

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Petra Petek, Andrea Petrinić

Istraživanje antioksidacijskog i bakteriostatičkog učinka vodenog ekstrakta i
izoliranih frakcija trave ive (*Teucrium montanum*)

Zagreb, 2022.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, kao dio istraživanja predloženih HRZZ projektom: „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“, voditeljice prof.dr.sc. Draženke Komes, a pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.“

POPIS KRATICA

AGS	humane stanice adenokarcinoma epitela želuca
BSA	albumin goveđeg seruma (od eng. Bovine Serum Albumin)
CaCo2	kontinuirana stanična linija adenokarcinoma epitela debelog Crijeva
CAL27	kontinuirana stanična linija pločastih epitelnih stanica raka jezika
DCFDA	2,7- diklorodihidrofluorescein diacetat
DMSO	dimetil sulfoksid
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
HepG2	kontinuirana stanična linija hepatocelularnog karcinoma jetre
LB	LB hranjiva podloga (eng. Luria-Bertani)
MRS	MRS hranjiva podloga (od eng. Man, Rogosa and Sharpe broth)
PBS	fosfatni pufer (od eng. Phosphate-buffered saline)
RNS	reaktivne dušikove vrste (od eng. Reactive Nitrogen Species)
ROS	reaktivne kisikove vrste (od eng. Reactive Oxygen Species)
TAE	puferska otopina Tris baze, octene kiseline i EDTA (od eng. Tris-acetate-EDTA pufer)
TCA	trikloroctena kiselina (od eng. Trichloroacetic acid)
TE	puferska otopina Tris baze i EDTA (od eng. Tris-EDTA pufer)

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	3
3.	TEORIJSKI DIO	4
3.1.	TRAVA IVA	4
3.2.	UČINAK TRAVE IVE NA ZDRAVSTVENI STATUS	5
3.3.	KEMIJSKI SASTAV	6
3.4.	POLIFENOLNI SPOJEVI	7
3.4.1.	Biološki aktivni spojevi trave ive: verbaskozid i ehinakozid	8
3.5.	METODE IZOLACIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA	10
3.6.	BIOLOŠKI UČINCI FITOKEMIKA LIJA	11
3.6.1.	Antioksidacijsko i prooksidacijsko djelovanje	11
3.6.2.	Citotoksičnost	14
3.6.3.	Genotoksičnost	15
3.7.	ANTIOKSIDANSI	15
4.	EKSPERIMENTALNI DIO	17
4.1.	MATERIJALI	17
4.1.1.	Uzorci	17
4.1.2.	Modelne makromolekule	17
4.1.3.	Biološki test sustavi	19
4.1.4.	Kemikalije	22
4.1.5.	Otopine	23
4.1.6.	Hranjive podloge	27
4.1.7.	Laboratorijski pribor	27
4.1.8.	Laboratorijski uređaji	28
4.2.	METODE	29
4.2.1.	Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka standarda i ekstrakta trave ive na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA	29
4.2.2.	Određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma	30
4.2.3.	Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakta trave ive na modelnom lipidu – linoleinska kiselina	31
4.2.4.	Određivanje citotoksičnog i antioksidacijskog učinka standarda i ekstrakta trave ive na staničnim linijama	32
4.2.5.	Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka standarda i ekstrakta trave ive na bakterijskim kulturama	36
4.2.6.	Obrada podataka	36

5.	REZULTATI I RASPRAVA	37
5.1.	PROOKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK EKSTRAKTA I IZOLIRANIH FRAKCIJA TRAVE IVE 37	
5.1.1.	Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA.....	37
5.1.2.	Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma	40
5.1.3.	Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelnom lipidu – linolenska kiselina	41
5.2.	ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA EKSTRAKTA I IZOLIRANIH FRAKCIJA TRAVE IVE	43
5.2.1.	Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na kontinuiranim humanim staničnim linijama	43
5.2.2.	Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na kontinuiranim humanim staničnim linijama	50
5.3.	CITOTOKSIČNI/PROLIFERATIVNI UČINAK EKSTRAKTA I IZOLIRANIH FRAKCIJA TRAVE IVE NA BAKTERIJE <i>E. COLI</i> , <i>S. AUREUS</i> I <i>L. PLANTARUM</i>	60
6.	ZAKLJUČAK.....	65
7.	ZAHVALE	66
8.	LITERATURA.....	67
9.	SAŽETAK.....	75
10.	SUMMARY	76

1. UVOD

Od davnina postoji veliki broj biljnih vrsta čiji se pripravci upotrebljavaju za liječenje i prevenciju mnogih bolesti i mentalnog zdravlja. Ljekovita svojstva biljaka i njihova primjena u terapijske svrhe pripisuje se bogatom sastavu različitih farmakološki aktivnih spojeva. Ekstrakti biljaka iz porodice *Lamiaceae* poznati su upravo po bogatom sastavu različitih biološki aktivnih spojeva koji ulaze u različite interakcije sa endogenim spojevima u staničnim biokemijskim procesima te tako mogu značajno utjecati na zdravstveno stanje ljudi i životinja (Oalđe i sur., 2020). Trava iva (*Teucrium montanum*) je samonikla biljka koja pripada spomenutoj porodici, raste u planinskim krajevima, a kod nas je poznata i pod nazivima dupčac i gorski smilj. Postoji staro narodno vjerovanje prema kojemu ova trava omogućuje mentalni i fizički oporavak nakon duge bolesti, teške tjelesne ili duševne iscrpljenosti, a uz nju se veže i narodna izreka: „Trava iva od mrtva pravi živa“. Nedovoljno istražena biljka trava iva potencijalno može predstavljati važan izvor biološki aktivnih komponenti, polifenola. Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji su odgovorni za ljekovito djelovanje kako u samim biljkama tako i drugim organizmima te su postali predmet znanstvenih istraživanja prvenstveno zbog njihovog potencijalnog pozitivnog učinka na ljudski organizam. Zastupljeni su u svim vrstama biljnih tkiva, gdje imaju niz fizioloških i morfoloških uloga poput pigmenata, biljnih hormona, obrane biljaka od biotičkih i abiotičkih stresora (Górniak i sur., 2019). Biljke pokazuju povećanu sintezu polifenola kao što su fenolne kiseline i flavonoidi u uvjetima abiotskog stresa, što pomaže biljci da se nosi s okolišnim ograničenjima. U takvim uvjetima (suša, salinitet, visoka/niska temperatura i ultraljubičasto zračenje) dolazi do nakupljanja različitih fenolnih spojeva koji pokazuju potencijal za uklanjanje štetnih reaktivnih kisikovih vrsta (Sharma i sur., 2019).

Cilj ovog rada je ispitati citotoksični, prooksidacijski i antioksidacijski učinak ekstrakata i izoliranih frakcija trave ive pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam tijekom 24 sata. Biološki učinak prati se djelovanjem na genetički materijal, određivanjem karbonilacije proteina te lipidne peroksidacije. Kao test sustavi korišteni su modeli staničnih makromolekula (plazmid phiX RF1 DNA, protein albumin iz goveđeg seruma i linoleinska kiselina) te kontinuirane humane stanične linije adenokarcinoma epitela želuca AGS, karcinoma epitela debelog crijeva Caco-2, hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 i humane stanice karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 kao glavne predstavnike ljudske mikrobiote. Ispituje se i citotoksično, odnosno proliferativno djelovanje na patogene bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* kao i na probiotsku bakteriju *Lactobacillus plantarum*.

Rezultati ovog istraživanja pokazat će djeluju li ekstrakt i izolirane frakcije trave ive protektivno na stanične makromolekule te inhibiraju li rast patogenih mikroorganizama i na

temelju dobivenih rezultata zaključit će se je li koncentracija bioaktivnih spojeva koji se nalaze u dnevnoj preporučenoj dozi ujedno i optimalna koncentracija odnosno doza unosa ekstrakta trave ive u organizam.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

1. utvrditi djeluju li ekstrakt i/ili izolirane frakcije trave ive citotoksično na humane stanice adenokarcinoma epitela želuca (AGS), adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2), hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) i karcinoma pločastog epitela jezika (Cal27)

2. utvrditi imaju li vodeni ekstrakt i/ili izolirane frakcije trave ive antioksidacijsko djelovanje na modelnim sustavima proteina, lipida i DNA (modelne molekule albumin, linoleinska kiselina i plazmid phiX174 RF1 DNA) te na kompleksnim staničnim sustavima; definirati uvjete u kojima dolazi do antioksidacijskog djelovanja

3. utvrditi djeluju li ekstrakt i/ili izolirane frakcije trave ive citotoksično na bakterijske kulture *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Lactobacillus plantarum*

Iz dobivenih rezultata utvrditi će se uvjeti u kojima vodeni ekstrakt te izolirane frakcije trave ive pokazuju protektivno djelovanje na stanične makromolekule kao i na stanice u cjelini. Definirat će se jesu li za antioksidacijsko djelovanje vodenog ekstrakta trave ive odgovorne izolirane frakcije ili svi spojevi koji se nalaze u vodenom ekstraktu. Nadalje, utvrditi će se uvjeti i koncentracije vodenog ekstrakta te izoliranih frakcija trave ive koji imaju bakteriostatičko djelovanje čime će se ustanoviti ima li trava iva komercijalni potencijal da se koristi kao antibakterijsko/bakteriostatičko sredstvo. Ujedno, utvrditi će se može li ekstrakt trave ive djelovati toksično na bakterije iz roda *Lactobacillus* te time poremetiti stabilnost crijevne mikroflore.

3. TEORIJSKI DIO

3.1. TRAVA IVA

Trava iva, *lat. Teucrium montanum*, višegodišnja je zimzelena biljka, u narodu znana i pod nazivima planinski dupčac ili gorski smilj. Pripada porodici *Lamiaceae* (hrv. *usnače*), iz koje još dolaze i poznatiji origano, kadulja i timijan, te redu *Lamiales* (hrv. *medicinske*). Na području Europe, rod *Teucrium* podijeljen je u 7 sekcija, s *T. montanum* L. svrstanom u sekciju *Polium* (Lakusic i Lakušić, 2014; Milošević-Djordjević i sur., 2013). Pronalazi se u južnoj i središnjoj Europi, do Nizozemske na sjeveru te od Ukrajine prema zapadu. Također je rasprostranjena u afričkom Alžiru te Maloj Aziji. Na Balkanskom poluotoku je široko rasprostranjena, pa se tako može pronaći od crnogorske obale na jugozapadu, sve do obala rijeke Dunav na sjeveroistoku te od jadranske obale do nadmorskih visina preko 2100 metara u dinarskim predjelima. Nastanjuje visinske predjele od obalnog područja do 2100 metara nadmorske visine, dok optimum rasta pokazuje između 500 i 1000 metara nadmorske visine (Lakusic i Lakušić, 2014). Biljka je poludrvenasti, mali grm s polegnutim granama, a raste do 25 cm visine, obično na vapnenačkim stijenama (Stankovic i sur., 2011). Prepoznatljiva je po malim grmićima s blijedo žućkastim cvjetićima na vrhovima grančica. Stabljike su pretežno uzdignute i djelomično drvenaste, a listovi su bez peteljke, dlakavi, zeleni i sivo bjeličaste boje. Ova biljka raste po suhim, toplim i krševitim mjestima te preferira vapnenac i tlo izvedeno iz dolomitne stijene, ali uspješno raste i na serpentinitima i kiselom kremenom tlu. Ekološki optimum pokazuju u vegetaciji kontinentalnog kamenjara i kserofilne listopadne šume, iako se često može pronaći i u vegetaciji otvorenih crnogoričnih šuma, alpskih i subalpski travnjak. Ponegdje naseljava vegetaciju mediteranskog kamenjara, garig i mediteranske zimzelene šume te tamne boreo-montanske crnogorične šume. Moguće, iako vrlo rijetko, da će se pronaći na terenima kao što su vlažne livade i higrofilne listopadne šume (Lakusic i Lakušić, 2014).

Zbog visoke morfološke varijabilnosti, *T. montanum* predstavlja kompleks više ili manje dobro definiranih podvrsta i varijeteta, od kojih su neki opisani kao zasebne vrste. Trenutno postoji bogatstvo vrsta, podvrsta i varijeteta unutar *T. montanum*: *T. supinum* L., *T. skorpii* Vel., *T. helianthemoides* Adamović, *T. jilae* Juz., *T. praemontanum* Klokov, *T. pannonicum* A. Kerner *T. montanum* var. *parnassicum* Čel., *T. Montanum* var. *hirsutum* Boiss. itd (Lakusic i Lakušić, 2014). Područje Mediterana predstavlja glavninu područja koje naseljava ovaj rod, obzirom da se na tim predjelima pronalazi oko 96 % svih vrsta iz navedenog roda. Unutar regije Mediterana, na razini vrsta i podvrsta, prisutno je 195 svojti, od toga 41 na Balkanskom poluotoku (Lakušić i sur., 2010).

Biljku karakterizira tanka, okrugla stabljika koja je još od osnove razgranata. Mlade stabljike su prekrivene kratkim, sivim dlačicama (Petrović, 2014). Listovi su eliptičnih oblika, od širokoeliptičnih do uskih, pa i gotovo linearnih, nazubljeni, postupno suženi u vrlo kratku peteljku. Duljina listova varira od 12 do 26 mm, a širina između 24 i 125 mm. Također mogu biti prekriveni dlačicama, ili pak goli. Na vrhovima grana nalaze se sitni cvjetovi, blijedožute boje s kratkom peteljkom. Cvjeta od lipnja do rujna (Lakusic i Lakušić, 2014; Petrović, 2014).



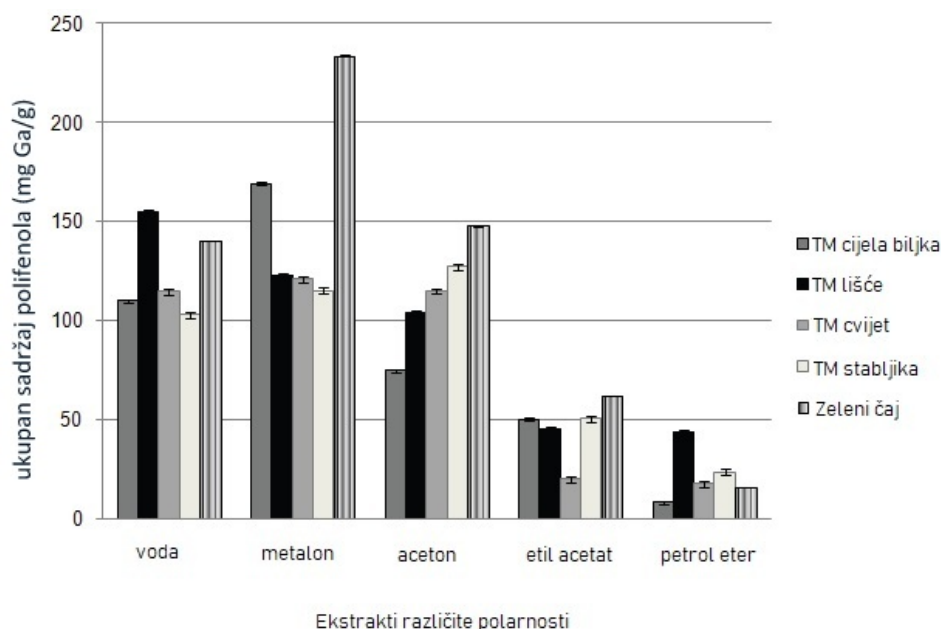
Slika 1. Trava iva (lat. *Teucrium montanum*) (Langbroek, 2013)

3.2. UČINAK TRAVE IVE NA ZDRAVSTVENI STATUS

Nadzemni dio biljke od davnina se koristi u fitoterapiji, a skuplja se u vrijeme cvjetanja. Danas je poznato da trava iva posjeduje ljekovita biološka svojstva zbog kojih se koristi u etnobotaničkoj medicini, farmaciji ali i prehrambenoj industriji. Dokazan je njezin hipoglikemijski, hipolipidemijski, hepatoprotektivni učinak. Koristi se kao diuretik, analgetik, kod bolova u trbuhu i grčeva te liječenja respiratornih bolesti. Osim toga, karakterizira se antimikrobnim, antifungalnim, protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem. Doprinosi jačanju organizma poslije bolesti, nakon teških tjelesnih aktivnosti i kod stresa (Milošević-Djordjević i sur., 2013; Petrović, 2014; Stankovic i sur., 2011).

3.3. KEMIJSKI SASTAV

Istraživanje i uporaba biljaka u medicinske svrhe seže u daleku prošlost čovječanstva. Još su stari Rimljani, Egipćani, Babilonci, Arapi i Kinezi ublažavali bolove i liječili bolesti koristeći bilje, a sva stečena znanja su zapisivali. Prvi ljekarnici skupljali su biljke za koje su uočili da imaju blagotvorno djelovanje, a ubrzo su ga počeli i sami uzgajati. Njegujući svoje biljke, ubrzo su prepoznali i da različiti dijelovi iste biljke nemaju jednako djelovanje, što je bila važna spoznaja koja je omogućila usmjeravanje istraživanja ljekovitih biljaka i njihove potencijalne farmakološke aplikacije na zasebne dijelove biljke. Danas je poznato da je osnovni preduvjet za ciljano liječenje odgovarajuća koncentracija aktivne tvari, što se u modernoj farmaciji postiže izdvajanjem čistih, standardiziranih sastojaka (Hrvatska enciklopedija; Stankovic i sur., 2011). Na slici 2. prikazan je ukupan sadržaj polifenola u različitim dijelovima biljke *T. montanum* te u otapalima različite polarnosti, u odnosu na zeleni čaj, kao dobro poznatu i istraženu ljekovitu biljku. Najveći sadržaj polifenolnih spojeva detektiran je u metanolnom ekstraktu cijele biljke (169.06 mg GA/g) i vodenom ekstraktu lišća (154.81 mg GA/g), dok etil acetatni i petrol eter ekstrakt pokazuju vidljivo niže vrijednosti. Može se primijetiti kako su veće vrijednosti polifenola dobivene upotrebom polarnijih otapala.



Slika 2. Ukupan sadržaj polifenola u različitim dijelovima biljke i u otapalima različite polarnosti (Stankovic i sur., 2011)

Među karakteristična staništa *T. montanum* svrstava se i Balkanski poluotok, sa svojom kontinentalnom klimom i suhim zrakom. Biljke koje rastu u takvim uvjetima izložene su ultraljubičastom B (UVB) zračenju. UVB zračenje i suša predstavljaju faktor stresa za rast biljke, što aktivira sintezu sekundarnih metabolita u biljkama, koji posjeduju odgovarajuću biološku aktivnost (Vujanovic i sur., 2019). Sekundarni metaboliti su spojevi koji nemaju ulogu u rastu i razvoju biljke, niti u primarnim biljnim procesima, kao što su fotosinteza, stanično disanje, asimilacija nutrijenata i transport tvari. Oni biljci služe kao zaštita protiv virusa, bakterija, plijesni, drugih biljaka, UV-zračenja i biljojeda, a imaju i antioksidacijsko djelovanje (Van Wyk i Wink, 2017). U kontekstu navedenog, posebna pažnja posvećuje se istraživanju bioaktivnih spojeva u biljkama koje rastu u divljini, kao što je to *T. montanum*, obzirom da se njihova sposobnost preživljavanja u okolišnim uvjetima dijelom temelji na prisustvu vrijednih nutrijenata, alkaloida, polifenola, fitoestrogena, a koji danas pružaju novu perspektivu u farmaciji i farmakologiji (Vujanovic i sur., 2019).

3.4. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi kao sastojci hrane pažnju su počeli privlačiti devedesetih godina dvadesetog stoljeća, nakon porasta broja istraživanja koja su u korelaciju dovela prehrambeni unos polifenola i učestalost obolijevanja od pojedinih kroničnih bolesti. Polifenoli su najčešći antioksidansi u ljudskoj prehrani, a pripadaju sekundarnim biljnim metabolitima. Sekundarni biljni metaboliti ispoljavaju različite biološke aktivnosti, pa redovita konzumacija namirnica koje su njima bogate može rezultirati kako pozitivnim tako i negativnim posljedicama. Pojedini polifenoli specifični su za određenu hranu (flavanoni u agrumima, izoflavoni u soji, floridzin u jabukama), a neki se nalaze u većini biljaka (voće, povrće, žitarice, mahunarke, čaj i vino). Ipak, hrana generalno sadrži kompleksnu smjesu polifenola. Najvažnijim prehrambenim izvorima mogu se smatrati namirnice koje se konzumiraju u velikim količinama, kao što su to voće, povrće, zeleni čaj, crni čaj, crveno vino, kava, čokolada, masline, ekstra djevičansko maslinovo ulje ali i začini, bilje, orašasti plodovi i alge. Ustanoviti distribuciju polifenola u ljudskoj prehrani prvi je korak k utvrđivanju dokaza o njihovom pozitivnom djelovanju na ljudsko zdravlje i prevenciju bolesti. Potrebno je procijeniti sadržaj polifenolnih spojeva u pojedinoj namirnici ali i identificirati koji od mnogobrojnih polifenola imaju najveći efekt u kontekstu prevencije. Osim same količine polifenolnih spojeva u namirnici, važna je i njihova biodostupnost. Pojam biodostupnost odnosi se na količinu nutrijenta ili spoja, unesenog u probavni sustav, koji dopijeva do sistemske cirkulacije i ciljnog tkiva, gdje ispoljava svoju biološku aktivnost. Na biodostupnost utječu čimbenici kao što su to okolišni čimbenici, postupak procesiranja hrane, čimbenici vezani uz samo hranu, interakcije s drugim

komponentama hrane, struktura samih polifenola te čimbenici vezani za pojednica koji probavlja hranu. Teško je izvesti zaključak o biološkom djelovanju i biodostupnosti određenog polifenola, ponajviše zbog sinergijskog djelovanja polifenola u matriksu hrane (Stankovic i sur., 2011; D'Archivio i sur., 2010).

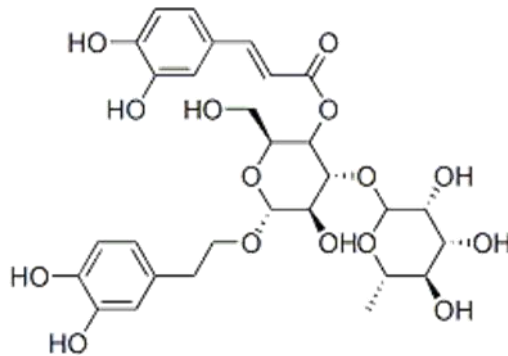
Osnovu strukture polifenolnih spojeva čini benzenski prsten na koji je vezana – OH skupina. Osnovnu podjelu čine *i*) fenolne kiseline, koje čine derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline *ii*) flavonoidi, s flavanolima, flavanolima, flavonima, izoflavonima, antocijanidinima i flavanonima kao najvažnijim podskupinama, *iii*) stilbeni i *iv*) lignani. Čak dvije trećine prehranbenog unosa polifenola čine flavonoidi (Han i sur., 2007). Na temelju rezultata istraživanja (Stankovic i sur., 2011), dijelovi biljke *T. montanum* bogati su izvori fenolnih spojeva visoke vrijednost. Većina polifenola u hrani je prisutna u obliku polimera ili u glikoziliranoj formi, gdje se šećerna skupina naziva *glikon* a polifenolna *aglikon*. Apsorpcija u takvim oblicima nije moguća, zbog čega se u probavnom sustavu vrši hidroliza djelovanjem probavnih enzima ili mikroflore debelog crijeva. Na brzinu apsorpcije, kao i njezin opseg, utječe specifična kemijska struktura polifenola i vrsta šećera u glikozidu (D'Archivio i sur., 2010). Podaci koji opisuju *in vitro* i *in vivo* biološku aktivnost polifenola iz prehrane prilično su neujednačeni, ali ukazuju na relativno slabu bioraspoloživost te brz metabolizma i izlučivanje. Polifenoli i njihovi metaboliti, nakon prispjeća u debelo crijevo, bivaju razgrađeni u male fenolne kiseline i aromatske katabolite djelovanjem mikrobiote. Apsorbiraju se u krvožilni sustav te putuju do ciljanih tkiva, gdje ispoljavaju svoje zaštitno djelovanje (Alipieva i sur., 2014).

3.4.1. Biološki aktivni spojevi trave ive: verbaskozid i ehinakozid

Verbaskozid i ehinakozid pripadaju skupini feniletanoidnih glikozida. Feniletanoidni glikozidi uspješno su izolirani iz korijena, stabljike, kore, lišća, cvijeća, plodova i sjemena ljekovitog bilja, kao i iz suspenzijskih staničnih kultura, kalusnog tkiva i kultura dlakavog korijena, iako njihove količine mogu znatno varirati u ovisnosti o dijelu biljke. Pronalaze se i u jestivom cvijeću i čajevima. Do danas su pronađeni kod predstavnika obitelji *Acanthaceae*, *Berberidaceae*, *Asteraceae*, *Gesneriaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae*, *Magnoliaceae*, *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Portulacaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae* i *Verbenaceae*. Osnovna struktura feniletanoidnih glikozida podrazumijeva hidroksifeniletilnu jedinicu, kao aglikon, vezanu za šećernu jedinicu, glikon, glikozidnom vezom u C – 1. Kao šećerna jedinica najčešće se pojavljuje β – D – glukopiranoza, u većini slučajeva esterificirana s derivatom hidroksicimetne kiseline kao što je kafeinska kiselina, kumarinska kiselina, cimetna kiselina i ferulinska kiselina. Na šećernu jedinicu mogu još biti vezane i ramnoza, ksiloza, arabinoza, aloza, galaktoza, itd. Općenito, moguće je vezanje od jedne do pet šećernih

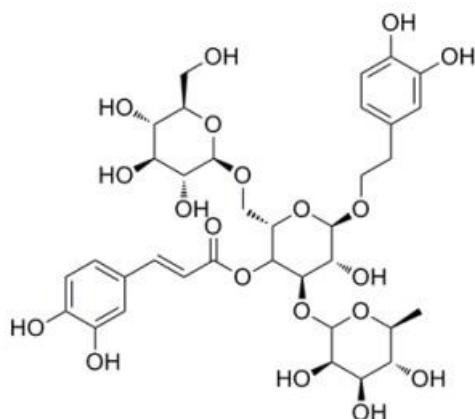
jeidnica. Upravo je razlika u vrsti i broju povezanih šećernih jedinica, kao i vrsti hidroksifeniletalne skupine, ključ raznolikosti feniletanoidnih glikozida (Wu i sur., 2020).

Verbaskozid, nazivan još i akteozid, jedan je od glavnih predstavnika feniletanoidnih glikozida, a detektiran je unutar obitelji *Lamiaceae*, *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae* i *Orobanchaceae*. Istraživanja potencijalnog funkcionalnog djelovanja verbaskozida većinom su bila usmjerena na utvrđivanje antimikrobnog i antifungalnog djelovanja, a što je proizašlo iz narodne medicine, obzirom da su se njime bogate biljke koristile za tretiranje upala i mikrobnih infekcija. Dosadašnje studije provedene na životinjama ukazuju na brzu apsorpciju – najviša koncentracija u plazmi postignuta je nakon otprilike 15 min, i eliminaciju. Niska lipofilnost verbaskozida otežava prodiranje kroz kožu, time ograničavajući mogućnost topikalne primjene njegovih potencijalnih pripravaka (Alipieva i sur., 2014).



Slika 3. Kemijska struktura verbaskozida (Anonymous 1)

Ehinakozid je prvi put izoliran prije šezdesetak godina, a od tad je utvrđeno nekoliko njegovih pozitivnih učinaka na zdravlje, između kojih neuroprotektivan učinak kao najizraženiji. Nekoliko studija izvijestilo je o efikasnom tretmanu Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, koristeći test stanične linije i životinjske modele. Osim neuroprotektivnog, treba spomenuti i kardioaktivno, protuupalno, antioksidativno i antiosteoporotično djelovanje (Liu i sur., 2018).



Slika 4. Kemijska struktura ehinakozida (Liu i sur., 2018)

Sistemske učinci feniletanoidnih glikozida određeni su stopom njihove bioraspoloživosti unutar gastrointestinalnog trakta, a za koju se čini da je relativno slaba, te brzog metabolizma i izlučivanja iz organizma. U cirkulaciji se pojavljuju u obliku metabolita faze II, a njihova koncentracija u plazmi rijetko prelazi razine nM (Liu i sur., 2018).

3.5. METODE IZOLACIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

Brojnim istraživanjima potvrđeno je da feniletanoidni glikozidi imaju pozitivne učinke na zdravlje. U svrhu njihove šire uporabe, potrebno je razviti efikasne mehanizme njihove proizvodnje. Ehinakozid visoke čistoće moguće je dobiti klasičnim metodama izolacije iz ljekovitog bilja, uz semipreparativnu tekućinsku kromatografiju ili protustrujnu kromatografiju. Prinos ehinakozida je na taj način između 0,2% i 0,4%. Nadalje, vodeni dvofazni proces ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka dao je bolji prinos u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom uz pomoć ultrazvuka. Na prinos utječe proces pripreme biljke, između ostaloga čimbenici kao što su debljina usitnjenih komadića, temperatura sušenja, vrijeme inaktivacije enzima. Ehinakozid se pokazao kao osjetljiv na enzimsku razgradnju i oksidaciju u hidroalkoholnim otopinama tijekom procesa ekstrakcije, te na obradu pri visokim temperaturama (Liu i sur., 2018). Brza protustrujna kromatografija pokazala se učinkovitom i prilikom izolacije verbaskozida, uz postizanje visoke čistoće (Alipieva i sur., 2014).

Međutim, metode izolacije iz ljekovitog bilja ne mogu zadovoljiti sve veće potrebe, zbog čega su do danas razvijeni i postupci kemijske sinteze (Liu i sur., 2018).

3.6. BIOLOŠKI UČINCI FITOKEMIKALIJA

3.6.1. Antioksidacijsko i prooksidacijsko djelovanje

Slobodni radikali nastaju kao posljedica odvijanja normalnog staničnog metabolizma, a definiraju se kao atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci ili vanjskoj orbiti te su sposobni za neovisno postojanje. Neparan broj elektrona slobodnog radikala čini ga nestabilnim, kratkotrajnim i vrlo reaktivnim, zbog čega slobodni radikali napadaju druge molekule, kako bi im oteli elektrone i time postigli vlastitu stabilnost. Molekula napadnuta slobodnim radikalom gubi svoj elektron i sama postaje slobodni radikal, čime započinje kaskada lančanih reakcija koje posljedično oštećuju živu stanicu. Višak proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) uzrokuje oksidativni, odnosno nitrozativni stres. Također, do oksidativnog i/ili nitrozativnog stresa može doći i u situacijama nedostatka enzimskih i neenzimskih antioksidanasa. Najvažniji radikali koji se produciraju prilikom metaboličkih reakcija su ROS, tipični nusprodukti lanca prijenosa elektrona tijekom staničnog disanja u aerobnim organizmima, a dodatno potječu od anaboličkih procesa i peroksisomalnog metabolizma (Chatterjee i Walker, 2017; Phaniendra i sur., 2015). ROS se, jednako kao i RNS, mogu podijeliti na radikale (superoksidni ($O_2^{\cdot-}$), kisikov radikal ($O_2^{\cdot\cdot}$), hidroksilni (OH^{\cdot}), alkoksiradikal (RO^{\cdot}), peroksilni radikal (ROO^{\cdot})) i neradikale (vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kiselina (HOCl), hipobromna kiselina (HOBr), ozon(O_3)) (Phaniendra i sur., 2015).

ROS mogu nastati endogenim ili egzogenim putem. Mjesta endogene stanične proizvodnje ROS su ona s velikom potrošnjom kisika, kao što su mitohondriji, peroksisomi ili endoplazmatski retikulum, dok su za egzogeni nastanak odgovorni činitelji kao što su ionizirajuće zračenje, UV radijacija, zagađivači okoliša i sl. (Phaniendra i sur., 2015; Dizdaroglu i Jaruga, 2012). U umjerenim količinama ROS imaju pozitivne učinke na zdravlje te su uključeni u različite fiziološke funkcije kao što su imunološka funkcija (obrana od patogenih mikroorganizama), stanični signalni putevi, mitogeni odgovor i redoks regulacija. Međutim, u visokim količinama, slobodni radikali mogu negativno utjecati na različite važne skupine bioloških makromolekula kao što su nukleinske kiseline, lipidi i proteini, mijenjajući tako normalni redoks status, a što dovodi do povećanog oksidativnog stresa. Oksidativni stres predstavlja stanje neravnoteže ROS i RNS i antioksidanasa, pri čemu ROS i RNS nastaju u većim koncentracijama. Provođenjem reakcija metabolizma, i sama stanica također proizvodi ROS, dok istovremeno ima vlastite mehanizme antioksidacije, kako se ROS ne bi nakupljale u previsokoj količini. Međutim, kada produkcija ROS nadvlada mehanizme stanice za njihovo

čišćenje, u stanici dolazi do oksidativnog stresa, odnosno do različitih oksidativnih oštećenja, za koja se danas smatra da imaju ulogu u patogenezi bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti (Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, multipla skleroza), kardiovaskularne bolesti (ateroskleroza i hipertenzija), bolesti dišnog sustava, razvoj katarakte, rak (kolorektuma, prostate, dojke, pluća, mokraćnog mjehura) i dijabetes (Eruslanov i Kusmartsev, 2010; Phaniendra i sur., 2015).

ROS izravno reagiraju s gradivnim komponentama DNA, različitim mehanizmima uzrokujući oštećenja na dušičnim bazama i šećernoj skupini (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Dok proteini i lipidi pogođeni oksidacijom mogu biti uklonjeni, isto nije moguće za DNA, već ona mora biti popravljena, jer ukoliko nastale lezije nisu adekvatno sanirane, može doći do mutacija (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Osim popravka lezija, stanica posjeduje i određenu toleranciju na oštećenja, kontrolne točke staničnog ciklusa i puteve stanične smrti, a sve u cilju što efikasnijeg sprječavanja mutageneze, citostaze i citotoksičnosti (Chatterjee i Walker, 2017; Cooke i sur., 2003). Ovisno o podrijetlu, oštećenja DNA mogu se podijeliti na endogeno i egzogeno uzrokovana. Dok glavnina endogenih oštećenja dolazi od interakcije kemijski aktivne DNA s vodom i ROS, koji su normalno prisutni unutar stanice, egzogena oštećenja uglavnom nastaju djelovanjem vanjskih čimbenika (okolišni, fizikalni, kemijski) (Chatterjee i Walker, 2017). U kontekstu oštećenja DNA, najvažniji radikal je hidroksilni, koji reagira s DNA adicijom na dvostruke veze dušičnih baza i oduzimanjem vodika metilnoj skupini timina ili nekoj od C – H veza 2' – deoksiriboze. Dva su osnovna mehanizma popravka oksidativnih oštećenja molekule DNA: izrezivanje oštećene baze djelovanjem enzima glikozilaze, ili izrezivanje nukleotida, odnosno uklanjanje kompletnog oligonukleotida koji sadrži lezije (Cooke i sur., 2003). Sunčeva svjetlost može biti vrlo jak egzogeni faktor genotoksičnog djelovanja. Spektar sunčevog elektromagnetskog zračenja čini UV – područje, vidljiva svjetlost i infracrveno zračenje. Tri su kategorije UV zračenja, ovisno o rasponu valne duljine: UV-C (190–290 nm), UV-B (290–320 nm) and UV-A (320–400nm), a maksimalna apsorpcija UV zračenja molekule DNA odvija se na 260 nm. Dva su mehanizma kojima UV zračenje oštećuje molekule, a oba mehanizma utječu na DNA. Prvo, ako molekula može apsorbirati svjetlost neke valne duljine, ta molekula prelazi u pobuđeno stanje i dolazi do njene fotokemijske promjene. Drugo, ako molekula ne može apsorbirati svjetlost neke valne duljine, dolazi do indirektnog prijenosa energije s okolnih molekula, fotosenzibilizatora (Chatterjee i Walker, 2017). UV – A uzrokuje oksidativne lezije te stvara oštećenja indirektno, putem fotosenzibilizatora, dok djelovanjem UV – B i UV – C posljedično dolazi do nastajanja mutagenih fotodimera na dipirimidinskim mjestima (Mullenders, 2018). Kako bi se sekundarni biljni metaboliti mogli razmatrati u kontekstu zaštite kože od fotostarenja, moraju biti fotostabilni i ne smiju promovirati fotokemijske reakcije u koži. Nekoliko je ključnih točaka u kojima se može ispoljiti njihovo djelovanje: i) apsorpcija UVA +

UVB; ii) ometanje UV – induciranih reakcija slobodnih radikala u komponentama kože (tzv. čišćenjem i izravnim antioksidacijskim djelovanjem); iii) zaštita endogenih antioksidanasa (α – tokoferoli, koenzim Q10, skvalen); iv) induciranje endogenih antioksidacijskih sistema u keratinocitima; v) ublažavanje upalnog odgovora u keratinocitima; vi) moduliranje pretjeranih metaboličkih i proliferativnih odgovora na stres (Alipieva i sur., 2014). Usporedbom navedenih akcija prilikom primjene nekoliko različitih biljnih polifenola (Kostyuk i sur., 2013), verbaskozid se pokazao kao optimalna opcija za topikalnu fotozaštitu, a posljedično za kemoprevenciju UV – induciranog nemelanomskog raka kože (Alipieva i sur., 2014).

Nakon vode, proteini u najvećem udjelu izgrađuju ljudsko tijelo, zbog čega su i glavna meta različitih oksidanasa (Stadtman i Levine, 2006). Oksidacijom različitih aminokiselinskih ostataka koji grade proteine dolazi do stvaranja poprečnih veza između proteina, čime se protein denaturira i posljedično gubi svoju funkcionalnost (Phaniendra i sur., 2015). Radikali proteina koji nastaju ovise o prirodi i reaktivnosti samog oksidansa koji napada. Elektrofilni radikali ($\text{HO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ i ostali iz skupine ROS) učestaliji su nego nukleofilni u in vivo sustavima. Kako elektrofilnim radikalima nedostaje elektron, napadaju mjesta bogata elektronima. Često je to crpljenje vodika iz C – H veze, ili S – H veze u slučaju cisteina i metionina (Phaniendra i sur., 2015; Stadtman i Levine, 2006). Nukleofilni radikali (fenil i druge vrste s ugljikom) napadaju mjesta kojima nedostaje elektron. Napadi radikala selektivniji su kod onih slabije reaktivnih, a uvelike ovisi o strukturnoj građi proteina kojeg napad. Stoga je napad na bočne lance značajniji kod globularnih proteina, dok kod manje uređenih struktura veća šteta može nastati na okosnici. Razmjeri štete i važnost štete nisu nužno od jednakog značaja. Tako manja šteta na kritičnom mjestu može imati veći efekt nego velika šteta na mjestu od manjeg značaja (Stadtman i Levine, 2006). U oksidaciju proteina mogu biti uključeni radikali kao što su superoksidni, hidroksilni, peroksilni, alkoksilni, hidroperoksilni ali i neradikalne oksidirajuće vrste (Phaniendra i sur., 2015). Oksidacijom različitih aminokiselinskih ostataka nastaju različiti produkti. Napadom ROS na ostatke lizina, prolina, treonina i arginina nastaju karbonilni derivati. Prisutnost karbonilnih grupa u proteinu koristi se kao marker prilikom utvrđivanja oksidacije proteina reaktivnim kisikovim vrstama (Phaniendra i sur., 2015). U uvjetima prisutnosti O_2 nastaju velike količine proteinskih peroksida, koji dalje mogu oksidirati druge proteine i različite druge molekule. Nastali protein – hidroperoksidi mogu dovesti do inhibicije enzima ili smanjenja njihove aktivnosti, a što je često povezano s oksidacijom cisteinskih ostataka. Također, proteinski radikali mogu reagirati s komponentama DNA i tako stvoriti protein – DNA adukte. Mali broj studija ukazuje i na to da bi nastajanje protein – hidroperoksida moglo prethoditi inicijaciji oksidacije lipida (Stadtman i Levine, 2006). Za razliku od H_2O_2 , za koji u tijelu postoje efikasni i brzi sustavi uklanjanja, proteinski peroksidi uklanjaju se sporo, većinom katabolizmom (Davies, 2016). Govoreći o

popravku nastalih oštećenja na proteinima, može se spomenuti samo redukcija oksidiranih aminokiselinskih ostataka koji sadrže sumpor, djelovanjem dva različita enzima: disulfid reduktaze i metionin sulfoksid reduktaze. Dodatni mehanizmi popravka nisu zabilježeni (Phaniendra i sur., 2015; Stadtman i Levine, 2006).

Stanične membrane u svome sastavu sadrže značajan udio polinezasićenih masnih kiselina, koje mogu biti esterificirane. Takve masne kiseline predstavljaju metu za napad slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija podrazumijeva reakciju lipida s molekularnim kisikom. Proces se sastoji od tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Yin i sur., 2011). U fazi inicijacije formira se lipidni radikal $L\cdot$, kada slobodni radikal napadne masnu kiselinu i oduzme vodik iz metilenske (CH_2) skupine. Takav lipidni radikal u fazi propagacije reagira s molekularnim kisikom čime se stvara peroksilni radikal $LOO\cdot$. Zatim, u slijedu lančanih reakcija $LOO\cdot$ oduzima vodik organskoj molekuli iz svoje okoline, čime se on stabilizira a nastaje novi radikal (Phaniendra i sur., 2015; Yin i sur., 2011). Primarni produkti peroksidacije masnih kiselina su peroksidi ili hidroperoksidi, no obzirom da su to nestabilne molekule, brzo se raspadaju na aldehide, ketone i dr. (Yin i sur., 2011). Kao posljedica lipidne peroksidacije, dolazi do smanjena fluidnosti stanične membrane, inaktivacije membranskih enzima i receptora (Phaniendra i sur., 2015).

3.6.2. Citotoksičnost

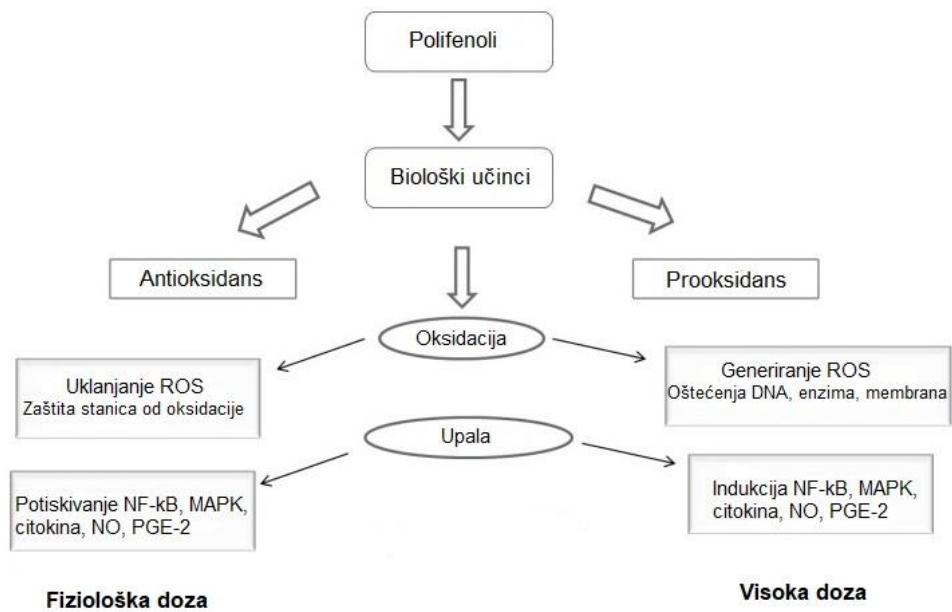
Citotoksičnost je svojstvo neke tvari da djeluje toksično na stanice, a može se odrediti pomoću različitih testova kao što su kolorimetrijski, fluorometrijski i luminometrijski testovi pri čemu je potrebno odabrati odgovarajuću metodu. Integritet stanične membrane ukazuje na održivost stanica i citotoksične učinke ispitivanih spojeva. Genotoksičnost je sposobnost oštećenja DNA stanice, odnosno sposobnost neke tvari da ošteti genetski materijal stanice i uzrokuje mutacije (promjena u genetskim informacijama). Kada je DNA oštećena, to može dovesti do raka, genetske bolesti, ali i do citotoksičnosti te uništiti stanice. Genotoksičan učinak može se različito manifestirati, no obično visoke koncentracije nekog genotoksičnog spoja izazivaju nespecifični citotoksični učinak koji dovodi do odumiranja stanica, ali i genetičkih oštećenja nasljednog materijala u stanicama koje su preživjele djelovanje toksičnog spoja ili su bile u kontaktu s nižim koncentracijama tog spoja. Genotoksični spojevi obično imaju određena fizikalna i kemijska svojstva koja omogućuju njihovu interakciju s nukleinskim kiselinama (Durgo, 2020).

3.6.3. Genotoksičnost

Pretpostavlja se da bi verbaskozid mogao djelovati antikancerogeno, citotoksično i antimetastatski. Istraživanja novijeg datuma ukazuju na moguću uporabu verbaskozida kao potencijalnog kemopreventivnog ili kemoterapeutskog sredstva u borbi protiv raka, zbog sposobnosti inhibicije proliferacije tumorskih stanica i induciranja njihove diferencijacije i apoptoze. Studije prijavljuju njegovo antiproliferativno djelovanje prema nekim tumorskim stanicama *in vitro*, poticanje proliferacije stanica humanog raka želuca, apoptozu prema telomer-telomera ovisnoj modulaciji staničnog ciklusa i popravak štete na DNA uzrokovane oksidativnim stresom (Alipieva i sur., 2014).

3.7. ANTIOKSIDANSI

Kako je već navedeno, procesi oksidacije mogu biti odgovorni za nastajanje slobodnih radikala, koji onda mogu voditi do razvitka raznih bolesti kod ljudi, npr. raka, Alzheimerove bolesti, bolesti bubrega i jetre, artritisa, ateroskleroze i neurodegenerativnih bolesti. Bioaktivni spojevi, prisutni u biljkama, mogu djelovati antioksidacijski i povoljno na zdravlje (Stankovic i sur., 2011). Antioksidansi su tvari koje mogu odgoditi i spriječiti oksidaciju drugih molekula, npr. lipida, proteina, nukleinskih kiselina, a u biološkim sustavima neutraliziraju slobodne radikale. Djeluju na način da inhibiraju fazu inicijacije ili propagiranja lančane reakcije oksidacije, čime onemogućavaju nastajanje novih slobodnih radikala u organizmu ili uništavaju tj. „čiste“ već nastale radikale. Također, popravljaju i već nastala oštećenja (Han i sur., 2007; Kadifkova Panovska i sur., 2005; Đaković, 2017). Antioksidansi se mogu podijeliti u dvije skupine, i to endogene i egzogene. Endogeni antioksidansi uključuju npr. enzime superoksid dismutazu, katalazu, glutation peroksidazu i tioredoksin reduktazu, dok egzogenu skupinu čine spojevi kao vitamin C, vitamin E i polifenoli (Bouayed i Bohn, 2010). Unatoč navedenom, studije prijavljuju da, u uvjetima prisutnosti metala, kao što su Fe^{3+} i Cu^{2+} koji su prisutni u velikom broju enzima, prirodni antioksidansi, uključujući polifenole, mogu djelovati kao prooksidansi. Prooksidativno djelovanje uočeno je u većini slučajeva u *in vitro* istraživanjima, a temelji se na nastajanju fenoksilnog radikala ili kompleksa s ionima prijelaznih metala. Prooksidansi povećavaju stanične razine ROS do citotoksičnih u stanicama raka, dok takav efekt nije zamijećen u normalnim stanicama, a što može biti objašnjeno višim razinama bakrovih iona i većom metaboličkom aktivnošću u stanicama raka. Opisano prooksidativno svojstvo antioksidanasa moglo bi zato imati potencijal u terapiji raka (Bouayed i Bohn, 2010; Eghbaliferiz i Iranshahi, 2016).



Slika 5. Shematski prikaz različitih bioloških učinaka polifenola pri različitim koncentracijama (prilagođeno prema Chu i sur., 2014)

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Uzorci

Za provođenje eksperimentalnog dijela rada korišteni su nadzemni dijelovi biljke trave ive, što uključuje stabljiku, listove i cvjetove podrijetlom iz Republike Hrvatske. Biljni uzorci sakupljeni su u Jadranskoj regiji, na području Šibensko-kninske županije (općina Kistanje).

Svi su biljni uzorci pažljivo sortirani te očišćeni od stranih primjesa. Za pripremu ekstrakta biljni je materijal usitnjen u električnom mlinu za kavu te je prosijan kroz metalno sito do željene veličine čestica ($< 450 \mu\text{m}$). Uzorci su pohranjeni u papirnatim vrećama. Do provođenja daljnjih analiza skladište na suhom i hladnom mjestu. Udio suhe tvari iznosio je više od 91%, čime je osigurana mikrobiološka i kemijska stabilnost uzoraka, važna za sljedivosti rezultata, kroz dulji vremenski period čuvanja. Uzorkovanje, priprema vodenog ekstrakta trave ive te fizikalno kemijske analize provedene su u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda, PBF, a rezultati se nalaze u Prilogu 1.

2 dkg sasušene trave ive preliveno je s 2 dL deionizirane vode te se ekstrakcija provodila pola sata pri 80°C . U vodenom je ekstraktu određena suha tvar, te su te vrijednosti korištene za pripremu radnih otopina ekstrakta trave ive kojima su bile izlagane stanice ili modelne makromolekule prilikom tretmana ($\gamma = 0,01233, 0,049315, 0,07398$ i $0,2466 \text{ mg mL}^{-1}$). Dobivena otopina je uparena u vakuum uparivaču, a suhi ekstrakt je dobiven postupkom liofilizacije. Također, u vodenom je ekstraktu izmjerena koncentracija verbakozida i ehinokozida, te su te vrijednosti bile korištene za podešavanje koncentracija izoliranih frakcija kojima su se tretirale stanice i modelne makromolekule.

Radne otopine koncentracija $\gamma = 0,01233, 0,049315, 0,07398$ i $0,2466 \text{ mg mL}^{-1}$ zbog jednostavnijeg daljnjeg pisanja rada označavane su kao 0,5x, 1x, 3x i 10x.

4.1.2. Modelne makromolekule

Prilikom provedbe ovog istraživanja kao modelne makromolekule korišteni su superzavijeni plazmid phiX-174 RF I, protein albumin goveđeg seruma (eng. bovine serum albumin, BSA) te linolenska kiselina, a na kojima je utvrđivano antioksidacijsko djelovanje različitih koncentracija ekstrakta i standarda trave ive.

4.1.2.1. Plazmid phiX-174 RF1

Za ispitivanje prooksidativnog učinka na DNA korištena je smrznuta izvorna otopina test plazmida phiX-174 RF1. Plazmid phiX-174 RF1 DNA je superzavijeni dvolančani družni DNA plazmid dugačak 5386 pb dobiven na temelju sekvence jednolančane kružne DNA prisutne u ikozahedralnom, neobavijenom kolifagu phiX-174 (Verreault i sur., 2010). Ovaj se modelni plazmid uslijed oksidacijskog oštećenja relaksira te sporije putuje u agaroznom gelu u odnosu na neoštećenu superzavijenu formu.

4.1.2.2. Albumin goveđeg seruma

Albumin je protein koji je u plazmi sisavaca pronađen u najvećem udjelu. Karakterizira ga velik kapacitet za vezanje liganada, zbog čega u tijelu ima ulogu transportera različitih signalnih molekula, nutrijenata, lijekova, metabolita i drugih molekula a što omogućuje njegovu primjenu u kliničke, farmaceutske i biokemijske svrhe (Majorek i sur., 2012). Albumin je jednolančani protein koji se sastoji od tri domene. Male je molekulske mase (66 kDa), a izgrađuje ga 585 aminokiselina. Neglikozilirana je, s hidrofobnim šupljinama te mu nedostaje prostetskih skupina. Djeluje kao glavni regulator osmotskog tlaka krvi, tako da promjene u njegovoj vrijednosti mogu dovesti do stimulacije sinteze albumina. Nadalje, posjeduje sposobnost antioksidacijskog djelovanja prilikom nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) (Raoufinia i sur., 2016). Antioksidacijska aktivnost proteina usko je povezana s njegovom strukturom, odnosno mnogim mjestima za vezanje liganada i svojstvima hvatanja slobodnih radikala. Molekula albumina može nadići mnoge promjene strukture promjenom konformacije a time i sposobnost vezanja i redoks stanje (Taverna i sur., 2013). Također, smanjuje vjerojatnost samog nastanka radikala vežući se na slobodni divalentni bakar koji ima ulogu u nastajanju radikala. Pretpostavlja se da albumin ima utjecaj i na promjenu permeabilnosti membrane, vezanjem na sloj subendotela i intersticijske slojeve. Studije prijavljuju i neuroprotektivni učinak na neurone i glija stanice (Raoufinia i sur., 2016). BSA se koristi i kao suplementa staničnim kulturama, nosač lijekova i stabilizator kompleksa proteina i lijeka (Majorek i sur., 2012).

4.1.2.3. Linolenska kiselina

α – linolenska masna kiselina (ALA) esencijalna je masna kiselina, odnosno neophodna za normalnu funkciju ljudskog tijela. Kako tijelo ne može samo sintetizirati ALA, potreban je unos hranom ili suplementacijom. Dobri izvori ALA su laneno ulje, ulje chia sjemenki, kiwi, portulak, ulja oraha, soje i kanole. ALA je izgrađena je od 18 atoma ugljika te sadrži tri

dvostruke veze u cis konfiguraciji. Farmakološke studije ukazuju da ALA može djelovati protuupalno, antikancerogeno, antioksidacijski, neuroprotektivno i ima utjecaj kod metaboličkog sindroma, uključujući antidijabetsko djelovanje i djelovanje protiv pretilosti (Yuan i sur., 2022). Također, utječe protektivno na kardiovaskularni sustav te antiosteoporetski (Kim i sur., 2014). ALA se može proizvoditi izolacijom ili ekstrakcijom iz biljaka (npr. iz lana), ali i umjetnom sintezom. Osim u prehrambene, koristi se u medicinske svrhe, u kozmetici i prilikom proizvodnje proizvoda široke potrošnje (Kim i sur., 2014).

4.1.3. Biološki test sustavi

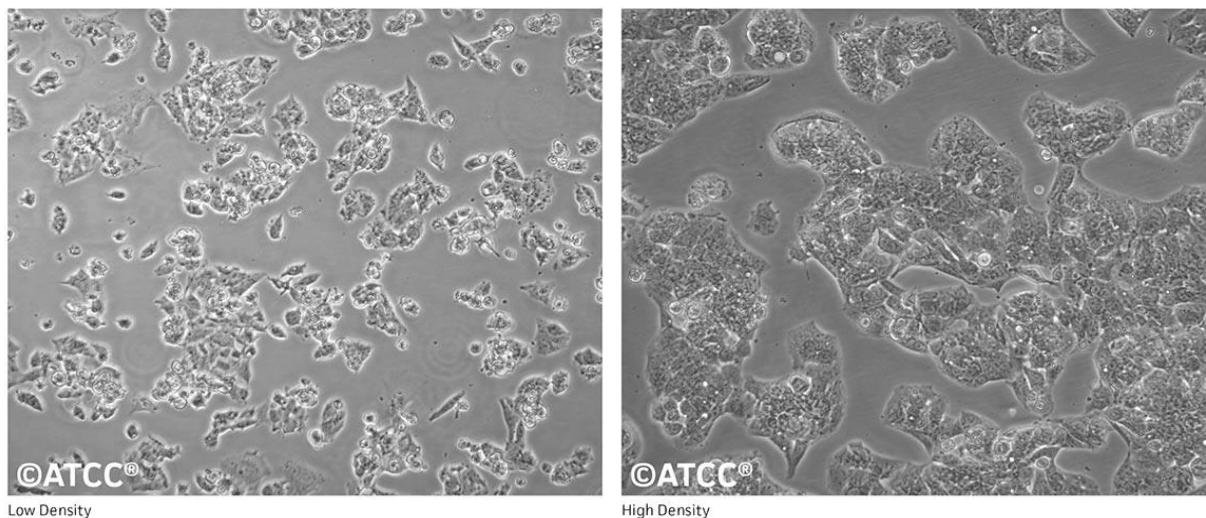
Kao biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnog učinka i oksidacijskog oštećenja u ovom istraživanju korištene su kontinuirane humane stanične linije te Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije.

4.1.3.1. Humane stanice

U ovom istraživanju korišten je in vitro test sustav staničnih kultura kontinuiranih humanih staničnih linija karcinoma jetre Hep G2 (Slika 6.), epitelne stanice kolorektalnog karcinoma Caco2 (Slika 7.), epitelne stanice karcinoma jezika CAL 27 (Slika 9.) i stanice adenokarcinoma želuca AGS (Slika 8.). Ispitivan je utjecaj različitih koncentracija trave ive na rast stanica, genotoksičnost te oksidacijska oštećenja.

HepG2 stanična linija predstavlja in vitro model hepatoma, karcinoma nastalog od hepatocita (HCC eng. Hepatocellular carcinoma). HepG2 je kontinuirana stanična linija izolirana iz hepatocelularnog karcinoma petnaestogodišnjeg dječaka svijetle boje kože. Stanice se najčešće koriste za detekciju antinuklearnih antitijela imunofluorescencijom (Gorphe, 2019) kao i kod ispitivanja djelotvornosti i toksičnosti lijekova i ksenobiotika te za otkrivanje genotoksičnih i citotoksičnih spojeva. Potencijalni lijek za hepatocelularni karcinom bi mogli biti flavonoidi jer uzrokuju apoptozu u staničnoj liniji HepG2 (Xia i sur. 2013).

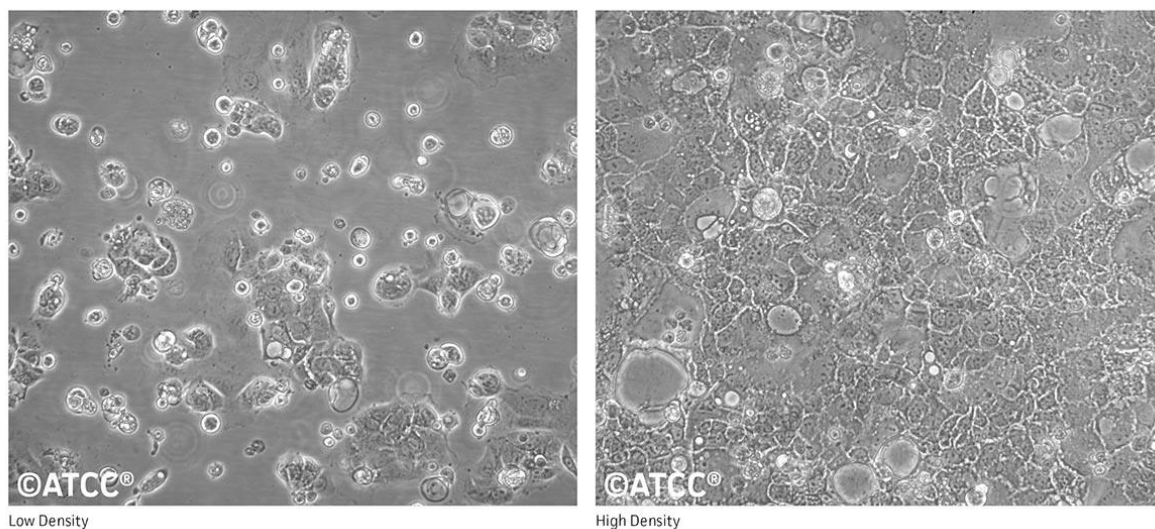
ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



Slika 6. Komercijalno dostupna HepG2 stanična linija (ATCC, 2022)

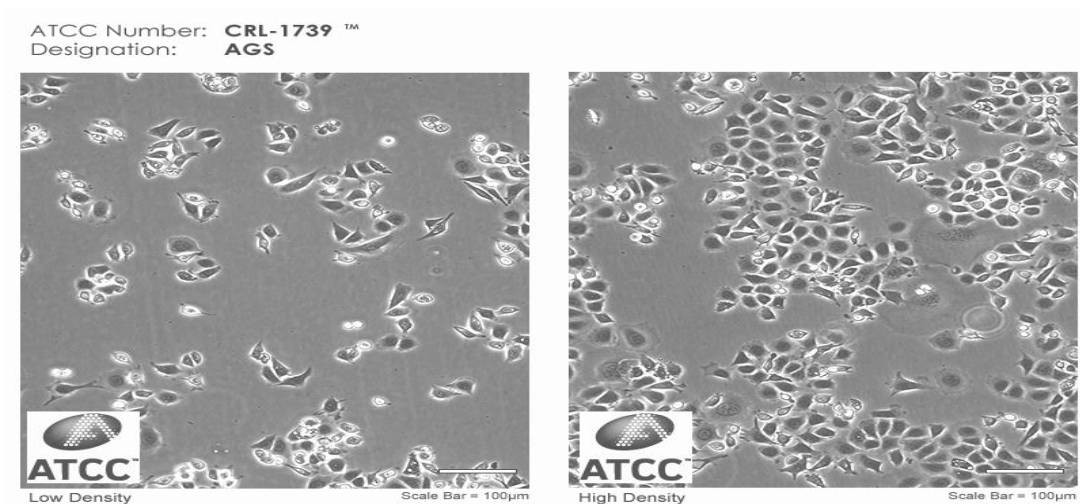
Caco-2 je stanična linija koja predstavlja in vitro model karcinoma debelog crijeva, a izolirana je iz sedamdesetdvoletnjeg muškarca svijetle boje kože. Kontinuirana stanična linija Caco-2 se najčešće koristi kao in vitro model u istraživanjima apsorpcije lijekova u probavnom sustavu te za proučavanje utjecaja ispitivanih spojeva na epitelne stanice karcinoma kolona (Borchardt 2011).

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



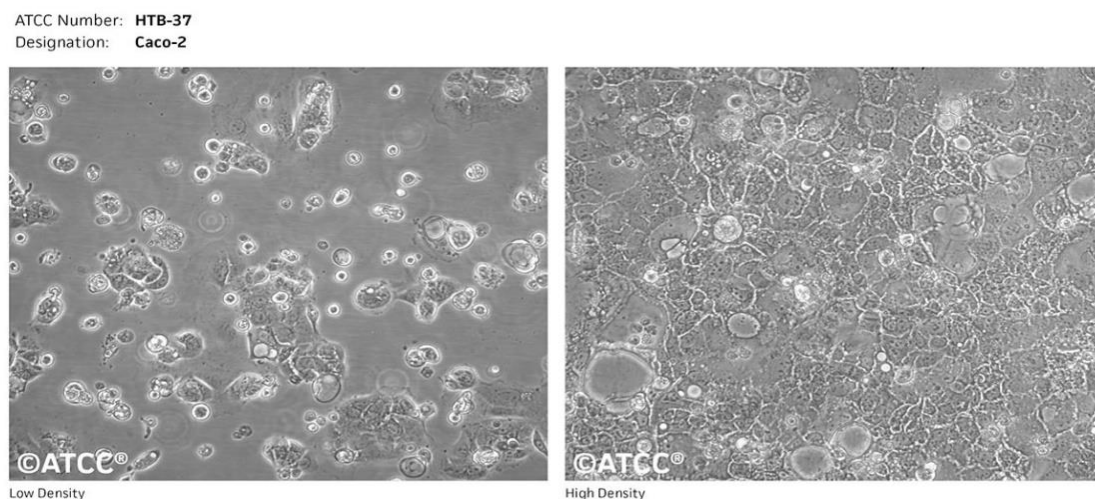
Slika 7. Komercijalno dostupna Caco-2 stanična linija (ATCC, 2022)

AGS je stanična linija dobivena izolacijom iz tkiva želuca pedesetčetirigodišnje žene svijetle boje kože s adenokarcinomom želuca.



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

CAL 27 stanična linija je kontinuirana stanična linija pločastih epitelnih stanica raka jezika izolirane iz tkiva jezika prije liječenja pedesetšestogodišnjeg muškarca bijele boje kože. Stanična linija CAL 27 jedna je od najčešće korištenih staničnih linija za ispitivanje utjecaja različitih spojeva i ksenobiotika na epitelne stanice oralnih karcinoma (Jiang i sur., 2009).



Slika 9. Komercijalno dostupna CAL 27 stanična linija (ATCC, 2022)

4.1.3.2. Radni mikroorganizmi

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

4.1.4. Kemikalije

- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Albumin iz goveđeg seruma (BSA), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Agar, Biolife, Italija
- Agaroz, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Amonij tiocijanat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Askorbinska kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Bakto tripton, Biolife, Italija
- Bromtimol plavo, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Ehinaskozid, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Etanol (96% (v/v)), Lach-ner, s.r.o., Republika Češka
- Etil acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etidij bromid (C₂₁H₂₀BrN₃), Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Glicerol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Gvanidin-hidroklorid, Acros Organics, SAD
- Ham's F-12 medij, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), Riedel-de Haën AG Seelze, Hannover, Njemačka
- Kalijev klorid (KCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (37% (v/v)), Carlo Erba Reagents, Francuska

- Kvaščev ekstrakt, Biolife, Italija
- Ledena octena kiselina (80% (v/v)), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Linolenska kiselina, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- MRS Broth, Biolife, Italija
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Plazmid phiX174 RF1 DNA, Promega, SAD
- Trikloroctena kiselina (TCA), Fisher Scientific, Engleska
- Tripsin, Capricorn Scientific, Njemačka
- Tris-HCl, Invitrogen, SAD
- TWEEN20, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Verbaskozid, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Vodikov peroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Željezov (III) klorid (FeCl_3), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Željezov (II) sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

4.1.5. Otopine

4.1.5.1. Pufferi

Fosfatni pufer – PBS

PBS pufer korišten je za pripremu standarda linolenske kiseline, za otapanje ekstrakta i standarda trave ive prilikom određivanja antioksidacijskog potencijala na standardu linolenske kiseline, za pripremu radne otopine DCFDA te za razrijeđenja suspenzija bakterija.

Tablica 1. Sastav PBS pufera

SASTOJAK	KOLIČINA
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	6,9 g
Na_2HPO_4	7,1 g

TAE pufer

TAE pufer korišten je za pripremu agaroznih gelova te kao pufer za provođenje elektroforeze u svrhu utvrđivanja stupnja superzavijenosti plazmida nakon izlaganja plazmida istraživanim otopinama.

Tablica 2. Sastav TAE pufera

SASTOJAK	KOLIČINA
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	48,40 g
EDTA (etliendiamintetraoctena kiselina)	3,70 g
Octena kiselina (ledena)	11,40 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

TE pufer

TE pufer korišten je za pripremu otopina željenih koncentracija pri određivanju učinka istraživanih otopina na superzavijenost plazmida. Sastav TE pufera naveden je u tablici 5.

Tablica 3. Sastav TE pufera

SASTOJAK	KOLIČINA
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	15,759 g
EDTA (etliendiamintetraoctena kiselina)	2,92 g
Destilirana voda	do 1000 mL

4.1.5.2. Otopine korištene za određivanje citotoksičnosti na staničnim linijama

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

Neutral red	50 mg
Etanol	10 mL
- *Radna otopina Neutral Red –a, 0,05 mg mL⁻¹*

Ishodišna otopina Neutral Red – a, 5 mg mL ⁻¹	0,1 mL
Ham's F-12 medij	9,9 mL
- *Otopina za odbojavanje*

Demineralizirana voda	100 mL (50%)
Etanol	98 mL (48%)
Ledena octena kiselina	2 mL (2%)

4.1.5.3. Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih vrsta na staničnim linijama

- *Ishodišna otopina DCFDA, 2 mM*

DCFDA	1 mg
DMSO	1 mL
- *Radna otopina DCFDA, 0,05 mM*

Ishodišna otopina DCFDA, 2 mM	0,25 mL
PBS	9,75 mL

4.1.5.4. Otopine korištene za određivanje protektivnog i genotoksičnog učinka na modelnoj DNA molekuli

- *Otopina plazmida, 1 mg mL⁻¹*

Plazmid	4 µL
TE pufer	36 µL
- *Otopina vodikovog peroksida*

H ₂ O ₂ , 0,03 M	30 µL
TE pufer	970 µL
- *Agarozni gel, 1%*

TAE pufer	150 mL
Agarozna	1,5 g
- *Obojeni pufer za nanošenje na agarozni gel (eng. loading buffer)*

Bromtimol plavo	0,2 g
Glicerol, 50%	6 mL
Demineralizirana voda	4 mL
- *Radna otopina etidij bromida, 20 µg mL⁻¹*

Ishodišna otopina etidij bromida, 400 µg mL ⁻¹	37,5 µL
Demineralizirana voda	dopuniti do 750 mL

4.1.5.5. Otopine korištene za određivanje protektivnog učinka na standardu linolenske kiseline

- *Otopina standarda linolenske kiseline*

Linolenska kiselina	0,14 g
TWEEN20	0,14 g
PBS	25 mL
- *Klorovodična kiselina, 3,5%*

HCl, 37%	8,12 mL
----------	---------

Demineralizirana voda	dopuniti do 100 mL
• <i>Otopina željezova (II) sulfata, 0,02 M</i>	
FeSO ₄	0,556 g
Klorovodična kiselina, 3,5%	0,1 mL
• <i>Etanol, 75%</i>	
Etanol, 96%	85,17 mL
Demineralizirana voda	14,83 mL
• <i>Amonij tiocijanat, 30%</i>	
NH ₄ SCN	30 g
Demineralizirana voda	dopuniti do 30 mL

4.1.5.6. Otopine korištene za određivanje protektivnog učinka na BSA

• <i>BSA, 4 mg mL⁻¹</i>	
BSA	40 mg
Demineralizirana voda	10 mL
• <i>Otopina željezova (III) klorida, 0,5 mM</i>	
FeCl ₃	0,811 g
Demineralizirana voda	10 mL
• <i>Askorbinska kiselina, 0,1 M</i>	
Askorbinska kiselina	0,176 mg
Demineralizirana voda	10 mL
• <i>Otopina vodikovog peroksida, 10 mM</i>	
H ₂ O ₂ , 3%	0,11 mL
Demineralizirana voda	10 mL
• <i>Otopina DNPH, 10 mM</i>	
DNPH	0,198 g
Etanol	100 mL
• <i>Trikloroctena kiselina, 10%</i>	
TCA	10 g
Demineralizirana voda	100 mL
• <i>Klorovodična kiselina, 2 M</i>	
HCl, 37%	16,65 mL
Demineralizirana voda	100 mL
• <i>Gvanidin hidroklorid, 6M</i>	
Gvanidin – HCl	56,118 g
Klorovodična kiselina, 2 M	dopuniti do 100 mL

4.1.6. Hranjive podloge

Hranjive podloge korištene u ovom radu su kompletna LB (eng. *Luria-Bertani*) hranjiva podloga i kompletna MRS (eng. *Man, Rogosa and Sharpe broth*) hranjiva podloga. Prilikom uzgoja bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* korištena je LB hranjiva podloga, dok je za uzgoj *Lactobacillus plantarum* korištena MRS hranjiva podloga. Prije nasađivanja podloge su sterilizirane u autoklavu na temperaturi 121 °C i pri tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa, u trajanju od 15 min nakon postizanja temperature vrenja. Sastav upotrijebljenih hranjivih podloga prikazan je u tablicama x. I x.

Tablica 4. Sastav kompletne LB hranjive podloge

Bakto – tripton	3 g
Kvašćev ekstrakt	1,5 g
NaCl	1,5 g
Agar	4,5 g
Destilirana voda	300 mL

Tablica 5. Sastav kompletne tekuće MRS hranjive podloge

MRS broth	55,2 g
Destilirana voda	1000 ml

Tablica 6. Sastav kompletne krute MRS hranjive podloge

MRS broth	55,2 g
Destilirana voda	1000 ml
Agar	12g

4.1.7. Laboratorijski pribor

- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica, Falcon, SAD
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerove tikvice, 20-100 mL

- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske žlice
- Menzure, 50-1000 mL
- Mikropipete, 10, 20, 200, 1000 μ L, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske pločice (96 jačica), Falcon, SAD
- T-boce (5 mL, 25 mL, 200 mL), Falcon, SAD
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 0,5-20 mL

4.1.8. 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
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, Iskra, Slovenija
- Mikroskop, XDS-1 Optika Microscopes, Italija
- Spektrofotometar, Cecil Instruments LTd, 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

4.2. METODE

4.2.1. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka standarda i ekstrakta trave ive na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA

Antioksidacijski učinak ekstrakta i standarda trave ive na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA prati se elektroforezom, pri čemu se plazmid podvrgava UV zračenju i tretira se vodikovim peroksidom što uzrokuje nastanak hidroksilnog radikala. Elektroforeza se provodi u pročišćenom agaroznom gelu u kojem superzavijena forma putuje brže negoli zavijena forma. Djelovanjem hidroksilnog radikala dolazi do razmatanja superzavijene forme plazmida i prelaska u zavijenu formu, te konačno do odijeljivanja dvaju bendova. Što je više plazmida oštećeno djelovanjem hidroksilnog radikala, to je intenzivniji gornji, sporiji bend.

Elektroforeza u agaroznom gelu koristi se za odvajanje, analizu, identifikaciju i pročišćavanje fragmenata DNA. Elektroforeza je jednostavna i učinkovita metoda, brzo se izvodi te se koristi za pročišćavanje DNA fragmenata različitih veličina u rasponu od 100 pb do 25 kb koji se ne mogu adekvatno odvojiti drugim postupcima kao što je npr. centrifugiranje gradijentom gustoće (Lee i sur., 2012). Mali fragmenti DNA (50-20 000 bp) najbolje se razlučuju u agaroznim gelovima u vodoravnom položaju u električnom polju konstantne jakosti i smjera struje. U takvim uvjetima brzina fragmenata DNA pada kako raste njihova duljina i proporcionalna je jakosti električnog polja. S obzirom da je DNA visoko negativno nabijena molekula zbog fosfatne okosnice koja je ravnomjerno raspoređena duž cijele molekule, u električnom polju fragmenti DNA molekule putuju prema pozitivno nabijenoj anodi (Stellwagen, 2009). Budući da molekula DNA ima jednoliki omjer mase i naboja, fragmenti DNA se u agaroznom gelu razdvajaju na temelju veličine, stoga kraći fragmenti DNA migriraju kroz gel brže u odnosu na dulje fragmente te je prijeđena udaljenost obrnuto proporcionalna logaritmu njihove molekulske mase (Lee i sur., 2012). Vizualizacija rezultata elektroforeze, odnosno položaj vrpce DNA unutar gela može se odrediti izravno bojenjem s niskim koncentracijama fluorescentnih interkalirajućih boja, kao što je etidijev bromid (Green i sur., 2019).

Za ispitivanje protektivnog učinka trave ive na DNA koristi se pročišćeni agarozni gel stoga se prvo priprema 1%-tni agarozni gel otapanjem agaroze i TAE pufera. Nakon otapanja agaroze u puferu, otopinu je potrebno malo ohladiti nakon čega se prebacuje u kalup za elektroforezu. Stavlja se češljic za formiranje jažica, kratko se ostavlja na sobnoj temperaturi da se formira čvrsti gel pa se češljic uklanja. Nakon što se formiraju jažice u agaroznom gelu nanose se pripremljeni uzorci te se dodaje TAE pufer na način da se prekrije cijela površina gela. Zatim se sat vremena provodi elektroforeza pod naponom 10 mV i jakosti struje od 150 mA. Reakcijske smjese sadržavale su 0,1 mg mL⁻¹ otopine plazmida u TAE puferu uključujući

pozitivnu i negativnu kontrolu. Uzorci uz plazmid sadrže 0,2 % H₂O₂ te ekstrakt odnosno standard trave ive u koncentracijama 0,5x, 1x, 3x i 10x te odgovarajući volumen TAE pufera do konačnog volumena uzorka od 30 µL. Uzorci su izlagani UV zračenju do 3 minute. Zračena je također i pozitivna kontrola koja uz plazmid, sadrži 0,2 % H₂O₂. U eksperimentu su korištene tri negativne kontrole; prva koja sadrži samo plazmid, druga koja sadrži plazmid i vodikov peroksid ali koja nije izlagana UV zračenju te treća negativna kontrola koja sadrži plazmid i koja je zračena UV svjetlom kao i svi ostali uzorci.

U pripremljene uzorke dodaje se 1 µL tzv. loading buffera, odnosno pufera za nanošenje koji sadrži bromtimol plavu i glicerol, pri čemu glicerol povećava viskoznost uzoraka što pospješuje da oni lakše tonu u gel, a kretanje boje omogućuje praćenje elektroforeze. Nakon provedene elektroforeze gel se boji otopinom etidij bromid, bojom koja se interkalira u DNA, koncentracije 20 µg mL⁻¹ u trajanju od 15 do 20 min nakon čega se izlaže UV zračenju kako bi se omogućila vizualizacija vrpce na gelu.

Nativni plazmid phiX-174 RF I je u superzavijenom obliku te putuje u agaroznom gelu određenom brzinom, a vodikov peroksid koji se dodaje u reakcijsku smjesu služi kao inducer oštećenja DNA, iako ih on sam ne uzrokuje što je vidljivo u kontroli. Interpretiranje rezultata temelji se na tome da će se plazmid relaksirati i putovati sporije od superzavijene forme plazmida, ukoliko je uzorak s kojim je tretiran genotoksičan, tj. uzrokuje lomove (Vandjelovic i sur., 2012). Ovisno o stupnju oštećenja plazmida, na gelu se formiraju dvije vrpce, a uspoređivanjem intenziteta fluorescencije vrpce zavijenog, odnosno superzavijenog plazmida moguće je odrediti stupanj oštećenja plazmida iz čega se određuje genotoksičnost ispitivanih uzoraka. Analiza intenziteta vrpce zavijenog i superzavijenog plazmida provedena je pomoću softverskog programa GelAnalyzer 19.0.

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

Karbonilacija proteina je specifična vrsta oksidativnih oštećenja proteina te je najdestruktivnija zbog svoje ireverzibilne prirode. Sadržaj proteinskih karbonila pokazatelj je oksidacije proteina te se koristi kao mjera za izazvana oksidacijska oštećenja, a ujedno je i marker oksidativnog stresa (Rogowska-Wrzesinska, 2014). Detekcija i mjerenje oksidacijskih biomarkera olakšava pristup za aktivnost oksidanta te za praćenje učinkovitosti antioksidativnog sustava (Lovrić, 2016). S obzirom da se koncentracija karbonila ne može izravno detektirati i kvantificirati jer ne apsorbiraju svjetlost u specifičnom dijelu UV/VIS spektra, njihova se koncentracija određuje indirektnim metodama. U ovom je radu korištena

metoda koja se temelji na reakciji derivatizacije karbonilne skupine proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu nastaje stabilni produkt 2,4-dinitrofenilhidrazon (DNP) koji se određuje spektrofotometrijski. Dinitrofenilna grupa DNP spoja apsorbira svjetlost u specifičnom dijelu UV/VIS spektra pri apsorbciji od 370 nm pri čemu je apsorbcija u pozitivnoj korelaciji s ukupnim udjelom proteinskih karbonila u ispitivanom uzorku (Purdel i sur., 2014).

Za određivanje utjecaja ekstrakta i standarda trave ive na oksidaciju proteina kao modelni protein korišten je protein albumin izoliran iz goveđeg seruma (BSA). Reakcijska smjesa sadržavala je BSA (4 mg mL^{-1}), Fe_2Cl_3 (0,5 mM), askorbinsku kiselinu (0,1 mM), vodikov peroksid (10 mM), odgovarajuće koncentracije ekstrakta i izolirane frakcije trave ive (0,5x, 1x, 3x i 10x) te demineraliziranu vodu do konačnog volumena reakcijske smjese od 600 μL . U kontrolu je umjesto uzoraka dodana demineralizirana voda odgovarajućeg volumena. Svi su uzorci pripremljeni u 3 replike te su inkubirani 30 minuta na 37°C . Nakon inkubacije dodano je 500 μL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), smjesu je potrebno dobro vorteksirati te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. U smjesu je zatim dodano 500 μL 10 %-tne trikloroctene kiseline (TCA) te je smjesa inkubirana 15 minuta na 4°C . Nakon inkubacije uzoraka slijedi centrifugiranje nakon čega se odbacuje supernatant, a talog u kojem su se istaložili proteini ispiru se s etil acetatom kako bi se uklonio nevezani i neizreagirani DNPH. Na talog se zatim stavlja gvanidin hidroklorid (6 M) koji uzrokuje otapanje taloga i ostavlja se preko noći nakon čega se mjeri apsorbcija na 3710 nm. Stupanj oksidacije proteina u uzorcima izračunava se prema formuli [1]:

$$\% \text{ oksidacije} = \frac{A_{370}(\text{uzorak})}{A_{370}(\text{negativna kontrola})} \times 100 \quad [1]$$

4.2.3. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka ekstrakata trave ive na modelnom lipidu – linoleinska kiselina

Produkti peroksidacije lipida, kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), kao i produkti oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina uzrokuju oksidacijska oštećenja proteina. 4-HNE, glavni produkt peroksidacije linolenske kiseline, u velikoj količini uzrokuje modifikacije lipoproteina, oštećuje tkiva te je povezan s Alzheimerovom bolesti, dijabetesom i s kardiovaskularnim bolestima (Mayo i sur., 2003).

Za određivanje utjecaja ekstrakta i standarda trave ive na oksidaciju lipida kao modelna makromolekula korištena je linolenska kiselina. Otopina masne kiseline pripremljena je na način da se u 25 mL 0,2 M fosfatnog pufera doda 0,14 g linolenske masne kiseline i 0,14 g

Tween-20. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosi 1250 μL te se dodaje 625 μL pripremljene emulzije linolenske kiseline i 625 μL radne otopine ekstrakta, odnosno izoliranih frakcija trave ive u konačnim koncentracijama 0,5x, 1x, 3x i 10x. Kontrola je sadržavala 625 μL emulzije linolenske kiseline i 625 μL fosfatnog pufera bez ekstrakta i standarda trave ive. Reakcijske smjese zatim se izlažu UV zračenju u trajanju od 30 minuta kako bi se induciralo oksidacijsko oštećenje. Nakon zračenja uzima se 50 μL reakcijske smjese svakog uzorka te se pomiješa s 1 ml etanola (EtOH, 75 %) i 50 μL amonijevog tiocijanata (NH_4SCN , 30 %). Zatim se u reakcijsku smjenu dodaje i 50 μL FeSO_4 (0,02 M, razrijeđen u 3,5 % HCl). Dodane otopine izazivaju oksidacijska oštećenja te uzrokuju peroksidaciju linolenske kiseline. Nakon 3 minute mjeri se apsorbancija na 500 nm. Svi uzorci pripremljeni su u 3 paralele, a eksperiment je ponovljen tri puta.

Postotak peroksidacije lipida u linoleinskoj kiselini izračunava se prema formuli [2]:

$$\% \text{ peroksidacije} = \left[\frac{A_{500}(\text{uzorak})}{A_{500}(\text{kontrola})} \right] \times 100 \quad [2]$$

4.2.4. Određivanje citotoksičnog i antioksidacijskog učinka standarda i ekstrakta trave ive na staničnim linijama

Uzgoj stanica u monosloju

Kontinuirane stanične linije HepG2, Caco-2, Cal 27 i Ags kultivirane su u monosloju u plastičnim T-bocama ravnih stijenci većeg volumena te se pohranjuju u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (pri 37 °C, relativna vlažnost zraka 95 % uz 5 % CO_2). Kao medij za rast stanica korišten je kompletirani medij (Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640, Invitrogen) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (eng. Fetal Bovine Serum, FBS) konačne koncentracije od 10 %. Kad stanice postignu subkonfluentno stanje precjepuju se u mikrotitarske ploče s jažicama i mogu se koristiti za daljnji eksperimentalni rad koji se odvija u laminaru kako bi se osigurali aseptički uvjeti nužni za rad s kulturama humanih stanica (Freshney, 2010).

Priprema suspenzije stanica

Nakon što stanice postignu konfluentno stanje, iz T-boca, u kojima se stanice nalaze, uklanja se medij. Stanice se zatim ispiru 25%-tnom otopinom tripsina kako bi se uklonili ostaci medija koji sadrži serum koji djeluje kao inhibitor proteolitičkog djelovanja tripsina. Tripsinizacijom dolazi do odvajanja stanica od podloge, a ponovnim dodatkom medija sa serumom na stanice

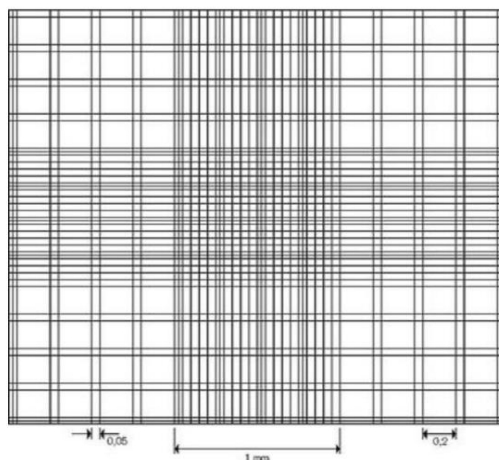
zaustavlja se proteolitičko djelovanje tripsina. Tripsin je potrebno dodati u minimalnim količinama da se pokrije dno T-boce na kojoj rastu stanične kulture (Freshney, 2010).

Određivanje broja stanica

Brojanje stanica koje je potrebno nasaditi te koje će biti izložene djelovanju ispitivanih spojeva provodi se pomoću Bürker-Türkova komorice. Bürker-Türkova komorica je kvadratna mreža, koja sadrži 16 velikih kvadrata (4×4), od kojih svaki kvadrat sadrži 25 malih kvadrata (5×5). Volumen od 10 μL nanosi se na Bürker-Türkovu komoricu na predmetnicu te se prekrije pokrovnim stakalcem, a potom koristeći svjetlosni mikroskop pronade se mali kvadrat unutar kojega su smještene stanice. Visina prostora između pokrovnog stakalca i predmetnice iznosi 0,1 mm, površina svakog kvadrata je 1 mm², a volumen velikog kvadrata 1x10⁻⁴ mL pa iz toga proizlazi jednadžba za izračunavanje ukupnog broja stanica u uzorku:

$$\text{Ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} \times 10^4 \text{ stanica mL}^{-1} \quad [3]$$

Brojenje se vrši barem 3 puta, a potom izračuna aritmetička sredina kao konačan broj stanica. Iz aritmetičke se sredine broja stanica u kvadratu izračunava se broj stanica u mililitru suspenzije te se na taj način podešava početna koncentracija stanica od 10⁵ za daljnju provedbu eksperimenta (Christensen i sur., 2005). Nakon što su stanice izbrojane, nacjepljuju se na mikrotitarske ploče na hranjivi medij te se inkubiraju na 37° C tijekom 24h nakon čega su spremne za tretiranje pripremljenim uzorcima.



Slika 10. Brojanje stanica pomoću Bürker-Türkove komorice (prilagođeno prema Christensen i sur., 2005)

Nasađivanje stanica

U prozirne mikrotitarske ploče s 96 jažica za Neutral red metodu, odnosno u crne mikrotitarske ploče za DCFDA metodu, nacijepljuje se po 100 μL određene suspenzije stanica početne koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su kultivirane 24 h u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO_2) i na temperaturi od 37 °C kako bi se adaptirale na novonastale uvjete, a nakon što su stanice postigle subkonfluentno stanje uklonjen je medij te su stanice tretirane s različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive (0,5x, 1x, 3x, 10x), prethodno pripremljenih u odgovarajućem hranjivom mediju. U kontrolu je umjesto uzorka trave ive dodano 100 μL odgovarajućeg hranjivog medija. Nakon tretmana stanica u trajanju od 2h, odnosno 24h, uklanja se ostatak hranjivog medija.

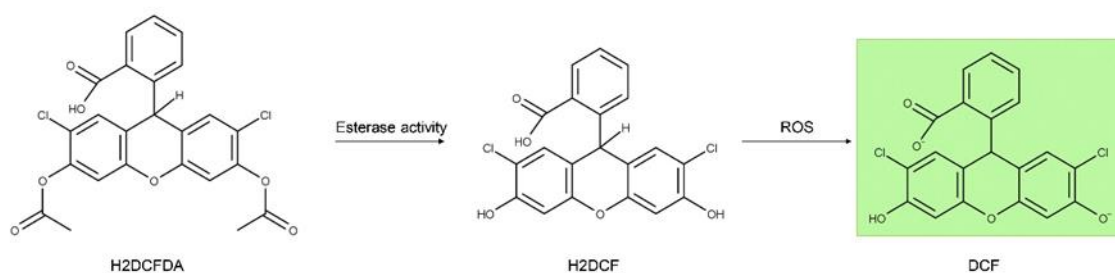
4.2.4.1. Određivanje citotoksičnog učinka trave ive Neutral red metodom

Neutral red test jedna je od najčešće korištenih testova za određivanje citotoksičnosti nekog spoja. Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) je slabo kationska boja koja aktivnim transportom prolazi kroz staničnu membranu unutar žive stanice te se boja veže i akumulira unutar lizosoma (Santa Maria i sur., 1997). Ksenobiotici dovode do oštećenja stanične membrane ili membrane lizosoma te tako smanjuju unošenje i zadržavanje boje. Stanice kod kojih je došlo do oštećenja, a tako i mrtve stanice, neće vezati boju zbog promjene pH gradijenta. Intenzitet nastalog obojenja određuje se mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu, a apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u mediju (Arechabala i sur., 1999). Neutral red metodom omogućuje se kvantitativno određivanje broja živih stanica, nakon tretmana nekim spojem, koji direktno ovisi o utjecaju ispitivanog ksenobiotika na morfologiju, odnosno oštećenje stanice.

Određivanje citotoksičnosti Neutral Red metodom započinje sterilnim uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica prozirne mikrotitarske ploče s tretiranim stanicama. Slijedi sterilno ispiranje jažica s 1 ml sterilnog PBS pufera kako bi se uklonili ostaci medija za uzgoj koji mogu utjecati na rezultate mjerenja. Slijedi sterilno bojanje *Neutral Red* bojom pripremljenom u mediju za uzgoj te se nakon 3 sata inkubacije iz jažica uklanja otopina boje, a stanice se ispiru s PBS puferom. Boja nakupljena u stanicama i vezana za lizosome ekstrahira se otopinom za odbojavanje te se mjeri apsorbancija (Repetto i sur., 2008).

4.2.4.2. Određivanje antioksidacijskog/prooksidacijskog djelovanja ekstrakta trave ive diklorfluorescin diacetat (DCFDA) metodom

Kao fluorescentni indikator širokog spektra ROS u staničnim bioanalizama često se koristi 2,7 – diklorfluorescin diacetat, koji prolazi staničnu membranu a stanične esterase ga zatim deacetiliraju, čime nastaje nefluorescentni produkt. Takav produkt oksidiraju razne ROS u organizmu, stvarajući fluorescentni diklorfluorescin, koji se može odrediti spektrofotometrijski (Ng i Ooi, 2021).



Slika 11. Mehanizam DCFDA metode (Ng i Ooi, 2021)

Za određivanje antioksidacijskog učinka različitih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive u svaku jažicu crne mikrotitarske ploče s tretiranim stanicama dodano je 100 μ L radne otopine DCFDA. Slijedi inkubacija u trajanju od 20 min na 37 °C. Po završetku inkubacije provodi se spektrofotometrijsko mjerenje. Intenzitet fluorescencije i količina ukupnih ROS u stanici su proporcionalni, a indukcija slobodnih radikala izračunava se prema formuli [4]:

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

[4]

4.2.5. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka standarda i ekstrakta trave ive na bakterijskim kulturama

Bakterijske kulture *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* uzgojene su u 20 ml LB hranjive podloge, a bakterijska kultura *Lactobacillus plantarum* uzgojena je u 20 ml MRS hranjive podloge, inkubirane su tijekom 24 sata do eksponencijalne faze rasta. Zatim se centrifugira 1,5 mL svake bakterijske kulture centrifugira se 10 minuta nakon čega se supernatant odbaci, a talog se ispere s 1 mL PBS pufera, resuspendira i ponovo centrifugira. U mikrotitarsku ploču nacjepljuje se 100 µL odgovarajuće bakterijske suspenzije. Bakterijska suspenzija tretirana je s po 100 µL ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive određene koncentracije. Ukupni volumen reakcijske smjese u jažici iznosio je 200 µL, pa su konačne koncentracije ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive bile 0,5x, 1x, 3x i 10x. Reakcijske smjese potom su inkubirane 60 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, rađena su mikrorazrjeđenja, a na odgovarajuće krute hranjive podloge nasađivane su stanice razrijeđene u rasponu od deset do milijun puta i to u šest paralela. Stanice su uzgajane 24 h na 37 °C nakon čega je izbrojan broj poraslih kolonija (eng. CFU – Colony-Forming Unit). Rezultati preživljenja bakterija nakon tretmana s različitim koncentracijama ekstrakta trave ive izračunati su prema formuli [5]:

$$\text{Preživljenje bakterija (\%)} = \frac{\text{CFU/mL bakterijske suspenzije}}{\text{CFU/mL kontrole}} \times 100 \quad [5]$$

4.2.6. Obrada podataka

Statistički program JASP 0.16 korišten je za obradu dobivenih podataka, pri čemu je primijenjena Classical ANOVA statistička analiza sa Scheffe i Tukey Post Hoc testom usporedbe. Odabrana razina značajnosti (p-vrijednost) iznosi 0,001, pri čemu se statistički značajnim smatra svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,001. Također, korišten je i program GelAnalyzer za obradu gelova elektroforeze. Rezultati su prikazani i grafički, ubradom u programu Microsoft Excel 2016.

5. REZULTATI I RASPRAVA

Prooksidacijski, odnosno antioksidacijski učinak aktivnih tvari iz ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive ispitani su na modelnim makromolekulama (plazmid phiX174 RF1 DNA, protein albumin iz goveđeg seruma, linolenska kiselina). Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 12. – 15.

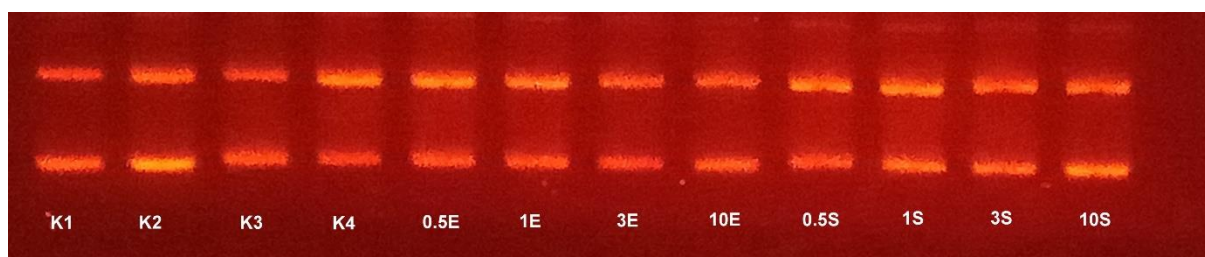
Citotoksični i antioksidacijski, odnosno prooksidacijski učinak aktivnih tvari ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive ispitan je na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS, Caco-2, HepG2 i CAL27, a rezultati su prikazani na slikama 16. – 31.

Citotoksični, odnosno proliferativni učinak aktivnih tvari iz ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive ispitani su na bakterijama *E. coli*, *S. aureus* i *L. plantarum*, a rezultati su prikazani na slikama 32. – 34.

5.1. PROOKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK EKSTRAKTA I IZOLIRANIH FRAKCIJA TRAVE IVE

5.1.1. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA

Potencijalni protektivni učinak različitih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive ispitan je na modelnom plazmidu phiX174 RF1 DNA. Plazmid je, u prisutnosti ekstrakta ili izoliranih frakcija trave ive, tretiran kombiniranim djelovanjem H₂O₂ i UV zračenja, pri čemu dolazi do odmatanja superzavijene forme plazmida u zavijenu. Nakon tretmana provedena je elektroforeza u agaroznom gelu, u kojem zavijeni oblik putuje sporije. Tako se formiraju dvije vrpce koje se vizualiziraju bojanjem gela u otopini etidij bromida, kako je prikazano na slici 12.

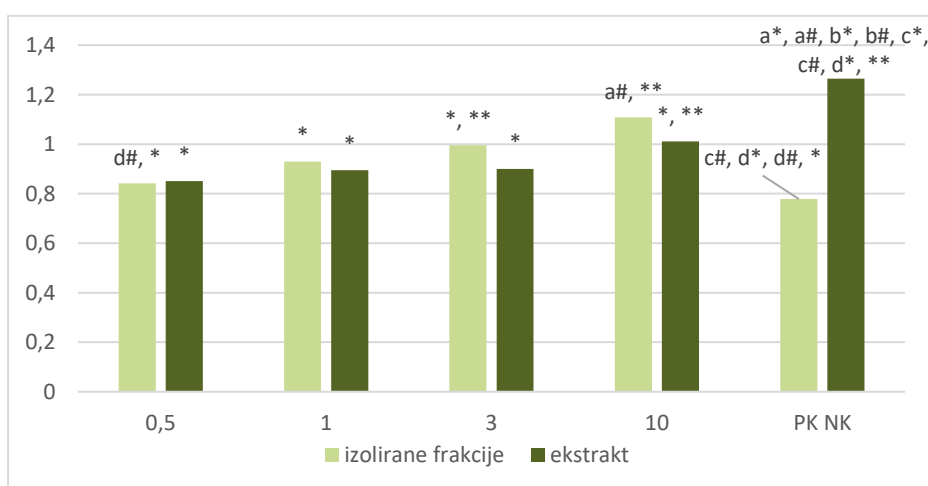


K1: negativna kontrola (plazmid + pufer); K2: negativna kontrola + H₂O₂; K3: negativna kontrola + UV zračenje; K4 – pozitivna kontrola (plazmid + pufer + H₂O₂ + UV zračenje); 0.5E – 10E: koncentracije ekstrakta kojima je tretiran plazmid; 0.5S – 10S: koncentracije ispitivanih frakcija kojima je tretiran plazmid

Slika 12. Protektivni učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na plazmid phiX174 RF1 DNA

Na Slici 12. može se uočiti da je kod K1, K2 i K3 intenzivnija donja vrpca, iz čega se može zaključiti da je glavna plazmida i dalje u superzavijenoj formi koja putuje brže i da samostalno djelovanje H₂O₂, odnosno UV zračenja, neće značajnije oštetiti plazmid. Kombiniranim djelovanjem H₂O₂ i UV zračenja, čime nastaje hidroksilni radikal, gornja vrpca postaje intenzivnija (K4), jer dolazi do značajnijeg odmatanja plazmida u zavijenu formu koja putuje sporije.

Na Slici 13. prikazane su srednje vrijednosti dobivene iz dva paralelna mjerenja, za svaku ispitivanu koncentraciju ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive. Rezultati su prikazani kao omjer superzavijene i zavijene forme plazmida, u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive.



* - statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,001$); ** - statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0.5x ekstrakt ($p < 0,001$); b* - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakt ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakt ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakt ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0.5x izolirane frakcije ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izolirane frakcije ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izolirane frakcije ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izolirane frakcije ($p < 0,001$), PK- pozitivna kontrola, NK- negativna kontrola

Slika 13. Protektivni učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na plazmid phiX174 RF1 DNA

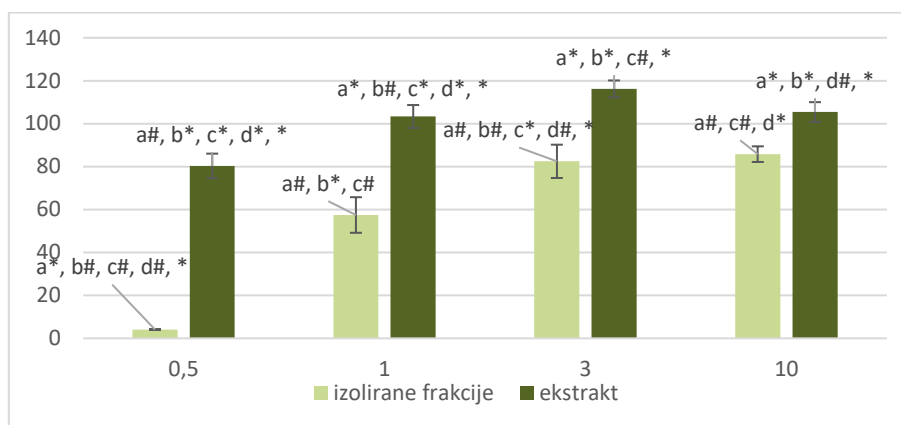
Iz grafičkih rezultata prikazanih na slici 13. vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu kod svih koncentracija, osim kod 10x izoliranih frakcija. Koncentracije 3x i 10x izoliranih frakcija i koncentracija 10x ekstrakta statistički su značajno različite u odnosu na pozitivnu kontrolu. Također, postoji statistički značajna razlika između 0.5x i 10x koncentracija izoliranih frakcija. Iz viđenog se može zaključiti da koncentracija 10x ekstrakta može djelovati protektivno na modelni plazmid izložen oksidacijskim agensima. Iako

koncentracije 0,5x, 1x i 3x ne pokazuju statistički značajno smanjenje oksidacijskog oštećenja u odnosu na negativnu kontrolu, vidljivo je da je to oštećenje puno manje u odnosu na pozitivnu kontrolu te se iz toga može zaključiti da ekstrakti i izolirane frakcije utječu na smanjenje prooksidacijskog oštećenja. Najviša istraživana koncentracija ekstrakta trave ive i izoliranih frakcija statistički značajno je smanjivala prooksidacijsko oštećenje te je dokazano zaštitno djelovanje ovih spojeva.

Do danas, mali je broj studija koji su ispitivale potencijalno genoprotektivno djelovanje trave ive. Oalđe i suradnici proučavali su utjecaj ekstrakta trave ive na kombinirani tretman H₂O₂ i UV zračenja na superzavijenu DNA, izoliranu iz *E. coli*. Metanolni, etanolni i vodeni ekstrakt pokazali su značajnu *in vitro* genoprotektivnu aktivnost, s najboljim vrijednostima vodenog ekstrakta (Oalđe i sur., 2020). Tepe i suradnici dokazali su kako je vodeni ekstrakt *Teucrium polium*, biljke koja dolazi iz porodice *Lamiaceae*, pokazao značajan genoprotektivni učinak na superzavijenom pBR322 DNA modelnom plazmidu (Tepe i sur., 2011). Genoprotektivno djelovanje nekoliko različitih *Lamiaceae* vrsta proučavano je na plazmidu pUC19, te je vodeni ekstrakt najviše pridonio zaštiti od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom (Oalđe i sur., 2021). *Abeliophyllum distichum*, hrv. abeliofilum, iz reda *Lamiales*, je korejska endemska biljka bogata verbaskozidom. Njegov etil acetatni ekstrakt ispitan je u kontekstu oksidativne zaštite plazmida ΦX-174 RF I DNA. Ekstrakt je inhibirao Fe²⁺ - inducirano oksidativno oštećenje plazmida, ovisno o koncentraciji. Također je utvrđeno i značajno protektivno djelovanje na plazmid prilikom oksidativnog oštećenja uzrokovanog H₂O₂, ovisno o koncentraciji (Jang i sur., 2020). Ehinakozid izoliran iz *Herba Cistanches* korišten je u studiji koja je istraživala njegov protektivni učinak na DNA. Fragmentacija DNA kod stanica koje su prije izlaganja UVB tretirane ehinakozidom je značajnije niža, a efekt je vidljiviji pri većim koncentracijama (Zhang i sur., 2017). Mogući protektivni učinak ekstrakta *Teucrium arduini* na kombinirano djelovanje H₂O₂ i UV zračenja na superzavijeni plazmid ΦX174 RF1 DNA ispitali su Šamec i suradnici. Rezultati su ukazali na snažno antioksidativno djelovanje ekstrakta hidroksilnog radikala (Šamec i sur., 2014).

5.1.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma

Modelni protein albumin iz goveđeg seruma korišten je za utvrđivanje antioksidacijskog kapaciteta različitih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive. Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slici 14., kao ovisnost postotka oksidacije proteina o koncentraciji ekstrakta ili izoliranih frakcija trave ive.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0.5x ekstrakt ($p < 0,001$); b* - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakt ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakt ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakt ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0.5x izolirane frakcije ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izolirane frakcije ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izolirane frakcije ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izolirane frakcije ($p < 0,001$)

Slika 14. Protektivni učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelni protein

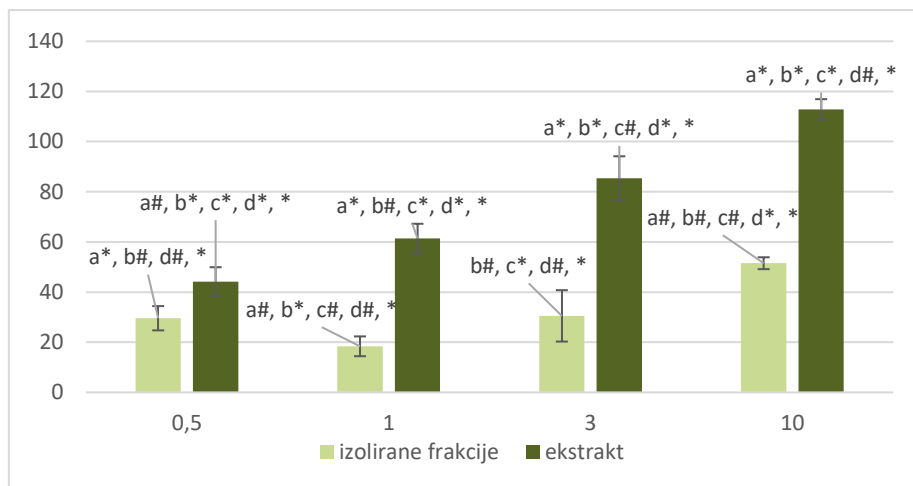
Prikazani grafički rezultati na slici 14. ukazuju da je koncentracija 0.5x izoliranih frakcija statistički značajno različita od svih ostalih koncentracija izoliranih frakcija, kao i od iste koncentracije ekstrakta i od kontrole. Od svih ispitivanih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija, tretiranje modelnog proteina koncentracijom 0,5x izoliranih frakcija rezultiralo je najmanjom oksidacijom proteina (4,11%). Koncentracija 0.5x ekstrakta je statistički značajno različita od svih ostalih koncentracija ekstrakta i od kontrole, te primjena ove koncentracije daje najmanju oksidaciju proteina (80,31%) u usporedbi s ostalim koncentracijama ekstrakta. Iz slike 14. je vidljivo da porastom koncentracije raste i oksidacija proteina, što znači da ekstrakt trave ive i izolirane frakcije ne sprečavaju karbonilaciju proteina pri dnevno preporučenim dozama.

Ardestani i Yazdanparast proveli su eksperiment kojim su pokazali da etilen acetatni ekstrakt *T. polium* djeluje na smanjenje oksidativnog stresa čime može utjecati na prevenciju oksidativnog oštećenja proteina do kojeg dolazi tijekom procesa glikoksidacije (Ardestani i

Yazdanparast, 2007). Ispitivanjem metanolnog ekstrakta kadulje, u kojem je, između ostalih polifenola, izoliran i verbaskozid kao drugi po redu najzastupljeniji, uočeno je da je došlo do inhibicije glikacije albumina te do smanjenja nakupljanja proteinskih karbonila (Ben Khedher i sur., 2020). Oksidacijsko oštećenje kolagena superoksidnim anionom i hidroksilnim radikalom uzrokuje nastanak velikog broja fragmenata peptida. U prisutnosti mikromolarnih koncentracija ehinakozida dolazi do potpunog oporavka nativnog proteina, pokazalo je istraživanje (Facino i sur., 1995). Antioksidativno djelovanje metanolnog ekstrakta cijele biljke *T. arduini* ispitivano je prilikom oksidacijskog oštećenja BSA. Uočeno je prooksidacijsko djelovanje, ovisno o koncentraciji (Šamec i sur., 2015). Studije pokazuju da polifenolni spojevi, u ovisnosti o koncentraciji, strukturi, test – sustavu i supstratu kojeg štite od oksidacije, pokazuju prooksidativno ili antioksidativno djelovanje. Prooksidacijsko djelovanje primjećuje se u eksperimentalnim uvjetima (npr. visok pH), a povezuje se sa sposobnošću redukcije Fe^{3+} i Cu^{2+} , što može stimulirati oksidativna oštećenja (Maurya i Devasagayam, 2010; Chu i sur., 2014).

5.1.3. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelnom lipidu – linolenska kiselina

Različite koncentracije ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive ispitane su u kontekstu potencijalnog antioksidacijskog učinka na modelni lipid, linolensku kiselinu. Rezultati su prikazani grafički na slici 15., kao ovisnost postotka inhibicije oksidacije o koncentraciji ekstrakta, odnosno izoliranih frakcija trave ive.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0.5x ekstrakt ($p < 0,001$); b* - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakt ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakt ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakt ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0.5x izolirane frakcije ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izolirane frakcije ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izolirane frakcije ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izolirane frakcije ($p < 0,001$)

Slika 15. Antioksidacijski potencijal ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelnom lipidu

Kako prikazuju grafički rezultati na slici 15., ekstrakt svake koncentracije pokazuje statistički značajno različito djelovanje od izoliranih frakcija jednake koncentracije. Djelovanje ekstrakta koncentracije 10x statistički se značajno razlikuje od primjene ekstrakta nižih koncentracija te pokazuje najveći antioksidacijski potencijal. Također, antioksidacijski učinak ekstrakta raste s porastom koncentracije. Govoreći o djelovanju izoliranih frakcija, koncentracija 1x statistički se značajno razlikuje od ostalih koncentracija te pokazuje najslabije djelovanje. Najveći antioksidacijski potencijal izoliranih frakcija vidljiv je kod koncentracije 10x, koja je statistički značajno različita od ostalih koncentracija izoliranih frakcija. Koncentracije 0,5x i 3x izoliranih frakcija statistički se ne razlikuju značajno, iako se obje statistički značajno razlikuju od koncentracije 1x. Porastom koncentracije ekstrakta trave ive odnosno izoliranih frakcija raste i protektivni učinak na nezasićene veze linoleinske kiseline s time da je antioksidacijski učinak ekstrakta trave ive puno veći nego onaj izmjeren nakon tretmana s izoliranim frakcijama.

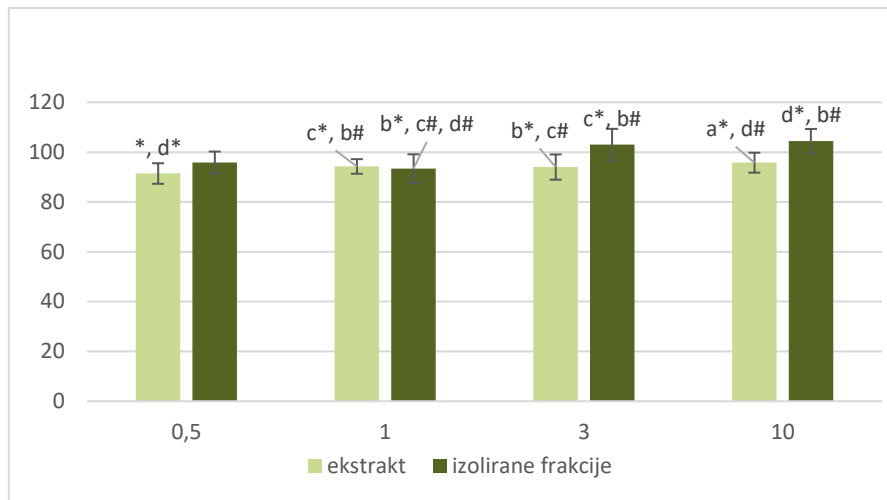
Kako su neki flavonoidi istovremeno lipofilni i hidrofilni (amfipatske molekule), moguće je njihovo otapanje na dodirnoj površini stanične membrane i vodenog sloja. To ih čini sposobnima spriječiti propagaciju lipidne peroksidacije. Također, mogu regenerirati oksidirani α – tokoferol u lipidnoj membrani, dok u vodenom sloju oksidiraju askorbinsku kiselinu i glutation (Chu i sur., 2014). Antioksidativna aktivnost ekstrakta *T. polium* mjerena je u početnoj fazi peroksidacije linolne kiseline. Rezultati su pokazali da je etilen acetatni ekstrakt imao najveći antioksidativni učinak, s 83% - tnom inhibicijom, a etanolni ekstrakt 73% - tni (Ardestani

i Yazdanparast, 2007). Istraživanjem, gdje je kao modelni sustav korišten β – karoten/linolna kiselina, utvrdilo se da ekstrakt trave ive pokazuje značajno antioksidativno djelovanje in vitro (Panovska i sur., 2005). Nadalje, na linolnoj kiselini kao modelnom lipidu testiran i ekstrakt *T. arduini*, sa zaključkom da predtretman lipida s ekstraktom značajno inhibira lipidnu peroksidaciju (Šamec i sur., 2014). Eritrociti kao stanice bogate molekulama koje sadrže Fe^{2+} (primarno hemoglobin) osjetljive su na oksidaciju. Inkubacija eritrocita s H_2O_2 tijekom 60 min uzrokuje značajno povećanje peroksidacije lipida. Preinkubacijom eritrocita s različitim ekstraktom *T. polium* različitih koncentracija, primijećena je značajna inhibicija lipidne peroksidacije (Suboh i sur., 2004). Verbaskozid je, kao najzastupljeniji feniletanoidni glikozid, izoliran iz lišća biljke *Ligustrum purpurascens*, također iz reda *Lamiales*, te je njegova frakcija ispitivana kao potencijalno protektivno sredstvo oksidacije humanih lipoproteina niske gustoće. Rezultat je protektivno djelovanje verbaskozida na lipoproteinima izloženim Cu^{2+} - posredovanoj oksidaciji. Protektivno djelovanje pokazao je i izomerni spoj isoverbaskozid, koji nastaje zagrijavanjem. Učinak je ovisan o koncentraciji. Verbaskozid i isoverbaskozid su djelovali protektivno i na oksidaciju α – tokoferola u lipoproteinima (Wong i sur., 2001).

5.2. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA EKSTRAKTA I IZOLIRANIH FRAKCIJA TRAVE IVE

5.2.1. Određivanje citotoksičnog učinka ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na kontinuiranim humanim staničnim linijama

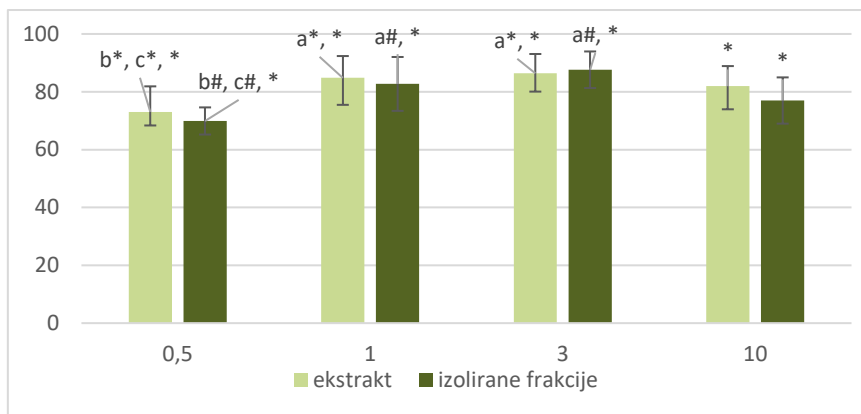
Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina različitih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive (0,5x, 1x, 3x i 10x) provedeno je Neutral red metodom na kontinuiranim humanim staničnim linijama, AGS i Caco-2, HepG2, Cal27 u vremenu izloženosti stanica od 2 i 24 sata. Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost postotka preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izražena u odnosu na kontrolu) o koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 16. Preživljenje stanične linije AGS nakon tretmana od 2 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Na grafičkom prikazu na slici 16. vidljivo je da tijekom 2 h tretmana AGS stanica sve koncentracije ekstrakta trave ive uzrokuju blagu inhibiciju rasta stanica, dok se s porastom koncentracije izoliranih frakcija povećava proliferativni učinak na stanice. Koncentracije 3x i 10x izoliranih frakcija pokazuju statističku razliku u odnosu koncentraciju 1x te na iste koncentracije ekstrakta.

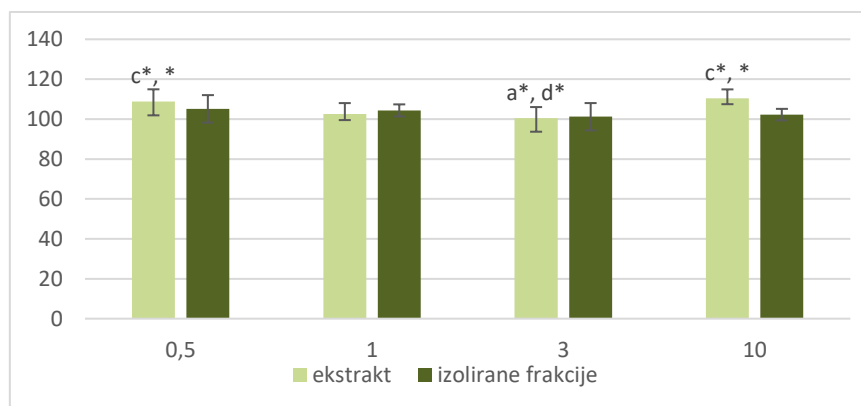


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 17. Preživljenje stanične linije AGS nakon tretmana od 24 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Produljenjem inkubacije AGS stanica na 24 h, kako prikazuje slika 17., dolazi do značajnog pada preživljenja kod svih primijenjenih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija pri čemu sve koncentracije pokazuju statistički značajnu razliku s obzirom na kontrolu.

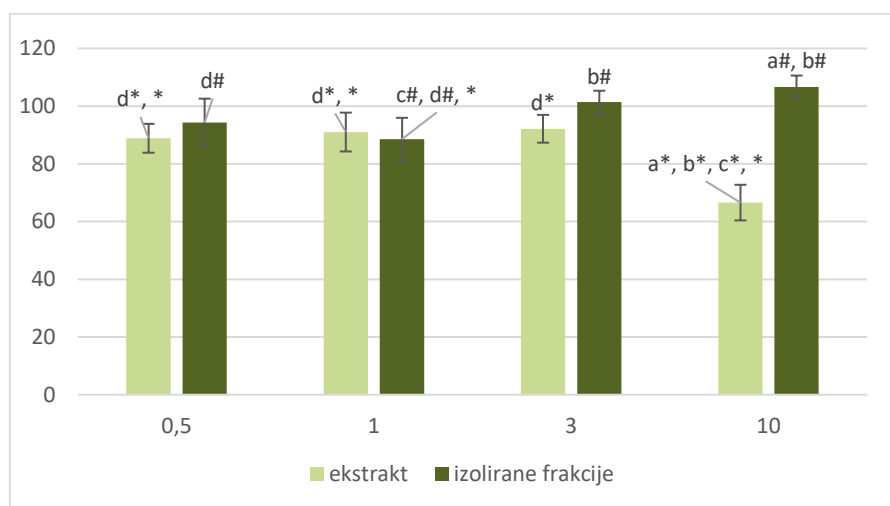
Caco-2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 18. Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon tretmana od 2 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Grafički prikaz na slici 18. ukazuje da tijekom 2 h tretmana Caco-2 stanica izolirane frakcije trave ive u cijelom koncentracijskom rasponu ne utječu na preživljenje stanica, dok koncentracija 0,5x i 10x ekstrakta proliferativno utječu na stanice i pokazuju statističku značajnost u odnosu na kontrolu.

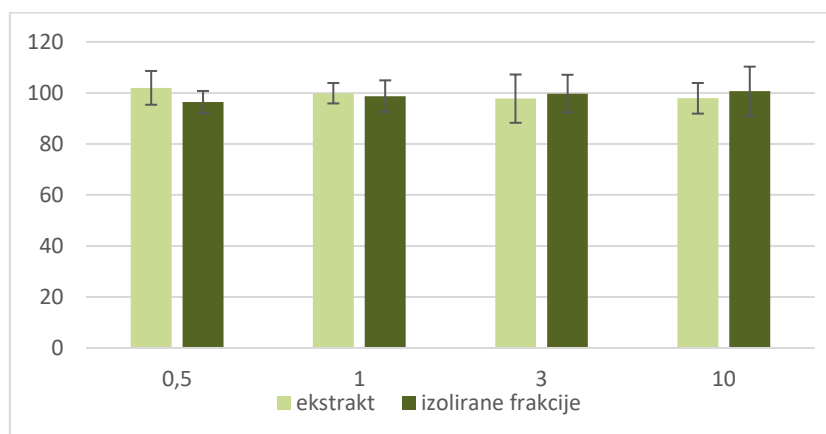


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 19. Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon tretmana od 24 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

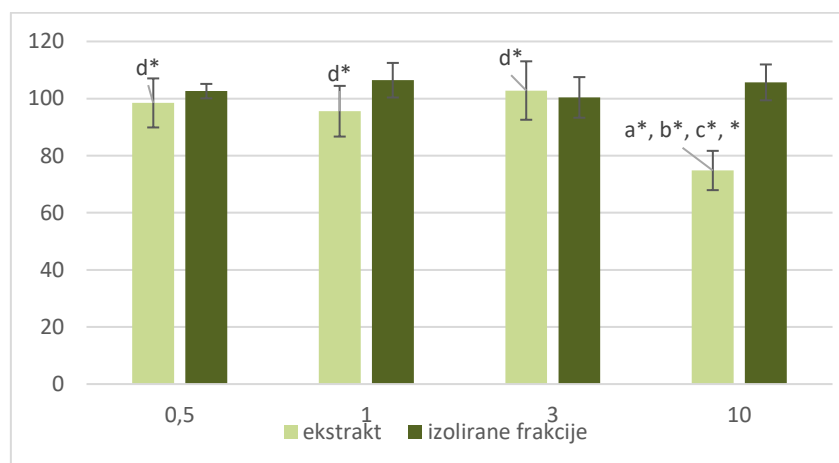
Grafički rezultati sa slike 19. prikazuju da tijekom tretmana stanica 24 h dolazi do značajnog pada preživljenja stanica tretiranih ekstraktom, osobito kod najviše koncentracije (10x) koja posljedično pokazuje statističku značajnost u odnosu na sve ostale koncentracije ekstrakta uključujući i kontrolu. Koncentracije 3x i 10x izoliranih frakcija pokazuju proliferativan učinak na stanice, što se očituje i u povećanju vijabilnosti u usporedbi s 2 sata tretmana stanica.

HepG2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 20. Preživljenje stanične linije HepG2 nakon tretmana od 2 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

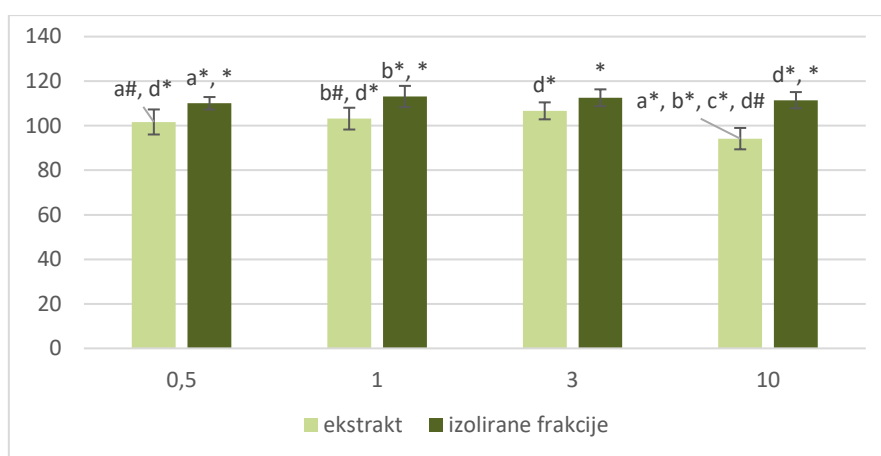


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 21. Preživljenje stanične linije HepG2 nakon tretmana od 24 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Tijekom 2 sata tretmana HepG2 stanica (slika 20.), ekstrakt i izolirane frakcije trave ive u cijelom koncentracijskom rasponu ne utječe na preživljenje tretiranih stanica. Međutim, tijekom 24 sata tretmana istih stanica (slika 21.) ekstrakt najviše koncentracije (10x) pokazuje citotoksičan učinak na HepG2 stanice te postoji statistički značajna razlika u odnosu na ostale koncentracije ekstrakta uključujući i kontrolu. U usporedbi s tretmanom od 2 sata, izolirane frakcije trave ive pokazuju blagi proliferativni učinak na stanice.

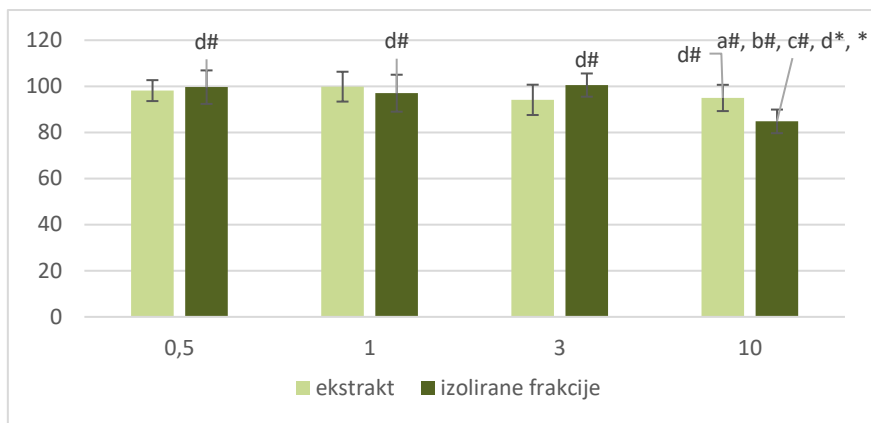
Cal27



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 22. Preživljenje stanične linije Cal27 nakon tretmana od 2 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Iz grafičkog prikaza na slici 22. vidljivo je tijekom 2 sata tretmana Cal27 stanica sve ispitivane koncentracije ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive pokazuju proliferativan učinak, osim ekstrakta najviše koncentracije (10x) koja uzrokuje pad preživljena stanica i kod koje postoji statistička značajnost u odnosu na sve ostale koncentracije ekstrakta kao i na istu koncentraciju izoliranih frakcija. Također, sve koncentracije izoliranih frakcija pokazuju statistički značajan porast preživljenja u odnosu na ispitivane ekstrakte istih koncentracija.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 23. Preživljenje stanične linije Cal27 nakon tretmana od 24 h različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Nakon 24 sata tretmana Cal27 stanica s porastom koncentracije dolazi do blagog smanjenja preživljena stanica, prikazano na slici 23., gdje najveća ispitivana koncentracija izoliranih frakcija pokazuje citotoksičan učinak i statistički se razlikuje od kontrole, ostalih koncentracija izoliranih frakcija te ekstrakta iste koncentracije.

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju (prikazani na slikama 16. – 23.) upućuju na to da citotoksični učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive prvenstveno ovisi o vrsti stanične linije, ali i o vremenu izloženosti.

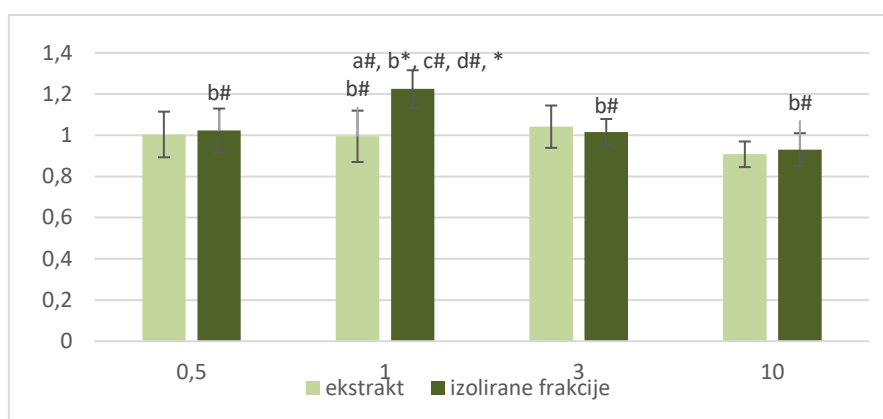
Ekstrakt i izolirane frakcije trave ive pokazuju citotoksično djelovanje na stanice epitela želuca AGS pri svim koncentracijama i na stanice epitela debelog crijeva Caco-2 (ekstrakti svih koncentracija) nakon 24 sata tretmana, dok na preživljenje stanica epitela jezika Cal27 nema značajnog učinka niti nakon produljene inkubacije. Tretman od 2 sata HepG2 stanica nije pokazao učinak na preživljenje stanica, no nakon produljenja tretmana od 24 sata ekstrakt (10x) pokazuje toksično djelovanje na stanice.

Istraživani ekstrakt i izolirane frakcije imaju različit citotoksičan učinak na različitim staničnim linijama, pri čemu nije primjećen toksičan učinak niti na jednoj liniji nakon 2 sata tretmana. Koncentracija 10x ekstrakta nakon tretmana od 24 sata djelovala je toksično na Caco-2 i HepG2 staničnu liniju koje su metabolički aktivne što upućuje na zaključak da produljenom izloženosti nastaju toksični metaboliti. Izolirane frakcije pri koncentraciji 10x djelovale su toksično na CAL27 staničnu liniju.

Vodeni ekstrakti crnog čaja i zelenog čaja, u istraživanju Sun i suradnika na HepG2 stanicama, pokazali su različite stupnjeve inhibicije rasta stanica pri čemu je zeleni čaj izazivao viši stupanj apoptoze HepG2 stanica. Proučavan je utjecaj fermentiranog (crni čaj) i nefermentiranog čaja (zeleni čaj) na stanice karcinoma jetre te su dobiveni rezultati pružili osnovu za daljnje istraživanje ekstrakta čaja za njihov antitumorski potencijal. U radu čiji je cilj bio ispitati antiproliferativno djelovanje vodenih ekstrakta nekoliko biljnih vrsta koje rastu na području Dalmacije (porodica *Lamiaceae*) na stanice karcinoma dojke (MB-MDA 231) i karcinoma prostate (T24), vodeni ekstrakt trave ive pokazao je najbolje inhibicijsko djelovanje na obje ispitivane stanice (Božić, 2016). Općenito, biljke iz porodice *Lamiaceae* pokazuju dobro antiproliferativno djelovanje na stanice raka prostate. U istraživanju (Stanković i sur., 2015) gdje je ispitivana citotoksičnost trave ive na četiri maligne stanične linije, humanog adenokarcinoma cerviksa HeLa, humanog melanoma Fem-x, humane stanične linije mijelomične leukemije K562 i stanice adenokarcinoma dojke MDA-MB-361, najizrazitiji citotoksični učinak uočen je protiv stanica K562. Kao jedan od zaključka istraživanja navodi se kako *T. montanum* predstavlja moćan prirodan izvor za razvoj budućih lijekova protiv raka ili za kemosenzibilizatore dostupnih citostatika. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da biljka *T. montanum* zavrjeđuje daljnja istraživanja kako bi se došlo do spoja i/ili spojeva koji su odgovorni za antiproliferativno djelovanje na maligne stanice.

5.2.2. Prooksidacijski/antioksidacijski učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na kontinuiranim humanim staničnim linijama

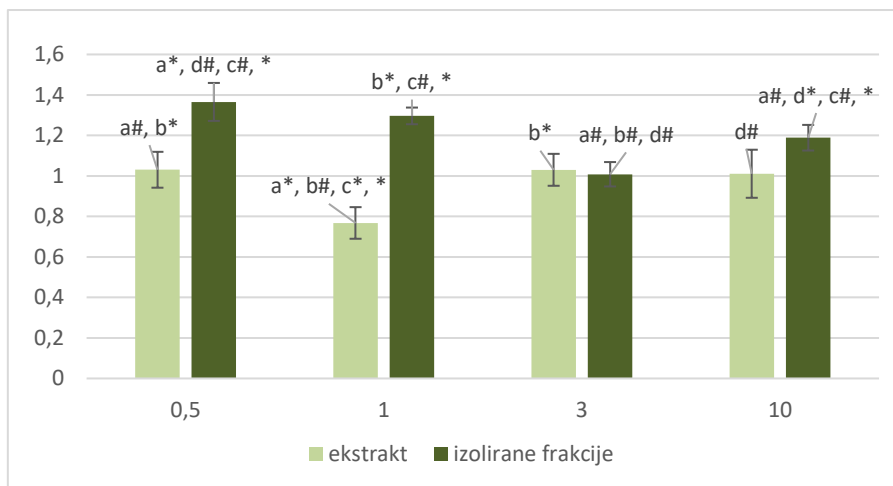
Ispitivanje antioksidacijskog učinka ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive različitih koncentracija provedeno je DCFH-DA metodom na kontinuiranim humanim staničnim linijama AGS, Caco-2, Cal27 i HepG2 u vremenu izloženosti stanica od 2 i 24 sata. Indukcija slobodnih radikala izračunata je kao omjer vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerenih nakon tretmana i preživljenja stanica određenog Neutral red metodom u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost indukcije slobodnih radikala o koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 24. Indukcija slobodnih radikala stanične linije AGS nakon tretmana od 2 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Na grafičkom prikazu na slici 24. vidljivo je da prilikom dvosatnog tretmana AGS stanica različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive, jedino koncentracija 1x izoliranih frakcija pokazuje statističko značajno djelovanje u odnosu na kontrolu, i to prooksidativno. Navedena koncentracija je također statistički značajno različita od svih ostalih koncentracija izoliranih frakcija, kao i od jednake koncentracije ekstrakta.



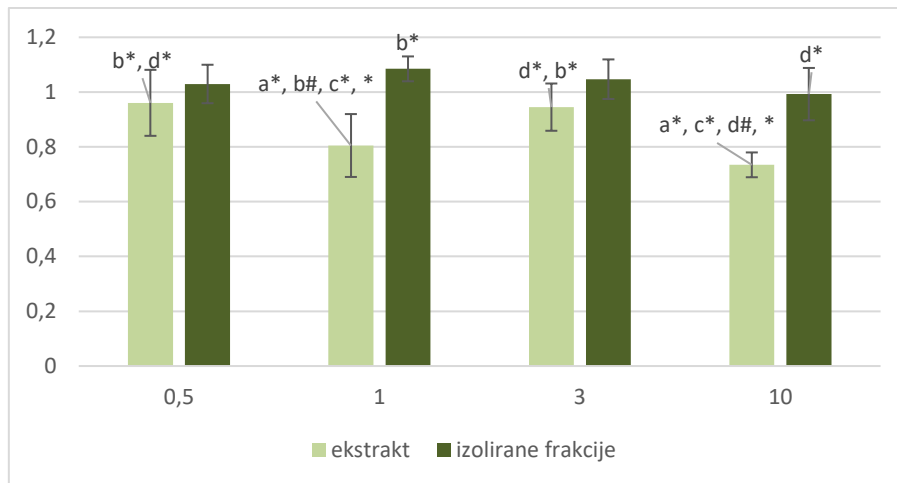
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 25. Indukcija slobodnih radikala stanične linije AGS nakon tretmana od 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Slika 25. ukazuje da, daljnjom inkubacijom prooksidativno djelovanje, osim koncentracije 1x izoliranih frakcija, pokazuju i 0,5x i 10x izoliranih frakcija, sa statistički značajnom razlikom između koncentracija 0,5x i 10x. Suprotno izoliranim frakcijama, koncentracija 1x ekstrakta pokazuje antioksidacijski učinak. Ostale koncentracije ekstrakta ne pokazuju statistički značajnu razliku od kontrole.

Vidljivo je da, produljenjem inkubacije AGS stanične linije, do izražaja dolazi prooksidativno djelovanje izoliranih frakcija. S druge strane, jedino je koncentracija 1x ekstrakta nakon 24h ispoljila antioksidativan učinak.

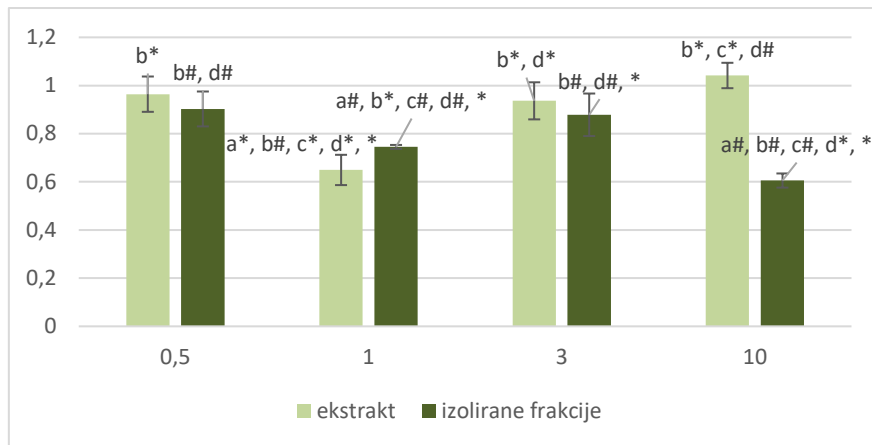
Caco-2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 26. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana od 2 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Iz grafičkog prikaza na slici 26. može se iščitati antioksidacijsko djelovanje koncentracija 1x i 10x ekstrakta, statistički značajno različito od kontrolnog mjerenja. Ostale koncentracije ekstrakta nemaju zamijetan učinak, kao i niti jedna od ispitanih koncentracija izoliranih frakcija.



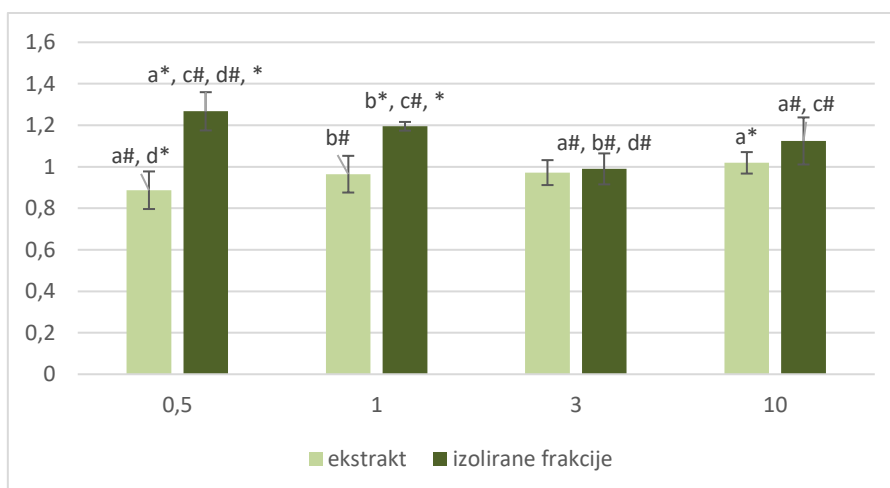
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 27. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana od 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Na slici 27. uočava se da nakon 24h koncentracija 1x ekstrakta i dalje pokazuje antioksidacijsko djelovanje, ali također i ista koncentracija izoliranih frakcija, s time da značajno jači antioksidacijski učinak ima ekstrakt. Osim toga, nakon produljene inkubacije, antioksidacijski potencijal javlja se kod koncentracija 3x i 10x izoliranih frakcija. Između sve tri koncentracije izoliranih frakcija koje su pokazale antioksidacijski učinak postoji statistički značajna razlika, s jakosti učinka započevši od najvećeg: 10x, 1x, 3x. Koncentracija 10x ekstrakta nakon 24h više ne pokazuje značajan učinak.

Po završetku tretmana u trajanju od 24 sata antioksidacijski potencijal primijećen je kod izoliranih frakcija 1x, 3x i 10x, dok koncentracija 1x ekstrakta djeluje antioksidacijski i nakon 2h i nakon 24h. Također, niti jedna od ispitanih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija nije pokazala statistički značajno prooksidacijsko djelovanje u odnosu na kontrolu.

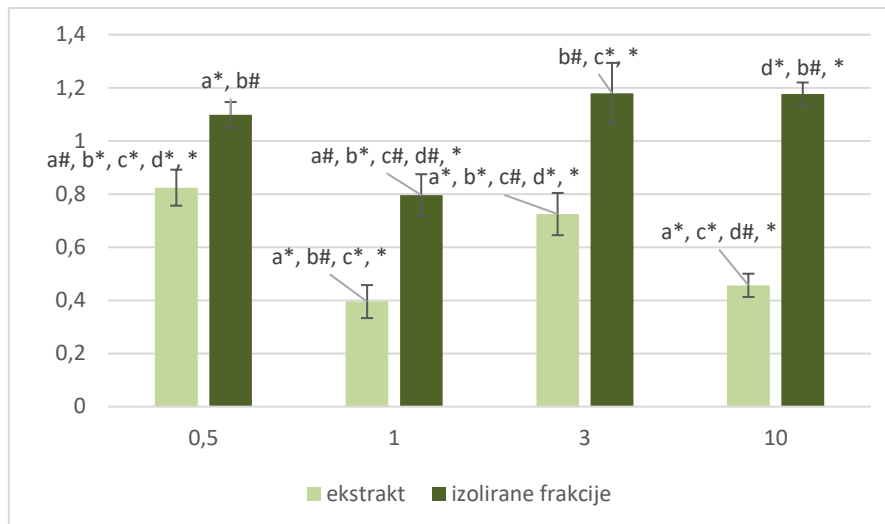
HepG2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b – statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 28. Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana od 2 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Tretiranjem stanične linije HepG2 u trajanju od 2 sata (slika 28.), koncentracije 0,5x i 1x izoliranih frakcija pokazuju prooksidativno djelovanje, bez međusobne statistički značajne razlike. Ostale primijenjene koncentracije izoliranih frakcija, kao i ekstrakta, ne pokazuju značajan učinak.



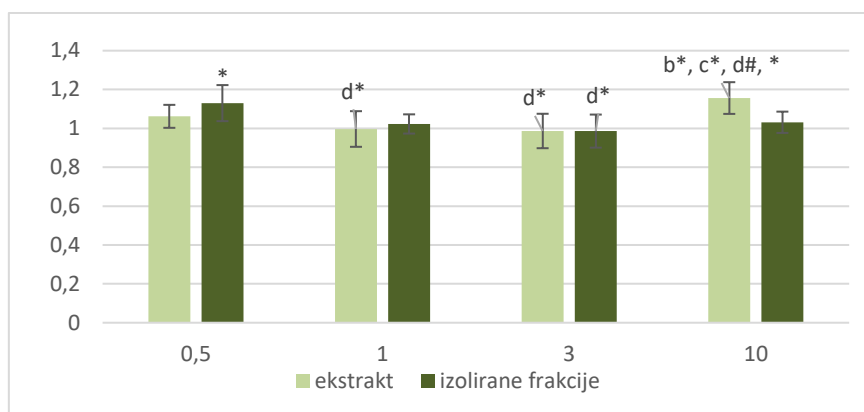
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 29. Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana od 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Kako je vidljivo na slici 29., poslije 24 sata koncentracija 0,5x izoliranih frakcija više ne pokazuje prooksidativan učinak, ali se isti javlja kod 3x i 10x izoliranih frakcija. Nasuprot prooksidativnom učinku izoliranih frakcija, sve ispitivane koncentracije ekstrakta pokazuju značajno antioksidacijsko djelovanje. Najučinkovitije se pokazuju koncentracije 1x i 10x, bez međusobne statistički značajne razlike. Koncentracije 0,5x i 3x značajno se razlikuju od koncentracija 1x i 10x, ali i međusobno. Osim toga, koncentracija 1x izoliranih frakcija ima antioksidativni efekt nakon 24 sata, u odnosu na prooksidativno djelovanje nakon 2 sata. Povećanjem koncentracije izoliranih frakcija do 3x, odnosno 10x, dolazi se do podataka o prooksidativnom učinku.

Koncentracija 1x izoliranih frakcija pokazala je nakon 2 sata prooksidativno djelovanje, dok je nakon 24 sata taj učinak antioksidacijski. Kod koncentracija 3x i 10 izoliranih frakcija nakon 2 sata nije bilo nikakvog efekta, dok je nakon 24 sata njihov učinak prooksidativan. S druge strane, sve primijenjene koncentracije ekstrakta djeluju antioksidacijski na HepG2 staničnu liniju nakon 24 sata.

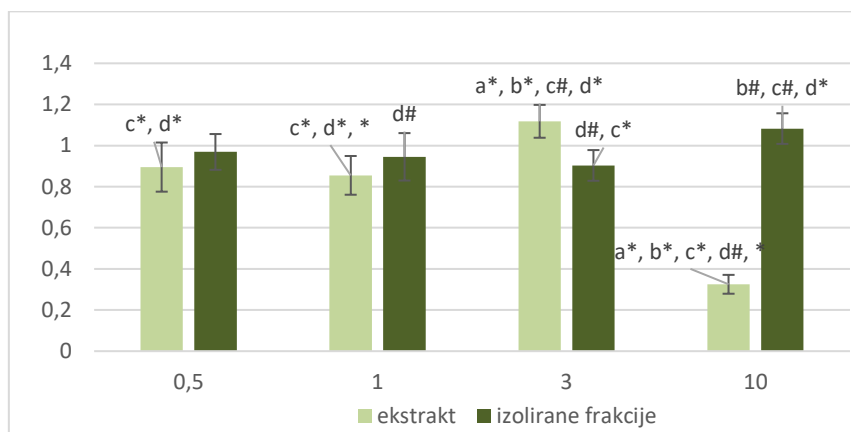
CAL27



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 30. Indukcija slobodnih radikala stanične linije CAL27 nakon tretmana od 2 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Tretmanom u trajanju od 2 sata izolirane frakcije koncentracije 0,5x i ekstrakt 10x pokazuju statistički značajno prooksidativno djelovanje, dok ostale ispitivane koncentracije ekstrakta i izoliranih frakcija nemaju značajan učinak (slika 30.).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 31. Indukcija slobodnih radikala stanične linije CAL27 nakon tretmana od 24 sata različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Rezultati na slici 31. pokazuju da daljnjim tretmanom do 24 sata, koncentracija ekstrakta 10x više ne pokazuje prooksidativno već antioksidacijsko djelovanje. Antioksidacijski učinak uočava se i kod koncentracije ekstrakta 1x. Ostale koncentracije ekstrakta i izoliranih frakcija nisu polučile statistički značajan efekt.

Produljenjem tretmana stanične linije CAL27 s 2 do 24 sata, koncentracija 10x ekstrakta mijenja svoje djelovanje s prooksidativnog u antioksidacijsko, a nakon 24 sata antioksidacijski je djelovao i ekstrakt 1x. Koncentracija 0,5x izoliranih frakcija daljnjom inkubacijom nakon 2 sata više nema prooksidacijski učinak.

Analizom prezentiranih podataka može se zaključiti da antioksidacijski odnosno prooksidacijski potencijal trave ive u većini ispitanih slučajeva ovisi o tome primjenjuje li se njezin ekstrakt ili izolirane frakcije. Zamjetno je da je koncentracija ekstrakta 1x nakon tretmana u trajanju od 24 sata djelovala antioksidacijski na svim testiranim staničnim linijama. Međutim, jednaka koncentracija izoliranih frakcija rezultira prooksidacijskim učinkom kod AGS i HepG2 i nakon 2 i nakon 24 sata izlaganja. Dok kod ostalih staničnih linija ekstrakt nije inducirao prooksidaciju niti u jednom vremenu, kod CAL27 ekstrakt koncentracija 0,5x i 10x djeluje prooksidativno nakon 2 sata, a nakon 24 sata djelovanje koncentracije 10x postaje antioksidativno. Nadalje, dok kod Caco-2 izolirane frakcije u koncentracijama 1x, 3x i 10x nakon 24 sata djeluju antioksidacijski, upravo iste te koncentracije izoliranih frakcija kod HepG2 uzrokuju prooksidaciju nakon jednakog vremena tretiranja.

Interpretacijom dobivenih rezultata dolazi se do zaključka o različitom djelovanju ekstrakta i izoliranih frakcija pojedine koncentracije na određenu staničnu liniju. Dok je koncentracija 10x izoliranih frakcija na HepG2 nakon 2 sata djelovala prooksidacijski uzrokujući pad preživljenja, kod AGS je isti učinak primijećen tek nakon 24h. Suprotno tome, 10x izoliranih frakcija na Caco-2 djeluje antioksidativno uz proliferaciju stanica već nakon 2 sata, ali i nakon 24 sata. Na CAL27 izolirane frakcije 10x ne utječu, ali ekstrakt 10x nakon 2 sata dovodi do prooksidacije i citotoksičnosti.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da ekstrakt trave ive pokazuje antioksidacijsko djelovanje nakon 24 sata tretmana staničnih linija CaCo-2, HepG2 i CAL27. Izolirane frakcije imale su prooksidacijsko djelovanje nakon 24 sata tretmana na stanične linije AGS i HepG2, dok su na CaCo-2 nakon 24 sata tretmana pokazale antioksidacijsko djelovanje.

Analiziranjem međuovisnosti indukcije ROS i preživljenja na AGS staničnoj liniji uviđa se da nakon 2 sata ni ekstrakt niti izolirane frakcije trave ive nisu pokazale statistički značajne promjene kod preživljenja u odnosu na kontrolu. Produljenjem tretmana do 24 sata dolazi do zamijetnog pada preživljenja kod svih primijenjenih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija, dok je istovremeno prooksidativni efekt utvrđen kod koncentracija 0,5x, 1x i 10x izoliranih

frakcija. Stanična linija Caco-2 nakon 2 sata inkubacije pokazuje proliferaciju stanica pri koncentraciji 10x izoliranih frakcija, dok ista ta koncentracija pokazuje antioksidacijski učinak. Isti efekt iste koncentracije izoliranih frakcija nastavlja se i nakon 24h. Kod HepG2 stanica koncentracija 10x izoliranih frakcija djeluje prooksidacijski što se očituje i u padu preživljenja stanične linije. Zanimljivo, iako su sve primijenjene koncentracije ekstrakta pokazale antioksidacijski učinak, to se nije očitovalo kao porast preživljenja stanica. Prooksidativno djelovanje ekstrakta 10x nakon 2h dovelo je do pada preživljenja stanične linije CAL27.

U posljednjih nekoliko desetljeća raste interes za polifenolima kao potencijalnim terapeutima u borbi protiv raka, ponajviše zbog njihove sposobnosti antioksidativnog djelovanja. Ostvarivanje uloge antioksidansa polifenoli zahvaljuju svojoj kemijskoj strukturi. U B prstenu sadrže orto – diol ili trihidroksilnu skupinu, a meta-5,7-dihidroksilnu skupinu u A prstenu. Diolna skupina s metalnim ionima stvara kompleks, čime se uklanjaju katalitički ioni i sprječava nastajanje slobodnih radikala. Međutim, novija istraživanja iznose spoznaje o dodatnim mehanizmima djelovanja polifenola. U okolini bogatoj metalnim ionima i pri visokim pH – vrijednostima, flavonoidi u visokim koncentracijama mogu se ponašati kao prooksidansi, inicirajući nastanak ROS. Okolinom bogatom ionima metala, specifično ionima bakra, smatraju se stanice raka pa se postavlja hipoteza o potencijalnom selektivnom utjecaju polifenola na stanice raka, obzirom na njihov abnormalan redoks – status (Chu i sur., 2014; Mileo & Miccadei, 2016). Studije provedene u oboljelih od raka pokazale su niske razine antioksidativne aktivnosti te povećane razine oksidativnog stresa. Razlika između redoks – statusa normalnih stanica i stanica raka omogućuje praćenje terapijskog učinka putem regulacije redoks – signalizacije (Mileo & Miccadei, 2016).

Oksidativni stres zajedno s kroničnom inflamacijom stanica vodi k genetičkim i/ili epigenetičkim promjenama (nasljedne promjene u ekspresiji gena, bez promjena u DNA sekvenci) te posljedično do disregulacije onkogenih i tumor – supresor gena. U kronično upaljenim stanicama proizvodnja ROS je povećana te endogeni antioksidativni odgovor može biti nedostatan. U takvim uvjetima dolazi do nedovoljne regulacije staničnih procesa i preneoplastičnih promjena (inicijacije karcinogeneze). Također, oksidativni stres utječe i na proliferaciju stanica interferirajući sa signalnim putevima, od kojih je najvažnije spomenuti signalni put receptora epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor receptor signalling pathway*, EGFR) i signalne proteine NRF2, Ras/Raf, fosfolipaza C, protein kinaza C. Sumirano, oksidativni stres uzrokuje promjene u ekspresiji gena, proliferaciji stanica i apoptozi, sve redom važnim faktorima u inicijaciji i razvoju karcinogeneze (Mileo & Miccadei, 2016). Antioksidativna sposobnost polifenola očituje se u uklanjanju ROS, bilo onih nastalih endogeno ili djelovanjem ksenobiotika, radijacije i sl., te je njihova antioksidativna uloga važna u prevenciji nastanka raka. S druge strane, smatra se da povećane količine ROS u stanici mogu

djelovati kao stanični toksikanti, zaustavljajući rast stanica raka te njihovu apoptozu ili nekrozu, što ukazuje na učinak regresije polifenola. Ipak, mehanizam kojim polifenoli reguliraju prooksidaciju, a time i svoju antikancerogenu aktivnost prema stanicama raka, ne oštećujući normalne stanice, nije sasvim poznat. (Khan i sur., 2012; Mileo & Miccadei, 2016). Eksperimentalni rezultati ukazuju na prooksidacijski karakter polifenola u prisutnosti iona bakra, kada polifenoli mobiliziraju endogene ione bakra u stanicama raka, posljedično generirajući ROS što za stanicu postaje toksično. Ovakav mehanizam citotoksičnosti za stanice raka koji istovremeno nema efekta kod normalnih stanica objašnjava se povišenim razinama bakra u stanicama raka u odnosu na normalne stanice (Khan i sur., 2012).

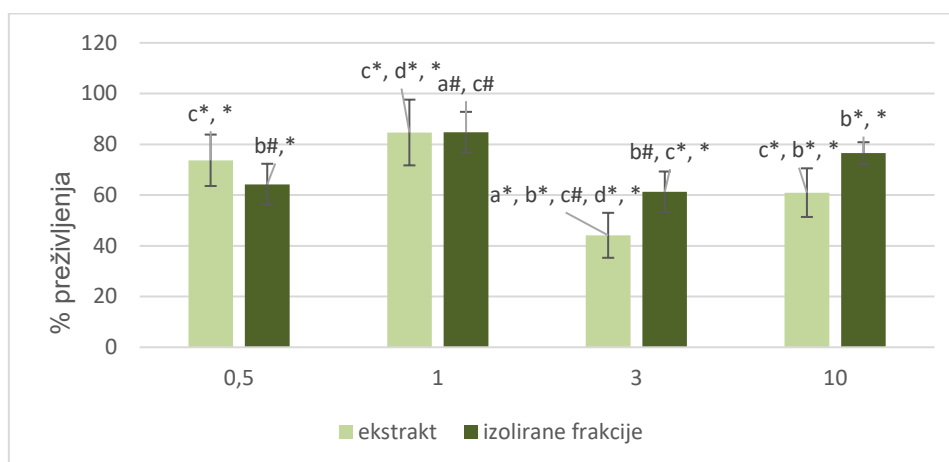
Većina biljnih polifenola posjeduje i antioksidativnu i prooksidativnu aktivnost. Uklanjanjem prekomjernih količina ROS polifenoli djeluju antioksidativno, odnosno preventivno na nastajanje raka, no kemoterapeutske učinke odnosi se na njihova prooksidativna svojstva (Khan i sur., 2012).

Brojna istraživanja potvrdila su da različiti polifenolni spojevi iskazuju kako antioksidativna, tako i proliferativna svojstva, čime se svakako širi spektar mogućnosti za daljnja detaljnija istraživanja i pronalaženje mogućnosti njihove terapijske primjene.

5.3. CITOTOKSIČNI/PROLIFERATIVNI UČINAK EKSTRAKTA I IZOLIRANIH FRAKCIJA TRAVE IVE NA BAKTERIJE *E. COLI*, *S. AUREUS* I *L. PLANTARUM*

Nakon 60 minuta tretmana različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive u koncentracijama od 0,5x, 1x, 3x i 10x, bakterijske suspenzije su nacijepljene na odgovarajuće hranjive krute podloge. Porasle kolonije su izbrojane nakon 24 sata inkubacije na 37 °C, a preživljenje bakterija je izraženo kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolu.

Escherichia coli

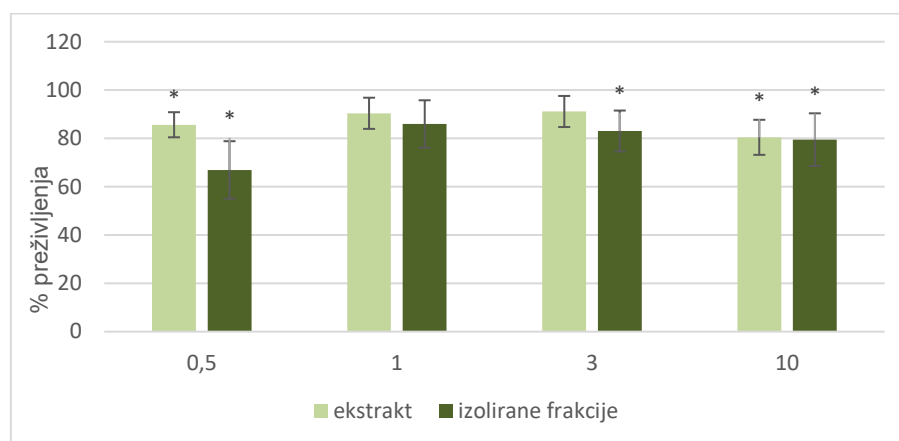


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 32. Preživljenje bakterija *Escherichia coli* nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Iz rezultata prikazanih na slici 32. vidljivo je da je ekstrakt koncentracije 3x statistički značajan u odnosu na sve ostale koncentracije ekstrakta, uključujući i kontrolu kao i na istu koncentraciju izoliranih frakcija te upravo ta koncentracija pokazuje najveći citotoksičan učinak na bakteriju *E. coli*. Koncentracija ekstrakta od 1x dovodi do statistički značajnijeg rasta vijabilnosti bakterije u usporedbi s djelovanjem ekstrakta koncentracije 10x i u usporedbi s kontrolom. Koncentracija od 1x izoliranih frakcija statistički je značajna u odnosu na koncentraciju 0,5x i 10x, a sve su ostale koncentracije statistički značajne u odnosu na kontrolu i pokazuju blagi citotoksični učinak smanjujući preživljenje bakterije. *E. coli* je Gram negativna bakterija, a Gram negativne bakterije sadrže vanjsku membranu koja bakterijama daje veliku otpornost.

Staphylococcus aureus

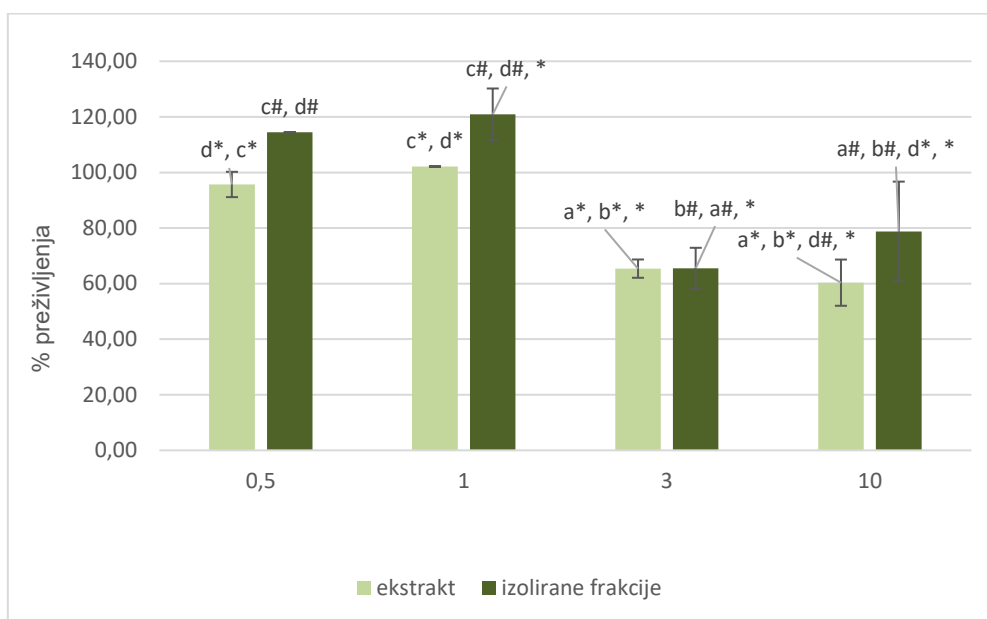


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 33. Preživljenje bakterija *Staphylococcus aureus* nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Iz grafičkih podataka na slici 33, vidljivo je da najveći citotoksičan učinak pokazuje koncentracija 0,5x izoliranih frakcija, dok je preživljenje kod svih ostalih koncentracija ekstrakta i izoliranih frakcija veća od 80 %. Među različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija ne postoji znatna statistički značajna razlika što se može interpretirati visokom rezistentnošću ispitivane bakterije. Istraživanje koje je proveo McNitt i sur. (2021.) gdje je ispitivano preživljenje bakterije *S. aureus* nakon tretmana s livadnom vlasnjačom (lat. *Poa pratensis*) te na sintetskim i prirodnim travama također je pokazalo visoko preživljenje bakterije. Stope preživljenja jedino su se smanjivale s vremenom i nakon dužeg izlaganja sunčevoj svjetlosti. *S. aureus* je Gram pozitivna bakterija te u svojoj stijenci sadrži debeli peptidoglikanski sloj za razliku od Gram negativnih bakterija što ju čini izuzetno otpornom bakterijom čime se može objasniti slab citotoksičan učinak ispitivanih koncentracija trave ive. Peptidoglikani su umreženi pentaglicinskim ograncima čiju sintezu, koju kataliziraju enzimi transpeptidaze u fazi razvoja stanične membrane bakterije te su upravo zbog tog povezivanja otporniji i na djelovanje pojedinih antibiotika (Silhavy i sur., 2010).

Lactobacillus plantarum



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a* - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x ekstrakta ($p < 0,001$); a# - statistički značajna razlika u odnosu na 0,5x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); b - statistički značajna razlika u odnosu na 1x ekstrakta ($p < 0,001$); b# - statistički značajna razlika u odnosu na 1x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); c* - statistički značajna razlika u odnosu na 3x ekstrakta ($p < 0,001$); c# - statistički značajna razlika u odnosu na 3x izoliranih frakcija ($p < 0,001$); d* - statistički značajna razlika u odnosu na 10x ekstrakta ($p < 0,001$); d# - statistički značajna razlika u odnosu na 10x izoliranih frakcija ($p < 0,001$)

Slika 34. Preživljenje bakterija *Lactobacillus plantarum* nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive

Rezultati na slici 34. pokazuju proliferativni učinak ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive kod koncentracija 0,5x i 1x, no koncentracije 3x i 10x pokazuju citotoksično djelovanje te su statistički značajne u odnosu na kontrolu te na koncentracije 0,5x i 1x i kod ekstrakta i kod izoliranih frakcija. Kod koncentracije od 10x također postoji statistički značajna razlika između ekstrakta i izoliranih frakcija. Laktobacili su Gram pozitivne bakterije koje u staničnoj stijenci imaju sloj mureina koji bi im pruža dodatnu zaštitu i čini ih otpornijima.

L. plantarum je probiotički mikroorganizam zbog čega bi proliferativan učinak trave ive bio poželjan rezultat. Ova bakterija proizvodi brojne bakteriocine i antifungalno aktivne spojeve. *L. plantarum* se široko koristi u proizvodnji mnogih fermentiranih namirnica, kao starter kultura i kao probiotički mikroorganizam, a također ima sposobnost poboljšanja nutritivne kvalitete i sadržaja vitamina u prehrambenim proizvodima, naročito vitamin B12 (Swain i Ray, 2016).

Razvoj rezistencije na antibiotike kod *E. coli* važan je problem, stoga pronalaženje alternativnih antimikrobnih sredstava iz biljnih ekstrakata izaziva sve veći interes. Polifenolne komponente zelenog čaja pokazuju antibakterijsko djelovanje. Katehini iz zelenog čaja

pokazuju antimikrobno djelovanje protiv različitih bakterija uključujući bakteriostatski utjecaj na *E. coli* na kojoj je i provedeno istraživanje Noormandi i Dabaghzadeh (2015) te također pokazuju sinergistički učinak s antibioticima kao što su kloramfenikol, amoksisilin, sulfametoksazol, azitromicin, levofloksacin, gentamicin, meticilin, naldiksična kiselina i, posebno ciprofloksacin. Ispitivani su antibakterijski učinci polifenola čaja ekstrahiranih iz korejskog zelenog čaja (lat. *Camellia sinensis*) protiv *Staphylococcus aureus* otpornog na meticilin (MRSA). Cho i suradnici u studiji provedenoj 2008. godine dokazali su da polifenolni spojevi iz zelenog čaja različito stimuliraju ekspresiju različitih proteina u bakterijama te zajedno sa antibiotikom oksacilinom mogu sinergistički baktericidno djelovati na meticilin rezistentni *S. aureus*. U svom radu Djilas i sur. navode kako su ekstrakti trave ive i etil acetata, kao i n-butanola pokazali značajno bakteriocidno djelovanje protiv patogena *S. aureus*. Slične rezultati objavili su i Stanković i sur. koji su proučavali in vitro antimikrobno djelovanje vrsta *Teucrium* na različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske vrste korištenjem mikrodilucije s resazurinom pri čemu je ekstrakt metanola pokazao je najveći inhibicijski učinak, osobito protiv vrsta bakterija otpornih na amoksisilin *S. aureus* ATCC 25923 i *Pseudomonas aeruginosa*. Na temelju dostupnih podataka općenito je uočena veća otpornost Gram negativnih bakterija prema antimikrobnim spojevima u usporedbi s Gram pozitivnim bakterijama. Primjerice, ekstrakt kadulje osim što djeluje kao uspješan bakteriostatik prema Gram pozitivnim bakterijama, pokazuje inhibicijski učinak i prema Gram negativnim bakterijama uključujući *E. coli*, ali pri značajno višim dozama. Razlog tome je u prisutnosti vanjske membrane koja obavija staničnu stijenkku Gram negativnih bakterija te im pruža veću zaštitu (Generalić-Mekinić i sur., 2014).

Preživljenje patogenih bakterija *E. coli* i *S. aureus* smanjeno je pri svim ispitivanim koncentracijama u odnosu na kontrolu, iz čega proizlazi da ekstrakt i izolirane frakcije trave ive pokazuju blago bakteriostatsko djelovanje prema oba patogena mikroorganizma. S druge strane, uočen je proliferativan učinak trave ive kod niskih koncentracija na rast probiotske bakterije *L. plantarum*, no kod većih koncentracija dolazi do inhibitornog djelovanja stoga je primjena trave ive kao prebiotičkog pripravka upitna jer bi veće doze mogle rezultirati narušavanjem humane mikroflore.

Ekstrakt trave ive i izolirane frakcije trave ive djeluju citotoksično na *E. coli* duž cijelog koncentracijskog raspona, dok su izolirane frakcije na bakteriji *S. aureus* toksične samo pri koncentraciji 10x. Ekstrakt trave ive na ovoj bakterijskog vrsti pokazuje blagi toksični učinak duž cijelog koncentracijskog raspona. Ekstrakt trave ive i izolirane frakcije pri koncentraciji 0,5x i 1x djeluju proliferativno na *L. plantarum* dok su ostale dvije koncentracije izrazito toksične za tu bakterijsku vrstu.

6. ZAKLJUČAK

Vodeni ekstrakt i izolirane frakcije trave ive utječu na smanjenje prooksidacijskog oštećenja. Najviša istraživana koncentracija ekstrakta trave ive i izoliranih frakcija statistički značajno je smanjivala prooksidacijsko oštećenje te je dokazano zaštitno djelovanje ovih spojeva na modelnoj molekuli DNA.

Ekstrakt i izolirane frakcije trave ive ne sprečavaju karbonilaciju proteina pri dnevno preporučenim dozama.

Porastom koncentracije ekstrakta trave ive odnosno izoliranih frakcija raste i protektivni učinak na nezasićene veze linoleinske kiseline s time da je antioksidacijski učinak ekstrakta trave ive puno veći nego onaj izmjeren nakon tretmana s izoliranim frakcijama.

Istraživani ekstrakt i izolirane frakcije imaju različit citotoksičan učinak na različitim staničnim linijama, pri čemu nije primjećen toksičan učinak niti na jednoj liniji nakon 2 sata tretmana. Koncentracija 10x ekstrakta nakon tretmana od 24 sata djelovala je toksično na Caco-2 i HepG2 staničnu liniju koje su metabolički aktivne što upućuje na zaključak da produljenom izloženošću nastaju toksični metaboliti. Izolirane frakcije pri koncentraciji 10x djelovale su toksično na CAL27 staničnu liniju.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da ekstrakt trave ive pokazuje antioksidacijsko djelovanje nakon 24 sata tretmana staničnih linija CaCo-2, HepG2 i CAL27. Izolirane frakcije imale su prooksidacijsko djelovanje nakon 24 sata tretmana na stanične linije AGS i HepG2, dok su na CaCo-2 nakon 24 sata tretmana pokazale antioksidacijsko djelovanje.

Ekstrakt trave ive i izolirane frakcije trave ive djeluju citotoksično na E. coli duž cijelog koncentracijskog raspona, dok su izolirane frakcije na bakteriji S. aureus toksične samo pri koncentraciji 10x. Ekstrakt trave ive na ovoj bakterijskog vrsti pokazuje blagi toksični učinak duž cijelog koncentracijskog raspona. Ekstrakt trave ive i izolirane frakcije pri koncentraciji 0,5x i 1x djeluju proliferativno na L. plantarum dok su ostale dvije koncentracije izrazito toksične za tu bakterijsku vrstu.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo se dragoj prof. dr. sc. Kseniji Durgo što je srdačno prihvatila naš upit za mentorstvo te nas sa strpljenjem i velikim razumijevanjem vodila kroz rad. Veliko hvala na svim udijeljenim savjetima i pruženoj podršci. Također, zahvaljujemo se i mag. ing. Ani Huđek Turković na pomoći pri izradi rada i riječima ohrabrenja. Na kraju, najviše zahvaljujemo jedna drugoj na međusobnoj kontinuiranoj podršci i razumijevanju, podizanju entuzijazma i uzajamnom guranju prema naprijed.

8. LITERATURA

Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I. E., Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside--a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol. Adv.* **32**, 1065–1076.

Anonymous 1, < <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>>. Pristupljeno 28. svibnja 2022.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxidation. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2402–2411.

Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L. J. M., Roeck-Holtzhauer, Y. D. (1999) Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J. Appl. Toxicol.* **19**, 163–165.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: HepG2[HEPG2] < <https://www.atcc.org/products/hb-8065> >. Pristupljeno 26. travnja 2022.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: Caco-2 [Caco2], <<https://www.atcc.org/products/htb-37>>. Pristupljeno 26. travnja 2022.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: AGS <<https://www.atcc.org/products/crl-1739>>. Pristupljeno 26. travnja 2022.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: CAL 27 < <https://www.atcc.org/products/crl-2095>>. Pristupljeno 26. travnja 2022.

Ben Khedher, M. R., Hafsa, J., Haddad, M., Hammami, M. (2020). Inhibition of Protein Glycation by Combined Antioxidant and Antiglycation Constituents from a Phenolic Fraction of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **75**, 505–511.

Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hadi, S. M. (2007). Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **218**, 249–255.

Borchardt, R.T., 2011. Hidalgo, I. J., Raub, T. J., Borchardt, R. T. (2011) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *The AAPS journal*, **13**, 323–327.

Bouayed, J., Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants: Double – edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell Longev.* **3**, 228–237.

Božić, I. (2016) Antiproliferativna aktivnost odabranih biljaka iz porodice Lamiaceae na dvije stanične linije raka, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Chatterjee, N., Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **58**, 235–263.

Cho, Y., S., Schiller, N., L., Oh, K.-H. (2008) Antibacterial Effects of Green Tea Polyphenols on Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **57**, 542–546.

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.

Chu, K. O., Chan, S. O., Pang, C. P., Wang, C. C. (2014). Pro-oxidative and antioxidative controls and signaling modification of polyphenolic phytochemicals: contribution to health promotion and disease prevention?. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 4026–4038.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195–1214.

D'Archivio, M., Filesì, C., Vari, R., Scaccocchio, B., Masella, R. (2010) Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1321-1342.

Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* **473**, 805–825.

Djilas, S.M., Markov, S.L., Cvetković, D.D., Čanadanović-Brunet, J.M., Ćetković, G.S., Tumbas, V.T. (2006) Antimicrobial and free radical scavenging activities of *Teucrium montanum*, *Fitoterapia* **77**, 401-403.

Durgo, K. (2020) Genotoksikologija - Nastavni materijali za modul Toksikologija hrane, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Merlin 2020.

Đaković, S. (2017) Skripta iz kolegija Kemija i biokemija hrane, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Merlin 2017.

Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M. (2016). Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytother. Res.* **30**, 1379–1391.

- Eruslanov, E., Kusmartsev, S. (2010) Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. U: Armstrong D. (eds) *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, **594**. Humana Press, Totowa, NJ.
- Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Pietta, P., Mauri, P. (1995). Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta. Med.* **61**, 510–514.
- Freshney, R. I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V. (2014) In vitro Antioxidant and Antibacterial Activity of Lamiaceae Phenolic Extracts: A Correlation Study. *Food Technol. Biotechnol.* **52**, 119-127.
- Gorphe, P. (2019) A comprehensive review of Hep-2 cell line in translational research for laryngeal cancer, *Am. J. Cancer Res.* **9**, 644-649.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem. Rev.* **18**, 241–272.
- Green, M. R., Sambrook, J. (2019) *Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis*. Cold Spring Harbor Protocols, **2019**(1).
- Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 950-988.
- Jang, T. W., Choi, J. S., Park, J. H. (2020). Protective and inhibitory effects of acteoside from *Abeliophyllum distichum* Nakai against oxidative DNA damage. *Mol. Med. Rep.* **22**, 2076–2084.
- Jiang, L., Ji, N., Zhou, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Z., Chen, Q., Zeng, X. (2009) CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncology.* **45**, 204-207.
- Kadifkova Panovska, T., Kulevanova, S., Stefova, M. (2005) In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae). *Acta. Pharm.* **55**, 207–214.
- Khan, H. Y., Zubair, H., Ullah, M. F., Ahmad, A., Hadi, S. M. (2012). A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Curr. Drug Targets.* **13**, 1738–1749.

- Khan, H. Y., Zubair, H., Faisal, M., Ullah, M. F., Farhan, M., Sarkar, F. H., Ahmad, A., Hadi, S. M. (2014). Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: a mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 437–446.
- Kim, K. B., Nam, Y. A., Kim, H. S., Hayes, A. W., Lee, B. M. (2014). α -Linolenic acid: nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. *Food Chem. Toxicol.* **70**, 163–178.
- Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Lulli, D., Stancato, A., De Luca, C., Pastore, S., Korkina, L. (2013). Modulation of human keratinocyte responses to solar UV by plant polyphenols as a basis for chemoprevention of non-melanoma skin cancers. *Curr. Med. Chem.* **20**, 869–879.
- Lakušić, B., Stevanović, B., Jančić, R., Lakušić, D. (2010) Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (Lamiaceae) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro), *Flora* **205**, 633-646.
- Lakušić, D., Lakušić, B. (2014). Morpho-anatomical differentiation of the species *Teucrium montanum* (Lamiaceae) in the Central Balkan Peninsula. *Botanica Serbica.* **38**, 109-120.
- Langbroek, M. (2013) *Teucrium montanum* L. <<https://observation.org/species/2771/>> Pristupljeno 19. lipnja 2021.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* **62**, 3923-3927.
- Liu, J., Yang, L., Dong, Y., Zhang, B., Ma, X. (2018). Echinacoside, an Inestimable Natural Product in Treatment of Neurological and other Disorders. *Molecules*, **23**, 1213.
- Lovrić, A. (2016) Osjetljivost proteina na oksidaciju i posljedice na fenotip stanice, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Ljekovito bilje. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 21. travnja. 2021.
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182.

- Maurya, D. K., Devasagayam, T. P. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3369–3373.
- Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Natarajan, M., Lopez-Burillo, S., Reiter, R. J. (2003). Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1620**, 139–150.
- McNitt, A., S., Petrunak, D., M., Senensits, T., J. (2021) Survival of *Staphylococcus aureus* applied to *Poa pratensis* L. and synthetic turf, *Int. Turfgrass. Soc. Res. J.* 1–13.
- Mileo, A. M., Miccadei, S. (2016). Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 6475624.
- Milošević-Djordjević, O., Stošić, I., Stanković, M., Grujičić, D. (2013). Comparative study of genotoxicity and antimutagenicity of methanolic extracts from *Teucrium chamaedrys* and *Teucrium montanum* in human lymphocytes using micronucleus assay. *Cytotechnology* **65**, 863–869.
- Mullenders, L. (2018). Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1842–1852.
- Ng, N.S., Ooi, L. (2021) A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. *Bio. Protoc.* **11**(1).
- Noormandi, A., Dabaghzadeh, F. (2015) Effects of green tea on *Escherichia coli* as a uropathogen, *J. Tradit. Complement Med.* **5**, 15-20.
- Oalđe, M., Kolarević, S., Živković, J., Alimpić Aradski, A., Jovanović Marić, J., Kračun Kolarević, M., Đorđević, J., Marin, P. D., Šavikin, K., Vuković-Gačić, B., Duletić-Laušević, S., (2021). A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models in vitro. *Food Funct.* **12**, 3233–3245.
- Oalđe, M. M., Kolarević, S. M., Živković, J. C., Vuković-Gačić, B. S., Jovanović Marić, J. M., Kračun Kolarević, M. J., Đorđević, J. Z., Alimpić Aradski, A. Z., Marin, P. D., Šavikin, K. P., Duletić-Laušević, S. N. (2020). The impact of different extracts of six Lamiaceae species on deleterious effects of oxidative stress assessed in acellular, prokaryotic and eukaryotic models in vitro. *Saudi. Pharm. J.* **28**, 1592–1604.

- Pavela, R., Benelli, G., Canale, A., Maggi, F., Mártonfi, P. (2020) Exploring essential oils of Slovak medicinal plants for insecticidal activity: The case of *Thymus alternans* and *Teucrium montanum* subsp. *jailae*. *Food Chem. Toxicol.* **138**, 111203.
- Petrović D. (2014) Trava iva od mrtva pravi živa. *Pčela - časopis saveza pčelara „Kadulja“* **6**: 7-8.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **30**, 11–26.
- Purdel, N. C., Margina, D., Ilie, M. (2014) Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. *Annu. Res. Rev. Biol.* **4**, 2015-2026.
- Raoufinia, R., Mota, A., Keyhanvar, N., Safari, F., Shamekhi, S., Abdolalizadeh, J. (2016). Overview of Albumin and Its Purification Methods. *Adv. Pharm. Bull.* **6**, 495–507.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125-1131.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Wojdyla, K., Nedić, O., Baron, C. P., Griffiths, H. R. (2014) Analysis of protein carbonylation — pitfalls and promise in commonly used methods. *Free Radic. Res.* **48**, 1145–1162.
- Santa Maria, A., Lopez, A., Diaz, M.M., Alban, J., Galan de Mera, A., Vicente Orellana, J.A., Pozuelo, J.M. (1997) Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by biassays in vitro. *J. Ethnopharmacol.* **57**, 183-187.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, a000414.
- Silva, S., Costa, E. M., Vicente, S., Veiga, M., Calhau, C., Morais, R. M., Pintado, M. E. (2017). DNA agarose gel electrophoresis for antioxidant analysis: Development of a quantitative approach for phenolic extracts. *Food Chem.* **233**, 45–51.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* **24**, 2452.
- Stadtman, E.R., Levine, R. L. (2006) Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, 191-208.

- Stankovic, M., Martinović, N., Topuzovic, M., Solujic, S. (2011). Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, *F. Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* **25**, 2222-2227.
- Stanković, M., Mitrović, T., Matić, I., Topuzović, M., Stamenković, Z. (2015) New values of *Teucrium* species: In Vitro study of cytotoxic activities of secondary metabolites, *Not. Bot. Horti. Agrobo.* **43**, e1842-e4309.
- Stellwagen, N. C. (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* **30**, 188–195.
- Suboh, S. M., Bילו, Y. Y., Aburjai, T. A. (2004). Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother. Res.* **18**, 280–284.
- Sun, L., Zhang, Y., Zhang, W., Lai, X., Li, Q., Zhang, L., Sun, S. (2020) Green tea and black tea inhibit proliferation and migration of HepG2 cells via the PI3K/Akt and MMPs signalling pathway, *Biomed. Pharmacother.* **125**, 109893.
- Swain, M., R., Ray, R., C. (2016) Nutritional values and bioactive compounds in fermented fruits and vegetables. U: Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables, Paramethioites, S. Ed., 37–52, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Šamec, D., Durgo, K., Grúz, J., Kremer, D., Kosalec, I., Piljac-Žegarac, J., Salopek-Sondi, B. (2015). Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. *Food Chem.* **186**, 298–305.
- Taverna, M., Marie, A. L., Mira, J. P., Guidet, B. (2013). Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann. Intensive Care* **3**, 4.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., Sarikurkcu, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia* **82**, 237–246.
- Van Wyk, B.E., Wink, M. (2017) Medicinal Plants of The World, Timber Press, Inc., Portland, Oregon, SAD, 408-409.

- Vandjelovic, N., Zhu, H., Misra, H.P., Zimmerman, R.P., Jia, Z., Li, Y. (2012) EPR studies on hydroxyl radical-scavenging activities of pravastatin and fluvastatin. *Mol. Cell. Biochem.* **364**, 71-77.
- Verreault, D., Rousseau, G. M., Gendron, L., Massé, D., Moineau, S., Duchaine, C. (2010) Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.* **44**, 197-201.
- Vujanović, M., Zengin, G., Đurović, S., Mašković, P., Cvetanović, A., Radojković, M. (2019) Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula, *South African Journal of Botany.* **120**, 213-218.
- Vukovic, N., Milosevic, T., Sukdolak, S., Solujic, S. (2007) Antimicrobial Activities of Essential Oil and Methanol Extract of *Teucrium montanum*. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **4**, 17-20.
- Wong, I. Y., He, Z. D., Huang, Y., Chen, Z. Y. (2001). Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3113–3119.
- Wu, L., Georgiev, M. I., Cao, H., Nahar, L., El-Seedi, H. R., Sarker, S. D., Xiao, J., Lu, B. (2020). Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med. Res. Rev.* **40**, 2605–2649.
- Xia, J. i sur. (2013) Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discov. Ther.* **7**, 1–8.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* **111**, 5944–5972.
- Yuan, Q., Xie, F., Huang, W., Hu, M., Yan, Q., Chen, Z., Zheng, Y., Liu, L. (2022). The review of alpha-linolenic acid: Sources, metabolism, and pharmacology. *Phytother. Res.* **36**, 164–188.
- Zhang, D., Lu, C., Yu, Z., Wang, X., Yan, L., Zhang, J., Li, H., Wang, J., Wen, A. (2017). Echinacoside Alleviates UVB Irradiation-Mediated Skin Damage via Inhibition of Oxidative Stress, DNA Damage, and Apoptosis. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, 6851464.

9. SAŽETAK

Petra Petek, Andrea Petrinić

Istraživanje antioksidacijskog i bakteriostatičkog učinka vodenog ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive (*Teucrium montanum*)

Mnoge biljne vrste, odnosno njihovi pripravci, upotrebljavaju za liječenje i prevenciju mnogih bolesti i mentalnog zdravlja stoljećima. Do spoznaje o njihovom djelovanju dolazilo se iskustveno, no za veliki broj biološki aktivnih spojeva iz biljaka nije poznat točan mehanizam djelovanja niti uvjeti pod kojima može doći do neželjenih učinaka. Ekstrakti biljaka iz porodice *Lamiaceae* poznati su upravo po bogatom sastavu različitih biološki aktivnih spojeva. Glavnu biološki aktivnih tvari trave ive čine polifenolni spojevi, od kojih su među najzastupljenijima verbaskozid i ehinakozid. Cilj ovog rada je ispitati prooksidacijski, odnosno antioksidacijski učinak aktivnih tvari iz ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive na modelnim makromolekulama, citotoksični i prooksidacijski, odnosno antioksidacijski učinak na kontinuiranim humanim staničnim linijama, kao i citotoksični, odnosno proliferativni učinak na predstavnicima humane mikroflore. Najviša istraživana koncentracija vodenog ekstrakta i izoliranih frakcija trave ive statistički značajno smanjuje prooksidacijsko oštećenje modelne DNA molekule, no ne sprečava karbonilaciju proteina pri dnevno preporučenim dozama. Protektivni učinak na nezasićene veze linoleinske kiseline raste porastom koncentracije istraživanih tvari s puno većim antioksidacijskim učinkom ekstrakta u odnosu na izolirane frakcije. Istraživani uzorci nisu djelovali citotoksično pri dnevno preporučenim koncentracijama. Dokazan je antioksidacijski učinak nakon produljenog tretmana na svim staničnim linijama. Ekstrakt trave ive i izolirane frakcije trave ive bile su toksične za bakterije *E. coli* i *S. aureus*. Ekstrakt trave ive i izolirane frakcije pri dnevno preporučenim koncentracijama djeluju proliferativno na *L. plantarum* dok veće koncentracije imaju izrazito toksičan učinak.

Ključne riječi: trava iva, makromolekule, kontinuirane humane stanične linije, bakterije, polifenoli

10. SUMMARY

Petra Petek, Andrea Petrinić

Examination of antioxidant and bacteriostatic effect of aqueous extract and isolated fractions of mountain germander (*Teucrium montanum*)

Many plant species, or their preparations, have been used to treat and prevent many diseases and mental health for centuries. Their effects have been known empirically, but for a large number of biologically active compounds from plants, the exact mechanism of action and the conditions under which side effects can occur are not known. Extracts of plants from the *Lamiaceae* family are known for their rich composition of various biologically active compounds. The majority of biologically active substances of mountain germander are polyphenolic compounds, of which verbascoside and echinacoside are among the most common. The aim of this study was to investigate the prooxidative or antioxidant effect of active substances from mountain germander extract and isolated fractions on model macromolecules, cytotoxic and prooxidative and antioxidant effect on continuous human cell lines, as well as cytotoxic and proliferative effect on pathogenic bacteria and probiotic bacteria. The highest investigated concentration of aqueous extract and isolated fractions of mountain germander statistically significantly reduced prooxidative damage of the model DNA molecule, but did not prevent protein carbonylation at the daily recommended doses. The protective effect on unsaturated linoleic acid bonds increases with increasing concentration of test substances with a much higher antioxidant effect of the extract compared to the isolated fractions. The studied samples were not cytotoxic at the daily recommended concentrations. An antioxidant effect has been demonstrated after prolonged treatment on all cell lines. The mountain germander extract and isolated fractions of mountain germander were toxic to *E. coli* and *S. aureus*. The mountain germander extract and isolated fractions at daily recommended concentrations have a proliferative effect on *L. plantarum*, while higher concentrations have a markedly toxic effect.

Key words: mountain germander, macromolecules, continuous human cell lines, bacteria, polyphenols

PRILOG

Većina analiza osnovnog kemijskog sastava (udjel osnovnih makrokomponentata) trave ive provedena je prema standardnim AOAC (Association of Analytical Communities) metodama, a uključivala je određivanje udjela: (i) suhe tvari- gravimetrijski, sušenjem pri 105 °C do konstantne mase (AOAC 930.15; Padmore (1990a)); (ii) proteina- poluautomatiziranom metodom po Kjeldahlu (AOAC 976.05; Padmore (1990b)); (iii) lipidne frakcije- gravimetrijski nakon ekstrakcije u aparaturi po Soxhletu (AOAC 920.39; Padmore (1990c)); (iv) mineralnog ostatka- gravimetrijski nakon suhog spaljivanja (AOAC 942.05; Padmore (1990d)) te (v) topljivih i netopljivih, odnosno ukupnih vlakana velike molekulske mase- enzimsko-gravimetrijskom integriranom metodom (AOAC 2011.25; McCleary i sur. (2012)). Sastav makro- i mikroelemenata prisutnih u biljkama analiziran je atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) prema metodi Vihnanek Lazarus i suradnika (2013). Sakupljenim lipidnim frakcijama je dodatno analiziran sastav i zastupljenost masnih kiselina prevođenjem u metilne estere prema standardnoj metodi HRN EN ISO 12966-2:2017. Korišten je plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network uz plameno-ionizacijski detektor (Agilent, Santa Clara, SAD). Korištena je kapilarna kolona DB-23 (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Protok helija kao plina nosioca iznosio je 1,5 mL min⁻¹, uz split 60:1. Temperatura injektora postavljena je na 250 °C, a temperatura detektora na 280 °C. Temperatura pećnice je programirana da raste 7 °C min⁻¹ od 60 °C do 220 °C uz zadržavanje na maksimalnoj temperaturi od 17 minuta.

Tablica 7. Osnovni kemijski sastav trave ive u analiziranom uzorku

	Uzorak trave ive
Suha tvar (%)	91,14±0,1
Proteini (% s.tv.)	7,50±0,2
Lipidi (% s.tv.)	1,71±0,2
Ukupna vlakna (% s.tv.)	60,35±0,5
Netopljiva (% s.tv.)	53,97±0,5
Topljiva (% s.tv.)	6,38±0,5
Mineralni ostatak (% s.tv.)	6,68±0,1

Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti 3 paralelna mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

GC analizom utvrđen je kvalitativan i kvantitativan profil masnih kiselina u ekstrahiranoj lipidnoj frakciji trave ive, kako je prikazano u Tablici 6, izraženo kao relativni omjer identificiranih masnih kiselina.

Tablica 8. Relativni udjel identificiranih masnih kiselina u lipidnim frakcijama uzorka trave ive

Masna kiselina (%)	Uzorak trave ive
Palmitinska (C16:0)	8,83±2,2
Oleinska (C18:1c)	7,88±2,2
Linolna (C18:2c)	17,29±4,0
α-linolenska (C18:3n3)	15,40±4,2
Arahidonska (C20:0)	7,51±2,5
Beheninska (C22:00)	12,04±9,7

Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti 3 paralelna mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 9. Sastav makroelemenata u ispitivanom uzorku trave ive

Makroelementi	Udjel (mg/kg s.tv.¹)
Na	46±4
Mg	1291±162
K	9588±438
Ca	11060±165
Fe	275±64
P	745±16

Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti 3 paralelna mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

¹s.tv.-suha tvar uzorka

Tablica 10. Sastav mikroelemenata u ispitivanom uzorku trave ive

	Udjel (µg/g s.tv.1)		Udjel (µg/g s.tv.1)
V	878±172	As	95±22,5
Mn	33±3,2	Mo	384±29,0
Cr	2608±435	Se	30±1,7
Co	225±36,6	Sn	71±12,2
Ni	615±158	Sb	15±2,8
Cu	6128±147	Hg	7,8±0,7
Zn	28±0,5	Ti	11,6±1,3
Al	277±20	Pb	314±6

Prikazane vrijednosti su srednje vrijednosti 3 paralelna mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

¹s.tv.-suha tvar uzorka

