

Karakterizacija biološkog učinka vodenog ekstrakta ploda maginje (*Arbutus unedo* L.)

Butumović, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:396714>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2023.

Lara Butumović

**KARAKTERIZACIJA
BIOLOŠKOG UČINKA VODENOG
EKSTRAKTA PLODA MAGINJE
(*Arbutus unedo* L.)**

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 te uz pomoć Ane Huđek Turković, mag. ing. biotechn. i Anice Bebek Markovinović, mag. ing. techn. aliment.



Istraživanje je provedeno u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Tehnologija preprekama i 3D printanje za ekološki prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3DSustJuice)“ (IP-2019-04-2105), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević.

ZAHVALA

Prvobitno bih se htjela zahvaliti svojoj mentorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada i svom znanju, savjetima i kritikama koje je srdačno 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.

Posebno se zahvaljujem i asistentici mag. ing. Ani Huđek Turković koja je bila tu kad god mi je trebala pomoć u vezi eksperimentalnog dijela rada.

Najveće hvala mojim roditeljima na ljubavi, podršci i razumijevanju, ne samo tijekom obrazovanja, već tijekom cijelog mog dosadašnjeg života. Hvala vam što ste se veselili svakom mom uspjehu.

Na kraju, hvala svim mojim prijateljima, a posebno prijateljici Lauri koja mi je uljepšala sve godine studiranja.

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: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

KARAKTERIZACIJA BIOLOŠKOG UČINKA VODENOG EKSTRAKTA PLODA MAGINJE (*Arbutus unedo* L.)

Lara Butumović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058211405

Sažetak: Obična planika (*Arbutus unedo* L.), u narodu poznatija kao maginja, samonikla je voćna vrsta koja se u tradicionalnoj medicini koristi u raznim ljekovitim pripravcima, budući da posjeduje antimikrobna i antioksidacijska svojstva. Sam plod biljke često je zanemaren i nedovoljno istražen, unatoč činjenici da obiluje polifenolima i vitaminima. Cilj ovog rada bio je utvrditi polifenolni sastav te istražiti biološki učinak vodenog ekstrakta maginje na stanične makromolekule, odabrane tumorske stanične linije epitela probavnog sustava te na patogene bakterije (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) i probiotičku bakteriju (*Lactobacillus plantarum*). Dobiveni rezultati pokazali su kako citotoksičnost ekstrakta ovisi o vrsti stanica, kao i o vremenu izloženosti. Najveći prooksidacijski učinak uočen je kod koncentracija sukladnim dnevnoj preporuci. Utvrđen je i protektivni učinak na genetički materijal prilikom oksidacijskog oštećenja uzrokovanog UV zračenjem, te snažan antimikrobni učinak na patogene bakterije.

Ključne riječi: maginja, obična planika, antioksidacijsko djelovanje, citotoksičnost, genotoksičnost

Rad sadrži: 54 stranica, 20 slika, 5 tablica, 75 literaturnih 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

Pomoć pri izradi: Ana Huđek Turković, mag.ing., asistent i Anice Bebek Markovinović, mag. ing. techn. aliment.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (zamjenski član)

Datum obrane: ožujak, 2023.

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: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

CHARACTERIZATION OF THE BIOLOGICAL EFFECT OF AQUEOUS STRAWBERRY TREE FRUIT (*Arbutus unedo* L.) EXTRACT

Lara Butumović, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058211405

Abstract: *Arbutus unedo* L., popularly known as strawberry tree fruit, is a wild fruit species used in folk medicine for various therapeutic compounds, as it is known for its antimicrobial and antioxidant properties. The fruit of the plant itself is often neglected and insufficiently studied, although it is rich in polyphenols and vitamins. The aim of this work was to determine the polyphenolic composition of the strawberry tree fruit, as well as to investigate the biological effect of the aqueous strawberry tree fruit extract on cellular macromolecules, selected tumor cell lines of the digestive system epithelium, and on pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) and probiotics (*Lactobacillus plantarum*). The obtained results showed that the cytotoxicity of the extract depends on the type of cells as well as on the duration of their exposure to the extract. The highest prooxidant effect was observed at concentrations corresponding to the daily recommendation. A protective effect on genetic material in oxidative damage caused by UV radiation and a strong antimicrobial effect on pathogenic bacteria were also determined.

Keywords: *strawberry tree, Arbutus unedo* L., *antioxidant activity, cytotoxicity, genotoxicity*

Thesis contains: 54 pages, 20 figures, 5 tables, 75 reference

Original in: Croatian

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

Mentor: Ksenija Durgo, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Ana Huđek Turković, MSc, Scientific Assistant; Anica Bebek Markovinović, MSc

Reviewers:

1. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (president)
2. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, University North (member)
4. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: March 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE MAGINJE (<i>Arbutus unedo</i> L.)	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PLODA MAGINJE	4
2.2.1. Polifenoli	5
2.2.2. Vitamini C i E	7
2.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES	9
2.5. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	10
2.6. <i>In vitro</i> TESTOVI CITOTOKSIČNOSTI	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Biljni materijal	13
3.1.2. Biološki test sustavi	13
3.1.3. Kontinuirane humane stanične linije	13
3.1.4. Brojanje stanica pomoću Bürker-Türkove komorice	15
3.1.5. Kemikalije	17
3.1.5.1. <i>Otopine</i>	17
3.1.5.2 <i>Hranjive podloge</i>	19
3.1.6. Laboratorijska oprema	20
3.1.6.1. <i>Laboratorijski uređaji</i>	20
3.1.6.2. <i>Laboratorijski pribor</i>	21
3.2. METODE	23
3.2.1. Priprema ekstrakta maginje za određivanje bioaktivnog sastava	23
3.2.2. Metode za određivanje bioaktivnog sastava ekstrakta maginje	23
3.2.3. Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim humanim staničnim linijama Neutral red metodom	24

3.2.4. Ispitivanje citotoksičnog učinka ekstrakta maginje na bakterijskim kulturama	24
3.2.5. Ispitivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim humanim staničnim linijama DCFH-DA metodom	25
3.2.6. Antioksidacijski učinak ekstrakta maginje na DNA prikazan na modelnom plazmidu ϕ X174 RF1.....	26
3.2.7. Obrada podataka.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG SASTAVA.....	29
4.2. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I PROLIFERATIVNOG UČINKA EKSTRAKTA MAGINJE.....	29
4.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim staničnim linijama.....	29
4.2.2. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta maginje na bakterije <i>L. plantarum</i> , <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	35
4.2.3. Određivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim staničnim linijama.....	37
4.3.1. Antioksidacijski učinak ekstrakta maginje na DNA	43
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Sukladno trendu razvoja funkcionalne hrane i nutraceutika, raste i interes prehrambene industrije za uporabom dosad neiskorištenih prirodnih resursa. Nutraceutik se definira kao svaka tvar koja je hrana ili dio hrane i pruža medicinske ili zdravstvene koristi, uključujući prevenciju i liječenje bolesti (DeFelice, 1994). Obična planika (*Arbutus unedo* L.), u narodu nazvana maginja, samonikla je biljka koja raste na području Mediterana. Ova nedovoljno istraжена biljna vrsta sve je više privlačna potrošačima i industriji kao nutritivno bogat izvor bioaktivnih spojeva, s naglaskom na proizvodnju funkcionalne hrane i dodataka prehrani. Analizom kemijskog sastava utvrđeno je kako plod maginje obiluje polifenolima, biološki aktivnim komponentama važnim za razvoj biljke, koji služe i kao njezin obrambeni mehanizam protiv oštećenja izazvanih UV zračenjem, ali i protiv raznih parazita (Liu, 2013). Osim toga, polifenoli utječu na različite procese u stanici te se promjene ispoljavaju na cjelokupnom ljudskom organizmu. S obzirom da mogu mijenjati ekspresiju različitih proteina te da djeluju kao antioksidansi, ovi spojevi mogu modulirati procese koji su uključeni u nastanak karcinoma (Azqueta i Collins, 2016).

Glavna karakteristika antioksidansa je njihov afinitet prema slobodnim radikalima koji mogu oksidirati nukleinske kiseline, proteine, lipide ili DNA (Dragović Uzelac i sur., 2007). Unatoč sposobnosti uništavanja slobodnih radikala, antioksidansi mogu djelovati i kao prooksidansi, odnosno mogu stvarati reaktivne kisikove (eng. *Reactive Oxygen Species, ROS*) ili dušikove vrste (eng. *Reactive Nitrogen Species, RNS*; Pham-Huy i sur., 2008). Prema tome, konzumacija visokih doza nije preporučljiva zbog potencijalne opasnosti na ljudsko zdravlje.

Do sada je provedeno nekoliko istraživanja vezanih uz biološki učinak listova i meda obične planike s obzirom na njihov bogat fenolni sastav, ali o samom plodu nema značajnih istraživanja. Cilj ovog rada bio je istražiti biološki učinak vodenog ekstrakta ploda maginje na humane stanične linije, bakterijske stanice (patogene i probiotičke) te njegov zaštitni učinak na DNA, odnosno ispitati citotoksični, antioksidacijski i prooksidacijski učinak vodenog ekstrakta ploda maginje pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam. Stanične linije korištene u radu dio su probavnog sustava, porijeklom iz ATCC (eng. *American Type Culture Collection*) banke stanica. Također, u ovom radu korišten je model plazmida ϕ X RF1 DNA na kojem je ispitana zaštitna uloga ekstrakta maginje protiv oštećenja DNA izazvanih hidroksilnim radikalima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE MAGINJE (*Arbutus unedo* L.)

Maginja, odnosno obična planika (*Arbutus unedo* L.) je samonikla voćna vrsta iz obitelji *Ericaceae*, rasprostranjena na području eumediteranske zone. U Hrvatskoj je rasprostranjena duž cijele hrvatske Jadranske obale (Slika 2), uključujući i otoke (Skendrović Babojelić i sur., 2020). Na području Mediterana maginja obično raste u obliku gustih grmova koji su visine tri do četiri metra, iako je potencijal rasta od devet do dvanaest metara (Miguel i sur., 2014).

Listovi planike su jednostavni, najčešće eliptično duguljastog oblika te ne mijenjaju boju jer se radi o vazdazelenoj vrsti. Dvospolni cvjetovi su upadljivi budući da cvatu tijekom jeseni i zime, odnosno od listopada do veljače (Skendrović Babojelić i sur., 2020). Plod planike loptastog je oblika te mijenja boju ovisno o zrelosti; prvobitno je zelen, pa prelazi u žutu, narančastu te na posljetku u tamno-grimiznocrvenu boju. Zreli, liofilizirani plodovi prikazani su na Slici 1. Samom plodu potrebno je i do dvanaest mjeseci kako bi sazrio, stoga je karakteristično za ovu biljnu vrstu da istovremeno na stablu može sadržavati i zrele plodove i cvjetove (Miguel i sur., 2014). Vanjska površina ploda je hrapava i gruba, dok unutrašnjost čini meko žuto meso unutar kojeg su smještene sjemenke. Broj sjemenki ovisi o veličini ploda, a obično iznosi od 22 do 40 sjemenki po plodu (Skendrović Babojelić i sur., 2020).



Slika 1. Liofilizirani plodovi maginje (*vlastita fotografija*)

Obitelj *Ericaceae* je velika porodica biljaka angiospermi koja uključuje bilje, patuljasto grmlje, grmlje i drveće koje se najčešće nalazi u kiselim i neplodnim uvjetima uzgoja. Prema tome, maginju karakterizira široka genetska, morfološka i fenološka varijabilnost (Ștefănescu i sur., 2019). Kao heliofit raste uz crniku, vazdazelene mediteranske šume i makije s vrlo uskom ekološkom nišom, rastući na različitim tipovima tala i s različitim količinama oborina. Zbog toga prirodne populacije stabala mogu značajno utjecati na sadržaj hranjivih tvari u plodu i lišću biljke, posebice u mediteranskom dijelu Hrvatske gdje su sjevernije regije (Istra, Kvarner) manje tople i sunčanije od južnih krajeva (srednja i južna Dalmacija i otoci) (Șic Źlabur i sur., 2020).



Slika 2. Rasprostranjenost obične planike (*Arbutus unedo* L.) u Hrvatskoj (Flora Croatica baza podataka, 2022)

Unatoč tome što ova biljka pripada skupini zanemarenih ili nedovoljno iskorištenih vrsta (Skendrović Babojelić i sur., 2020), zbog svojeg bogatog kemijskog sastava gotovo svi dijelovi ove biljke koriste se u tradicionalnoj narodnoj medicini (Șic Źlabur i sur., 2020) kao antiseptik, diuretik i laksativ te za liječenje arterijske hipertenzije (Miguel i sur., 2014). Međutim, svježi plod nije privlačan konzumentima, već se najčešće koristi za preradu u alkoholna pića (vina, likera i rakija) te želirane proizvode poput džemova, želea i marmelada. Također, može ga se u komadićima dodati u jogurt ili koristiti u slastičarstvu kao nadjev za pite i kolače, proizvode od žitarica i slično (Miguel i sur., 2014). Zbog visokog sadržaja ugljikohidrata voće brzo propada jer dolazi do fermentacije, zbog čega je otežana njihova komercijalizacija, a zbog istih razloga se ne preporučuje konzumacija svježih plodova u velikoj količini (Șic Źlabur i sur., 2020). S

obzirom na sastav, plod maginje ima visok stupanj slatkoće i relativno visoku energetska vrijednost u usporedbi s drugim samoniklim voćem (Skendrović Babojelić i sur., 2020). No, iako se za ovo voće u podmakloj fazi zrelosti popularno kaže da izaziva znakove pijanstva, vjerojatno zbog visokog sadržaja šećera koji može fermentirati, ne postoje znanstvene reference o njihovom sadržaju etanola koje bi to potvrdile (Molina i sur., 2011).

2.2. KEMIJSKI SASTAV PLODA MAGINJE

Plod maginje nutritivno je bogat biološki značajnim kemijskim spojevima poput šećera, nezasićenih masnih kiselina, organskih i fenolnih kiselina, vlakana, vitamina, proteina i karotenoida (Bebek Markovinović i sur., 2022a). Prema Španjol i sur. (2021), šećeri koji dominiraju u plodu su fruktoza (20-33 %), glukoza (20 %), saharoza (1,5-3 %) i maltoza (1-2 %), dok su od ostalih ugljikohidrata prisutni celuloza i škrob.

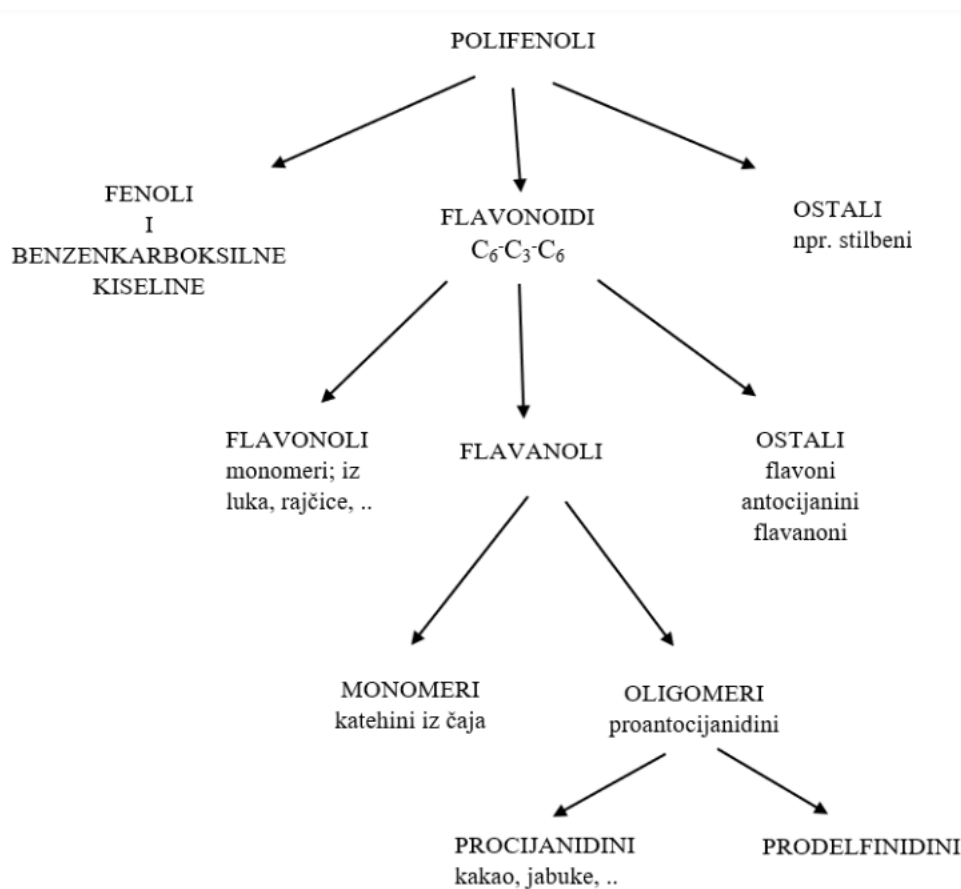
Sadržaj vode u plodu maginje varira ovisno o klimatskim uvjetima, a prosječni postotak iznosi između 46 i 56 % (Skendrović Babojelić i sur., 2020). Prehrambena vlakna također su dosta zastupljena (18,49 g na 100 g ukupnih prehrambenih vlakana, od čega je 14,3 g topljivih vlakana (Španjol i sur., 2021)), što je iznimno važno s obzirom na značajan pozitivan utjecaj prehrambenih vlakana na gastrointestinalni sustav, posebice topljivih prehrambenih vlakana kojima mikroorganizmi koji ih razgrađuju u crijevima mogu lako pristupiti te proizvesti niz korisnih i funkcionalnih metabolita (Guan i sur., 2021). Najznačajniji od njih je pektin (1,8 % pektinskih tvari), koji je u većoj zastupljenosti nego kod nekih konvencionalnih voćnih vrsta, poput jabuke i breskve (Španjol i sur., 2021).

Što se tiče masnih kiselina, nekoliko autora ukazalo je na prisutnost između 15 i 21 masnih kiselina, gdje je α -linolenska kiselina (C18:3n3) nađena u većim količinama ($36,90 \pm 1,75$ % u nezrelim plodovima, do $43,07 \pm 0,16$ % u zrelih plodovima). Višestruko nezasićene masne kiseline predstavljaju većinu svih masnih kiselina (oko 58 %) (Oliveira i sur., 2011). Prema Miguel i sur. (2014) sastav masnih kiselina se nije pretežno razlikovao ovisno o fazi sazrijevanja, uspoređujući dominantne kiseline α -linoleinsku (36,9 %–43,04 %), linolnu (20,14 %–18,84 %) i oleinsku kiselinu (29,38 %–26,75 %).

Plod maginje sadrži i značajan broj minerala, ponajviše kalija, kalcija i magnezija dok su razine toksičnih elemenata izrazito niske (arsena, kadmija, kroma, olova i žive) (Jurica i Brčić Karačonji, 2019). Osim toga, determinirane su organske kiseline (fumarna, mliječna, jabučna, suberinska i limunska), fenolne kiseline, vitamini (C, E) i karotenoidi.

2.2.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni proizvodi biljaka, koji osim što imaju značajnu ulogu u razvoju biljke, služe i kao obrambeni mehanizam biljke kako od UV zračenja, tako i od raznih parazita (Liu, 2013). Dio su sastavnih komponenti hrane biljnog porijekla, prema tome i dio redovne prehrane u ljudi. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta, osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstena (Berend i Grabarić, 2008). Prema razlikama u kemijskoj strukturi, polifenoli se dijele na fenolne kiseline i flavonoide. Flavonoidne podgrupe razlikuju se u broju i rasporedu hidroksilnih grupa, te prema prirodi i stupnju njihove alkilacije i/ili glikozidacije. U hrani se javljaju u obliku glikozida ili estera s drugim spojevima kao što su steroli, alkoholi, glukozidi i masne kiseline (Kurtagić, 2017). Polifenoli su podijeljeni po skupinama (Slika 3) ovisno o broju fenolnih prstena koje sadrže i strukturnim elementima koji te prstene povezuju (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 3. Osnovna podjela polifenola (prema Berend i Grabarić, 2008)

Dokazano je kako polifenoli posjeduju antioksidacijska svojstva zbog čega mogu djelovati na slobodne radikale hvatajući ROS-ove te time smanjiti oštećenje biomolekule (Rajendran i sur., 2022), a povećanjem broja hidroksilnih skupina povećava se i njihova antioksidacijska aktivnost (Kurtagić, 2017).

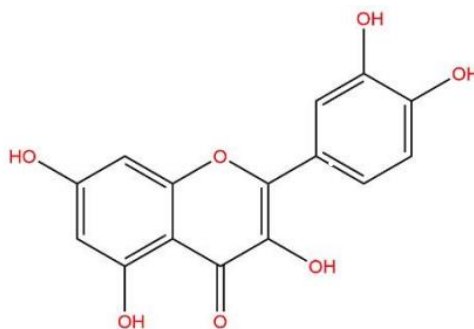
Mehanizam djelovanja polifenola s antioksidativnim kapacitetom izgleda tako da suzbijaju signalne putove uključene u stvaranje oksidativnog stresa na molekularnoj razini. Naime, nastankom ROS-a, javlja se i veća koncentracija slobodnih metalnih iona, kao i visoko reaktivnog hidroksil radikala (\bullet OH) u stanici. Polifenoli keliraju ione poput Fe^{2+} , Cu^{2+} i ostale slobodne radikale što dovodi do redukcije visoko oksidirajućih slobodnih radikala (Yahfoufi i sur., 2018). Konzumacija prehrane s polifenolima povećava aktivnost antioksidansa i inhibira peroksidaciju lipida i puteve ciklooksigenaze (COX; Rajendran i sur., 2022).

Fenolni sastav maginje varira ovisno o lokalitetu uzgoja, što je i dokazano u radu Šic Žlabur i sur. (2022) gdje je utvrđeno kako ukupni sadržaj fenola u plodu maginje duž cijele Jadranske obale varira od Hvara (479,62 ekvivalenata galne kiseline (eng. *gallic acid equivalent*, GAE) u miligramima na 100 g mase svježeg uzorka (eng. *fresh weight, FW*)) do Cresa (850,02 mg GAE 100 g⁻¹ FW). Brčić Karačonji i sur. (2021) su analizom kemijskog sastava pronašli katehin galat u uzorku ploda maginje s Malog Lošinja (ekstrakcija metanolom), dok je kvercetin pronađen na istoj lokaciji (u vodenom ekstraktu).

Osim količine polifenola u određenoj biljci, važna je i njihova biodostupnost, odnosno količina spoja unesenog u probavni sustav, koji dopijeva do sistemske cirkulacije i ciljnih tkiva, gdje pokazuje svoju biološku aktivnost (D'Archivio i sur., 2010). Prema tome, neki literaturni podaci navode kako se bioraspoloživost flavonoida mijenja unosom masti koji poboljšavaju apsorpciju flavonoida u crijevu zbog povećanja izlučivanja žučnih soli što pospješuje micelarnu ugradnju flavonoida. Međutim, što se tiče unosa proteina, bioraspoloživost flavonoida se pogoršala, budući da interakcija fenolnih kiselina s proteinima utječe na antioksidacijsku učinkovitost i probavljivost proteina (Rodríguez-García i sur., 2019). Kod ugljikohidrata pak flavonoidi mogu promijeniti apsorpciju glukoze nakon visokog unosa ugljikohidratne hrane, jer inhibiraju enzime koji hidroliziraju ugljikohidrate (α -amilaza i α -glukozidaza; Rodríguez-García i sur., 2019).

Prema Pallauf i sur. (2008) utvrđeno je kako su kvercetin i njegovi derivati jedni od najzastupljenijih flavonola u plodu maginje. Istraživanja na kvercetinu pokazala su kako pomaže u prevenciji raznih bolesti kao što su osteoporoza, neke vrste tumora, plućne bolesti te

bolesti krvožilnog sustava (Xu i sur., 2019). Kvercetin (Slika 4) sadrži dva aromatska prstena koji su povezani heterocikličkim prstenom koji sadrži kisik. U reakciji kvercetina sa slobodnim radikalima, on sam postaje radikalom donirajući jedan proton. No, zbog delokalizacije elektrona rezonancijom dobiveni radikal nije reaktivan.



Slika 4. Kemijska struktura kvercetina (Xu i sur., 2019)

Fenolna frakcija izolirana iz ploda maginje uključuje nekoliko kategorija polifenilnih spojeva poput flavonoida i tanina. Od fenolnih kiselina najviše su zastupljene galna, protokatekoińska, gentizinska, β -hidroksibenzoična, vanilinska, m-anisična kiselina te derivati elaginske i galne kiseline. Sadržaj tanina smanjuje se sa stadijem zrenja ploda tako da najmanje tanina imaju potpuno zreli plodovi. Iz ploda maginje izolirano je i desetak vrsta flavonoida (udio 0,1- 0,29 %) od kojih su najznačajniji galokatehin i epikatehin (Španjol i sur., 2021). Neki literaturni podaci navode kako određene podgrupe flavonoida ukazuju na smanjenje rizika od različitih vrsta raka, kao što su katehin i ostali flavonoli za rak prostate, epikatehin za rak dojke, proantocijanidini za rak pluća, flavoni za kolorektalni karcinom. Flavonoidi općenito ukazuju na smanjenje rizika od raka želuca (Rodriguez-Garcia i sur., 2019). Zbog toga, uključivanje namirnica bogatih ovim spojevima od iznimne je važnosti za ljudsko zdravlje.

2.2.2. Vitamini C i E

Dnevna preporučena doza vitamina C u odraslih osoba je između 75 mg (žene) i 90 mg (muškarci), dok je vitamina E potrebno 4 mg za muškarce, odnosno 3 mg za žene (NHS, 2020). Plodovi maginje obiluju vitaminima C i E, pa je tako prema nekim studijama utvrđeno kako plod maginje može sadržavati između 200 i 300 mg 100 g^{-1} FW vitamina C, dok vitamina E u nezrelom voću može biti i do 1369 mg kg^{-1} FW (Bebek Markovinović i sur., 2022a). Rezultati istraživanja kojeg su proveli Šic Žlabur i sur. (2020) u Hrvatskoj pokazali su raspon

koncentracija vitamina C u plodu maginje od 107,63 do čak 402,41 mg 100 g⁻¹ svježeg uzorka maginje što dokazuje kako sastav ploda ovisi o lokaciji na kojoj raste.

Najveća dobivena koncentracija dokazuje kako se ova biljna vrsta može smatrati vrlo dobrim izvorom vitamina C, sa koncentracijom većom i od voćnih i povrtnih vrsta koje su poznate po visokom sadržaju ovog vitamina, kao što su kivi, paprike i agrumi (Bebek Markovinović i sur., 2022a). Valja naglasiti kako sama proizvodnja vitamina C u biljci ovisi o fotosintezi, budući da je glukoza jedan od prekursora za njegovu proizvodnju (Šic Žlabur i sur., 2020). Također, ljudski organizam nije sposoban samostalno proizvesti ovaj vitamin, budući da mu nedostaje enzim L-gulanolakton-oksidaza, posljednji enzim u reakciji nastanka (Domitrović, 2006). Prema tome, ovaj vitamin dobiva na još većoj važnosti s obzirom na njegovu ulogu u raznim tjelesnim funkcijama. Vitamin C je antioksidans i kofaktor koji doprinosi imunološkoj obrani podupirući razne stanične funkcije kod urođenog i kod adaptivnog imunološkog sustava (Carr i Magini, 2017). Prehrana koja uključuje 200 mg ili više vitamina C dnevno povezana je s nižim rizikom za razvoj karcinoma, osobito karcinoma usne šupljine, jednjaka, želuca, debelog crijeva i pluća. Literaturni podaci navode da je kombinirana nadopuna vitamina C i E uspješnija u jačanju imunološkog sustava nego što bi to bilo zasebno za svaki vitamin (Domitrović, 2006), što daje prednost maginji budući da su oba vitamina zastupljena u visokoj koncentraciji. Sinergističko djelovanje ova dva vitamina očituje se tako da vitamin C (askorbinska kiselina) obnavlja ishodni oblik vitamina E (α -tokoferola) reducirajući njegov radikal. Takav obnovljeni α -tokoferol može ponovo reagirati s drugim radikalima lipidnih peroksida inaktivirajući ih i sprječavajući štetne lančane reakcije stvaranja radikala (Miletić, 2012). Vitamin E u tijelu osim što djeluje kao antioksidans, inducira stanice uključene u imunološki sustav, inhibira nakupljanje trombocita i sudjeluje u protuupalnim procesima (Rizvi i sur., 2014).

2.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

Slobodni radikali definiraju se kao kemijske vrste (atomi, molekule ili ioni) koje sadržavaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj valentnoj ljusci ili vanjskoj orbiti te mogu neovisno postojati. Neparan broj elektrona čini slobodne radikale izrazito reaktivnima, zbog čega mogu primati elektrone od drugih spojeva kako bi postigli stabilnost, što uzrokuje da druga molekula gubi ravnotežu i time dovodi do kaskade reakcija te posljedično do oštećenja same stanice (Phaniendra i sur., 2015).

Reaktivne kisikove i dušikove vrste su prirodni nusprodukti staničnog metabolizma koji mogu nastati na više načina; tijekom zračenja UV svjetlom, X-zrakama i gama-zrakama, kao proizvodi reakcija kataliziranih metalima, kao zagađivači u atmosferi, preko neutrofila i makrofaga tijekom upale te kao nusproizvodi reakcija transporta elektrona kataliziranih mitohondrijima i drugim mehanizmima (Valko i sur., 2006). ROS-ovi nastaju u svim normalnim aerobnim reakcijama metabolizma, a među njih ubrajamo superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), „singlet“ kisik (O_2), ozon (O_3) i organske perokside (Vrbanić, 2018). Pri niskim koncentracijama aktiviraju i utječu na različite procese u organizmu, regulirajući unutar-staničnu signalizaciju i održavajući staničnu homeostazu (Jurišić, 2021). U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između stvaranja i uklanjanja ROS-ova zbog prisutnosti antioksidacijskih obrambenih sustava koji reguliraju razinu slobodnih radikala (Kosanović, 2021).

Prekomjerna proizvodnja ROS-ova prevladava kapacitet antioksidacijskih mehanizama te dolazi do oštećenja antioksidacijskih sustava što rezultira oksidativnim stresom i narušenom ravnotežom između proizvodnje ROS-ova te sposobnosti bioloških sustava da ih uklone (Nita i Grzybowski, 2016).

Prema tome, višak ROS-ova uzrokuje oksidativno oštećenje DNA, proteina i lipida. ROS može reagirati s nukleinskom kiselinom napadajući dušikove baze i okosnicu šećernog fosfata te uzrokovati pucanje jednolančane i dvolančane DNA. Oštećenje DNA izazvano oksidativnim stresom može utjecati na regiju mitohondrijske DNA (mDNA) koja kodira proteine uključene u procese staničnog disanja te tako utjecati na oksidativnu fosforilaciju. Mutacije mDNA mogu uzrokovati poremećaje u respiratornom lancu te dovesti do gubitka kontrole deaktivacije ROS-ova. Nemogućnost stanice da popravi nastalu štetu može uzrokovati genetski programiranu smrt stanice (apoptozu) ili mutacije u DNA, što dovodi do karcinogeneze ili razvoja mnogih neurodegenerativnih bolesti (Nita i Grzybowski, 2016).

2.5. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Antioksidans označava bilo koji spoj koji, ako je prisutan u nižoj koncentraciji u usporedbi sa supstratom koji se oksidira, može odgoditi ili spriječiti njegovu oksidaciju (Halliwell, 1990). Mehanizam kojim antioksidansi najčešće djeluju uključuje velik broj raznih enzima, pa se prema tome nazivaju enzimskim antioksidansima. Naime, enzimski antioksidansi grupirani su unutar primarnog i sekundarnog obrambenog sustava. Primarnu obranu čine tri ključna enzima sposobna spriječiti nastanak ili neutralizirati slobodne radikale: glutathion peroksidaza, koja donira dva elektrona koji reduciraju perokside, zatim katalaza koja razgrađuje vodikov peroksid na vodu i molekularni kisik te superoksid dismutaza koja pretvara superoksidne anione u vodik peroksid (Pisoschi i sur., 2016). Sekundarna enzimska obrana sastoji se od glutathion reduktaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Glutathion reduktaza pretvara glutathion u njegov reducirani oblik i tako ga reciklira, dok glukoza-6-fosfat dehidrogenaza reformira reduktivni NADPH (Pisoschi i sur., 2016). Procijenjeno je da enzimski antioksidansi djeluju tako da razgrađuju slobodne radikale i u ovom slučaju se štetne oksidativne vrste pretvaraju u vodikov peroksid i vodu, dok su neenzimatski antioksidansi uglavnom prekidači lanca.

Osim enzimatskih i neenzimatskih, postoje još i endogeni te egzogeni antioksidansi. Egzogeni antioksidansi dolaze iz prehrane, npr. karotenoidi, tokoferoli, vitamin D, fenolne kiseline, flavonoidi ili askorbinska kiselina, kao i metaboliti visoke molekularne mase, poput tanina. Važni su u suzbijanju reaktivnih kisikovih vrsta kada endogeni spojevi nisu u stanju osigurati temeljitu zaštitu (Pisoschi i sur., 2016).

Polifenoli su biljni spojevi sa antioksidacijskim efektom, koji posjeduju snažna svojstva hvatanja ROS-ova, odnosno pružaju zaštitu od oštećenja nastalog njihovim djelovanjem. Polifenolni spojevi mogu djelovati i kao antioksidansi i kao prooksidansi, ovisno o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala te o prisutnosti prijelaznih metala kao što je bakar, koji potiče njihovu prooksidativnu aktivnost (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Kao prooksidansi, polifenoli mogu inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju (Perica, 2020), što se može objasniti činjenicom da polifenolne tvari čini različit broj spojeva s različitim djelovanjem pa se svojstvo jednog spoja ne može podrazumijevati i za ostale spojeve.

Protuupalna i antibiotska svojstva mogu aktivirati transkripcijski faktor Nrf2, koji igra ključnu ulogu u staničnoj zaštiti protiv oksidativnog stresa i upale. Također, mehanizmi uključeni u antioksidacijsku aktivnost polifenola uključuju supresiju formiranja ROS-ova tako da inhibiraju enzime uključene u njihovu proizvodnju ili regulaciju, odnosno zaštitu od antioksidativne

obrane (Hussain i sur., 2016). Polifenoli mogu smanjiti katalitičku aktivnost enzima uključenih u stvaranje ROS-ova. Zabilježeno je da stvaranje ROS-ova povećava slobodne metalne ione redukcijom vodikove peroksidaze uz stvaranje visoko reaktivnog hidroksilnog radikala. Niži redoks potencijali polifenola su termodinamički sposobni reducirati visoko oksidirajuće slobodne radikale zbog njihove sposobnosti keliranja metalnih iona (željeza, bakra, itd.) i slobodnih radikala. Na primjer, kvercetin ima svojstva keliranja i stabilizacije željeza (Hussain i sur., 2016).

Voće predstavlja bogat izvor antioksidansa, posebice polifenola, a nedostatan unos voća i povrća u organizam može dovesti do raznih kroničnih poremećaja, kao što su rak i srčane bolesti (Fortalezas i sur., 2010) upravo zbog nedostatka antioksidansa koji bi svojim mehanizmima stali u obranu protiv ROS-ova.

2.6. *In vitro* TESTOVI CITOTOKSIČNOSTI

Određivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva iz biljaka provodi se izvođenjem niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) kako bi se na temelju toga mogao procijeniti njihov učinak na ljude (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

In vitro testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Naime, *in vitro* testovima citotoksičnosti omogućeno je kontroliranje okolišnih uvjeta, karakterizacija i homogenost uzorka, izbjegavanje pokusa na životinjama te su ovakvi testovi puno jeftiniji od testova na životinjama (Negovec, 2017). Unatoč tome, *in vitro* metode još uvijek nisu pogodne za sve vrste istraživanja zbog mogućnosti promjene karakteristika određene stanične linije nakon razdoblja kontinuiranog rasta, kao i moguće kontaminacije tijekom provođenja eksperimenta.

In vitro testovi najčešće uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva i kulturama organa (Kniewald i sur., 2005). Osim inhibitornog učinka navedenim testovima može se odrediti i stimulativni, odnosno proliferirajući učinak na rast stanica u kulturi zbog čega *in vitro* testovi imaju jako široku primjenu (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Sukladno tome, ovakvi testovi u znanosti koriste se za ispitivanje potencijalno aktivnih spojeva iz biljaka koja imaju razna djelovanja, od kojih su antitumorski i antioksidacijski učinak najčešće ispitivana svojstva. Mnogi dokazi o

prevenciji bolesti primjenom polifenola dobiveni su *in vitro* istraživanjima ili testiranjem na životinjama, no pri provođenju takvih eksperimenata koriste se znatno veće doze od onih koje ljudi unose prehranom. Stoga, nužno je poznavanje metabolizma, bioraspoloživosti i rasprostranjenosti različitih polifenolnih spojeva te njihovog sadržaja u hrani (Scalbert i sur., 2005).

Citotoksičnost se definira kao sposobnost kemikalije da ošteti žive stanice remećenjem funkcionalnih i strukturnih značajki povezanih s općim staničnim održavanjem (Tabernilla i sur., 2021). Kako bi se ispitala selektivna citotoksičnost različitih agenasa prema određenom tipu tumorskih stanica rabe se stanične linije. Za nastanak jedne stanične linije potrebno je proći kroz nekoliko procesa; započinje se od primarne kulture koja nastaje kada se stanice mehaničkim usitnjavanjem tkiva, uz pomoć skalpela ili enzima, izdvoje iz životinjskog tkiva te se prenesu u medij za uzgoj. Nadalje, subkultiviranjem primarne kulture razvija se stanična linija, odnosno populacija stanica koju karakterizira kontinuirani rast. Danas su u uporabi stanice koje potječu iz primarnih staničnih kultura, a naknadnom selekcijom i transformacijama dobivene su kontinuirane stanične linije odgovarajućih svojstava. Dvije najveće banke stanica na svijetu su American Type Culture Collection (ATCC) i The European Collection of Animal Cell Culture (ECACC; Sente, 2012). Stanične linije koje su se koristile u ovom radu potječu od ATCC zbirke.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

Priprema uzorka ekstrakta maginje korištenog u ovom radu provedena je u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svježi plodovi maginje su liofilizirani te su neposredno prije pripreme uzoraka usitnjeni u tarioniku.

Uzorku od 1 g liofilizirane maginje dodano je 10 mL Ham's F-12 medija za uzgoj stanica te je postavljen na ultrazvučnu kupelj pri temperaturi 40 °C u vremenu od 30 minuta, nakon čega je uzorak stavljen na centrifugiranje 20 minuta pri brzini od 6500 okretaja min^{-1} kako bi se biološke komponente uzorka što bolje ekstrahirale. Za daljnje provođenje eksperimenta korišten je dobiveni supernatant. Ishodišna otopina s koncentracijom maginje 100 mg mL^{-1} korištena je za pripremu radnih otopina ($\gamma = 0,01, 0,1, 1, 10 \text{ mg mL}^{-1}$). Odabrani raspon koncentracija utvrđen je prema preporučenoj dnevnoj dozi polifenola.

3.1.2. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustavi u ovom radu korištene su kontinuirane humane stanične linije probavnog trakta te Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Osim toga, korišten je i plazmid $\Phi\text{X174 RF1 DNA}$.

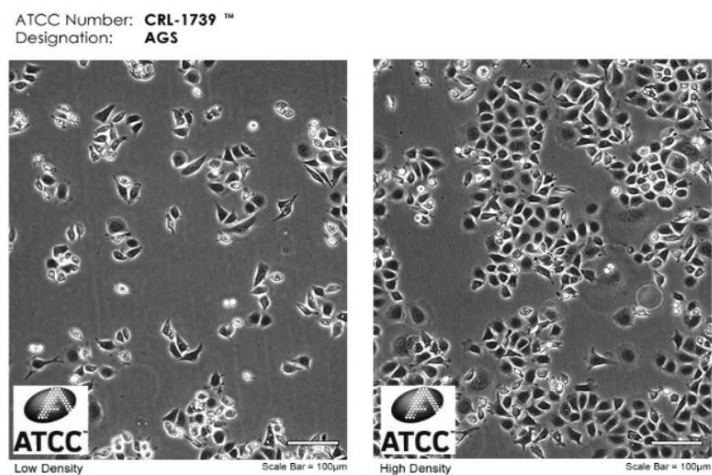
3.1.3. Kontinuirane humane stanične linije

Kontinuirane humane stanične linije koje su korištene u ovom radu su AGS (slika 5), izolirana iz adenokarcinoma epitela želuca, zatim CAL27 (slika 6), izolirana iz pločastog epitela tumora jezika, Caco-2 (slika 7), izolirana iz primarnog karcinoma debelog crijeva i HepG2 (slika 8), izolirana iz hepatocelularnog karcinoma jetre.

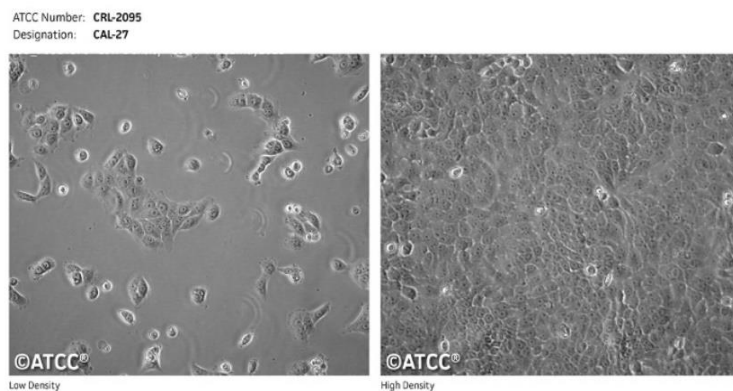
Navedene stanične linije su uzgajane u monosloju u T-bocama u kompletiranom mediju (Ham's F-12 s L-glutaminom) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum*, *FBS*) konačne koncentracije od 10 %. Stanice su uzgajane u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C u kontroliranim uvjetima atmosfere s 5% CO_2 . Nakon uzgoja, stanice se odvajaju od podloge dodatkom 0,25%-tne otopine tripsina, te se nakon 15-minutne inkubacije (ovisno o vrsti stanične linije, inkubacija može biti i duža ako nije došlo do odvajanja stanica od podloge)

djelovanje tripsina zaustavlja dodatkom jednake količine medija sa serumom u odnosu na tripsin.

Željena koncentracija stanica koja se nasađuje na mikrotitarsku ploču iznosi 10^5 st mL^{-1} , a ona se postiže prvobitnim brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici (slika 9).

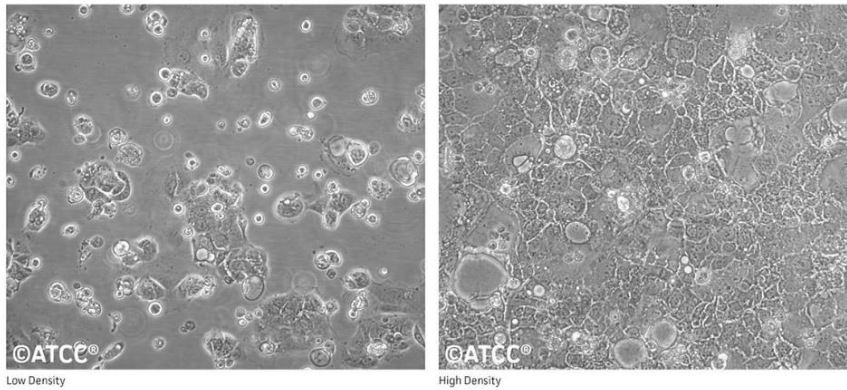


Slika 5. Komercijalno dostupna AGS stanična linija (ATCC, 2022)



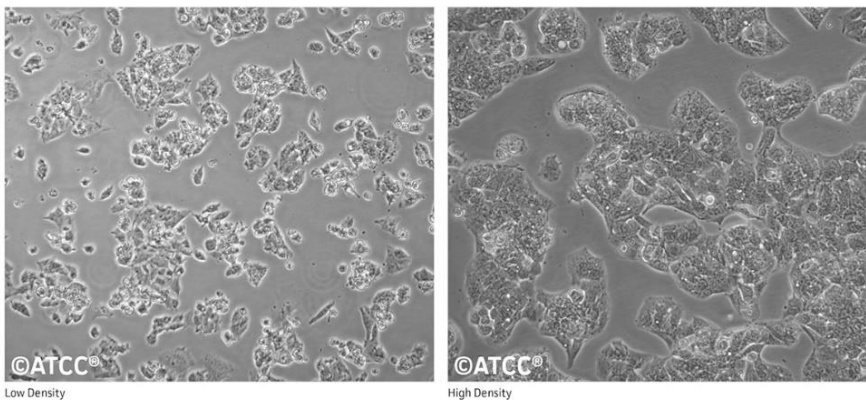
Slika 6. Komercijalno dostupna CAL 27 stanična linija (ATCC, 2022)

ATCC Number: **HTB-37**
Designation: **Caco-2**



Slika 7. Komercijalno dostupna Caco-2 stanična linija (ATCC, 2022)

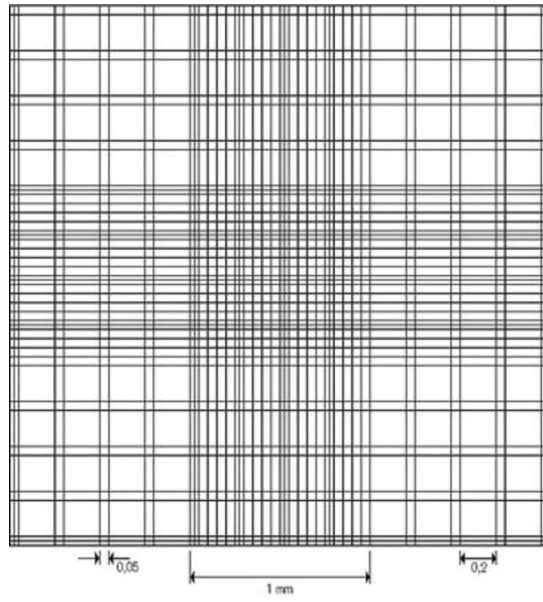
ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



Slika 8. Komercijalno dostupna HepG2 stanična linija (ATCC, 2022)

3.1.4. Brojanje stanica pomoću Bürker-Türkove komorice

Brojanje stanica započinje tako da se 10 μL suspenzije stanica prebaci na komoricu, prekrije stakalcem i stavlja pod svjetlosni mikroskop. Bürker-Türkova komorica sastoji se od četiri velika kvadrata, a u svakom od njih nalazi se 16 manjih kvadrata, kao što je prikazano na slici 9. Potrebno je u svakom velikom kvadratu odrediti broj stanica te izračunati njihovu srednju vrijednost u cijeloj komorici. Volumen velikog kvadrata iznosi 10^{-4} mL, a prostor između predmetnice i pokrovnog stakalca 0,1 mm, što znači da je površina svakog kvadrata 1 mm^2 . Konačan broj stanica izražava se kao broj stanica po mL (Christensen i sur., 2005).



Slika 9. Bürker-Türkova komorica za brojanje stanica (prilagođeno prema Christensen i sur., 2005)

3.1.5. Kemikalije

- *Agarozna niske točke tališta (LMP), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- *Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- *Bromtimol plavo, Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- *Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- *Etidij-bromid (C₁₂H₂₀BrN₃), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- *Etanol (C₂H₅OH), Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- *Fetalni goveđi serum, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka*
- *Neutral red, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- *Octena kiselina (CH₃COOH), Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- *Plazmid ϕ X174 RF1 DNA, Thermo Scientific, SAD*
- *Ham's F-12 s L-glutaminom, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka*
- *Trikloroctena kiselina (TCA), Fisher Scientific, Engleska*
- *Tripsin, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka*
- *Vodikov peroksid (H₂O₂), Kemika, Zagreb, Hrvatska*

3.1.5.1. Otopine

Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL⁻¹

Neutral red 50 mg

Etanol 10 mL

Radna otopina Neutral red-a

Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL⁻¹ 0,1 mL

Ham's F-12 s L-glutaminom hranjivi medij 9,9 mL

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

DCFH-DA 1,5 mg

DMSO 1,5 mL

Radna otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 50 μ M

Ishodišna otopina DCFH-DA, 2 mM 0,25 mL

PBS pufer (pH = 7,2 – 7,4) 9,75 mL

Fosfatni pufer – PBS (pH = 7,2 - 7,4)

NaCl 8,0 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 1,16 g

K₂HPO₄ 0,2 g

Demineralizirana voda 1000 mL

Sterilizacija fosfatnog pufera provodi se 15 minuta pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1,01 x 10⁵ Pa.

TAE pufer, 10x

Tris-HCl 48,4 g

Ledena octena kiselina 11,4 mL

EDTA 3,7 g

Demineralizirana voda do 1000 mL

Agarozni gel (1 %)

Agarozna 1,5 g

TAE pufer, 1x 150 mL

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

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

Otopina za odbojavanje

<i>Demineralizirana voda</i>	<i>100 mL (50 %)</i>
<i>Etanol</i>	<i>98 mL (49 %)</i>
<i>Ledena octena kiselina</i>	<i>2 mL (1 %)</i>

3.1.5.2 Hranjive podloge

U ovom radu korištena je tekuća kompletna LB (eng. *Luria-Bertani*) hranjiva podloga za kultivaciju bakterije *Staphylococcus aureus*, M9 podloga uz dodatak laktoze (M9+lac) za kultivaciju bakterije *Escherichia coli*, dok je tekuća MRS (eng. *Man, Rogosa and Sharpe broth*) podloga korištena za kultivaciju bakterije *Lactobacillus fermentum*. Sastav pojedine podloge određen je prema uputama proizvođača te je prikazan u Tablicama 1, 2 i 3. Hranjive podloge je prije korištenja potrebno sterilizirati u autoklavu pri temperaturi $121 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku 1 atm tijekom 15 minuta. Za pripremu krutih hranjivih podloga jednakog sastava, prije sterilizacije je u tekuću hranjivu podlogu potrebno dodati 4,5 g agara.

Tablica 1. Sastav M9+lac podloge

Prije sterilizacije		Nakon sterilizacije	
sastojak	količina	sastojak	količina
Na_2HPO_4	1,8 g	1 M MgSO_4	600 μL
KH_2PO_4	0,9 g	1 M CaCl_2	30 μL
NaCl	0,15 g	20%-tna laktoza	3 mL
NH_4Cl	0,3 g	Tiamin (2 mg/L)	300 μL
Destilirana voda	300 mL		

Tablica 2. Sastav LB podloge

sastojak	količina
Bakto-tripton	3g
Kvaščev ekstrakt	1,5g
NaCl	1,5g
Destilirana voda	300 mL

Tablica 3. Sastav MRS podloge

sastojak	količina
MRS Broth	4,5 g
antibiotik	90 μ L
Destilirana voda	300 mL

3.1.6. Laboratorijska oprema

3.1.6.1. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, 1712 Mp8 Silver Edition, Sartorius, Engleska
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu, HC-240, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, Cecil Instruments Ltd, Engleska
- Digestor
- 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
- Tehnička vaga, Sartorius, Engleska
- Uređaj za elektroforezu, Life Technologies, New York, SAD
- Vibromikser EV-202, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, New Brunswick Scientific, SAD
- Ultrazvučna kupelj, DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5L, 860W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka
- Analitička vaga, ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka
- Centrifuga, Thermo Scientific™, Megafuge™ 16R, Kalkberg, Njemačka

3.1.6.2. Laboratorijski pribor

- Aluminijska folija
- Automatska propipeta, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena, 20-1000 mL
- Laboratorijske staklene čaše različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Marker 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
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Sterilni filteri
- Špatula
- T-boce, Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL
- Erlenmeyerova tikvica sa šlifom, 50 mL
- Stakleni lijevak, filter papir

- Plastične falkonice, 50 mL
- Metalna špatula
- Štapni mikser

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ekstrakta maginje za određivanje bioaktivnog sastava

Postupak ekstrakcije provodi se na način da se unaprijed odmrznuti plodovi maginje usitnjavaju štapnim mikserom pri čemu se dobije homogena pulpa maginje. Odvažuje se 5 g uzorka pulpe od maginje u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL te se nadoda 20 mL destilirane vode. Potom se sa špatulom dodatno usitni kaša maginje na čestice promjera manjeg od cca. 0,3 mm. Tako pripremljena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi 50 °C i vremenu 15 min. Po provedenoj ekstrakciji, uzorci se profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 25 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake (Bursać Kovačević i sur., 2016).

3.2.2. Metode za određivanje bioaktivnog sastava ekstrakta maginje

Određivanje ukupnih fenola se provodi primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 725 nm dobiva se vrijednost potrebna za izračun ukupnih fenola prema jednadžbi pravca baždarnog dijagrama za standard galne kiseline (Yuan i sur., 2018). Ukupni flavonoidi se određuju metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri 415 nm (Chang i sur., 2002). Ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupni flavonoli određivani su prema metodi iz literature pri čemu se reakcijskoj smjesi intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003). Monomerni antocijani određeni su službenom AOAC metodom (AOAC, 1990), koja se temelji na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju kemijsku strukturu što rezultira promjenom apsorpcijskog spektra. Princip određivanja kondenziranih tanina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998). Detaljan opis svih ovih analiza dan je u literaturi (Bebek Markovinović i sur., 2022b; Bebek Markovinović i sur., 2022c).

3.2.3. Ispitivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim humanim staničnim linijama Neutral red metodom

Neutral red je kationska boja koja aktivnim transportom prolazi kroz staničnu membranu u živoj stanici i akumulira se u lizosomima (Kolarić, 2016). Metoda se provodi tako da se na mikrotitarsku pločicu u svaku jažicu nacijepi 100 μL stanica koncentracije 10^5 st mL^{-1} . Nakon što se stanice vežu za podlogu, tretiraju se odgovarajućim koncentracijama ekstrakta maginje. Koncentracije su pripremljene na način da je iz ishodišne otopine uzet određeni alikvot i u njega dodan medij. Prvo se od stanica koje su se vezale za podlogu mikrotitarske ploče odvoji ostatak medija te se potom stanice tretiraju sa 100 μL ekstrakta određene koncentracije. Za svaku koncentraciju rađeno je 8 paralela u 3 zasebna eksperimenta. Tretman stanica s ekstraktima trajao je 2 h, odnosno 15 min za CAL 27 staničnu liniju.

Kada se provodio tretman stanica s 24-satnim oporavkom, nakon tretmana stanicama je izvađen ekstrakt s medijem, isprane su 2 puta otopinom PBS-a, te im je dodano 100 μL svježeg medija i vraćene su u CO_2 inkubator na 24 h. Nakon 24 h, sa stanica je uklonjen medij te su tretirane Neutral red bojom i vraćene u inkubator na 45 min, tijekom kojih se boja nakuplja u lizosomima živih stanica. Nakon isteka vremena, stanice su isprane PBS puferom, a boja se iz lizosoma ekstrahira otopinom za odbojavanje te se intenzitet ekstrahirane boje mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 520 nm.

Za tretman stanica bez oporavka, nakon tretmana se uklanja medij, na stanice se dodaje 100 μL Neutral Red boje i provodi inkubacija 45 min u CO_2 inkubatoru pri 37 °C. Nakon toga, stanice su 2 puta isprane otopinom PBS-a te se na njih dodaje otopina za odbojavanje, nakon čega se mjeri apsorbanacija ekstrahirane boje pri prethodno navedenoj valnoj duljini.

3.2.4. Ispitivanje citotoksičnog učinka ekstrakta maginje na bakterijskim kulturama

Bakterijske kulture navedene u *Poglavlju 3.1.5.2* uzgojene su do eksponencijalne faze u prethodno pripremljenim tekućim hranjivim podlogama. Uzgojene bakterije tretirane su sa 5 različitih koncentracija ekstrakta maginje (0,01, 0,1, 1, 10 i 50 mg mL^{-1}) po 2 paralele. Postupak se provodio tako da je u 200 μL bakterijskog soja dodana odgovarajuća koncentracija ekstrakta maginje i volumen medija tako da ukupni volumen u Eppendorf epruveti iznosi 400 μL . Osim toga, pripremljena je i negativna kontrola koja je sadržavala samo 200 μL bakterijskog soja i 200 μL medija. Pripremljeni uzorci stavljeni su na 1 h u inkubator pri temperaturi od 37 °C. Nakon isteka 1 h, pripremljena su mikrorazrjeđenja, tako da je iz svake jažice izuzeto 10 μL

sadržaja jažice i pomiješano sa 90 μL PBS pufera. Zatim je na odgovarajuće krute hranjive podloge nasadeno 3 puta po 10 μL 10^{-6} , 10^{-5} i 10^{-4} razrjeđenja u 2 paralele. Krute hranjive podloge stavljene su u inkubator na 24 h, a drugi dan je prebrojan broj izraslih kolonija (eng. *CFU – Colony-Forming Unit*). Rezultati preživljenja bakterija nakon tretmana izračunati su prema formuli [1]:

[1]

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

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

2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) metoda jedna je od najčešćih metoda za određivanje udjela ROS-ova (Eruslanov i Kusmartsev, 2010). DCFH-DA je nefluorescentna boja koja u prisutnosti ROS-ova oksidira u 2',7'-diklorofluorescein (DCF), koji je izrazito fluorescentan (Yang i sur., 2014). Intenzitet fluorescencije mjeri se fluorimetrom, a sam intenzitet proporcionalan je koncentraciji ukupnih ROS-ova u stanici.

Kako bi se ispitao antioksidacijski potencijal različitih koncentracija ekstrakta maginje, u crnu mikrotitarsku ploču nacijepnjeno je po 100 μL kulture stanica koncentracije od 10^5 stanica mL^{-1} , osim u posljednju jažicu koja je služila kao kontrola. Nakon 24-satne kultivacije stanica u CO_2 inkubatoru pri temperaturi $37\text{ }^\circ\text{C}$ i kontroliranoj atmosferi (5% CO_2 i 95% zraka), uklonjen je stari medij te su stanice tretirane sa 100 μL različitih koncentracija ekstrakta maginje (0,01, 0,1, 1, 10 i 100 mg mL^{-1}), prethodno pripremljenih u hranjivom mediju. Kao kontrola korišten je hranjiv medij bez ekstrakta. Tretman stanica trajao je 2 h, odnosno 15 min za CAL27 staničnu liniju.

Nakon završetka tretmana, izvađen je ostatak ekstrakta te su stanice 2 puta isprane sa 100 μL PBS pufera. Ovisno o tome da li se radilo o stanicama s 24-satnim oporavkom ili bez, sljedeći koraci se razlikuju. Kod stanica bez oporavka, u svaku jažicu je dodano po 100 μL razrijeđene otopine DCFH-DA, te su stanice inkubirane 45 min pri $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini emisije od 485 nm i valnoj duljini ekscitacije od 530 nm.

Kod 24-satnog oporavka, nakon ispiranja stanica PBS-om, dodano im je 100 μL svježeg medija te su vraćene u inkubator. Sljedeći dan, uklonjen je medij te su stanice tretirane otopinom DCFH-DA, inkubirane 45 min pri 37 °C u CO₂ inkubatoru, te je nakon isteka inkubacije izmjeren intenzitet fluorescence pri prethodno navedenim uvjetima.

3.2.6. Antioksidacijski učinak ekstrakta maginje na DNA prikazan na modelnom plazmidu $\phi\text{X174 RF1}$

Agarozni gel za elektroforezu priprema se tako da se 1 g agaroze pomiješa sa 100 mL TAE pufera (1%) i otapa u mikrovalnoj pećnici, sve dok se ne dobije bistra otopina. Navedena homogena otopina se djelomično ohladi pod mlazom vode do 60 °C nakon čega se prebacuje u kalup i dodaje se češljic za formiranje jažica. Nakon određenog vremena formira se čvrsti gel te se uklanja češljic.

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 μL pripremi se za 5 različitih uzoraka po dvije paralele, ali i za 4 različite vrste kontrola. Pripremljeni uzorci prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Reakcijska smjesa za gel elektroforezu

uzorak	TE pufer (μL)	Plazmid (μL)	3 %-tni H ₂ O ₂ (μL)	Ekstrakt maginje (μL)
Negativna kontrola	17	3		
Negativna kontrola	16	3	1	
Pozitivna kontrola + UV	17	3		
Pozitivna kontrola + UV	16	3	1	
*Stock 2 + UV	14	3	1	2
*Stock 3+ UV	14	3	1	2
*Stock 4 + UV	14	3	1	2
*Stock 1 + UV	14	3	1	2
Stock 1 + UV		3	1	16

*Ishodišna otopina 1: 100 mg mL⁻¹ ekstrakta maginje

Ishodišna otopina 2: 0,1 mg mL⁻¹

Ishodišna otopina 3: 1 mg mL⁻¹

Ishodišna otopina 4: 10 mg mL⁻¹

Pripremljeni uzorci tretirani su UV zračenjem na 10 minuta kako je označeno u Tablici 4. Prije nanošenja uzoraka na jažice gela, gel se prelije s 1x TAE puferom. Nakon toga, u uzorke je dodano po 1 μL pufera za nanošenje (eng. *loading buffer*) čime je omogućeno praćenje tijekom elektroforeze te povećanje gustoće uzorka. U zadnju jažicu nanoseno je 5 μL standarda (1 kb *plus DNA ladder for safe stans; BioLabs*). Konačno, pokrenuta je elektroforeza na 1 h i 50 minuta pri jakosti od 60 V. Nakon provedene elektroforeze, gel je bojan u otopini etidij bromida koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u trajanju 1 h i 30 minuta.

3.2.7. Obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su u JASP programu 0.16.4.0, odnosno primjenom ANOVA statističke analize sa Scheffe i Tukey *Post Hoc* testom usporedbe. Rezultati gel elektroforeze obrađeni su u programu *Gel Analyser*. Rezultati dobiveni u navedenim programima dalje su obrađeni u Microsoft Excel programu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Biološki učinak aktivnih tvari vodenog ekstrakta maginje ispitan je na kontinuiranim humanim staničnim linijama (CAL 27, HepG2, AGS, Caco-2), bakterijama *L. plantarum*, *E. coli*, *S. aureus* i na plazmidu ϕ X174 RF1 DNA. Odabrani raspon koncentracija koje su se ispitivale odgovarao je očekivanom unosu ekstrakta maginje u organizam, pri čemu je koncentracija od 0,015 mg mL⁻¹ sukladna preporučenoj dnevnoj dozi.

Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta maginje na odabranim humanim staničnim linijama određen je Neutral red metodom, dok je antioksidacijski učinak određen DCFH-DA metodom.

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

Antioksidacijski učinak maginje na modelni plazmid određen je elektroforezom u agaroznom gelu.

Svi rezultati prikazani su na slikama 10-20.

4.1. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG SASTAVA

Određivanje bioaktivnog sastava ekstrakta maginje provedeno je kako je navedeno u poglavlju 3.2.2., a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Bioaktivni sastav ekstrakta maginje

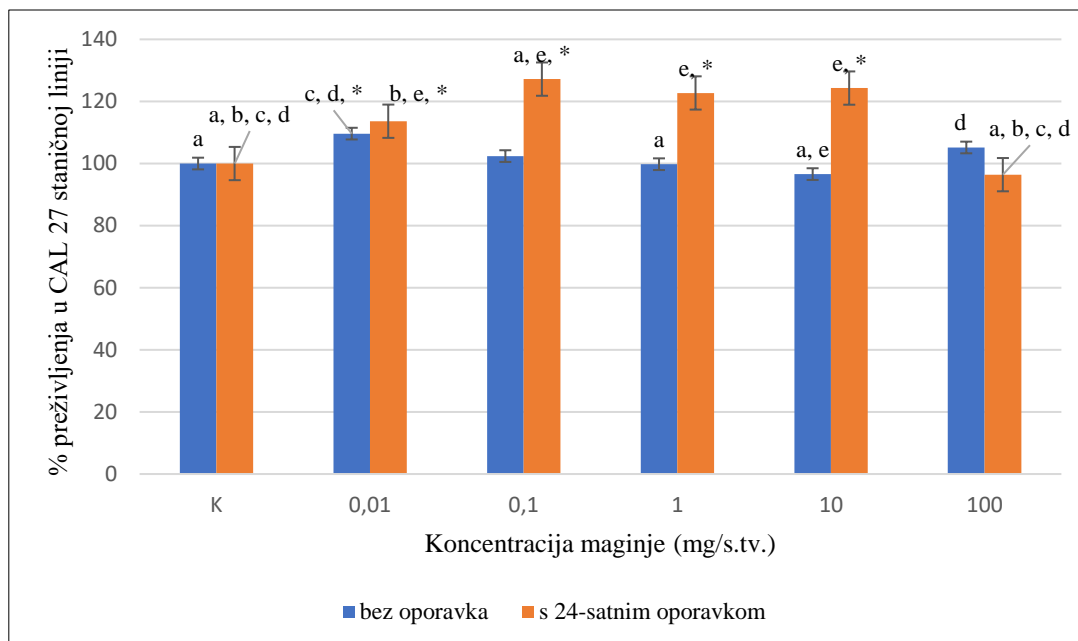
Bioaktivni spojevi	mg 100 g⁻¹
Ukupni fenoli	460,95 ± 31,11
Hidroksicimetne kiseline	27,25 ± 2,97
Ukupni flavonoli	7,18 ± 1,11
Ukupni flavonoidi	6,13 ± 1,48
Ukupni monomerni antocijani	5,78 ± 0,71
Kondenzirani tanini	176,64 ± 22,39

4.2. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I PROLIFERATIVNOG UČINKA EKSTRAKTA MAGINJE

4.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim staničnim linijama

Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina različitih koncentracija ekstrakta maginje (0,01, 0,1, 1, 10 i 100 mg mL⁻¹) provedeno je Neutral red metodom (opisanom u poglavlju 3.2.3.), na kontinuiranim humanim staničnim linijama CAL 27, HepG2, AGS i Caco-2 u vremenu izloženosti stanica od 2 h, odnosno 15 min za CAL27 staničnu liniju.

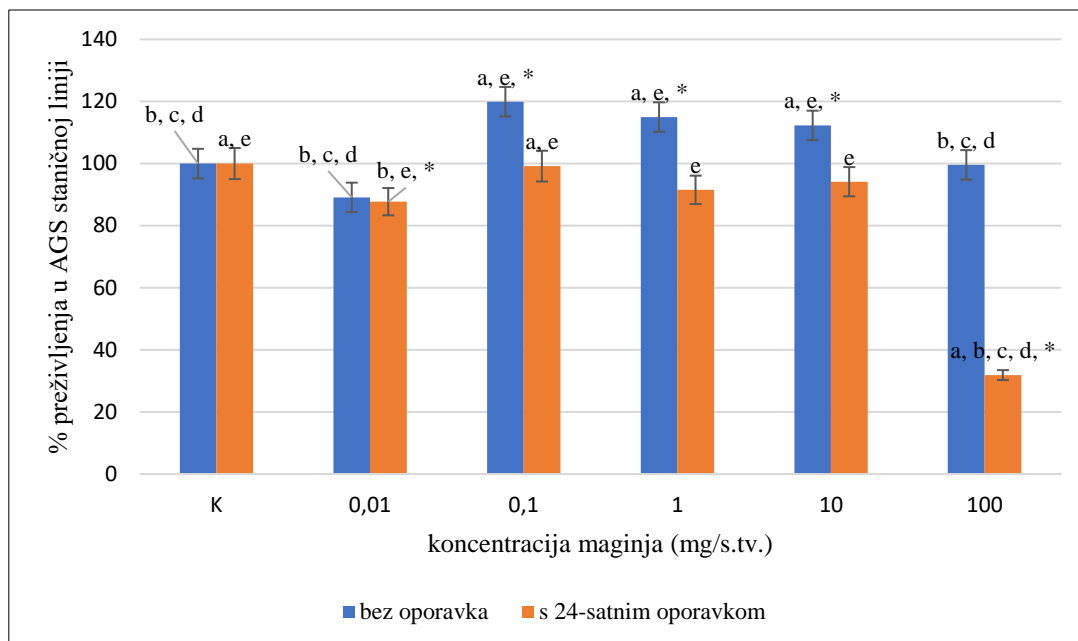
Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost postotka preživljenja stanica o koncentracijama ekstrakta maginje (slike 10 – 13).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

Slika 10. Preživljenje CAL 27 stanične linije nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta maginje bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

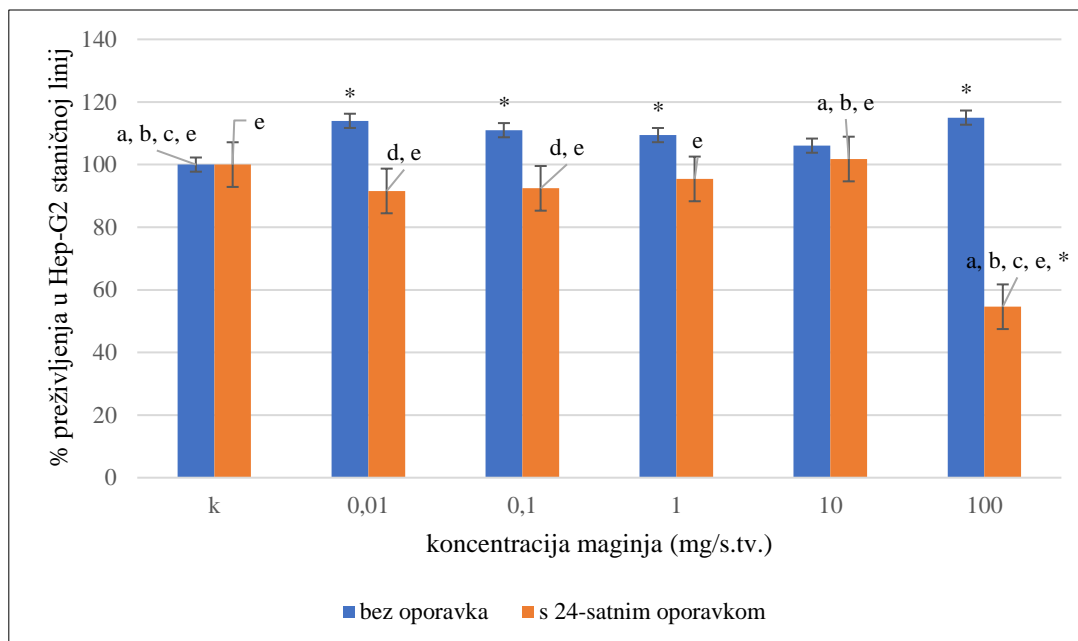
Prema grafičkom prikazu na Slici 10, može se uočiti kako niti jedna koncentracija ekstrakta maginje kod tretmana bez oporavka ne djeluje citotoksično na staničnu liniju CAL27. S druge strane, kod tretmana stanica s 24-satnim oporavkom primjećuje se blago proliferativni učinak, ponajviše kod 0,1 mg mL⁻¹ koncentracije maginje, dok pri najvećoj koncentraciji (100 mg mL⁻¹) nema većih promjena.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

Slika 11. Preživljenje AGS stanične linije nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta maginje bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

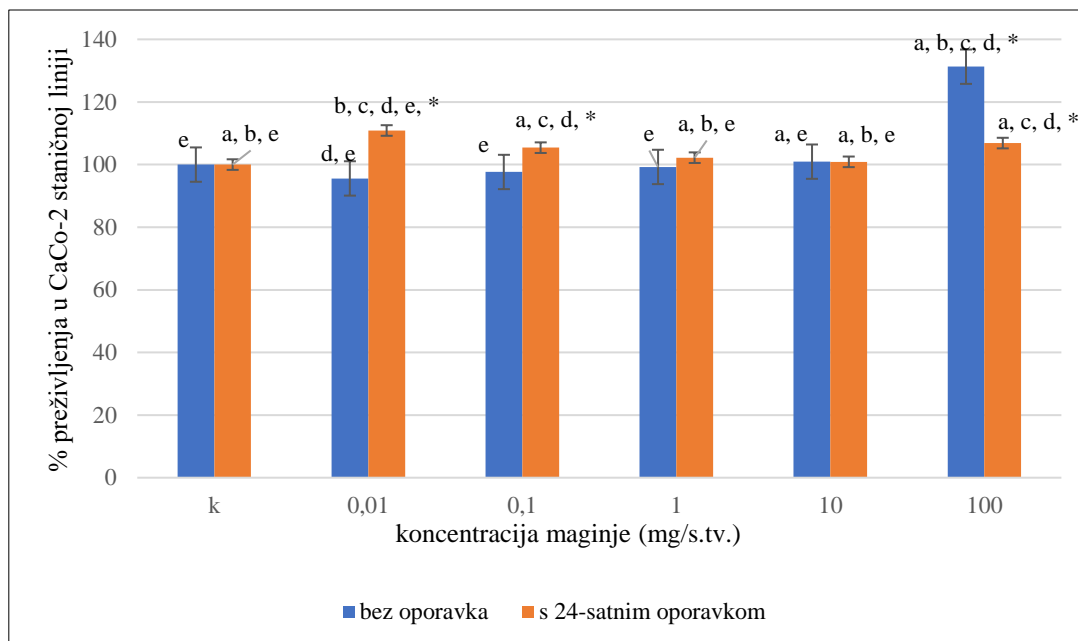
Grafički prikaz na Slici 11, koji prikazuje AGS staničnu liniju, dovodi do zaključka kako tretman bez oporavka pokazuje najveći proliferativni učinak pri koncentraciji 0,1 mg mL⁻¹ koji je statistički značajan u odnosu na kontrolu, nakon čega slijedi blagi pad, odnosno pri najvećoj koncentraciji (100 mg mL⁻¹) nema proliferativnog učinka. Kod tretmana s oporavkom uočen je statistički značajan pad preživljenja pri koncentraciji 100 mg mL⁻¹ u odnosu na ostale ispitivane koncentracije.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

Slika 12. Preživljenje HepG2 stanične linije nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta maginje bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

Prema grafičkom prikazu na Slici 12, kod tretmana HepG2 stanične linije bez oporavka može se uočiti blagi proliferativni učinak koji je najveći pri najvećoj koncentraciji ekstrakta maginje (100 mg mL⁻¹), dok kod tretmana s 24-satnim oporavkom pri najvećoj koncentraciji (100 mg mL⁻¹) dolazi do statistički značajne inhibicije rasta.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

Slika 13. Preživljenje Caco-2 stanične linije nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta maginje bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

Prema grafičkom prikazu na Slici 13, tek pri najvećoj koncentraciji maginje dolazi do značajnog povećanja vijabilnosti CaCO-2 stanične linije. Produljenjem tretmana na 24 h nema značajne promjene u vijabilnosti stanica.

Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je kako citotoksični učinak ekstrakta maginje ovisi o vremenu izloženosti stanica, ali i o samoj vrsti stanica. Prema tome, CAL27 stanična linija pokazuje najveći postotak preživljenja u odnosu na ostale stanice. Razlog tomu može biti kraća izloženost stanica ekstraktu od ostalih stanica, ali i činjenica da je CAL27 manje metabolički aktivna od ostalih staničnih linija (Jurič i sur., 2022).

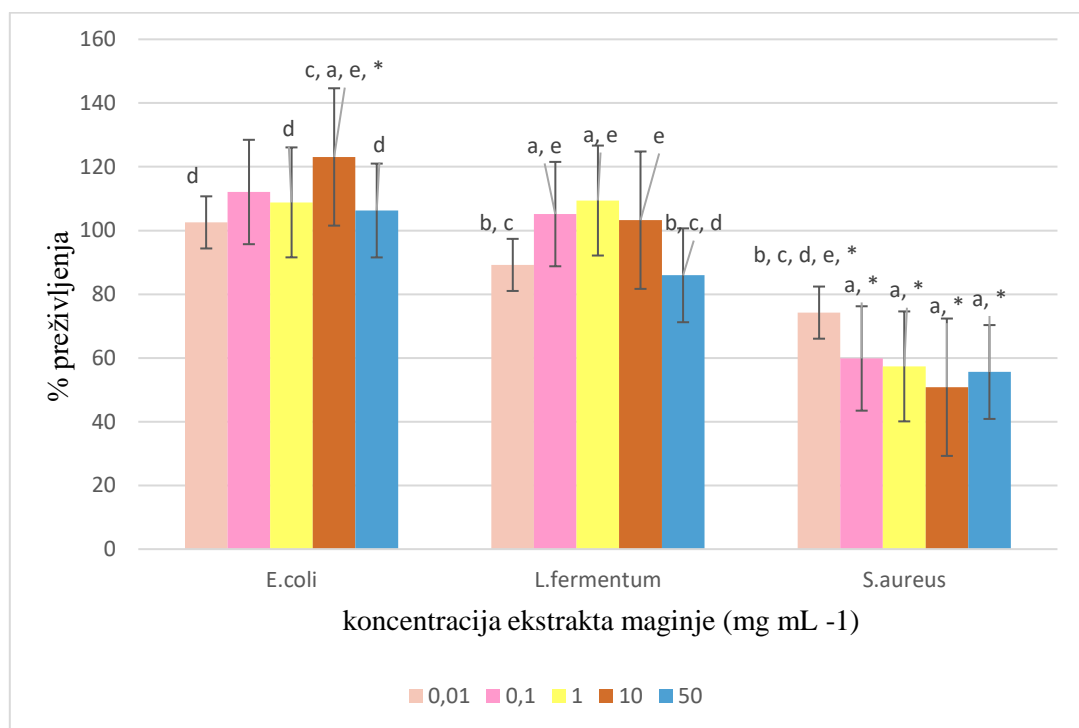
Test citotoksičnosti u upotrebi je kada se želi odrediti vijabilnost stanica nakon izlaganja određenom spoju ili tvari. U radu Lopez-Corona i sur. (2022) pokazali su da je antikancerogeno djelovanje koje se pripisuje fenolnim spojevima ovisno o dozi. Zbog sličnosti u fenolnom sastavu ploda maginje s plodom maline, Fortalezas i sur. (2010) procijenili su antioksidativna svojstva ploda maginje *in vitro* na modelu neurodegeneracije stanica, služeći se plodom maline

kao kontrolom. Prema ovom radu, čini se kako mnogi biljni sekundarni proizvodi imaju paradoksalan učinak na bolesti koji ovisi o njihovoj koncentraciji, odnosno pri niskim koncentracijama određeni spoj pokazuje blagotvoran učinak, dok pri većim koncentracijama pokazuje toksičan efekt jer je njegova koncentracija previsoka za organizam, odnosno stanice. Konkretno, provođenjem testova toksičnosti na staničnoj liniji humanog neuroblastoma (SK-N-MC), pri četverosatnoj inkubaciji u rasponu od 0 do 500 $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$ medija, nisu uočeni toksični učinci na vijabilnost stanica za obje voćne vrste, sve do vrijednosti od 125 $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$, gdje se za vrijednosti veće od 125 $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$ sposobnost preživljenja smanjila (Fortalezas i sur., 2010). Taj fenomen mogao bi objasniti zašto pri najvećim koncentracijama ekstrakta maginje (100 mg mL^{-1}) dolazi do značajnog pada vijabilnosti kod staničnih linija HepG2 i AGS.

Ovi rezultati upućuju na nisku razinu citotoksičnosti i visoku biokompatibilnost neovisno o koncentraciji, što postavlja dobre temelje za daljnja istraživanja i primjenu same biljke.

4.2.2. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta maginje na bakterije *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus*

Nakon tretmana s određenim koncentracijama ekstrakta maginje (0,01, 0,1, 1, 10 i 50 mg mL⁻¹), mikrorazrjeđenja bakterijske suspenzije nasadene su na odgovarajuće krute hranjive podloge. Porasle kolonije su izbrojane nakon 24 h inkubacije na 37 °C, a preživljenje bakterija je izraženo kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolu.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 50 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

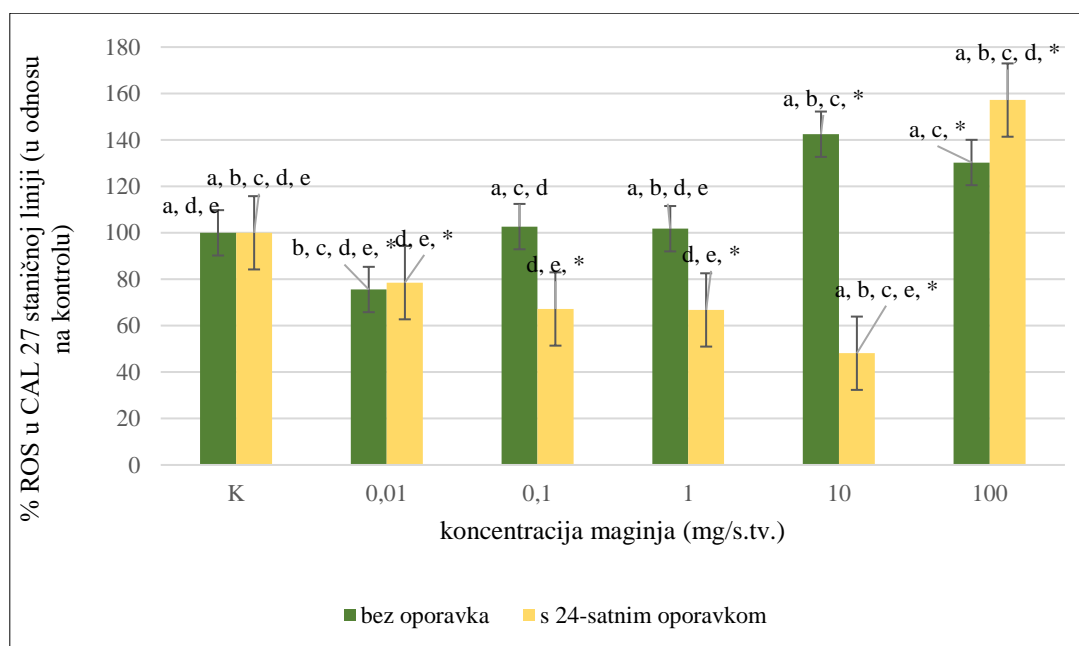
Slika 14. Preživljenje bakterija *L. fermentum*, *E. coli* i *S. aureus* nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta maginje

Prema grafičkom prikazu rezultata na Slici 14, bakterija *S. aureus* pokazuje statistički značajan pad preživljenja u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama ekstrakta. Kod *E. coli* pri koncentraciji 10 mg mL⁻¹ dolazi do statistički značajnog proliferativnog učinka. Bakterija *L. fermentum* pokazala je najmanji postotak preživljenja pri najvećoj koncentraciji ekstrakta (50 mg mL⁻¹). Usporedbom preživljenja sve tri bakterije, može se zaključiti kako ekstrakt maginje pokazuje najveće bakteriostatsko djelovanje prema *S. aureus*, dok na ostale bakterije

nema značajnog utjecaja. Kahrman i sur. (2010) u svom su radu došli do zaključka kako postoji umjerena antimikrobna aktivnost eteričnih ulja cvijeta i ploda maginje prema *L. monocitogenes* i *E. faecalis*, ali ne i prema *E. coli* i *S. aureus* (Kahrman i sur., 2010). Doukani i Souhila (2014) su također ustanovili kako maginja (*A. unedo* L.) i njezina eterična ulja ne pokazuju antimikrobni učinak prema patogenim bakterijama *Salmonella typhi* i *Pseudomonas aeruginosa* (Doukani i Souhila, 2014). Nedostatak antimikrobnog učinka prema ovim bakterijama može se objasniti postojanjem stanične stijenke kod Gram negativnih bakterija koja joj omogućava bolju zaštitu. Sukladno tome, *E. coli* kao Gram negativna bakterija pokazuje veći postotak preživljenja. Visok postotak preživljenja *L. fermentum* kao nepatogene bakterije je dobar znak zbog njezine značajne uloge u mikrobioti humanog intestinalnog sustava, potencijalne pomoći u prevenciji alkoholne bolesti jetre kao i raka debelog crijeva (Spano i sur., 2020).

4.2.3. Određivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta maginje na kontinuiranim staničnim linijama

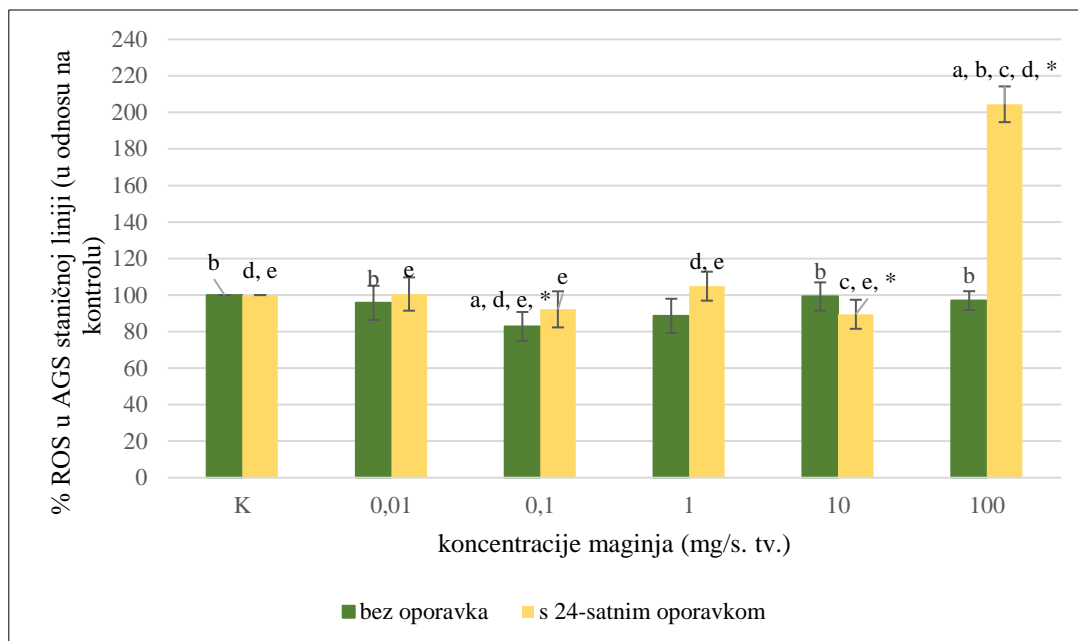
Antioksidativno djelovanje ekstrakta maginje ispitano je na kontinuiranim staničnim linijama primjenom DCFH-DA (diklorodihidrofluorescein diacetat) metode. Rezultati su prikazani kao ovisnost nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (% ROS-ova) o koncentraciji ekstrakta maginje (mg mL^{-1}).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL^{-1} ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL^{-1} ($p \leq 0,05$)

Slika 15. Učinak ekstrakta maginje na inducirani oksidacijski stres u CAL27 staničnoj liniji bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

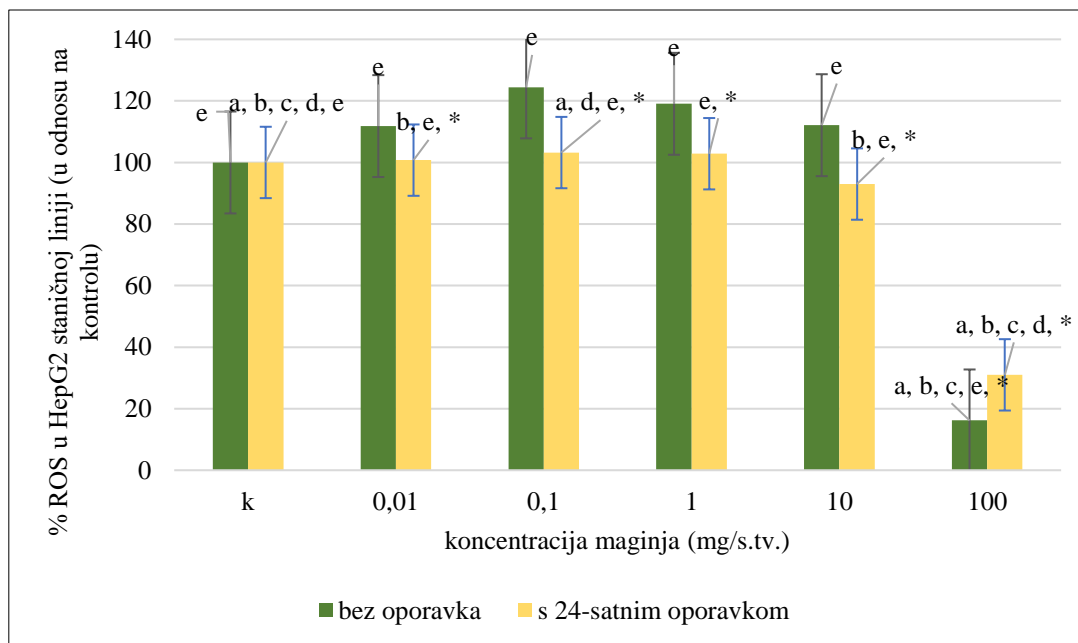
Kod tretmana bez oporavka za CAL 27 staničnu liniju, uočava se porast ROS-ova s povećanjem koncentracije ekstrakta, dok je kod tretmana s 24-satnim oporavkom uočljiv blagi pad % ROS-ova, sve do najveće koncentracije (100 mg mL^{-1}) kada dolazi do značajnog porasta u % ROS-ova (slika 15).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

Slika 16. Učinak ekstrakta maginje na inducirani oksidacijski stres u AGS staničnoj liniji bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

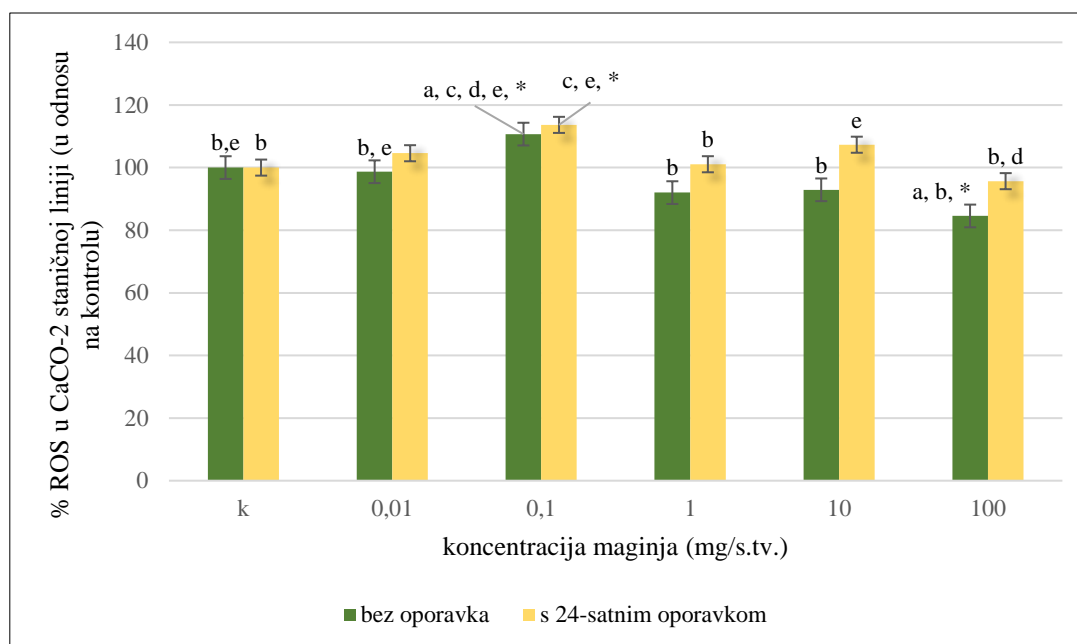
Što se tiče utjecaja ekstrakta maginje na AGS staničnu liniju, nema velike razlike u odnosu na stanice s oporavkom i bez, osim pri najvećoj koncentraciji (100 mg mL⁻¹) kod stanica s oporavkom koja je također statistički značajno različita u odnosu na kontrolu (slika 16).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$)

Slika 17. Učinak ekstrakta maginje na inducirani oksidacijski stres u HepG2 staničnoj liniji bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

Slika 17 grafički prikazuje učinak ekstrakta maginje na HepG2 staničnu liniju, gdje se uočava kako ekstrakt maginje koncentracije 100 mg mL⁻¹ uzrokuje statistički značajno smanjenje postotka oksidacije u odnosu na pozitivnu kontrolu, kako kod stanica bez oporavka tako i za stanice s oporavkom. Kod ostalih koncentracija kod stanica bez oporavka, vidljiv je blagi prooksidativan učinak koji je najveći pri koncentraciji 0,1 mg mL⁻¹.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$); a - statistički značajna razlika u odnosu na 0,01 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 0,1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); c - statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); d - statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL⁻¹ ($p \leq 0,05$); e – statistički značajna razlika u odnosu na 100 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$)

Slika 18. Učinak ekstrakta maginje na inducirani oksidacijski stres u Caco-2 staničnoj liniji bez oporavka i s 24-satnim oporavkom

Prema dobivenim rezultatima na Slici 18, najveći prooksidacijski učinak ekstrakta maginje na CaCO-2 staničnu liniju vidljiv je pri koncentraciji ekstrakta od 0,1 mg mL⁻¹. Ostale koncentracije nisu pokazale statistički značajnu razliku, osim kod koncentracije ekstrakta od 100 mg mL⁻¹ gdje je došlo do statistički značajnog antioksidacijskog učinka pri tretmanu bez oporavka stanica.

Oksidacijski stres se javlja kada je sadržaj reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-ova) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS-ova) veći od antioksidacijskih supstanci u stanicama, što je stanje u kojem se javlja višak slobodnih radikala. Budući da antioksidansi imaju visok kapacitet doniranja elektrona, mogu smanjiti oksidacijski stres u stanici (Lopez-Corona i sur., 2022).

Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti kako antioksidacijski učinak ekstrakta maginje također ovisi o vrsti stanica. Visok prooksidacijski učinak uočen je kod tretmana s 24-satnim oporavkom pri koncentraciji ekstrakta od 100 mg mL⁻¹ kod svih staničnih linija, osim HepG2 stanične linije gdje je pri najvišoj koncentraciji došlo do antioksidacijskog učinka.

Usporedbom vrijednosti dobivenih određivanjem citotoksičnog učinka s rezultatima antioksidacijskog djelovanja, može se zaključiti kako kod AGS stanica dolazi do povećanja % ROS-ova sa smanjenjem preživljenja stanica kod tretmana s oporavkom, dok je kod CAL27 stanične linije obrnuto; povećanjem postotka preživljenja smanjio se % ROS-ova. Slična situacija uočena je kod HepG2 stanične linije, gdje je kod tretmana bez oporavka došlo do indukcije najmanjeg % ROS-ova pri najvećem postotku preživljenja stanica, ali samo kod najveće koncentracije ekstrakta (100 mg mL^{-1}).

Prema radu Fortalezas i sur. (2010) u kojem se istraživao neuroprotektivni kapacitet ploda maginje, usporedbom maginje s plodom maline dobiven je zaključak kako plod maline pokazuje 36,6 % veće preživljenje stanica, dok plod maginje nije pokazao nikakav učinak na vijabilnost neuroblastoma. Time se zaključilo kako razina antioksidacijske aktivnosti nije nužno u korelaciji s biološkim značajem. Rezultati predstavljeni u ovom radu pokazuju da nema zaštitnog učinka fenola ploda maginje na neurodegeneraciju, ali nisu isključeni drugi mogući relevantni biološki učinci, štoviše, trebalo bi se provesti mnogo više analiza kako bi se potvrdile kemijske bioaktivnosti ove biljke (Fortalezas i sur., 2010).

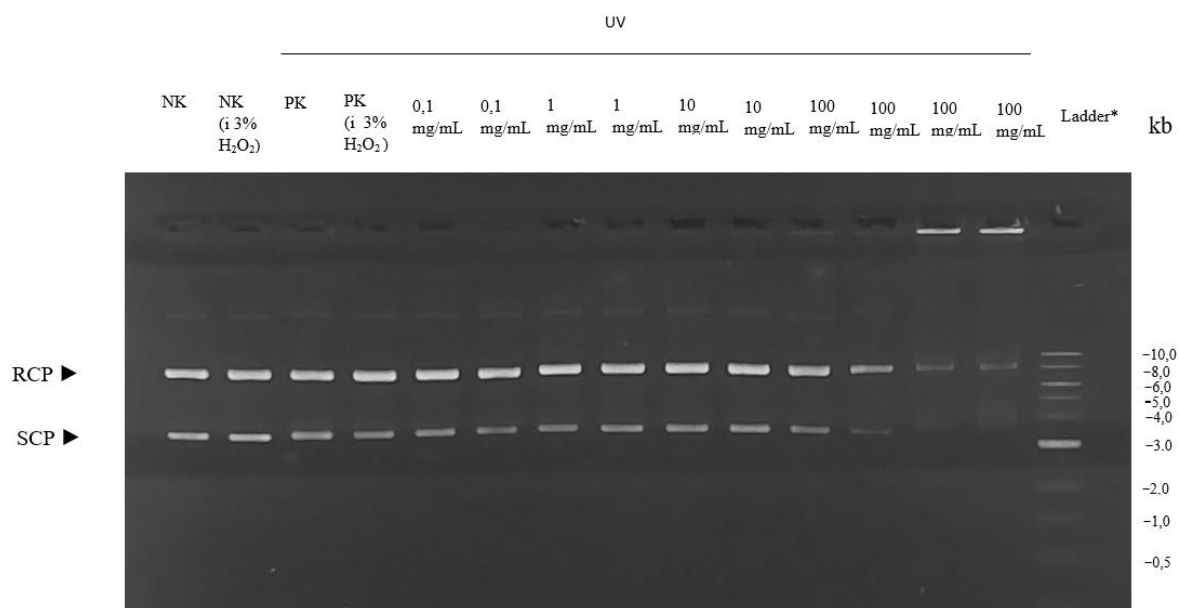
Postoji mnogo metoda koje su razvijene i primijenjene za mjerenje antioksidativnog kapaciteta i učinkovitosti, ali vrlo često se javlja nedostatak korelacije između aktivnosti utvrđenih na istom materijalu pomoću različitih analiza i između aktivnosti utvrđenih istom analizom u različitim laboratorijima. Nažalost, ne postoji jednostavna univerzalna metoda kojom bi se antioksidativni kapacitet mogao točno i kvantitativno procijeniti jer je i u ljudskom organizmu oksidacijski stres upravljani preko više vrsta reakcija i mehanizama (Etsuo, 2010). Plod maginje dobar je izvor kvercetina (Pallauf i sur., 2008), koji je povezan s brojnim prednostima poput zaštite od oksidativnog stresa. Prema Ekström i sur. (2011), visoki unos kvercetina iz prehrane obrnuto je povezan s rizikom od nekardijalnog želučanog adenokarcinoma. Također, epidemiološke studije pokazuju kako unos hrane bogatom kvercetinom smanjuje rizik od raka želuca za 43 % i raka debelog crijeva za 32 % (Niedzwiecki i sur., 2016). Proučavanjem antioksidativnog i prooksidativnog učinka kvercetina na staničnu liniju adenokarcinoma pluća (A549) *in vitro*, Robaszkiewicz i sur. (2007) uočili su kako niske koncentracije kvercetina povećavaju ukupni antioksidacijski kapacitet, dok su više koncentracije smanjile sadržaj tiola i ukupni antioksidacijski kapacitet stanica. Valja naglasiti kako je kvercetin smanjio proizvodnju ROS-ova kada su mjerenja bila obavljena u inkubacijskom puferu bez medija, dok je u slučaju dodatka DMEM medija, kvercetin proizvodio perokside (Robaszkiewicz i sur, 2007). Takvi rezultati impliciraju kompleksnost

stanične kulture i činjenice da flavonoidi mogu smanjiti unutarstaničnu proizvodnju ROS-ova, ali ih u isto vrijeme proizvoditi u izvanstaničnom mediju zbog čega može doći do poremećaja homeostaze i ostalih staničnih procesa.

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

4.3.1. Antioksidacijski učinak ekstrakta maginje na DNA

Ispitivanje potencijalnog genoprotektivnog učinka ekstrakta maginje na DNA provedeno je na modelu plazmida ϕ X174 RF1, u rasponu koncentracija 0,1 – 100 mg mL⁻¹. Plazmid je bio izložen djelovanju UV zračenja, odnosno hidroksilnih radikala koji su nastali djelovanjem UV zračenja na vodikov peroksid (H₂O₂) u kombinaciji s ekstraktom maginje. Prvotno je provedena optimizacija UV-zračenja gdje je utvrđena optimalna duljina izloženosti od 10 min. Nakon 10-minutnog zračenja uzoraka s plazmidom, provedena je gel elektroforeza na agaroznom gelu te je vizualizacija vrpca dobivena bojanjem gela u etidij bromidu.



*1 kb DNA Ladder: SCP-superzavijena cirkularna forma plazmida, RCP-relaksirana cirkularna forma plazmida

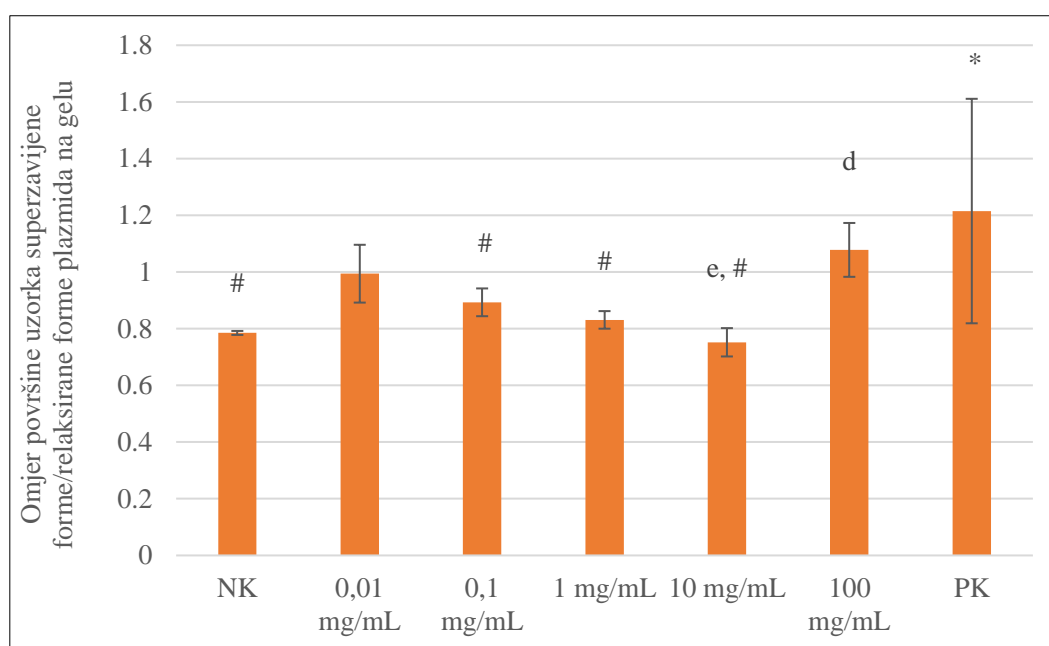
NK – negativna kontrola, PK – pozitivna kontrola

Slika 19. Protektivni učinak ekstrakta maginje na DNA na modelu plazmida ϕ X174 RF1

Slika 19 prikazuje putanju plazmida ϕ X174 RF1 u usporedbi sa standardnim DNA (1 kb DNA Ladder). Ako je došlo do oštećenja DNA tijekom tretmana, plazmid prelazi iz superzavijene (SCP; 3,5 kb) forme u relaksiranu (RCP; 8 kb), što dovodi do toga da plazmid putuje sporije u gelu (Vandjelovic i sur., 2012).

Uspoređujući intenzitet fluorescencije vrpce relaksiranog sa superzavijenim plazmidom moguće je odrediti stupanj oštećenja plazmida. Iz dobivenih podataka određuje se genotoksičnost ispitivanih uzoraka.

Grafički rezultati na slici 20 prikazani su kao omjer površine uzorka superzavijene i relaksirane forme plazmida na gelu, u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta maginje. Prema obrađenim rezultatima gel elektroforeze pomoću programa GelAnalyzer možemo zaključiti kako u negativnoj kontroli (NK) i negativnoj kontroli s dodatkom 0,03M H₂O₂ (NK i 0,03 M H₂O₂), postoji statistički značajno veći dio SCP DNA nego u pozitivnoj kontroli na kojoj je uz 0,03M H₂O₂ provedeno i UV zračenje (ANOVA, Tukey *post-hoc* test, $p \leq 0,05$). Nadalje, najmanja koncentracija ekstrakta maginje (0,01 mg mL⁻¹) nije pokazala protektivni učinak na DNA, dok se daljnjim povećanjem koncentracije (0,1 - 100 mg mL⁻¹) povećava i protektivni učinak odnosno statistički značajno manje superzavijene forme modela plazmida prelazi u relaksiranu modela plazmida u odnosu na PK djelovanje UV-zračenja i H₂O₂ (ANOVA, Tukey *post-hoc* test, $p \leq 0,05$).



* - statistički značajno u odnosu na NK; # - statistički značajno u odnosu na PK; a, b, c, d, e - statistički značajno u odnosu na ispitivane koncentracije ekstrakta maginje (0,01-100 mg mL⁻¹); ANOVA, Tukey *post-hoc* test, $p \leq 0,05$

Slika 20. Protektivni učinak ekstrakta maginje na DNA na modelu plazmida ϕ X174 RF1

Polifenoli dokazano pokazuju kemopreventivne učinke, djelomice inhibicijom oštećenja DNA tako da moduliraju putove antioksidativnog odgovora (Zhao i sur., 2018), što je važno s obzirom na to da višak oksidansa može promijeniti normalnu strukturu i funkciju DNA, lipida i proteina, dovodeći do mutacija ili oksidativnog oštećenja.

Trenutno je ovo jedini rad koji je ispitao potencijalan genoprotektivni učinak ekstrakta ploda maginje, ali ako fokus stavimo na ukupne fenole i tanine kao glavnu komponentu ploda maginje dolazimo do rada Delgado i sur. (2008) koji su u svom radu dokazali kako polifenoli štite stanice ljudskog podrijetla od oksidativnog oštećenja, provodeći eksperiment sa HepG2 staničnom linijom na koju su djelovali sa N-nitrosodimetilaminom (NDMA), N-nitrozopirrolidinom (NPYR), benzo(a)pirenom (BaP) te potom sa polifenolima (kvercetin, miricetin, (+)-katehin i (-)-epikatehin). Također su zaključili kako prisutnost i broj polihidroksilnih skupina u kemijskoj strukturi i/ili vrsta mutagena koji se koristi za induciranje oštećenja DNA imaju važnu ulogu u zaštiti strukture DNA (Delgado i sur., 2008).

Kvercetin je jedan od flavonoida na kojem je intenzivno istraživana njegov genoprotektivni učinak. Prema radu Silva i sur. (2008), kvercetin može djelovati zaštitno protiv oštećenja DNA izazvanog oksidativnim stresom koja se obično javljaju kod neurodegenerativnih bolesti. U toj je studiji pokazano 24,7 % poboljšanje popravka DNA nakon tretmana PC12 stanica (stanična linija izvedena iz transplantabilnog štakorskog feokromocitoma) kvercetinom. Ovi rezultati dokazuju sposobnost kvercetina da zaštiti od stvaranja lomova lanaca DNA i poboljša popravak oštećenja izazvanih metil metanosulfatom (Barcelos i sur., 2011). No, učinak kvercetina također je ovisan o koncentraciji; u radu Duthie et al. (1997) dokazan je štetan učinak kvercetina na DNA pri koncentraciji od 50 μM , uz sposobnost zaštite stanica od oštećenja DNA izazvanog H_2O_2 u koncentracijama od 10-50 μM . Niske koncentracije su općenito zaštitne, u nekim slučajevima čak smanjuju ionako nisku pozadinsku razinu oštećenja stanične DNA. Prema tome, polifenoli štite tijelo protiv reaktivnih kisikovih vrsta i DNA oštećenja, ali ovisno o koncentraciji gdje su niske koncentracije te koje su pokazale učinkovitost (Azqueta i Collins, 2016).

5. ZAKLJUČCI

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

1. Citotoksičnost ekstrakta ploda maginje ovisna je o staničnoj liniji.
2. Citotoksičnost ekstrakta maginje ovisna je o koncentraciji, ali i vremenu izloženosti; koncentracije ekstrakta od 100 mg mL^{-1} djeluju citotoksično na stanične linije AGS i HepG2 prilikom 24-satnog oporavka stanica, dok je za CAL27 i CaCo-2 stanične linije vidljiv blagi proliferativni učinak.
3. Ekstrakt maginje pokazuje značajno antimikrobno djelovanje prema patogenoj bakteriji *S. aureus*.
4. Prooksidativan učinak ekstrakta maginje specifičan je za AGS i CAL27 staničnu liniju tijekom 24-satnog oporavka i koncentracije od 100 mg mL^{-1} , dok je pri istoj koncentraciji i vremenu izloženosti na HepG2 liniju ekstrakt maginje pokazao antioksidacijski učinak.
5. Najveći prooksidacijski učinak ekstrakta maginje vidljiv je pri koncentracijama ekstrakta od $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Ostale koncentracije nisu pokazale statistički značajnu razliku, osim kod koncentracije ekstrakta od 100 mg mL^{-1} gdje je došlo do statistički značajnog antioksidacijskog učinka pri tretmanu bez oporavka stanica.
6. Povećanje koncentracije ekstrakta maginje pozitivno korelira sa smanjenjem prooksidacijskog oštećenja DNA izazvanog UV djelovanjem.

6. LITERATURA

Azqueta A, Collins A (2016) Polyphenols and DNA damage: a mixed blessing. *Nutrients* **8**, 785. <https://doi.org/10.3390/nu8120785>

AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 15. izdanje, Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.

ATCC (2023) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: HepG2 <<https://www.atcc.org/products/hb-8065>>. Pristupljeno 15. ožujka 2023.

ATCC (2023) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: Caco-2 <<https://www.atcc.org/products/htb-37>>. Pristupljeno 15. ožujka 2023.

ATCC (2023) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: AGS <<https://www.atcc.org/products/crl-1739>>. Pristupljeno 15. ožujka 2023.

ATCC (2023) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: CAL 27 <<https://www.atcc.org/products/crl-2095>>. Pristupljeno 15. ožujka 2023.

Barcelos GRM, Grotto D, Angeli JPF, Serpeloni JM, Rocha BA, Bastos JK, i sur. (2011) Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. *Phytother Res* **25**, 1381-1388. <https://doi.org/10.1002/ptr.3436>

Bebek Markovinović A, Brčić Karačonji I, Jurica K, Lasić D, Skendrović Babojelić M, Duralija B i sur. (2022a) Strawberry tree fruits and leaves (*Arbutus unedo* L.) as raw material for sustainable functional food processing: a review. *Horticulturae* **8**, 881. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100881>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Duralija B, Krivohlavek A, Ivešić M, Mandić Andačić I i sur. (2022b) Chemometric Valorization of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Albion' for the Production of Functional Juice: the Impact of Physicochemical, Toxicological, Sensory, and Bioactive Value. *Foods*, 11(5), 640. <https://doi.org/10.3390/foods11050640>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Stulić V, Batur L, Duralija B, Pavlić B i sur. (2022c) The Application and Optimization of HIPEF Technology in the Processing of Juice from Strawberries Harvested at Two Stages of Ripeness. *Foods*, 2022, **11**, 1997. <https://doi.org/10.3390/foods11141997>

- Berend S, Grabarić Z (2008) Determination of total polyphenol content in food with the flow-injection method. *Arh Hig Rada Toksikol* **59**, 205-212. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-59-2008-1868>
- Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem*, **190**, 317-323.
- Carr AC, Maggini S (2017) Vitamin C and immune function. *Nutrients* **9**, 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**, 178-182.
- Christensen P, Stryhn H, Hansen C (2005) Discrepancies in the determination of concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* **63**, 992-1003.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Sczzocchio B, Masella R (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* **11**, 1321-1342. <https://doi.org/10.3390/ijms1104132>
- DeFelice SL (1995) The nutraceutical revolution, its impact on food industry research and development. *Trends Food Sci Technol* **6**, 59-61.
- Delgado ME, Haza AI, Arranz N, García A, Morales P (2008) Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *Eur J Nutr* **47**, 479-490. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0751-6>
- Dragović-Uzelac V, Levaj B, Bursać D, Pedisić S, Radojčić I, Biško A (2007) Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agric Conspec Sci* **72**, 279-284.
- Domitrović R (2006) Vitamin C u prevenciji i liječenju bolesti. *Biochem Med* **16**, 107-125.
- Doukani K, Souhila T (2014) Antibacterial effect of *Arbutus unedo* L. fruit and its essential oils on *Salmonella typhi* (ATCC 14028) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). *Int Res J Nat Sci* **3**, 25-30.

- Ekström AM, Serafini M, Nyrén O, Wolk A, Bosetti C, Bellocco R (2011) Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. *Ann Oncol* **22**, 438-433. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq390>
- Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. U: Armstrong D (ured.) *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology* **594**. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Etsuo N (2010) Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* **49**, 503-515. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
- Flora Croatica baza podataka (2022) Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, <http://hirc.botanic.hr/fcd>. Pristupljeno 16. siječnja 2023.
- Fortalezas S, Tavares L, Pimpao R, Tyagi M, Pontes V, Alves PM i sur. (2010) Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients* **2**, 214-229. <https://doi.org/10.3390/nu2020214>
- Guan Z-W, Yu E-Z, Feng Q (2021) Soluble dietary fiber, one of the most important nutrients for the gut microbiota. *Molecules* **26**, 6802. <https://doi.org/10.3390/molecules26226802>
- Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* **9**, 1-32. <https://doi.org/10.3109/10715769009148569>
- Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agr* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N (2016) Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longev* **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Jurica K, Brčić Karačonji I (2019) Maginja – neotkriveno mediteransko blago. U: Stipičević S (ur.) *Znanstveni dalekozor*. Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, 21-26.
- Jurič A, Huđek Turković A, Brčić Karačonji I, Prđun S, Bubalo D, Durgo K (2022) Cytotoxic activity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey, its extract, and homogentisic acid on CAL 27, HepG2, and Caco-2 cell lines. *Arh Hig Rada Toksikol* **73**, 158-168. <https://doi.org/10.2478/aiht-2022-73-3653>

Jurišić A (2021) Učinci polifenola i ferocenskih konjugata polifenola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama ovarija (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:971551>

Kahrman N, Albay C, Usta A, Alpay Karaoğlu S, Yayli N, Dogan N (2010) Volatile Constituents and Antimicrobial Activities from Flower and Fruit of *Arbutus unedo* L. *Asian J Chem* **22**, 6437-6442.

Kolarić J (2016) Učinak ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica (diplomski rad), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:252199>

Liu RH (2013) Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci* **78**, A18-A25. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12101>

Lopez-Corona AV, Valencia-Espinosa I, González-Sánchez FA, Sánchez-López AL, Garcia-Amezquita LE, Garcia-Varela R (2022) Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of phenolic compound family extracted from raspberries (*Rubus idaeus*): A general review. *Antioxidants* **11**, 1192. <https://doi.org/10.3390/antiox11061192>

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD (2014) *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules* **19**, 15799-15823. <https://doi.org/10.3390/molecules191015799>

Miletić A (2012) Citotoksični učinak PCB 77 i protektivni učinak vitamina E na proliferaciju CHO (Chinese Hamster Ovary)-K1 stanica (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:203350>

Molina M, Pardo-de-Santayana M, Aceituno L, Morales R, Tardío J (2011) Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry* **84**, 419-429. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpr031>

Negovec K (2017) *In vitro* učinci ekstrakta cvijeta trnine (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:296802>

NHS (2020) Overview – vitamins and minerals. NHS - National Health Service, <https://www.nhs.uk/conditions/vitamins-and-minerals/>. Pristupljeno 25. siječnja, 2023.

- Niedzwiecki A, Waheed Roomi M, Kalinovsky T, Rath M (2016) Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients*, **8**, 552. <https://doi.org/10.3390/nu8090552>
- 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**, 3164734. <https://doi.org/10.1155/2016/3164734>
- Kniewald J, Kmetič I, Gaurina Srček V, Kniewald Z (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh Hig Rada Toksikol* **56**, 195-204. <https://hrcak.srce.hr/149>
- Kosanović J (2021) Učinak polifenola iz ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea*) na humanu mikrobiotu i stanice epitela gastrointestinalnog trakta (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:280725>
- Kurtagić H (2017) Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti* **6**, 28-35. <https://hrcak.srce.hr/182928>
- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira J (2011) *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *J Food Nutr Res* **50**, 73-85.
- Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, del Castillo MD, Cano MP, de Pascual-Teresa S (2008) Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J Food Compost Anal* **21**, 273–28. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.11.006>
- Perica M (2020) Kvalitativna fitokemijska analiza lista i ploda vrste *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) s područja Kvarnera i Dalmacije (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:031783>
- Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G (2016) Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxid Med Cell Longev* **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* **4**, 89–96.

- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Ind J Clin Biochem* **30**, 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Radošević K (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 169-175.
- Rajendran P, Abdelsalam SA, Renu K, Veeraraghavan V, Ben Ammar R, Ahmed EA (2022) Polyphenols as potent epigenetics agents for cancer. *Int J Mol Sci* **23**, 11712. <https://doi.org/10.3390/ijms231911712>
- Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F (2014) The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J* **14**, e157–e165.
- Robaszekiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G (2007) Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Bio Int* **31**, 1245-1250. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.04.009>
- Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Gaforio JJ (2019) Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies. *Antioxidants* **8**, 137. <https://doi.org/10.3390/antiox8050137>
- Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, **81**, 2155-2175. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.2155>
- Sente S (2012) Zajedničko djelovanje 17 α -etinilestradiola i dietilstilbestrola na stanične linije sisavaca i riba (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:137537>
- Skendrović Babojelić M, Bogdanović S, Dlačić I, Duralija B, Prgomet Ž, Prgomet I, i sur. (2020) Obična planika (*Arbutus unedo* L.) - Biološka, kemijska i gospodarska svojstva. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. http://herbarium.agr.hr/docs/obicna_planinka.pdf
- Spano G, Seal BS, Drider D (2020) *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60**, 3387–3399. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>

- Ștefănescu BE, Szabo K, Mocan A, Crișan G (2019) Phenolic compounds from five *Ericaceae* species leaves and their related bioavailability and health benefits. *Molecules* **24**, 2046. <https://doi.org/10.3390/molecules24112046>
- Sun J, Zhou W, Huang D, Fuh JY, Hong GS (2015) An overview of 3D printing technologies for food fabrication. *Food Bioproc Tech* **8**, 1605-1615. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1528-6>
- Šic Žlabur J, Bogdanović S, Voća S, Skendrović Babojelić M (2020) Biological potential of fruit and leaves of Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from Croatia. *Molecules* **25**, 5102. <https://doi.org/10.3390/molecules25215102>
- Španjol Ž, Dorbić B, Vučetić, M (2021) Planika (*Arbutus unedo* L.) i lovor (*Laurus nobilis* L.) – značajne (važne) vrste našeg mediteranskog krša. *Vatrogastvo i upravljanje požarima* **11**, 29-71. <https://hrcak.srce.hr/273000>
- Tabernilla A, dos Santos Rodrigues B, Pieters A, Caufriez A, Leroy K, Van Campenhout R, Cooreman A, Gomes AR, Arnesdotter E, Gijbels E, Vinken M (2021) *In Vitro* liver toxicity testing of chemicals: a pragmatic approach. *Int J Mol Sci* **22**, 5038. <https://doi.org/10.3390/ijms22095038>
- Xu D, Hu M-J, Wang Y-Q, Cui Y-L (2019) Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* **24**, 1123. <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact* **160**, 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vandjelovic N, Zhu H, Misra HP, Zimmerman RP, Jia Z, Li Y (2012) EPR studies on hydroxyl radical-scavenging activities of pravastatin and fluvastatin. *Mol Cell Biochem* **364**, 71–77. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1206-6>
- Vrbanić I (2018) Određivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta metodom spektrofotometrije u mladih ispitanika na dijeti s visokim udjelom soli (završni rad), Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:385394>

Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C (2018) The Immunomodulatory and anti-Inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* **10**, 1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>

Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, Semenza GL (2014) Chapter twenty-two - Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol* **542**, 425-455. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00022-4>

Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov Food Sci Emerg* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

Zhao Y, Hu X, Zuo X, Wang M (2018) Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review. *Food Funct* **9**, 4548–4568. <https://doi.org/10.1039/C8FO00850G>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LARA BUTUMOVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis