

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Dora Anić, Barbara Komar i Mirela Šalov

**VREDNOVANJE EKSTRAKTA KOMINE MASLINE KAO
NUTRITIVNOG IZVORA HIDROKSITIROSOLA I
NJEGOVIH DERIVATA**

Zagreb, godina 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za kemiju prehrane pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

KRATICE

ACN – acetonitril

DMEM – Doulbecov minimalni esencijalni medij

FBS – fetalni goveđi serum

FC – Folin-Ciocalteu

GAE – ekvivalenti galne kiseline

HBSS – Hankova puferirana otopina soli

HDL – lipoproteini visoke gustoće

HPLC-DAD – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorima diodnog niza

LDL – lipoproteini niske gustoće

NEAA – neesencijalne aminokiseline

OPE – suhi ekstrakt komine masline

SGF – otopina gastrične faze

SIF – otopina intestinalne faze

SSF – otopina salivarne faze

SADRŽAJ:

1. UVOD

1.1. Zdravstveni učinci maslinovog ulja – važnost polifenola

1.2. Bioraspoloživost polifenola

1.2.1. Metode za određivanje bioraspoloživosti

1.2.2. Bioraspoloživost polifenola masline

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci: ulje, matrice hrane i priprema ekstrakta komine masline

3.1.2. Instrumenti i uređaji

3.1.3. Kemikalije i reagensi

3.1.4. Pufferi i otopine

3.1.5. Stanične linije

3.1.6. Reagensi i pribor za uzgoj staničnih linija

3.2. METODE

3.2.1. Simulacija gastrointestinalne digestije (INFOGEST)

3.2.1.1. Salivarna faza

3.2.1.2. Gastrična faza

3.2.1.3. Intestinalna faza

3.2.2. Simulacija sa matricama hrane

3.2.3. Određivanje redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

3.2.4. Određivanje tirosola i hidroksitirosola visokorazdjelnom tekućinskom kromatografijom HPLC-DAD

3.2.5. Određivanje bioraspoloživosti primjenom Caco-2 staničnog modela

3.2.5.1. Uzgoj staničnih kultura

3.2.5.2. Pokus permeabilnosti

3.2.5.3. Istraživanje viabilnosti stanica

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Usporedba polifenolnog sastava maslinovog ulja i ekstrakta komine masline (OPE)

4.2. Bioraspoloživost polifenola OPE

4.3. Interakcije polifenola OPE s komponentama hrane

4.4. Permeabilnost hidroksitirosola i tirosola iz OPE na Caco-2 staničnom monosloju

5. ZAKLJUČCI

6. POPIS LITERATURE

7. SAŽETAK

8. SUMMARY

1. UVOD

1.1. Zdravstveni učinci maslinovog ulja – važnost polifenola

Maslinovo ulje je najkorištenija masnoća u mediteranskoj prehrani te se povezuje sa smanjenim mortalitetom zbog manje pojave kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma te neurodegenerativnih bolesti. Pozitivan učinak na zdravlje je dokazano brojnim istraživanjima te se zna da utječe na povećanje HDL kolesterola i poboljšanje funkcionalnosti HDL lipoproteina, smanjenje oksidativne degradacije lipida, smanjivanje upale, poboljšanje endotelne funkcije te smanjenje sistoličkog krvnog tlaka (*Covas i sur., 2015*).

Razlikujemo ekstra djevičansko maslinovo ulje koje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja, djevičansko maslinovo ulje koje sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina, maslinovo ulje koje nastaje miješanjem djevičanskog i rafiniranog ulja te komina maslinovo ulje (*Covas i sur., 2015*).

Najzastupljenije komponente maslinovog ulja su masne kiseline: mononezasićene (55-83%), polinezasićene (4-20%) te zasićene masne kiseline (8-14%). Manje zastupljene komponente su podijeljene na neosapunjivu (nepolarnu) frakciju koja se sastoji od skvalena i ostalih triterpena, sterola, tokoferola i pigmenata te polarnu frakciju koja sadrži polifenolne spojeve. Koncentracija manje zastupljenih komponenti ovisi o kultivaru, klimi, zrelosti masline pri berbi te načinu proizvodnje maslinovog ulja (*Covas i sur., 2015*).

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji se povezuju sa brojnim pozitivnim učincima na zdravlje zbog svojih antioksidacijskih i protuupalnih svojstva. Također pomažu kod zacjeljivanja rana i u radu probavnog sustava, djeluju protiv dijabetesa, osteoporoze, raka srčanih i neuroloških bolesti. Polifenoli pronađeni u maslinovom ulju su fenolni alkoholi, hidrokstitirosol, tirosol, oleuropein i oleokantal (*Ray i sur.,2019*). Potvrdu važnosti polifenola u prehrani pokazuje i činjenica da je

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) odobrila zdravstvenu tvrdnju koja glasi „polifenoli iz maslinovog ulja pridonose zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa“. Ova tvrdnja odnosi se samo na maslinovo ulje koje osigurava barem 5 miligrama polifenola (hidroksitirosola i njegovih derivata) u 20 grama maslinovog ulja. Što znači da, kako bismo mogli govoriti o povoljnom učinku, potrebno je uzimati 20 grama maslinovog ulja dnevno. Ova koncentracija odgovara minimalnoj koncentraciji ukupnog broja fenola u ekstra djevičanskom ulju ne manjoj od 300-350mg/kg. Ukupna koncentracija fenola u ekstra djevičanskim uljima dostupnim u trgovinama varira od 40 do 1000mg/kg (*Roselli i sur.,2017*).

Proizvodnjom maslinovog ulja nastaje velika količina otpada i nusprodukata. Najvažniji nusprodukti sa velikom nutritivnom vrijednošću su komina i list masline. Njihovi ekstrakti su valjani alternativni izvori polifenola masline. Djevičansko maslinovo ulje dobiva se isključivo mehaničkim tehnikama gnječenja i tiješnjenja zrelih plodova masline nakon čega ostaje komina masline sastavljena od kože, pulpe i koštica maslina. Kemijski gledano, glavne komponente komine masline su polisaharidi, proteini, masne kiseline, pigmenti i polifenoli. Ekstrakcijom komine možemo dobiti vrijedne supstance, a koncentracija antioksidansa u komini može čak i nadmašiti koncentraciju antioksidansa u maslinovom ulju. Komina masline je bogata hidroksitirosolom, ali sadrži i značajnu količinu oleuropeina, tirosola, kofeinske kiseline, kumarinske kiseline, vanilinske kiseline, verbaskozida, elenolne kiseline, katehola i rutina.

U listu masline najobilnija fenolna komponenta je oleuropein nakon kojeg slijedi hidroksitirosol (*Nunes i sur.,2016*).

1.2. Bioraspoloživost polifenola

Ukoliko neki spoj pokazuje jako antioksidacijsko ili bilo koje drugo biološko svojstvo *in vitro*, to ne znači da će imati značajan učinak *in vivo*. Naime, zbog niske bioraspoloživosti (male topljivosti, niske permeabilnosti, vrlo učinkovitih efluksnih transportera ili značajne metaboličke pregradnje), velik broj prirodnih spojeva u vrlo malom postotku dopire do ciljnog mjesta djelovanja. Stoga oni polifenoli koji su u najvećoj mjeri prisutni u hrani ne moraju nužno imati i najveću bioraspoloživost. Zbog toga je iznimno važno znati, ne samo udio nutrijenata u hrani i dodacima prehrani, nego i njihovu bioraspoloživost (*D'Archivo i sur.,2010*).

Bioraspoloživost se definira kao frakcija nutrijenta (ksenobiotika) koji je dospio do sistemske cirkulacije i ciljnog mjesta gdje može ispoljiti svoj biološki učinak. Čimbenici koji utječu na bioraspoloživost polifenola direktno ili smanjenjem udjela polifenola u hrani su: vanjski čimbenici (npr. izloženost suncu, kiša), kuhanje i metode pripreme hrane, skladištenje hrane, utjecaj ostalih namirnica u probavnom sustavu, vezanje na proteine plazme, kemijska struktura, bakterijska mikroflora, sistemski čimbenici (spol, dob, genetika, prisutnost nekih bolesti...) (*D'Archivo i sur.,2010*).

Obzirom da su polifenoli prirodno inkorporirani u određene namirnice, a u organizam ih uglavnom unosimo kao dio obroka, zajedno s ostalim sastavnicama, na njihovu bioraspoloživost značajno utječu interakcije sa ostalim nutrijentima, prvenstveno sa lipidima, proteinima i ugljikohidratima. Studije koje su do sada rađene pokazuju kako pozitivan, tako i negativan utjecaj tih interakcija na bioraspoloživost polifenola. Do pozitivnog utjecaja dolazi kada nastaju kompleksi kojima se polifenoli štite od oksidacije prolaskom kroz probavni trakt (*Jakobek, 2014*).

1.2.1. Metode za određivanje bioraspoloživosti

1.2.2. *In vitro* metode koje simuliraju probavu se uvelike koriste u istraživanjima bioraspoloživosti komponenata hrane i lijekova. Iako se istraživanja na ljudima smatraju zlatnim standardom, kada je riječ o prehrani, *in vitro* metode imaju svoje prednosti. One su brže i jeftinije, jednostavnije te ne postoje etička ograničenja. Takav pristup omogućuje usporedno ispitivanje velikog broja uzoraka. Kontrolirani uvjeti te jednostavno uzorkovanje čine *in vitro* metode odgovarajućim izborom za mehaničke studije i postavljanje hipoteza. Metode simulacije procesa probave uobičajeno uključuju oralnu, gastičnu te intestinalnu fazu. Te metode oponašaju fiziološke uvjete *in vivo* uzimajući u obzir prisutnost probavnih enzima i njihovu koncentraciju, pH, vrijeme digestije koncentraciju soli te ostale faktore. Neki računalno sofisticirani modeli kao Nizozemski TNO gastrointestinalni model, model Engleskog instituta za istraživanje hrane ili Francuski INRA omogućavaju dinamičku simulaciju prijenosom probavljenog obroka, promjenom koncentracije enzima i pH tijekom vremena. (Minekus i sur., 2014). Nizozemski TNO gastrointestinalni model sastoji se od dvije računalno kontrolirane komore od kojih je jedna podijeljena na 4 odjeljka oponašajući želudac, duodenum, jejunum te ileum, a druga komora oponaša debelo crijevo. U svakom odjeljku se podešava pH i koncentracija probavnih sokova prema dostupnim fiziološkim podacima (Etcheverry i sur., 2012). Međutim, većina modela korištenih u studijama, kao i oni korišteni u ovom istraživanju, su statični modeli. Takvi modeli koriste stalni omjer matrice, enzima, soli, žučnih kiselina i ostalog u svakoj fazi digestije. (Minekus i sur., 2014). Iako su mnoge *in vitro* metode razvijene iz već poznatih, postoje značajne razlike između metoda opisanih u literaturi o upotrebi parametara koji oponašaju

fiziološke uvjete. Zbog toga je teško uspoređivati rezultate te je osnovana internacionalna mreža INFOGEST koja okuplja znanstvenike s ciljem utvrđivanja standarda za simuliranu probavu (*Minekus i sur., 2014*). Apsorpcija većine hranjivih tvari događa se u tankom crijevu različitim mehanizmima transporta. Stijenku tankog crijeva čine četiri sloja povezana vezivnim tkivom, živčanim i vaskularnim komponentama: mukoza, submukoza, mišićni sloj i seroza. Prvi sloj u dodiru sa intestinalnim lumenom koji odvaja lumen od lamine proprije je epitel. Crijevni epitel prekriven mješavinom vode, sluzi i glikokaliksa propustan je za hranjive tvari, vodu i male molekule. Obzirom da statični *in vitro* modeli ne prikazuju kompleksnost prijenosa u tankom crijevu, već su pogodni za utvrđivanje gastrointestinalne stabilnosti, odnosno određivanja biodostupne frakcije, često se kombiniraju sa staničnim modelima četkaste prevlake. U tu svrhu najčešće se koristi Caco-2 stanična linija koja je izolirana iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma te se koristi u predviđanju apsorpcije u tankom crijevu (*Pereira i sur., 2016*).

U ranim fazama rasta Caco-2 stanice ostaju neidentificirane sa samo nekoliko mikrovila. Po određenim uvjetima diferencijacijom nastaje polarizirani monosloj stanica učvršćen uskim spojevima („tight junction“) te brojnim mikrovilima na apikalnoj strani. Unatoč tome što potječu od debelog crijeva, Caco-2 stanice imaju većinu morfoloških i funkcionalnih svojstva stanica tankog crijeva uključujući enzime disaharidazu i peptidazu te eksprimirane transportere karakteristične za enterocite (*Pereira i sur., 2016*).

1.2.2. Bioraspoloživost polifenola masline

In vivo istraživanja na životinjama i ljudima pokazala su da se polifenoli iz maslinovog ulja dobro apsorbiraju u tankom crijevu. Tirosol i hidroksitirosol

apsorbiraju se ovisno o primijenjenoj dozi maslinovog ulja. Kod unosa umjerenih doza (25mL/dan), čak 98% polifenola prisutno je u plazmi i urinu u konjugiranom obliku što ukazuje na intezivan metabolizam prvog prolaska kroz jetru. *In vitro* istraživanja gastričke i digestije tankog crijeva polifenola u maslinovom ulju pokazala su dobru stabilnost u gastričkoj fazi te lošu stabilnost u fazi digestije tankog crijeva (*Soler i sur., 2009*).

Nisu rađena istraživanja biorasploživosti polifenola u komini masline kao alternativnom izvoru polifenola te se time bavimo u ovom radu.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada je dati uvid u mogućnosti korištenja komine masline kao sirovine za razvoj proizvoda dodane vrijednosti. Ekstrakt komine masline će se vrednovati kao izvor polifenola karakterističnih za maslinovo ulje: hidroksitirosola i njegovih derivata, odnosno kao alternativa maslinovom ulju (u smislu sadržaja antioksidansa). Stoga su specifični ciljevi ovog rada:

- Odrediti udio polifenola, hidroksitirosola i tirosola u OPE i maslinovom ulju
- Istražiti njihovu gastrointestinalnu stabilnost i biodostupnost
- Istražiti interakcije OPE s hranom, tj odrediti utjecaj različitih namirnica na njihovu biodostupnost
- Istražiti permeabilnost hidroksitirosola i tirosola na Caco-2 staničnom modelu

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci: ulje, matrice hrane i priprema ekstrakta komine masline

Za izradu uzoraka korištene su sljedeće sirovine:

- liofilizirani ekstrakti komine masline (*Olea europea sativa* L. Oleaceae)
- maslinovo ulje

Priprema ekstrakta komine masline:

Ekstrakti komine masline (iz 2016. g.) pripremljeni su maceracijom (8 g komine + 400 mL 60 % EtOH) 2 h, 70 °C. Nakon uparavanja i uklanjanja etanola u rotavaporu, uzorci su liofilizirani i korišteni za daljnja istraživanja. U pokus ide 200 mg OPE+1800 uL vode

Priprema uzoraka maslinovog ulja:

Prije simulacije digestije, maslinovo ulje se razrijeđuje sa vodom u omjeru 1:10 i sonicira prije svakog koraka (200 uL maslinovog ulja+1800 uL vode).

Za izradu matrica hrane korištene su sljedeće sirovine:

- celulozna vlakna
- pektinska vlakna
- inulinska vlakna
- tuna (usitnjena, iz konzerve)
- vrhnje (kiselo, 12% m.m.)
- mlijeko (svježe, 3,2 % m.m.)
- jogurt (tekući, 2,8 % m.m.)
- sir svježi

- mesni umak
- jabuka (naribana, bez kore)
- banana (usitnjena)
- soja
- žitarice za doručak
- blitva
- kruh
- krumpir
- med

3.1.2. Instrumenti i uređaji

- Analitička vaga, AB265-S, Metler Toledo, Indija
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan
- Termostat, Inko, Zagreb, Hrvatska
- UV-VIS spektrometar UV 4-100, ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija
- pH-metar sa kombiniranom staklenom elektrodom, Metrohm, Herisau, Švicarska
- destilacijska jedinica B-324, Büchi Kjeldahl sistem, Büchi Labortechnik AG, Glawil, Švicarska
- Mjerač otpora, Millipore, USA
- Invertni mikroskop, Olympus, Japan
- Kabinet za rad u čistom HS12, klasa II, Heraeus, Njemačka
- Viale 1,5 mL (LLG Labware)
- Filteri za pripremu uzoraka (PES syringe filter, promjer pora: 0,45 µm)
- Šprice
- Eppendorf epruvete od 2 mL za uzorke

- Falcon kivete
- mikropipete

3.1.3. Kemikalije i reagensi

- Pepsin (iz svinjske gastrične mukoze) 0.7 FIP-U/mg, Merck, Damstadt, Njemačka
- Pankreatin (iz svinjskog pankreasa), 4×USP, Sigma, St. Luis, USA
- Žučne soli, Sigma, St. Luis, USA
- Termostabilna α -amilaza, A3306, Sigma, St. Luis, USA
- Natrijev hidroksid, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Kloridna kiselina, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev klorid, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenkarbonat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Magnezijev klorid, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Amonijev hidrogenkarbonat, puriss., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Kalcijev klorid, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Etanol, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens, Fluka, Buchs, Švicarska
- Diamino-2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), Sigma, St. Luis, USA
- Kalijev persulfat, p.a., Sigma, St. Luis, USA
- Acetonitril (CH₃CN); HPLC stupnja čistoće, $\geq 99,93$ %, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Metanol (CH₃OH); HPLC stupnja čistoće, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, Missouri, USA

- Octena kiselina p.a., C₂H₄O₂ (konc. 99,5%), Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrij-acetat CH₃COONa PhEur, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Ultračista voda za HPLC (miliQ H₂O)

3.1.4. Pufferi i otopine

SSF otopina (Simulated Salivary Fluid)

Za pripremu otopine salivarne faze potrebno je otpipetirati 7,55 mL kalijevog klorida, 1,85 mL kalijevog dihidrogenfosfata, 3,4 mL natrijevog hidrogenfosfata, 0,25 mL magnezijevog klorida heksahidrata i 0,03 mL amonijevog hidrogenkarbonata u odmjernu tikvicu od 200 mL, te istu nadopuniti do oznake s destiliranom vodom (1,25 x koncentrat). Potrebno je provjeriti pH i podesiti na 7. Za podešavanje pH je bilo potrebno oko 555 µL 1 M HCl-a. Otopinu je do pokusa potrebno pohraniti na -20°C.

SGF otopina (Simulated Gastric Fluid)

Prilikom pripreme otopine gastične faze potrebno je otpipetirati 3,455 mL kalijevog klorida, 0,45 mL kalijevog dihidrogenfosfata, 6,25 mL natrijevog hidrogenfosfata, 5,9 mL natrijevog klorida, 0,2 mL magnezijevog klorida heksahidrata i 0,25 mL amonijevog hidrogenkarbonata u odmjernu tikvicu od 200 mL. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake s destiliranom vodom (1,25 x koncentrat), provjeri pH i isti podesi na 3. (Za podešavanje pH je bilo potrebno oko 6,3 mL 1 M HCl-a). Otopina se do pokusa pohrani na -20°C.

SIF otopina (Simulated Intestinal Fluid)

Za pripremu otopine intestinalne faze potrebno je otpipetirati 3,4 mL kalijeveg klorida, 0,4 mL kalijeveg dihidrogenfosfata, 21,25 mL natrijevog hidrogenfosfata, 4,8 mL natrijevog klorida i 0,55 mL magnezijevog klorida heksahidrata u odmjernu tikvicu od 200 mL te istu nadopuniti do oznake s destiliranom vodom (1,25 x koncentrat). Potrebno je provjeriti pH te isti podesiti na 7. (Za podešavanje pH je bilo potrebno oko 6,3 mL 1 M HCl-a). Otopina se do pokusa pohranjuje na -20°C.

Tablica 1. Priprema SSF, SGF i SIF otopina na izračun volumena od 200 mL destilirane vode.

	SSF	SGF	SIF
	pH 7	pH 3	pH 7
Stock otopina	V/mL	V/mL	V/mL
KCl	7,55	3,455	3,4
KH ₂ PO ₄	1,85	0,45	0,4
NaHCO ₃	3,4	6,25	21,25
NaCl	-	5,9	4,8
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,25	0,2	0,55
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,03	0,25	-
Podešavanje pH	V/mL	V/mL	V/mL
1 M NaOH	-	-	-
1 M HCl	0,045	0,65	0,35

Priprema otopina enzima:

Otopina pepsin dobije se vaganjem 50 mg pepsina i otapanjem u 1 mL SGF otopine (25000 U mL⁻¹).

Pankreatin otopine priprema se vaganjem 8 mg pankreatina i otapanjem u 1 mL SIF otopine (800 U mL⁻¹).

Otopina žučnih soli priprema se vaganjem 65,37 mg žučnih soli u 1 mL vode.

Acetatni pufer:

Za pripremu mobilne faze u HPLC metodi potrebno je pripremiti octenu kiselinu (0,1 M) pomoću 5,75 mL koncentrirane octene kiseline i nadopune do 1 L u odmjerne tikvici od 1 L s ultračistom vodom). Za pripremu 1 L natrijevog acetat (0,1 M) koristi se otopina 8,2 g natrijevog acetata u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici. Za pripremu pufera potrebno je pomiješati 1 L otopine natrijevog-acetata (0,1 M) i 0,5 L octene kiseline (0,1 M) te izmjeriti pH pufera pH-metrom i podesiti pH na 5 pomoću kiseline ili natrijevog acetata.

3.1.5. Stanične linije

- Caco-2 stanice dobivene su od Europskog Fonda za kulture stanica (ECACC 86010202)

3.1.6. Reagensi i pribor za uzgoj staničnih linija

- D-(+)- glukoza, Sigma, St. Luis, USA
- Dulbecco's modified Eagle Medium (D-MEM), Gibco, USA
- Foetal bovine serum (FBS), Gibco, USA
- GlutaMAX™-I Supplement, Gibco, USA

- MEM neesencijalne aminokiseline, Gibco, USA
- Penicilin-streptomycin, Gibco, USA
- Tripsin-EDTA, Gibco, USA
- HEPES (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetansulfonska kiselina), Gibco USA
- EDTA (etilen-diamino-tetraoctena kiselina), Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- PBS (phosphate buffered saline), Gibco USA
- HBSS (Hank's buffered saline), Gibco USA
- Costar® ploče sa 6 jažica za uzgoj staničnih kultura, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Transwell® polikarbonantni membranski inserti, promjer 24 mm, veličina pora 0.4 μm, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Tikvice za uzgoj stanica, 75 mL, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Strugalice za stanice, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Sterilne kivete za centrifugu, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Sterilne pipete, graduirane
- krioviali, Sigma-Aldrich, Missouri, USA

3.1.7. Programski paketi

- Microsoft®Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, USA)
- Statistica ver. 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA)
- GrafPad Prism ver 3.02 (GrafPad Software, USA)

3.2. METODE

3.2.1. Simulacija gastrointestinalne digestije (INFOGEST)

Sve kemikalije i reagense je prije upotrebe potrebno zagrijati na 37 °C.

3.2.1.1. Salivarna faza (2 min, 37 °C)

U Falcon kivetu od 50 mL potrebno je izvagati oko 600 mg uzorka hrane i 200 mg ekstrakta komine masline. Svaki uzorak s hranom i ekstraktom se radi u duplikatu. Kao slijepa proba izvaže se 600 mg uzorka hrane, a za svaki uzorak hranepotrebno je pripremiti slijepu probu. Daljnja analiza se radi prema uputama kao i za uzorak hrane i ekstrakt. Također je potrebno pripremiti i slijepu probu koja ne sadrži uzorak hrane i ekstrakt komine (slijepu probu samo s enzimima) te slijepu probu koja sadrži samo 200 mg komine masline. Slijepe probe za svaki uzorak hrane, slijepe probe samo sa enzimima te slijepe probe komine se također rade u duplikatu. Izvaganom uzorku hrane i ekstrakta (kao i izvaganom uzorku za slijepu probu, te ostale slijepe probe) otpipetira se 0,875 mL SSF otopine (simulirana salivarna otopina-Simulated Salivary Fluid) te je sve potrebno dobro homogenizirati. Zatim se otpipetira 0,125 mL otopine salivarne α -amilaze, pripremljene u SSF otopini (1500 U mL⁻¹), 6,25 μ L 0,3 M kalcijevog klorida te 243,8 μ L vode. Falcon kivete je potrebno dobro zatvoriti parafilmom te inkubirati na 37 °C 2 minute u vodenoj kupelji uz stalno miješanje.

3.2.1.2. Gastrična faza (2 h, 37 °C)

U Falcon kivetu od 50 mL otpipetira se volumen od 2,5 mL otopine dobivene nakon salivarne faze, te se otpipetira i 1,875 mL SGF otopine (simulirana gastrična otopina-Simulated Gastric Fluid), 0,4 mL pepsina otopljenog u SGF

otopini (25 000 U mL⁻¹), 1,25 µL 0,3 M kalcijevog klorida te 0,05 mL 1 M kloridne kiseline. Zatim je potrebno provjeriti pH, isti podesiti na 3, te otopini otpipetirati 0,174 mL vode. Falcon kivete je potrebno dobro zatvoriti parafilmom i sadržaj homogenizirati te inkubirati 2 sata na 37 °C u vodenoj kupelji uz stalno miješanje. Tijekom inkubacije potrebno je provjeriti pH i po potrebi isti podesiti na 3. pH se podešava pomoću pH tester papira.

3.2.1.3. Intestinalna faza (2 h, 37 °C)

U Falcon kivetu od 50 mL potrebno je otpipetirati 19ellet od 5 mL otopine dobivene nakon gastrične faze, te otpipetirati 2,75 mL SIF otopine (simulirana intestinalna otopina-Simulated Intestinal Fluid), 1,25 mL pankreatina otopljenog u SIF otopini (800 U mL⁻¹), 0,625 mL žučnih soli (160 mM), 10 µL 0,3 M kalcijevog klorida, te 0,0375 mL 1 M natrijevog hidroksida. Potrebno je provjeriti pH i podesiti ga na 7 te na kraju otpipetirati 0,328 mL vode.. Za podešavanje pH koristi se otopina 1 M natrijevog hidroksida i 6 M kloridna kiselina. Falcon kivete je potrebno dobro zatvoriti parafilmom i sadržaj homogenizirati te inkubirati 2 sata na 37 °C u vodenoj kupelji uz stalno miješanje. Tijekom inkubacije potrebno je provjeriti pH i po potrebi isti podesiti na 7. pH se podešava pomoću pH tester papira.

Uzorke je nakon simulirane digestije potrebno centrifugirati 5 minuta, pri 4000 okretaja/ min, a uzorci jabuke, vrhnja, 19ellet, krumpira, umaka i blitve su prije centrifugiranja profiltrirani kroz naborani filter papir. Postupak centrifugiranja potrebno je ponoviti 2 puta. Supernatant je potrebno otpipetirati u Falcon kivetu od 15 mL, a 19ellet baciti. Alikvot supernatanta od 2 mL potrebno je profiltrirati kroz filtere od 0,45 µm u viala za HPLC (obzirom da se radi o vodenim ekstraktima koristimo PES filtere) i zamrznuti na -20°C.

3.2.2. Simulacija sa matricama hrane

Simulacija gastrointestinalne ingestije komine masline sa matricama hrane provedena je prema prethodno opisanom INFOGEST postupku, a priprema uzoraka za istraživanje interakcija s hranom opisana je u Tablici 2.

Tablica 2. Priprema uzoraka za istraživanje interakcija s hranom

Broj	Oznaka uzorka	Odvaga hrane (mg)	Odvaga komine (mg)
1	tuna 1	619,3	196,7
2	tuna 2	625,9	203,9
3	tuna SP 1	604,7	0,0
4	tuna SP 2	622,2	0,0
5	jogurt 1	610,5	195,4
6	jogurt 2	596,3	205,5
7	jogurt SP 1	644,3	0,0
8	jogurt SP 2	601,6	0,0
9	vrhnje 1	600,1	200,8
10	vrhnje 2	611,4	200,2
11	vrhnje SP 1	616,0	0,0
12	vrhnje SP 2	590,3	0,0
13	mlijeko 1	577,3	200,1
14	mlijeko 2	647,9	204,4
15	mlijeko SP 1	590,5	0,0
16	mlijeko SP 2	597,1	0,0
17	jabuka 1	594,7	201,3
18	jabuka 2	601,5	206,6
19	jabuka SP 1	606,1	0,0
20	jabuka SP 2	605,6	0,0
21	banana 1	595,7	201,7
22	banana 2	595,0	205,2
23	banana SP 1	596,0	0,0
24	banana SP 2	604,3	0,0
25	soja 1	563,7	202,6
26	soja 2	580,3	202,3
27	soja SP 1	586,5	0,0
28	soja SP2	607,7	0,0
29	sir 1	581,5	205,9
30	sir 2	568,9	197,6
31	sir SP1	658,5	0,0
32	sir SP2	588,8	0,0
33	žitarice 1	524,0	200,7

34	žitariće 2	546,9	198,6
35	žitariće SP1	551,5	0,0
36	žitariće SP2	598,1	0,0
37	krumpir 1	600,3	197,6
38	krumpir 2	583,0	198,9
39	krumpir SP1	609,7	0,0
40	krumpir SP2	612,4	0,0
41	blitva 1	591,9	197,8
42	blitva 2	612,5	201,8
43	blitva SP 1	552,8	0,0
44	blitva SP2	604,1	0,0
45	kruh 1	575,0	194,5
46	kruh 2	575,3	199,1
47	kruh SP 1	576,0	0,0
48	kruh SP 2	586,9	0,0
49	med 1	580,1	201,5
50	med 2	594,2	197,8
51	med SP 1	610,0	0,0
52	med SP 2	618,2	0,0
53	umak 1	610,7	200,8
54	umak 2	612,3	196,3
55	umak SP 1	609,5	0,0
56	umak SP 2	562,4	0,0
57	SP enzimi)	0,0	0,0
59	SP (komina)	0,0	201,9
60	SP (komina)	0,0	195,3

3.2.3. Određivanje redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

Za određivanje količine ukupnih fenola u ekstraktima, korištena je Folin Ciocalteu metoda (*Singleton i Rossi 1965*) modificirana prema Gao i suradnicima (*Gao i sur. 2002*). Folin-Ciocalteu metoda temelji se na prijenosu elektrona s fenola i drugih redukcijskih vrsta na molibden u alkalnom mediju, stvarajući pritom komplekse plave boje koji se mogu detektirati spektrofotometrijski na 750-765 nm. Folin Ciocalteu reagens (FC reagens) je smjesa fosfovolframata i fosfomolibdata, žute boje. Hidroksilne skupine fenolnih komponenti uzorka imaju reduktivna svojstva, stoga reduciraju fosfomolibdate i fosfovolframate iz reagensa. Tim procesom nastaju plavo obojeni W(VI) i Mo(VI)

kompleksi nepoznate strukture, a intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu fenolnih komponenti uzorka. Kao referentni standardni spoj, obično se koristi galna kiselina te se rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (GAE- Gallic Acid Equivalence). Nastali plavi kompleksi ne ovise o strukturi fenolnih spojeva pa se odbacuje mogućnost koordinacijskih kompleksa formiranih između metala i fenolnih spojeva (*Singleton i sur., 1999*).

FC reagens nije specifičan za fenolne spojeve i može biti reduciran s mnogim ne-fenolnim spojevima (npr. aromatskim aminima, sumpornim dioksidom, askorbinskom kiselinom, bakrom, željezom) te zato nije prikladan za određivanje ukupnog sadržaja fenola, osim ako su interferirajuće vrste uzete u obzir ili uklonjene (*Prior i sur., 2005; Singleton i sur., 1999*). Stoga slijedi da se Folin Ciocalteu test koristi za mjerenje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka. Folin-Ciocalteu metoda je ponovljiva, jednostavna za izvođenje i prikladna za procjenu antioksidacijskog kapaciteta budući da je postupak standardiziran, reagens komercijalno dostupan, a interferencije matriksa minimalne jer stvoreni kompleksi apsorbiraju na velikim valnim duljinama.

Za postupak mjerenja, pripremljen je Folin Ciocalteu reagens u razrijeđenju 1:1 s destiliranom vodom na dan analize. U jažice se otpipetira 100 μL adekvatno razrijeđenog uzorka ili slijepe probe i 20 μL pripremljenog FC reagensa, te se nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperature otpipetira još 100 μL natrijevog karbonata (6%). Mjeri se apsorbancija spektrofotometrijski pri 750 nm nakon inkubacije od 30 min na 50°C.

3.2.4. Određivanje tirosola i hidroksitirosola visokorazdjelnom tekućinskom kromatografijom HPLC-DAD

Pri identifikaciji i određivanju sadržaja hidroksitirosola i tirosola u suhim ekstraktima komine masline korištena je obrnuto fazna C18 kromatografska kolona

dimenzija 250x4,6 mm i veličine čestica 5 μm . Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 μL . Brzina protoka mobilne faze na početku je 0,25 mL/min te se postepeno tijekom pola sata podiže na 1 mL/min, a temperatura kolone postavljena je na sobnu temperaturu. Mobilne faze čine acetatni pufer (pH 5, podešen s octenom kiselinom) (A) i acetonitril (B). Valne duljine su: $\lambda_{\text{ex}}=280\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=316\text{ nm}$. Odjeljivanje polifenola postignuto je gradijentnom eluacijom tijekom 20 minuta, odnosno mijenjanjem sastava mobilne faze pod uvjetima prikazanim u Tablici 3.

Tablica 3. Gradijentni elucijski program kromatografske separacije hidroksitirosola i tirosola

t [min]	Brzina protoka [mL min ⁻¹]	A [%]	B [%]	Broj pikova
0	1	90	10	0
4	1	80	20	3
8	1	40	60	7
11	1	30	70	8
15	1	90	10	2
20	1	90	10	2

3.2.5. Određivanje biorasploživosti primjenom Caco-2 staničnog modela

Kultura stanica kolorektalnog karcinoma Caco-2 je stanična kultura koja se primjenjuje u istraživanju intestinalne apsorpcije zbog kompleksnog sustava transportnih proteina koji pomažu u imitaciji probavnog sustava. Caco-2 stanice spontano podliježu diferencijaciji stvarajući monosloj stanica koji eksprimira nekoliko morfoloških i funkcionalnih značajki zrelih enterocita. Pri konfluenciji formiraju polarizirane monoslojeve s tijesnim spojevima i dobro razvijenim atipičnim mikrovilima. Razvijene su naprednije metode imitacije

stanica probavnog sustava kombinacijom kokultura Caco-2 i HT29-MTX te Caco-2 i Raji B stanica čime se postiže i utjecaj mukusa na apsorpciju istraživanog uzorka (*Pereira i sur.,2016*). Primjena Caco-2 staničnog modela ne može zamijeniti uporabu in vivo istraživanja, no može značajno smanjiti potrebu za njima zbog ranije identifikacije uzoraka sa slabom mogućnošću apsorpcije.

3.2.5.1. Uzgoj staničnih kultura

Za istraživanje transporta polifenola kroz stanični monosloj korištene su stanice humanog karcinoma kolona (Caco-2 stanice) između pasaža 50 i 60. Nakon postizanja konfluentnosti (70 – 85%), stanice su rasađivane na polikarbonatne inserte (promjera 24 mm i veličine pora 0.4 μm) tako da je gustoća nasađenih stanica bila 35×10^4 po jažici. Medij za rast stanica sadržavao je FBS (10%), NEAA (1%), Glutamax (1%), penicilin-streptomycin-ampicilin (1%) i DMEM (87%), pH= 7.2 – 7.4. Rast stanica provjeravan je redovito, obzirom na boju, bistrinu i odsutnost mikroorganizama u staničnom mediju. Medij je mijenjan svaka 2 dana. Za pokuse su korištene diferencirane stanice starosti 19 – 21 dan.

3.2.5.2. Istraživanje permeabilnosti

Prije pokusa permeabilnosti stanične kulture, potrebno je izmjeriti otpor ploče i aspirirati medij. Donorski odjeljak se ispere s prethodno ugrijanim HBSS-om (37 °C) – 500 μL rasporediti u 5 jažica i aspirirati. Ploča s HBSS-om se inkubira 30 min, na 37 °C, te se tada stavi na inkubaciju i pripremljeni uzorak za pokus permeabilnosti. Potom se izmjeri otpor ploče s HBSS-om, te doda u donorski odjeljak po 0,5 mL uzorka. Ploča s uzorcima razrijeđenima s HBSS-om i HBSS-om (negativna kontrola) se stavlja na inkubaciju na 2 sata (37°C, 50 rpm) nakon što se stavi zadnji uzorak. Prilikom uzorkovanja uzima se pipetira se po 0,5 mL

uzorka iz donorskog odjeljka i 1,5 ml iz akceptorskog odjeljka. Cijelu ploču je potrebno aspirirati i isprati s po 100 μ L HBSS-a po jažici. Inkubiraju se sa svježim medijem 24 h, a vijabilnost stanica se mjeri MTT pokusom.

3.2.5.3. Istraživanje viabilnosti stanica

MTT pokus je kolorimetrijski pokus za određivanje metaboličke aktivnosti stanica. NAD(P)H-ovisne stanične oksidoreduktaze mogu u određenim okolnostima indicirati na broj živih stanica. Ti enzimi mogu reducirati tetrazolijsku boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) u netopljivi formazan.

MTT reagens se otopi u PBS-u (5 mg/mL) u falcon kivetama od 15 mL. Kada se počne pipetirati MTT na prvu ploču, počinje se mjeriti vrijeme. Ukupno vrijeme inkubacije je 3 h u inkubatoru (37 °C, 5% CO₂, 95% vlažnost), te se nakon 3 sata aspiriraju jažice. Dodaje se po 100 μ L izopropanola i otope ljubičasti kristalići formazana. Ploče se zamotaju folijom i izmjeri apsorbancija na 570 nm. Izopropanol se pipetom odbaci u organski otpad.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Usporedba polifenolnog sastava maslinovog ulja i ekstrakta komine masline (OPE)

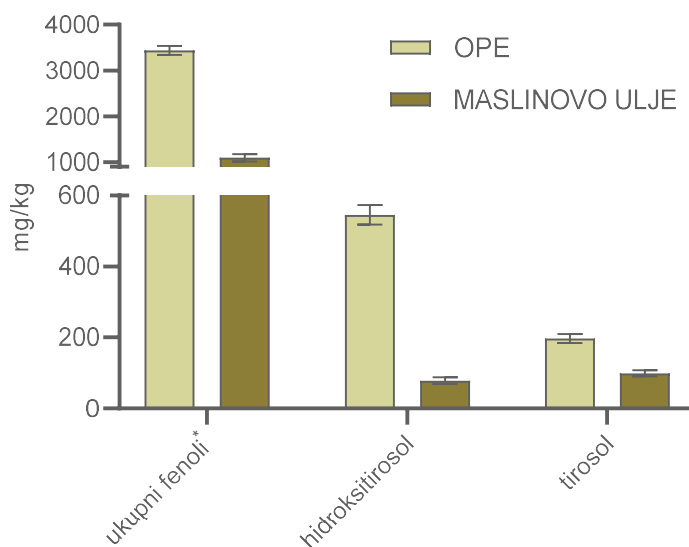
Maslinovo ulje je karakteristična i najzastupljenija masnoća u mediteranskoj prehrani te značajno pridonosi dobrobitima ovog načina prehrane u smislu smanjenih stopa mortaliteta zbog niže incidencije kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma i neurodegenerativnih bolesti (*Covas i sur., 2015*). Konzumacija maslinovog ulja dokazano utječe na sekundarne čimbenike rizika za pojavnost kroničnih nezaraznih bolesti kao što su osjetljivost na inzulin, dislipidemiju, oksidaciju lipida, upalu, endotelnu disfunkciju, zgrušavanje krvi i krvni tlak (*López-Miranda i sur., 2010*). Kako bi se ostvarili pozitivni učinci na zdravlje potrebno je zamijeniti dio masnoća u prehrani maslinovim uljem, bez ukupnog povećanja kalorijskog unosa (*USFDA, 2004*).

Karakteristične sastavnice maslinovog ulja su mononezasićene masne kiseline (primarno oleinska) kao najzastupljenije masne kiseline u maslinovom ulju, te polifenolni spojevi. Zbog karakterističnog sastava masti, prehrana temeljena na maslinovom ulju kao najvažnijoj masnoći bitno doprinosi normalizaciji $\Omega 3/\Omega 6$ omjera čime se može objasniti dio bioloških učinaka maslinovog ulja. Međutim, novija saznanja pokazuju da je za velik dio karakterističnih bioloških učinaka odgovorna upravo polifenolna frakcija maslinovog ulja (*Rigacci and Stefani, 2016*). Glavne polifenolne komponente maslinovog ulja su tirozol, hidroksitirozol i njihovi konjugirani derivati koji su djelomično bioraspoloživi te su postprandijalne koncentracije u krvi proporcionalne sadržaju tih komponenti u maslinovom ulju, a značajna akumulacija u krvi vidljiva je već nakon umjerene konzumacije maslinovog ulja. Upravo je stoga 2011. godine odobrena zdravstvena tvrdnja koja povezuje svakodnevnu konzumaciju maslinovog ulja sa prevencijom oksidacije LDL-a, a uvjetovana je sadržajem od najmanje 5 mg polifenolnih komponenti (hidroksitirosola i njegovih derivata) u 20 g ulja (*EFSA, 2011*).

Udio polifenola u maslinovom ulju može značajno varirati, ovisno o kultivaru masline, klimatskim uvjetima, stupnju zrelosti ploda i načinu prerade masline. Najveći sadržaj polifenolnih komponenti nalazi se u ekstra djevičanskom maslinovom ulju, koje je ujedno i najskuplje. Tijekom prerade maslina, velik dio polifenola zaostaje u komini ili otpadnim vodama koje zaostaju tijekom proizvodnje, pa se intenzivno razvijaju postupci ekstrakcije polifenola iz tih otpadnih produkata i sve više se prepoznaje veliki potencijal takvih ekstrakata kao potentnih nutraceutika (*Nunes i sur., 2016*).

U okviru ovog istraživanja određen je sadržaj ukupnih polifenola, hidroksitirosola i tirosola u suhom ekstraktu komine masline (OPE) koji je dobiven prema prethodno optimiranom zelenom postupku ekstrakcije (*Jurmanović i sur., 2018*). OPE je validiran kao alternativni izvor biološki aktivnih polifenola maslinovog ulja uzevši u obzir ukupni sadržaj polifenola, gastrointestinalnu stabilnost, bioraspoloživost i interakcije s hranom. Na Slici 1 prikazane su vrijednosti sadržaja ukupnih polifenola, hidroksitirosola i tirosola u OPE te u mješavini maslinovih ulja sa hrvatskog tržišta. Iz prikaza je vidljivo da je OPE značajno bolji izvor biološki aktivnih fenola masline od maslinovog ulja. Vrijednost sadržaja ukupnih fenola OPE su 3435.5 ± 98.2 mg/kg nasuprot prosječnoj vrijednosti u analiziranim maslinovim uljima od 1096.9 ± 79.3 mg/kg. Hidroksitirosol je i u OPE i u maslinovom ulju bio zastupljeniji od tirosola a vrijednosti su se kretale od 78.36 ± 9.20 mg/kg (ulje) do čak 545.9 ± 27.3 mg/kg u OPE. Značajno veći udio hidroksitirosola u ekstraktu komine može se s jedne strane objasniti niskim logP odnosno velikom hidrofiličnošću hidroksitirosola. S druge strane, hidroksitirosol je razgradni produkt oleuropeina i nekih drugih kompleksnih fenola u maslinovom ulju, pa je za očekivati da do takvih razgradnji može doći i tijekom skladištenja komine i postupaka dobivanja ekstrakcije polifenola. Visok sadržaj hidroksitirosola ujedno je karakteristika OPE kojom se takvi ekstrakti razlikuju od ekstrakta lista masline u kojima je najzastupljeniji kompleksni polifenol oleuropein. Visok sadržaj hidroksitirosola u

ekstraktu zapravo je poželjan jer ga se smatra najpotentnijom supstancom vodene frakcije maslinovog ulja i to u smislu protuupalnog djelovanja (*Ciriminna i sur., 2016*). Prosječan udio tirosola u maslinovom ulju bio je 98.9 ± 8.5 mg/kg dok su vrijednosti u OPE bile otprilike dvostruko veće (196.7 ± 12.8). Iako je tirosol značajno slabiji antioksidans od hidrokstirosola, on doprinosi biološkim učincima maslinovog ulja. Također, ne smije se zaboraviti da su brojni složeni polifenolni spojevi maslinovog ulja strukturalno povezani (hidrokstirosol acetat, oleuropein aglikon, 10-OH oleuropein aglikon, aldehid-, dialdehid-, dekarboksimetil oleuropein aglikon, tirosol acetat, ligstrozid aglikon, aldehid- dialdehid- karboksimetil ligstrozid aglikon) te se tijekom prerade i skladištenja ulja/OPE, tijekom probave i metabolizma lako konvertiraju jedni u druge te da se odobrena zdravstvena tvrdnja odnosi na zbroj „hidrokstirosola i derivata (oleuropein kompleksa i tirosola)“.



Slika 1. Udio ukupnih fenola, hidrokstirosola i tirosola u ekstraktu komine masline (OPE) i prosječnih vrijednosti u maslinovom ulju. **rezultati iskazani kao ekvivalenti galne kiseline (GAE).* ***prosječne vrijednosti u mješavini maslinovih ulja sa tržišta RH*

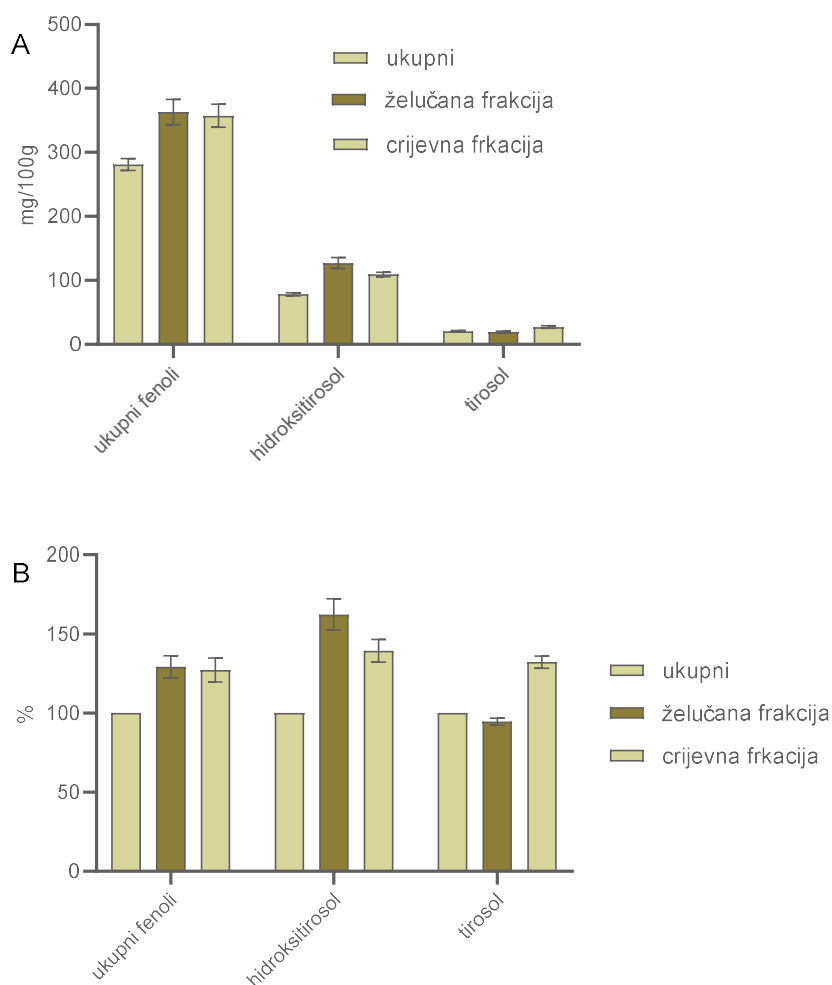
4.2. Bioraspoloživost polifenola OPE

Kako bi ispoljili biološke učinke i ostvarili mjerljive učinke na zdravlje, polifenoli maslinovog ulja moraju biti bioraspoloživi, tj. moraju se apsorbirati iz probavnog trakta u sistemsku cirkulaciju. Bioraspoloživost polifenola iz maslinovog ulja dobro je istražena većim brojem kliničkih studija. Studije na ljudima pokazuju da je apsorpcija polifenola maslinovog ulja vjerojatno veća od 55-60% (*Vissers i sur., 2004*). Međutim ukupna bioraspoloživost je mala zbog značajnog prvog prolaska kroz jetru, pa su radi gotovo potpune glukuronidacije/sulfatacije količine aglikona u tjelesnim tekućinama nemjerljive (*de la Torre, 2008*).

S druge strane bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta komine masline do sada nije istražena. Naime, obzirom da je polifenolni sastav nešto dugačiji od onog maslinovog ulja te da se radi o bitno drugačijem matriksu (u odnosu na ulje) za očekivati je da raspoloživost hidroksitirosola, tirosola i njihovih derivata za apsorpciju neće nužno biti jednaka onoj maslinovog ulja. Naime, sastav namirnice/obroka može bitno utjecati na bioraspoloživost polifenola u probavnom traktu, njihovu apsorpciju i metabolizam. Prehrambena vlakna (kao što je hemiceluloza, dvovalentni metali, i visok udio proteina u obroku) mogu smanjiti bioraspoloživost polifenola. S druge strane probavljivi ugljikohidrati, prisustvo masti te prisutnost drugih antioksidansa mogu povećati bioraspoloživost polifenolnih komponenti (*Bohn, 2014*). Obzirom na velik broj i različite fizikalno-kemijske karakteristike fenolnih spojeva u hrani, vrlo je teško, gotovo nemoguće, generalizirati i predviđati učinke matriksa hrane/obroka na bioraspoloživost pojedinih komponenti već su nužna istraživanja za svaku (skupinu) spojeva. Mogući mehanizmi su brojni: od stvaranja netopljivih kompleksa u probavnom traktu, preko inhibicije probavnih enzima ili steričkog onemogućavanja enzimskog djelovanja, utjecaja na pH u probavnom traktu, modifikacije kemijske pregradnje u uvjetima

probavnog trakta, antioksidacijske zaštite, kompeticije za intestinalne transportere, inhibicije/indukcije (efluksnih) transportera i enzima uključenih u biotransformacije itd.

Kao što je već rečeno, najzastupljeniji fenolni spoj u ekstraktu komine masline je hidroksitirosol, čija se bioraspoloživost značajno mijenja ovisno o matriksu namirnice, a najveća je upravo iz maslinovog ulja (*Visioli i sur., 2003*). U ovom istraživanju po prvi puta je istražen utjecaj probave na udio ukupnih fenola, hidroksitirosola i tirosola u OPE, a rezultati su prikazani na Slici 2.



Slika 2. A: Udio ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline), tirosola i hidroksitirosola u OPE, tijekom probave u želucu i tijekom probave u tankom crijevu. **B:** postotak od ukupnih polifenola u želučanoj i crijevnoj frakciji tijekom probave.

Iz Slike 2 vidljivo je da su polifenoli u OPE stabilni tijekom probave. Udio ukupnih polifenola i hidroksitirosola se u kiselom mediju želuca povećava (sa 282.0 na 363.3 mg GAE/100g i sa 78.4 na 128.3 mg/100g hidrokstirosol) što odgovara povećanju bioraspoloživosti na 129.3 (ukupni fenoli) odnosno na 162.3% (hidroksitirosol). Nasuprot tome koncentracije tirosola tijekom probave u želucu ostaju nepromijenjene. Dobiveni rezultati u skladu s podacima dobivenim *in vitro* simulacijom probave maslinovog ulja (Soler i sur., 2010) koji pokazuju značajnu otpornost polifenola u ulju prema kiselim uvjetima u želucu. Naime, većina polifenola u maslini su glikozidi, a tijekom postupka dobivanja maslinovog ulja zbog kiselog pH i djelovanja β -glukozidaze oslobađaju se aglikoni, kao dominantna forma u maslinovom ulju (i komini). Time bi se mogao objasniti i porast udjela ukupnih fenola i hidroksitirosola u želučanoj frakciji: tijekom želučane probave dolazi do dodatne razgradnje glikozida i konjugiranih spojeva zbog kiselog pH te se povećava udio slobodnih aglikona u želučanoj frakciji. U crijevnom digestu koncentracije hidroksitirosola se smanjuju (sa 127.3 na 109.3 mg/100g). Opažanja su u skladu sa literaturnim navodima koji ukazuju na osjetljivost polifenola masline na blago lužnati pH i prisustvo probavnih enzima u tankom crijevu te posljedično smanjenje hidroksitirosolne frakcije u crijevnom digestu (Soler i sur., 2010). U studiji Soler-a i suradnika (2010) udio hidroksitirosolne frakcije maslinovog ulja smanjio se sa 32.8 nmol/L (u gastričnoj frakciji) na 26.1 nmol/L (u crijevnoj frakciji). Nasuprot tome, tirosol je stabilan u blago lužnatom pH tankog crijeva, čak se i njegove koncentracije u tankom crijevu povećavaju sa 19.6 na 27.4 mg/100g (u odnosu na želučanu frakciju). Opažanja su u skladu sa istraživanjima gastrointestinalne stabilnosti tirosola drugih autora. Soler i suradnici (2010) su pokazali da koncentracije tirosola u crijevnoj frakciji značajno rastu u odnosu na gastričnu (sa 27.9 nmol/l na 48.6 nmol/l). Dinnela i suradnici (2007) istraživali su gastrointestinalnu stabilnost tirosola u maslinovom ulju i također utvrdili (nešto skromnije) povećanje tirosolne frakcije u intestinalnom digestu (sa 250 μ g/g na

268.7 $\mu\text{g/g}$). Gledajući cjelokupan proces probave OPE, bioraspoloživost ukupnih fenola, hidroksitirosola i tirosola povećava se unutar raspona 27.2/% (ukupni fenoli) - 39.4% (hidroksitirosol) (Slika 2B).

4.3. Interakcije polifenola OPE s komponentama hrane

Biološki učinci polifenola značajno su uvjetovani njihovom bioraspoloživošću koja ovisi o većem broju čimbenika: biodostupnošću (raspoloživost za apsorpciju u tankom crijevu), apsorpcijom i metabolizmom (u tankom crijevu i jetri). Iako na biodostupnost pojedinih fitokemikalija može bitno utjecati procesuiranje hrane te izloženost namirnice svjetlu/temperaturi/tlaku (*Svelander i sur., 2011*), najznačajnije interakcije događaju se upravom tijekom probave. pH, aktivnost enzima i trajanje probave utječu na otpuštanje bioaktivnih spojeva iz kompleksnih matrica hrane, ali i omogućuju interakcije sa ostalim komponentama obroka. Upravo je utjecaj stvarnih, kompleksnih obroka na bioraspoloživost polifenola vrlo slabo istražen (*Bohn i sur., 2014; Bohn i sur., 2015*). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj različitih namirnica/nutrijenata na biodostupnost polifenola OPE (ukupnih polifenola, hidroksitirosola i tirosola) *in vitro* simulacijom probave OPE sa različitim namirnicama, odnosno komponentama namirnica. Makronutritivni sastav korištenih namirnica prikazan je u Tablici 1. Prilikom odabira namirnica nastojalo se odabrati takve matrice koje se međusobno značajno razlikuju obzirom na makronutritivni sastav (udio masti, udio proteina, udio raspoloživih ugljikohidrata, udio prehrambenih vlakana) obzirom da različiti makronutrijenti različitim mehanizmima stupaju u interakcije sa polifenolnim spojevima u hrani (*Bohn i sur., 2014*). Prema saznanjima autora, do danas nije provedeno istraživanje utjecaja hrane na bioraspoloživost polifenola masline.

Tablica 4. Makronutritivni sastav namirnica korištenih za istraživanje interakcija s polifenolima OPE

		proteini	masti	raspoloživi ugljikohidrati	ukupna vlakna	topljiva vlakna	netopljiva vlakna
		g/100g jestivog dijela					
tuna konzerve*	iz	21,5	15,5	0,0	0,0	0,0	0,0
jogurt*		4,3	2,8	5,1	0,0	0,0	0,0
vrhnje*		3,0	12,0	4,4	0,0	0,0	0,0
mlijeko*		3,3	3,2	4,6	0,0	0,0	0,0
jabuka (bez kore)**	(bez	0,3	0,0	11,9	2,4	0,7	1,7
banana**		1,1	0,3	19,2	2,8	0,7	2,1
pahuljice soje*	od	52,0	6,0	4,0	16,0	0,0	16,0
svježi sir*	posni	12,4	1,0	2,7	0,0	0,0	0,0
žitarice doručak*	za	12,8	2,3	68,9	11,2	1,1	10,1
krumpir kuhani**		0,9	0,2	17,6	2,8	1,6	1,2
blitva blanširana**		1,3	0,1	1,5	1,2	0,3	0,9
kruh polubijeli**		8,0	2,0	46,0	2,7	2,5	0,2
med**		0,4	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0
umak Bolognese*		6,2	5,3	7,1	1,8	1,2	0,4

* podaci preuzeti iz tablica nutritivnog sastava proizvođača: ** podaci preuzeti iz tablica nutritivnog sastava (Kaić Rak i Antonić, 1990; <https://nutritiondata.self.com/>)

Vrijednosti udjela biodostupnih polifenola OPE (ukupni fenoli, hidroksitirosol, tirosol) određenih u intestinalnoj frakciji nakon *in vitro* simulacije gastrointestinalne digestije prikazane su u Tablici 2. Iz tablice je vidljivo da je biodostupnost ukupne polifenolne frakcije uglavnom nepromijenjena, bez obzira na prisustvo drugih namirnica u probavnom traktu. Udio biodostupne frakcije polifenola OPE iznosio je 3.77 mg/100 g GAE, a vrijednosti dobivene nakon kodigestije s različitim namirnicama kretale su se od

2.04 (soja) do 4.48 mg/g GAE (med). Značajan negativan utjecaj na udio biodostupnih polifenola utvrđen je jedino za sojine pahuljice i svježi sir ($p < 0.001$). Nasuprot tome, utjecaj različitih namirnica na biodostupnost hidroksitirosola bio je puno izraženiji: značajan pozitivan utjecaj na biodostupnost hidroksitirosola utvrđen je za namirnice bogate proteinima, a siromašne prehranbenim vlaknima: tunu, vrhnje, mlijeko i jogurt (65.10-71.88 mg/100g naprama 51.26 mg/100g u čistom OPE) dok su jabuka i polubijeli kruh značajno smanjili biodostupnost hidroksitirosola iz OPE (36.33 mg/100g - 38.06 mg/100g naprama 51.26 mg/100g u čistom OPE). U slučaju tirosola posebno se ističe negativan utjecaj namirnica bogatih prehranbenim vlaknima (jabuka, žitarice za doručak, blitva, kruh) na biodostupnost (11.49 mg/100g – 13.56 mg/100g naprama 17.10 mg/100g u čistom OPE). Nije opažen porast biodostupnosti u slučaju kodigestije sa namirnicama bogatim proteinima kao u slučaju hidroksitirosola, osim statistički značajnog, ali blagog pozitivnog učinka jogurta (18.77 mg/100g naprama 17.10 mg/100g).

Tablica 5. Udio biodostupnih frakcija ukupnih polifenola, hidroksitirosola i tirosola iz OPE nakon simulacije probave sa pojedinim namirnicama

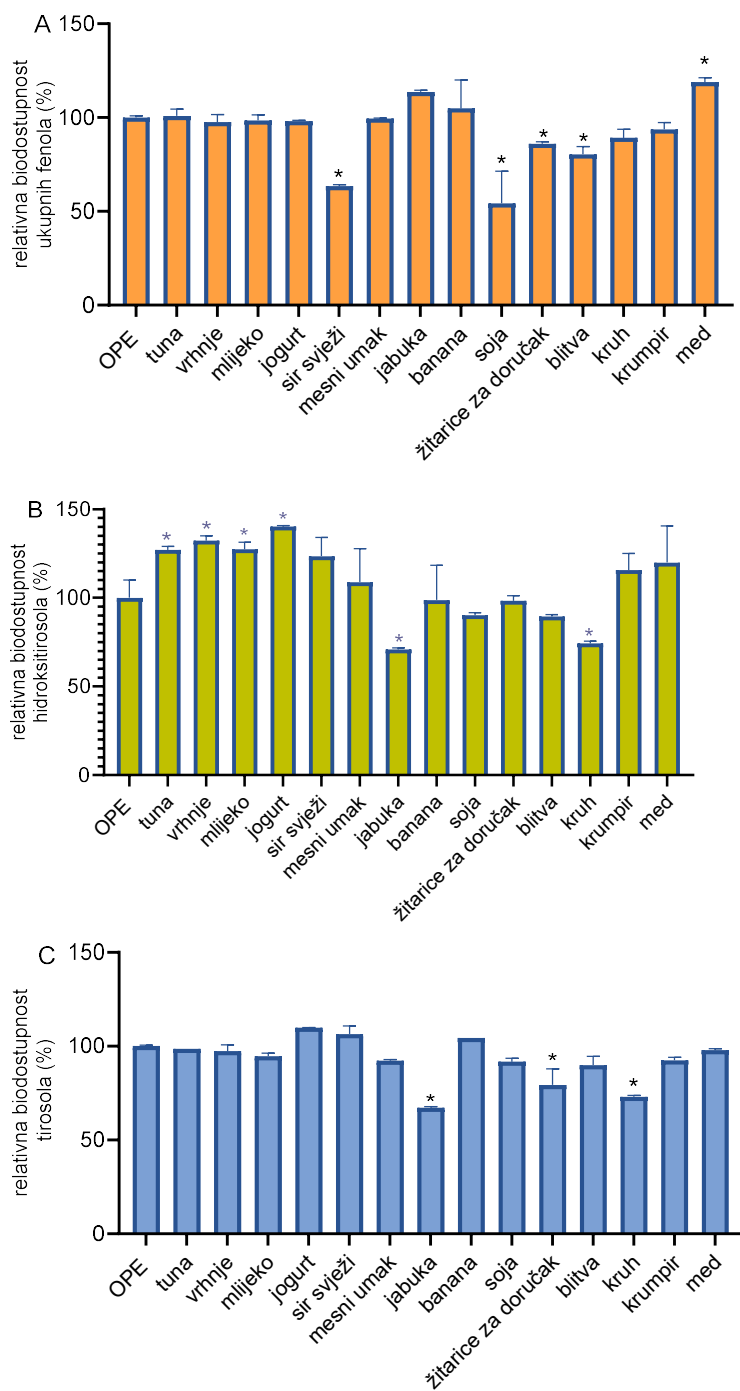
	ukupni fenoli (mg/gGAE)	hidroksitirosol (mg/100g)	tirosol (mg/100g)
OPE**	3,77 ± 0,000	51,26 ± 5,18	17,10 ± 0,261
tuna	3,80 ± 0,138	65,10 ± 0,00*	16,85 ± 0,000
vrhnje	3,67 ± 0,153	67,80 ± 1,45*	16,65 ± 0,572
mlijeko	3,71 ± 0,109	65,32 ± 2,06*	16,18 ± 0,279
jogurt	3,70 ± 0,014	71,88 ± 0,21*	18,77 ± 0,022*
sir svježi	2,39 ± 0,025*	63,30 ± 5,41	18,20 ± 0,744
mesni umak	3,75 ± 0,005	55,81 ± 9,68	15,80 ± 0,078*
jabuka	4,28 ± 0,034	36,33 ± 0,477*	11,49 ± 0,094*
banana	3,95 ± 0,571	43,60 ± 9,97	17,87 ± 0,000
soja	2,04 ± 0,645*	46,24 ± 0,706	15,91 ± 0,331
žitarice za doručak	3,24 ± 0,038	50,36 ± 1,53	13,56 ± 1,488*
blitva	3,03 ± 0,158*	45,89 ± 0,520	15,39 ± 0,785*
kruh	3,36 ± 0,174	38,06 ± 0,648*	12,49 ± 0,113*
krumpir	3,53 ± 0,136	59,31 ± 4,81	15,80 ± 0,280*
med	4,48 ± 0,091	61,50 ± 10,52	16,73 ± 0,156

OPE+

* značajna razlika u odnosu na čisti OPE prema rezultatima jednosmjerne analize varijance i post hoc Dunnettovog testa; ** pojedine matrice hrane također sadrže polifenole; stoga su kao slijepa probe korišteni digesti pojedinih matrica hrane, bez OPE. Stoga se vrijednosti u tablici odnose isključivo na polifenole OPE

Na Slici 3 prikazani su rezultati istraživanja biodostupnosti ukupne fenolne frakcije, hidroksitirosola i tirosola iz OPE nakon simulacije probave sa različitim namirnicama, izraženi kao postoci u odnosu na njihovu biodostupnost iz OPE bez prisutnosti drugih namirnica. Prisutnost pojedinih namirnica tijekom digestije negativno je utjecala na biodostupnost polifenolne komponente smanjivši je sa 100% na 54-89%. Većinom se radilo o namirnicama bogatim vlaknima (osobito netopljivim). U literaturi se često navodi da je bioraspoloživost polifenola iz namirnica bogatih prehranbenim vlaknima niska obzirom da se polifenoli tijekom sazrijevanja biljke vežu za frakciju prehranbenih vlakana te se, da bi bili dostupni za apsorpciju, moraju tijekom probave osloboditi iz kompleksnih matriksa (*P'erez et al., 2009*). Rezultati dobiveni u okviru ove studije pokazuju da takvi netopljivi kompleksi mogu nastati, ne samo tijekom sazrijevanja biljke već i tijekom probave hrane. Dakle, i u slučajevima kada se polifenoli unose u organizam kao pročišćeni ekstrakti, oni mogu stvarati komplekse sa prehranbenim vlaknima obroka, premda utjecaj na biodostupnost vjerojatno nije toliko izražen kao kod polifenola prirodno prisutnih u namirnicama bogatim vlaknima. Nadalje, prehranbena vlakna mogu otežavati interakciju probavnih enzima sa konjugatima (glikozidima) polifenolnih spojeva pa i na taj način ostvarivati negativne učinke na biodostupnost aglikona u tankom crijevu (*Palafox-Carlos i sur., 2011*).

Ipak, važno je napomenuti da učinak vlakana na biodostupnost polifenola bitno ovisi o kemijskim karakteristikama i vlakana i polifenolnih komponenti. Stoga se opažanja utjecaja različitih namirnica na biodostupnost ukupne polifenolne frakcije samo dijelom poklapaju sa opažanjima biodostupnosti hidroksitirosola i tirosola.



Slika 3. Relativna biodostupnost ukupne fenolne frakcije (A), hidrokstirosola (B) i tirosola (C) izražena u odnosu na biodostupnost iz OPE bez prisustva druge hrane (100%). *vrijednosti se značajno razlikuju od vrijednosti čistog OPE ($p < 0.05$; *post hoc* Dunnetov test).

U slučaju hidroksitirosola (slika 3B) značajno smanjenje biodostupnosti dogodilo se tijekom kodigestije s jabukom i kruhom (70.88% i 74.26%) dok neke druge namirnice, puno bogatije prehranbenim vlaknima (npr. pahuljice soje) nisu pokazale negativan učinak. Vrlo slični rezultati dobiveni su za biodostupnost tirosola (slika 3C): značajan negativan utjecaj na biodostupnost utvrđen je nakon kodigestije sa jabukom, kruhom i žitaricama za doručak (67.21%, 73.03% i 79.27%).

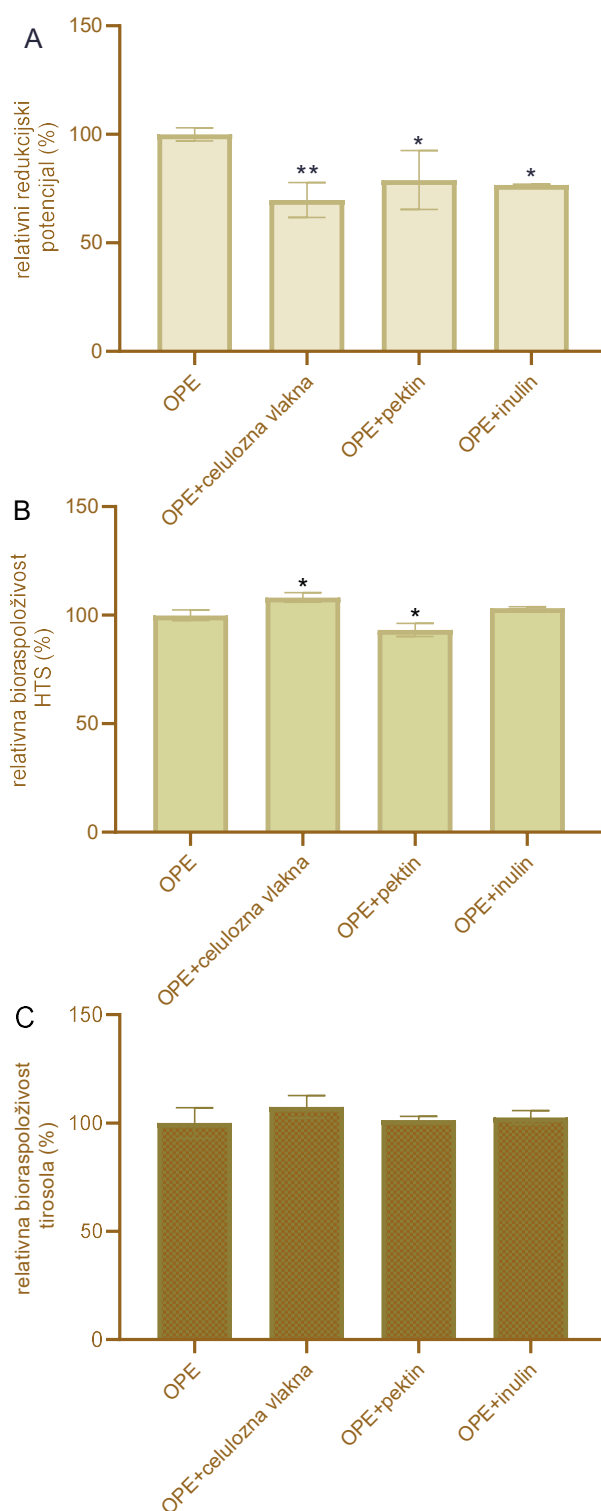
Iz navedenog bi se moglo zaključiti da hidroksitirosol i tirosol mogu tijekom probave stvarati netopljive komplekse sa sličnim/istim vrstama prehranbenih vlakana, što je vjerojatno uvjetovano njihovom vrlo sličnom kemijskom strukturom. Interakcije između prehranbenih vlakana i polifenola dokazane su većim brojem studija. Primjerice pektin i celuloza mogu stvarati netopljive komplekse sa antocijaninima i fenolnim kiselinama (*Padayachee i sur., 2012a, 2012b*).

Neke namirnice bogate proteinima značajno su povećale biodostupnost hidroksitirosola (tuna-127.01%; vrhnje-132.28%; mlijeko-127.43% i jogurt-140.23%). Interakcije proteina i polifenola dokazane su brojnim *in vitro* studijama. Yuksel i suradnici (2010) dokazali su da se polifenoli zelenog čaja hidrofobnim nekovalentnim vezama vežu za kazein što je kasnije dodatno istraženo brojnim studijama (*Hasni i sur., 2011; Von Staszewski i sur., 2012*). Nastajanje takvih kompleksa moglo bi zaštititi polifenole od razgradnje u probavnom sustavu (npr. zaštita tirosola u blago lužnatom mediju tankog crijeva) kao što je prethodno pokazano za epigalokatehin galat (*Shpigelman i sur., 2010*).

Međutim, bitno je naglasiti kako pozitivan utjecaj proteina na biodostupnost hidroksitirosola nije bio proporcionalan udjelu proteina, a uočen je samo kod onih namirnica koje nisu sadržavale prehranbena vlakna. S druge strane, velik broj namirnica

sa puno višim sadržajem proteina, ali i prehrambenih vlakana nije pozitivno utjecao na biodostupnost hidroksitirosola (soja, mesni umak, žitarice za doručak). Stoga se može pretpostaviti da je pozitivan utjecaj proteina uvjetovan odsutnošću prehrambenih vlakana u namirnici ili specifičnim aminokiselinskim sastavom pojedinih proteina. Ova pretpostavka može se potkrijepiti rezultatima nekih studija koje su pokazale da prisustvo prehrambenih vlakana u namirnicama može onemogućiti stvaranje kompleksa polifenola sa proteinima. Npr. poligalaturonska kiselina, pektin i ksantan spriječili su nastajanje kompleksa između salivarnih proteina i procijanidina sjemenke grožđa (*Soares i sur., 2012*).

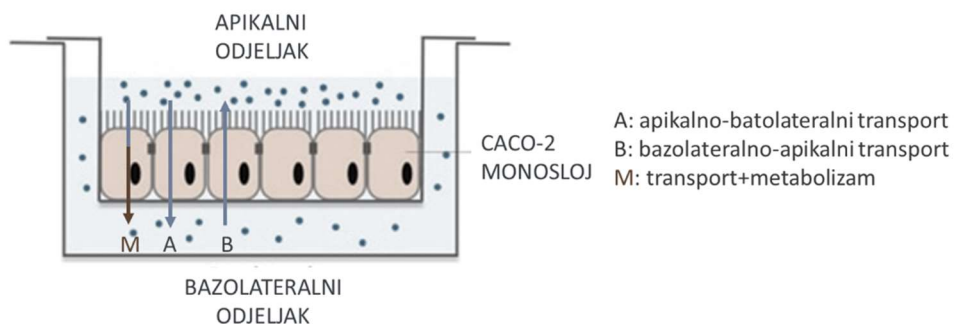
Obzirom da se smanjena bioraspoloživost polifenola OPE glavnom povezuje s namirnicama bogatim prehrambenim vlaknima provedena su dodatna istraživanja kojima je istražen utjecaj nekih pročišćenih vlakana na biodostupnost ukupnih polifenola (Slika 4A), hidroksitirosola (Slika 4B) i tirosola (Slika 4C). Sva istražena vlakna značajno su negativno su djelovala na biodostupnost ukupnih polifenola OPE, ali je celuloza, kao netopljivo vlakno, ostvarila najznačajniji negativni učinak. S druge strane, u slučaju hidroksitirosola, najznačajniji negativni učinak ostvario je pektin, što je u skladu s opažanjima prikazanim u Tablici 2 i na Slici 3. Biodostupnost tirosola (C) nije se mijenjala zbog prisutnosti celuloze, pektina ili inulina u digestu te su smanjene stope biodostupnosti uvjetovane pojedinim namirnicama vjerojatno posljedica interakcija s drugim vrstama vlakana u hrani (npr. hemicelulozama). Dobiveni rezultati pokazuju da samo određena prehrambena vlakna stupaju u kontakt s određenim polifenolima.



Slika 4. Relativna biodostupnost ukupne fenolne frakcije (**A**), hidroksitirosola (**B**) i tirozola (**C**) izražena u odnosu na biodostupnost iz OPE bez prisustva druge hrane (100%). *vrijednosti se značajno razlikuju od vrijednosti čistog OPE ($p < 0.05$; *post hoc* Dunnettov test).

4.4. Permeabilnost hidroksitirosola i tirosola iz OPE na Caco-2 staničnom monosloju

Permeabilnost karakterističnih polifenola OPE istražena je primjenom Caco-2 staničnog *in vitro* modela koji se rutinski koristi za istraživanje permeabilnosti lijekova te je postao zlatni standard u ispitivanju aktivnog i pasivnog puta transporta. Pod specifičnim uvjetima uzgoja, Caco-2 stanice diferenciraju i stvaraju karakterističnu četkastu prevlaku sa čvrstim spojevima i eksprimiranim transporterima karakterističnim za enterocite te vrlo dobro simuliraju epitel tankog crijeva. Stanični monoslojevi uzgajaju se na permeabilnim podlogama koje se smještaju u ploče s jažicama tako da tvore dva odjeljka: donorski i akceptorski. Istraživana supstanca (u ovom slučaju, biodostupna frakcija OPE) nanosi se u apikalni odjeljak i transport/metabolizam ciljanih spojeva prati se kroz slijedećih 120 min. (Slika 5).

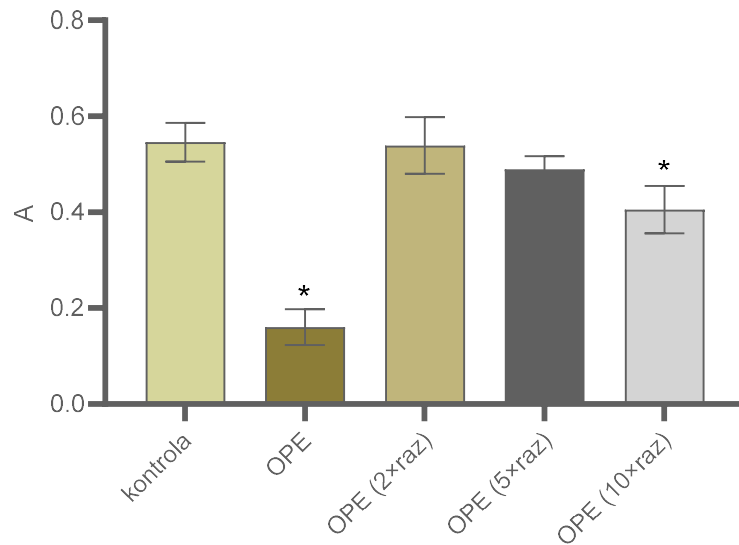


Slika 5. Caco-2 stanični monosloj kao model za istraživanje permeabilnosti polifenola OPE

Tijekom interpretacije dobivenih rezultata bitno je napomenuti da promatrana supstanca može putovati i u smjeru od bazolateralnog odjeljka natrag u apikalni (efluks) što se istražuje tako da se uzorak unosi u bazolateralni odjeljak. Također je moguće da se promatrana supstanca u enterocitu metabolizira i pregradi u neki drugi spoj te se

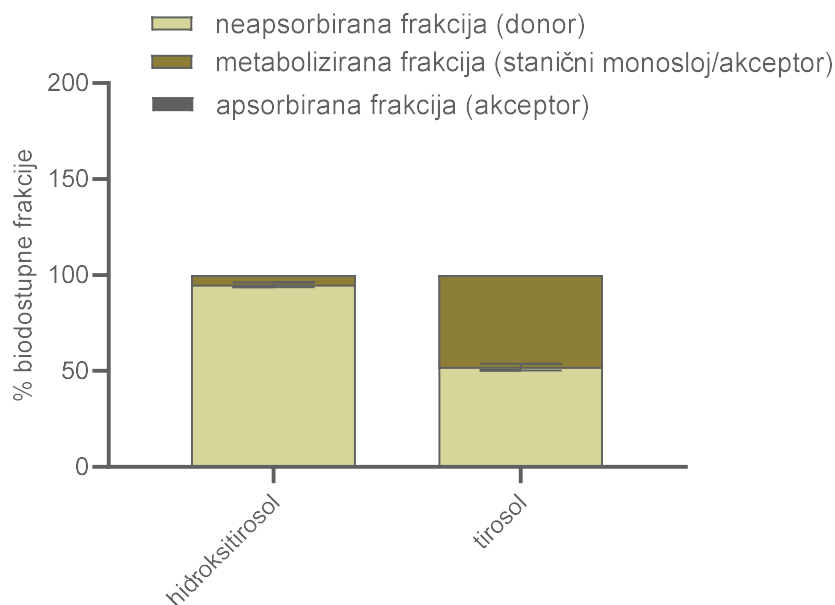
apsorbira ili putem efluksnih transportera izbaci natrag u apikalni odjeljak. Stoga zbroj postotka neapsorbirane i apsorbirane frakcije ponekad može biti veći ili manji od 100%. U okviru ovog rada istraživana je permeabilnost i efluks hidrokstirosola i tirosola iz biodostupne frakcije OPE korištenjem Caco-2 staničnog modela, a rezultati su prikazani na Slici 6 i Slici 7.

Kod istraživanja permeabilnosti komponenata hrane bitno je najprije izdvojiti biodostupnu frakciju namirnice što znači da se na stanični monosloj nanosi vrlo kompleksna smjesa spojeva koja bez obzira na specifičnu obradu može sadržavati ostatke žučnih soli, probavnih enzima te imati neodgovarajuću osmolalnost (razlika u odnosu na istraživanje permeabilnosti lijekova). Takve smjese mogu smanjiti viabilnost stanica i funkcionalnost čvrstih spojeva što čime se značajno mijenjaju karakteristike monosloja i njegova permeabilnost. Stoga je neophodno prije provođenja pokusa ispitati biokompatibilnost biodostupne frakcije istraživanog uzorka i staničnog monosloja (Slika 6). Iz prikazanih podataka vidljivo je da intestinalni digest OPE bitno smanjuje viabilnost Caco-2 stanica te su pokusi rađeni sa 10 puta razrijeđenim digestom.



Slika 6. Viabilnost stanica nakon ekspozicije različitim razrjeđenjima intestinalnog digesta OPE određena MTT testom.* vrijednosti su značajno različite od kontrole ($p < 0.05$, Dunettov *post hoc* test)

Permeabilnost hidroksitirosola, tirosola i oleuropein aglikona iz OPE do danas, prema našim saznanjima nije istražena. Iako postoje studije permeabilnosti čistih spojeva, podaci dobiveni takvim studijama često nisu primjenjivi na realne kompleksne sustave hrane. Naime, interakcije različitih spojeva u kompleksnom matriksu mogu bitno utjecati na permeabilnost pojedinog spoja, primarno zbog kompeticije za inluksne/efluksne transportere i metaboličke enzime. Podaci o permeabilnosti hidroksitirosola, tirosola i oleuropein aglikona prikazani su na Slici 7.



Slika 7. Permeabilnost hidroksitirosola, tirosola i oleuropein aglikona na Caco-2 staničnom monosloju.

Iz prikazanih podataka vidljivo je da je permeabilnost hidroksitirosola relativno mala; samo 5% biodostupne frakcije hidroksitirosola se apsorbira i odmah metabolizira, obzirom da u akceptorskom odjeljku nakon 2 h inkubacije nalazimo 95% početne vrijednosti hidroksitirosola. Obzirom na fizikalno-kemijska svojstva hidroksitirosola, očekivana je veća permeabilnost. Iako neočekivani, dobiveni rezultati u skladu su sa rezultatima istraživanja Manna i suradnici (2000) koji su istraživali permeabilnost radioaktivno obilježenog hidroksitirosola na Caco-2 monosloju i zaključili da je glavni mehanizam transporta pasivna difuzija koja je vrlo brza i učinkovita u oba smjera (influks i efluks). Također je moguće da je dio polifenola prisutnih u intestinalnom digestu OPE metaboliziran do hidroksitirosola što je dovelo do prividnog povećanja hidroksitirosolske frakcije u apikalnom odjeljku. Gotovo identični rezultati

permeabilnosti hidroksitirosola iz *alpejura* (vrlo sličan sastav OPE) na Caco-2 staničnom prezentirani su u nedavnoj studiji Malaperta i suranika (2018).

Permeabilnost tirosola bila je značajnija u odnosu na hidroksitirosol što je utvrđeno smanjenjem sadržaja tirosola u apikalnom odjeljku nakon 2h inkubacije na staničnom monosloju (u apikalnom odjeljku zaostalo je 52% inicijalne biodostupne frakcije tirosola). Iznenadujuće, u bazolateralnom odjeljku nije detektiran tirosol, što znači da se po apsorpciji u enterocitu vrlo učinkovito metabolizira. U studiji Malaperta i suradnika (2018), permeabilnost tirosola također je veća od permeabilnosti hidroksitirosola, međutim nakon 2 h inkubacije u apikalno odjeljku detektirano je oko 80 % inicijalne koncentracije tirosola što ukazuje na veću bioraspodivnost tirosola iz OPE.

5. ZAKLJUČCI

- Ekstrakt komine masline je značajno bogatiji izvor ukupnih polifenola, hidroksitirosola i tirosola od maslinovog ulja
- Polifenoli ekstrkata komine masline, uključujući hidroksitirosol i tirosol stabilni su tijekom probave; zbog oslobađanja iz matriksa ekstrakta tijekom probave udio slobodnog hidroksitirosola i tirosola raste
- Prisutnost pojedinih namirnica tijekom probave, osobito onih bogatih netopljivim vlaknima, negativno je utjecala na biodostupnost polifenolne komponente smanjivši je sa 100% na 54-89%. Većinom se radilo o namirnicama bogatim vlaknima (osobito netopljivim).
- Učinak vlakana na biodostupnost polifenola bitno ovisi o kemijskim karakteristikama i vlakana i polifenolnih komponenti. Stoga se opažanja utjecaja različitih namirnica na biodostupnost ukupne polifenolne frakcije samo dijelom poklapaju sa opažanjima biodostupnosti hidroksitirosola i tirosola.
- Celuloza je, među istraženim vlaknima, ostvarila najznačajniji negativni učinak na biodostupnost ukupnih fenola; najznačajniji negativni učinak na biodostupnost hidroksitirosola ostvario je pektin, dok se biodostupnost tirosola nije mijenjala zbog prisutnosti celuloze, pektina ili inulina te su smanjene stope biodostupnosti uvjetovane pojedinim namirnicama vjerojatno posljedica interakcija s drugim vrstama vlakana u hrani (npr. hemicelulozama).
- Neke namirnice bogate proteinima značajno su povećale biodostupnost hidroksitirosola (tuna-127.01%; vrhnje-132.28%; mlijeko-127.43% i jogurt-140.23%). Pozitivan utjecaj proteina uvjetovan je odsutnošću prehrambenih vlakana u namirnici ili specifičnim aminokiselinskim sastavom pojedinih proteina.
- Ekstrakti polifenola masline nisu citotoksični

- Permeabilnost tirosole i hidroksitirosole na Caco-2 monosloju je niska, primarno zbog značajnog metabolizma u enterocitima. permeabilnost tirosole veća je od permeabilnosti hidroksitirosole

6. POPIS LITERATURE

1. Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7):429–452.
2. Bohn, T.; McDougall, G.J.; Alegría, A.; Alminger, M.; Arrigoni, E.; Aura, A.M.; Brito, C.; Cilla, A.; Karakaya, S.; Martínez-Cuesta, M.C; Santos, C.N. (2015). Mind the gap--deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites--a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(7):1307-23.
3. Ciriminna, R.; Meneguzzo F.; Fidalgo A.; Ilharco L.M.; Pagliaro, M. (2016). Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. *European Journal of lipid science and technology*, 118(4):503-5011.
4. Covas, M.-I.; Fitó, M.; Torre, R. (2015). 2 - Minor Bioactive Olive Oil Components and Health: Key Data for Their Role in Providing Health Benefits in Humans. U: Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. Dimitrios Boskou, urednik; AOCS Press, 31-52.
5. D'Archivio; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular sciences*, 11(4):1132-1342.
6. Dinnella, C.; Minichino, P.; D'andrea, A.M.; Monteleone, E. (2007). Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:8423–8429.
7. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the Substantiation of Health Claims Related to Polyphenols in Olive Oil and Protection of LDL Particles from Oxidative Damage. *EFSA Journal* [Online] 2011, 9, 2033. [http:// www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2033.htm](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2033.htm)
8. Etcheverry, P; Grusak, M.A.; Fleige, L.E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron,

- magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontier in Physiology*, 3:1-22.
9. Gao, L.; Wang, S.; Oomah, B.D.; Mazza, G. (2002). Wheat quality: Antioxidant activity of millstreams. U: Wheat quality elucidation P. Ng and C.W. Wrigley AACC International, St. Paul, MN.
 10. Hasni, I.; Bourassa, P.; Hamdani, S.; Samson, G.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Interaction of milk α and β -casein with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126: 630–639.
 11. Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175:556-567.
 12. Jurmanović, S.; Jug, M.; Safner, T.; Radić, K.; Domijan, A.-M.; Pedisić, S.; Šimić, S.a; Jablan, J.; Vitali Čepo, D. (2018) Utilization of olive pomace as a source of polyphenols : Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of spray-dried extract. *Journal of Food and Nutrition Research*. 58(1): 51-62.
 13. Kaić-Rak, A.; Antonić, K. (1990). Tablice o sastavu namirnica i pića. Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske.
 14. López-Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Ros, E.; De Caterina, R.; Badimón, L.; Covas, M. -I.; Escrich, E.; Ordovás, J. M.; Soriguer, F.; Abiá, R.; et al. (2010). Olive Oil and Health: Summary of the II International Conference on Olive Oil and Health Consensus Report, Jaen and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 20:84–94.
 15. Malapert, A.; Tomao, V.; Margier, M.; Nowicki, M.; Gleize, B.; Dangles, O.; Reboul, E. (2018). β -Cyclodextrin Does not Alter the Bioaccessibility and the Uptake by Caco-2 Cells of Olive By-Product Phenolic Compounds. *Nutrients*. doi: 10.3390/nu10111653.

16. Manna, C.; Galletti, P.; Maisto, G.; Cucciolla, V; D'Angelo, S.; Zappia V. (2000) Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters*, 470(3):341-344.
17. Miller, N.J., Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (London)*, 84:407-412.
18. Minekus, M.; Alming, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carriere, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, D.; Egger, L.; Golding, M.; Karaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J. ; Menard, O.; Recio, I.; Santos, C. N. ; Singh, R.P.; Vegarud, G.E.; Wickham, M. S. J. ;Weitschies W.; Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5:1113-1124.
19. Nunes, M.A.; Pimentel, F.; Costa, A.S.G.; Alves, R.C.; Beatriz M.; Oliveira, P.P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35:139-148.
20. Pérez, J.; Serrano, J.; Taberero, M.; Arranz, S.; D'iaz, M.E.; Garcia, L.; Goni, I.; Saura, F. (2009). Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64:102–7.
21. Padayachee, A.; Netzel, G.; Netzel, M.; Day, L.; Zabar, D.; Mikkelsen, D.; Gidley, M.D. (2012). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 2: Phenolic acids. *Food Chemistry*, 135:2287–2292.

22. Padayachee, A.; Netzel, G.; Netzel, M.; Day, L.; Zabaras, D.; Mikkelsen, D.; Gidley, M.D. (2012). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134:155–161.
23. Palafox-Carlos, H.; Ayala-Zavala, J.F.; Gonz'alez-Aguilar, G.A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1):6-15.
24. Pereira, C.; Costa, J.; Sarmiento, B.; Araujo, F. (2016). Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. U: Concepts and Models for Drug Permeability Studies, Bruno Sarmiento, urednik, Elsevier, 57-81.
25. Prior, R.L.; Wu, X.L.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agric Food Chemistry*, 53:4290-4302.
26. Ray, N.B.; Hilsabeck, K.D.; Karagiannis, T.C.; McCord, D.E. (2019). Bioactive olive oil polyphenols in the promotion of health. *The Role of Functional Food Security in Global Health*, 36:623-637.
27. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1231-1237.
28. Rigacci, S; Stefani, M. (2016). Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 17:843.
29. Rosellia, L.; Clodoveoa, M.L.; Corbob, F.; De Gennaro, B. (2017). Are health claims a useful tool to segment the category of extra-virginolive oil. *Trends in Food Science & Technology*, 68:176-181.

30. Shpigelman, A.; Israeli, G.; Livney, Y. D. (2010). Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: Beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, 24:735–743.
31. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
32. Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V. (2012a). Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:3966–3972.
33. Soler, A.; Romero, M.P.; Macià, A.; Saha, S.; Furniss, C.S.M.; Kroon, P.A.; Motilva, M.J. (2010). Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chemistry*, 119:703–714.
34. Svelander, C. A.; Lopez-Sanchez, P.; Pudney, P. D.; Schumm S.; Alminger M. A. G. (2011). High pressure homogenization increases the in vitro bioaccessibility of alpha- and beta-carotene in carrot emulsions but not of lycopene in tomato emulsions. *Journal of Food Science*, 76:215–225.
35. Torre R. (2008). Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology*. 5:245-247.
36. USFDA (2004). U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html>. Pristupljeno 30. travnja 2019.
37. Visioli, F.; Galli, C.; Grande, S.; Colonnelli, K.; Patelli, C.; Galli, G.; Caruso D. (2003). Hydroxytyrosol Excretion Differs between Rats and Humans and Depends on the Vehicle of Administration. *The Journal of Nutrition*, 133:2612–2615.

38. Vissers M.N.; Zock P.L.; Katan M.B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 58:955-965.
39. Von Staszewski, M.; Jara, F. L.; Ruiz, A. L. T. G.; Jagus, R. J.; Carvalho, J. E.; Pilosof, A. M. R. (2012). Nanocomplex formation between b-lactoglobulin or caseinomacropptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. *Journal of Functional Foods*, 4:800–809.
40. Yuksel, Z.; Avci, E.; Erdem, Y. K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry*, 121:450–456.

7. SAŽETAK

Maslinovo ulje je visoko je zastupljeno u mediteranskoj prehrani te se njegova konzumacija povezuje sa smanjenim mortalitetom i smanjenom pojavnosću kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma te neurodegenerativnih bolesti. Važne biološki aktivne sastavnice maslinovog ulja, koje se smatraju važnim nositeljima navedenih učinaka su polifenoli, primarno hidroksitirozol i njegovi derivati. Tijekom proizvodnje maslinovog ulja zaostaju velike količine otpada, komine, vrlo bogate hidroksitirozolom i srodnim polifenolima. Osnovni cilj ovog rada bio je validirati suhe ekstrakte komine masline kao alternativne nutritivne izvore hidroksitirosola i njegovih derivata uvažavajući ne samo njihove koncentracije u analiziranim ekstraktima, već i njihovu bioraspoloživost i interakcije s hranom. Koncentracije hidroksitirosola i njegovih derivata određene su korištenjem visokorazdjelne tekućinske kromatografije (HPLC-DAD); biodostupnost i interakcije s hranom istražene su primjenom statičkog modela simulacije probave prema standardiziranom postupku dok je permeabilnost hidroksitirosola i derivata istražena primjenom Caco-2 staničnog modela. Analizirani ekstrakti puno su koncentriraniji izvori polifenola (uključujući i hidroksitirozol i derivate) od maslinovog ulja, te ostaju stabilni tijekom probave. Prisutnost pojedinih namirnica tijekom probave različito djeluje na biodostupnost polifenola; prisutnost vlakana ima negativan utjecaj, dok namirnice bogate proteinima, a siromašne vlaknima značajno povećavaju biodostupnost hidroksitirosola. Permeabilnost hidroksitirosola i tirosola je niska na Caco-2 staničnom modelu je niska, primarno zbog značajnog metabolizma u enterocitima. Analizirani ekstrakti komine masline mogu se smatrati nutritivno vrijednim izvorom polifenola masline te mogu značajno doprinjeti dnevnom unosu tih biološki vrijednih spojeva.

Ključne riječi: ekstrakt komine masline, hidroksitirozol, tirosol, Caco-2 stanični model, in vitro bioraspoloživost

8. SUMMARY

Olive oil is highly represented in Mediterranean diet and it is associated with reduced mortality and lower rates of cardiovascular diseases, certain types of cancer and neurodegenerative diseases. Major bioactive compounds that contribute significantly to health-promoting properties of olive oil are polyphenols, primarily hydroxytyrosol and its derivatives. The production of olive oil generates a large amount of waste, including olive pomace that contains high amounts of hydroxytyrosol and other similar polyphenolic compounds. The major goal of this work was to characterize olive pomace extracts as the nutritional sources of hydroxytyrosol and its derivatives taking into account their content, bioavailability and interaction with foods. The content of polyphenols in analyzed extracts was determined by HPLC-DAD, bioaccessibility and food interactions were assessed by validated, static *in vitro* model and permeability of targeted polyphenolic compounds was determined using Caco-2 cell permeability model. Analyzed extracts were much more concentrated sources of hydroxytyrosol and derivatives than olive oil; their polyphenolic composition remained stable during digestion. Different foods had variable effects of polyphenol bioaccessibility: high-fibre food negatively affected bioavailability of polyphenols and high-protein food with low fibre content positively affected bioaccessibility of hydroxytyrosol. Permeability of hydroxytyrosol and tyrosol in Caco-2 cell monolayer was low, primarily due to intensive metabolism within cells. Analyzed extracts can be considered as valuable nutritive sources of hydroxytyrosol and derivatives and can significantly contribute to daily intake of these biologically active substances.

Key words: olive pomace extract, hydroxytyrosol, tyrosol, Caco-2 cell model, *in vitro* bioavailability