

Optimizacija uvjeta za studije propusnosti spojeva iz biljnih ekstrakata kroz 2D model monosloja Caco-2 stanica

Filipec, Laura

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Laura Filipec

**Optimizacija uvjeta za studije propusnosti
spojeva iz biljnih ekstrakata kroz 2D model
monosloja Caco-2 stanica**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, na Zavodu za farmakologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu te na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića te pod komentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Šole u sklopu projekta IP-202-02-7585 „Indirektni utjecaj globalnog zagrijavanja na fiziološke parametre sisavaca prehranom biljkama uzgojenim pri visokoj temperaturi – TEMPHYS“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Prije svega, želim se zahvaliti mentoru prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na angažiranosti te na ugodnoj suradnji tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ireni Landeki Jurević s Prehrambeno biotehnološkog fakulteta u Zagrebu na pomoći u radu sa staničnim kulturama.

Zahvaljujem se svojim kolegicama i kolegama koji su bili dio mojih nezaboravnih studentskih dana i noći, učenja i mučenja, kava i izlazaka. Hvala Mateji na optimističnosti i svakom zagrljaju, hvala Petri na nesebičnom davanju bilježaka i dozi odgovornosti te hvala mojoj kritičkoj prijateljici Josipi na bezbrižnom izvršavanju obaveza metodičke prakse.

Posebne zahvale mojoj obitelji, ponajviše mojim roditeljima koji su podržavali svaku moju odluku. Hvala vam što ste bili strpljivi i što ste vjerovali u mene.

Najveće hvala mom Mihaelu koji mi je bio ohrabrenje, poticaj i motivacija. Hvala ti na nepresušnoj podršci tijekom studiranja.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Optimizacija uvjeta za studije propusnosti spojeva iz biljnih ekstrakata kroz 2D model monosloja Caco-2 stanica

Laura Filipec

Ravnice 48, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stanična linija Caco-2 izvedena iz ljudskog karcinoma debelog crijeva koristi se za procjenu propusnosti biološki aktivnih spojeva u uvjetima in vitro koji simuliraju prolazak molekula i apsorpciju u crijevima. Dvodimenzionalni (2D) stanični model Caco-2 kulture izvodi se u dvostrukim jažicama pri čemu su stanice nasađene na polupropusnoj membrani koja simulira enterocite u crijevima te iz jedne komore u drugu propušta određene biološke molekule. Upotrebom navedenog staničnog modela analiziran je antioksidacijski kapacitet i biodostupnost molekula iz skupine polifenola. Za diferencijaciju Caco-2 stanica i stvaranja 2D monosloja bilo je potrebno 17 dana. Neutral red testom, koji je prikladniji test od MTT testa za mjerenje citotoksičnosti, nije ustanovljena citotoksičnost. Rezultati su pokazali da nije došlo do oksidativnog stresa u stanicama te se antioksidacijski enzimi nisu aktivirali. Polifenolni spojevi iz ekstrakata biljaka pod optimiziranim uvjetima uglavnom ne prolaze crijevnju barijeru, već se akumuliraju u stanicama crijeva. Zaključci mogu biti korisni za razvoj daljnjih pojedinačnih metoda pripreme stanične linije u validacijske svrhe i daljnja istraživanja propusnosti biološki važnih spojeva iz hrane kroz crijevo.

Ključne riječi: apsorpcija; Caco-2 stanice; polifenoli; citotoksičnost; antioksidacijski kapacitet (53 stranica, 24 slika, 17 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Komentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Šola

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Domagoj Đikić

dr. sc. Damir Sirovina, v. pred.

prof. dr. sc. Mirta Rubčić

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Optimization of conditions for permeation studies of plant bioactive compounds through a 2D model of Caco-2 cells monolayer

Laura Filipec

Ravnice 48, 10000 Zagreb, Croatia

The Caco-2 cell line derived from human colon cancer is used to evaluate the permeability of biologically active compounds under in vitro conditions that simulate the passage of molecules and absorption in the intestine. The two-dimensional (2D) cell model of Caco-2 culture is performed in double wells, where the cells are seeded on a semi-permeable membrane that simulates enterocytes in the intestines and allows certain biological molecules to pass from one chamber to the other. The antioxidant capacity and bioavailability of molecules from the group of polyphenols were analyzed using the aforementioned cellular model. It took 17 days for the differentiation of Caco-2 cells and the formation of a 2D monolayer. The neutral red test, which is a more suitable test than the MTT test for measuring cytotoxicity, did not detect cytotoxicity. The results showed that there was no oxidative stress in the cells and the antioxidant enzymes were not activated. Under optimized conditions, polyphenolic compounds from plant extracts generally do not cross the intestinal barrier, but instead accumulate in the intestinal cells. The conclusions may be useful for the development of further individual cell line preparation methods for validation purposes and further research on the permeability of biologically important compounds from food through the intestine.

Keywords: absorption; Caco-2 cells, polyphenols; cytotoxicity; antioxidation capacity
(53 pages, 24 figures, 17 tables, 68 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Domagoj Đikić, PhD

Co-mentor: Assoc. Prof. Ivana Šola, PhD

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Damir Sirovina, PhD

Prof. Mirta Rubčić, PhD

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Stanični model Caco-2.....	1
1.2.	Polifenoli.....	2
1.2.1.	Biološka aktivnost polifenola.....	3
1.2.2.	Biodostupnost polifenola.....	4
1.3.	Brokula (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>).....	5
1.3.1.	Kemijski sastav brokule	6
1.4.	Mirta (<i>Myrtus communis</i> L.).....	8
1.4.1.	Kemijski sastav mirte	9
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3.	MATERIJAL I METODE.....	11
3.1.	Kemikalije, materijali i ostalo.....	11
3.1.1.	Uređaji korišteni za potrebna mjerenja.....	12
3.1.2.	Biljni ekstrakti	12
3.2.	Stanične kulture.....	15
3.2.1.	Odmrzavanje stanica i uzgoj.....	15
3.2.2.	Presadivanje stanica.....	16
3.2.3.	Brojanje stanica	17
3.3.	Stanični testovi in vivo.....	18
3.3.1.	Određivanje citotoksičnosti praćenjem promjene vijabilnosti stanica.....	18
3.4.	Određivanje antioksidativnih markera.....	21
3.4.1.	Metoda BCA.....	22
3.4.2.	Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze	23
3.4.3.	Mjerenje aktivnosti glutaciona.....	23
3.4.4.	Mjerenje aktivnosti katalaze.....	24
3.5.	HPLC analiza prometa polifenolnih spojeva kroz membranski jednosloj.....	24
3.5.1.	Prikupljanje uzoraka za HPLC analizu.....	24
3.5.2.	Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti – HPLC.....	25
3.6.	Analiza rezultata i statistička obrada.....	26
4.	REZULTATI.....	27
4.1.	Optimizacija rasta stanica i stvaranje monosloja Caco-2 stanica.....	27
4.2.	Citotoksični učinak.....	29
4.3.	Antioksidativni markeri.....	32
4.4.	HPLC analiza prometa fenolnih spojeva kroz membranski jednosloj.....	35
5.	RASPRAVA.....	44

5.1.	Optimizacija rasta stanica i stvaranja monosloja Caco-2 stanica.....	44
5.2.	Citotoksični učinak.....	45
5.3.	Antioksidativni markeri.....	45
5.4.	HPLC analiza prometa fenolnih spojeva kroz membranski jednosloj.....	45
6.	ZAKLJUČAK.....	47
7.	LITERATURA.....	48
8.	ŽIVOTOPIS.....	53

Popis kratica

Caco-2 (eng. colon carcinoma) - karcinom debelog crijeva

dH₂O – destilirana voda

DMEM (eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium) - Dulbeccov minimalni esencijalni medij

DMSO (eng. dimethyl sulfoxide) - dimetil-sulfoksid

FCS (eng. fetal calf serum) - fetalni teleći serum

GSH - glutation

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) – puferska otopina

HPLC (eng. high performance liquid chromatography) - tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

min – minuta

mL – mililitar

mmol/L – milimol po litri

MTT test - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid test

NEAA (eng. non-essential amino acids) - neesencijalne aminokiseline

PBS (eng. phosphate-buffered saline) - fosfatni pufer

PEN-STREP – penicilin-streptomycin

PI – inhibitori proteaza

rpm (eng. revolutions per minute) – broj okretaja u minuti

SOD – superoksid dismutaza

s.tv. – suha tvar uzorka

XO – ksantin oksidaza

µg - mikrogram

µL – mikrolitar

2D - dvodimenzionalno

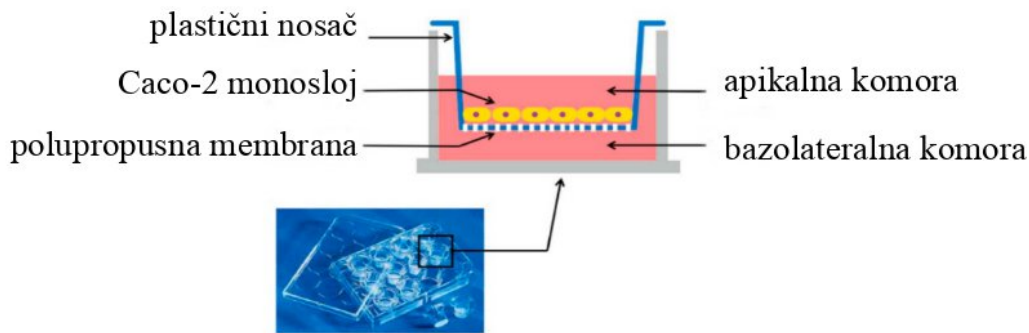
1. UVOD

1.1. Stanični model Caco-2

Stanična linija Caco-2 izvedena iz ljudskog karcinoma debelog crijeva obično se koristi za procjenu propusnosti spojeva u *in vitro* uvjetima (Kus i sur. 2024). Metoda propusnosti pomoću modela Caco-2 stanica smatra se najreprezentativnijom metodom za simulaciju procesa crijevnog apsorpcije kao što su transcelularni transport, paracelularni transport i neki aspekti aktivnog transporta (Caco-2 Permeability Assay 2024). Zbog navedene prednosti te jednostavnosti, stanični model Caco-2 izvrstan je model crijevnog apsorpcije lijekova i drugih spojeva u ljudi (van Breemen i Li 2005) koji je postao vodeći u studijama procjene propusnosti spojeva. Monosloj stanica Caco-2, u mnogim aspektima, oponaša ljudski crijevni epitel te simulira stanice crijeva s formiranim mikrovilima koje reguliraju prodiranje lijekova i funkcionalnih ekstrakata iz intestinalnog lumena kroz polupropusnu membranu u krvotok (Iftikhar i sur. 2020). No, postoji razlika između stanica Caco-2 i ljudskih enterocita. Glavna funkcionalna razlika između stanica Caco-2 i normalnih crijevnih stanica je nedostatak ekspresije izoenzima citokroma P450, posebno CYP3A4 u stanicama Caco-2 (Caco-2 Permeability Assay 2024). Kada se uzgajaju kao monosloj, Caco-2 stanice se diferenciraju kako bi formirale čvrste spojeve između stanica te poslužile kao model pasivne difuzije kroz monosloj.

Standardna dvodimenzionalna (2D) kultura stanica temelji se na adheziji stanica na ravnu površinu, tipično Petrijeve zdjelice ili na staklo polistirena. Stanice rastu u monosloju zbog čega su jednako izložene mediju s hranjivim tvarima što rezultira homogenim rastom i proliferacijom (Duval 2017). 2D kultura je jednostavna, jeftina, laka za interpretaciju te je omogućila bolje razumijevanje mehanizama rasta tumorskih stanica. Stanice Caco-2, uzgajane u 2D modelu stanične kulture, smatraju se referentnim staničnim modelom kojim se imitira crijevna barijera *in vitro*. Ovakav stanični model služi za procjenu apsorpcije tvari kroz crijevo i za procjenu pasivne propusnosti tvari.

Monosloj stanica Caco-2 obično se uzgaja na polupropusnim plastičnim nosačima koji se mogu ugraditi u jažice ploča s više jažica te se tako izdvajaju gornja (apikalna) komora i donja (bazolateralna) komora (slika 1) (van Breemen i Li 2005).



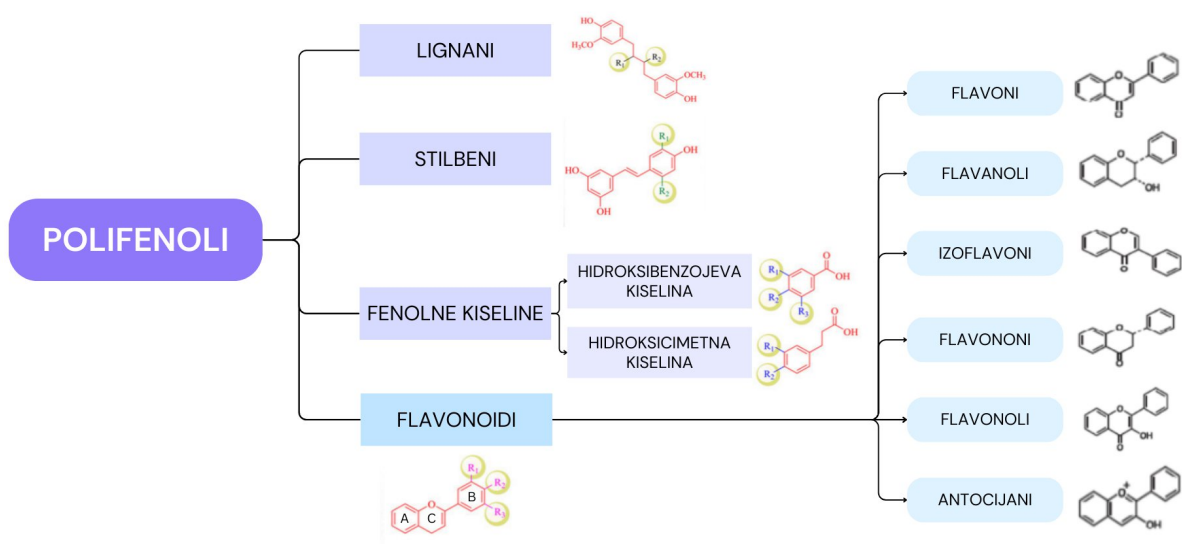
Slika 1. Shematski prikaz Caco-2 staničnog modela (Ding X. M. i sur. 2020) (preuzeto i prilagođeno s <https://www.profacgen.com/>).

1.2. Polifenoli

Polifenoli su jedna od najčešće zastupljenih skupina specijaliziranih metabolita u biljkama, a njima posebice obiluju aromatične biljke (Shahidi i Yeo 2018). Do danas je poznato oko 8000 polifenolnih sastavnica te ih to čini jednom od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi (Radojčić Radovniković i sur. 2016). Također predstavljaju jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanasa (Kurtagić 2017) te štite biljku od nametnika i ultraljubičastog zračenja. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstena koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih skupina, a mogu naći u slobodnom obliku ili češće u obliku glikozida (Kurtagić 2017). Zbog njihove velike raznovrsnosti, klasifikacija ovih spojeva je doista složena, a pojednostavljena podjela prikazana je na slici 2. S obzirom na njihovu osnovnu kemijsku strukturu mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide. Glavne podskupine flavonoida su flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni, flavanoni i antocijani (Pandey i Rizvi 2009; Manach i Scalbert 2004). Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe od flavonoida i dijele se na fenolne kiseline, stilbene i lignane (Katalinić i sur. 2010). Flavonoidi su dobro proučena skupina polifenola (identificirano ih je oko 4000), a njihova prisutnost u biljkama odgovorna je za atraktivne i privlačne boje cvjetova, voća i lišća (Cartea i sur. 2011; Pandey i Rizvi 2009). Najčešći predstavnici flavonoida u prehrani su kvercetin, miricetin, katehini i drugi (Pandey i Rizvi 2009). Fenolne kiseline se u biljkama nalaze u visokom udjelu te se dijele na derivate benzoične te derivate cimetine kiseline od kojih su hidroksicimetine kiseline češće (Pandey i Rizvi, 2009; Manach i Scalbert 2004). Najčešće fenolne kiseline prisutne u biljkama su *p*-kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapinska kiselina (Pandey i Rizvi 2009;

Manach i Scalbert 2004). Lignani su difenolni spojevi te se ponajviše pronalaze u uljanim sjemenkama (Pandey i Rizvi 2009), a prisutnost stilbena u ljudskoj prehrani prilično je niska (Pandey i Rizvi 2009).

Za analizu mogućnosti apsorpcije i biodostupnosti ovih spojeva u istraživanju korišten je standardizirani ekstrakt mirte (*Myrtus communis* L.) i ekstrakt brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*).

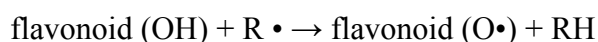


Slika 2. Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura na glavne skupine i nekoliko podskupina

1.2.1. Biološka aktivnost polifenola

Biološki utjecaji polifenola prvenstveno se vežu uz antioksidacijsko djelovanje (Dizdar 2020). Polifenoli se uz metabolite vitamin C, vitamin E i karotenoide ubrajaju u direktne antioksidanse jer imaju sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala (Kopjar i sur. 2012). Mnoga istraživanja pokazuju da spojevi polifenola, većinom antocijani, fenolne kiseline i flavonoidi, imaju antioksidativni učinak (Aleksić i Knežević 2014). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina i flavonoida ovisi o broju i položaju fenolnih hidroksilnih skupina u aromatskom prstenu (veći broj hidroksilnih skupina dovodi do veće antioksidacijske aktivnosti) (Duthie i Crosier 2000; Cartea i sur. 2011). Antioksidacijska aktivnost fenolnih sastojaka pripisuje se njihovim redukcijskim

svojstvima jer djeluju kao reducirajući agensi (donori vodika) (Rice-Evans i sur. 1995). Polifenoli su jaka antioksidacijska sredstva jer potaknu aktivaciju antioksidacijskih enzima i inhibiciju vezanja radikala sa slobodnim ionima u organizmu (Kamenjašević i sur. 2019). Flavonoidi, zbog sposobnosti hvatanja elektrona slobodnog radikala, imaju veliku ulogu u sprječavanju šteta u stanici tako da se flavonoidi oksidiraju slobodnim radikalima te time nastaje spoj manje reaktivnog oblika prema sljedećem mehanizmu (Ioannou i Ghoul 2012):



Polifenoli imaju važnu ulogu u obrani ljudskog organizma od reaktivnih oksidacijskih vrsta koji su naposljetku uzročnici mnogih bolesti kao što je ateroskleroza, ishemijska srčana bolest, rak te Alzheimerova i Parkinsonova bolest. U skladu s time, polifenoli štite organizam od oksidacijskih oštećenja koja dovode do neurodegenerativnih bolesti. Prehrana bogata flavonoidima (sok od grožđa, borovnice, kakao) pokazala je pozitivan učinak u kognitivnoj izvedbi (Del Rio i sur. 2013).

Ekstrakti bogati kvercetinom i kempferolom pokazali su učinkovito inhibiranje rasta nekih Gram-pozitivnih bakterija koji su respiratorni patogeni kod ljudi (Ayaz i sur. 2008). Flavonoidi kvercetin, kempferol i izorhamnetin imaju protuupalni učinak na aktivirane makrofage, a zbog dokazanih vazodilatacijskih svojstava izorhamnetina ukazuje se zaštita od kardiovaskularnih bolesti (Garcia-Lafuente i sur. 2009).

Polifenoli pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, od kojih razlikujemo antibakterijsku, protuupalnu, antialergijsku, antitrombotičnu, antivirusnu, antikarcinogenu, hepatozaštitnu i vazodilatatornu aktivnost, a koriste se i u liječenju bolesti probavnog sustava te kao analgetici i sredstva za zacjeljivanje rana (Asgarpanah i Ariamanesh 2015).

1.2.2. Biodostupnost polifenola

Unatoč brojnim dokazima i istraživanjima o pozitivnim učincima polifenola u prevenciji raznih bolesti današnjice, zaštitni učinci ovise o samoj biodostupnosti polifenolnih spojeva u organizmu. Kako bi polifenolni spojevi mogli djelovati svojim svojstvima, moraju biti dostupni u organizmu. Naime, biodostupnost polifenola je relativno niska zbog slabe apsorpcije u probavnom sustavu. Njihova apsorpcija ovisi o raznim čimbenicima kao što su vrsta spoja, kemijska struktura spoja, molekulska masa spoja, veličina i topljivost molekule, opseg konjugacije, metaboličke reakcije koje prolaze polifenoli, biološki faktori (permeabilnost membrane) te naravno individualnost

crijevne mikrobiote (Shivashankara i Acharya 2010). Nedavna istraživanja potvrđuju da će se od ukupnog unosa polifenola u organizam samo oko 5 % apsorbirati u tankom crijevu, a ostalih 95 % će se apsorbirati u lumenu debelog crijeva te će daljnja razgradnja i apsorpcija ovisiti o mikroflori crijeva (Cardona i sur. 2013). Većina flavonoida u hrani se nalaze u obliku glikozida, a tip šećerne jedinice znatno utječe na apsorpciju pojedinih flavonoida u tankom crijevu. Kuhanjem hrane koja sadrži polifenole, smanjuje se njihova količina, ali se povećava biodostupnost nutrijenta u organizmu. Primjerice, likopen se lakše apsorbira iz obrađene rajčice (čak tristo puta više) nego likopen iz svježne neobrađene rajčice (Shivashankara i Acharya 2010).

1.3. Brokula (*Brassica oleracea* var. *italica*)

Brokula (*Brassica oleracea* var. *italica*) je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici *Brassicaceae*. U porodicu *Brassicaceae* ubrajaju se i kupus, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa i gorušica (Kopjar i sur. 2012). Ime brokule dolazi od latinske riječi *bracchium* što u prijevodu znači jaka ruka ili grana, a taj naziv zahvaljuje izgledu svojih izdanaka (Radojčić Redovniković i sur. 2016). Brokula se prepoznaje po zelenim cvjetnim izdancima na razgranatoj stabljici i po mnoštvu razdijeljenih listova (slika 3). Brokula potječe iz Male Azije, s područja Turske, odakle je stigla u Italiju još tijekom rimskog doba (Fabek 2008). U Hrvatskoj je brokula stigla na područje Dubrovnika te se tek ranih godina 20. stoljeća proširila i u središnje dijelove Hrvatske.

Izvrstan je izvor bioaktivnih spojeva - glukozinolata, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i vitamina (Kamboj i sur. 2023; Vallejo i sur. 2004.) te se zbog visokih udjela navedenih spojeva smatra funkcionalnom hranom.

U posljednje vrijeme, široko se istražuje fitokemijski sastav brokule i povrća iste porodice zbog prisutnosti metabolita koji imaju vrijedan doprinos na zdravlje čovjeka što je direktno povezano s pozitivnim biološkim aktivnostima prisutnih sastojaka.



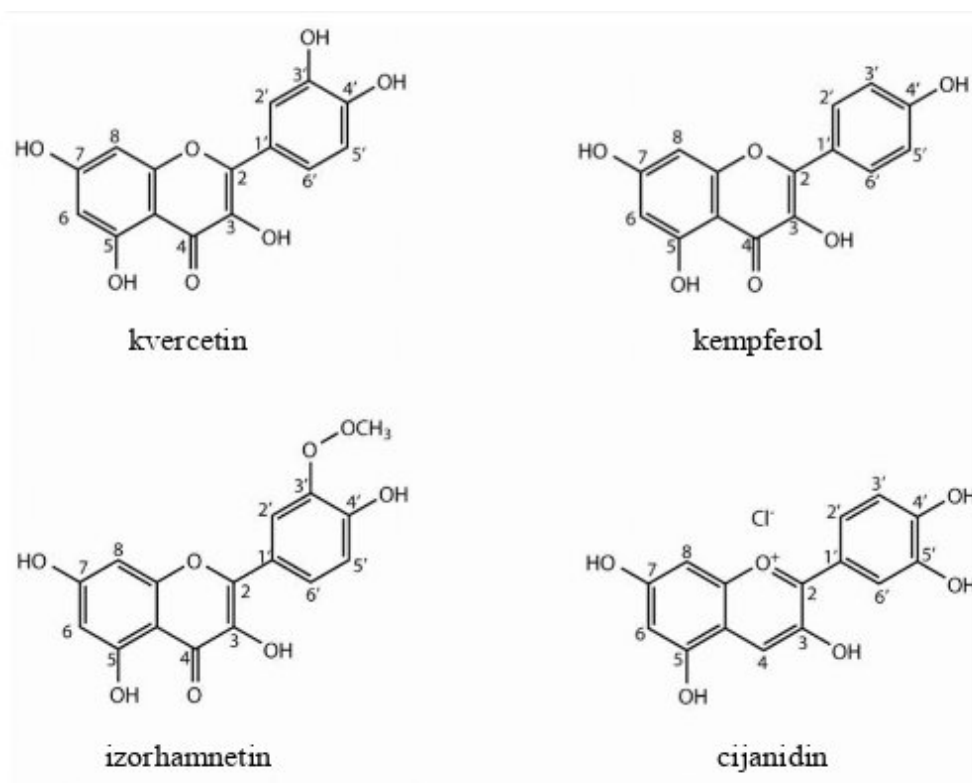
Slika 3. Brokula (*Brassica oleracea* var. *italica*)
(autor Pao Y. (2015) preuzeto s <https://pixabay.com/>)

1.3.1. *Kemijski sastav brokule*

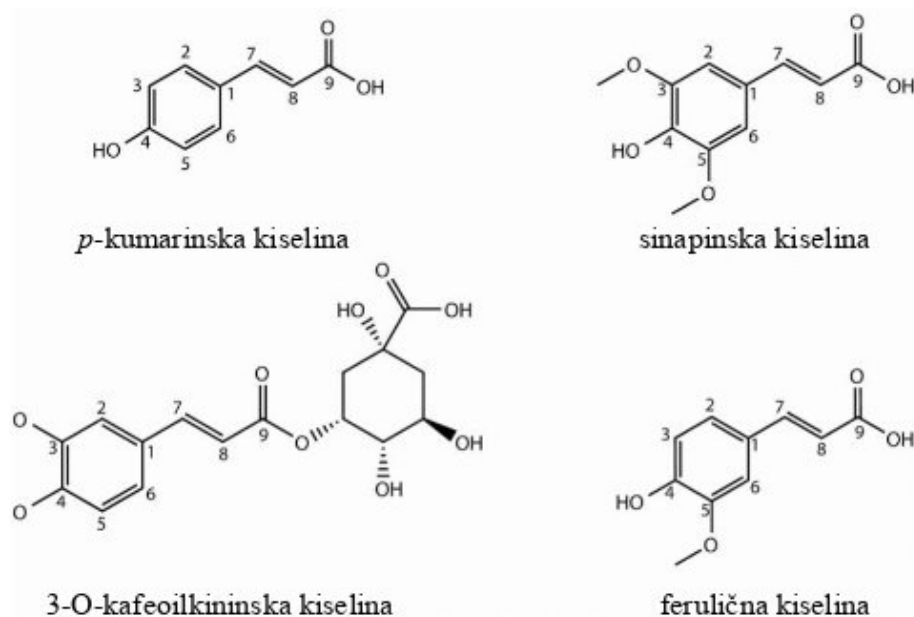
Brokula je bogat izvor nutritivnih sastojaka kao što su vlakna, vitamini (A, C i K), minerali (kalij, kalcij i željezo) i antioksidansi. Također sadrži razne bioaktivne tvari poput brojnih glukozinolata i njihovih razgradnih produkata te polifenola koji imaju značajne uloge u prevenciji i zaštiti zdravlja (Syed i sur. 2023).

Brokula sadrži polifenolne spojeve. U kupusnjača najčešće su *p*-kumarinska, sinapinska i ferulična kiselina koje se često nalaze u konjugaciji sa šećerom ili drugim hidroksicimetnim kiselinama. Kvantitativno najzastupljeniji polifenolni spojevi su flavonoli, kvercetin, kempferol i izorhamnetin, koji se najčešće se nalaze kao O-glikozidi (Cartea i sur. 2011). Fenolni ekstrakti brokule složene su smjese flavonolnih glikozida (kvercetina i kempferol-3-O-soforozida kao glavnih flavonola i izokvercetina, kempferol-3-O-glukozida i kempferol diglukozida u manjim količinama) te derivata hidroksicimetnih kiselina (Vallejo i sur. 2002).

Radojčić Redovniković i sur. (2016) u svom istraživanju utvrdili su da je udio polifenolnih spojeva u uzorcima brokule u rasponu od 9,70-16,11 mg g⁻¹ s. tv. u stabljici, od 17,65-31,08 mg g⁻¹ s. tv. u cvatu i od 22,27-34,02 mg g⁻¹ s.tv. u listu brokule.



Slika 4. Najzastupljeniji flavonoidi prisutni u kupusnjačama (preuzeto i prilagođeno iz rada autora Cartea i sur. 2011).



Slika 5. Najzastupljenije fenolne kiseline prisutne u kupusnjačama (preuzeto i prilagođeno iz rada autora Cartea i sur. 2011).

1.4. Mirta (*Myrtus communis* L.)

Mirta je endemska biljna vrsta porodice *Myrtaceae*, a reda *Myrtales*. U Flora Croatica Database za mirtu se upotrebljavaju razni nazivi poput obična mrča, obična mirta, murta, mrčika, martvina, martva, mrča, mrčica, mrtvina, rujevika, marta, mrčela (Nikolić 2024). Mirta je zimzeleni grm ili nisko stablo visine 1,5-3 m (Fadda i Mulas, 2010) s manjim tamnozelenim listovima ovalnog oblika (slika 6). Cvjetovi mirte su aksilarni i bijeli, a plodovi su bobice tamnoplave do crne boje okruglastog oblika (Asif i sur. 2011). Specifična aroma biljke potječe od eteričnih ulja koja se nalaze u listovima, cvjetovima i plodovima (Aydin i Özcan 2007). Jovančević (1980) navodi da podrijetlo mirte potječe iz Indije odakle je donesena na područje zapadne Azije, južne Europe i sjeverne Afrike te je široko rasprostranjena u Turskoj, Italiji, Grčkoj, Tunisu, Alžiru i Maroku (Sumbul i sur. 2011). Tipična je samonikla voćna vrsta koja raste u južnoj Europi na mediteranskom području (Duralija i sur. 2021), a u Hrvatskoj rasprostranjena u srednjoj i južnoj Dalmaciji u ekosustavu makije.

Mirta je izrazito bogata taninima, flavonoidima i hlapljivim uljima čija su svojstva temelj za ljekovita svojstva biljke. Mirta se upotrebljava u medicinskim i terapijskim svrhama već stoljećima (Dabbaghi i sur. 2023), a Asgarpanah i Ariamanesh (2015) navode kako se mirta u iranskoj narodnoj medicini koristila za razna infektivna i upalna oboljenja poput plućnih poremećaja te kod gljivičnih infekcija. U današnje vrijeme plodovi mirte najčešće se koriste u pripravi marmelada, džemova i alkoholnih pića (vina i likera) te u medicini i farmaceutskoj industriji, a listovi u kozmetičkoj industriji i industriji parfema. U brojnim istraživanjima potvrđeno je kako mirta ima pozitivne učinke poput antimikrobnih, protuupalnih, antitumornih i ostalih učinaka na ljudsko zdravlje (Alipour i sur. 2014; Asgarpanah i Ariamanesh 2015).



Slika 6. Plodovi (lijevo) i cvjetovi (desno) mirte (*Myrtus communis* L.) (autor Barra 2012 (slika lijevo) i Starr i Starr 2012 (slika desno) preuzeto s <https://www.plantea.com.hr/>).

1.4.1. Kemijski sastav mirte

U kemijskom sastavu mirte najveći udio ekstrakta mirte čine fenolni spojevi. Sastav polifenola u ekstraktu mirte može značajno varirati, a ovisi o dijelu biljke uzetom za ekstrakciju, otapalu te metodi ekstrakcije (Handa i sur. 2008). Polifenolni sastojci mirte uključuju kiseline poput galne, elaginske, kafeinske, vanilinske, siringinske i ferulične, a identificirani flavonoidi su miricetin, kvercetin, katehin te tanini koji uključuju hidrolizirane tanine (galotanini) i proantocijanidine (Aleksić i Knežević 2014). U tablici 1. prikazani su udjeli najzastupljenijih fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu mirte.

Tablica 1. Glavni sastojci (%) u vodenom ekstraktu mirte (*Myrtus communis* L.)

TRIVIJALNO IME	%	REFERENCA
Miricetin-3-O-ramnozid	36,38	Berendika i sur. 2022
Miricetin-3-O-galaktozid	33,20	
Miricetin	14,48	
5-O-galokininska kiselina	7,96	
Kafeinska kiselina	1,81	
Katehin	0,05	
Elaginska kiselina	0,03	
Kvercetin	0,25	

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je optimizirati uvjete za studije propusnosti kroz monosloj Caco-2 stanica, tj. standardizirati glavne aspekte upotrebe 2D modela stanične kulture za analizu razine učinkovitosti jednoslojnog prijenosa, citotoksičnosti spojeva, procesa diferencijacije stanica i antioksidacijskog djelovanja spojeva.

Specifični ciljevi istraživanja su odrediti:

1. vrijeme (u danima) koje je potrebno za provedbu procesa diferencijacije stanica u funkcionalni crijevni monosloj s apikalnom i bazalnom stranom stanica i formiranje mikrovila na stanicama.
2. razinu aktivacije antioksidacijskog djelovanja biomolekula apliciranih spojeva iz biljnih ekstrakata.
3. vrijeme i selektivno propuštanje pojedinih tipova biomolekula iz biljnih ekstrakata koji prolaze kroz jednosloj što simulira apsorpciju iz probavila u krvotok putem crijevnog epitela.
4. doze ekstrakata koje prelaze pozitivne učinke i uzrokuju eventualnu citotoksičnost stanica crijeva u 2D modelu.

Zaključci će biti korisni za razvoj daljnjih pojedinačnih metoda pripreme stanične linije u validacijske svrhe i daljnja istraživanja propusnosti biološki važnih spojeva iz hrane kroz crijevo.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kemikalije, materijali i ostalo

Kemikalije i materijali za pripremu i diferencijaciju stanica:

- Fosfatni pufer (PBS) koristila sam za ispiranje posuda za rast stanica tijekom uklanjanja starog medija.
- PBS+PI (kombinacija fosfatnog pufera i inhibitora proteaza) koristila sam za pripremu standarda u metodi BCA.
- Dimetil-sulfoksid (DMSO, Kemika, Zagreb) koristila sam za otapanje kristalića tijekom MTT metode.
- Otopina tripsin-EDTA (0,25% tripsina, 10 mM EDTA u PBS-u) koristila sam za odvajanje stanica od podloge.
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) koristila sam kao medij.
- Otopina boje tripan plavo (Invitrogen, USA) koristila sam za diferencijalno bojenje kod određivanja broja živih i mrtvih stanica.
- FCS (Fetalni teleći serum, Sigma-Aldrich, Njemačka) - 20% FCS inaktiviranog toplinom, odnosno 2 mL/10 mL (na 20 mL dodano 4 mL seruma) koristila sam za pripremu medija za nasađivanje stanica.
- DMEM (Dulbeccov modificirani Eagleov medij, Sigma-Aldrich, Njemačka) s L-glutaminom i 4,5 g/L glukoze koristila sam za pripremu medija za nasađivanje stanica.
- 1% PEN-STREP (Sigma-Aldrich, Njemačka) otopina penicilina 10,000 U/mL i streptomicina 10,000 U/mL, odnosno 100 µL/10 mL koristila sam za pripremu kompletnog medija za nasađivanje stanica.
- 1% NEAA (neesencijalne aminokiseline, Sigma-Aldrich, Njemačka) 100x (100 µL/10 mL) koristila sam za pripremu kompletnog medija za nasađivanje stanica.
- 70%-tni etanol
- Multikanalna pipeta
- Pipeta
- Pinceta

Kemikalije i materijali potrebni za mjerenje oksidativnog stresa:

- Standard BSA koncentracije 2 mg/mL koristila sam za pripremu standarda u metodi BCA

- Otopina A za SOD (190 mL 0,05 mM citokroma c i 19 ml 1 mM ksantina (omjer 10:1))
- Otopina enzima ksantin oksidaze (40 μ L XO + 960 μ L dH₂O)
- GSH standard (200 μ M)
- Otopina A za GSH - 10 mM DTNB (Ellmanov reagens) pripremila sam otapajući 20 g DTNB u do 5 mL pufer 0,5 M PBS s 0,25 M EDTA (smjesa za 100 uzoraka)
- Otopina B za GSH - 9980 μ L 0,8 mM NADPH (6,67 mg NADPH sam otopila u do 10 mL 0,5 M PBS s 0,25 M EDTA) + 20 μ L glutation reduktaze (smjesa za 100 uzoraka)
- Otopina 10 mM H₂O₂ (50 mL dH₂O + 51 μ L 9,8 M H₂O₂)
- Stanični lizati ljudskih stanica Caco-2
- Multikanalna pipeta
- Pipeta

3.1.1. Uređaji korišteni za potrebna mjerenja

Spektrofotometrijska mjerenja provela sam na čitaču mikrotitarskih pločica Infinite M Plex (Tecan Group Ltd., Švicarska).

Za određivanje broja živih i mrtvih stanica u suspenziji koristila sam Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, SAD).

Centrifugiranje staničnih lizata provela sam na stolnoj centrifugi Centrifuge 5424 (Eppendorf, Njemačka).

Homogenizaciju staničnih lizata Caco-2 provela sam na sonikatoru (Bandelin, Njemačka).

Analiza fenolnih spojeva u biljnim ekstraktima provedena je na tekućinskom kromatografu Agilent Series 1100, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD).

3.1.2. Biljni ekstrakti

Ekstrakti mirte pripremljeni su u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu, a ekstrakti brokule u Laboratoriju za fitokemiju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Metodom RP-HPLC sam razdvojila, identificirala i kvantificirala pojedinačne spojeve od interesa.

3.1.2.1. Ekstrakcija i određivanje udjela fenolnih spojeva u uzorku mirte

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzoraka mirte provedena je pomoću 30 % vodene otopine etanola (v/v). Uzorak (10 g) je pomiješan sa 100 mL 30 % etanola i postupak ekstrakcije je proveden u mućkalici vodene kupelji na 60 °C tijekom 20 minuta. Proces ekstrakcije je ponovljen u nekoliko serija koje su kombinirane, a kombinirani ekstrakt je uparen do volumena od 200 mL na vakuumskom koncentratoru (Thermo Scientific Savant SPD2010 SpeedVac® Concentrators, SAD), kako bi se postigla ciljana ukupna koncentracija fenola u konačnom ekstraktu od oko 50 g GAE/L. Dobiveni ekstrakt je vodeni ekstrakt; etanol je ispario tijekom procesa koncentriranja ekstrakta. Dobiveni ekstrakt korišten je za određivanje ukupnih fenola (TPC) i HPLC analizu.

Fenolni spojevi u ekstraktima mirte procijenjeni su spektrofotometrijskim određivanjem Folin-Ciocalteu metodom. Alikvot (100 µL) svakog ekstrakta uzorka kratko je pomiješan s 200 µL Folin–Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute, u smjesu je dodana 20% otopina natrijevog karbonata (1 mL), ostavljena 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku uz povremeno mućkanje, a apsorbancija je izmjerena na 765 nm (Shimadzu, Japan). Isti postupak ponovljen je za standardne otopine galne kiseline. Ukupni sadržaj fenola izračunat je prema standardnoj kalibracijskoj krivulji galne kiseline ($y = 0,0035x$, $R^2 = 0,9995$) pripremljenoj iz radnih standardnih otopina u rasponu koncentracija od 50 do 500 mg/L u tri primjerka i izražen je na bazi svježje mase kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/100 g uzorka.

3.1.2.2. Ekstrakcija i određivanje udjela fenolnih spojeva u uzorku brokule

Ekstrakti koncentracije 30 mg/mL pripremljeni su u 70 %-tnom etanolu na sljedeći način: na analitičkoj vagi je izvagana masa od 30 mg liofiliziranih klijanaca te je na tkivo dodano otapalo do volumena od 1 ml. Uzorci su inkubirani 1 sat pri sobnoj temperaturi na vrtložnoj miješalici pri 20 okretaja u minuti, a potom centrifugirani na sobnoj temperaturi 5 minuta pri 5000 rpm. Supernatanti su odvojeni u čiste epruvete i pohranjeni na - 20 °C do daljnjih analiza.

Za određivanje udjela ukupnih fenola korištena je metoda s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom prema Zhishen i sur. (1999). U epruvetu je otpipetirano 790 µL deionizirane vode, 5 µL 30 mg/mL etanolnog ekstrakta brokule i 50 µL FC reagensa. Kao kontrola otpipetirane su sve navedene komponente, s tim da je umjesto ekstrakta brokule korišten 70 %-tni etanol. Navedeni sadržaj je

promiješan na vrtložnoj miješalici. Nakon toga je otpipetirano 150 μL 1,88 M vodene otopine Na_2CO_3 , zatim opet promiješano na vrtložnoj miješalici te inkubirano 30 minuta pri 45 $^\circ\text{C}$. Na mikrotitarsku pločicu otpipetirano je po 200 μL svake otopine u tetraplikatu. Apsorbancija je očitana spektrofotometrom FLUOstar Optima na valnoj duljini od 734 nm. Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima brokule određena je očitavanjem s baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline u rasponu koncentracija od 0,01 do 1,00 mg/mL pri istoj valnoj duljini. Baždarni pravac prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 734 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline.

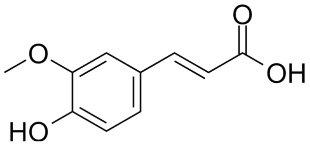
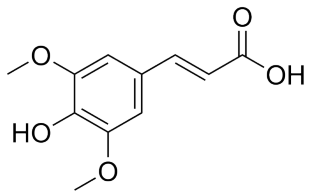
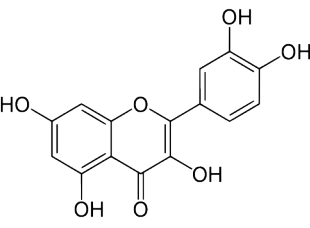
Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu: $y = 0,5163x + 0,0317$; $R^2 = 0,9927$

pri čemu je:

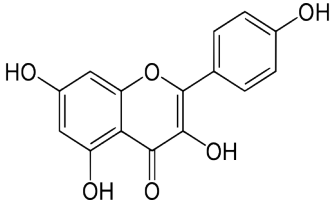
y – apsorbancija pri 734 nm

x – masena koncentracija galne kiseline.

Tablica 2. Ispitani spojevi u biljnim ekstraktima mirte i brokule

Naziv spoja	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
FERULIČNA KISELINA		4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina
SINAPINSKA KISELINA		4-hidroksi-3,5- dimetoksicimetna kiselina
KVERCETIN		3,3',4',5,7- pentahidroksiflavinon

Tablica 2. nastavak

KEMPFEROL		3,4',5,7-tetrahidroksiflavon
-----------	---	------------------------------

3.2. Stanične kulture

Za istraživanje sam koristila certificirane stanične kulture: istraživanje je provedeno na uspostavljenim 2D kulturama stanica Caco-2 nabavljenim od kompanije CacoReady, Španjolska.

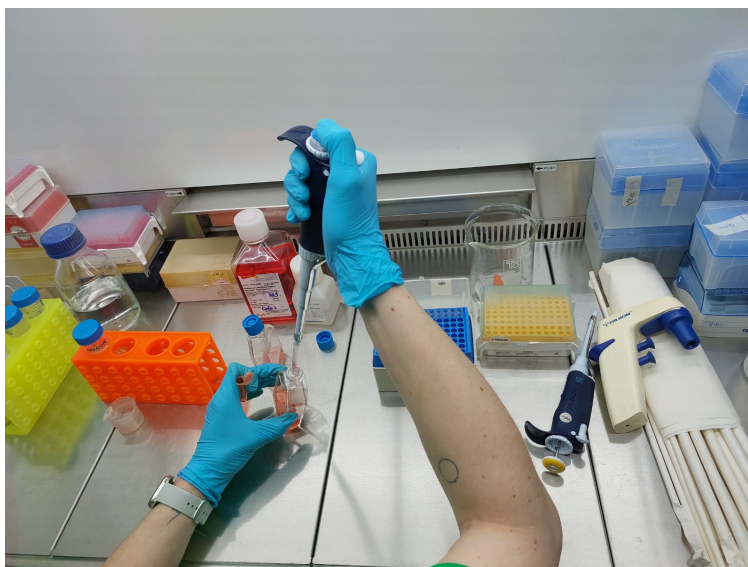
3.2.1. Odmrzavanje stanica i uzgoj

Stanice se čuvaju u spremniku s tekućim dušikom. Prije početka pokusa potrebno je odmrznuti vijalice sa stanicama, u vodenoj kupelji na 37 °C. U kupelji sam zagrijala i odgovarajući medij za uzgoj stanica DMEM (Dulbecco's Modified Eagle, Sigma-Aldrich, Njemačka) do optimalne temperature za rast stanica (37 °C).

U posudu za uzgoj stanica (250 mL) dodala sam 2 mL FBS seruma, 100 µL antibiotika PEN-STREP i 100 µL NEAA te dodala do 10 mL DMEM medija i otpipetirala 0,5 mL Caco-2 stanica u posudu. Isti postupak sam ponovila u novoj posudi za uzgoj stanica. Stanice sam uzgajala kao adherentnu kulturu u posudama za uzgoj pri kontroliranim uvjetima u inkubatoru za uzgoj (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C) u DMEM mediju uz dodatak 1 % otopine antibiotika penicilin-streptomicin (PEN-STREP, Sigma-Aldrich, Njemačka), 20 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka).

Nakon što su se stanice zalijepile za podlogu, tripsinizirala sam ih tako što sam 1 mL tripsina, dodala u posudu za uzgoj i stavila u inkubator na 37 °C uz 5 % CO₂ na 5 min. Prethodno sam izbacila stari medij iz posude i isprala posudu s 1 mL tripsina. Nakon 5 minuta, izbacila sam potrošeni tripsin i dodala 1 mL novog tripsina u posudu za uzgoj te ponovno stavila u inkubator na 37 °C dok se stanice nisu odvojile od podloge.

Nakon što su se stanice odvojile od podloge, u svaku posudu za uzgoj sam dodala 9 mL pripremljenog kompletnog medija te izdvojila 200 μ L stanica u mikroeprevetu s medijem za brojanje stanica. Zatim sam ostatak sadržaja stanica s medijem iz manjih posuda za uzgoj prebacila u veće posude za uzgoj te inkubirala pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C).



Slika 7. Priprema Caco-2 stanica za uzgoj u 250 mL posude za uzgoj uz 10 mL kompletnog DMEM medija (uz dodatak 1 % NEAA, 1 % PEN-STREP i 20 % FBS).

3.2.2. Presađivanje stanica

Sve postupke uzgoja stanica i presađivanja radila sam u sterilnim uvjetima, u laminaru s okomitim protokom zraka. Za presađivanje stanica u pločice s donjim (bazolateralnim) i gornjim (apikalnim) komorama pripremila sam kompletni DMEM medij (uz dodatak 1 % NEAA, 1 % PEN-STREP i 10 % FBS) i isti kompletni DMEM medij s Caco-2 stanicama.

U donje komore dodala sam 900 μ L pripremljenog DMEM medija, a u gornje komore s polupropusnom membranom dodala sam 300 μ L pripremljenog medija sa stanicama. Na pločicu sam stavila poklopac kako ne bi došlo do kontaminacije.

Caco-2 stanice su se diferencirale na Transwell umetcima sve dok nisu formirale barijeru sličnu crijevu, odnosno tijesan stanični monosloj koji sprječava prolaz medija između apikalne komore

i bazolateralne komore. Medij za rast stanica (kompletni DMEM medij) mijenjala sam u gornjim i donjim komorama dva puta tjedno.

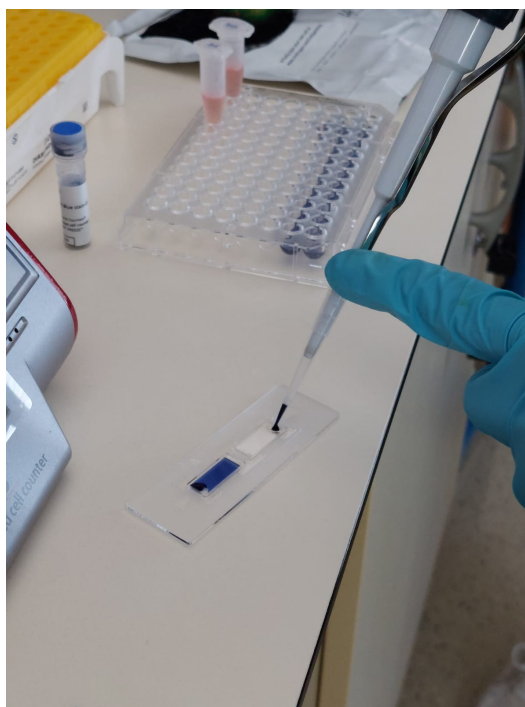


Slika 8. Pločica s donjim komorama u kojima se nalazi kompletni medij DMEM (uz dodatak 1 % NEAA, 1 % PEN-STREP i 10 % FBS seruma) i gornjim komorama s polupropusnom membranom u kojima se nalazi kompletni DMEM medij s Caco-2 stanicama.

U dvije pločice sa 6 jažica dodala sam u svaku jažicu 2 mL kompletnog DMEM medija sa stanicama te stavila pločice inkubirati na 37 °C uz 5 % CO₂ 24 sata. Sljedeći dan sam izbacila stari medij; dodala 500 µL PBS za ispiranje (izvaditi i baciti) te dodala 500 µL tripsina u svaku jažicu i stavila 15 min na inkubaciju. Nakon toga, prebacila sam sadržaj iz svake jažice u jednu mikroeprijetu i u svaku mikroeprijetu dodala 500 µL DMEM medija. Nakon toga centrifugirala sadržaj mikroeprijetu 15 min na 1500 okretaja. Nakon centrifugiranja, otpipetirala sam supernatant iz svake mikroeprijetu u nove pripadajuće mikroeprijetu koje će poslužiti za daljnji pokus za određivanje antioksidacijskog stresa u uzorcima.

3.2.3. Brojanje stanica

Kada su Caco-2 stanice postigle 80 % konfluencije, stanice sam tripsinizirala te sam odredila gustoću stanica uređajem za brojanje stanica. U pločicu s jažicama dodala sam 20 µL uzorka stanica te 20 µL boje Tripin-blue. Pipetom sam snažno resuspendirala sadržaj jažice. Pripremljenu otopinu dodala sam na pločicu za uzorkovanje i stavila u uređaj za brojanje stanica Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, SAD).



Slika 9. Priprema stanica za njihovo brojanje pomoću uređaja Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, SAD).

3.3. Stanični testovi in vivo

3.3.1. *Određivanje citotoksičnosti praćenjem promjene vijabilnosti stanica*

MTT-testom i Neutral red testom uzoraka ekstrakta brokule i mirte različitih koncentracija ispitala sam staničnu metaboličku aktivnost u uzorcima mjerenjem apsorbancija pomoću uređaja Infinite M. Plex.

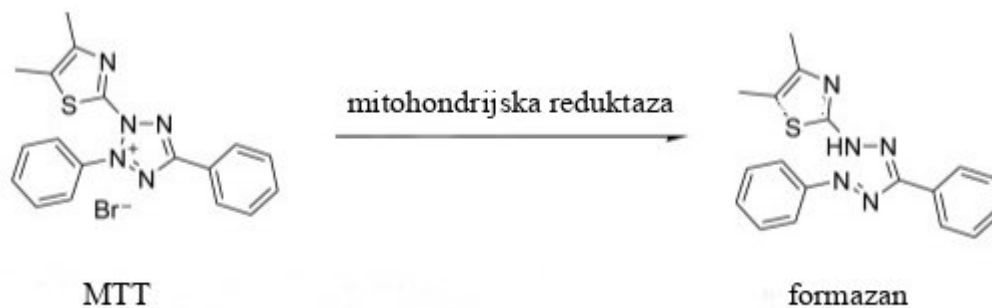
3.3.1.1. *MTT-test*

MTT test se koristi za mjerenje stanične metaboličke aktivnosti kao pokazatelja stanične vitalnosti, proliferacije i citotoksičnosti (MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation 2024). Postupak se temelji na redukciji žute tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid ili MTT) u ljubičaste kristale formazana pomoću metabolički aktivnih stanica (slika 10). Žive stanice sadrže enzime oksidoreduktaze ovisne o NAD(P)H koji reduciraju MTT u formazan (MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation 2024). Količina proizvedenog formazana izravno je proporcionalna broju živih stanica. Dakle, što je otopina

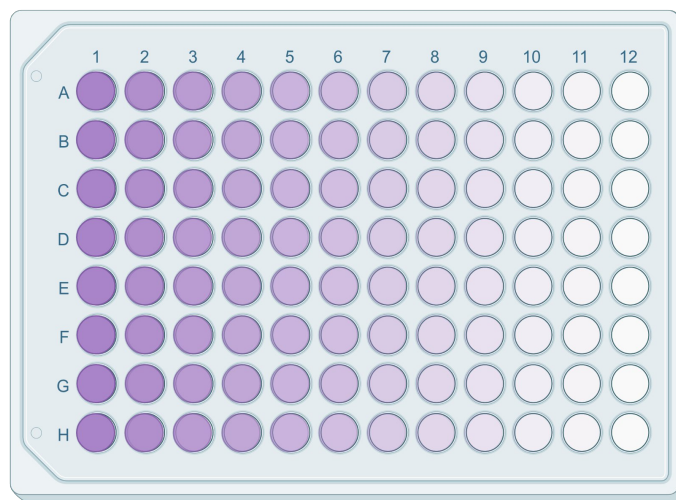
tamnija, to je veći broj živih metabolički aktivnih stanica. Gubitkom intenziteta ljubičaste boje otopine do bistre bezbojne otopine, smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica što je uzrokovano gubitkom enzimske aktivnosti oksidoreduktaze kod mrtvih stanica.

U MTT testu, postotak stanične održivosti izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\% \text{ preživljavanja} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{570\text{nm}}(\text{uzorak})}{\text{srednja vrijednost } A_{570\text{nm}}(\text{proba})} \times 100$$



Slika 10. Redukcija MTT-a do formazana djelovanjem mitohondrijske reduktaze iz stanica (preuzeto i prilagođeno iz poglavlja knjige autora Kuete V. i sur. 2017).



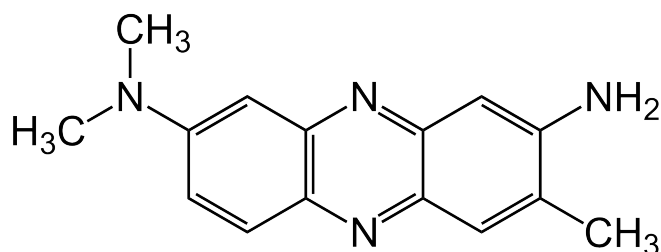
Slika 11. Primjer MTT testa izvedenog u mikroploči s 96 jažica. Kako se intenzitet ljubičastog signala smanjuje od trake 1 do trake 12, tako se smanjuje i broj živih, metabolički aktivnih stanica po jažici (preuzeto s <https://www.aatbio.com/>).

Protokol za MTT test: U ploču od 96 jažica, u prvih sedam redova (A-G) i devet stupaca (1-9) dodala sam 150 μ l kompletnog DMEM medija sa stanicama, a u zadnji H red sam dodala čisti kompletni DMEM medij. U pločicu s jažicama dodala sam 50 μ l ispitivanih spojeva različitih koncentracija prema tablici 3. Pločica se inkubira 1 h u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂. Nakon inkubacije, dodala sam 20 μ L MTT boje u svaku jažicu. Pločicu sam ponovno stavila inkubirati 30 min na 37 °C, zaštićeno od svjetlosti. Zatim sam dodala 20 μ l DMSO u svaku jažicu kako bi se otopili kristali formazana i izmjerila sam apsorbanciju na 570 nm u uređaju Infinite M. Plex proizvođača Tecan.

3.3.1.2. Neutral red

Neutral red test ili 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid test (slika 12) je kvantitativna procjena broja održivih stanica u kulturi (Repetto i sur. 2008.). Neutral red test se temelji na sposobnosti živih stanica da preuzmu i vežu neutralno crveno, boju koja lako prodire kroz stanične membrane putem neionske difuzije i apsorbira se u lizosomima, dok umiruće stanice imaju izmijenjena svojstva membrane i stoga više ne mogu vezati neutralno crveno (Neutral Red Uptake Assay 2022). Posljedično, žive stanice mogu se razlikovati od mrtvih ili umirućih na temelju unosa boje neutralno crveno pri čemu stanice sposobne za život sadržavaju više boje.

Protokol za Neutral red test: U ploču s 96 jažica, u prvih sedam redova (A-G) i devet stupaca (1-9) dodala sam 150 μ l kompletnog DMEM medija sa stanicama, a u zadnji H red sam dodala čisti kompletni DMEM medij. U pločicu s jažicama dodala sam 50 μ l ispitivanih spojeva različitih koncentracija prema tablici 3. Pločica se inkubira 1 h u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂. Nakon inkubacije, dodala sam 20 μ L neutral red boje u svaku jažicu. Pločicu sam ponovno stavila inkubirati 3 h na 37 °C. Nakon inkubacije uklonila sam neutral red otopinu iz jažice korištenjem PBS-a za otklanjanje viška boje koja se nije sjedinila sa stanicama. Dodala sam otapalo (50 %-tni etanol i 1 %-tna octena kiselina) i lagano tresla pločicu za odvajanje boje od stanica. Izmjerila sam apsorbanciju na 540 nm u uređaju Infinite M. Plex proizvođača Tecan.



Slika 12. 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid ili neutralno crveno (preuzeto iz rada Repetto i sur. 2008.)

Tablica 3. Koncentracije ekstrakta mirte i ekstrakta brokule ($\mu\text{mol/mL}$) u triplikatima dodanih u ploču s 96 jažica za MTT-test i Neutral red test. U G red dodane su Caco-2 stanice s kompletnim DMEM medijem i u H red dodan je pripremljeni DMEM medij (uz dodatak 1 % NEAA, 1 % PEN-STREP i 10 % FBS seruma).

$\mu\text{mol/mL}$	1	2	3	7	8	9
A	800	800	800	800	800	800
B	400	400	400	400	400	400
C	200	200	200	200	200	200
D	50	50	50	50	50	50
E	1	1	1	1	1	1
F	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
G	Caco-2	Caco-2	Caco-2	Caco-2	Caco-2	Caco-2
H	medij	medij	medij	medij	medij	medij

plavo – ekstrakt mirte; žuto – ekstrakt brokule

3.4. Određivanje antioksidativnih markera

U homogenatima stanica, koristeći spektrofotometrijske metode mjerenja bioloških markera oksidacijskog stresa, izmjerila sam koncentracije glutationa (GSH) te aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) i katalaze pomoću komercijalnih kitova poput Sigma Aldrich/Cayman/Biosciens.

Planirani protokoli uključivali su mjerenje aktivnosti SOD metodom inhibicije redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i Ötting (1984).

Koncentraciju GSH sam izmjerila prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969), a mjerenje aktivnosti katalaze odredila sam spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984).

3.4.1. Metoda BCA

Kako bih odredila antioksidativni učinak biljnih ekstrakata, prvotno sam izmjerila količinu proteina u uzorcima. Metodom BCA odredila sam količinu proteina u staničnim lizatima Caco-2 stanica. Za početak, pripremila sam otopinu PBS+PI te dodala 300 μ L na svaki uzorak taloga stanica Caco-2. Zatim sam svaki uzorak Caco-2 stanica homogenizirala u ultrazvučnoj kupelji (Brandelin) 15 sekundi s pauzom od 5 sekundi te sam ponavljala dok se ne dobije uniformni homogenat. Uzorke sam stavila centrifugirati na 15000 \times g tijekom 15 min na 4 °C. Nakon centrifugiranja otpipetirala sam supernatant bez odvajanja taloga od podloge i uzorke stavila na led za daljnje korištenje.

Pripremila sam razrjeđenja standarda BSA na sljedeći način:

- 1) U svaku od 4 označene mikroeprovete (redom 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL) otpipetirala sam 75 μ L pufera (PBS+PI).
- 2) Zatim sam u svaku mikroeprovetu redom dodala 75 μ L prethodnog standarda (time sam svaki sljedeći standard razrijedila dva puta):

1 mg/mL - dodala sam 75 μ L standarda BSA koncentracije 2 mg/mL

0,5 mg/mL – dodala sam 75 μ L 1 mg/mL

0,25 mg/mL - dodala sam 75 μ L 0,5 mg/mL

0,125 mg/mL - dodala sam 75 μ L 0,25 mg/mL.

Nakon razrjeđenja standarda BSA pripremila sam razrjeđenja uzorka tako da sam u novi set označenih mikroeproveta (K1, K2, K3, B1, B2, B3, M1, M2, M3) otpipetirala sam 50 μ L pufera (PBS+PI). Nakon toga sam dodala 25 μ L staničnog lizata svakog uzorka u istoimenu mikroeprovetu te vorteksirala svaku mikroeprovetu razrijedenih uzoraka.

Zatim sam nanosila standarde i uzorke u pločicu s 96 jažice (u duplikatima) na sljedeći način:

- 1) Otpipetirala sam 25 μ L svakog BSA standarda (redom: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 mg/mL te 0 (PBS+PI) u dvije jažice (duplikati) pločice s 96 jažica te 25 μ L od svakog uzorka staničnog lizata u dvije jažice (duplikati).

- 2) Multikanalnom pipetom sam dodala u svaku jažicu 200 μL pripremljenog BCA reagensa (miješanje dviju otopina u omjeru 50:1).
- 3) Pločicu sam omotala aluminijskom folijom i inkubirala 30 min u mraku na 37 °C.
- 4) Izmjerila sam apsorbanciju na 570 nm u čitaču mikrotitarskih pločica.

Na temelju dobivenih podataka apsorbancija za navedene uzorke i baždarnog grafa izračunala sam količinu proteina u svakom uzorku.

3.4.2. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze

Prvo sam izmjerila promjenu apsorbancije kemikalija i slijepe probe (dH_2O) na 550 nm tijekom 3 min. Za mjerenje promjene apsorbancije kemikalija u kivetu sam stavila 1,45 mL otopine A, a za mjerenje promjene apsorbancije slijepe probe u kivetu sam stavila 1,45 mL otopine A, 25 μL dH_2O i 25 μL XO (0,8 U/mL). Na isti način sam izmjerila apsorbancije uzoraka – u mikroepruvetu sam dodala 1,45 mL otopine A, 25 μL uzorka i 25 μL XO.

Postotak inhibicije i aktivnost SOD / mg proteina izračunala sam po sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}}/\text{min}) / (\Delta A_{\text{slijepa proba}}/\text{min}) \times 100$$

$$\text{Akt SOD (U/mL)} = 10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757)/30,932)}$$

3.4.3. Mjerenje aktivnosti glutaciona

Za mjerenje aktivnosti glutaciona u uzorcima pripremila sam razrjeđenja standarda reduciranog glutaciona na sljedeći način:

- 1) U svaku od 10 označenih mikroepruveta (redom 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM , 1,56 μM , 0,78 μM i slijepa proba 0) otpipetirala sam 50 μL pufera PBS.
- 2) Zatim sam dodala 50 μL prethodnog standarda (time se svaki sljedeći standard razrjeđuje dva puta).

Za pripremu uzorka u svaku jažicu pločice s 96 jažica dodala sam 20 μL standarda ili uzorka, 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL mM otopine A multikanalnom pipetom. Pločicu sam stavila na inkubaciju 10 min na sobnoj temperaturi te izmjerila apsorbanciju pri $\lambda = 415$ nm. Nakon toga sam u otopinu dodala 100 μL otopine B i odmah izmjerila apsorbanciju tijekom 5 minuta pri $\lambda = 415$ nm (u razmaku od 80 s koliko je potrebno spektrofotometru da očita vrijednosti).

Za izračun koncentracije ukupnog glutaciona u uzorcima koristila sam izračun prema formuli ekstinkcijskog koeficijenta (Salbitani i sur. 2017) koja glasi $c = A / l \times \epsilon$ gdje je l duljina kivete i ϵ ekstinkcijski koeficijent koji pri navedenoj valnoj duljini iznosi $17 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. $\Delta A_{\text{uzorka}} / \text{min}$ dobiven je kao srednja vrijednost svake minute podijeljen s brojem minuta, a $c(\text{GSH}) / \mu\text{mol mL}^{-1}$ dobiven je tako da je ΔA_{uzorka} podijeljen s ekstinkcijskim koeficijentom. Koncentracija ukupnog glutaciona dobivena je tako da je $c(\text{GSH}) / \mu\text{mol mL}^{-1}$ svakog uzorka podijeljena s masom proteina u pojedinom uzorku.

3.4.4. Mjerenje aktivnosti katalaze

U kivetu sam izravno dodala 5 μL uzorka, a ostatak do 1 mL 10 mM vodikovog peroksida te izmjerila $\Delta A_{\text{uzorka}} / \text{min}$ tijekom jedne minute pri valnoj duljini $\lambda = 240$ nm. Koncentracija potrošenog H_2O_2 ($\mu\text{M} / \text{min}$) dobivena je tako da je ΔA_{uzorka} pomnožena s 1000. Dobivenu vrijednost pomnožila sam s faktorom razrjeđenja u kiveti ($R = 166,6$) te zatim tako izraženu aktivnost katalaze (U_{cat}) podijelila s koncentracijom proteina u svakom uzorku što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

3.5. HPLC analiza prometa polifenolnih spojeva kroz membranski jednosloj

3.5.1. Prikupljanje uzoraka za HPLC analizu

U pločicu s 24 jažice, dodala sam u donju komoru 750 μL bijelog medija HBSS te na njih prebacila plastične nosače iz kojih sam prethodno uklonila stari medij te u gornju komoru 2D modela Caco-2 stanica dodala 250 μL ekstrakta brokule ili mirte koncentracije 800 $\mu\text{g/mL}$ prema tablici 4. Pločicu sam stavila u inkubator pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO_2 i temperaturi 37 °C). Iz gornje (apikalne) i donje (bazolateralne) komore prikupila sam po 250 μL medija u zasebne

mikroeprovete nakon 20, 40 i 60 minuta i u tim uzorcima metodom RP-HPLC analizirala koji spojevi prolaze kojom dinamikom.

Tablica 4. Raspored dodavanja ekstrakta mirte ili ekstrakta brokule i HBSS-a u apikalnu (A) ili bazolateralnu (B) komoru u triplikatima iz kojih je prikupljeno 250 μ L medija iz apikalne i bazolateralne komore nakon 20, 40 i 60 min

	A \rightarrow B			B \rightarrow A		
20 min	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B
40 min	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B
60 min	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	M/B 250 μ L A Medij 750 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B	Medij 750 μ L A M/B 250 μ L B

M – Mirta 800 μ g/m, B – Brokula 800 μ g/mL, A – apikalna (gornja) komora, B – bazolateralna (donja) komora

3.5.2. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti – HPLC

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) uz kromatografsku kolonu Infinity Lab Poroshell 120 SB-C18 (4,6 \times 750 mm, 2.7 μ m) te detektora. Uzorci su injektirani u sustav u volumenu od 50 μ L i temperaturi od 25 $^{\circ}$ C. Identifikaciju pikova na kromatogramima uzoraka odredila sam usporedbom retencijskog vremena pojedinačnih standarada i maksimuma apsorpcijskog spektra pojedinih polifenolnih spojeva, a navedeni podaci su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Retencijsko vrijeme/min i valne duljine/nm određenih standarada (ferulične kiseline, sinapinske kiseline, kvercetina, kempferola) za analizu kromatograma istraživanih uzoraka

spoj	retencijsko vrijeme/min	λ/nm
Ferulična kiselina	21,490	310
Sinapinska kiselina	22,646	310
Kvercetin	32,849	360
Kempferol	36,515	360

3.6. Analiza rezultata i statistička obrada

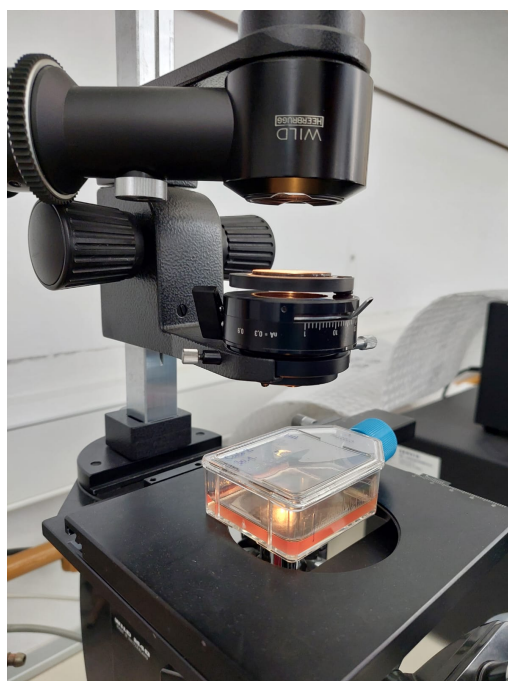
U pokusu su korišteni triplikati ekstrakata biljnih uzoraka i kontrole kako bi rezultati bili pouzdaniji. Koncentracije antioksidacijskih markera (SOD, GSH i katalaza) izračunala sam na temelju spektrofotometrijskih podataka, a iz dobivenih vrijednosti sam izračunala jednostavne statističke parametre (srednja vrijednost triplikata i standardna devijacija). Uzete su aritmetičke sredine svih mjerenja za grafički prikaz, a trake pogrešaka prikazuju standardnu devijaciju. Također sam izračunala srednju vrijednost triplikata i standardnu devijaciju koncentracije polifenolnih spojeva te izradila tablični prikaz dinamike prolaska koncentracije bioaktivnih spojeva kroz sloj Caco-2 stanica unutar 60 minuta. Za izračun i grafove koristila sam Microsoft Excel i GraphPad Prism program. Za obradu podataka koristila sam t-test, a statističku značajnost prikazala sam s 95 %-tnom pouzdanošću.

4. REZULTATI

4.1. Optimizacija rasta stanica i stvaranje monosloja Caco-2 stanica

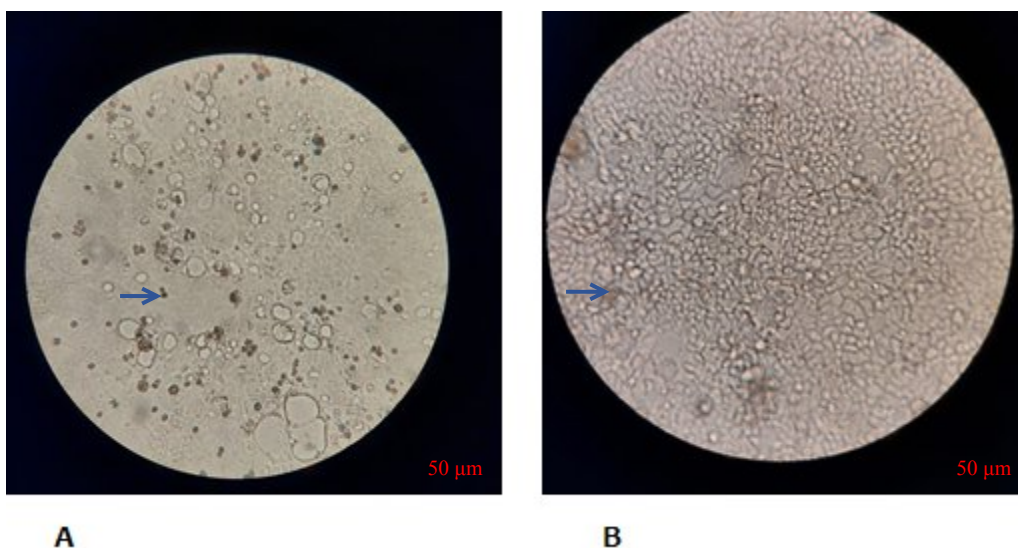
Sedam dana nakon nasađivanja i inkubiranja stanica u male posude za rast stanica (250 mL), stanice se nisu dovoljno razmnožile. Medij je i dalje crven, pa su stanice ostavljene dodatno tjedan dana na inkubiranje u uvjetima 5 % pCO₂ i 37 °C.

Nakon 14 dana, stanice su se primile za podlogu, odnosno potpuno su se oporavile (slika 14) – postigle su 80 % konfluencije. Stanice su prebačene u veće posude (750 mL) za poboljšani rast stanica.



Slika 13. Promatranje Caco-2 stanica pod mikroskopom

Nakon 21 dan, stanice su se uspješno namnožile (slika 14b) u većim posudama za rast stanica i spremne su za presađivanje u pločicu s 24 jažica.



Slika 14. A) Caco-2 stanice u uzorku 1a nakon 14 dana uzgoja B) Caco-2 stanice u uzorku 1a nakon 21 dan uzgoja u kulturi. Stanice su povećane 200x na mikroskopu (Wild Heerbrugg, Švicarska). Skala predstavlja 50 μm .

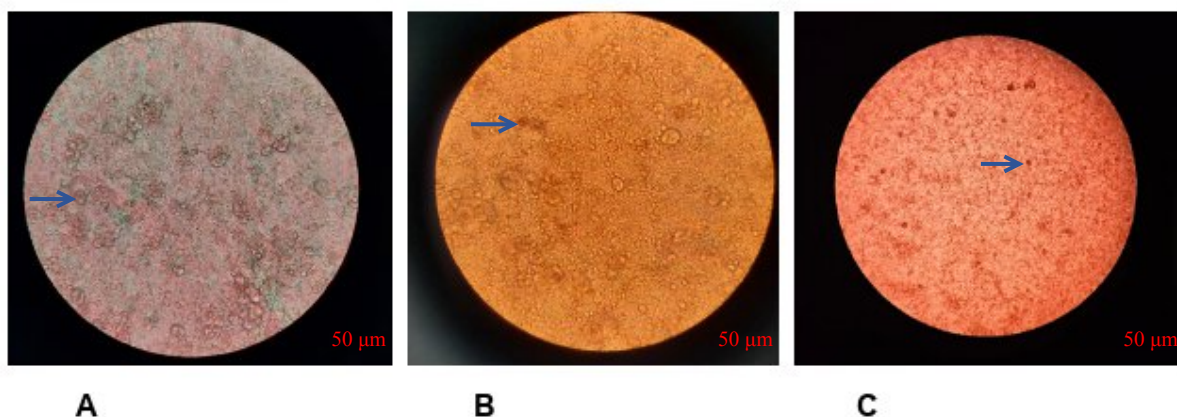
Tijekom određivanja broja stanica u uzorku, boja ulazi u oštećene stanice (mrtve stanice su obojene), dok u žive aktivne stanice boja ne ulazi (neobojene su). Gustoća živućih stanica nakon 14 dana i 21 dan prikazana je u tablici 6 te se uočava da je nastalo više stanica nego nakon 14 dana. Uzorak 1b se ne koristi dalje u eksperimentu – stanice će se zamrznuti jer ima dovoljno stanica u uzorku 1a za izvedbu ciljanog pokusa.

Tablica 6. Gustoća živućih Caco-2 stanica po mL nakon 14 i 21 dan (u duplikatima) uzgajanja mjerena u Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, SAD)

	broj stanica/mL
Nakon 14 dana ($\bar{x} \pm \sigma$)	$6,5 \times 10^5 \pm 2,97 \times 10^5$
Nakon 21 dan ($\bar{x} \pm \sigma$)	$3,85 \times 10^6 \pm 2,12 \times 10^5$

Stanice su nakon tri dana nakon presađivanja u pločicu s 24 jažice zauzele cijelu površinu podloge, odnosno postigle 80% konfluencije (slika 15a). Otopina u donjoj komori je još uvijek crvena što znači da još ima hranjivih tvari za rast stanica. Stanice su se počele diferencirati, ali još uvijek ima velikih stanica koje se moraju ‘razbiti’ u manje.

Nakon 17 dana nakon presađivanja Caco-2 stanica u pločicu s 24 jažice, stanice su se potpuno diferencirale i stvorile monosloj koji simulira crijevnu barijeru (slika 15c).



Slika 15. Caco-2 stanice nakon A) 3 dana nakon presađivanja B) 7 dana nakon presađivanja C) 17 dana nakon presađivanja. Stanice su povećane 200x na mikroskopu (Wild Heerbrugg, Švicarska). Skala predstavlja 50 μm .

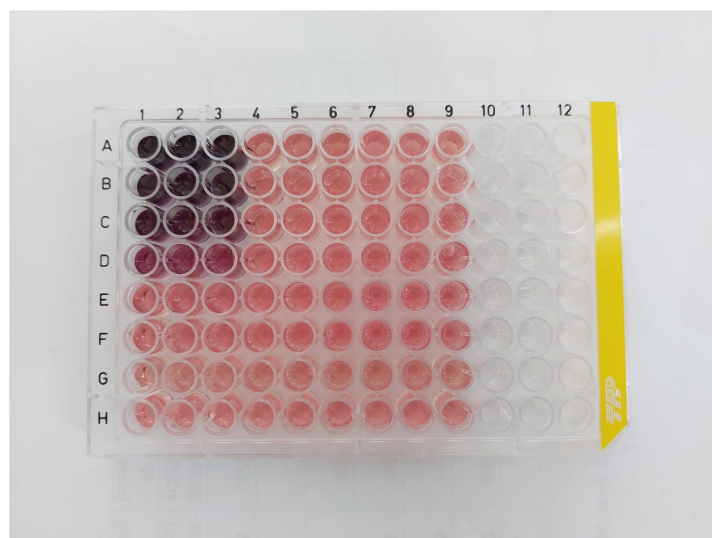
Za potpunu tripsinizaciju Caco-2 stanica bilo je potrebno 20 min. Nakon prvih 5 minuta stanice se nisu odvojile od podloge pri čemu sam dodala 1 mL novog tripsina u posudu za uzgajanje stanica jer se stari tripsin potrošio. Caco-2 stanice su se odvojile od podloge nakon dodatnih 15 minuta.

4.2. Citotoksični učinak

Rezultati MTT-testa pokazali su da je otopina ekstrakta mirte i medija sa stanicama promijenila boju u tamnoljubičastu, dok u ekstraktu brokule nije bilo vidljive promjene (slika 16). U tablici 7. prikazani su rezultati MTT testa koji govore o razini citotoksičnosti.

Tablica 7. Rezultati MTT testa - apsorbancije ekstrakta mirte i ekstrakta brokule u triplikatima pri $\lambda = 570$ nm pri određenim koncentracijama. U G red dodane su Caco-2 stanice s medijem i u H red dodan je pripremljeni kompletan DMEM medij (uz dodatak 1 % NEAA, 1 % PEN-STREP i 10 % FBS seruma) koji služi kao slijepa proba (SP).

		MIRTA			BROKULA		
$c / \mu\text{M}$ mL^{-1}		1	2	3	4	5	6
800	A	3,7757	OVER	OVER	0,5184	0,5194	0,4953
400	B	2,8487	2,7588	3,1407	0,5266	0,5475	0,5018
200	C	1,9064	1,8087	1,9371	0,5337	0,5372	0,5331
50	D	1,0462	0,9819	0,9481	0,5453	0,5573	0,6721
1	E	0,5612	0,5715	0,5702	0,5339	0,5533	0,5353
0,25	F	0,5544	0,5418	0,5418	0,5381	0,5657	0,5396
0	G	0,3993	0,3919	0,3894	0,4002	0,3884	0,4098
SP	H	0,5091	0,4925	0,5128	0,4711	0,4911	0,4901



Slika 16. Pločica s 96 jažica s različitim koncentracijama/ $\mu\text{M mL}^{-1}$ (800, 400, 200, 50, 1, 0.25, 0, medij) ekstrakta mirte (1-3) i ekstrakta brokule (7-9) u triplikatima nakon 30 min inkubacije.

Zbog dobivenih rezultata, pomiješan je samo ekstrakt mirte s MTT bojom - ekstrakt mirte je reagirao s bojom čak i kada Caco-2 stanice nisu bile prisutne u otopini. Protokol se ponavlja uz metodu Neutral red.

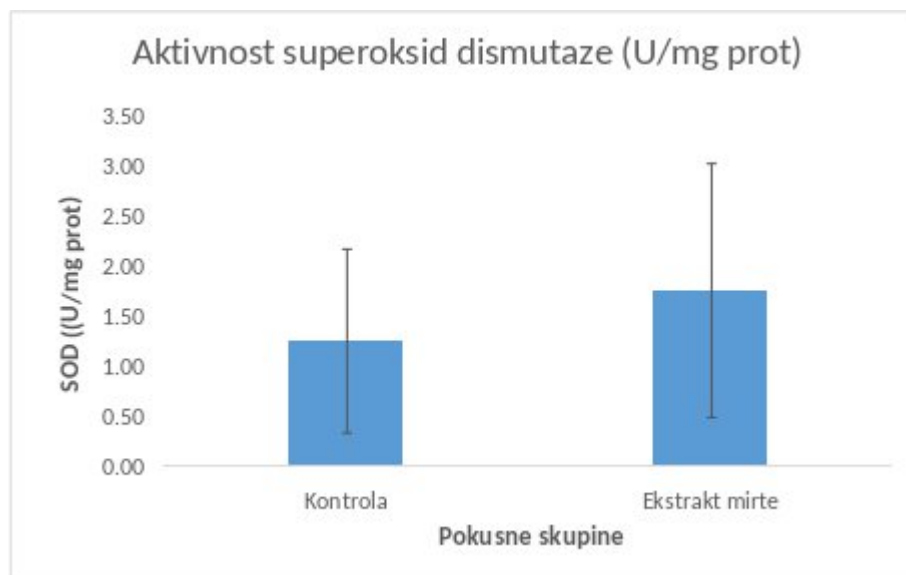
Rezultati Neutral red testa pokazali su da nema značajnih razlika u ispitivanom rasponu koncentracija biljnih ekstrakata te nije ustanovljena citotoksičnost (tablica 8). Dakle, primijenjene koncentracije nisu štetno djelovale na stanice, odnosno nisu ubijale stanice.

Tablica 8. Rezultati Neutral Red testa - apsorbancije ekstrakta mirte i ekstrakta brokule u triplikatima pri $\lambda = 540$ nm pri određenim koncentracijama. U G red dodane su Caco-2 stanice s medijem i u H red dodan je pripremljeni kompletan DMEM medij (uz dodatak 1 % NEAA, 1 % PEN-STREP i 10 % FBS seruma) koji služi kao slijepa proba (SP).

		MIRTA			BROKULA		
$c / \mu\text{M}$ mL^{-1}		1	2	3	4	5	6
800	A	0,1904	0,1555	0,2036	0,2510	0,3333	0,3180
400	B	0,3686	0,3747	0,2409	0,0520	0,0507	0,0489
200	C	0,4871	0,1617	0,3223	0,0478	0,0467	0,0461
50	D	0,5934	0,5251	0,4934	0,0553	0,0604	0,0551
1	E	0,4698	0,3123	0,2716	0,0468	0,0462	0,0471
0,25	F	0,3253	0,5087	0,3794	0,0561	0,0475	0,0639
0	G	0,4283	0,3147	0,3212	0,0539	0,0472	0,0490
SP	H	0,5208	0,5105	0,4193	0,0484	0,0688	0,0560

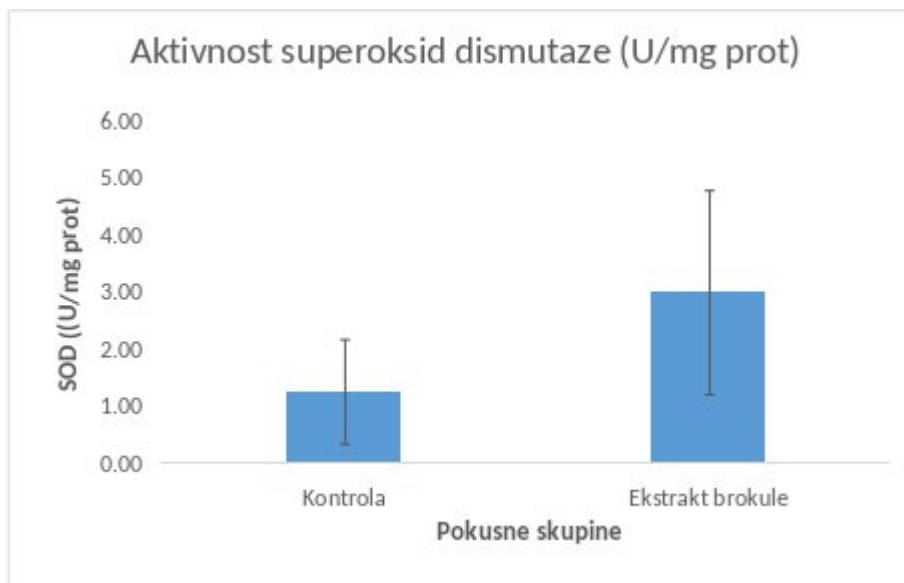
4.3. Antioksidativni markeri

Statističkim *t*-testom utvrđeno je da razlike u prosječnim koncentracijama enzima superoksid dismutaze (U/mg prot) u kontrolnoj skupini i ekstraktu mirte nisu statistički značajne ($p > 0,9999$) (slika 17).



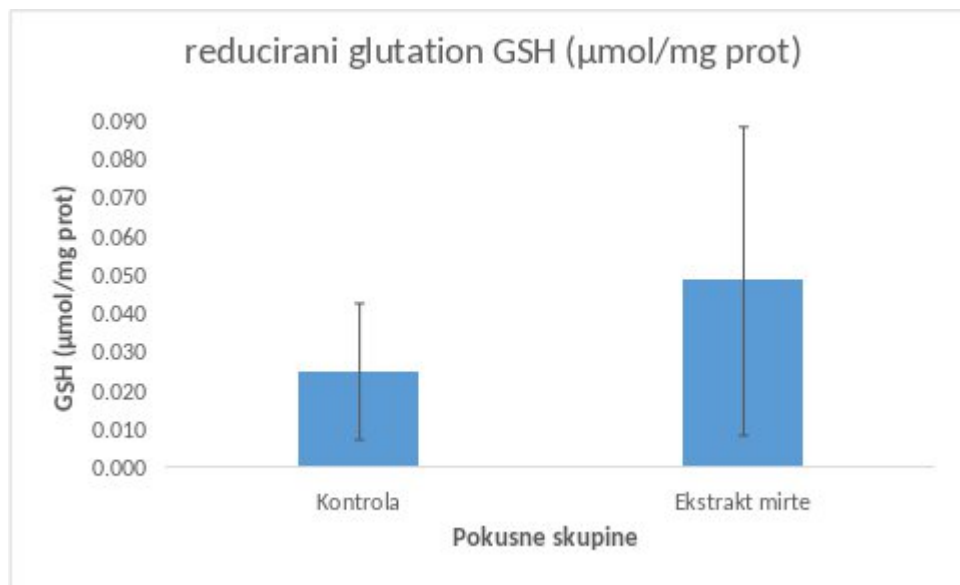
Slika 17. Prosječna aktivnost superoksid dismutaze po miligramu proteina ($\mu\text{mol/mg prot}$) u biljnom ekstraktu mirte i kontrolne skupine uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$ pri čemu je *p*-vrijednost $p > 0,9999$.

Statističkim *t*-testom utvrđeno je da razlike u prosječnim koncentracijama enzima superoksid dismutaze (U/mg prot) u kontrolnoj skupini i ekstraktu brokule nisu statistički značajne ($p = 0,6$) (slika 18).



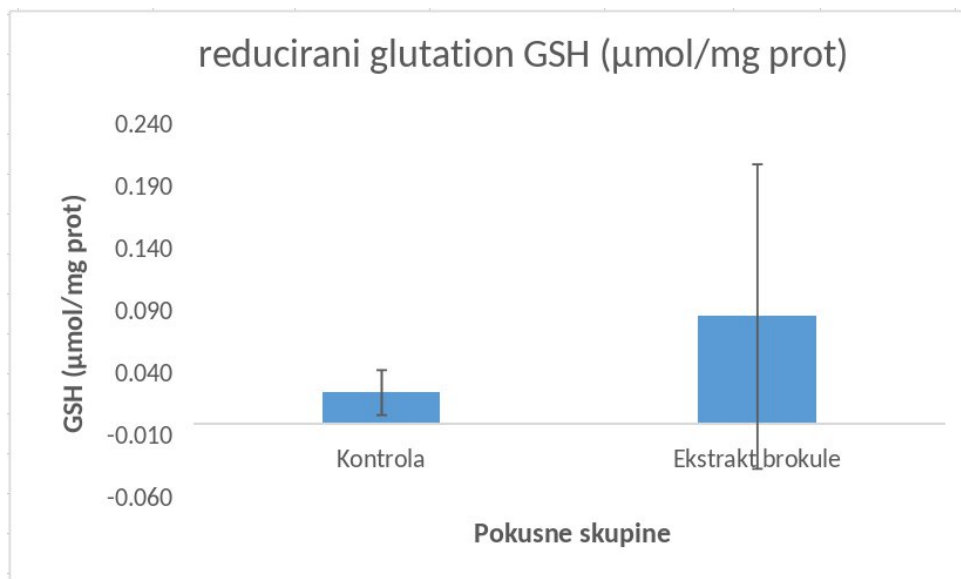
Slika 18. Prosječna aktivnost superoksid dismutaze po miligramu proteina ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) u kontrolnoj skupini i ekstraktu brokule uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$ pri čemu p-vrijednost iznosi $p = 0,6$.

Statističkim *t*-testom utvrđeno je da nema značajnih statističkih razlika između kontrole i ekstrakta mirte s obzirom na srednje vrijednosti njihovih koncentracija reduciranog glutaciona (U/mg prot) ($p = 0,4081$) (slika 19).



Slika 19. Prosječna aktivnost glutaciona po miligramu proteina ($\mu\text{mol/mg prot}$) u kontrolnoj skupini i ekstraktu mirte uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$ pri čemu p-vrijednost iznosi $p = 0,4081$.

Statističkim *t*-testom utvrđeno je da razlike u prosječnim koncentracijama reduciranog glutaciona ($\mu\text{mol/mg prot}$) u kontrolnoj skupini i ekstraktu brokule nisu statistički značajne ($p > 0,9999$) (slika 20).



Slika 20. Prosječna aktivnost glutaciona po miligramu proteina ($\mu\text{mol/mg prot}$) u kontrolnoj skupini i ekstraktu brokule uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$ pri čemu p-vrijednost iznosi $p > 0,4399$.

Prosječne koncentracije enzima katalaze u kontrolnoj skupini, ekstraktu mirte i ekstraktu brokule prikazane su u tablici 9. gdje je vidljivo da je najveća prosječna aktivnost katalaze u ekstraktu mirte ($\bar{x} = 898,89 \mu\text{M}/\text{mg}$), a najmanja u ekstraktu brokule ($\bar{x} = 29,54 \mu\text{M}/\text{mg}$).

Tablica 9. Vrijednosti početnih apsorbancija (A_0), konačnih apsorbancija (A_{60}), promjene apsorbancije (ΔA), aktivnosti katalaze po miligramu proteina (U_{cat} ($\mu\text{M} / \text{mg}$)) te srednje vrijednosti (\bar{x}) tripplikata uzoraka staničnih lizata Caco-2 stanica. Oznaka K označuje kontrolnu skupinu, M ekstrakt mirte i B ekstrakt brokule.

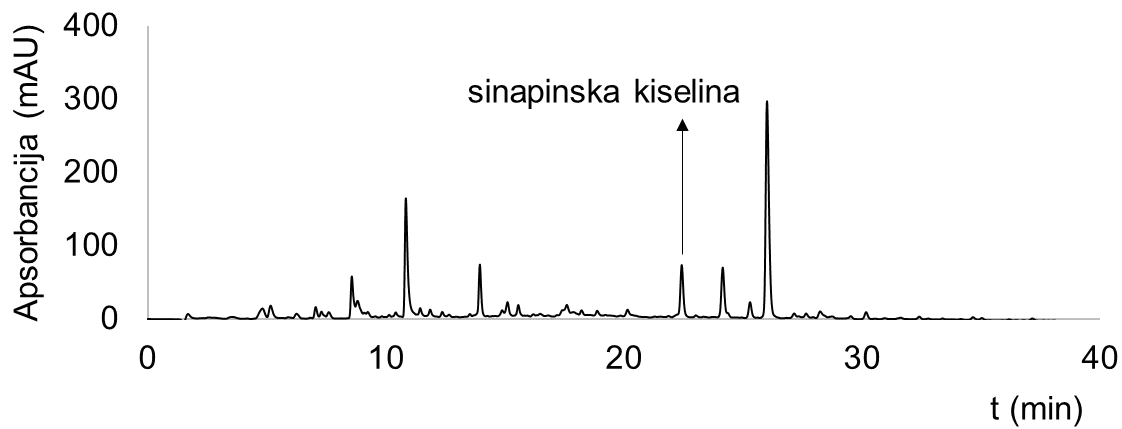
Uzorak	A_0	A_{60}	$ \Delta A $	U_{cat} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	$U_{\text{cat}} / \text{masa}$ proteina ($\mu\text{M mg}^{-1}$)	\bar{x}
K1	1,100	1,100	0	0	0	64,82
K2	0,832	0,832	0	0	0	
K3	0,563	0,562	0,001	166,6	64,8	
M1	0,110	0,108	0,002	333,2	1514,5	898,90
M2	-0,008	-0,011	0,003	499,8	1110,7	
M3	0,116	0,115	0,001	166,6	71,5	
B1	0,833	0,833	0	0	0	29,54
B2	0,828	0,827	0,001	166,6	88,6	
B3	0,660	0,660	0	0	0	

Određivanjem aktivnosti katalaze u određenim uzorcima, aktivnost katalaze iznosi 0 što je onemogućilo izračunavanje standardne devijacije u triplikatima te zbog nedostatka rezultata katalaza nije uzeta u obzir.

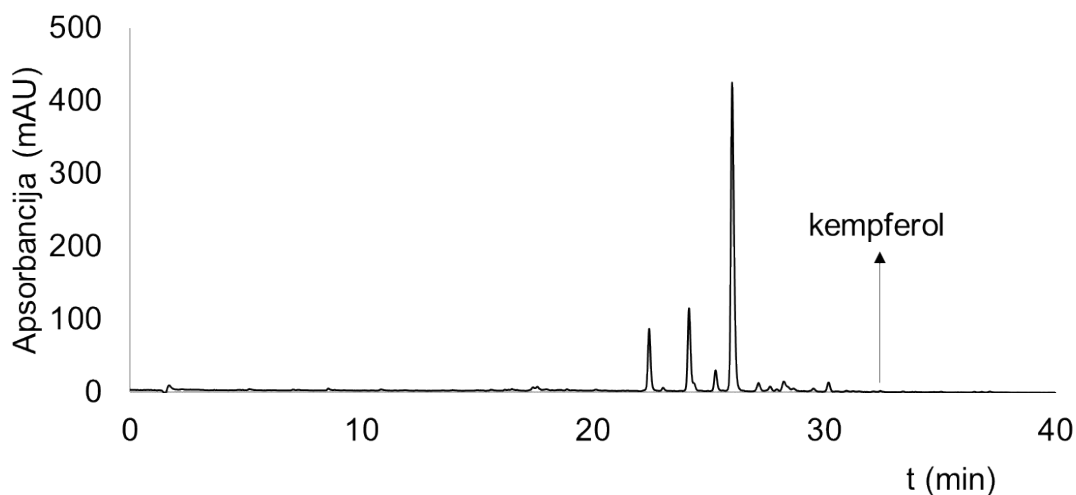
4.4. HPLC analiza prometa fenolnih spojeva kroz membranski jednosloj

Ekstrakte brokule i mirte koncentracije do $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ otopine nanijela sam na gornju komoru 2D modela Caco-2 stanica. Iz apikalne i bazolateralne komore prikupila sam po $250 \mu\text{L}$ otopine nakon 20, 40 i 60 minuta i u tim uzorcima metodom RP-HPLC analizirala kojom dinamikom prolaze ispitani bioaktivni spojevi (ferulična kiselina, sinapinska kiselina, kvercetin, kempferol).

Na temelju HPLC analize i dobivenih kromatograma (slika 21 i slika 22) utvrđeno je da se sinapinska kiselina i kempferol nalaze u izvornom ekstraktu mirte.



Slika 21. Kromatogram izvornog ekstrakta mirte pri 310 nm



Slika 22. Kromatogram izvornog ekstrakta mirte pri 360 nm

Početna koncentracija ferulične kiseline u originalnoj otopini mirte iznosi 0 mg/L uzorka, a sinapinske kiseline u originalnoj otopini mirte iznosi 112,033 mg/L uzorka. Početna koncentracija kvercetina u originalnoj otopini mirte iznosi 0 mg/L uzorka, a kempferola u originalnoj otopini mirte iznosi 15,930 mg/L uzorka.

Iz tablice 10. vidljivo je da se tijekom apikalno bazolateralnog transporta ($A \rightarrow B$) u apikalnoj komori povećava koncentracija ferulične kiseline (iako u početnoj koncentraciji nije detektirana), a u bazolateralnoj komori ferulična kiselina nije detektirana tijekom 60 min. Tijekom bazolateralno apikalnog transporta ($B \rightarrow A$), u apikalnoj komori ferulična kiselina nije detektirana, ali je detektirana u približno jednakim koncentracijama tijekom 60 min u bazolateralnoj komori.

Tablica 10. Dinamika prolaska koncentracija ferulične kiseline (mg/L) iz ekstrakta mirte u triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

ferulična kiselina (mg/L) iz ekstrakta mirte									
A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min	A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	9,12	16,74	27,66	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	0,16	1,84	1,39	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min	B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	18,50	22,78	20,23
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	3,97	0,40	0,82

n.d. – *nije detektirano*; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

Iz tablice 11. vidljivo je da se koncentracija sinapinske kiseline u apikalnoj komori tijekom apikalno bazolateralnog transporta ($A \rightarrow B$) smanjuje te je 81% sinapinske kiseline prošlo u stanični monosloj. U bazolateralnoj komori sinapinska kiselina nije detektirana što znači da se spoj vjerojatno akumulira u stanicama crijeva te ne prolazi iz apikalne u bazolateralnu komoru. Tijekom bazolateralno apikalnog transporta ($B \rightarrow A$), u apikalnoj komori sinapinska kiselina nije detektirana, ali je detektirana u bazolateralnoj komori čija se koncentracija smanjivala tijekom 60 minuta što označava da se spoj akumulira u crijevnim stanicama.

Tablica 11. Dinamika prolaska koncentracija sinapinske kiseline (mg/L) iz ekstrakta mirte u triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

sinapinska kiselina (mg/L) iz ekstrakta mirte									
A → B	0 min	20 min	40 min	60 min	A → B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	112,03	75,52	49,49	21,64	\bar{x}	112,03	n.d.	n.d.	n.d.
σ	0,00	3,25	6,92	3,06	σ	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
B → A	0 min	20 min	40 min	60 min	B → A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	112,03	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	112,03	31,44	7,09	18,44
σ	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	σ	0,00	17,34	5,16	5,50

n.d. – nije detektirano; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

Iz tablice 12. vidljivo je da tijekom apikalno bazolateralnog transporta (A → B) i bazolateralno apikalnog transporta (B → A) koncentracija kvercetina nije detektirana ni u apikalnim ni u bazolateralnim komorama zato što kvercetin nije prisutan u originalnom ekstraktu mirte.

Tablica 12. Dinamika prolaska koncentracija kvercetina (mg/L) iz ekstrakta mirte u triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

kvercetin (mg/L) iz ekstrakta mirte									
A → B	0 min	20 min	40 min	60 min	A → B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B → A	0 min	20 min	40 min	60 min	B → A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

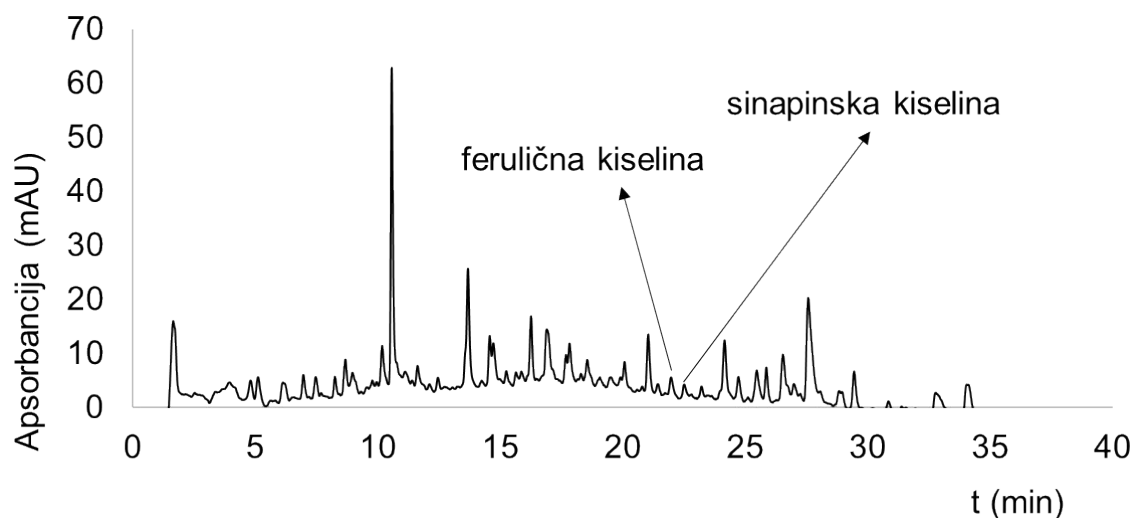
Iz tablice 13. vidljivo je da se tijekom apikalno bazolateralnog transporta ($A \rightarrow B$) u apikalnoj komori smanjila koncentracija kempferola, no koncentracija je približno jednaka tijekom svih 60 minuta, a u bazolateralnoj komori kempferol nije detektiran tijekom 60 min što znači da je spoj vjerojatno zaostao u crijevnim stanicama. Tijekom bazolateralno apikalnog transporta ($B \rightarrow A$), u apikalnoj komori kempferol nije detektiran, ali je detektirana u približno jednakim koncentracijama tijekom 60 min u bazolateralnoj komori.

Tablica 13. Dinamika prolaska koncentracija kempferola (mg/L) iz ekstrakta mirte u triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

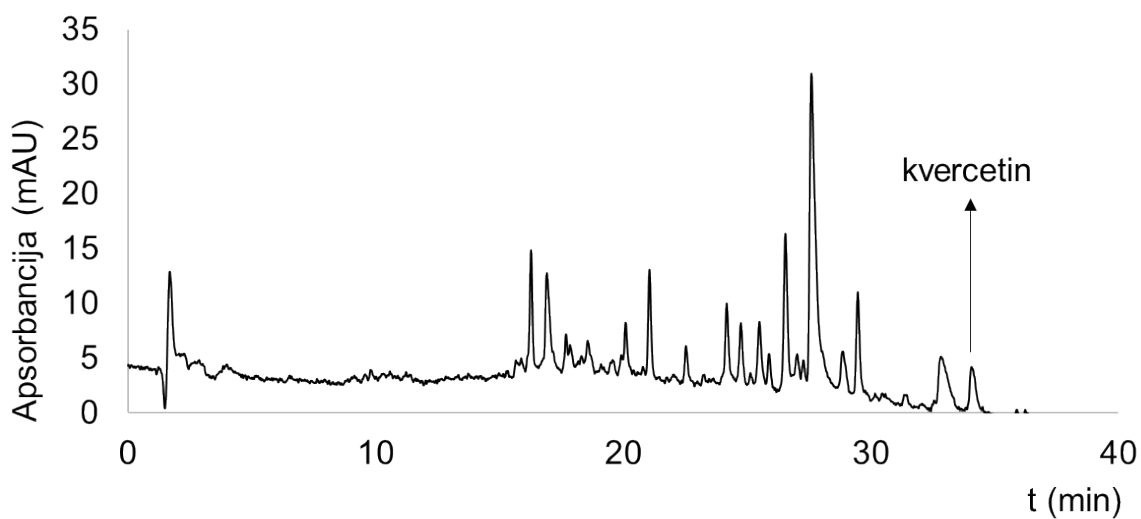
kempferol (mg/L) iz ekstrakta mirte									
A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min	A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	19,28	11,44	11,02	11,06	\bar{x}	19,28	n.d.	n.d.	n.d.
σ	0,00	0,40	0,55	0,05	σ	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min	B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	19,28	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	19,28	11,07	11,76	11,52
σ	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	σ	0,00	0,90	0,80	0,42

n.d. – nije detektirano; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

Na temelju HPLC analize i dobivenih kromatograma (slika 23 i slika 24) utvrđeno je da se ferulična kiselina i kvercetin nalaze u izvornom ekstraktu brokule.



Slika 23. Kromatogram izvornog ekstrakta brokule pri 310 nm



Slika 24. Kromatogram izvornog ekstrakta brokule pri 360 nm

Početna koncentracija ferulične kiseline u originalnoj otopini brokule iznosi 7,67 mg/L uzorka, a sinapinske kiseline u originalnoj otopini brokule iznosi 0 mg/L uzorka. Početna koncentracija kvercetina u originalnoj otopini brokule iznosi 61,031 mg/L uzorka, a kempferola u originalnoj otopini brokule iznosi 0 mg/L uzorka.

Iz tablice 14. vidljivo je da je tijekom apikalno bazolateralnog transporta ($A \rightarrow B$) u apikalnoj komori koncentracija ferulične kiseline tijekom 60 min približno jednaka početnoj koncentraciji, a u bazolateralnoj komori nije detektirana. Tijekom bazolateralno apikalnog transporta ($B \rightarrow A$), u apikalnoj komori ferulična kiselina nije detektirana, ali je detektirana u bazolateralnoj komori u približno jednakim koncentracijama kao u originalnoj otopini tijekom svih 60 min.

Tablica 14. Dinamika prolaska koncentracija ferulične kiseline (mg/L) iz ekstrakta brokule u triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

ferulična kiselina (mg/L) iz ekstrakta brokule									
A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min	A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	7,67	7,37	7,57	7,51	\bar{x}	7,67	n.d.	n.d.	n.d.
σ	0,00	0,47	0,13	0,25	σ	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min	B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	7,67	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	7,67	7,98	8,01	7,74
σ	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	σ	0,00	0,39	0,19	0,27

n.d. – nije detektirano; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

Iz tablice 15. vidljivo je da tijekom apikalno bazolateralnog transporta ($A \rightarrow B$) i bazolateralno apikalnog transporta ($B \rightarrow A$) koncentracija sinapinske kiseline nije detektirana ni u apikalnim ni u bazolateralnim komorama zato što sinapinska kiselina nije prisutna u originalnom ekstraktu brokule.

Tablica 15. Dinamika prolaska koncentracija sinapinske kiseline (mg/L) iz ekstrakta brokuleu triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

sinapinska kiselina (mg/L) iz ekstrakta brokule									
A → B	0 min	20 min	40 min	60 min	A → B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B → A	0 min	20 min	40 min	60 min	B → A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

Iz tablice 16. vidljivo je da je tijekom apikalno bazolateralnog transporta (A → B) u apikalnoj komori koncentracija kvercetina tijekom 60 min približno jednaka početnoj koncentraciji, a u bazolateralnoj komori je detektiran u manjoj koncentraciji. Tijekom bazolateralno apikalnog transporta (B → A), u apikalnoj komori kvercetin je detektiran tek nakon 60. minute, a u bazolateralnoj komori je detektiran u približno jednakoj koncentraciji kao u originalnoj otopini brokule.

Tablica 16. Dinamika prolaska koncentracija kvercetina (mg/L) iz ekstrakta brokule u triplikatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

kvercetin (mg/L) iz ekstrakta brokule									
A → B	0 min	20 min	40 min	60 min	A → B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	61,03	54,40	56,13	64,98	\bar{x}	61,03	18,21	11,46	17,33
σ	0,00	2,01	3,64	2,30	σ	0,00	1,29	9,92	0,27
B → A	0 min	20 min	40 min	60 min	B → A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	61,03	n.d.	n.d.	21,17	\bar{x}	61,03	67,54	66,26	68,82
σ	0,00	n.d.	n.d.	2,38	σ	0,00	6,77	2,87	2,10

n.d. – nije detektirano; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

Iz tablice 17. vidljivo je da tijekom apikalno bazolateralnog transporta ($A \rightarrow B$) i bazolateralno apikalnog transporta ($B \rightarrow A$) koncentracija kempferola nije detektirana ni u apikalnim ni u bazolateralnim komorama zato što kempferol nije prisutan u originalnom ekstraktu brokule.

Tablica 17. Dinamika prolaska koncentracija kempferola (mg/L) iz ekstrakta brokule u triplicatima kroz jednosloj Caco-2 stanica u apikalnim (A) i bazolateralnim (B) komorama tijekom 60 minuta

kempferol (mg/L) iz ekstrakta brokule									
A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min	A \rightarrow B	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min	B \rightarrow A	0 min	20 min	40 min	60 min
\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	\bar{x}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	σ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – *nije detektirano*; zeleno – apikalna komora; bijelo – bazolateralna komora; \bar{x} – srednja vrijednost; σ – standardna devijacija

5. RASPRAVA

5.1. Optimizacija rasta stanica i stvaranja monosloja Caco-2 stanica

Zadnjih godina sve je veći interes za studije propusnosti koristeći Caco-2 staničnu liniju te je stoga porasla potreba za standardizacijom ovog biološkog modela. Farmaceutske smjernice definiraju samo kriterije prihvatljivosti za validaciju Caco-2 stanica te u skladu s farmaceutskim zahtjevima potrebno je specificirati protokol za njenu provedbu i razviti interne postupke. Sve metode uzgoja stanica i presađivanja odvijale su se u sterilnim uvjetima (u laminaru s okomitim protokom zraka), a stanice su inkubirane u vlažnoj atmosferi na 37 °C u uvjetima u atmosferi 90% zraka i 5 % CO₂ u potpunom mediju. Rad pri ovim uvjetima je uobičajena laboratorijska praksa za uzgoj i održavanje Caco-2 stanica (Kus i sur. 2023). Sastav medija za održavanje stanične linije Caco-2 ovisi o dobavljaču, internom protokolu i svrsi eksperimenta (Kus i sur. 2023). U ovom istraživanju kompletni DMEM medij sadržavao je 1% NEAA, 1% PEN-STREP i 20% FBS, dok općenito je DMEM medij pomiješan s 10-20% FBS. Aminokiseline su esencijalne za rast stanica, antibiotici se dodaju za sprječavanje infekcija (Natoli i sur. 2012), a glutamin je važan faktor za diferencijaciju stanica i održavanje funkcije crijevne barijere (Huang i sur. 2022). Pawar i sur. (2019) su za kompletni medij za rast Caco-2 stanica razlikovao se jedino u udjelu FBS seruma – medij se sastojao od 10% FBS seruma, a u ovom istraživanju dodano je 20% radi boljeg rasta stanica. Medij je nakon tjedan dana nakon nasađivanja stanica u manje posude bio i dalje crven, što znači da se stanice slabo hrane hranjivim tvarima iz medija te su stanice ostavljene dodatno tjedan dana na inkubaciju. Za kultivaciju stanica do željene gustoće (4×10^6 stanica/mL) trebalo je 21 dan što je bilo duže od očekivanoga. Stanice su zatim bile nasađene na PET membranske umetke i održavane u kompletnom mediju koji se mijenjao dva puta tjedno. U nekim istraživanjima navedeno je da se medij mijenja 3 puta tjedno, no u ovom eksperimentu stanice su se sporo hranile medijem pa je bilo dovoljno dva puta. U ovim uvjetima stanice su postigle konfluenciju za 3 dana i potpuno se diferencirale za 17 dana. Prema generalnim smjernicama za proces diferencijacije Caco-2 stanica i stvaranja monosloja potrebno je 18-21 dan (Tor 2015) što približno odgovara dobivenim rezultatima. Za proces tripsinizacije koji je važan korak u uzgoju stanica ukupno je bilo potrebno 20 minuta što malo odskače od uobičajenog raspona vremena 6-15 minuta (Tor 2015). Pawar i sur. (2016) su Caco-2 stanice tripsinizirali s 0,25% tripsin-EDTA na 4 minute što se dosta razlikuje od dobivenog rezultata. Inkubacija s tripsinom trebala bi biti što kraća jer taj proces utječe na održivost stanica.

5.2. Citotoksični učinak

Ekstrakt mirte je reagirao s bojom čak i kada Caco-2 stanice nisu bile prisutne u otopini što ukazuje na prisutnost određenog spoja koji reagira s MTT. Peng i sur. (2005) su dokazali da luteolin i kvercetin mogu reducirati MTT u odsutnosti živih stanica. Zbog navedenih problematika, u ispitivanju citotoksičnosti bolje je koristiti Neutral red test jer se njime onemogućava doticaj boje s biljnim ekstraktom te boja direktno reagira sa stanicama.

5.3. Antioksidativni markeri

Prosječne vrijednosti aktivnosti antioksidativnih markera (GSH, SOD i katalaza) su izrazito niske, a to se može pripisati tome što u homogenatima stanica nije došlo do oksidativnog stresa te se navedeni antioksidacijski enzimi nisu aktivirali. Očekivano je da je antioksidacijska aktivnost najveća u ekstraktu mirte jer sadržava najveći udio fenolnih spojeva koji su važni antioksidansi te štite stanicu od oštećenja (Aleksić i Knežević 2014; Kurtagić 2017), no ovim istraživanjem to nije u potpunosti potvrđeno. Dakle, u stanicama nisu zabilježeni nikakvi štetni učinci što se posljedično odražava na slabu aktivnost antioksidativnih markera. Sama primjena ekstrakata biljaka (u ovom slučaju mirte i brokule) nije aktivirala enzime antioksidativne obrane u stanicama crijeva. Za buduća istraživanja potrebno je podložiti stanice stresu čime bi se potencijalno aktivirali antioksidacijski enzimi te izmjerile razine njihove aktivacije.

5.4. HPLC analiza prometa fenolnih spojeva kroz membranski jednosloj

Očekivano je da će fenolni spojevi iz biljnih ekstrakata proći kroz model Caco-2 stanica koji simulira crijevnu barijeru, no to u biološkom sustavu nije tako jednostavno i idealno. Koncentracija sinapinske kiseline iz ekstrakta mirte se smanjivala u apikalnoj komori tijekom vremena, ali koncentracije iste kiseline nisu detektirane u bazolateralnoj komori i obrnuto. Razlog tome je što se sinapinska kiselina vjerojatno zadržala (akumulirala) u crijevnim stanicama te nije prošla na suprotnu stranu komore. Slične rezultate dobili su i Zhang i sur. (2020) koji su utvrdili da se visoke koncentracije kvercetina nalaze u jednosloju stanica. Rezultati istraživanja Wanga i sur. (2023) u kojem su mjerili propusnost hidroskicimetnih kiselina kroz Caco-2 stanice utvrdili su da je najbolja propusnost ferulične kiseline u odnosu na sinapinsku i ostale fenolne kiseline, no rezultati ovog rada to ne mogu potkrijepiti. Strukturne razlike u građi fenolnih kiselina vjerojatno imaju utjecaj

na razinu propusnosti (Wang i sur. 2023). U izvornom ekstraktu mirte ferulična kiselina nije detektirana, no HPLC analizom u uzorcima detektirana je ferulična kiselina. Povećanje ferulične kisline moglo bi biti uzrokovano pregrađivanjem ili konjugacijom s drugim spojevima. Poquet i sur. (2008) u svom istraživanju su pokazali da je moguće stvaranje ferulične kiseline iz dihidroferulne kiseline nakon 30 minuta metabolizma na rezovima jetre štakora. Takav metabolizam može biti djelomično odgovoran za cirkuliranje slobodne ferulične kiseline uz mali postotak glukuronidnih i sulfatnih konjugata ferulične kiseline. U slučaju kada se nije dogodio nikakav transport, HPLC uređaj nije detektirao spoj iz biljnog ekstrakta jer su koncentracije spoja ispod njegove razine detekcije. Kvercetin može na sebe imati vezane šećerne ostatke koji onemogućuju njegovu detekciju. Kvercetin može biti u slobodnoj formi kao u ekstraktu brokule te ga je moguće detektirati, dok je u mirti kvercetin vjerojatno glikoliziran i njegova detekcija je onemogućena. Dodatan korak koji bi se ubuduće morao poduzeti za bolju detekciju je hidroliza šećernih ostataka kvercetina. Zhang i sur. (2020) utvrdili su da kvercetin glikozidi pokazuju slab transport kroz Caco-2 stanice, što sugerira da ne prelaze lako crijevnu barijeru u ovom modelu, dok kvercetin aglikoni pokazuju puno veću učinkovitost transporta u usporedbi s njihovim odgovarajućim glikozidima. Do istih zaključaka došli su i Walgren i sur. (1998). Mnogobrojna istraživanja naglašavaju kako postoji mogućnost da se neki polifenoli, unatoč svojim potencijalnim zdravstvenim dobrobitima, neće učinkovito apsorbirati u ljudskom crijevu čime se smanjuje njihova bioraspoloživost u organizmu. U nedostatku standarda za identifikaciju spojeva u uzorcima, ovakva analiza sužava izbor neidentificiranih pikova na kromatogramima te određivanje koji fenolni spojevi su prošli kroz crijevni epitel. Također, potrebno je razumjeti mehanizam apsorpcije fenolnih spojeva kako bi se povećala biodostupnost navedenih biomolekula te time omogućila bolja farmaceutska i terapijska sredstva sa svrhom prevencije i liječenja bolesti.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja čiji je cilj bio optimizirati uvjete za studije propusnosti biljnih ekstrakata kroz monosloj Caco-2 stanica izvedeni su sljedeći zaključci:

- Oporavak i uzgoj Caco-2 stanica trajao je 3 tjedna, a za proces diferencijacije i stvaranja monosloja Caco-2 stanica bilo je potrebno 17 dana što je nešto manje od uobičajenog trajanja stvaranja membranskog jednosloja koji simulira crijevni epitel.
- Neutral red test je prikladniji test za određivanje citotoksičnosti od MTT testa jer onemogućava doticaj boje s biljnim ekstraktom te boja direktno reagira sa stanicama. Neutral red testom dokazano je da korištene koncentracije biljnih ekstrakata nisu citotoksične.
- Prosječna aktivnost superoksid dismutaze i glutationa se ne razlikuje značajno u ekstraktu mirte i ekstraktu brokule od kontrolne skupine što znači da sama primjena ekstrakata navedenih biljaka nije aktivirala enzime antioksidativne obrane u stanicama crijeva, odnosno nije došlo do oksidativnog stresa.
- Ferulična kiselina, sinapinska kiselina, kvercetin i kempferol u biljnim ekstraktima mirte i brokule pokazali su slabu propusnost kroz crijevnu barijeru bilo u apikalno bazolateralnom ($A \rightarrow B$) ili bazolateralno apikalnom ($B \rightarrow A$) smjeru. Sinapinska kiselina iz ekstrakta mirte je pokazala konzistentnu propusnost te je u postotku od 81 % prošla u stanični monosloj. Fenolni spojevi se ili nakupljaju u crijevnim stanicama te ne prolaze kroz monosloj stanica ili nisu uopće detektirani. Kvercetin se u obliku aglikona apsorbira (iz ekstrakta brokule) kroz crijevnu barijeru, dok kao glikolizirani spoj (iz ekstrakta mirte) nije nedetektiran.

Navedeni zaključci mogu biti korisni za razvoj daljnjih istraživanja za procjenu crijevne propusnosti bioaktivnih tvari iz biljnih ekstrakata te takav optimizirani model Caco-2 stanica može pomoći u razvoju farmaceutskih i terapijskih sredstava te promicanju ljudskog zdravlja.

7. LITERATURA

Aebi H. (1984): Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-6.

Aleksić V., Knežević P. (2014): Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological research* 169: 240–254.

Alipour G., Dashti S. and Hosseinzadeh H. (2014): Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytotherapy research* 28: 1125–36.

Andjelkovic M., van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., Verhe R. (2006): Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* 98, 23-31.

Asif H., Akram M., Uddin S., Hasan Z. U., Sami A., Iqbal A., Tauseef U., Bari A. (2011): *Myrtus communis* Linn. (pharmacological activity). *Journal of Medicinal Plants Research* 5(26): 6257–6259.

Asgarpanah, J., Ariamanesh, A. (2015): Phytochemistry and pharmacological properties of *Myrtus communis* L. *Indian journal of traditional knowledge* 14: 82-87.

Ayaz F. A., Hayirlioglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Gruz J., Valentova K., Ulrichova J., Strnad M. (2008): Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry* 107: 19–25.

Aydın C., Özcan M. M. (2007): Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering* 79(2): 453–458.

Barra A. (2012) Mirta. <https://www.plantea.com.hr/> (pristupljeno 27. srpnja 2024.)

Berendika M., Drozdek S. D., Odeh D., Oršolić N., Dragičević P., Sokolović M., Garofulić I.E., Đikić D., Jurčević I.L. (2022): Beneficial effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) and myrtle (*Myrtus communis* L.) extract on rat health. *Molecules* 27: 581.

Caco-2 Permeability Assay (2024) <https://www.profagen.com/> (pristupljeno 10. veljače 2024.)

Cardona F., André´s-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F. J., Queipo-Ortuño M. I. (2013): Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24(8): 1415–1422.

Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., Velasco P. (2011): Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* 16: 251-80.

Dabbaghi, M. M., Fadaei M. S., Soleimani Roudi H., Baradaran Rahimi V., Askari V. R. (2023): A review of the biological effects of *Myrtus communis*. *Physiological reports* 11(14): e15770.

Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J. P. E., Tognolini M., Borges G., Crozier A. (2013): Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants and redox signaling* 18: 1818-1892.

Dizdar L. (2020): Bioaktivni spojevi i antioksidacijska aktivnost mirte, tršlje i lovora. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb.

- Duralija B., Lozica E., Mikulec N., Maslov Bandić L., Voća S. (2021): Kemijski i mineralni sastav plodova mirte (*Myrtus communis* L.). Glasnik Zaštite Bilja 44(3): 12–16.
- Duthie G., Crosier A. (2000): Plant-derived phenolic antioxidants. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 3: 447–51.
- Duval K. (2017): Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Physiology (Bethesda) 32(4): 266 – 277.
- Fabek S. (2008): Uzgoj brokule. Glasnik zaštite bilja 3: 32-37.
- Fadda A., Mulas M. (2010): Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening. Scientia Horticulturae 125: 477–485.
- Flohé L., Otting F. (1984): Superoxide dismutase assays. Methods in Enzymology 105: 93-104.
- Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A., Rostagno M. A., Martinez J. A. (2009): Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. Inflammation Respiratory 58: 537–552.
- Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G., Rakesh D. D. (2008): Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International centre for science and high technology, 21-25.
- Huang C. Y., Chen J. K., Kuo W. T. (2022): Glutamine induces remodeling of tight junctions in Caco-2 colorectal cancer cell. Medical Oncology 40: 32.
- Iftikhar M., Iftikhar A., Zhang H., Gong L., Wang J. (2020): Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review. Food Research International 136: 109240.
- Ioannou I., Ghoul M. (2012): Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants 10.5772/30690.
- Janić I. (2019): Modeliranje staničnih sferoida različitim uzgojnim metodama in vitro. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Osijek.
- Jovančević, M. (1980.): Mirta (*Myrtus communis* L.). Šumarska enciklopedija II, JLZ, str. 419.
- Kamenjašević M., Oršolić N., Matković A., Matković B. R. (2019.): Učinkovitost polifenolne prehrane na zdravlje i funkcionalnu sposobnost sportaša i rekreativaca. Hrvatski športskomedicinski vjesnik 32: 5-21.
- Kamboj A., Sharma S., Singh V., Sinha A., Yadav S., Lal B., Chaudhary M., Devi, L. (2023): Phytochemical and therapeutic potential of broccoli (*Brassica oleracea*): A review. The Pharma Innovation Journal 12: 633-638.
- Katalinić V., Smole Možina S., Skroza D., Generalić I., Abramović H., Miloš M., Ljubenković I., Piskernik S., Pezo I., Terpinč P., Boban M. (2010): Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry 119: 715-723.

Kopjar M., Šubari D., Piližota V. (2012): Glukozinolati: Biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku 1: 22-35.

Kuete V., Karaosmanoğlu O., Sivas H. (2017): Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. U: Kuete V. (ur.) Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Academic Press, str. 271-297.

Kurtagić H. (2017): Polifenoli i flavonoidi u medu. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku 6: 8-35.

Kus M., Ibragimow I., Piotrowska-Kempisty H. (2023): Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays. Pharmaceutics, 15(11): 2523.

Kazazić S. P. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 55: 279-290.

Latte, K. P., Appel, K., Lampen, A. (2011): Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. Food Chemistry and Toxicology 49, 3287–3309.

Manach C, Scalbert A. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition 79, 727-47.

Mir M. A. (2024): *Myrtus communis* leaves: source of bio-actives, traditional use, their biological properties, and prospects, Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 23: 487 - 515.

MTT Assay (2022) <https://www.aatbio.com/> (pristupljeno 20. ožujka 2024.)

MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation (2024) <https://www.merckgroup.com/en> (pristupljeno 12. veljače 2024.)

Natoli M. Leoni B. D., D'agnano I., Zucco F., Felsani A. (2012): Good Caco-2 cell culture practices. Toxicology in Vitro 26: 1243–1246.

Neutral Red Uptake Assay (2022) <https://www.re-place.be/database> (pristupljeno 28. kolovoza 2024.)

Nikolić T. (2024): Flora Croatica Database. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. <http://hirc.botanic.hr/fcd> (pristupljeno 25. svibnja 2024.)

Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009): Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2: 270–278.

Pawar R., Barve S., Joshi M., Dhawal P., Nabar B. (2019): Optimization of Protocol for Maintaining and Freezing Caco-2 Cells. International Journal of Modern Science and Technology

Pao Y. (2015) <https://pixabay.com/> (pristupljeno 27. srpnja 2024.)

Peng L., Wang B., Ren P. (2005): Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 45 (2): 108-111.

Poquet L., Clifford M. N., Williamson G. (2008) Investigation of the metabolic fate of dihydrocaffeic acid. Biochemical Pharmacology 75(5): 1218-1229,

Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K. (2016): Biološki aktivni spojevi glukozinolati i polifenoli u cvatu, listu i stabljici brokule (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). Glasnik zaštite bilja 5: 24-29.

Repetto G., Del Peso A., Zurita J.L. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols 3: 1125–31.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995): The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research 22: 375–383.

Salbitani G., Bottone C., Carfagna S. (2017): Determination of Reduced and Total Glutathione Content in Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea*. Bio-protocol 7(13): e2372.

Shahidi F., Yeo J.D. (2018): Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A review. International Journal of Molecular Sciences 19: 1573.

Shivashankara K.S., Acharya S.N. (2010): Bioavailability of Dietray Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. The Open Nutraceuticals Journal 3: 227-241.

Starr F. i Starr K. (2012) Mirta. <https://www.plantea.com.hr/> (pristupljeno 27. srpnja 2024.)

Sumbul S., Ahmad M. A., Asif M., Akhtar M. (2011): *Myrtus communis* Linn - A review. Indian J Natural Products and Resources 2(4): 395-402.

Syed R. U., Moni S. S., Break M. K. B., Khojali W. M. A., Jafar M., Alshammari M. D., Abdelsalam, K., Taymour S., Alreshidi K. S. M., Elhassan Taha M. M. i sur. (2023): Broccoli: A Multi-Faceted Vegetable for Health: An In-Depth Review of Its Nutritional Attributes, Antimicrobial Abilities, and Anti-inflammatory Properties. Antibiotics 12: 1157.

Tietze F. (1969): Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. Analytical Biochemistry 27: 502-522.

Tor L. (2015) Caco-2 Cell Line. U: Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I. (ur.) The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Cham (CH): Springer, Chapter 10. (pristupljeno 26. 8. 2024.)

Travers-Martin N., Kuhlmann F., Müller C. (2008): Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. Plant Physiology and Biochemistry 46: 506-516.

Vallejo F., Tomás-Barberán F., Ferreres F. (2004): Classification of flavonols in broccoli. Journal of Chromatography 1054: 18-93.

van Breemen R. B., Li Y. (2005): Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 1: 175-85.

Walgren R. A., Walle U. K., Walle T. (1998): Transport of Quercetin and Its Glucosides across Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. Biochemical Pharmacology 55(10): 1721–1727.

Wang Z. Y., Yin Y., Li D. N., Zhao D. Y., Huang J. Q. (2023): Biological Activities of p-Hydroxycinnamic Acids in Maintaining Gut Barrier Integrity and Function. Foods 12(13): 2636.

Zhang H., Hassan Y. I., Liu R., Mats L., Yang C., Liu C., Tsao R. (2020): Molecular Mechanisms Underlying the Absorption of Aglycone and Glycosidic Flavonoids in a Caco-2 BBe1 Cell Model. *ACS Omega* 5(19): 10782-10793.

Zhong R., Zhou D. (2013): Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of Integrative Agriculture* 12: 1826– 1838.

8. ŽIVOTOPIS

Laura Filipec rođena je 25. veljače 2000. godine. Pohađa osnovnu školu u Dubravi (blizu Vrbovca) koju završava 2014. godine, a zatim upisuje smjer opće gimnazije u Srednjoj školi Vrbovec. Nakon završene srednje škole, upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studiranja, prisustvovala je kao pasivni sudionik na 7. (2022.) i 8. (2023.) Simpoziju studenata kemičara. Metodičku praksu iz biologije održala je u XV. gimnaziji u Zagrebu, a metodičku praksu iz kemije održala je u OŠ Ivana Gorana Kovačića u Zagrebu. Također prisustvovala je na Županijskom stručnom vijeću nastavnika biologije u Zagrebu 2024. godine.