izračunata je prema formuli [4]:

[4]

$$\text{Indukcija slobodnih radikala} = \frac{\frac{\text{Intenzitet fluorescencije (ekstrakt)}}{\% \text{ preživljenja}}}{\frac{\text{Intenzitet fluorescencije (kontrola)}}{100}}$$

3.2.6. Ispitivanje utjecaja ekstrakta dobričice na promjenu adhezije bakterija za humane stanice

Korištene bakterijske kulture (navedene u poglavlju 3.1.3.1.) uzgojene su prekoonočno do eksponencijalne faze rasta u odgovarajućim tekućim hranjivim podlogama. Po 1 mL svake bakterijske kulture centrifugira se na 3000g 10 minuta. Supernatant se odbaci, a talog se ispere s 1 mL PBS pufera, resuspendira i ponovo centrifugira. Supernatant se ponovo odbaci, a dobiveni talog sa stanicama resuspendira se u 1 mL odgovarajućeg hranjivog medija (RPMI 1640 ili Ham's F-12), te su tako priređene suspenzije prikladne za provođenje željenog eksperimenta. U mikrotitarske ploče s 24 jažice naciepljeno je po 1 mL prethodno

pripremljenih suspenzija Cal27, AGS, odnosno Caco-2 stanica u početnoj koncentraciji od 10^5 stanica mL^{-1} . Navedene humane stanične linije uzgajane su u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO_2) i na temperaturi od 37 °C. Nakon formiranja subkonfluentnog monosloja, uklonjen je istrošeni hranjivi medij, te su stanice tretirane s 900 μL otopina ekstrakta dobričice u koncentracijama od 0,025 i 0,075 mg mL^{-1} , koje su prethodno pripremljene u odgovarajućim medijima za uzgoj. Kontrolne jažice sadržavale su 900 μL odgovarajućeg medija za uzgoj, bez ekstrakta. Tretman stanica trajao je 1,5 h, nakon čega su stanice tretirane s po 100 μL odgovarajuće bakterijske suspenzije 30 minuta na 37 °C. Nakon tretmana uklonjen je medij s ekstraktom i bakterijskom suspenzijom, a stanice su isprane pet puta s po 200 μL PBS pufera. U svaku jažicu je potom dodano po 100 μL 10 %-tne otopine SDS-a razrijeđene u PBS-u. Stanice su inkubirane 10 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, uzorci su dobro resuspendirani, te su rađena mikrorazrjeđenja. Po 10 μL svakog decimalnog razrjeđenja nacijejpljeno je na odgovarajuće krute hranjive podloge. Ploče su inkubirane 24 sata na 37 °C, nakon čega su prebrojane porasle kolonije. Postotak adhezije bakterija izražen je u odnosu na kontrolu koja nije bila tretirana s ekstraktom te je izračunat prema formuli [5]:

[5]

$$\% \text{ adhezije bakterija} = \frac{\frac{\text{CFU (tretirani uvjeti)}}{\text{mL suspenzije}}}{\frac{\text{CFU (kontrola)}}{\text{mL suspenzije}}} \times 100$$

3.2.7. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su korištenjem statističkog programa JASP 0.14.1.0, primjenom Classical ANOVA statističke analize sa Scheffe i Tukey *Post Hoc* testom usporedbe. Odabrana razina značajnosti (p-vrijednost) bila je 0,001, pri čemu se svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,001 smatra statistički značajnim. Osim toga, rezultati su prikazani grafički uporabom programa Microsoft Excel 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Biološki učinci aktivnih tvari iz ekstrakta dobričice ispitani su na modelnim makromolekulama (plazmid phiX174 RF1 DNA i protein albumin iz goveđeg seruma), bakterijama *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus* te kontinuiranim humanim staničnim linijama pločastog epitela karcinoma jezika, Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre, HepG2, adenokarcinoma epitela želuca, AGS, te adenokarcinoma epitela debelog crijeva, Caco-2. Raspon ispitivanih koncentracija odgovarao je očekivanom dnevnom unosu ekstrakta dobričice u organizam, pri čemu koncentracija od 0,025 mg mL⁻¹ odgovara preporučenoj dnevnoj dozi.

Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta dobričice na odabranim humanim staničnim linijama određen je Neutral red metodom, antioksidacijski učinak DCFH-DA metodom, a oštećenje genetičkog materijala komet testom (na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu). Stanice su izložene djelovanju ekstrakta u trajanju od 2 i 24 sata.

Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog djelovanja na bakterijske stanice provedeno je pripremom mikrorazrjeđenja tretirane bakterijske suspenzije, te brojanjem poraslih kolonija na podlozi nakon 24 sata uzgoja pri 37 °C.

Test adhezije proveden je inkubiranjem humanih staničnih linija Cal27, AGS i Caco-2 s ekstraktom 1,5 sat, a potom bakterijskim suspenzijama 30 minuta. Nakon tretmana priređena su mikrorazrjeđenja te je prebrojan broj poraslih kolonija nakon 24-satne inkubacije na 37 °C.

Genoprotektivni učinak na modelni plazmid određen je elektroforezom u agaroznom gelu, a stupanj oksidacije modelnog proteina DNPH metodom.

Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 8.-30.

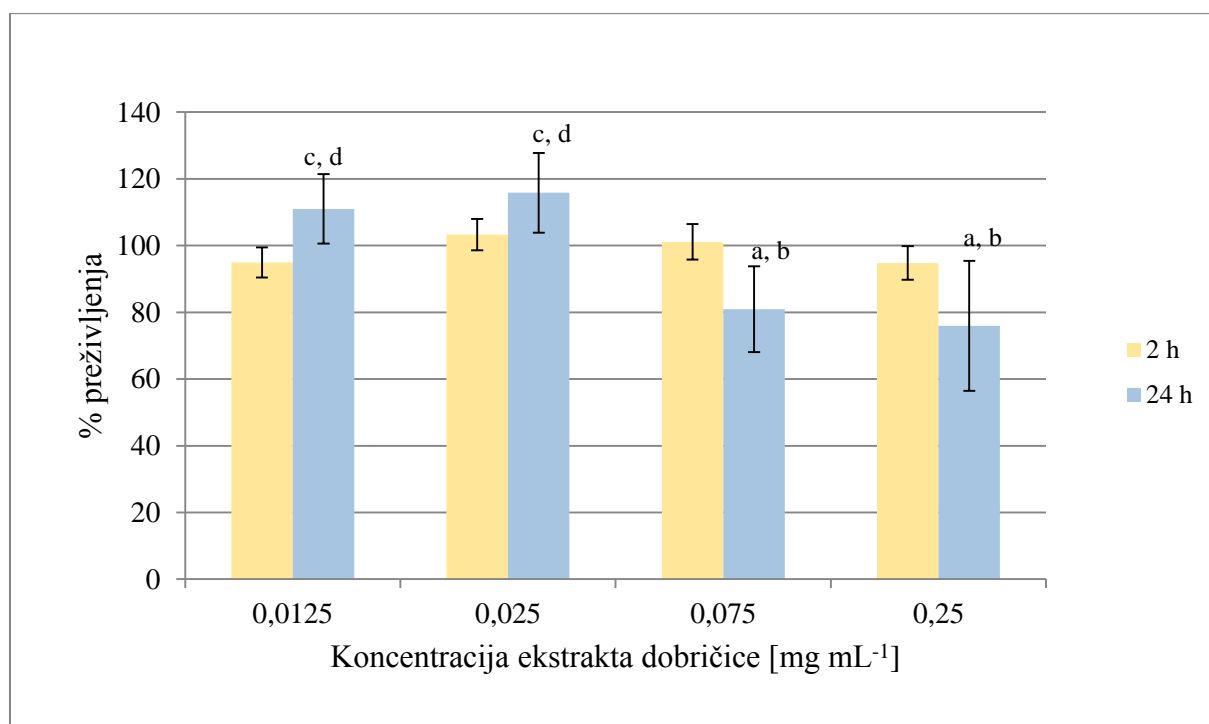
4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG UČINKA EKSTRAKTA DOBRIČICE

4.1.1. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina različitih koncentracija ekstrakta dobričice (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) provedeno je Neutral red metodom (opisanom u poglavlju 3.2.4.) na kontinuiranim humanim staničnim linijama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 u vremenu izloženosti stanica od 2 i 24 h.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost postotka preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izražena u odnosu na kontrolu) o koncentracijama ekstrakta dobričice.

Cal27

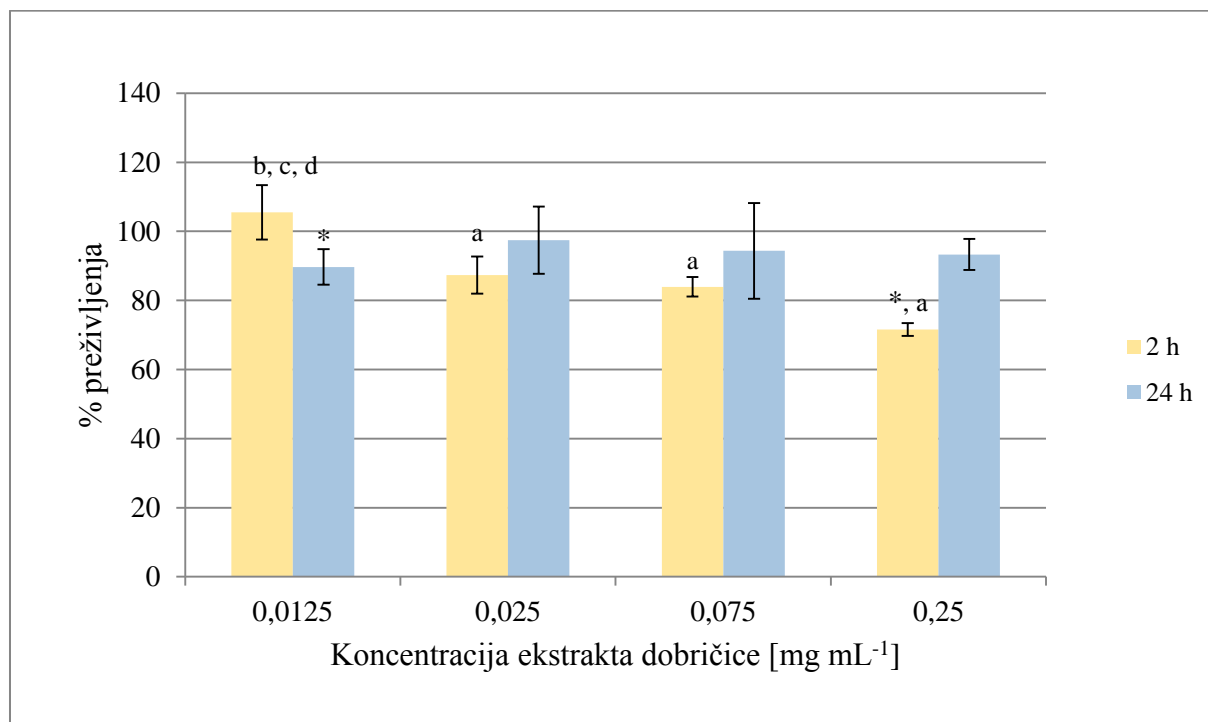


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 8. Preživljenje stanične linije Cal27 nakon 2 i 24 sata tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Iz grafičkog prikaza na Slici 8. vidljivo je da tijekom 2 sata tretmana Cal27 stanica, niti jedna od ispitivanih koncentracija ekstrakta dobričice ne djeluje citotoksično na Cal27 stanice. Međutim, tijekom 24 sata tretmana stanica Cal27 primjećuje se blagi proliferativni učinak pri nižim ispitivanim koncentracijama (0,0125 i 0,025 mg mL⁻¹), dok više ispitivane koncentracije (0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) inhibiraju rast Cal27 stanica.

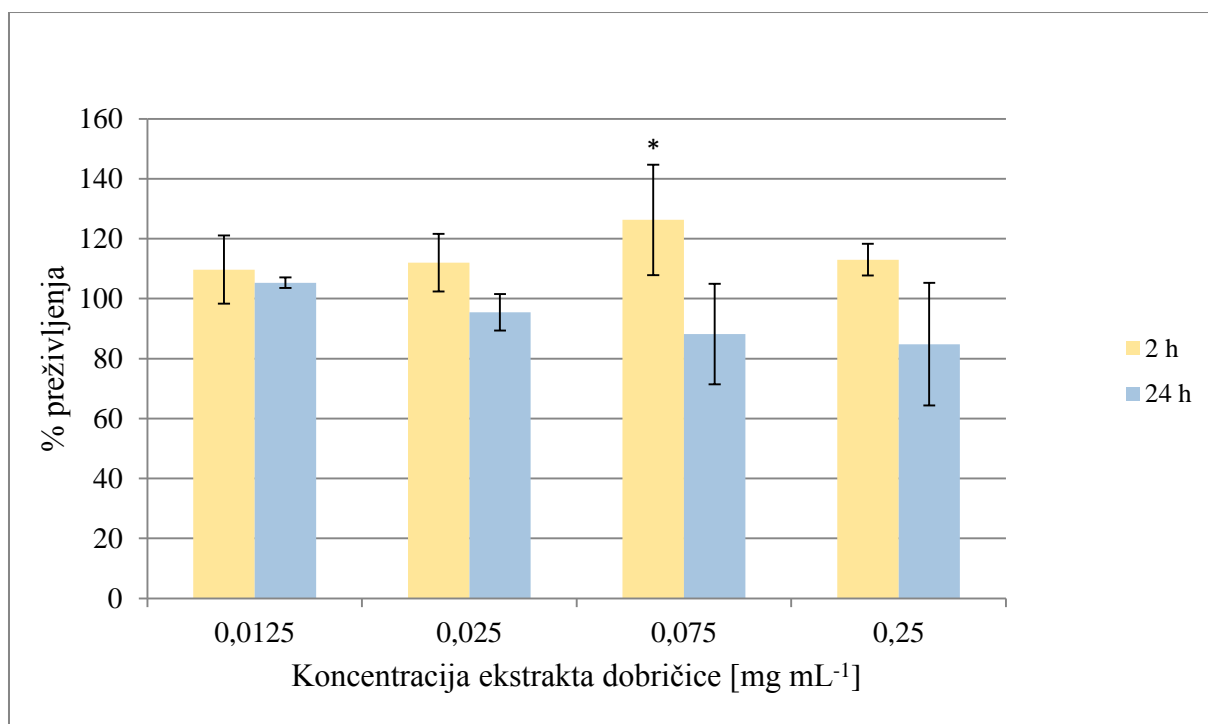
HepG2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 9. Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 2 i 24 sata tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

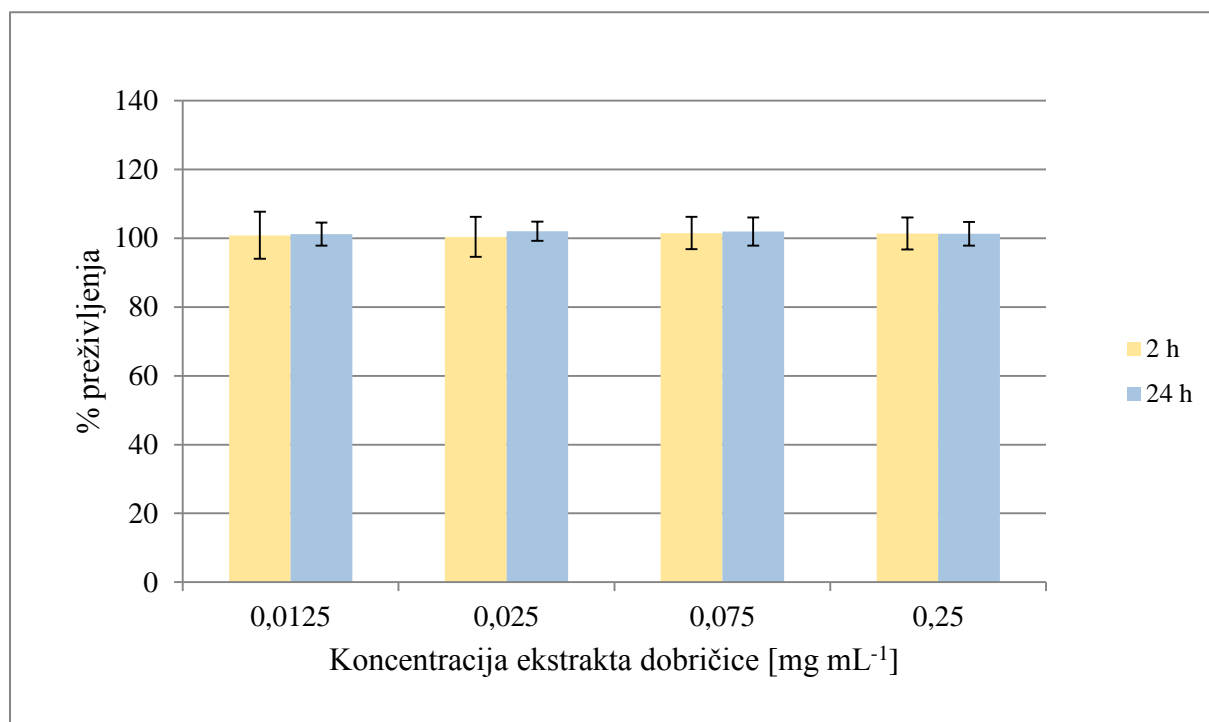
Tijekom 2 sata tretmana HepG2 stanica, vidljivo je kako se porastom koncentracije smanjuje vijabilnost stanica, pri čemu jedino najviša ispitivana koncentracija (0,25 mg mL⁻¹) statistički značajno smanjuje rast stanica. Produljenjem inkubacije HepG2 stanica na 24 sata samo pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji ekstrakta (0,0125 mg mL⁻¹) dolazi do značajnog pada preživljenja, a preostale koncentracije dovode do oporavka stanica, što se očituje u povećanju vijabilnosti u usporedbi s 2 sata tretmana.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 10. Preživljenje stanične linije AGS nakon 2 i 24 sata tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Iz rezultata prikazanih na Slici 10. vidljivo je da nakon 2 sata tretmana AGS stanica, ekstrakt dobričice djeluje blago proliferativno, pri čemu se statistički značajan porast preživljenja u odnosu na kontrolu primjećuje jedino pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹, dok se nakon 24 sata tretmana s porastom koncentracije smanjuje vijabilnost stanica.



Slika 11. Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon 2 i 24 sata tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Tijekom 2 i 24 sata tretmana Caco-2 stanica, ekstrakt u cijelom koncentracijskom rasponu ne utječe na preživljenje Caco-2 stanica.

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju (prikazani na Slikama 8., 9., 10. i 11.) upućuju kako citotoksični učinak ekstrakta dobričice prvenstveno ovisi o vrsti stanične linije, ali i o vremenu izloženosti.

Ekstrakt dobričice djeluje citotoksično na stanice epitela jezika Cal27 i stanice epitela želuca AGS pri višim koncentracijama (0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) nakon 24 sata tretmana, dok na preživljenje stanica epitela debelog crijeva Caco-2 nema učinka niti nakon produljene inkubacije. Citotoksični učinak ekstrakta dobričice mogao bi se dovesti u vezu s antiproliferativnim svojstvima ružmarinske kiseline, kao najzastupljenije komponente u ekstraktu. Prema istraživanju Luo i sur. (2020) ustanovljeno je da ružmarinska kiselina

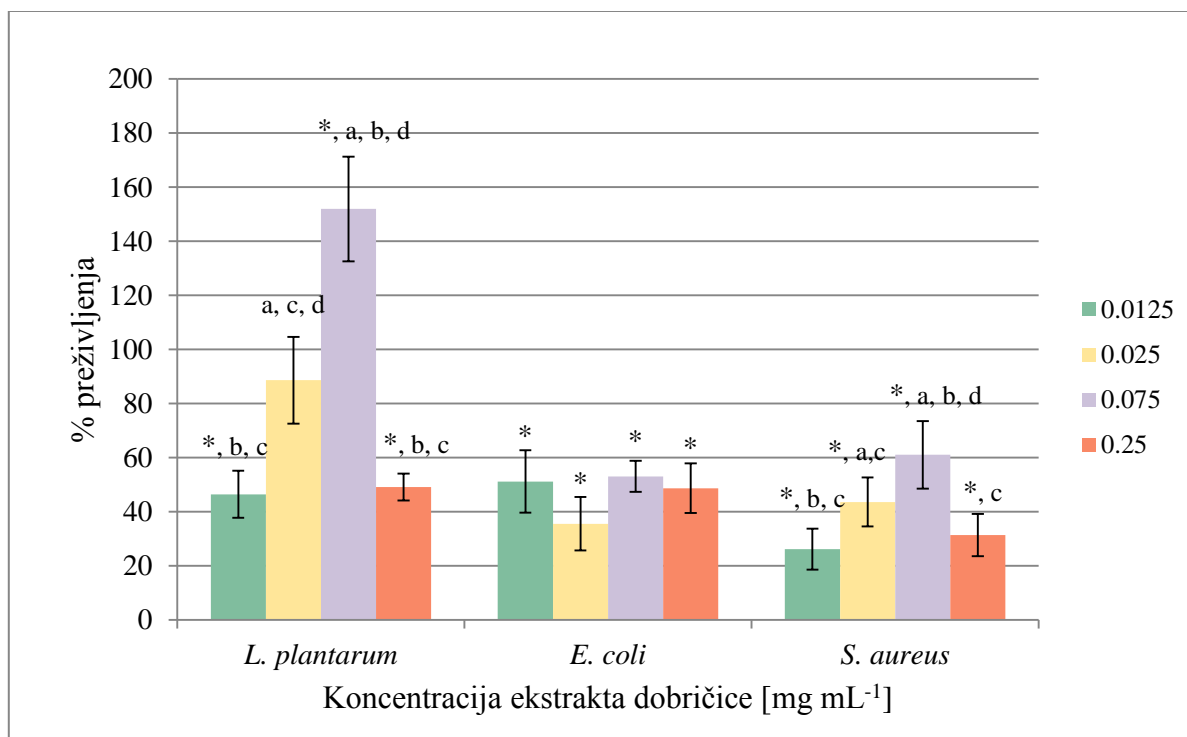
inhibira proliferaciju humane stanične linije karcinoma usne šupljine SCC-15 proporcionalno s porastom koncentracije (2,5 – 160 μM) nakon 24 sata tretmana. Mehanizam antikancerogenog djelovanja ružmarinske kiseline temelji se na indukciji apoptotičkih proteina, što posljedično dovodi do programirane smrti tumorskih stanica usne šupljine. S druge strane, Chou i sur. (2020) ispitivali su učinak ekstrakta dobričice i ružmarinske kiseline, na humanoj staničnoj liniji epitela proksimalnih tubula bubrega (HK-2) te humanoj tumorskoj staničnoj liniji bubrega (RCC 786-O). Rezultati njihove studije pokazali su kako vodeni ekstrakt dobričice i ružmarinska kiselina značajno smanjuju proliferaciju tumorske stanične linije RCC 786-O (<50 % preživljenja) tek pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno 200 μM , dok na HK-2 stanicama nije zabilježen toksični učinak tijekom 48 sati tretmana. Štoviše, u njihovoj studiji objavljeno je kako i vodeni ekstrakt dobričice i ružmarinska kiselina, u kombiniranom tretmanu s konvencionalnim kemoterapeutikom cisplatinom pojačavaju njegov antiproliferativni učinak prema tumorskim stanicama RCC 786-O, uz ublažavanje nuspojava prema normalnim stanicama HK-2. Međutim, ekstrakt dobričice korišten u prethodnom radu bio je pripremljen od cijele biljke, a ne samo od suhih listova, pa je zbog toga moguće da sadrži i druge bioaktivne tvari koje pridonose protektivnom učinku te dovode do inhibicije rasta stanica tek pri relativno visokim koncentracijama. Uspoređujući rezultate prijašnjih studija s rezultatima u ovom radu može se zaključiti da senzibilnost stanica na djelovanje ekstrakta ovisi upravo o vrsti stanica. Iako su sve korištene stanice epitela, ovisno o vrsti organa kojeg prekrivaju, imaju i različite specifične procese koji im omogućuju određenu razinu adaptacije na novonastale uvjete.

Nasuprot tome, tijekom kraćeg izlaganja od 2 sata stanice jetre HepG2 jedine su pokazale osjetljivost na djelovanje ekstrakta dobričice, pri čemu toksični učinak raste s porastom koncentracije. Međutim, produljenjem vremena inkubacije HepG2 stanica na 24 sata, dolazi do porasta vijabilnosti stanica neovisno o koncentraciji, u usporedbi s tretmanom 2 sata. Oporavak HepG2 stanica nakon 24 sata tretmana, može se povezati s prisustvom enzimskih sustava za detoksifikaciju ksenobiotika te visokim regeneracijskim kapacitetom stanica. Postoji mogućnost da su metaboliti koji nastaju razgradnjom ružmarinske kiseline manje toksični, poput kofeinske, ferulinske i *m*-kumarinske kiseline što posljedično dovodi do stimulacije staničnog rasta. Međutim, Chao i sur. (2021) objavili su u svom radu da 24 sata tretmana HepG2 stanica etil-acetatnom frakcijom ekstrakta dobričice dovodi do smanjenog rasta HepG2 stanica u ovisnosti o koncentraciji, pri čemu IC_{50} vrijednost iznosi 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mogući razlog razilaženja u rezultatima navedene studije s eksperimentima u ovom radu je

razlika u otapalu korištenom za ekstrakciju. Organska otapala ekstrahiraju više hidrofobnih komponenti iz biljaka u odnosu na vodu, koje su često odgovorne za antiproliferativno djelovanje. Na posljertku, važno je primijetiti da preporučena dnevna doza ekstrakta ($0,025 \text{ mg mL}^{-1}$) nije pokazala toksično djelovanje niti u jednoj korištenoj staničnoj liniji tijekom produljene ekspozicije.

4.1.2. Citotoksični/proliferativni učinak ekstrakta dobričice na bakterije *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus*

Nakon 40-minutnog tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice ($0,0125$, $0,025$, $0,075$ i $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$), bakterijske suspenzije su nacijepljene na odgovarajuće krute hranjive podloge. Porasle kolonije su izbrojane nakon 24 sata inkubacije na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a preživljenje bakterija je izraženo kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolu.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 12. Preživljenje bakterija *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus* nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Iz rezultata prikazanih na Slici 12. vidljivo je da ekstrakt koncentracije 0,0125 i 0,25 mg mL⁻¹, dovodi do statistički značajnog pada vijabilnosti bakterije *L. plantarum* u usporedbi s kontrolom, dok pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹ stimulira rast navedene bakterije. Preživljenje bakterija *E. coli* i *S. aureus* značajno je smanjeno pri svim ispitivanim koncentracijama u odnosu na kontrolu, iz čega proizlazi da ekstrakt pokazuje bakteriostatsko djelovanje prema oba patogena mikroorganizma.

Polifenolni spojevi općenito imaju dokazanu sposobnost moduliranja rasta mikroorganizama. Kod patogenih organizama navedeni spojevi prvenstveno dovode do narušavanja integriteta staničnih membrana i poremećaja u respiratornom lancu elektrona, što rezultira smanjenim ili potpunim izostankom rasta mikroorganizama te posljedično gubitkom virulencije. Autooksidirajući polifenoli također mogu djelovati i kao prooksidansi, pri čemu oksidacijom polifenola nastaje vodikov peroksid koji inducira nastajanje lomova u DNA te zbog toga ima baktericidno djelovanje (Piekarska-Radzic i Klewicka, 2020).

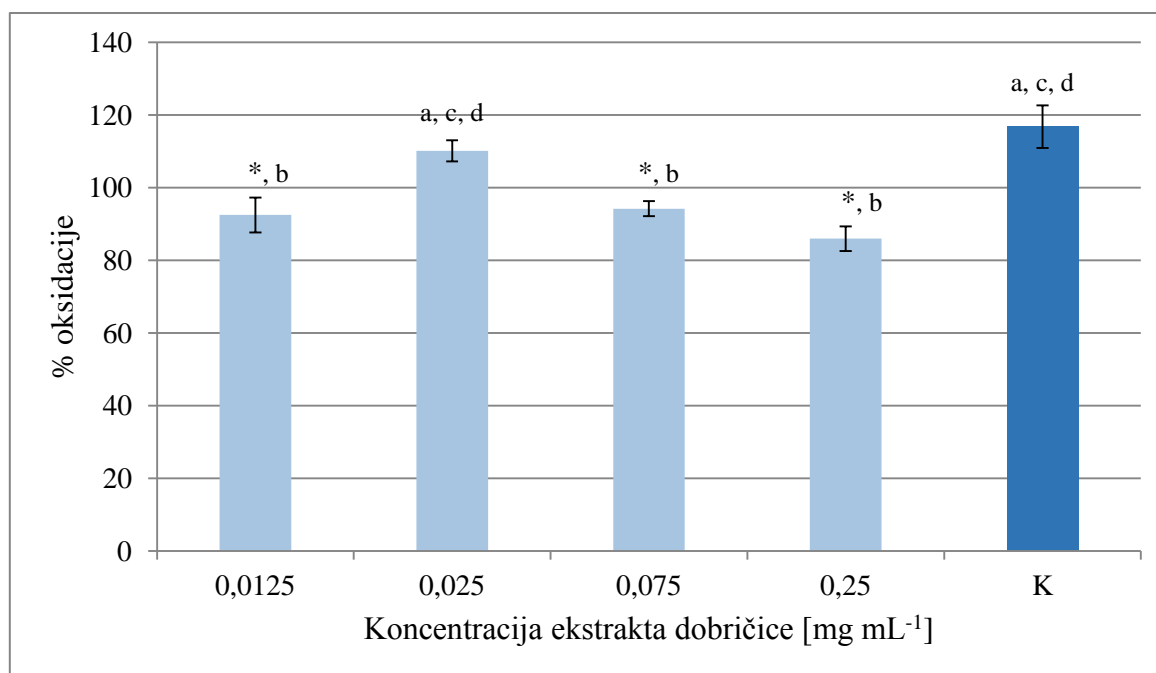
Citotoksični učinak ekstrakta dobričice prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus* (Slika 12.) može se dovesti u vezu s antimikrobnim svojstvima ružmarinske kiseline dokazanim u prethodnim studijama. Abedini i sur. (2013) navode da su ružmarinska kiselina i njezin ester metil ružmarinat glavne antimikrobne komponente hidrometanolnog ekstrakta biljke *Hyptis atrorubens* (Lamiaceae) koje dovode do inhibicije rasta 29 od ukupno 46 ispitanih mikrobnih vrsta, pri kojima je i *S. aureus*. Na temelju dostupnih podataka općenito je uočena veća otpornost Gram negativnih bakterija prema antimikrobnim spojevima u usporedbi s Gram pozitivnim bakterijama. Primjerice, ekstrakt ružmarina, koji obiluje ružmarinskom kiselinom ima snažan inhibicijski učinak na rast Gram pozitivnih bakterija, dok nije efektivan protiv Gram negativnih bakterija, uključujući *E. coli* i *S. typhimurium* (Alagawany i sur., 2017). Sličan trend pokazuju i drugi ekstrakti biljaka iz porodice Lamiaceae, poput ekstrakta timijana. S druge strane, ekstrakt kadulje osim što djeluje kao uspješan bakteriostatik prema Gram pozitivnim bakterijama, pokazuje inhibicijski učinak i prema Gram negativnim bakterijama *E. coli* i *S. infantis*, ali pri značajno višim dozama. Pretpostavlja se da je razlog tome prisutnost vanjske membrane koja obavlja staničnu stijenkku, i time pruža veću zaštitu Gram negativnim bakterijama (Generalčić-Mekinić i sur., 2014). Parametar koji također ima važnu ulogu u ispoljavanju antibakterijskog učinka biljnih ekstrakata, odnosno ružmarinske kiseline, je otapalo korišteno tijekom ekstrakcije aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Metanolni ekstrakt ružmarina koji sadrži 30 % karnosične kiseline, 16 % karnosola i 5 % ružmarinske kiseline djeluje kao učinkovitiji antimikrobni agens na širi spektar

mikroorganizama, u usporedbi s vodenim ekstraktom ružmarina koji sadrži 15 % ružmarinske kiseline (Alagawany i sur., 2017). Iz priloženih podataka može se zaključiti da se antimikrobni potencijal ružmarinske kiseline u biljnim ekstraktima pojačava u sinergiji s mehanizmima djelovanja drugih bioaktivnih spojeva, te varira ovisno o prisustvu drugih spojeva. S druge strane, stimulativni učinak ekstrakta dobričice pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹ na rast bakterije *L. plantarum* prikazan na Slici 12. može se povezati s dokazanom ulogom ružmarinske kiseline u poboljšanju funkcija crijevne mikrobiote (Alagawany i sur., 2013), jer probiotičke bakterije imaju sposobnost metaboliziranja polifenolnih spojeva. Stoga se na temelju prethodnih studija i rezultata dobivenih u ovom radu može zaključiti da biološki aktivni spojevi iz ekstrakta dobričice pokazuju dobar antimikrobni učinak prema patogenim bakterijama *E. coli* i *S. aureus*, zbog čega ekstrakt ima potencijal primjene kao prirodni konzervans u prehrambenoj industriji, dok je primjena kao prebiotičkog pripravka upitna radi suprotnog djelovanja pri jako malim razlikama u primijenjenim dozama, što u slučaju inhibitornog djelovanja na probiotičke bakterije može rezultirati narušavanjem humane mikroflore te posljedično dovesti do poremećaja probavnog trakta i imunološkog sustava.

4.2. PROOKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK EKSTRAKTA DOBRIČICE

4.2.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta dobričice na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma

Antioksidacijski kapacitet različitih koncentracija ekstrakta dobričice ispitan je na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma primjenom DNPH metode (opisane u poglavlju 3.2.2.). Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost postotka oksidacije proteina (u odnosu na negativnu kontrolu) o koncentraciji ekstrakta.



* - statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

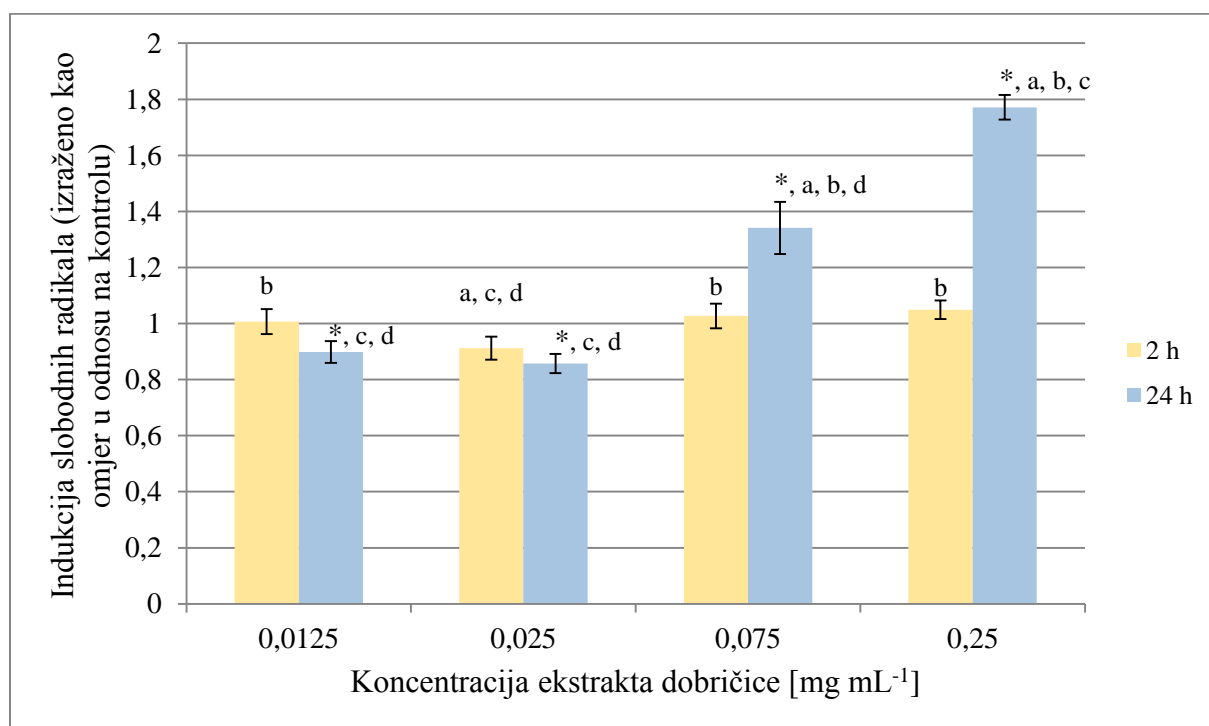
Slika 13. Učinak ekstrakta dobričice na oksidaciju proteina.

Ekstrakt dobričice u svim ispitivanim koncentracijama, izuzev koncentracije 0,025 mg mL⁻¹, uzrokuje statistički značajno smanjenje postotka oksidacije proteina u odnosu na pozitivnu kontrolu. Navedene koncentracije ekstrakta pokazuju blago antioksidacijsko djelovanje, što se očituje u smanjenju postotka oksidacije proteina u odnosu na negativnu kontrolu, dok je blagi prooksidacijski učinak ekstrakta uočen pri koncentraciji koja odgovara preporučenoj dnevnoj dozi (0,025 mg mL⁻¹). Ekstrakt pokazuje dozni odgovor, pri čemu se postotak oksidacije proteina smanjuje porastom koncentracije ekstrakta. U prilog tome idu i rezultati nedavne studije Ou i sur. (2017), koji navode da ružmarinska kiselina na modelu BSA proteina također inhibira nastajanje proteinskih karbonila, pri čemu s porastom koncentracije (6,25 – 400 µg mL⁻¹) raste i inhibicijsko djelovanje. Štoviše, protektivna uloga ružmarinske kiseline od oksidacijskih oštećenja proteina dokazana je i *in vivo* eksperimentima. Farr i sur. (2016) pokazali su da ružmarinska kiselina (1,6, 16 i 32 mg/kg) u miševima srednje dobi dovodi do redukcije proteinskih karbonila u hipokampusu, kao i do korisnih učinaka koji poboljšavaju učenje i pamćenje.

4.2.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

Ispitivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta dobričice različitih koncentracija ($0,0125 - 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) provedeno je DCFH-DA metodom (opisanom u poglavlju 3.2.5.) na kontinuiranim humanim staničnim linijama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 u vremenu izloženosti stanica od 2 i 24 sata. Indukcija slobodnih radikala izračunata je kao omjer vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerenih nakon tretmana i preživljenja stanica određenog Neutral red metodom, u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost indukcije slobodnih radikala o koncentracijama ekstrakta dobričice.

Cal27

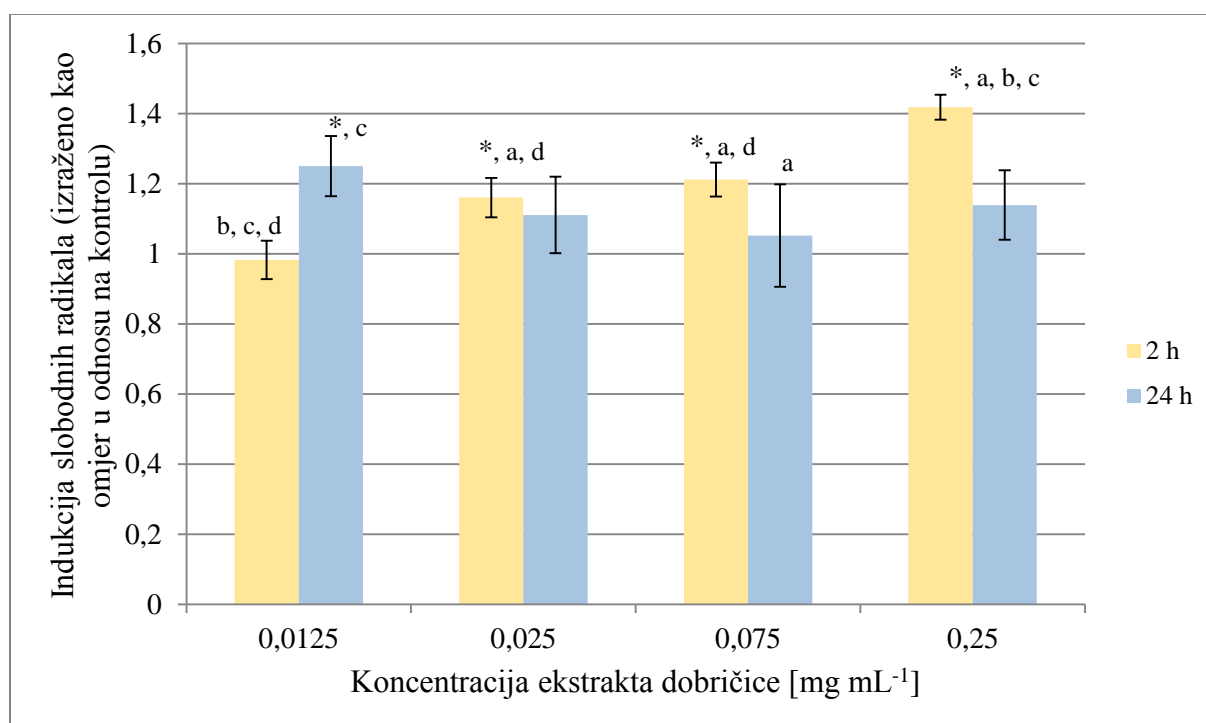


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 14. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Cal27 nakon tretmana 2 i 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Nakon 2 sata tretmana Cal27 stanica ne dolazi do indukcije slobodnih radikala, dok ekstrakt koncentracije $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ pokazuje blago antioksidativno djelovanje. Produljenjem tretmana Cal27 stanica na 24 sata, pri nižim ispitivanim koncentracijama ekstrakta ($0,0125$ i $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$) dolazi do indukcije antioksidacijskih sustava, dok kod viših koncentracija ($0,075$ i $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) ekstrakt djeluje kao prooksidans. Ekstrakt pokazuje dozni odgovor nakon 24 sata tretmana Cal27 stanica, pri čemu porastom koncentracije ekstrakta raste i količina slobodnih radikala.

HepG2



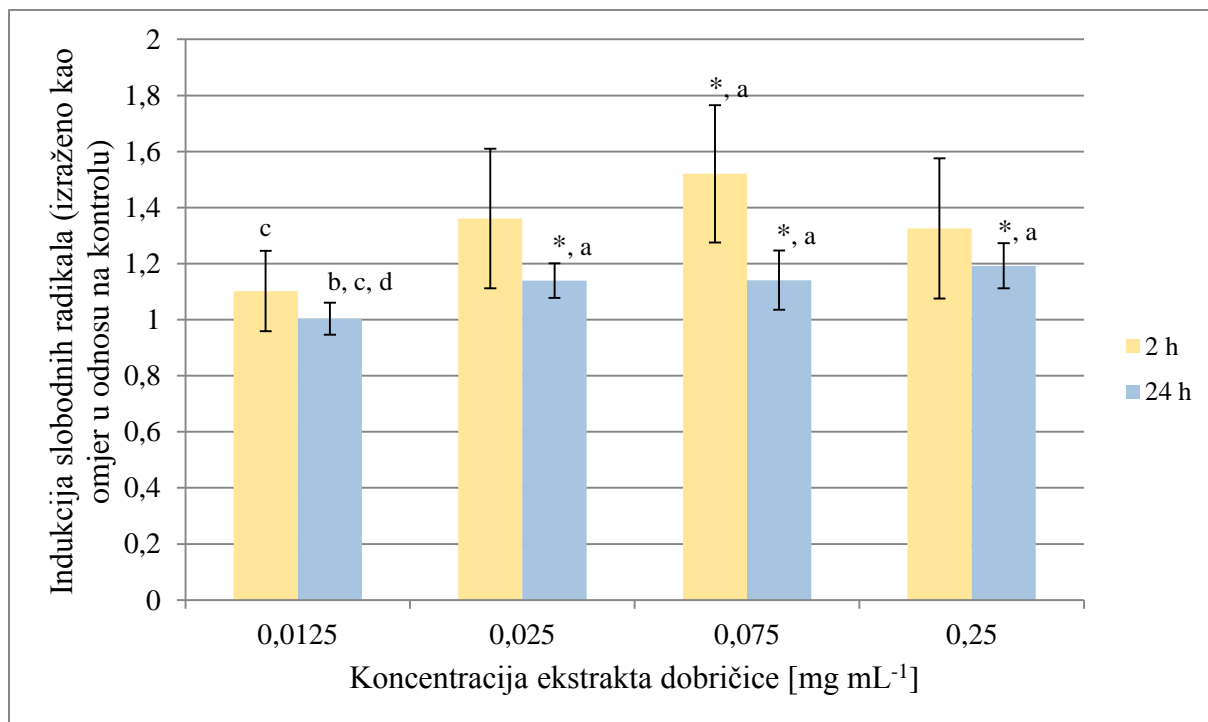
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 15. Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana 2 i 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Tijekom 2 sata tretmana HepG2 stanica s povećanjem koncentracije ekstrakta povećava se i prooksidativno djelovanje, dok nakon 24 sata tretmana HepG2 ne dolazi do

nastajanja slobodnih radikala, izuzev najniže ispitivane koncentracije ($0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$) koja pokazuje statistički značajan prooksidativni učinak u odnosu na kontrolu.

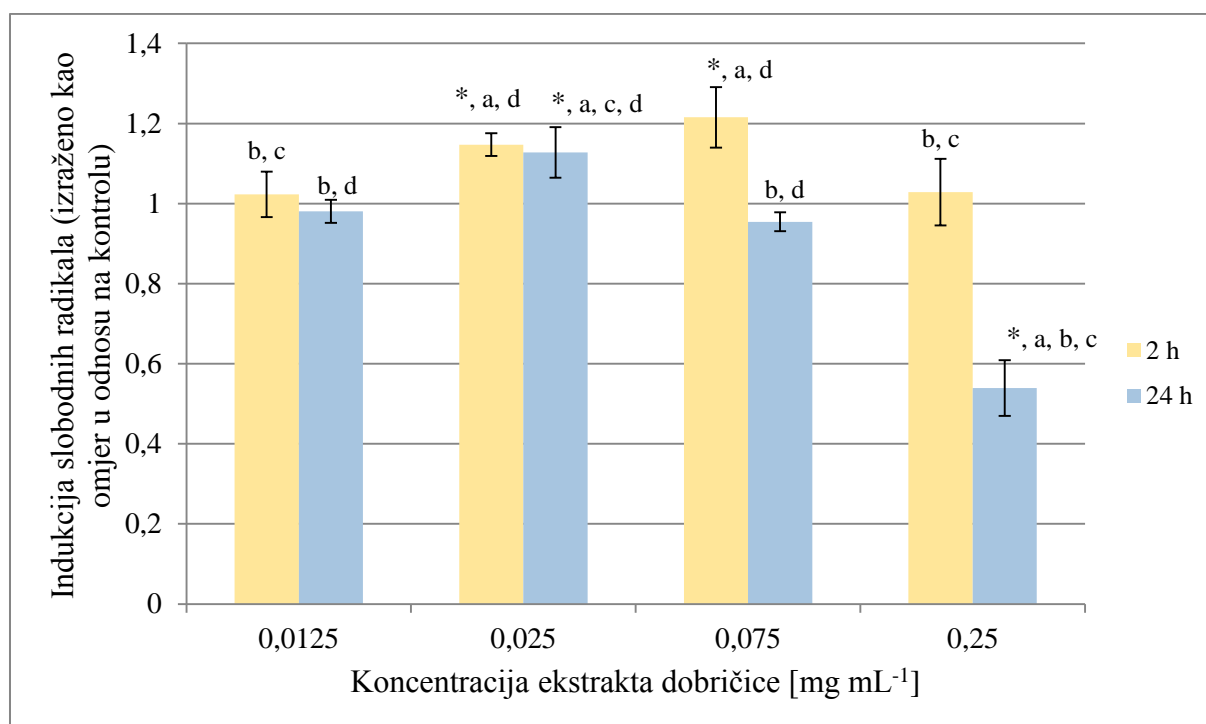
AGS



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 16. Indukcija slobodnih radikala stanične linije AGS nakon tretmana 2 i 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Nakon 2 i 24 sata tretmana AGS stanica s porastom koncentracije ekstrakta raste i prooksidacijsko djelovanje. Ekstrakt pokazuje dozni odgovor tijekom oba vremena tretmana AGS stanica. Međutim, produljenjem inkubacije AGS stanica na 24 sata, indukcija slobodnih radikala je značajno niža pri svim ispitivanim koncentracijama u usporedbi s 2 sata tretmana, iz čega proizlazi da tijekom dulje izloženosti ekstraktu dolazi do aktivacije antioksidacijskih sustava u AGS stanicama.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 17. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana 2 i 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta dobričice.

Na Slici 17. vidljivo je da nakon 2 sata tretmana Caco-2 stanica dolazi do indukcije slobodnih radikala pri koncentracijama ekstrakta 0,025 i 0,075 mg mL⁻¹, dok se nakon 24 sata tretmana Caco-2 stanica porastom koncentracije ekstrakta smanjuje prooksidativni učinak, pri čemu najviša ispitivana koncentracija (0,25 mg mL⁻¹) pokazuje snažno antioksidacijsko djelovanje.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da kao i kod određivanja citotoksičnog učinka, antioksidacijski potencijal ekstrakta dobričice razlikuje se ovisno o vrsti stanica. Produljenim izlaganjem HepG2, AGS i Caco-2 stanica ekstraktu od 24 sata smanjuje se prooksidacijski učinak ekstrakta u usporedbi s kraćim tretmanom, dok kod Cal27 stanica raste pri višim koncentracijama od preporučene dnevne doze. Najjače antioksidativno

djelovanje ekstrakt pokazuje pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) tijekom 24 sata tretmana Caco-2 stanica, dok ista koncentracija ekstrakta pri produljenom djelovanju u Cal27 stanicama značajno stimulira proizvodnju slobodnih radikala. Nastajanje slobodnih radikala u direktnoj je vezi sa smanjenjem vijabilnosti stanica Cal27 i HepG2, dok kod AGS i Caco-2 stanica ta ovisnost nije utvrđena.

Prekomjerna proizvodnja ROS-a u stanicama dovodi do promjena redoks potencijala, što može rezultirati oksidativnim oštećenjima staničnih makromolekula. S obzirom da je oksidativni stres povezan s rakom i drugim kroničnim stanjima, znanstvena istraživanja su uglavnom fokusirana na antioksidativna svojstva biljnih polifenola. Međutim, ovi snažni antioksidansi mogu imati i prooksidativni karakter, koji uvelike ovisi o pH, prisustvu prijelaznih metala, kelirajućoj sposobnosti te topljivosti. Nestabilnost polifenola u alkalnom mediju, rezultira njihovom autooksidacijom i povećanom proizvodnjom ROS-a (Babich i sur., 2011).

Važnu ulogu u održavanju staničnog redoks statusa ima tripeptid glutation (GSH), koji u stanici postoji u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku. Održavanje dostatne razine GSH u stanici ključan je faktor za suzbijanje oksidativnog stresa, što podrazumijeva transaktivaciju gena koji kodiraju enzime za sintezu GSH, uključenog u fazu II detoksifikacijskog sustava. Polifenoli s antioksidacijskim svojstvima sudjeluju u regulaciji ekspresije gena koji kodiraju za proteine uključene u metabolizam glutationa, uključujući i enzim γ -glutamil cistein sintetazu. Iako točan mehanizam nije razjašnjen, smatra se da prooksidirajući karakter polifenola, odnosno ROS nastali njihovom autooksidacijom, posljedično smanjuju razinu GSH, što je signal stanici za aktivaciju transkripcije gena koji kodiraju za γ -glutamil cistein sintetazu. Zapravo, polifenoli pri nižim koncentracijama proizvode niže razine egzogenog ROS-a uzrokujući blagi oksidativni stres, što je signal stanici za sintezu GSH i povećanu aktivnost antioksidacijskih mehanizama kako se ne bi poremetila stanična homeostaza (Babich i sur., 2011). Uspoređujući navedene tvrdnje s rezultatima u ovom radu za Caco-2 stanice može se zaključiti da je povišena razina ROS-a, nastala autooksidacijom polifenolnih spojeva iz ekstrakta dobričice, inducirala blagi oksidativni stres u stanicama, koji je posljedično rezultirao aktivacijom antioksidacijskih sustava, što se očituje u smanjenju razine ROS-a nakon 24 sata tretmana proporcionalno s porastom koncentracije ekstrakta. Štoviše, ekstrakt najviše ispitivane koncentracije pokazuje snažno antioksidativno djelovanje nakon 24 sata tretmana. Osim toga, vijabilnost Caco-2 stanica nije se promijenila tijekom 24 sata tretmana, što potvrđuje ove tvrdnje da ROS nisu

uzrokovali oštećenja staničnih komponenti, već su indukcijom oksidativnog stresa potaknuli antioksidacijski obrambeni sustav.

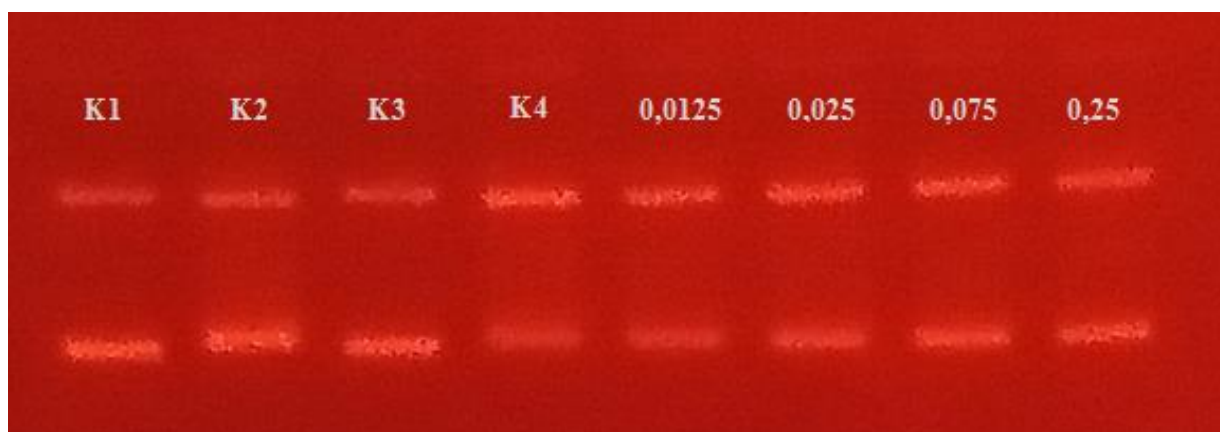
Kod HepG2 i Cal27 stanica nastajanje slobodnih radikala u direktnoj je vezi s preživljenjem stanica, iz čega proizlazi da ROS nastali autooksidacijom aktivnih spojeva iz ekstrakta dobričice igraju važnu ulogu u oštećenju staničnih makromolekula i induciranju stanične smrti, odnosno da su odgovorni za citotoksični učinak ekstrakta. S druge strane, kod AGS stanica indukcija slobodnih radikala ovisna je o koncentraciji ekstrakta, pri čemu se porastom koncentracije ekstrakta povećava i nastajanje slobodnih radikala. Međutim, razina slobodnih radikala je manja tijekom 24 sata inkubacije nego nakon 2 sata. Iz toga proizlazi da slobodni radikali induciraju antioksidacijske mehanizme stanice, ali je taj kapacitet oslabljen s porastom koncentracije ekstrakta što se reflektira na preživljenje stanica AGS nakon produljenog tretmana, odnosno prooksidacijski karakter ekstrakta dobričice raste s porastom koncentracije. Dobiveni rezultat može se objasniti na način da tumorske stanice imaju povišenu koncentraciju ROS-a u odnosu na normalne, ali su osjetljivije na remećenje redoks ravnoteže, što može aktivirati različite signale puteve koji dovode do stanične smrti (Reczek i Chandel, 2017).

Postoji mali broj *in vivo* studija koje dokazuju prooksidativni učinak polifenola. Naprotiv, antioksidacijsko djelovanje ekstrakta dobričice dokazano je u *in vivo* istraživanjima. Tijekom ispitivanja akutne i subakutne toksičnosti oralne primjene ekstrakta dobričice na štakorima, Chung i sur. (2020) ustanovili su da ekstrakt uzrokuje povećanu aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u srčanom, ali ne i u moždanom tkivu te tkivu jetre štakora, dok se aktivnost drugih antioksidacijskih enzima (katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx)) nije značajno promijenila u odnosu na kontrolnu skupinu. Uzimajući u obzir rezultate prethodne studije, vidljivo je da aktivnost antioksidacijskih mehanizama prvenstveno ovisi o vrsti tkiva, što objašnjava varijacije u nastajanju slobodnih radikala između staničnih linija tijekom 24-satnog izlaganja.

4.3. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKTA DOBRIČICE NA MODELNOJ DNA I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU

4.3.1. Antioksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA

Ispitivanje potencijalnog genoprotektivnog učinka ekstrakta dobričice u rasponu koncentracija 0,0125 – 0,25 mg mL⁻¹ provedeno je na plazmidu phiX174 RF1 DNA. Osim djelovanju ekstrakta, plazmid je bio izložen i djelovanju hidroksilnih radikala koji su nastali djelovanjem UV zračenja na H₂O₂. Nakon tretmana provedena je agarozna elektroforeza te su dobivene vrpce vizualizirane bojanjem gela u otopini etidij bromida (Slika 18.). Ukoliko nastupi oštećenje DNA, plazmid mijenja konformaciju iz superzavijene forme u relaksiranu, zbog čega posljedično putuje sporije u gelu.



K1 – negativna kontrola; K2 – kontrola s UV zračenjem; K3 – kontrola s H₂O₂; K4 – pozitivna kontrola; 0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 – koncentracije ekstrakta izražene u mg mL⁻¹ kojima je tretiran plazmid phiX174 RF1 DNA

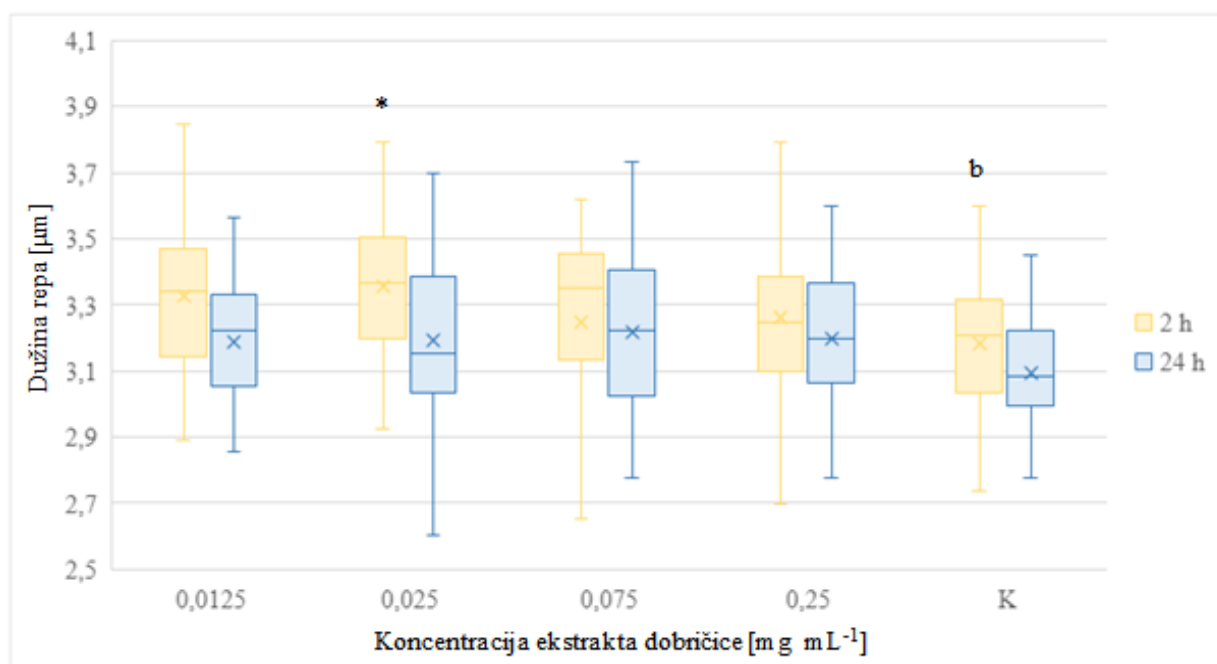
Slika 18. Protektivni učinak ekstrakta dobričice na plazmid phiX174 RF1 DNA.

Iz rezultata prikazanih na Slici 18. vidljivo je da se u kontrolama K1, K2 i K3 glavina plazmida nalazi u superzavijenoj konformaciji, što se očituje u značajno jačem intenzitetu vrpce superzavijenog plazmida u usporedbi s relaksiranim. Nasuprot tome, u pozitivnoj kontroli K4 zastupljenija je relaksirana forma plazmida, jer daje jači signal u odnosu na superzavijenu konformaciju. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da izloženost plazmida samo UV zračenju ili samo H₂O₂ ne dovodi do značajnih oštećenja DNA, za razliku od sinergističkog djelovanja ova dva agensa što rezultira puno jačim signalom relaksirane forme. Svi uzorci tretirani ekstraktom dobričice sadrže više superzavijene DNA u odnosu na

pozitivnu kontrolu, iz čega proizlazi da aktivni spojevi prisutni u ekstraktu dobričice u određenoj mjeri imaju protektivni učinak prema oštećenjima genetičkog materijala. Usporedbom djelovanja različitih koncentracija ekstrakta na modelnu DNA, može se primijetiti kako se porastom koncentracije povećava i genoprotektivni učinak ekstrakta.

4.3.2. Određivanje stupnja oštećenja DNA uzrokovanih ekstraktom dobričice u kontinuiranim humanim staničnim linijama

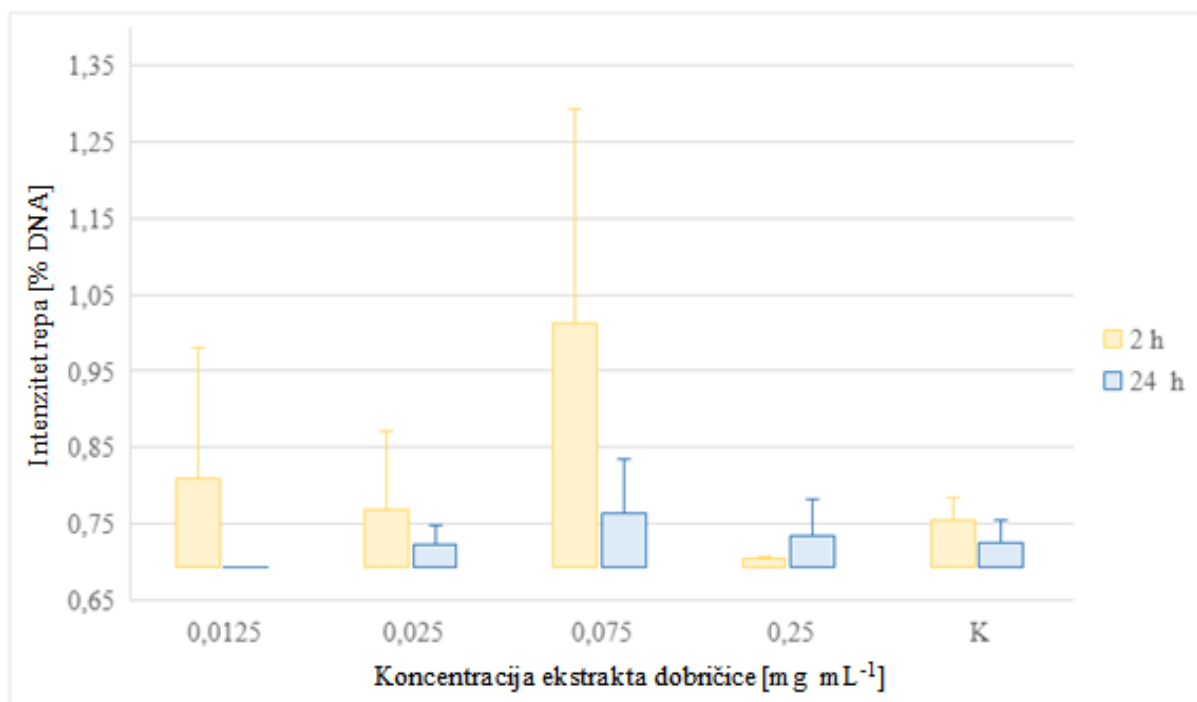
Ispitivanje učinka različitih koncentracija ekstrakta dobričice ($0,0125 - 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) na DNA provedeno je komet testom (opisanim u poglavlju 3.2.1.2.) na kontinuiranim humanim staničnim linijama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 u vremenu izloženosti stanica od 2 i 24 sata. Mjerenja su provedena primjenom programa za analizu slike *Comet Assay II*, pri čemu su kao parametri za procjenu oštećenja korišteni: dužina repa, intenzitet repa (% DNA u repu) i repni moment (umnožak dužine repa i intenziteta repa). U svrhu lakše obrade dobivenih rezultata, podaci su normalizirani prirodnim logaritmom. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta o koncentraciji ekstrakta dobričice.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

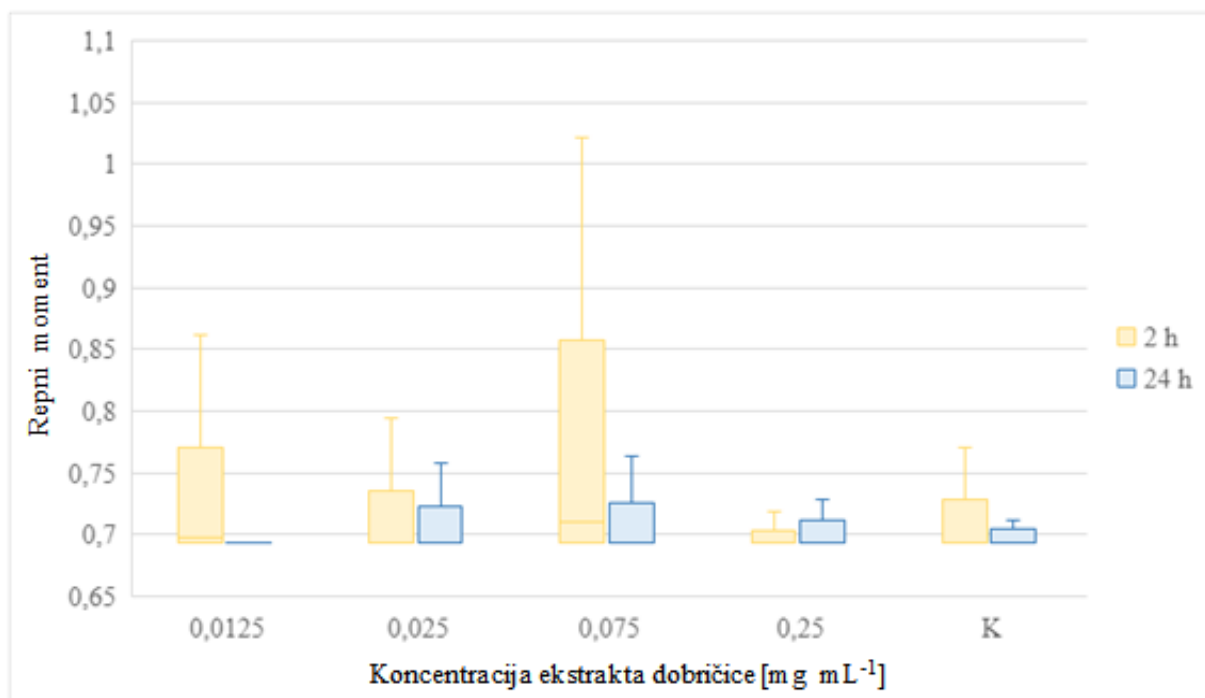
Slika 19. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu dužine repa u Cal27 stanicama.

Iz rezultata prikazanih na Slici 19. vidljivo je da nakon 2 sata tretmana Cal27 stanica jedino koncentracija ekstrakta koja odgovara dnevnom preporučenom unosu (0,025 mg mL⁻¹) izaziva značajno povećanje dužine repa u odnosu na kontrolu, dok se tijekom produljenog tretmana 24 sata stanica Cal27, dužina repa ne mijenja značajno u cijelom koncentracijskom rasponu.



Slika 20. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu intenziteta repa u Cal27 stanicama.

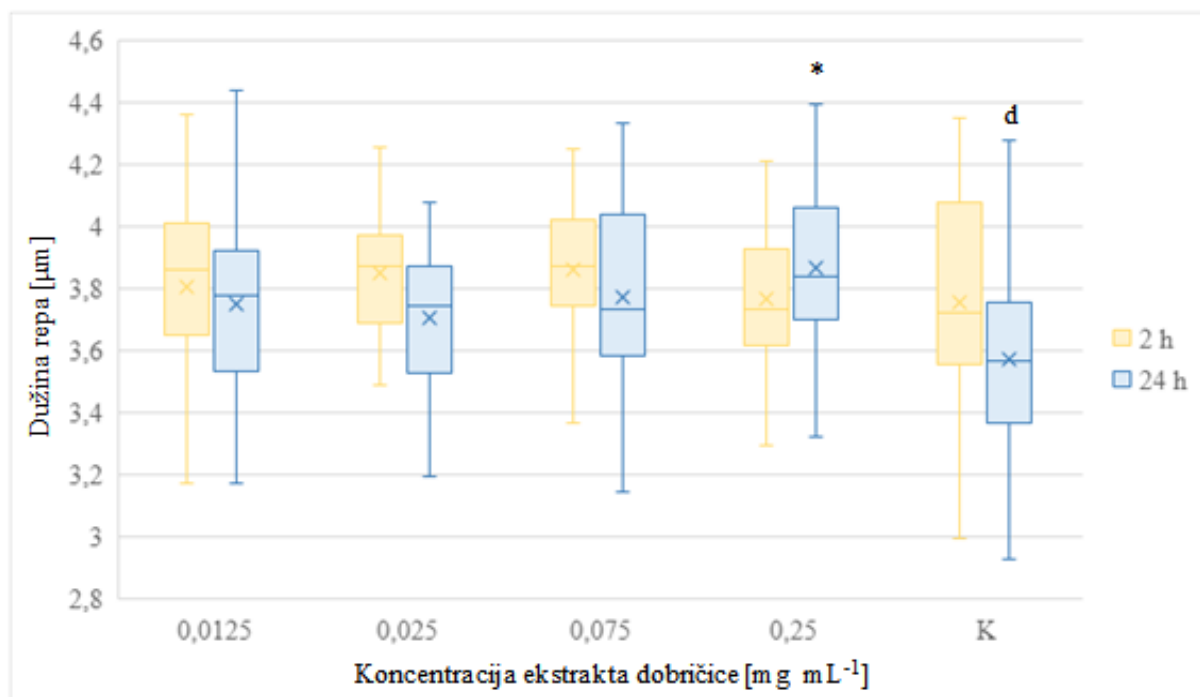
Na temelju vrijednosti intenziteta repa prikazanih na Slici 20. vidljivo je da nakon 2 i 24 sata tretmana Cal27 stanica nema značajnih promjena u % DNA u odnosu na negativnu kontrolu. Blago povećanje postotka DNA, koje nije značajno, može se primijetiti jedino pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹ nakon 2 sata tretmana Cal27 stanica, ali nakon 24 sata tretmana intenzitet repa u navedenom uzorku se podosta smanjuje.



Slika 21. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu repnog momenta u Cal27 stanicama.

Rezultati prikazani na Slici 21. prikazuju kako nakon 2 i 24 sata tretmana stanica Cal27 ne dolazi do značajne promjene repnog momenta u cijelom koncentracijskom rasponu. Blago oštećenje genetičkog materijala u odnosu na druge ispitivane uzorke i negativnu kontrolu primjećuje se jedino pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹ nakon 2 sata tretmana Cal27 stanica, koje se smanjuje s produljenjem vremena inkubacije.

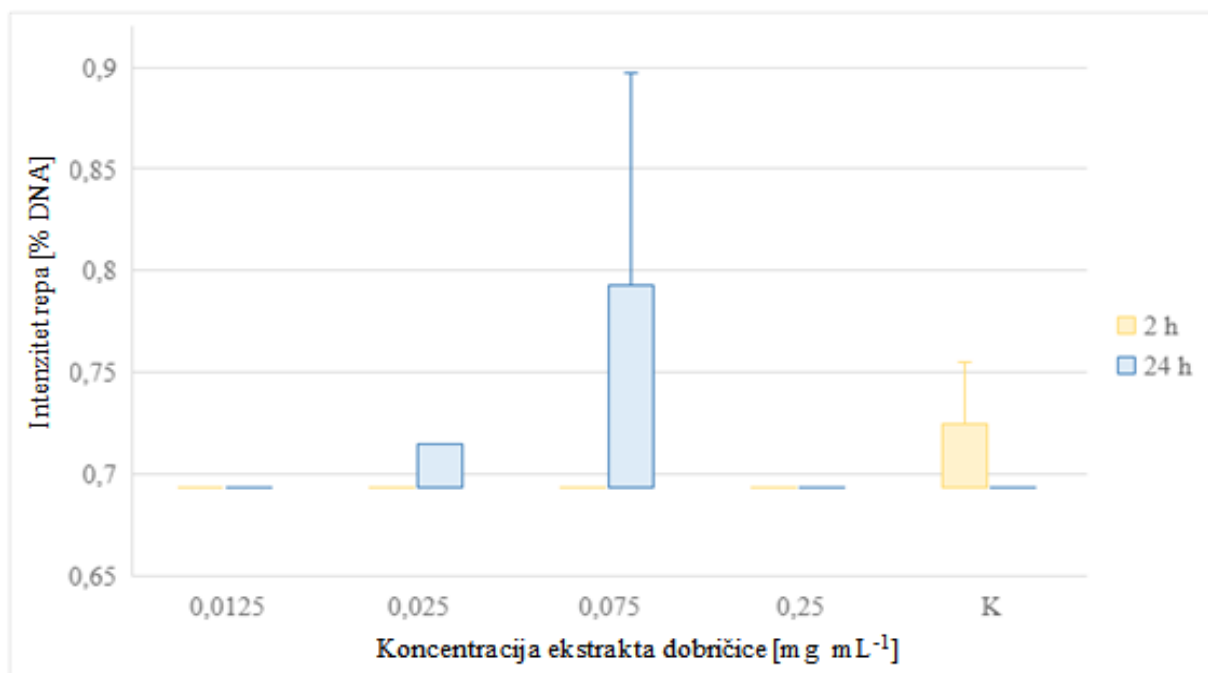
HepG2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

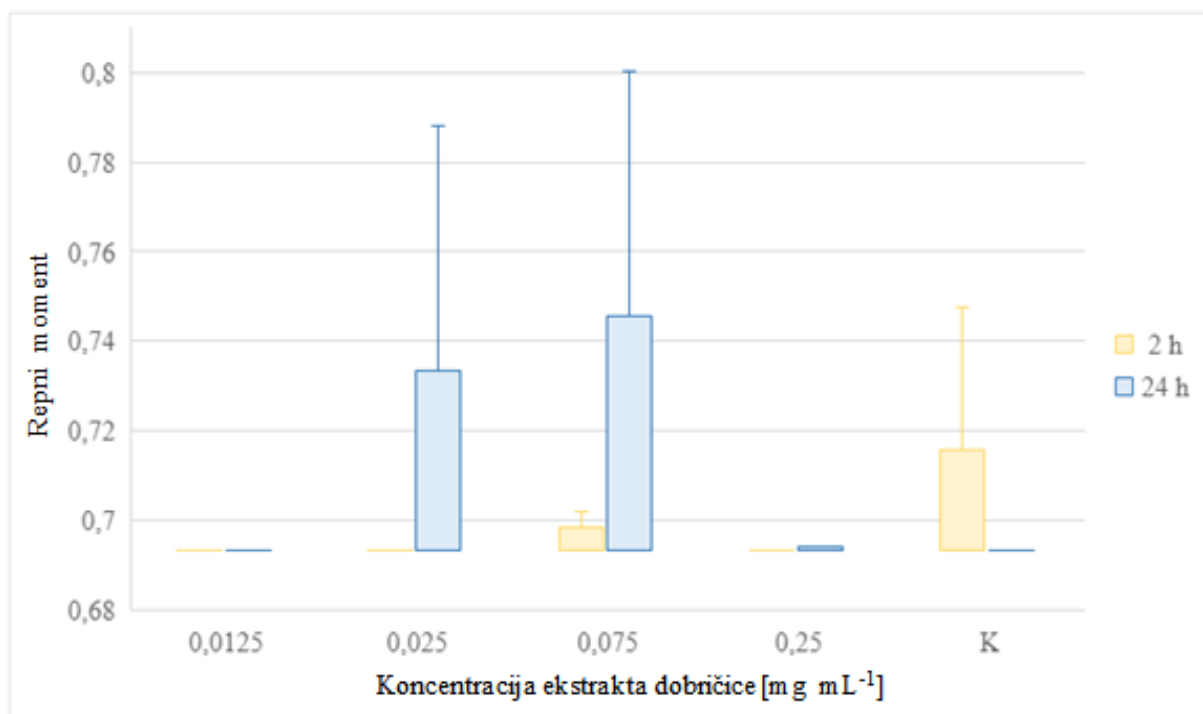
Slika 22. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu dužine repa u HepG2 stanicama.

Iz rezultata prikazanih na Slici 22. vidljivo je kako se nakon 2 sata tretmana HepG2 stanica dužina repa ne mijenja značajno u odnosu na kontrolu u cijelom koncentracijskom rasponu, dok se nakon 24 sata tretmana HepG2 stanica može uočiti statistički značajno povećanje dužine repa pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (0,25 mg mL⁻¹).



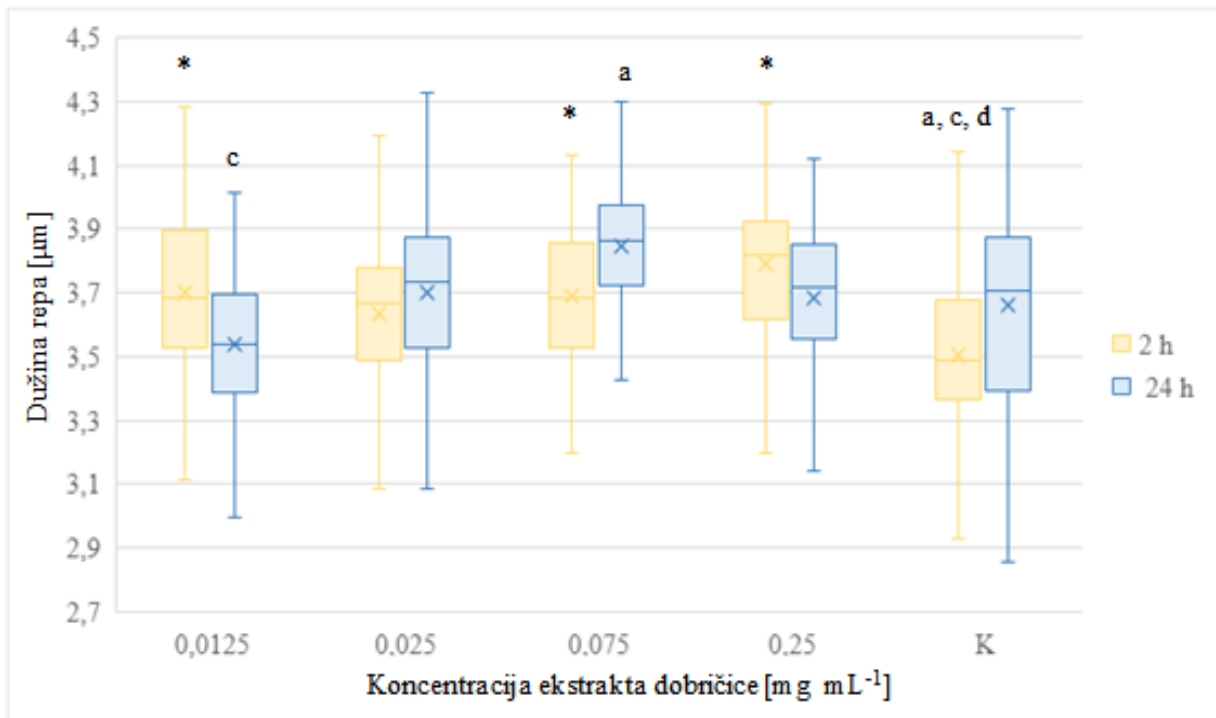
Slika 23. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu intenziteta repa u HepG2 stanicama.

Za razliku od vrijednosti dobivenih za dužinu repa, na Slici 23. vidljivo je kako se vrijednost intenziteta repa ne mijenja značajno nakon tretmana 2 i 24 sata HepG2 stanica. Blago, ali ne značajno, povećanje % DNA može se uočiti nakon tretmana HepG2 stanica pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹.



Slika 24. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu repnog momenta u HepG2 stanicama.

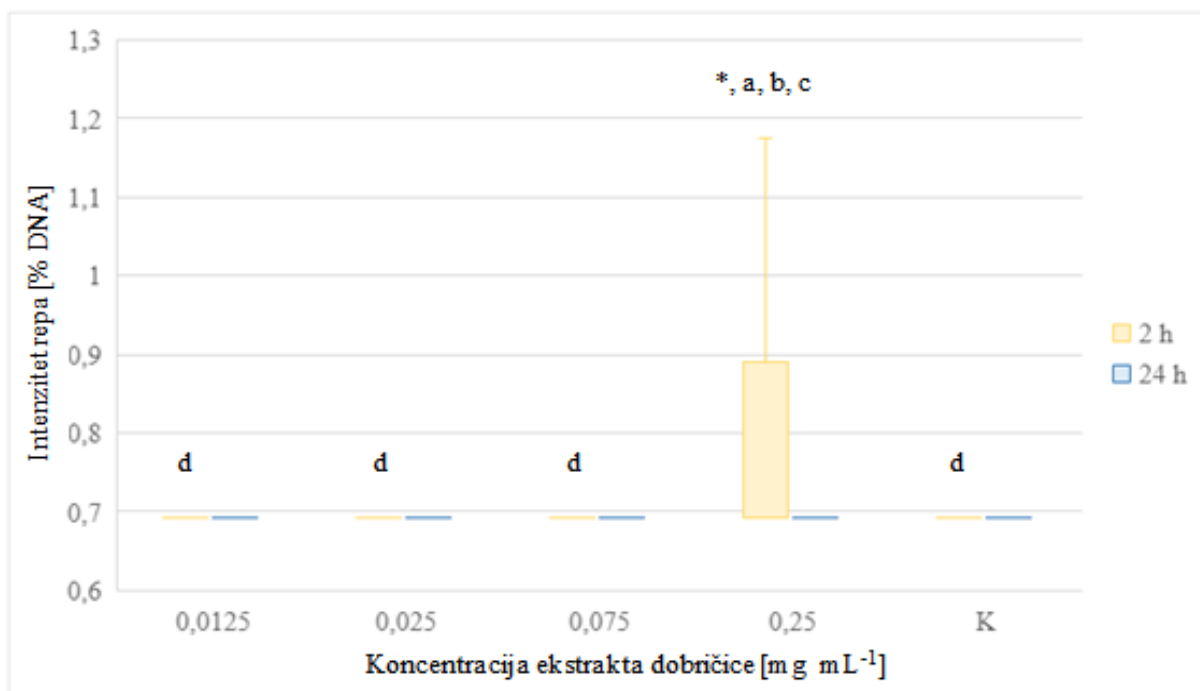
Ako uzmemo u obzir dužinu repa i % DNA koja je migrirala u rep kometa, na Slici 24. vidljivo je da nakon 2 sata tretmana HepG2 stanica ne dolazi do oštećenja genetičkog materijala, dok se nakon produljene inkubacije HepG2 stanica na 24 sata može primijetiti kako ekstrakt pri koncentracijama 0,025 i 0,075 mg mL⁻¹ uzrokuje blaža oštećenja DNA.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 25. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu dužine repa u AGS stanicama.

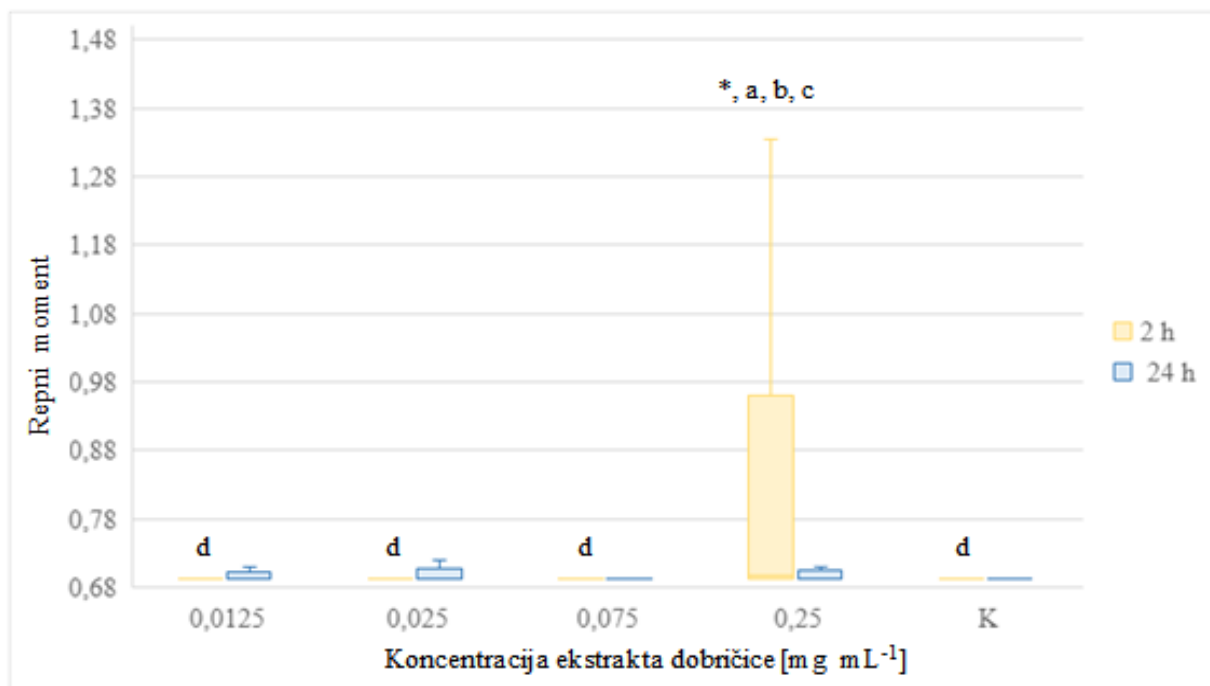
Prema rezultatima prikazanim na Slici 25. može se uočiti kako se tijekom 2 sata tretmana AGS stanica dužina repa statistički značajno povećava pri svim ispitivanim koncentracijama ekstrakta u odnosu na kontrolu, izuzev koncentracije 0,025 mg mL⁻¹. Duljim tretmanom stanica od 24 sata, jedino pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji (0,0125 mg mL⁻¹) dolazi do statistički značajnog smanjenja dužine repa u odnosu na kontrolu, dok pri ostalim koncentracijama nisu zamijećene znatnije promjene.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 26. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu intenziteta repa u AGS stanicama.

Iz grafičkog prikaza na Slici 26. može se uočiti da je tijekom 2 sata tretmana AGS stanica % DNA statistički značajno povećan jedino pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ekstrakta (0,25 mg mL⁻¹), koji se smanjuje produljenjem vremena inkubacije stanica na 24 sata.

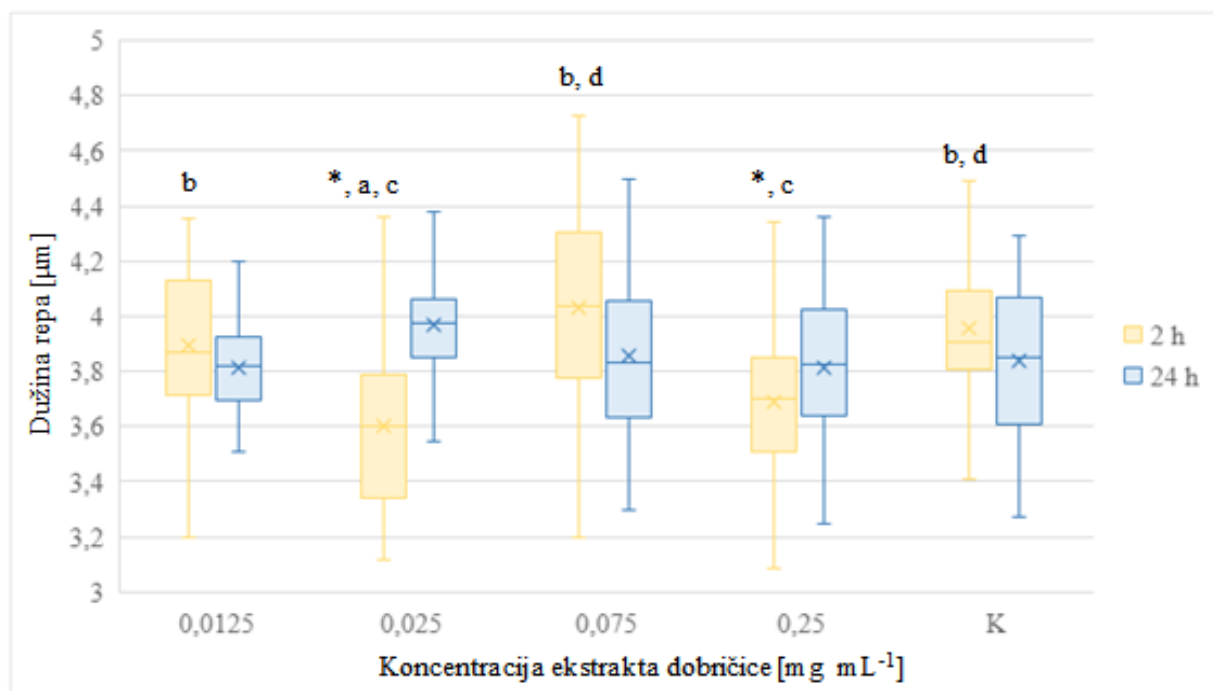


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$)

Slika 27. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu repnog momenta u AGS stanicama.

Tijekom tretmana 2 sata AGS stanica statistički značajno se povećava vrijednost repnog momenta uzorka tretiranog koncentracijom ekstrakta $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, a nakon 24 sata tretmana dolazi do smanjenja te vrijednosti (Slika 27.), što je u skladu s vrijednostima dobivenim za intenzitet repa.

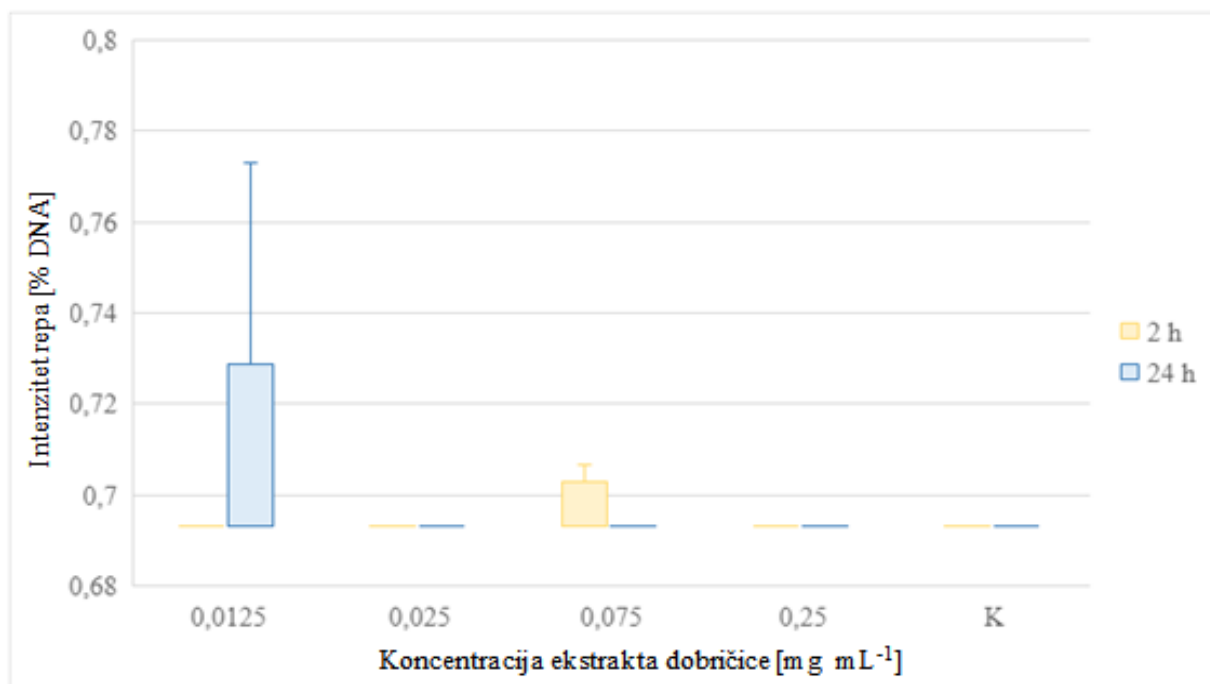
Caco-2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

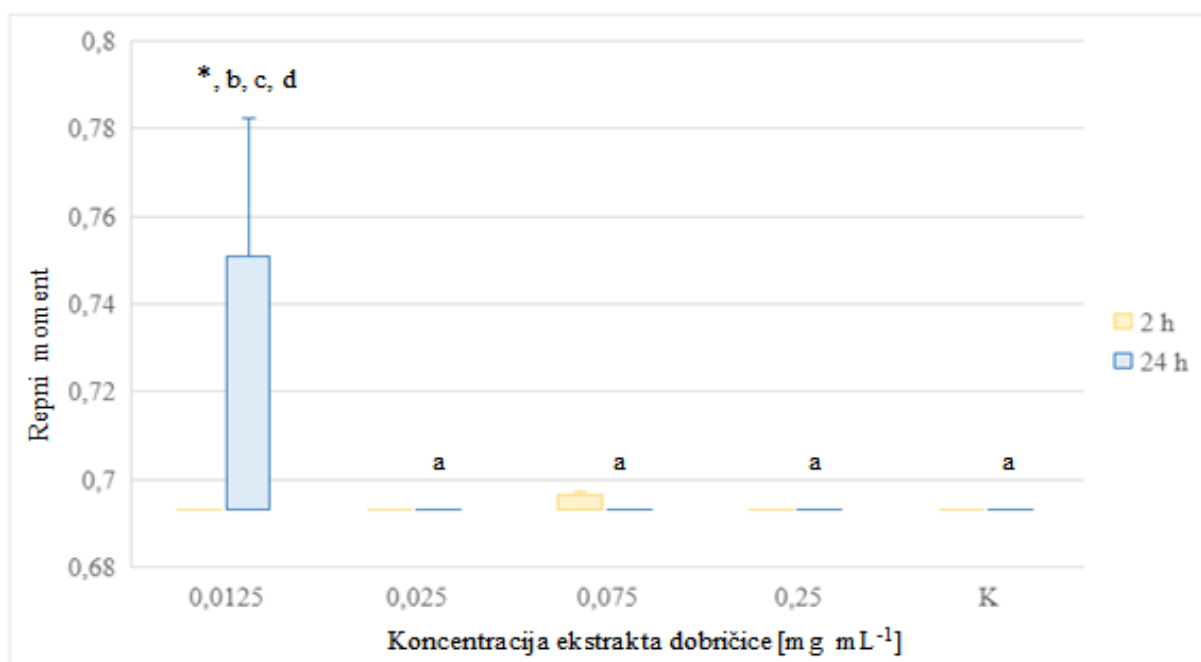
Slika 28. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu dužine repa u Caco-2 stanicama.

Prema rezultatima prikazanim na Slici 28., vidljivo je da tijekom 2 i 24 sata tretmana Caco-2 stanica ne dolazi do statistički značajnih promjena dužine repa u odnosu na kontrolu. Međutim, nakon 2 sata tretmana Caco-2 stanica udaljenosti na koju su otputovali najkraći fragmenti DNA značajno se razlikuju među ispitivanim koncentracijama.



Slika 29. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu intenziteta repa u Caco-2 stanicama.

Na Slici 29. može se uočiti kako promjena intenziteta repa Caco-2 stanica nije statistički značajna nakon 2 sata tretmana, dok se nakon 24 sata tretmana stanica Caco-2 povećava % DNA, ali ne značajno, jedino u uzorku tretiranom najnižom ispitivanom koncentracijom (0,0125 mg mL⁻¹).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,001$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,001$)

Slika 30. Učinak ekstrakta dobričice na promjenu repnog momenta u Caco-2 stanicama.

U skladu s vrijednostima intenziteta repa, na Slici 30. vidljivo je kako ekstrakt dobričice pri svim ispitivanim koncentracijama tijekom 2 sata tretmana Caco-2 stanica ne oštećuje DNA, dok produljenjem vremena tretiranja na 24 sata jedino koncentracija ekstrakta 0,0125 mg mL⁻¹ dovodi do značajnih oštećenja genetičkog materijala.

Iz priloženih rezultata prikazanih na Slikama 19-30. može se ustanoviti kako tijekom produljenog vremena inkubacije stanica od 24 sata, ekstrakt dobričice pruža protektivni učinak od oksidacijskih oštećenja DNA u svim ispitivanim staničnim linijama, izuzev Caco-2 stanica, kod kojih je uočeno genotoksično djelovanje pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 0,0125 mg mL⁻¹. U usporedbi s preliminarnim ispitivanjem antioksidacijskog učinka na modelnoj DNA kojim je pokazano da se protektivni učinak povećava s porastom koncentracije ekstrakta, ispitivanjem istog učinka na staničnom genetičkom materijalu ta ovisnost nije utvrđena. Pored toga, smanjenje vrijednosti repnog momenta s produljenjem vremena inkubacije Cal27 i AGS stanica dovodi do zaključka da aktivni spojevi iz ekstrakta

dobričice, osim što pružaju zaštitu od oštećenja genetičkog materijala, ujedno sudjeluju i u popravku DNA. Osim antimikrobnog učinka, navedene aktivnosti ekstrakta dobričice mogu se u velikoj mjeri pripisati ružmarinskoj kiselini. *In vitro* istraživanjem genoprotektivnog učinka polifenolnih spojeva na modelu stanica mišjih neurona, Silva i sur. (2008) pokazali su da ružmarinska kiselina sudjeluje u popravku oksidiranih baza, kao i lomova u DNA, te na taj način štiti genetički materijal od oksidacijskih oštećenja. Povezujući dobivene rezultate genoprotektivnog učinka s vijabilnosti stanica, može se pretpostaviti da citotoksični učinak ekstrakta nastaje kao posljedica oštećenja proteina ili lipidnih komponenti membrana, a ne genetičkog materijala. Međutim, da bi se to dokazalo potrebna su dodatna istraživanja.

4.4. UTJECAJ EKSTRAKTA DOBRIČICE NA PROMJENU ADHEZIJE BAKTERIJA ZA HUMANE STANICE

Za ispitivanje utjecaja ekstrakta dobričice na promjenu adhezije bakterija za kontinuirane humane stanične linije Cal27, AGS i Caco-2, odabrane su tri bakterijske kulture, *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus*. Odabrane stanične linije inkubirane su 1,5 sat ekstraktom dobričice koncentracije 0,025 i 0,075 mg mL⁻¹, a potom bakterijskom suspenzijom u trajanju od 30 minuta. Nakon tretmana bakterije su naciyepljene na odgovarajuće hranjive podloge. Porasle kolonije su izbrojane, a postotak adhezije bakterija na humane stanice izražen je u odnosu na kontrolu.

Tablica 4. Postotak adhezije bakterija *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus* na kontinuirane humane stanične linije Cal27, AGS i Caco-2.

| Stanična linija | Koncentracija ekstrakta dobričice [mg mL ⁻¹] | % adhezije bakterija | | |
|-----------------|--|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| | | <i>L. plantarum</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| Cal27 | 0,025 | 10,26 ± 2,37* | 23,40 ± 6,67* | - |
| | 0,075 | 13,46 ± 2,52* | 35,76 ± 11,78* | 0,86 ± 1,19 x 10 ⁻¹⁹ |
| AGS | 0,025 | 195,00 ± 57,32 ^{*.c} | 155,57 ± 19,54* | 78,46 ± 13,26* |
| | 0,075 | 33,33 ± 7,72 ^b | 133,74 ± 19,53 | 69,23 ± 8,22* |
| Caco-2 | 0,025 | 1637,50 ± 425,05 ^{*.c} | 93,75 ± 15,53 ^c | 31,65 ± 16,53 ^{*.c} |
| | 0,075 | 612,50 ± 116,30 ^b | 34,84 ± 1,99 ^{*.b} | 57,91 ± 12,34 ^{*.b} |

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (p < 0,001); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ (p < 0,001); c - statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ (p < 0,001)

Poznato je da mnogi proizvodi biljnog porijekla imaju svojstva koja sprječavaju prihvaćanje kliničkih patogena, a tvari koje su sposobne spriječiti ili liječiti bakterijsku adheziju poželjna su antimikrobna sredstva. Mnoge *in vitro* studije navode da su polifenolni spojevi, glavne antimikrobne komponente brojnih biljnih ekstrakata, koje dovode do promjene adhezijskih svojstava patogenih bakterija i posljedično onemogućavaju formiranje biofilma ili kolonizaciju na površini humanih epitelnih stanica, čime se sprječava pokretanje različitih staničnih procesa odgovornih za virulentnost bakterija (Makarewicz i sur., 2021). Prema trenutnim saznanjima, biološki aktivne tvari iz ekstrakta dobričice pokazuju antiadhezivna svojstva, uključujući ružmarinsku kiselinu koja inhibira stvaranje biofilma bakterije *Aeromonas hydrophila* (Alagawany i sur., 2017). Međutim, prihvaćanje bakterija na površinu humanih stanica temelji se na strogo specifičnim interakcijama adhezin-receptor, pri čemu neka tvar da bi interferirala vezanju mora biti analogna ili receptoru ili adhezinu. Na primjer, klorogenska kiselina igra važnu ulogu u regulaciji međustanične komunikacije i sprječavanju stvaranja biofilma bakterije *P. aeruginosa*, dok je u istraživanju Gato i sur. (2020) pokazano da kao najzastupljenija tvar ekstrakta borovnice, nema utjecaja u sprječavanju vezanja bakterije *K. pneumoniae* na intestinalne stanice HT-29. Ovisno o pH okruženja i prisutnosti iona mijenja se i lipofilni karakter polifenola, a time i njihov utjecaj na promjenu površinskih svojstava stanice, što se posljedično reflektira na bakterijsku adheziju (Piekarska-Radzik i Klewicka, 2020). Antibakterijski učinak ujedno zavisi i o tome je li određena biološki aktivna tvar djeluje zasebno ili se nalazi u formi biljnog ekstrakta. Biljni ekstrakti obično pokazuju jače antimikrobno djelovanje u odnosu na pojedinačne bioaktivne spojeve, zbog kumulativnog učinka različitih antimikrobnih mehanizama kojima djeluju biološki aktivne tvari u ekstraktu (Gato i sur., 2020). Stoga je teško predvidjeti kako će se ponašati aktivne tvari ekstrakta u biološkim sustavima.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 4. vidljivo je kako ekstrakt dobričice u ispitivanim koncentracijama djeluje vrlo heterogeno na adheziju odabranih bakterijskih kultura za humane stanice. Ekstrakt dobričice u obje ispitivane koncentracije značajno smanjuje adheziju sve tri bakterijske kulture na humane stanice karcinoma jezika, Cal27, pri čemu niža ispitivana koncentracija ($0,025 \text{ mg mL}^{-1}$) pokazuje jači inhibitorni učinak. Međutim, utjecaj ekstrakta dobričice na adheziju odabranih bakterijskih kultura za stanice karcinoma jezika, AGS, se podosta razlikuje. Niža ispitivana koncentracija ekstrakta statistički značajno povećava adheziju *L. plantarum* za AGS stanice, dok viša ispitivana koncentracija pokazuje inhibitorni učinak. Obje ispitivane koncentracije ekstrakta, povećavaju adheziju *E. coli*, dok s

druge strane inhibiraju adheziju *S. aureus* na AGS stanice. Uspoređujući rezultate dobivene za utjecaj ekstrakta na prihvaćanje bakterija za humane stanice karcinoma crijeva Caco-2, može se primijetiti kako ekstrakt dobričice u obje ispitivane koncentracije pokazuje značajno proadhezivno djelovanje prema *L. plantarum* na Caco-2 stanice, dok prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus* izražava antiadhezivni učinak. Na temelju dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti kako je bakterija *S. aureus* najosjetljivija na djelovanje aktivnih spojeva iz ekstrakta dobričice, što se očituje u značajno smanjenom postotku adhezije na sve tri humane stanične linije. Ekstrakt pokazuje slabije antiadhezivno djelovanje prema bakteriji *E. coli*, dok kod bakterije *L. plantarum* značajno pridonosi adheziji na AGS i Caco-2 stanice, osobito pri koncentraciji 0,025 mg mL⁻¹. Budući da su korištene bakterije nepoželjne u usnoj šupljini te da su *E. coli* i *L. plantarum* komenzalni mikroorganizmi u želucu i crijevima čovjeka, dobiveni rezultati upućuju da konzumacija ekstrakta dobričice u količini koja odgovara preporučenoj dnevnoj dozi neće značajno narušiti humanu mikrobiotu.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Citotoksičnost ekstrakta dobričice ovisna je o staničnoj liniji. Ekstrakt djeluje citotoksično na stanične linije karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 i adenokarcinoma epitela želuca AGS pri koncentracijama 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹ tijekom dulje ekspozicije.
2. Citotoksični učinak ekstrakta dobričice u korelaciji je s indukcijom slobodnih radikala kod Cal27 i HepG2 stanične linije, dok kod AGS i Caco-2 nije.
3. Prooksidativni učinak ekstrakta smanjuje se produljenjem vremena izloženosti HepG2, AGS i Caco-2 stanične linije, dok kod Cal27 stanica raste pri višim dozama od preporučene.
4. Polifenoli iz ekstrakta dobričice djeluju genoprotektivno na sve četiri stanične linije.
5. Ekstrakt pokazuje značajno antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama *E. coli* i *S. aureus*.
6. Antimikrobni potencijal ekstrakta dobričice i utjecaj ekstrakta na adheziju, pri preporučenoj dnevnoj dozi ne bi smio dovesti do značajnijeg poremećaja mikrobiote ljudskog organizma.
7. U usporedbi sa svim ispitivanim koncentracijama, preporučena dnevna doza ekstrakta dobričice (0,025 mg mL⁻¹) zaista odgovara optimalnoj dozi unosa u organizam, uz mjere opreza zbog potencijalnog prooksidativnog djelovanja.

6. LITERATURA

Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C., Hennebelle, T. (2013) Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, **2013**: 604536. doi:10.1155/2013/604536.

Abraham, S. N., Sharon, N., Ofek, I., Schwartzman, J. D. (2015) Adhesion and Colonization. U: *Molecular Medical Microbiology*, 2. izd., (Tang, Y.-W., Sails, A., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 409-421. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00024-x.

Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., Dhama, K. (2017) Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim. Health Res. Rev.*, **18**: 167-176. doi:10.1017/s1466252317000081.

Anonymus, Ground Ivy. <<https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-26/ground-ivy>>. Pristupljeno 27. svibnja 2021.

Asadi, A., Razavi, S., Talebi, M., Gholami, M. (2019) A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection*, **47**: 13-23. doi: 10.1007/s15010-018-1222-5.

Asbaghi, B. A. N., Shokoufi, N., Hajibaba, S. N. (2020) Bovine serum albumin determination based on methylene blue detection by photothermal lens spectroscopy. *Anal. Biochem.*, **594**: 113621-113627. doi:10.1016/j.ab.2020.113621.

Babich, H., Schuck, A. G., Weisburg, J. H., Zuckerbraun, L. (2011) Research Strategies in the Study of the Pro-Oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals. *J. Toxicol.*, **2011**: 467305. doi: 10.1155/2011/467305.

Beedanagari, S., Vulimiri, S. V., Bhatia, S., Mahadevan, B. (2014) Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. U: *Biomarkers in Toxicology* (Gupta, R. C., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 729-742. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00043-9.

BioQuoChem (2020) DCFH-DA probe (Intracellular ROS assay). <<https://bioquochem.com/ros-sensors/dcfh-da-probe/>>. Pristupljeno 20. kolovoza 2021.

Cai, Z., Yan, L.-J. (2013) Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.*, **1**: 15-26.

Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., Keller, J. N. (2007) Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**: 93-104. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.039.

Celi, P., Gabai, G. (2015) Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Front. Vet. Sci.*, **2**: 48. doi: 10.3389/fvets.2015.00048.

Chao, W. W., Liou, Y. J., Ma, H. T., Chen, Y. H., Chou, S.-T. (2021) Phytochemical composition and bioactive effects of ethyl acetate fraction extract (EAFE) of *Glechoma hederacea* L. *J. Food Biochem.*, **45**: e13815. doi: 10.1111/jfbc.13815.

Chatterjee, N., Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.*, **58**: 235-263. doi: 10.1002/em.22087.

Chen, L., Cao, H., Xiao, J. (2018) Polyphenols: Absorption, bioavailability, and metabolomics. U: Polyphenols: Properties, Recovery and Applications, (Galanakis, C. M., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, UK, str. 45-67. doi: 10.1016/b978-0-12-813572-3.00002-6.

Chou, S.-T., Ho, B.-Y., Tai Y.-T., Huang, C.-J., Chao, W.-W. (2020) Bidirect effects from cisplatin combine with rosmarinic acid (RA) or hot water extracts of *Glechoma hederacea* (HWG) on renal cancer cells. *Chin. Med.*, **15**: 77. doi:10.1186/s13020-020-00358-2.

Chou, S.-T., Lin, T.-H., Peng, H.-Y., Chao, W.-W. (2019) Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Sci.*, **231**: 116519-116528. doi:10.1016/j.lfs.2019.05.075.

Chung, Y., Liao, J.-W., Li, K.-Y., Jhan, J.-K., Chou, S.-T. (2020) *In vivo* Toxicity and the Antioxidant Activity of the Hot Water Extract of *Glechoma hederacea*. doi: 10.21203/rs.3.rs-42365/v1.<<https://www.researchgate.net/publication/343014708> In Vivo Toxicity and the Antioxidant Activity of the Hot Water Extract of *Glechoma Hederacea*>. Pristupljeno 26. kolovoza 2021.

- Collins, A. R. (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol. Biotechnol.*, **26**: 249-261. doi:10.1385/mb:26:3:249.
- Corthell, J. T. (2014) Agarose Gel Electrophoresis. Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 21-25. doi:10.1016/b978-0-12-801461-5.00003-4.
- Di Martino, P. (2018) Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiol.*, **4**: 563-566. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.563.
- Dmitrieva, N. I., Burg, M. B. (2007) Osmotic Stress and DNA Damage. *Methods Enzymol.*, **428**: 241-252. doi:10.1016/s0076-6879(07)28013-9.
- Döring, A. S., Petersen, M. (2014) Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochem. Lett.*, **10**: 111-117. doi: 10.1016/j.phytol.2014.05.012.
- Emam, A. N., Girgis, E., Khalil, W. K. B., Mohamed, M. B. (2014) Toxicity of Plasmonic Nanomaterials and Their Hybrid Nanocomposites. *Adv. Mol. Toxicol.*, **8**: 173-202. doi:10.1016/b978-0-444-63406-1.00005-2.
- Farr, S. A., Niehoff, M. L., Ceddia, M. A., Herrlinger, K. A., Lewis, B. J., Feng, S., Welleford, A., Butterfield, D. A., Morley, J. E. (2016) Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. *Physiol. Behav.*, **165**: 328-338. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.08.013.
- Fierer, J., Looney, D., Pechère, J.-C. (2017) Nature and Pathogenicity of Micro-organisms. *Infect. Dis. (Auckl.)*, **1**: 4-25.e1. doi: 10.1016/b978-0-7020-6285-8.00002-2.
- Gato, E., Rosalowska, A., Martínez-Gutián, M., Lores, M., Bou, G., Pérez, A. (2020) Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed. Pharmacother.*, **132**: 110885. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110885.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V. (2014) *In vitro* Antioxidant and Antibacterial Activity of Lamiaceae Phenolic Extracts: A Correlation Study. *Food Technol. Biotechnol.*, **52**: 119-127.

Ghosh, N., Das, A., Chaffee, S., Roy, S., Sen, C. K. (2018) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. U: Immunity and Inflammation in Health and Disease. Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support, (Chatterjee, S., Jungraithmayr, W., Bagchi, D., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 45-55. doi:10.1016/b978-0-12-805417-8.00004-4.

Gonçalves, S., Mansinhos, I., Romano, A. (2020) Aromatic plants: A source of compounds with antioxidant and neuroprotective effects. U: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases, (Martin, C. R., Preedy, V., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 155–173. doi:10.1016/b978-0-12-817780-8.00011-6.

Gonzalez-Hunt, C. P., Wadhwa, M., Sanders, L. H. (2018) DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Curr. Opin. Toxicol.*, **7**: 87-94. doi:10.1016/j.cotox.2017.11.001.

González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, F. A., García-Villalba, R. (2020) Structural Diversity of Polyphenols and Distribution in Foods. U: Dietary Polyphenols: Their Metabolism and Health Effects, (Tomás-Barberán, F. A., González-Sarriás, A., García-Villalba, R., ured.), John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, SAD, str. 1-29. doi:10.1002/9781119563754.ch1.

Grić, Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2. izd., August Cesarec, Zagreb, Hrvatska, str. 264-265.

Halliwell, B. (2000) Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**: 1082-1087. doi:10.1093/ajcn/72.5.1082.

Hermund, D. B. (2018) Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances. U: Bioactive Seaweeds for Food Applications. Natural Ingredients for Healthy Diets, (Qin, Y., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 201-221. doi:10.1016/b978-0-12-813312-5.00010-8.

Jin, L., Liu, L., Guo, Q., Wang, L., Zou, J. (2019) Variation in bioactive compounds of *Glechoma longituba* and its influential factors: Implication for advanced cultivation strategies. *Sci. Hortic.*, **244**: 182-192. doi:10.1016/j.scienta.2018.09.047.

Judzentiene, A., Stoncius, A., Budiene, J. (2015) Chemical composition of the essential oils from *Glechoma hederacea* plants grown under controlled environmental conditions in Lithuania. *J. Essent. Oil Res.*, **27**: 454-458. doi:10.1080/10412905.2015.1039663.

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. doi: 10.1155/2019/1279250.

Kennedy, D. O., Wightman, E. L. (2011) Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain function. *Adv. Nutr.*, **2**:, 32-50. doi:10.3945/an.110.000117.

Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Alcalde, M. A., Cusido, R. M., Eibl, R., Palazon, J. (2020) Powerful Plant Antioxidants: A New Biosustainable Approach to the Production of Rosmarinic Acid. *Antioxidants*, **9**: 1273. doi:10.3390/antiox9121273.

Kim, H., Xue, X. (2020) Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *J. Vis. Exp.*, **160**: e60682. doi:10.3791/60682.

Klemm, P., Vejborg, R. M., Hancock, V. (2010) Prevention of bacterial adhesion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**: 451-459. doi:10.1007/s00253-010-2805-y.

Koontz, L. (2013) Agarose Gel Electrophoresis. *Methods Enzymol.*, **529**: 35-45. doi:10.1016/b978-0-12-418687-3.00004-5.

Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D. (2003) Isolation, structure elucidation and biological activity of hederacine A and B, two unique alkaloids from *Glechoma hederaceae*. *Tetrahedron*, **59**: 6403-6407. doi:10.1016/s0040-4020(03)01093-7.

Kumarasamy, Y., Nahar, L., Kong-Thu-lin, P., Jaspars, M., Sarker, S. D. (2006) Hederacine A and Hederacine B from *Glechoma hederaceae* Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells *in vitro*. *Nat. Prod. Commun.*, **1**: 33-35. doi:10.1177/1934578x0600100106.

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. doi:10.3791/3923.

- Liu, R. H. (2013) Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *J. Food Sci.*, **78**: A18-A25. doi:10.1111/1750-3841.12101.
- Lu, H., Tian, Z., Cui, Y., Liu, Z., Ma, X. (2020) Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **19**: 3130-3158. doi: 10.1111/1541-4337.12620.
- Luo, S., Wehr, N. B. (2009) Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Rep.*, **14**: 159-166. doi:10.1179/135100009x392601.
- Luo, Y., Ma, Z., Xu, X., Qi, H., Cheng, Z., Chen, L. (2020) Anticancer effects of rosmarinic acid in human oral cancer cells is mediated via endoplasmic reticulum stress, apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of cell migration. *JBUON*, **25**: 1245-1250.
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., Minor, W. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.*, **52**: 174-182. doi: 10.1016/j.molimm.2012.05.011.
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., Duda-Chodak, A. (2021) The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. *Antioxidants*, **10**: 188. doi: 10.3390/antiox10020188.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**: 727-747. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
- Martinez, K. B., Mackert, J. D., McIntosh, M. K. (2017) Polyphenols and Intestinal Health. U: Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging, (Watson, R. R., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 191-210. doi:10.1016/b978-0-12-805376-8.00018-6.
- Matkowski, A. (2008) Antioxidant Activity of Extracts and Different Solvent Fractions of *Glechoma hederacea* L. and *Orthosiphon stamineus* (Benth.) Kudo. *Adv. Clin. Exp. Med.*, **17**: 615-624.

- Mikšik, P. (2020) Dobričica – ljekovitost, uporaba i mjere opreza. <<https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/dobricica-ljekovitost-uporaba-i-mjere-opreza>>. Pristupljeno 25. srpnja 2021.
- Mitich, L. W. (1994) Ground Ivy. *Weed Technol*, **8**: 413-415. doi:10.1017/s0890037x0003904x.
- Mockutė, D., Bernotienė, G., Judzentiene, A. (2005) Chemical composition of essential oils of *Glechoma hederacea* L. growing wild in Vilnius district. *CHEMIJA*, **16**: 47-50.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modaresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z., (2018) Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.*, **97**: 67-74. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064.
- Nishiyama, K., Sugiyama, M., Mukai, T. (2016) Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms*, **4**: 34. doi: 10.3390/microorganisms4030034.
- Nita, M., Grzybowski, A. (2016) The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**: 1-23. doi:10.1155/2016/3164734.
- Noh, H., Ha, H. (2011) Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *Contrib. Nephrol.*, **170**: 102-112. doi:10.1159/000324955.
- North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox, *Glechoma hederacea*. <<https://plants.ces.ncsu.edu/plants/glechoma-hederacea/>>. Pristupljeno 13. svibnja 2021.
- Oalđe, M. M., Kolarević, S. M., Živković, J. C., Vuković-Gačić, B. S., Jovanović Marić, J. M., Kračun Kolarević, M. J., Đorđević, J. Z., Alimpić Aradski, A. Z., Marin, P. D., Šavikin, K. P., Duletić-Laušević, S. N. (2020) The impact of different extracts of six Lamiaceae species on deleterious effects of oxidative stress assessed in acellular, prokaryotic and eukaryotic models *in vitro*. *Saudi Pharm. J.*, **28**: 1592-1604. doi: 10.1016/j.jsps.2020.10.006.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., Hacker, J. (2010) Cell Wall Structure and Pathogenicity. U: Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistry, (König, H., Claus, H.,

Varma, A., ured.), Springer, Heidelberg, Njemačka, str. 313-343. doi:10.1007/978-3-642-05062-6_11.

Ou, J., Huang, J., Wang, M., Ou, S. (2017) Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation *in vitro*. *Food Chem.*, **221**: 1057-1061. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.056.

Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2**: 270-278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.

Petersen, M., Simmonds, M. S. J. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, **62**: 121-125. doi:10.1016/s0031-9422(02)00513-7.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind. J. Clin. Biochem.*, **30**: 11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0.

Piekarska-Radzik, L., Klewicka, E. (2020) Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. *Eur. Food Res. Technol.*, **247**: 9-24. doi: 10.1007/s00217-020-03603-y.

Pisoschi, A. M., Pop, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, **97**: 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Pizzaro-Cerdá, J., Cossart, P. (2006) Bacterial Adhesion and Entry into Host Cell. *Cell*, **124**: 715-727. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.

Purdel, N. C., Margina, D., Ilie, M. (2014) Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. *Annu. Res. Rev. Biol.*, **4**: 2015-2026. doi: 10.9734/ARRB/2014/8763.

Rajneesh, Pathak, J., Chatterjee, A., Singh, S. P., Sinha, R. P. (2017) Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). *Bio-protocol*, **7**: e2545. doi: 10.21769/BioProtoc.2545.

Reczek, C. R., Chandel, N. S. (2017) The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, **1**: 79-98.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.*, **3**: 1125-1131. doi:10.1038/nprot.2008.75.

Rockland Immunochemicals, Inc., Bovine Serum Albumin. <<https://rockland-inc.com/bovine-serum-albumin.aspx>>. Pristupljeno 03. svibnja 2021.

Sailaja Rao, P., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S. (2011) Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radic. Antioxid.*, **1**: 2-7. doi:10.5530/ax.2011.4.2.

Sarowar, S., Hu, O. J., Werneburg, G. T., Thanassi, D. G., Li, H. (2016) The *Escherichia coli* P and Type 1 Pilus Assembly Chaperones PapD and FimC Are Monomeric in Solution. *J. Bacteriol.*, **198**: 2360-2369. doi: 10.1128/JB.00366-16.

Shimada, K., Crother, T. R., Ardit, M. (2014) DNA Damage Responses in Atherosclerosis. U: Biological DNA Sensor. The Impact of Nucleic Acids and Diseases and Vaccinology, (Ishii, K. J., Kit Tang, C., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 231-253. doi: 10.1016/B978-0-12-404732-7.00010-1.

Silva, J. P., Gomes, A. C., Coutinho, O. P. (2008) Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **601**: 50-60. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.10.046.

Sotler, R., Poljšak, B., Dahmane, R., Jukić, T., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Trebše, P., Starc, A. (2019) Prooxidant Activities of Antioxidants and Their Impact on Health. *Acta Clin. Croat.*, **58**: 726-736. doi: 10.20471/acc.2019.58.04.20.

Soto, G. E., Hultgren, S. J. (1999) Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.*, **181**: 1059-1071.

Sundar, I. K., Caito, S., Yao, H., Rahman, I. (2010) Oxidative Stress, Thiol Redox Signaling Methods in Epigenetics. U: Thiol Redox Transitions in Cell Signaling, Part B: Cellular Localization and Signaling (Cadenas, E., Packer, L., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 213-244. doi:10.1016/s0076-6879(10)74013-1.

Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Žepić, I., Marković, K., Komes, D. (2020) An insight into the chemical composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) by means of

macrocomponent analysis and fractionation of phenolic compounds. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **15**: 133-138. doi: 10.31895/hcptbn.15.3-4.3.

Tchounwou, P. B. (2013) Genotoxic Stress. U: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2. izd., (Maloy, S., Hughes, K., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 313–317. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.00645-8.

Tromelin, A., Andriot, I., Guichard, E. (2006) Protein–flavour interactions. U: *Flavour in Food*, (Voilley, A., Etiévant, P. X., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, str. 172-207. doi:10.1533/9781845691400.2.172.

Uritu, C. M., Mihai, C. T., Stanciu, G.-D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M. M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic, S., Tamba, B. I. (2018) Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: a review. *Pain Res. Manag.*, **2018**: 1-44. doi: 10.1155/2018/7801543.

Varga, L., Engel, R., Szabo, K., Abrankó, L., Gosztola, B., Zámboriné Németh, É., Sárosi, S., (2016) Seasonal variation in phenolic content and antioxidant activity of *Glechoma hederacea* L. harvested from six Hungarian populations. *Acta Aliment.*, **45**:, 268-276. doi: 10.1556/066.2016.45.2.14.

Verreault, D., Rousseau, G. M., Gendron, L., Massé, D., Moineau, S., Duchaine, C. (2010) Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.*, **44**:, 197-201, doi: 10.1080/02786820903518899.

Waggy, M. A. (2009) *Glechoma hederacea*. Fire Effects Information System (FEIS). <<https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/forb/glehed/all.html>>. Pristupljeno 15. svibnja 2021.

Wang, Y.-Y., Lin, S.-Y., Chen, W.-Y., Liao, S.-L., Wu, C.-C., Pan, P.-H., Chou, S.-T., Chen, C.-J. (2017) *Glechoma hederacea* extracts attenuate cholestatic liver injury in a bile duct-ligated rat model. *J. Ethnopharmacol.*, **204**: 58-66. doi: 10.1016/j.jep.2017.04.011.

Wilson, J. W., Schurr, M. J., LeBlanc, C. L., Ramamurthy, R., Buchanan, K. L., Nickerson, C. A. (2002) Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.*, **78**: 216-224. doi: 10.1136/pmj.78.918.216.

Yadav, N., Umapathi, R., Venkatesu, P. (2020) How does bovine serum albumin sustain in saccharomate® derived from pine tree biomass? *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **191**: 110975-110982. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110975.

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.

J. Kosarović