

Određivanje citotoksičnog i antioksidacijskog učinka ekstrakata listova bobičastog voća

Čaljkušić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:398202>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-18**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Marija Čaljkusić
0058216165

**ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA
EKSTRAKATA LISTOVA BOBIČASTOG VOĆA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Održivi pristupi iskorištavanja biopotencijala nusproizvoda bobičastog voća, šifra: HRZZ-IP-2022-10-5499, voditeljica: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac 

Mentor: dr. sc. Ana Huđek Turković

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje citotoksičnog i antioksidacijskog učinka ekstrakata listova bobičastog voća

Marija Čaljkusić, 0058216165

Sažetak: Bobičasto voće spada među najbolje prehrambene izvore biološki aktivnih spojeva s pozitivnim učinkom na zdravlje. Njihova industrijska prerada rezultira značajnom količinom otpada u obliku lišća koje obiluje polifenolima s dokazanim antioksidacijskim i protuupalnim djelovanjem. Cilj ovog rada bio je ispitati biološki učinak ekstrakata listova aronije, borovnice i crnog ribizla na *in vitro* staničnim linijama skvamoznog epitela karcinoma jezika CAL 27 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2. Ispitivanje utjecaja na stanično preživljenje i klonogeni rast provedeno je MTT i klonogenim testom. Metoda DCFH-DA korištena je u svrhu ispitivanja unutarstanične indukcije slobodnih radikala. Najveći biološki učinak pokazao je ekstrakt lista crnog ribizla koji u cijelom rasponu koncentracija smanjuje preživljenje obje ispitivane stanične linije na ~ 80% pri čemu pokazuje i jak dozno-ovisni inhibitorski učinak na njihov klonogeni rast. S druge strane, ekstrakt lista aronije pokazuje proliferativno i prooksidativno djelovanje na HepG2 staničnu liniju. Borovnica nije pokazala značajnije biološke učinke na ispitivane test sustave.

Ključne riječi: ekstrakt listova bobičastog voća, citotoksičnost, antioksidacijski potencijal, klonogeni rast, *in vitro* biološki test sustavi

Rad sadrži: 34 stranice, 12 slika, 2 tablice, 47 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Ana Huđek Turković

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Datum obrane: 16. rujna, 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Genetics of Microorganisms

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Determination of the cytotoxic and antioxidant effect of berry leaf extracts

Marija Čaljkušić, 0058216165

Abstract: Berries are one of the best food sources for biologically active compounds that have a positive effect on health. Their industrial processing results in a significant amount of waste in the form of leaves that are rich in polyphenols with proven antioxidant and anti-inflammatory effects. The aim of this work was to examine the biological effect of chokeberry, blueberry, and blackcurrant leaf extracts on the *in vitro* squamous epithelial cell lines of tongue carcinoma CAL 27 and hepatocellular carcinoma of the liver HepG2. Testing of the influence on cell survival and clonogenic growth was performed by MTT and clonogenic assay. The DCFH-DA method was used to examine the intracellular induction of free radicals. The greatest biological effect was shown by blackcurrant leaf extract, which in the entire range of concentrations reduces the survival of both tested cell lines to ~ 80% while also showing a strong dose-dependent inhibitory effect on their clonogenic growth. On the other hand, chokeberry leaf extract shows a proliferative and slightly prooxidative effect on the HepG2 cell line. Blueberry did not show significant biological effects on the examined test systems.

Keywords: berry leaf extract, cytotoxicity, antioxidant potential, clonogenic growth, *in vitro* biological-test systems

Thesis contains: 34 pages, 12 figures, 2 tables, 47 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: dr. sc. Ana Huđek Turković

Technical support and assistance: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Thesis defended: September 16th, 2024

Sadržaj

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. BOBIČASTO VOĆE | 2 |
| 2.1.1. List aronije..... | 3 |
| 2.1.2. List borovnice | 4 |
| 2.1.3. List crnog ribizla | 4 |
| 2.2. <i>IN VITRO</i> SUSTAVI ZA ODREĐIVANJE BIOLOŠKOG UČINKA | 5 |
| 2.2.1. Stanična kultura | 5 |
| 2.2.2. Prednosti primjene stanične kulture..... | 6 |
| 2.2.3. Stanične kulture u ispitivanju citotoksičnog i antioksidacijskog potencijala | 7 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 9 |
| 3.1. MATERIJALI | 9 |
| 3.1.1. Uzorci..... | 9 |
| 3.1.2. Biološki test sustavi | 11 |
| 3.1.3. Kemikalije..... | 12 |
| 3.1.4. Otopine | 12 |
| 3.1.5. Laboratorijski uređaji | 14 |
| 3.1.6. Laboratorijski pribor..... | 14 |
| 3.2. METODE | 15 |
| 3.2.1. Uzgoj humanih staničnih linija | 15 |
| 3.2.2. Metoda MTT..... | 15 |
| 3.2.3. Metoda DCFH-DA | 17 |
| 3.2.4. Klonogeni test | 18 |
| 3.2.5. Statistička analiza | 20 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 4.1. Ispitivanje učinka ekstrakata lišća bobičastog voća na preživljenje CAL 27 i HepG2 stanica MTT metodom | 21 |
| 4.2. Ispitivanje antioksidacijskog djelovanja ekstrakata lišća bobičastog voća DCFH-DA metodom..... | 23 |
| 4.3. Ispitivanje proliferativnog učinka ekstrakata lišća bobičastog voća klonogenom analizom | 25 |
| 5. ZAKLJUČCI | 28 |
| 6. POPIS LITERATURE | 29 |

1. UVOD

Bobičasto voće odavno je prepoznato kao važan dio ljudske prehrane, ne samo zbog svog okusa i niske kalorijske vrijednosti, već i zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva i zdravstvenih dobrobiti koje proizlaze iz njihove konzumacije. Biološki aktivni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka, a najveći udio čine fenolni spojevi (Aguilera, 2024). Istraživanja su pokazala da konzumacija hrane bogate biljnim polifenolima ima ulogu u očuvanju mentalnog zdravlja, jačanju imunološke funkcije, smanjenju rizika od pretilosti i razvoja kardiovaskularnih bolesti te u borbi protiv oksidativnog stresa i upalnih procesa (Ferlemi i Lamari, 2016).

Osim plodova, listovi bobičastog voća također sadrže fenolne spojeve, a istraživanja pokazuju da je njihov udio sličan ili čak i veći nego u plodovima. Prema tome, lišće bobičastog voća se koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje raznih stanja poput prehlade, upale mokraćnog trakta te dijabetesa (Ferlemi i Lamari, 2016). Unatoč velikom bioaktivnom potencijalu, lišće bobičastog voća je danas uglavnom zanemareno i čini glavni nusproizvod u procesu berbe plodova. Kako bi se smanjila količina otpada te kako bi se iskoristio njihov potencijal dolazi do porasta broja istraživanja kemijskog sastava lista bobičastog voća (Ferlemi i Lamari, 2016). Time se otvara mogućnost njihove šire primjene u industriji dodataka prehrani, nutraceutika i funkcionalne hrane.

Cilj ovog rada bio je ispitati citotoksični učinak i antioksidacijski potencijal ekstrakata lišća aronije, borovnice te crnog ribizla u koncentracijama koje predstavljaju preporučenu dnevnu dozu polifenola na staničnim linijama skvamoznog epitela karcinoma jezika CAL 27 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 u *in vitro* uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOBIČASTO VOĆE

Bobičasto voće je visoko cijenjeno kao aromatično i zdravo voće koje može spriječiti ili odgoditi neke kronične bolesti. Ono ima malo kalorija i sadrži različite bioaktivne fitokemikalije, antioksidanse, dijetalna vlakna i vitamine. Bobičasto voće se konzumira u svrhu održavanja zdravlja (npr. mentalno zdravlje, imunološka funkcija), smanjenja rizika od pretilosti i smanjenja rizika od kroničnih bolesti povezanih s prehranom (npr. kardiovaskularne bolesti). Također, zbog bogatog sastava antioksidansa, može se koristiti u liječenju bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom i upalama. Primjer takvih bolesti su kognitivna oštećenja i demencija, neke vrste raka, kardiovaskularne bolesti te slabost imunološkog sustava. Osim toga, konzumacija ovog voća može smanjiti rizik od dijabetesa tipa 2, poboljšati održavanje tjelesne težine i djelovati neuroprotektivno (Ferlemi i Lamari, 2016; Aguilera, 2024).

Osim plodova, u tradicionalnoj medicini korišteni su i listovi bobičastog voća kako bi se izliječile bolesti poput prehlade, upale mokraćnog sustava, dijabetesa i disfunkcije binokularnog vida, ali su u današnje vrijeme ti tretmani gotovo zaboravljeni. U posljednjih pet godina Europska agencija za lijekove (EMA) je odobrila korištenje infuzija lišća i ekstrakata crnog ribizla (*Ribes nigrum* L.), maline (*Rubus idaea* L.) i medvjete (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) kao ljekovitih biljnih proizvoda temeljenih na njihovoj tradicionalnoj uporabi. Unatoč ljekovitoj vrijednosti, koja u velikoj mjeri proizlazi iz njihovog sadržaja fenola/polifenola, lišće bobičastog voća glavni je nusprodukt berbe, što znači da se godišnje baca na tone lišća. Rezultati usporedne analize sastava biološki aktivnih spojeva, posebice polifenola, u plodovima i listu su pokazali da lišće sadrži značajno više polifenolnih spojeva nego sami plodovi što ukazuje na njihov potencijal korištenja u svrhu razvoja dodataka prehrani, nutraceutika ili funkcionalne hrane. Stoga kako bi se smanjila količina otpada sve češće se istražuje sastav i način potencijalne uporabe lišća (Teleszko i Wojdyło, 2015; Ferlemi i Lamari, 2016).

Kemijski sastav plodova i lišća je varijabilan te ovisi o kultivaru i sorti, lokaciji uzgoja i okolišnim uvjetima, ishrani biljaka, stupnju zrelosti i vremenu berbe, kao i naknadnim uvjetima skladištenja. Biološki aktivnim spojevima u bobičastom voću pripadaju antioksidansi kao što su fenolni spojevi i pigmenti antocijani i karotenoidi. Fenolni spojevi bobičastog voća predstavljaju raznoliku skupinu spojeva uključujući fenolne kiseline (konjugati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline) i flavonoide (flavonoli, flavanoli i antocijani). Biološki aktivnim spojevima pripadaju i drugi antioksidansi kao što su vitamini (askorbinska kiselina) i minerali s antioksidativnim svojstvima, a veliku važnost imaju i tanini. Ovi spojevi su

od velikog interesa za nutricioniste i prehrambene tehnologe zbog mogućnosti korištenja kao funkcionalnih sastojaka hrane (Skrovankova i sur., 2015).

Hrvatska se nalazi u jugoistočnoj Europi i zemlju karakteriziraju tri različite klime (u nizinskoj Hrvatskoj kontinentalna klima, alpska klima u planinskom području, a na obali mediteranska klima) na relativno malom području (56 542 km²). U sve tri prisutne klime, moguć je uzgoj različitih vrsta i kultivara bobičastog voća, a Hrvatska je poznata kao jedna od najbogatijih europskih zemalja po pitanju biološke raznolikosti. Proizvodnja bobičastog voća u Hrvatskoj započela je početkom 1930-ih godina na području Zagreba gdje su podignute prve veće plantaže jagoda zbog blizine tržišta. Glavne vrste bobičastog voća po proizvodnji su jagode, kupine i maline. Borovnica, ribizl, bazga i šipak su u manjem obimu zastupljeni u proizvodnji i na tržištu. U posljednjem desetljeću neki proizvođači su više zainteresirani za uvođenje nekih novih vrsta bobičastog voća te su podignute manje plantaže aronije i goji bobica. Do danas je proizvodnja bobičastog voća u Hrvatskoj ovisila o znanju, iskustvu i ulaganjima iz inozemstva, uglavnom SAD-a i nekih europskih zemalja (Italija, Nizozemska) (Sopov i Njavro, 2013). Točne količine bobičastog voća koje se uzgajaju u Hrvatskoj teško je procijeniti jer dio proizvodnje dolazi s obiteljskih gospodarstava, te zbog nesrazmjera između službenih statističkih podataka i podataka s terena.

2.1.1. List aronije

Aronija (*Aronia melanocarpa* L.) je član porodice ruža (Rosaceae). Listopadni grm aronije može narasti do visine 2 - 3 m, a listovi su ovalnog oblika i tamnozelenog nazubljenog ruba. Cvate krajem travnja i cvat je sastavljen od 30 malih bijelih cvjetova koji sazrijevaju do ljubičasto-crnih plodova u kolovozu. Meso bobica je intenzivno crvene boje te slatko-kisele do trpke arome. Aronija se u različitim dijelovima Europe često koristi za proizvodnju voćnih sirupa, sokova ili želea, namaza, likera, žestokih pića i čaja. S druge strane, ima ograničenu upotrebu u industrijskoj proizvodnji sokova i voćnog nektara zbog kiselog, pomalo neugodnog oporog okusa i mirisa sirovog voća po gorkom bademu. Čaj se obično miješa s drugim okusima, uključujući crni ribiz (Kulling i Rawel, 2008).

Lišće aronije sadrži polifenole u obliku derivata kafeinske kiseline, kvercetina, izorhamnetina te kempferola i apigenina, a najzastupljeniji su klorogenska kiselina i izokvercetin (Kuzmanović Nedeljković i sur., 2023). Količina polifenola identificiranih u lišću ovisi o starosti samog lišća pri čemu je ona veća u mladom lišću u odnosu na zrelo i ostarjelo lišće. U mladom lišću dominiraju derivati kafeinske kiseline. Od flavonoidnih komponenti, u lišću aronije najzastupljeniji je kvercetin 3-O-rutinozid (Lee i sur., 2014).

Listovi aronije posjeduju različita biološka svojstva, poput antioksidativnog,

antineurodegenerativnog i antikancerogenog djelovanja. Također, aronija ima veliki potencijal kao vrijedan izvor snažnih antioksidansa s dodatnim hipoglikemijskim, antibakterijskim i protuupalnim djelovanjem (Kuzmanović Nedeljković i sur., 2023). S obzirom na promjenjiv sastav lišća aronije ovisno o starosti, antioksidativna aktivnost ekstrakta lišća aronije je najveća u mladom, a najmanja u ostarjelom lišću (Lee i sur., 2014). Derivati kafeinske kiseline posjeduju brojne biološke aktivnosti, uključujući snažno antioksidativno, antimitogeno, antikancerogeno i antifungalno djelovanje (Chuu i sur., 2012; Harrison i sur., 2003). Ostale polifenolne komponente prisutne u aroniji, kao što su derivati kvercetina, kempferola i izorhamnetina, su također sveprisutne u biljkama i u ljudskoj prehrani. Niz studija je pokazalo njihovo preventivno djelovanje protiv raznih vrsta karcinoma, kao i njihov antioksidativni, protuupalni, antiagregacijski, antidijabetički i vazodilatacijski učinak (Erlund, 2004).

2.1.2. List borovnice

Obična borovnica (*Vaccinium Myrtillus* L.) je listopadni grm prosječne visine 20 - 30 cm. Mlade grane su zelene i izrazito uglate, a lišće ovalno-eliptičnog oblika svijetlozelene boje. Cvjeta u svibnju i lipnju, a sazrijeva od lipnja do kolovoza. Plod je okrugla bobica tamnoplave boje. Ispod tanke pokožice pokrivene sivkastom pepeljkom se nalazi sočno slatko-kiselo i aromatično meso. Plod se konzumira u svježem i osušenom obliku ili prerađen u obliku sokova, kompota i marmelada (Nestby i sur., 2011).

U listu borovnice kvantificirano je oko 20 polifenola od kojih su najzastupljeniji klorogena kiselina, D-katehin, L-epikatehin, rutin, izokvercitrin, cijanidin-3-O-glukozid, iridin i kvercetin (Li i sur., 2020). Prisutni polifenoli ublažavaju oksidativni stres, poremećaj homeostaze i mitohondrijsku disfunkciju u jetri te suzbijaju jetrene upalne citokine. Također, olakšavaju antioksidacijsku obranu mitohondrija jetre te aktiviraju AMPK/PGC1 α /SIRT3 put za poboljšanje mitohondrijske funkcije i antioksidativnog kapaciteta (Li i sur., 2020).

2.1.3. List crnog ribizla

Crni ribizl (*Ribes nigrum* L.) je uspravni grm visine do 2 m koji raste samoniklo u Europi te u sjevernoj i centralnoj Aziji. Stablo je sivo-smeđe do crne boje s trodijelnim ili petodijelnim listovima nepravilno nazubljenih rubova na kojima se nalaze žlijezde specifičnog mirisa. Rumeni cvjetovi s pet latica su skupljeni u grozdove, a plod je crna okrugla ili slabo spljoštena bobica obavijena glatkom kožicom (Cortez i Gonzalez de Mejia, 2019).

Infuzije lišća crnog ribizla su se koristile za ubrzavanje procesa izlučivanja toksina iz tijela i za regulaciju rada bubrega (Declume, 1989), a ekstrakti lišća kao dijaforetici i diuretici,

te za liječenje upalnih stanja poput reume (Nour i sur., 2014; Tabart i sur., 2006). Istraživanja posljednjih desetljeća jasno su potvrdila da ekstrakti lišća crnog ribiza imaju blagotvoran učinak na zdravlje, uglavnom kroz protuupalno i antioksidativno djelovanje (Declume, 1989; Garbacki i sur., 2004; Tabart i sur., 2006).

U ekstraktu lista crnog ribiza identificirano je ukupno 47 polifenola, uključujući 14 fenolnih kiselina, 21 flavanol, 4 flavan-3-ola, 5 flavona i 3 procijanidina pri čemu su od fenolnih kiselina najviše zastupljene klorogena, kafeinska, galna i p-hidroksibenzojeva kiselina (Elez Garofulić i sur., 2024).

Ekstrakti mladog lišća imaju veću antioksidacijsku aktivnost od onih sakupljenih u kasnijim fazama rasta (Thi i Hwang, 2014) pri čemu ekstrakti listova ubranih sredinom lipnja pokazuju najveću antioksidacijsku aktivnost, što je u korelaciji s ukupnim sadržajem fenola (Nour i sur., 2014). Također, dokazano je da ekstrakcijska otapala značajno utječu na ukupan sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet. Najbolje otapalo za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz lišća crnog ribizla bio je 40 %-tni etanol (Nour i sur., 2014).

2.2. *IN VITRO* SUSTAVI ZA ODREĐIVANJE BIOLOŠKOG UČINKA

2.2.1. Stanična kultura

Kultura humanih stanica široko je korištena tehnika koja omogućuje proučavanje ljudskog metabolizma i fiziologije koja nije lako izvediva u *in vivo* uvjetima. Stoga *in vitro* stanične kulture čine temelj biomedicinskih i pretkliničkih istraživanja (Baust i sur., 2017). Stanice se mogu izolirati iz normalnog tkiva, ako to klinički postupci i etička razmatranja dopuštaju, te iz oboljelog tkiva uklonjenog tijekom operacije kao jedan od koraka u liječenju bolesti pacijenata. Kulturom stanica se može istražiti ponašanje pojedinih vrsta stanica bez utjecaja sistemskih varijacija koje bi mogle nastati tijekom održavanja normalne homeostaze *in vivo*. Kultura stanica se obično nalazi u obliku suspenzije, a postoje i stanice koje mogu rasti samo ako su pričvršćene za podlogu (adherentne stanice). Stanice se uzimaju iz izvornog tkiva (enzimskom, mehaničkom, ili kemijskom disocijacijom), primarnih kultura ili staničnih linija, a uzgoj se provodi u strogim sterilnim laboratorijskim uvjetima u atmosferi kontrolirane temperature, plinova i tlaka (Philippeos i sur., 2012).

Primarna kultura podrazumijeva fazu uzgoja nakon izolacije stanica, ali prije prve subkultivacije nakon koje postaje stanična linija (Freshney, 2010). Stanične linije mogu se u grubo podijeliti u tri skupine: konačne stanične linije, kontinuirane stanične linije te stanične linije matičnih stanica (Pamies i sur., 2021). Konačne stanične linije obično potječu iz primarnih kultura i imaju sporu stopu rasta. Kao takve, mogu se uzgajati ograničen broj generacija prije konačnog starenja kad dolazi do gubitka tipičnog oblika stanice te konačno smrti. Važno je

naglasiti da stanice konačne stanične linije podliježu kontaktnoj inhibiciji pri čemu se mitozu zaustavlja u G0, G1 ili G2 fazi nakon formiranja monosloja (Mao i sur., 2012). Nasuprot tome, kontinuirane stanične linije se obično dobivaju iz transformiranih ili tumorskih stanica te se brzo dijele i postižu puno veću gustoću stanica u kulturi nego konačne stanične linije. Nisu kontaktno inhibirane te stoga mogu rasti u više slojeva. Matične stanice su nediferencirane ili djelomično diferencirane pluripotentne stanice koje potječu iz višestaničnih organizama. Ove stanice se mogu podijeliti na neograničen broj stanica iste vrste ili se alternativno mogu u pravim uvjetima potaknuti na diferencijaciju u stanice sa specijaliziranim funkcijama. Kao takve, mogu služiti kao vrsta multipotentnog prekursora za mnoge različite tipove stanica (Weiskirchen i sur., 2023).

2.2.2. Prednosti primjene stanične kulture

Prednost staničnih kultura je to da je omogućena kontrola fizikalno-kemijskih parametara poput pH, temperature, osmotskog tlaka te parcijalnog tlaka kisika i ugljikovog dioksida. Time se olakšava izvođenje citoloških testova te se pojednostavnjuje kvantifikacija, a eksperimenti se mogu izvoditi sa smanjenim volumenima što smanjuje troškove. Uzorci tkiva redovito su heterogeni. Međutim, nakon jednog ili dva precjepljivanja kultivirane stanične linije poprimaju jednoliku strukturu. Razlog tomu je nasumično miješanje pri svakom prijenosu te selektivni pritisak uvjeta uzgoja koji nastoji proizvesti homogenu kulturu najsnažnijih stanica. Uspostavljanjem homogene kulture se omogućava reproducibilnost eksperimenata čime se smanjuje statistička varijanca. Uzgoj se treba provoditi u strogim aseptičnim uvjetima jer uobičajeni kontaminanti poput bakterija, plijesni i kvasaca rastu brže od stanica sisavaca. Treba postojati stroga kontrola okoliša jer stanice višestaničnih životinja obično ne postoje u izolaciji i prema tome nisu u stanju održati neovisno postojanje bez potrebne podrške. Ostala ograničenja uključuju visoku cijenu potrošnog materijala i medija, unakrsnu kontaminaciju te dediferencijaciju koja podrazumijeva prekomjerni rast nediferenciranih stanica što dovodi do gubitka fenotipskih karakteristika tipičnih za tkiva iz kojeg su stanice izolirane (Philippeos i sur., 2012).

Začetak *in vitro* ispitivanja često je bio potaknut etičkim razlozima, a za cilj je imao odustajanje od testiranja na životinjama (Hartung, 2009). U današnje vrijeme, uz sve veću proizvodnju novih kemikalija za širok raspon primjene u zdravstvu, hrani i kozmetici, povećava se potreba za brzim i pouzdanim pristupima za procjenu toksičnosti. Novi inovativni *in vitro* sustavi u idealnim uvjetima bi trebali ne samo identificirati toksična svojstva kemikalija, nego i dati uvid u vrstu nanesenog staničnog oštećenja kako bi se pouzdanije predvidjela opasnost za ljudsko zdravlje (Eskes i sur., 2017).

2.2.3. Stanične kulture u ispitivanju citotoksičnog i antioksidacijskog potencijala

Preživljenje stanica podrazumijeva zadržavanje regenerativne sposobnosti i obično se mjeri učinkovitošću naciepljivanja koja se dobije kao rezultat provedbe klonogene analize adherentnih stanica. Učinkovitost naciepljivanja mjeri preživljenje pokazujući proliferativni kapacitet nekoliko generacija stanica, pod uvjetom da se stanice naciepe s dovoljno visokom učinkovitošću tako da kolonije mogu predstavljati cijelu staničnu populaciju. Učinak različitih spojeva na staničnu proliferaciju se može odrediti i brojanjem stanica nekoliko dana nakon tretmana no svaki značajan učinak treba potkrijepiti krivuljom rasta tijekom cijelog ciklusa rasta ili alternativnim testom kao što je krivulja preživljenja dobivena klonogenim ili MTT testom (Freshney, 2010).

Kod metaboličkih testova citotoksičnosti preživljenje je definirano zadržavanjem metaboličke ili proliferativne sposobnosti stanične populacije kao cjeline neko vrijeme nakon uklanjanja toksične tvari. Određuje se neto povećanje u broju stanica, povećanje ukupne količine proteina ili DNK te nastavljen metabolička aktivnost stanica kao što je redukcija tetrazolijevih soli (MTT ili XTT) u formazan ili sinteza proteina ili DNK. Međutim, ovi testovi ne mogu razlikovati smanjenje metaboličke ili proliferativne aktivnosti stanica od smanjenja broja stanica pa se stoga svako opažanje treba potvrditi klonogenim testom (Freshney, 2010).

Reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) nastaju u živim organizmima kao rezultat normalnog staničnog metabolizma i okolišnih utjecaja te imaju važnu ulogu u njegovom pravilnom funkcioniranju. U niskim koncentracijama slobodni radikali su potrebni za sintetiziranje određenih staničnih struktura, uključeni su u niz staničnih signalnih putova te su dio obrambenog sustava u zaštiti od patogena. Porast koncentracije ROS-ova u organizmu dovodi do stvaranja oksidativnog stresa, koji negativno utječe na stanične strukture, uključujući membrane, lipide, proteine, lipoproteine i DNK. Oštećenje staničnih struktura može dovesti do genetskih mutacija, upalnih procesa i disfunkcije organa što može značajno ugroziti zdravlje i doprinijeti razvoju različitih bolesti uključujući rak, dijabetes, aterosklerozu, razne neurološke, kardiovaskularne i respiratorne bolesti, bolesti bubrega, te reumatoidni artritis (Pizzino i sur., 2017).

ROS-ovi se mogu podijeliti na neradikalne vrste (eng. *nonradical*) i slobodne radikale (eng. *free radical*). Neradikalni sadrže dva elektrona, a uključuju vodikov peroksid (H_2O_2), organske hidroperokside (ROOH), singletni molekularni kisik (1O_2), elektronski pobuđeni karbonil, ozon (O_3) te hipoklornu (HOCl) i hipobromnu kiselinu (HOBr). U slobodne radikale se ubrajaju superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), peroksilni radikal ($ROO\cdot$) te alkoksilni radikal ($RO\cdot$) (Sies i Jones, 2020).

Oksidativnim stresom se smatra neravnoteža između oksidansa i antioksidansa (Birben i sur., 2012). Kada dođe do oksidativne neravnoteže u organizmu često je indicirana uporaba egzogenih antioksidativnih tvari koje uključuju i najvažnije biljne sekundarne metabolite. Ovi spojevi su sposobni odgoditi oksidaciju molekula inhibicijom ili prekidom stvaranja slobodnih radikala. Može ih proizvoditi i sam organizam kao dio svoje enzimske antioksidativne obrane (reducirani glutation, superoksid dismutaza, itd.) ili se mogu unijeti hranom i/ili dodacima prehrani. Jednom kada uđe u tijelo, antioksidativni spoj može djelovati tako da: (I) inhibira oksidacijske enzime, što dovodi do smanjenja proizvodnje slobodnih radikala; (II) ulazi u interakciju s redoks signalnim putovima povećavajući stanični antioksidativni odgovor; (III) usmjerava inaktivaciju ROS-ova (Nascimento da Silva i sur., 2016). Jedna od najčešće korištenih tehnika za određivanje nastalih ROS-ova *in vitro* je DCFH-DA (2',7'-diklorfluorescein diacetat) metoda. Metoda se temelji na prolasku lipofilne i nefluorescentne molekule DCFH-DA kroz staničnu membranu gdje se spoj deesterificira u hidrofilni alkohol dihidrodiklorfluorescein (DCFH). Oksidacija ove molekule ROS-ovima rezultira nastankom 2,7-diklorfluoresceina, DCF, sa zelenom bojom fluorescencije. Kada se ovakva molekula pobudi plavim svjetlom, intenzitet fluorescencije reflektira količinu ROS-ova prisutnih u stanici (Karlsson i sur., 2010). Prednosti ove metode u odnosu na druge su jednostavnost provođenja, visoka osjetljivost na promjene u redoks stanju stanice, mogućnost praćenja promjena ROS-ova tijekom vremena, a sama metoda je relativno jeftina (Eruslanov i Kusmartsev, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Ubrzana ekstrakcija otapalima

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista borovnice, crnog ribiza i aronije provedena je primjenom metode ubrzane ekstrakcije otapalima (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) i ASE ekstraktora (**slika 1**). Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je 30 %-tna vodena otopina etanola, koja je prethodno odzračena u ultrazvučnoj kupelji. Prije same ekstrakcije, listovi korištenog bobičastog voća su usitnjeni te odvagani u staklenu čašu prema zadanom omjeru otapala i biljnog materijala: $30 \text{ mL g}^{-1} = 1,67 \text{ g}$; $40 \text{ mL g}^{-1} = 1,25 \text{ g}$.



Slika 1. Uređaj za ubranu ekstrakciju otapalima (vlastita fotografija)

Metoda ASE provedena je na način da su prvotno pomiješani izvagani uzorci lišća i dijatomejska zemlja. Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (34 mL) postavljena su dva celulozna filtera na koje je stavljena prethodno pripremljena smjesa uzorka i dijatomejske zemlje, a na vrh je nadodano još dijatomejske zemlje i postavljen jedan celulozni filter.

Staklena boca za ekstrakciju zajedno sa zatvorenom ćelijom postavljena je na zadano mjesto na ASE ekstraktoru. Fiksni uvjeti ekstrakcije navedeni su u **tablici 1**. Ekstrakti lišća bobičastog voća pripremljeni su pri optimalnim uvjetima temperature, vremena ekstrakcije i omjera otapalo:uzorak određenim za svaku vrstu lišća (**tablica 2**). Dobiveni ekstrakti su profiltrirani u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i nadopunjeni do oznake ekstrakcijskim otapalom (30 %-tna vodena otopina etanola).

Tablica 1. Fiksni uvjeti ekstrakcije

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Tlak | 10,34 MPa |
| Volumen ispiranja | 30 % |
| Volumen propuhivanja | 30 s |
| Broj ciklusa | 3 |

Tablica 2. Optimalni uvjeti ekstrakcije

| Uzorak lista | ASE |
|---------------------|-------------------------------------|
| Borovnica | 125 °C/10 min/40 mL g ⁻¹ |
| Crni ribiz | 150 °C/5 min/30 mL g ⁻¹ |
| Aronija | 150 °C/5 min/30 mL g ⁻¹ |

Uparavanje ekstrakata

Dobiveni ekstrakti upareni su do suha na vakuum koncentratoru, a temperatura koncentriranja iznosila je 50 °C dok je tlak vakuuma održavan na razini 8 i ramp 5.

Liofilizacija

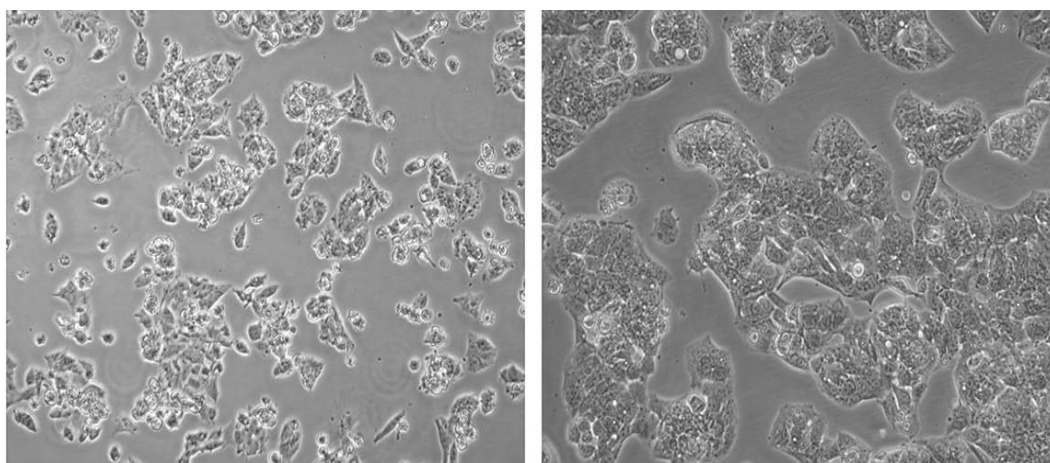
Nakon što su ekstrakti upareni do suha, zamrznuti su na -80 °C tijekom 24 h te su liofilizirani na uređaju za liofilizaciju tijekom 48 h pri -55 °C. Tako pripremljeni liofilizirani uzorci su usitnjeni u tarioniku s tučkom te čuvani pri +4 °C do provođenja analiza.

Dobiveni liofilizati korišteni su za pripremu ishodišnih otopina ekstrakata za određivanje biološkog učinka na *in vitro* sustavima koje su sadržavale 5 mg mL⁻¹ polifenola te su kasnije iz njih pripremljene radne otopine u koncentracijama 0,014, 0,07, 0,2 i 0,5 mg mL⁻¹ polifenola. Odabrani raspon koncentracija temelji se na preporučenom dnevnom unosu polifenola.

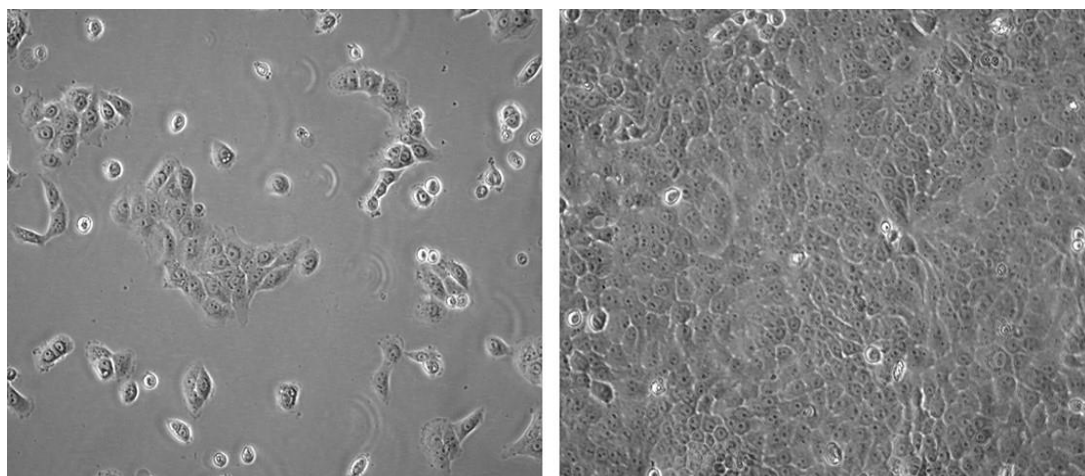
3.1.2. Biološki test sustavi

Kontinuirane humane stanične linije skvamoznog epitela karcinoma jezika CAL 27 (ATCC CRL-2095) i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 (ATCC HB-8065) su korištene kao biološki test sustavi. Obje stanične linije su dobivene iz ATCC (eng. *American Type Culture Collection*) banke stanica.

HepG2 je stanična linija koja je izolirana iz hepatocelularnog karcinoma 15-godišnjeg bijelca s karcinomom jetre (**slika 2**). Ima primjenu u 3D staničnim kulturama, toksikologiji te istraživanju tumora. CAL 27 stanice su izolirane iz tkiva 56-godišnjeg bijelca s lezijom na sredini jezika (**slika 3**). To su poligonalne, epitelne stanice s visoko granuliranom citoplazmom koje se poput HepG2 stanica koriste za 3D stanične kulture i u istraživanju tumora.



Slika 2. Mikroskopski prikaz HepG2 stanične linije: mala gustoća (lijevo) i velika gustoća stanica (desno) (ATCC, 2024a).



Slika 3. Mikroskopski prikaz CAL 27 stanične linije: mala gustoća (lijevo) i velika gustoća stanica (desno) (ATCC, 2024b).

3.1.3. Kemikalije

- Boja kristal ljubičasto, Kemika, Hrvatska
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikal), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Etanol (96 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Fetalni goveđi serum (FBS), Capricorn Scientific, Njemačka
- Giemsa boja, Merck, Njemačka
- Medij za uzgoj staničnih linija Ham's F-12 s L-glutaminom, Capricorn Scientific, Njemačka
- MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Natrijev dodecil sulfat, SDS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), PlusOne, VWR International, SAD
- Tripsin (2,5 %) u DPBS-u (10 \times), Capricorn Scientific, Njemačka

3.1.4. Otopine

Fosfatni pufer - PBS (pH = 7,2 - 7,4)

| | |
|---------------------------------------------------------|------------|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ | 1,15 g |
| K_2HPO_4 | 0,2 g |
| Demineralizirana voda | do 1000 mL |

Sterilizacija fosfatnog pufera provodi se 15 min pri temperaturi od 120 °C i tlaku od $1,01 \times 10^5$ Pa.

10 %-tna otopina SDS

| | |
|-----------------------|-----------|
| SDS | 10 g |
| Demineralizirana voda | do 100 mL |

Dodati 10 g SDS-a u 80 mL demineralizirane vode, zagrijavati pri 40 - 50 °C i nadopuniti do 100 mL.

Ishodišna otopina MTT (5 M)

| | |
|-----|----------|
| MTT | 250 mg |
| PBS | do 50 mL |

Radna otopina MTT (0,5 M)

| | |
|---------------------------------|--------|
| Ishodišna otopina (5 M) | 0,5 mL |
| Medij kompletiran s 10 % FSB-om | 4,5 mL |

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

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

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

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

0,1/1 %-tna otopina kristal ljubičasto/Giemsas boje:

| | |
|-------------------------|----------|
| boja kristal ljubičasto | 0,1 g |
| Giemsa boja | 1 g |
| 2 %-tni etanol | do 10 mL |

0,25 %-tna radna otopina tripsina

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 2,5 %-tna ishodišna otopina tripsina | 10 mL |
| PBS pufer | 90 mL |

30 %-tni etanol, odzračeni

S obzirom na potrebni volumen 30 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a tikvica se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3.1.5. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga 1712 Mp8, SilverEdition, UK
- Čitač mikrotitarskih pločica FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Brouwer CH, Švicarska
- Invertni biološki mikroskop XDS-1, OPTIKA Microscopes, Italija
- Komora za sterilni rad IBK 1 V2, Iskra, Slovenija
- Laboratorijska centrifuga Microspin 12, Biosan, Ltd., Latvija
- Svjetlosni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Tehnička vaga, Sartorius, Engleska
- Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digitec DT 512 H, Bandelin electronic GmbH i Co., Njemačka
- Uređaj za liofilizaciju Alpha 1–4 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Vakuum koncentrador SpeedVac Concentrator SPD2010-230, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Vibromikser EV-202 i EV-100, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Vodena kupelj VK2, INKOLAB, Hrvatska
- Zamrzivač Ultralow temperature freezer, New Brunswick scientific Co., SAD

3.1.6. Laboratorijski pribor

- Automatska propipeta, Eppendorf, Njemačka
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena, 20 - 1000 mL
- Laboratorijske staklene čaše različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Marker za pisanje
- Mikropipete od 20, 200 i 1000 µL, Eppendorf, Njemačka
- Mikrotitarske ploče s 24 i 96 jažica, Falcon, SAD
- Nastavci za pipete
- Odmjerne tikvice različitih volumena, 25 - 100 mL
- Pamučna vata

- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1 - 25 mL
- Sterilni filteri
- Špatule
- T-boce od 25 i 75 cm², Falcon, BD Company, SAD
- Parafilm

3.2. METODE

Za određivanje biološkog učinka ekstrakata lišća aronije, borovnice i crnog ribizla korištene su MTT metoda, DCFH-DA metoda i klonogeni test. MTT metoda je korištena za mjerenje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakata, DCFH-DA metoda za mjerenje antioksidacijskog učinka ekstrakata, a klonogeni test za određivanje učinka ekstrakata na staničnu proliferaciju i sposobnost formiranja kolonija.

3.2.1. Uzgoj humanih staničnih linija

HepG2 i CAL 27 stanične linije su kultivirane u monosloju u plastičnim T-bocama u hranjivom mediju za uzgoj staničnih linija Ham's F-12 s L-glutaminom kompletiranom dodatkom 10 %-tne otopine fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS). Stanice su uzgajane u CO₂ inkubatoru u kontroliranim uvjetima atmosfere s 95 % zraka uz 5 % CO₂ i pri temperaturi od 37 °C.

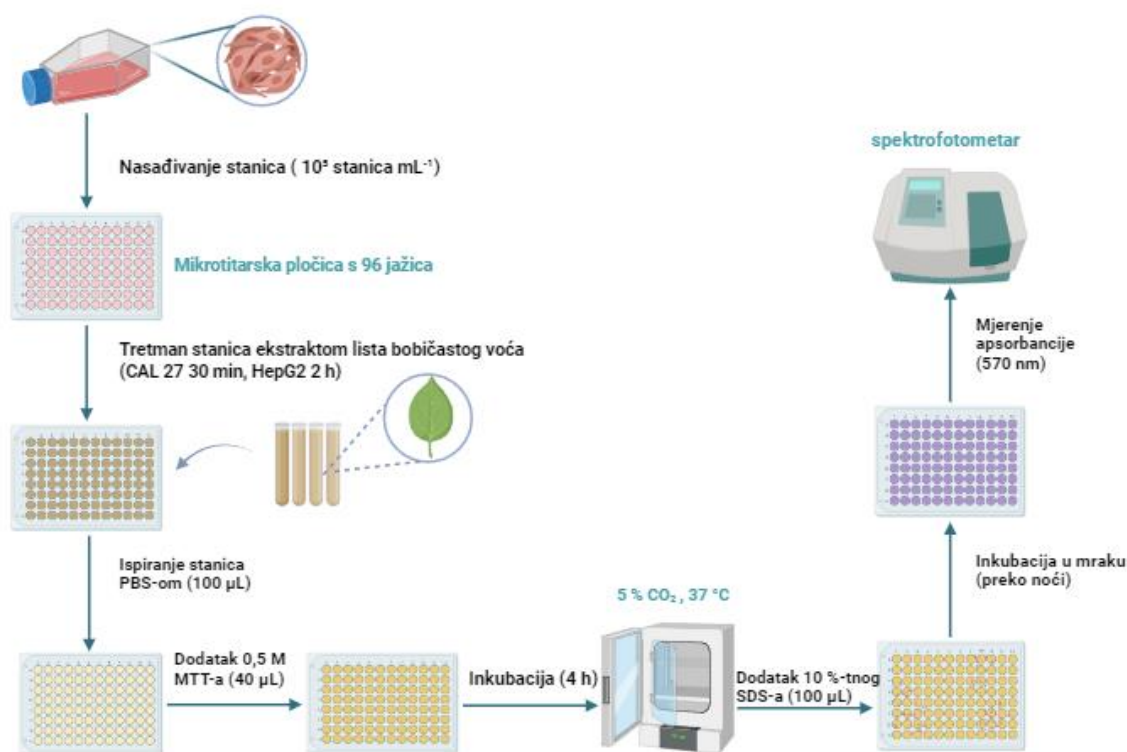
Subkultivacija se provodila kada bi rast adherentnih stanica dosegao oko 80 % konfluentnosti. Tada bi se stanice odvojile od podloge pomoću 0,25 %-tne otopine tripsina. Djelovanje tripsina se zaustavilo nakon 10-ak minuta dodatkom medija sa serumom.

Kako bi se mogla podesiti početna koncentracija stanica koju je bilo potrebno nasaditi, a koja je ovisna o metodi koja se provodi, koncentracija stanica se određivala brojanjem u Bürker-Türkovoj komorici.

3.2.2. Metoda MTT

MTT je kolorimetrijski test koji se koristi za određivanje citotoksičnog i proliferativnog potencijala ispitivanih spojeva. Ovom metodom se određuje metabolička aktivnost mitohondrija, a djeluje na principu mjerenja aktivnosti enzima sukcinat dehidrogenaza koje reduciraju topljive žute MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) tetrazolijeve soli u ljubičaste kristale formazana. Produkt reakcije, formazan, djelomično je

topljiv u mediju pa se za njegovo otapanje koriste organska otapala. Tako se dobije homogena otopina pogodna za mjerenje optičke gustoće pri valnoj duljini od 570 nm (Mosmann, 1983).



Slika 4. Protokol za MTT test (prema Slater i sur., 1963). Napravljeno pomoću BioRender.com.

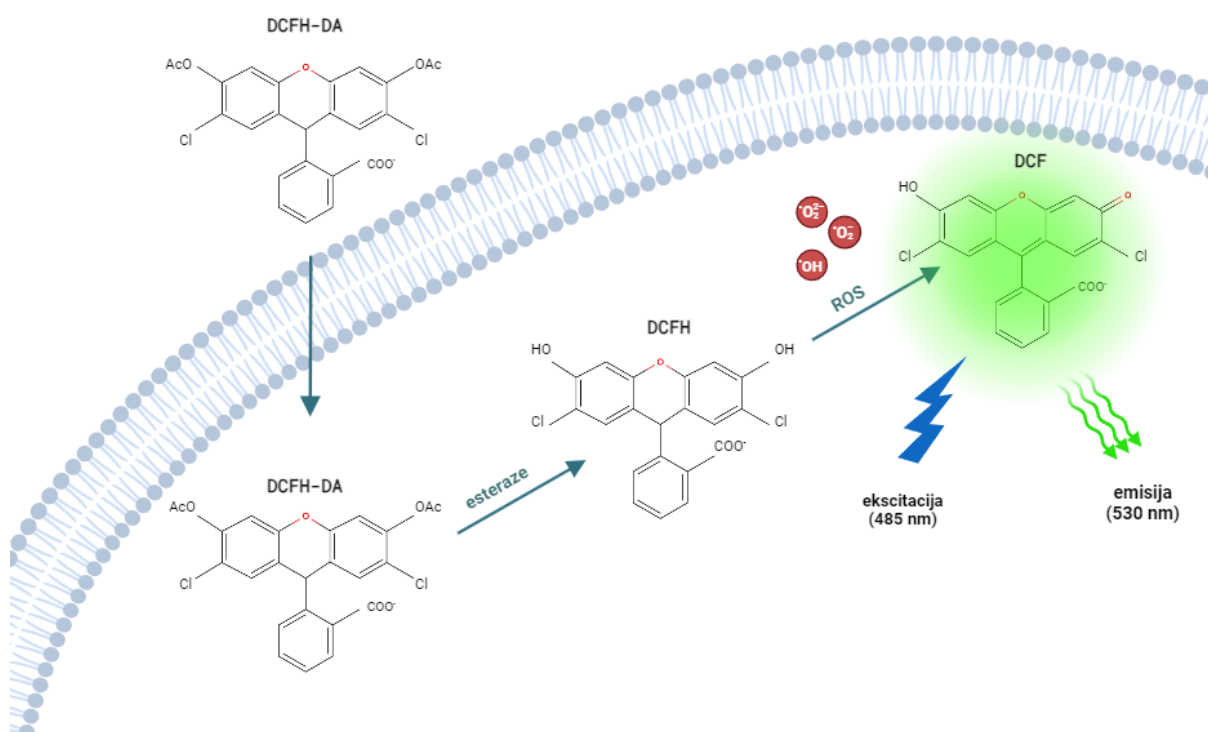
Protokol za provedbu ove metode je prikazan na **slici 4**. Ukratko, u prozirne mikrotitarske ploče s 96 jažica naciijepljeno je 100 µL suspenzije stanica, HepG2 i CAL 27, početne koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su inkubirane 24 h te je nakon toga uklonjen medij. Stanice su zatim tretirane sa 100 µL otopine četiri različite koncentracije (0,014, 0,07, 0,2 i 0,5 mg polifenola mL^{-1}) ekstrakata lišća aronije, borovnice i crnog ribizla. Otopine su pripremljene u hranjivom mediju Ham's F-12 s L-glutaminom kompletiranom dodatkom 10 %-tne otopine fetalnog goveđeg seruma iz ishodišnih otopina ekstrakata. U kontrolne jažice dodano je 100 µL hranjivog medija bez ekstrakta. Tretman CAL 27 stanica trajao je 30 min, a HepG2 stanica 2 h. Nakon tretmana uklonjen je hranjivi medij s ekstraktom, a stanice su isprane s dodatkom 100 µL PBS-a u svaku jažicu te je na njih dodano 40 µL 0,5 M radne otopine MTT reagensa. Nakon 4 h inkubacije pri 37 °C dodano je 100 µL 10 %-tne otopine SDS-a kako bi se otapili nastali kristalići formazana. Otapanjem kristala inkubacijom pri 37 °C preko noći u mraku, zbog fotolabilnosti kristala, razvija se ljubičasto obojenje čiji se intezitet

određuje spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm. Usporedbom intenziteta obojenja tretiranih i kontrolnih stanica izračunava se postotak proliferacije prema **formuli [1]**:

$$\text{Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} = \left(\frac{\text{Apsorbancija}_{570 \text{ nm tretiranog uzorka}}}{\text{Apsorbancija}_{570 \text{ nm kontrole}} \right) \times 100 \quad [1]$$

3.2.3. Metoda DCFH-DA

Kako bi se ispitao antioksidacijski učinak ekstrakata lišća bobičastog voća na humane stanične linije koristila se metoda diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA). Ovaj nefluorescentni lipofilni ester lako prolazi kroz citoplazmatsku membranu i ulazi u citosol gdje ga brzo cijepaju nespecifične stanične esterase (**slika 5**). Jedan od produkata reakcije je nefluorescentni alkohol DCFH koji se oksidira djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i peroksida u 2',7'-diklorofluorescein (DCF). Kada se ova molekula pobudi plavim svjetlom valne duljine 485 nm, ona emitira zelenu fluorescenciju na valnoj duljini od 530 nm koja se može detektirati spektrofotometrijski (Karlsson i sur., 2010; Kim i Xue, 2020).



Slika 5. Princip rada DCFH-DA metode (prema Silveira i sur., 2003). Napravljeno pomoću BioRender.com.

U crnu mikrotitarsku ploču s 96 jažica nacijepnjeno je 100 μL suspenzije HepG2 i CAL 27 stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su inkubirane u kontroliranoj atmosferi (95 % zraka i 5 % CO_2) i pri temperaturi od 37 °C. Nakon 24 h inkubacije, stanice su podvrgnute tretmanu. Uklonjen je medij te je u svaku jažicu dodano 100 μL pripremljenih ekstrakata lišća aronije, borovnice i crnog ribizla u četiri različite koncentracije (0,014, 0,07, 0,2 i 0,5 mg polifenola mL^{-1}). Otopine su pripremljene u hranjivom mediju Ham's F-12 s L-glutaminom kompletiranom dodatkom 10 %-tne otopine fetalnog goveđeg seruma iz ishodišnih otopina ekstrakata. U kontrolne jažice dodano je 100 μL hranjivog medija. Duljina tretmana ovisila je o vrsti stanične linije koja je tretirana. Tretman CAL 27 stanica je trajao 30 min, a HepG2 stanica 2 h. Po završetku tretmana uklonjen je hranjivi medij s ekstraktima, a stanice su isprane sa 100 μL PBS pufera. Zatim je dodano 100 μL radne otopine DCFH-DA (0,05 mM) te su stanice inkubirane 30 min pri 37 °C. Nakon inkubacije izmjeren je intenzitet fluorescencije u čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini ekscitacije 485 nm i valnoj duljini emisije 530 nm.

Prooksidacijsko ili antioksidacijsko djelovanje ekstrakata određeno je izračunom indukcije slobodnih radikala prema **formuli [2]**:

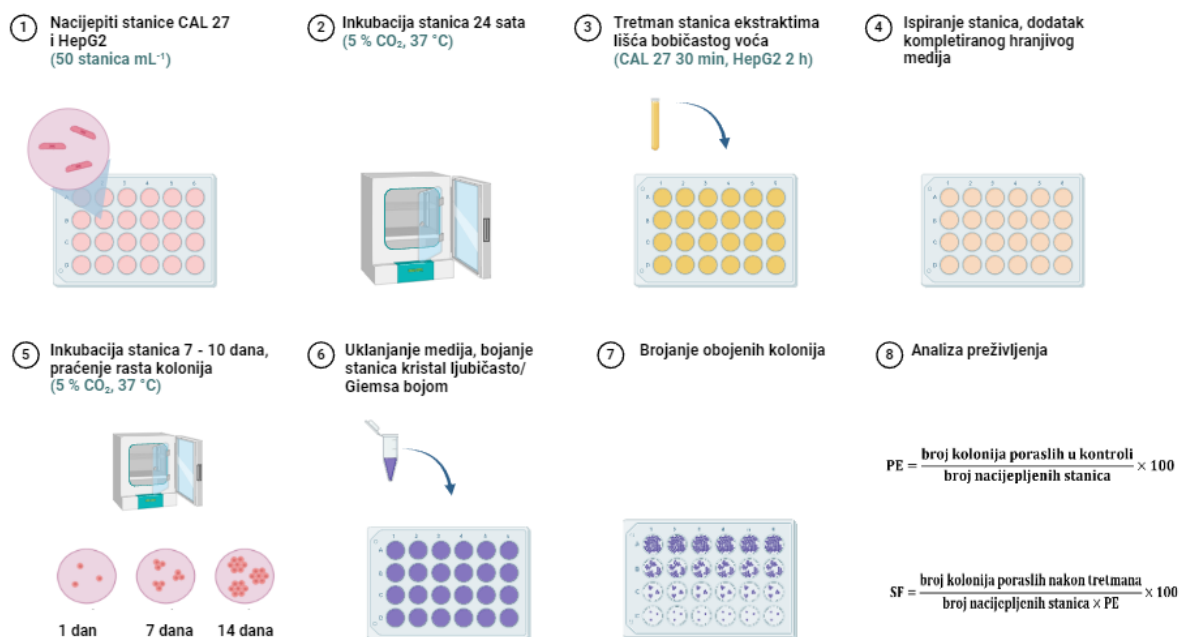
$$\text{Indukcija slobodnih radikala} = \frac{\frac{\text{intenzitet fluorescencije (ekstrakt)}}{\% \text{ preživljenja}}}{\frac{\text{intenzitet fluorescencije (kontrola)}}{100}} \quad [2]$$

3.2.4. Klonogeni test

Klonogeni test ili test formiranja kolonije je *in vitro* metoda koja se temelji na sposobnosti jedne stanice da formira koloniju. U osnovi, klonogeni test omogućuje procjenu razlika u reproduktivnoj sposobnosti, odnosno sposobnosti jedne stanice da formira koloniju od 50 ili više stanica, između kontrolnih netretiranih stanica i stanica koje su podvrgnute raznim tretmanima poput izlaganja ionizirajućem zračenju, raznim kemijskim spojevima (npr. citotoksičnim sredstvima) ili genetskim modifikacijama (Rafehi i sur., 2011).

Klonogeni test proveden je prema protokolu prikazanom na **slici 6**. U svaku jažicu ploče (s 24 jažice) nacijepnjeno je 1 mL prethodno uzgojenih CAL 27 i HepG2 stanica koncentracije 50 stanica mL^{-1} . Nakon 24 h inkubacije u CO_2 inkubatoru pri 37 °C uklonjen je medij te su stanice tretirane s 1 mL pripremljenih ekstrakata lišća aronije, borovnice i crnog ribizla u četiri različite koncentracije (0,014, 0,07, 0,2 i 0,5 mg polifenola mL^{-1}). Kao kontrola, u jažice umjesto otopine ekstrakata, dodan je 1 mL hranjivog medija. Tretman CAL 27 stanica trajao je 30 min, a HepG2 stanica 2 h. Nakon tretmana uklonjen je hranjivi medij s ekstraktima

te je zamijenjen svježim hranjivim medijem. Stanice su inkubirane 7 - 10 dana do porasta vidljivih kolonija.



Slika 6. Protokol za provedbu klonogenog testa. Napravljeno pomoću BioRender.com na temelju predloška *Clonogenic Survival Assay*.

Kada su formirane kolonije postale vidljive podvrgnute su bojanju kristal ljubičasto/Giemsma bojom. Prvo je uklonjen medij te je dodano 500 μL 0,01/0,1 %-tne otopine kristal ljubičasto/Giemsma u vodi koja je inkubirana 10 - 15 min. Boja je uklonjena te su stanice osušene nakon čega je izbrojan broj poraslih kolonija u svim uzorcima. Na temelju broja poraslih kolonija izračunata je učinkovitost naci jepljivanja (eng. *plating efficiency*, PE), koja je definirana kao omjer broja poraslih kolonija u odnosu na broj ishodišno naci jepljenih stanica (**formula [3]**). Također, izračunata je i frakcija preživljenja (eng. *surviving fraction*, SF), koja predstavlja udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana otopinama ekstrakata (**formula [4]**).

$$\text{Učinkovitost naci jepljivanja (PE)} = \frac{\text{broj kolonija poraslih u kontroli}}{\text{broj naci jepljenih stanica}} \times 100 \quad [3]$$

$$\text{Frakcija preživljenja (SF)} = \frac{\text{broj kolonija poraslih nakon tretmana}}{\text{broj naci jepljenih stanica} \times PE} \times 100 \quad [4]$$

3.2.5. Statistička analiza

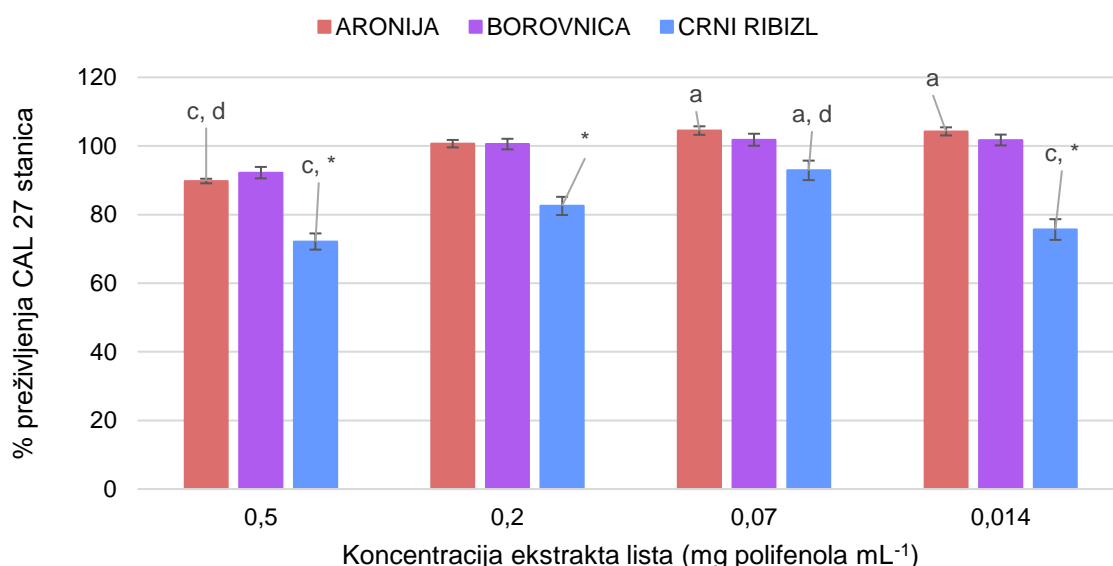
Statistička obrada podataka provedena je u statističkom programu JASP 0.18.3.0. Normalnost distribucije podataka provjerena je Shapiro–Wilk testom pri razini značajnosti 0,05. Nakon što je utvrđena normalna raspodjela podataka provedena je jednosmjerna analiza varijance (eng. *one-way ANOVA*) i *post-hoc* Tukeyev HSD (eng. *Honest Significant Difference*) test višestrukih usporedbi. Vrijednosti za koje je određen koeficijent $p < 0,05$, smatrane su statistički značajnim.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu analiziran je biološki učinak ekstrakata lišća aronije, borovnice i crnog ribizla na humanim staničnim linijama karcinoma jezika CAL 27 i karcinoma jetre HepG2.

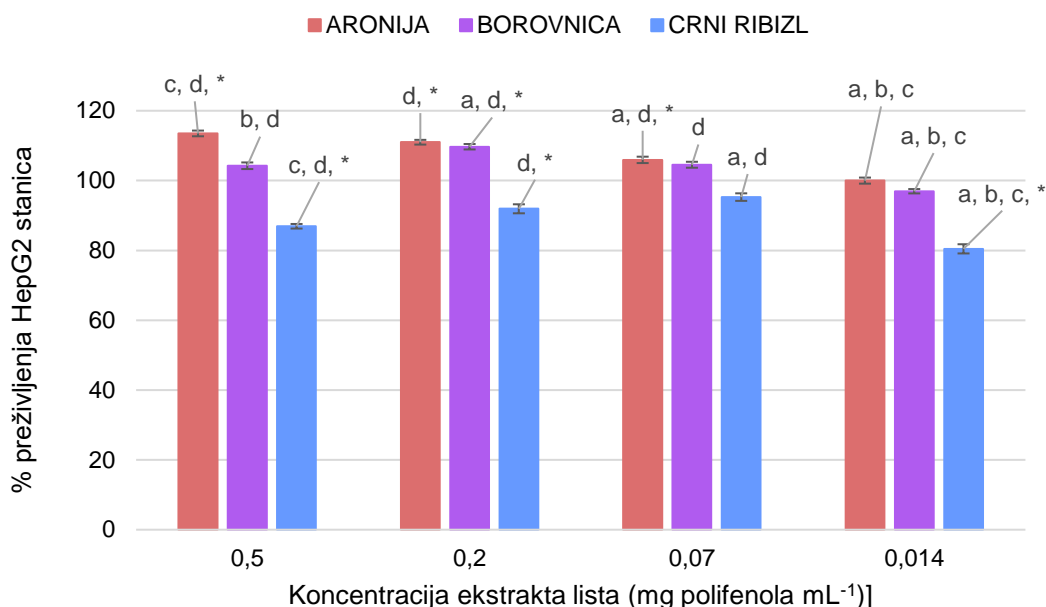
4.1. Ispitivanje učinka ekstrakata lišća bobičastog voća na preživljenje CAL 27 i HepG2 stanica MTT metodom

Rezultati MTT metode su prikazani grafički, kao ovisnost postotka preživljenja CAL 27 (slika 7) i HepG2 (slika 8) stanične linije o koncentraciji ekstrakta kojim su tretirane.



Slika 7. Preživljenje CAL 27 stanica nakon duljine tretmana od 30 min ekstraktima lišća bobičastog voća. Različiti eksponenti iznad stupaca ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na: * kontrolu; ^a 0,5 mg mL⁻¹; ^b 0,2 mg mL⁻¹; ^c 0,07 mg mL⁻¹; ^d 0,014 mg mL⁻¹ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD).

Iz rezultata (slika 7) vidljivo je da od tri ispitivana ekstrakta, list crnog ribizla je jedini pokazao statistički značajan učinak na smanjenje preživljenja CAL 27 stanica pri čemu najveća koncentracija ima najjače antiproliferacijsko djelovanje. Preživljenje CAL 27 stanica je u cijelom rasponu koncentracija ekstrakta crnog ribizla smanjeno na ~80 %.



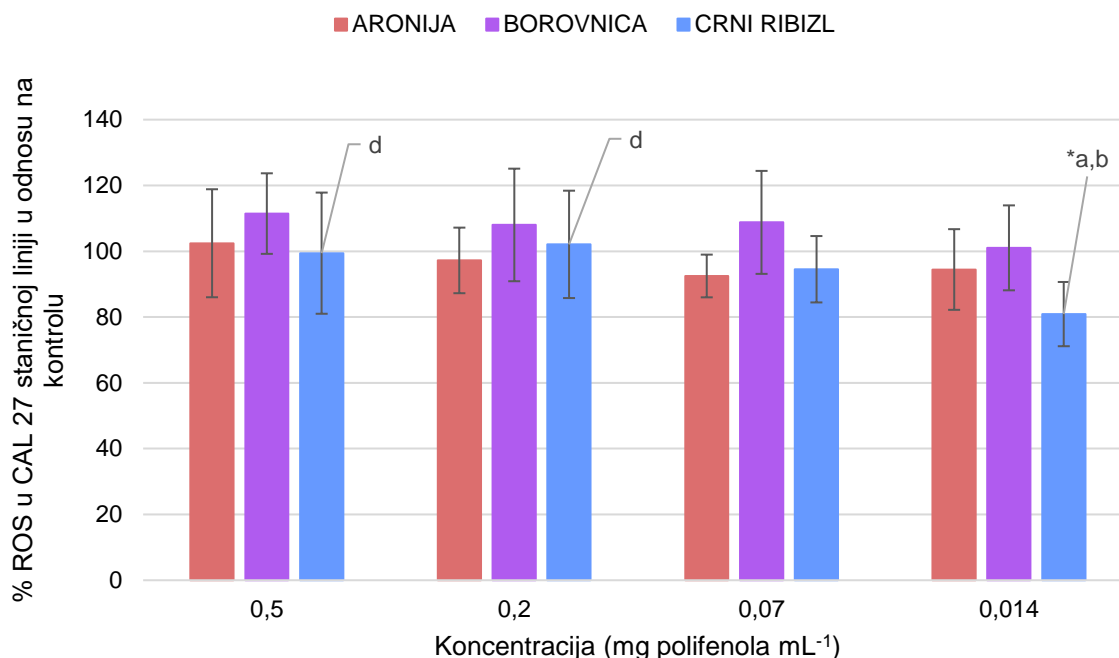
Slika 8. Preživljenje HepG2 stanica nakon 2 h tretmana ekstraktima lišća bobičastog voća različitih koncentracija. Različiti eksponenti iznad stupaca ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na: * kontrolu; ^a 0,5 mg mL⁻¹; ^b 0,2 mg mL⁻¹; ^c 0,07 mg mL⁻¹; ^d 0,014 mg mL⁻¹ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD).

Također, kod HepG2 (**slika 8**) stanične linije ekstrakt lista crnog ribizla u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija ima učinak na smanjenje preživljenja (preživljenje ~80 %). Nasuprot tome, sve ispitivane koncentracije ekstrakta lista aronije (0,07 - 0,5 mg mL⁻¹) osim najmanje pokazale su statistički značajno proliferativno djelovanje na HepG2 stanice u odnosu na kontrolu (~100 %). Ekstrakt lista borovnice nije pokazao nikakav učinak na preživljenje HepG2 stanica u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija. Cvetanović i sur. (2018) su istraživali utjecaj ekstrakta lista aronije na tri vrste malignih staničnih linija izoliranih iz tumora pluća, kolorektalnog adenokarcinoma i tumora vrata maternice (A-549, LS-174T i HeLa) te na MRC5 staničnu liniju (normalne stanice fibroblasta) te su otkrili da ekstrakti lista imaju veći citotoksični učinak u odnosu na ekstrakte dobivene iz drugih dijelova ove biljke. Autori smatraju da je razlog boljeg citotoksičnog djelovanja veća količina fenola i flavonoida u listu aronije. (Ribera-Fonseca i sur., 2020) su pokazali da ekstrakti lišća borovnice konačne koncentracije $\geq 0,4$ mg mL⁻¹ uzrokuju više od 50 % inhibicije vijabilnosti humanih epitelnih stanica karcinoma želuca (AGS), dostižući do 60 % inhibicije pri najvećim dozama. Pri tome nisu uočene značajne razlike između vremena inkubacije (24 i 48 h) i vijabilnosti stanica, a sam inhibicijski učinak je ovisio o dozi. Staszowska-Karkut i sur., (2023) su u svom istraživanju koristili stanične linije humanog kolorektalnog karcinoma HCT 116, PC-3 linija raka prostate i

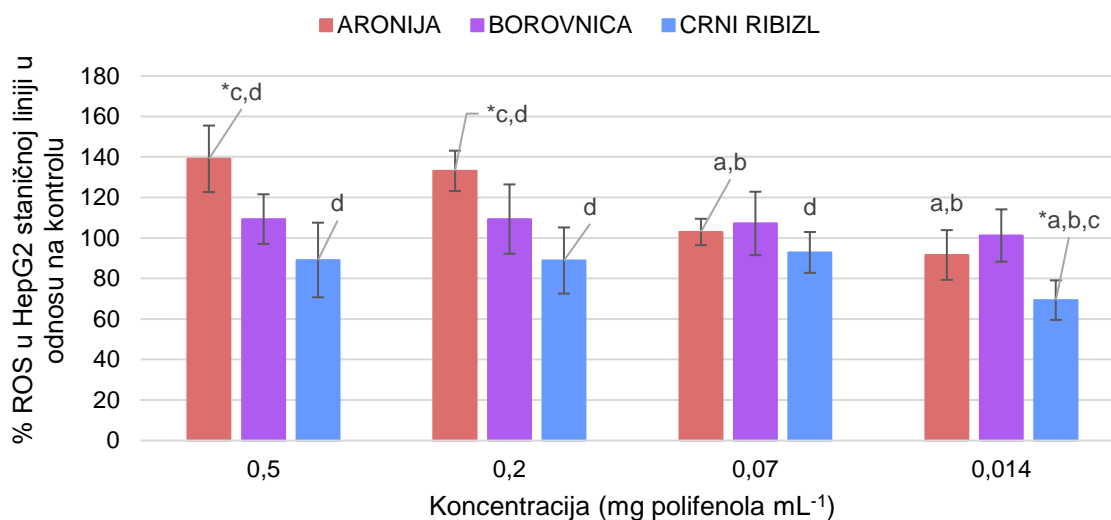
liniju mišjih fibroblasta L929 te su pokazali da ekstrakt lista crnog ribizla ima umjerenu citotoksičnost ($IC_{50} = 21$ i $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) na tumorske stanice dok prema normalnoj staničnoj liniji nije pokazao nikakav učinak. Ovi rezultati slažu se s rezultatima ovog rada gdje je raspon koncentracija ekstrakta crnog ribizla ($14 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$) pokazao statistički značajno smanjenje preživljenja na CAL 27 i HepG2 stanične linije iako u mnogo manjoj mjeri. Razlika dobivenih rezultata u odnosu na ovaj rad se može objasniti činjenicom da postoji značajna razlika u duljini vremena tretmana istraživanim spojevima, sastavu biljke koji ovisi o različitim parametrima, a i o samom otapalu korištenom za ekstrakciju. Također, na rezultat utječu i stanične linije koje se koriste kao biološki test sustavi.

4.2. Ispitivanje antioksidacijskog djelovanja ekstrakata lišća bobičastog voća DCFH-DA metodom

Rezultati DCFH-DA metode prikazani su grafički, kao ovisnost postotka indukcije slobodnih radikala u CAL 27 (**slika 9**) i HepG2 (**slika 10**) stanicama o koncentraciji ekstrakta kojim su tretirane.



Slika 9. Prikaz utjecaja ekstrakata lišća bobičastog voća na indukciju slobodnih radikala stanične linije CAL 27 nakon tretmana 30 min. Različiti eksponenti iznad stupaca ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na: * kontrolu; ^a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; ^b $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$; ^c $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$; ^d $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc Tukeyev HSD*).



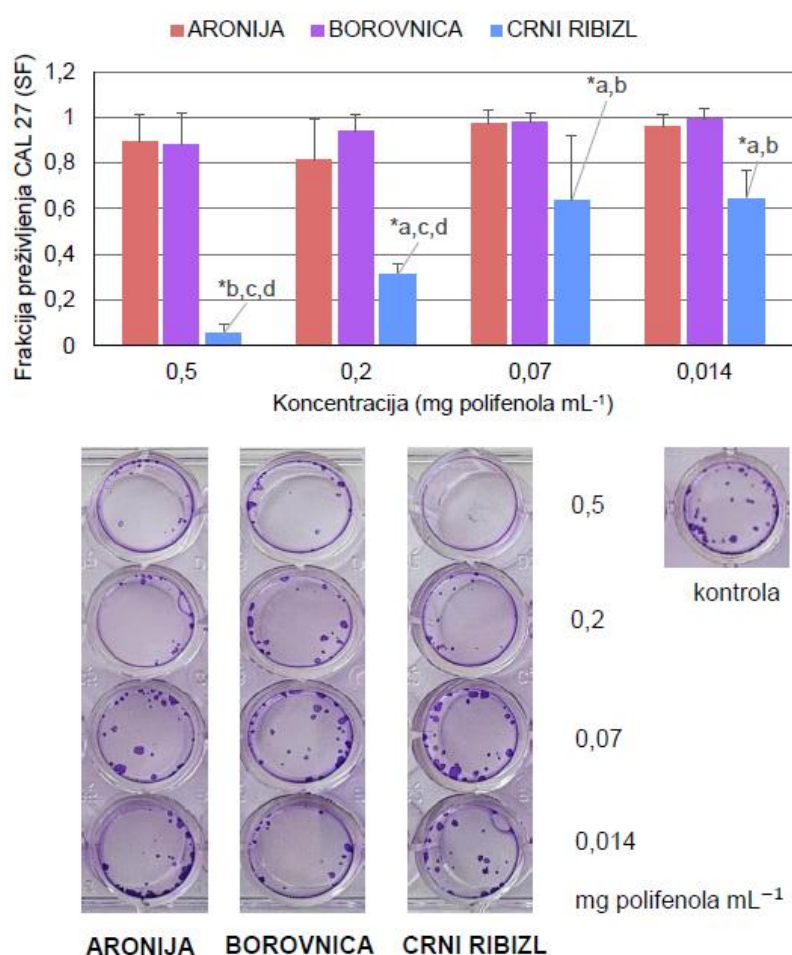
Slika 10. Prikaz utjecaja ekstrakata lišća bobičastog voća na indukciju slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana 2 h. . Različiti eksponenti iznad stupaca ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na: * kontrolu; ^a 0,5 mg mL⁻¹; ^b 0,2 mg mL⁻¹; ^c 0,07 mg mL⁻¹; ^d 0,014 mg mL⁻¹ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc Tukeyev HSD*).

Iz rezultata (**slika 9**) je vidljivo da je od tri ispitivana ekstrakta, jedino ekstrakt lista crnog ribizla najmanje koncentracije (0,014 mg polifenola mL⁻¹) pokazao statistički značajno antioksidativno djelovanje na obje ispitivane stanične linije, CAL 27 i HepG2. S druge strane, ekstrakt lista aronije u dvije najveće koncentracije, 0,5 i 0,2 mg polifenola mL⁻¹, pokazao je statistički značajno prooksidacijsko djelovanje na HepG2 stanice (**slika 10**). Ekstrakt lista borovnice nije pokazao nikakav učinak na indukciju ROS-ova u CAL 27 i HepG2 stanicama u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija.

Thi i Hwang, (2014) su pokazali da se antioksidacijski učinak ekstrakta lišća aronije povećava s koncentracijom (0 ~ 0,1 mg mL⁻¹) te da je učinak bio veći kod etanolnog nego vodenog ekstrakta. Razlika u rezultatima u odnosu na ovaj rad moguća je s obzirom na to da je antioksidacijski učinak mjeran *in vitro* kemijskim metodama bez upotrebe staničnih linija te je kao otapalo korištena puno veća koncentracija etanola (80 %). Rezultati istraživanja antioksidacijskog učinka ekstrakta lišća crnog ribizla drugih autora se slažu s rezultatima ovog rada. Ekstrakt lišća crnog ribizla pokazao je značajna antioksidacijska i protuupalna svojstva na staničnoj liniji ljudske pupčane vene (EAHy926) koja su u korelaciji s fenolnim sastojcima koje izvorno sintetiziraju biljke kako bi se zaštitile od patogena (Ferlemi i Lamari, 2016, Tabart i sur., 2012). Antioksidacijski učinak lišća bobičastog voća pozitivno korelira s visokim sadržajem fenolnih spojeva koji ovisi o načinu ekstrakcije te korištenom otapalu prilikom ekstrakcije.

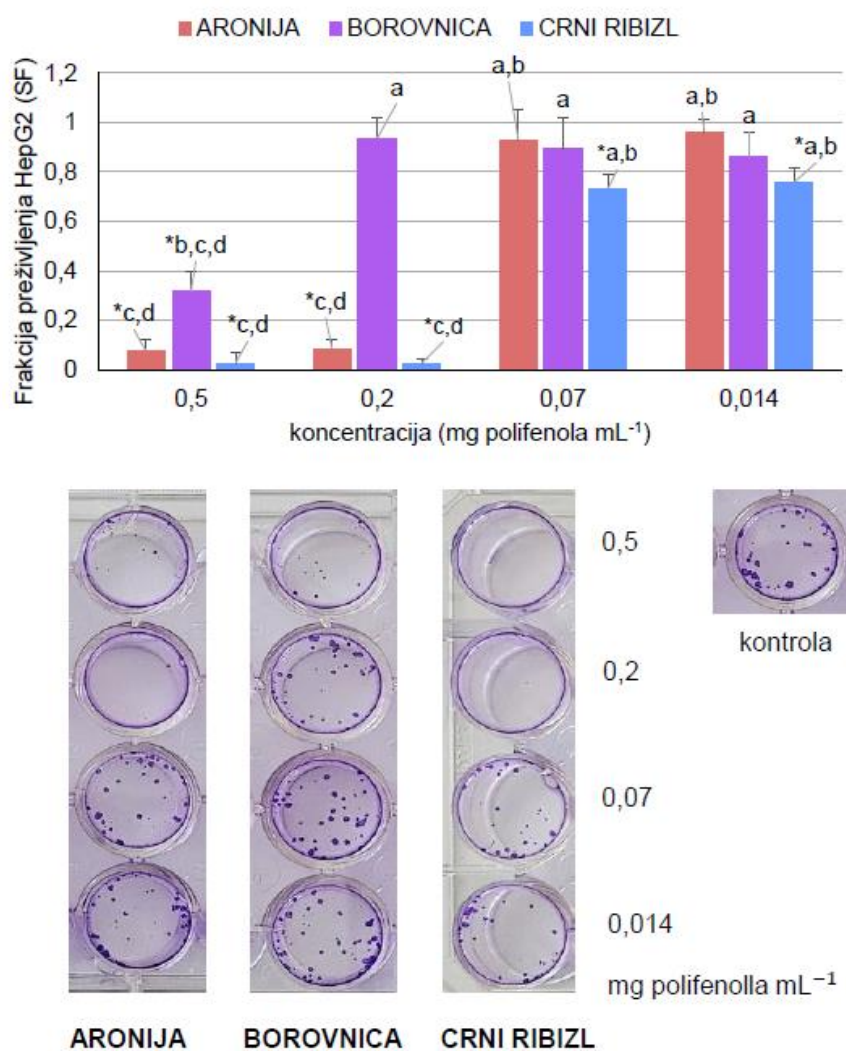
4.3. Ispitivanje proliferativnog učinka ekstrakata lišća bobičastog voća klonogenom analizom

Rezultati klonogenog testa su pokazali da od tri ispitivana ekstrakta lišća bobičastog voća jedino crni ribizl ima inhibitorni učinak na sposobnost stvaranja kolonija CAL 27 stanica, pri čemu je taj učinak ovisan o dozi odnosno najveća koncentracija ima najjači inhibitorni učinak na klonogeni rast CAL 27 stanica (**slika 11**). Pri čemu, najveća ispitivana koncentracija ekstrakta lista crnog ribizla smanjuje frakciju preživljenja (SF) CAL 27 stanica na $< 0,1$. Kod ekstrakta lista borovnice i aronije nema statistički značajnog učinka na klonogeni rast CAL 27 stanica.



Slika 11. Rezultati klonogene analize nakon 30 min tretmana CAL 27 stanica ekstraktima listova bobičastog voća. Različiti eksponenti iznad stupaca ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na: * kontrolu; ^a 0,5 mg mL⁻¹; ^b 0,2 mg mL⁻¹; ^c 0,07 mg mL⁻¹; ^d 0,014 mg mL⁻¹ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD).

Sposobnost stvaranja kolonija HepG2 stanica je najmanja nakon tretmana ekstraktom lista crnog ribizla, pri čemu je inhibitorni učinak na klonogeni rast veći porastom koncentracije ekstrakta (**slika 12**). Najveće ispitivane koncentracije ekstrakta lista crnog ribizla (0,2 i 0,5 mg polifenola mL⁻¹) smanjuju frakciju preživljenja (SF) HepG2 stanica na < 0,1 (frakcija preživljenja kontrole ~1). Također, na smanjenje sposobnosti stvaranja kolonija imaju utjecaj dvije najveće koncentracije ekstrakta lista aronije (0,5 i 0,2 mg mL⁻¹) i najveća ispitivana koncentracija ekstrakta lista borovnice (0,5 mg mL⁻¹). Ekstrakt lista aronije smanjio je frakciju preživljenja (SF) na < 0,2 dok ekstrakt lista borovnice na < 0,4.



Slika 12. Rezultati klonogene analize nakon 2 h tretmana HepG2 stanica ekstraktima listova bobičastog voća. Različiti eksponenti iznad stupaca ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na: * kontrolu; ^a 0,5 mg mL⁻¹; ^b 0,2 mg mL⁻¹; ^c 0,07 mg mL⁻¹; ^d 0,014 mg mL⁻¹ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD).

Dosadašnja znanstvena istraživanja slažu se s rezultatima ovog rada te pokazuju da ekstrakti bobičastog voća i njihovi pojedinačni pročišćeni fenolni sastojci inhibiraju proliferaciju stanica, moduliraju zaustavljanje staničnog ciklusa i induciranje apoptoze (programirana stanična smrt) tumorskih stanica s malim ili nikakvim citotoksičnim učincima na normalne stanice. Na primjer, ekstrakt borovnice inhibira rast tumorskih humanih staničnih linija usne šupljine (KB, CAL 27), dojke (MCF-7), debelog crijeva (HT-29, HCT116) i prostate (LNCaP) pri čemu se s povećanjem koncentracije ekstrakta povećava inhibitorno djelovanje na proliferaciju stanica. Stanice su bile tretirane ekstraktom u rasponu koncentracija od 0,03 do 0,2 mg mL⁻¹ tijekom 48 h te su dobivene IC₅₀ vrijednosti iznosile 0,2 za CAL 27, MCF-7 i KB stanice, 0,09 za HT-29, 0,09 za HCT116 te 0,04 mg mL⁻¹ za LNCaP staničnu liniju (Seeram i sur., 2006). Također, ekstrakt borovnice je u istraživanju kojeg su proveli Aaby i sur., (2013) pokazao dozno-ovisnu inhibiciju stanične proliferacije triju staničnih linija raka debelog crijeva (Caco-2, HT-29 i HCT 116) u rasponu koncentracija od 75 do 250 mg GAE (ekvivalent galne kiseline) L⁻¹. Ekstrakt lista aronije je u istraživanju Skupieñ i sur., (2008) inhibirao rast HL60 stanične linije, izolirane iz osobe oboljele od akutne promijelocitne leukemije, pri čemu je koncentracija potrebna za inhibiciju 50 % rasta (IC₅₀) iznosila 1060 ± 280 mg mL⁻¹. Liu i Li (2016) su u svom istraživanju koristili humane stanične linije karcinoma želuca (MKN-45) i jednjaka (TE-1) te normalnu staničnu liniju debelog crijeva (NCM460). Pokazali su da je preživljenje normalne stanične linije bilo više od 90 % nakon izlaganja ekstraktu crnog ribizla koncentracije 25 mg mL⁻¹ tijekom 48 h dok je za MKN-45 i TE-1 stanice iznosilo 27 % odnosno 40 %.

Kontradiktorni rezultati MTT testa u odnosu na klonogeni test u slučaju ekstrakta lista aronije mogu se objasniti time da se ove dvije tehnike koriste za procjenu različitih aspekata staničnog odgovora. Smanjenje sposobnosti stvaranja kolonija (klonogeni rast) moglo bi značiti da stanica tretirana ekstraktom lista aronije ne može dobro rasti bez međustanične interakcije. S druge strane, rezultati dobiveni MTT testom mogli bi značiti da ekstrakti lista aronije utječu na metabolizam i vijabilnost stanica tako da ubrzavaju stanični ciklus s obzirom da je pokazano proliferativno djelovanje na HepG2 staničnu liniju. Također, rezultati MTT testa mjere se odmah nakon tretmana (bez oporavka stanica) dok rezultati klonogenog testa 7 - 10 dana nakon tretmana (oporavak stanica). To bi također mogao biti faktor koji objašnjava različite rezultate odnosno MTT test pokazuje trenutni učinak ekstrakta, a klonogeni pokazuje trajni učinak.

5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakt lista aronije pokazuje proliferativni učinak na tumorske stanice epitela jetre (HepG2) pri čemu najveće ispitivane koncentracije imaju prooksidacijsko djelovanje te inhibiraju klonogeni rast HepG2 stanica što možemo objasniti time da ekstrakt lista aronije utječe na metabolizam/vijabilnost stanice tako da ubrzava stanični ciklus dok s druge strane utječe na smanjenje međustanične interakcije čime se inhibira njihov klonogeni rast.
2. Ekstrakt lista borovnice s preporučenom dnevnom dozom polifenola inhibira rast kolonija tumorskih stanica jetre HepG2, ali ne utječe na njihovu vijabilnost i stanični ciklus.
3. Od sva tri ispitivana ekstrakta lišća bobičastog voća, ekstrakt lista crnog ribizla je pokazao najveći biološki učinak na tumorske stanice epitela jezika i jetre (CAL 27 i HepG2); u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija smanjuje njihovo preživljenje te dozno-ovisno inhibira njihov klonogeni rast.

6. POPIS LITERATURE

Aaby K, Grimmer S, Holtung L (2013) Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT - Food Sci Technol* **54**, 257–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.031>

Aguilera JM (2024) Berries as foods: processing, products, and health implications. *Annu Rev Food Sci Technol* **15**, 1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-072023-034248>

ATCC (2024a) - The Global Bioresource center: HepG2. ATCC - American Type Culture Collection, < <https://www.atcc.org/products/hb-8065> >. Pristupljeno 20. kolovoza 2024.

ATCC (2024b) - The Global Bioresource center: CAL 27. ATCC - American Type Culture Collection, <<https://www.atcc.org/products/crl-2095>>. Pristupljeno 20. kolovoza 2024.

Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW i sur. (2017) Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **53**, 669–672. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* **5**, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

Chuu C-P, Lin H-P, Ciaccio MF, Kokontis JM, Hause RJ, Hiipakka RA i sur. (2012) Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev Res* **5**, 788–797. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0004-T>

Cortez RE, Gonzalez de Mejia E (2019) Blackcurrants (*Ribes nigrum*): A review on chemistry, processing, and health benefits. *J Food Sci* **84**, 2387–2401. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14781>

Cvetanović A, Zengin G, Zeković Z, Švarc-Gajić J, Ražić S, Damjanović A i sur. (2018) Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems,

leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chem Toxicol* **121**, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.045>

Declume C (1989) Anti-inflammatory evaluation of a hydroalcoholic extract of black currant leaves (*Ribes nigrum*). *J Ethnopharmacol* **27**, 91–98. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90081-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90081-0)

Elez Garofulić I, Repajić M, Cegledi E, Dobrosravić E, Dobrinčić A, Zorić Z i sur. (2024) Green approach to enhance the recovery of polyphenols from blackcurrant and bilberry leaves: evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extraction. *Molecules* **29**, 1351. <https://doi.org/10.3390/molecules29061351>

Erlund I (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* **24**, 851–874. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005>

Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* **594**, 57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4

Eskes C, Boström A-C, Bowe G, Coecke S, Hartung T, Hendriks G i sur. (2017) Good cell culture practices & *in vitro* toxicology. *Toxicol in Vitro* **45**, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.022>

Ferlemi A-V, Lamari F (2016) Berry leaves: an alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, 17. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>

Freshney R (2010) Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications, 6. izdanje, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken.

Garbacki N, Tits M, Angenot L, Damas J (2004) Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacol* **4**, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-4-25>

Harrison HF, Peterson JK, Snook ME, Bohac JR, Jackson DM (2003) Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]

storage root periderm. *J Agric Food Chem* **51**, 2943–2948.
<https://doi.org/10.1021/jf0211229>

Hartung T (2009) Toxicology for the twenty-first century. *Nature* **460**, 208–212.
<https://doi.org/10.1038/460208a>

Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem J* **428**, 183–190.
<https://doi.org/10.1042/BJ20100208>

Kim H, Xue X (2020) Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *J Vis Exp* **160**.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3791/60682>

Kulling S, Rawel H (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* **74**, 1625–1634.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1088306>

Kuzmanović Nedeljković S, Radan M, Čujić Nikolić N, Mutavski Z, Krgović N, Marković S i sur. (2023) Microencapsulated bilberry and chokeberry leaf extracts with potential health benefits. *Plants* **12**, 1–24. <https://doi.org/10.3390/plants12233979>

Lee JE, Kim G-S, Park S, Kim Y-H, Kim M-B, Lee WS, i sur. (2014) Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food Chem* **146**, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.029>

Li Z, Zhang H, Li Y, Chen H, Wang C, Wong VKW, i sur. (2020) Phytotherapy using blueberry leaf polyphenols to alleviate non-alcoholic fatty liver disease through improving mitochondrial function and oxidative defense. *Phytomedicine* **69**, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153209>

Liu B, Li Z (2016) Black currant (*Ribes nigrum* L.) extract induces apoptosis of MKN-45 and TE-1 cells through MAPK- and PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways. *J Med Food* **19**, 365–373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/jmf.2015.352>

Mao Z, Ke Z, Gorbunova V, Seluanov A (2012) Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging* **4**, 431–435. <https://doi.org/10.18632/aging.100467>

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Nascimento da Silva LC, Bezerra Filho CM, Paula RA de, Silva e Silva CS, Oliveira de Souza LI, Silva MV da i sur. (2016) *In vitro* cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. *Free Radic Res* **50**, 801–812. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1193668>

Nestby R, Percival D, Martinussen I, Opstad N, Rohloff J (2011) The European blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the potential for cultivation. A review. *EJPSB* **5**, 5–16

Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S (2014) Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. *Ind Crops Prod* **53**, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.022>

Pamies D, Leist M, Coecke S, Bowe G, Allen DG, Gstraunthaler G, i sur. (2021) Guidance document on good cell and tissue culture practice 2.0 (GCCP 2.0). *ALTEX* **39**, 30–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.14573/altex.2111011>

Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mity RR (2012) Introduction to cell culture. *Methods Mol Biol* **806**, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, i sur. (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp* **49**. <https://doi.org/10.3791/2573>

Ribera-Fonseca A, Jiménez D, Leal P, Riquelme I, Roa JC, Alberdi M, i sur. (2020) The anti-proliferative and anti-invasive effect of leaf extracts of blueberry plants treated with

methyle jasmonate on human gastric cancer *in vitro* is related to their antioxidant properties. *Antioxidants* **9**, 45. <https://doi.org/10.3390/antiox9010045>

Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Silveira LR, Pereira-Da-Silva L, Juel C, Hellsten Y (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radic Biol Med* **35**, 455–464. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00271-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00271-5)

Skupień K, Kostrzewa-Nowak D, Oszmiański J, Tarasiuk J (2008) *In vitro* antileukaemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and mulberry (*Morus alba* L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Phytother Res* **22**, 689–694. <https://doi.org/10.1002/ptr.2411>

Slater TF, Sawyer B, Sträuli U (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. *Biochim Biophys Acta* **77**, 383–393. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)90513-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)90513-4)

Sopov M, Njavro M (2013) Assessment of the Soft Fruit Sector - Croatia. Centre for Development Innovation, Wageningen UR. Report number CDI-13-025. www.wageningenur.nl/cdi Pristupljeno 20. srpnja 2024.

Staszowska-Karkut M, Chilczuk B, Materska M, Kontek R, Marciniak B (2023) Phenolic compounds in fractionated blackcurrant leaf extracts in relation to the biological activity of the extracts. *Molecules* **28**, 7459. <https://doi.org/10.3390/molecules28227459>

Tabart J, Franck T, Kevers C, Pincemail J, Serteyn D, Defraigne J-O, i sur. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chem* **131**, 1116–1122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.076>

Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J-O, Dommès J (2006) Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. *J Agric Food Chem* **54**, 6271–6276. <https://doi.org/10.1021/jf061112y>

Teleszko M, Wojdyło A (2015) Comparison of phenolic compounds and antioxidant

potential between selected edible fruits and their leaves. *J Funct Foods* **14**, 736–746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>

Thi N Do, Hwang E-S (2014) Bioactive compound contents and antioxidant activity in aronia (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Prev Nutr Food Sci* **19**, 204–212. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.3.204>

Weiskirchen S, Schröder SK, Buhl EM, Weiskirchen R (2023) A beginner's guide to cell culture: practical advice for preventing needless problems. *Cells* **12**, 682. <https://doi.org/10.3390/cells12050682>

Izjava o izvornosti

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

Marija Čaljkusić