

Antioksidacijski učinak komine masline u model-sustavu liposoma

Šćur, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:285295>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Valentina Šćur

**Antioksidacijski učinak komine masline u
model-sustavu liposoma**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo i uz pomoć izv. prof. dr. sc. Maria Juga.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2014-09-9143.

Zahvala:

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na ukazanom vremenu i koja je svojim stručnim savjetima pomogla u izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mariu Jugu na pomoći pri izradi rada te svim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane koji su mi uvijek bili spremni izaći u susret.

Posebna zahvala mojim roditeljima i sestri na podršci i razumijevanju tijekom cijelog studiranja.

Velika zahvala mojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali i obogatili ovo razdoblje.

Sadržaj:

1.Uvod.....	1
1.1. Maslina	1
1.2. Komina masline.....	2
1.3. Oksidativni stres i antioksidansi	3
1.3.1. Polifenoli	3
1.3.2. Antioksidansi u komini masline	5
1.3.3. Butilhidroksi anisol (BHA)	6
1.3.4. Lipidna peroksidacija.....	6
1.4. Liposomi	8
1.5. Ciklodekstrini.....	9
1.6. Zeta potencijal.....	11
2.Obrazloženje teme.....	12
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Kemikalije i pribor	13
3.2. Instrumenti.....	13
3.3. Plan eksperimentalnog rada	14
3.4.Priprema reagensa	14
3.5. Uzorci	15
3.5.1. Priprema ekstrakata.....	15
3.5.2. Priprema liposoma	16
3.5.3. Priprema uzoraka s BHA	17
3.5.4. Priprema uzoraka s nativnim ekstraktom komine masline.....	17
3.5.5. Priprema uzoraka ekstrakata komine masline inkapsuliranih ciklodekstrinima	18
3.6. Karakterizacija liposoma	19
3.7. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti TBARS metodom.....	20
3.7.1. Izvođenje TBARS pokusa.....	21
3.7. Optimizacija uvjeta oksidacije.....	22
4.Rezultati.....	23
4.1. Karakterizacija liposoma	23
4.2. Optimizacija uvjeta oksidacije.....	24

4.3. Antioksidacijski učinak BHA u modelu liposoma	25
4.4. Antioksidacijski učinak nativnog ekstrakta komine masline u modelu liposoma	27
4.5. Učinak inkapsulacije ciklodekstrinima na antioksidacijsku aktivnost komine masline u modelu liposoma	29
5. Rasprava.....	32
6. Zaključci.....	34
7. Literatura.....	36
8. Sažetak / Summary.....	39
9. Temeljna dokumentacijska kartica /Basic documentation card.....	41

1.UVOD

1.1. Maslina

Maslina (*Olea Europea L.*) je biljna vrsta iz porodice maslina (*Oleaceae*) karakteristična za obalno područje Mediterana. Raste sporo te joj je za razvoj potrebno dovoljno topline i sunca. Stablo je razgranato i može narasti do 10 metara visine s mnogo grana i širokom krošnjom. Listovi su nasuprotni, na kratkim peteljka, kožasti, zimzeleni, ušiljenog vrha, cjelovitog ruba, na naličju srebrnosivkasti, dugi 5 - 10 cm, a široki do 2 cm. Cvjetovi su jednospolni, dvodomni skupljeni u rahle metličaste cvatove. Plod masline je mesnata i ovalna koštunica duga 1 - 3 cm, široka do 2 cm. Sastoji se od kože, pulpe i sjemenke. Ulje se u plodu nalazi u pulpi u vakuolama stanica. U početku je zelena, a dozrijevanjem u rujnu ili listopadu postaje modra, crna ili smeđezelena (plantea.com). Na istočnoj obali Sredozemnog mora i u južnim predjelima središnje Azije, maslina raste samoniklo. U Hrvatskoj je maslina najvećim dijelom rasprostranjena na otocima i uskom dijelu priobalja. Uzgajaju se domaće, ali i strane sorte maslina. Najviše se prednost daje onim sortama koje su prikladne za dobivanje ulja i konzerviranje jela (Kuštrak, 2005.). Pojedini primjerci masline, zahvaljujući izvanrednoj sposobnosti obnavljanja grana i korijena, mogu doživjeti starost i više od 2000 godina (slika 1).



Slika 1. *Olea europae L.* na Velikom Brijunu stara 1600 godina (Fotografija: Valentina Šćur)

1.2. Komina masline

U procesu proizvodnje maslinovog ulja kao nusprodukt nastaje komina masline kao čvrst produkt i vegetabilna ili biljna voda kao tekuća faza. Potrebno je pravilno zbrinjavanje komine masline zbog njezinog fitotoksičnog učinka na tlo i vodu. Također sadrži mnoge komponente koje se mogu reciklirati i iskoristiti. Komina masline sastoji se od kože ploda, pulpe i dijelova koštice. Smjesa je gumaste strukture, tamne boje, intenzivnog mirisa i umjereno kisele pH vrijednosti. Kemijski sastav može varirati ovisno o načinu prerade, tipu, stanju i podrijetlu masline (Sladonja i sur., 2006.). Centrifugalnom ekstrakcijom s dvije faze dobije se komina s većim sadržajem vode, a manjim sadržajem ulja. Korištenjem centrifugalnih ekstraktora s tri izlaza dobiva se komina bogatija uljem. Glavne kemijske sastavnice komine masline su celuloza, voda, ulje, proteini te organski spojevi kao što su polifenoli, organske kiseline, lipidi, alkoholi (Frankel i sur., 2013).

Komina masline može se koristiti na više načina, a neki od njih su proizvodnja energije, izolacija organskih spojeva, kao herbicid, pesticid, stočna hrana, gnojivo, regenerator tla (Brlek i sur., 2009).



Slika 2. Komina masline, (agroklub.com,29.10.2013)

1.3. Oksidativni stres i antioksidansi

Slobodni radikali su molekule ili molekularni fragmenti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskoj ili molekularnoj orbitali koji im omogućuju veliku reaktivnost. Kisikovi slobodni radikali, koji se nazivaju i reaktivni kisikovi spojevi (ROS) mogu nastati tako da molekula kisika neenzimatskom oksidacijom oduzima elektrone drugim molekulama (Štefan i sur., 2007). Utjecaj oksidativnog stresa ovisi o mjestu, intenzitetu stvaranja i vrsti oksidansa te djelovanju antioksidansa i o sposobnosti sustava za oporavak (Ćosić i sur., 2017). ROS uključuju superoksidge, hidroksidne i peroksidne slobodne radikale, dušikove spojeve (NO i peroksinitril). Oni služe kao signalne molekule u normalnim i patološkim putovima, a njihovo održavanje u granicama bitno je za održavanje homeostaze. Kada njihova proizvodnja nadvlada antioksidacijske putove, mogu dovesti do oštećenja lipida, DNA i proteina. Biološki učinci koje iniciraju ROS mogu izazvati široki raspon fenotipskih odgovora kao što su aktivacija genske ekspresije, starenje, proliferacija, stanična smrt ili usporavanje rasta (Johri i Flint-Beal, 2012)

Antioksidansi su tvari koje u malim koncentracijama dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata. Smatra se da antioksidans može učinkovito reducirati prooksidans uz nastanak tvari koje nisu toksične. Mogu djelovati različitim mehanizmima kao što su uklanjanje kisika, smanjenje lokalne koncentracije kisika, uklanjanje metalnih iona, uklanjanje slobodnih radikala, uklanjanje ROS ili uklanjanje singletnog kisika (Štefan i sur., 2007).

1.3.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka i djeluju kao antioksidansi ovisno o redoks svojstvima fenolnih hidroksilnih skupina i strukturnom odnosu između različitih dijelova u kemijskoj strukturi (Bianco i sur., 2006). Za njihovu strukturu karakteristični su aromatski prsteni supstituirani barem jednom hidroksilnom skupinom. Različite skupine polifenola razlikuju se po broju i položaju aromatskih prstena te njihovih supstituenata (Losada-Eccheberria i sur., 2017).

Polifenoli su vrlo heterogena skupina spojeva, a obzirom na kemijsku strukturu mogu se klasificirati na sljedeći način:

- **Fenolne kiseline**

Fenolne kiseline spadaju u neflavonoidne polifenolne spojeve te se još mogu podijeliti u dvije skupine, derivate benzoične i cimetine kiseline koji se temelje na C1-C6 i C3-C6 strukturnoj formuli. Voće i povrće sadrži mnogo slobodnih fenolnih kiselina dok su u žitaricama i sjemenkama u vezanoj formi i mogu se osloboditi djelovanjem enzima ili hidrolizom.

- **Flavonoidi**

Opća struktura flavonoida je C6-C3-C6 u kojoj su jedinice C6 prstenovi fenolne prirode. S obzirom na varijacije u strukturi, flavonoidi se mogu podijeliti na antocijane, flavan-3-ole, flavone, flavanone i flavonole. Osnovna struktura flavonoida je aglikon, ali se u prirodi najčešće javljaju kao glikozidi. Biološka aktivnost ovih spojeva koja uključuje antioksidativni učinak ovisi o strukturnim razlikama i različitim putovima glikozilacije.

- **Polifenolni amidi**

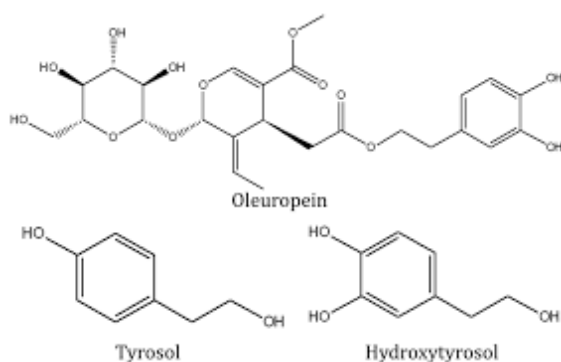
Neki od polifenola u funkcionalnoj skupini sadrže dušik. Dvije su značajne skupine takvih spojeva, a to su kapsaicinoidi kojima je dokazano antioksidativno i protuupalno djelovanje te avenantramidi koji imaju antioksidativni učinak koji se temelji na inhibiciji oksidacije LDL-a.

- **Ostali polifenoli**

Uz već navedene polifenolne spojeve, postoji i skupina neflavonoidnih polifenola koji se smatraju važnima za ljudsko zdravlje. Neki od njih su resveratrol koji se nalazi u grožđu i crnom vinu, elagična kiselina i njezini derivati u bobičastom voću. Lignani u žitaricama postoje u vezanoj formi te hidrolizom nastaju slobodni spojevi. U različitim biljkama mogu se nalaziti galna i elagična kiselina, a njihovi esteri s glukozom nazivaju se tanini (Tsao i sur., 2010.).

1.3.2. Antioksidansi u komini masline

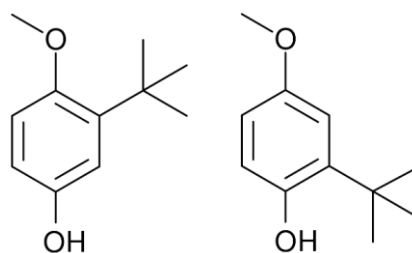
Ulje, plod, lišće, stabljika, ali i komina masline bogati su polifenolima, a najviše oleuropeinom, tirosolom i hidroksitirosolom (Wannes i Marzouk, 2016.). Oleuropein može inhibirati $PPAR\gamma$ receptore (peroksisom proliferatorom aktivirani receptor gamma) i aktivirati UCP-1 receptore što dovodi do povećane osjetljivosti tkiva na inzulin i preraspodjele adipoznog tkiva. Hidroksitirosol može aktivirati AMPK (5' adenzin monofosfat - aktivirana protein kinaza) i inhibirati $PPAR\gamma$ i $PPAR\alpha$ što dovodi do pojačane beta oksidacije i inhibicije diferencijacije adipocita (Castro-Barquero i sur., 2018).



Slika 3. Strukturne formule oleuropeina, tirosola i hidroksitirosola (Chin i sur., 2016.)

1.3.3. Butilhidroksianisol (BHA)

Kao jedan od uzoraka u ovom diplomskom radu korišten je i BHA (butilhidroksianisol) koji se primarno primjenjuje kao antioksidans za očuvanje masti i ulja u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima te u prehrambenoj industriji. Bijele je boje, čvrste i voskaste strukture te se sastoji od 2- i 3- tert-butil-4-hidroksianisola i veoma je aromatičnog mirisa. Također je i dokazani karcinogen (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.9).



Slika 4. 2- i 3- tert-butil-4-hidroksianisol (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov9, 23.7.2005.)

1.3.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija predmet je mnogih istraživanja već nekoliko desetljeća. Smatra se da je podloga za mnoga oboljenja kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, karcinom (Shichiri i sur. 2014). Predstavlja oksidativno oštećenje koje zahvaća stanične membrane, lipoproteine i ostale molekule koje sadrže lipide u uvjetima oksidacijskog stresa. (Jančić i Stošić, 2014).

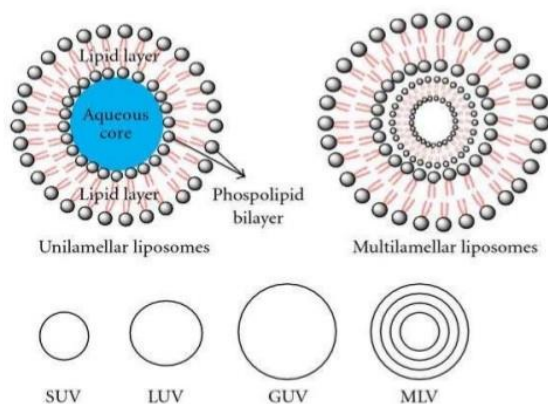
Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) podložnije su djelovanju ROS nego zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu. Hidroksilni radikal najčešće pokreće lipidnu peroksidaciju, ali i drugi slobodni radikali također mogu pokrenuti proces peroksidacije. Reakcija molekularnog kisika sa PUFA-om spinski je zabranjena, peroksidacija je moguća mehanizmom kojim se premošćuje spinska prepreka između kisika i PUFA-e. U lipidnim sustavima ROS je sposoban izdvojiti atom vodika iz metilenske skupine te tako nastaju slobodni lipidni radikali. Lipidni peroksidi pod djelovanjem iona željeza ili bakra stvaraju razgradne produkte kao što su aldehidi, ketoni, ugljikovodici, epoksidi, aktivni radikali. Malondialdehid

(MDA) pokazatelj je lipidne peroksidacije. MDA se u fiziološkim uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji međureagira s proteinima. Ciljno mjesto napada MDA je i gvanin u DNA što može izazvati mutagena oštećenja. Lipidna peroksidacija u staničnim membranama može dovesti do gubitka fluidnosti, padanja membranskog potencijala, povećane permeabilnosti za ione, rupture stanica i otpuštanja staničnog sadržaja (Štefan i sur., 2007).

1.4. Liposomi

Liposomi su sferične fosfolipidne vezikule koje mogu biti načinjene od kolesterola i prirodnih netoksičnih fosfolipida, veličine 30 nm do nekoliko mikrometara. Obećavajući su sustavi za dostavu aktivnih tvari koje mogu biti hidrofilnog, lipofilnog ili amfipatskog karaktera na mjesto djelovanja s obzirom na njihovu veličinu i svojstva te mogu zaštititi aktivnu tvar od razgradnje. Svojstva im se znatno se razlikuju s obzirom na lipidni sastav, veličinu, površinski naboj i način izrade. Prednosti liposoma su to što su netoksični, fleksibilni, biokompatibilni, bioazgradivi, smanjuju toksičnost enkapsuliranog agensa, mogu smanjiti nuspojave te povećati učinkovitost lijeka. S druge strane slabo su topljivi, imaju kratak životni vijek, mogu podlijeći oksidaciji ili hidrolizi te može doći do izlivanja enkapsuliranog sadržaja. Također njihova izrada je skupa što sve može dovesti do problema u njihovoj izradi i primjeni (Akbarzadeh i sur., 2013).

Liposomi su strukturno klasificirani na temelju fosfolipidnih dvosloja. Unilamelarne vezikule sastoje se od jednog sloja fosfolipida koji kapsulira unutarnju vodenu jezgru. Mogu se podijeliti na male unilamelarne vezikule (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV), velike unilamelarne vezikule (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV), vrlo velike unilamelarne vezikule (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUV). Multilamelarne vezikule (engl. *multilamellar vesicles*, MLV) sastoje se od više slojeva fosfolipidnih dvosloja. Različiti tipovi liposoma prikazani su na slici 3. (Mishra i sur., 2011).

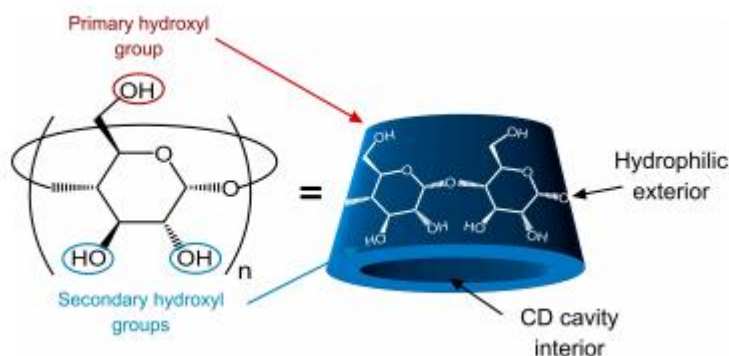


13

Slika 5. Klasifikacija liposoma (Mishra i sur., 2011.)

1.5. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji se koriste kao farmaceutski ekscipijensi te zbog svojih svojstava privlače sve više pažnje u znanosti. Čine ih glukopiranozne jedinice, a dobivaju se katalitičkom razgradnjom škroba pomoću enzima glukotransferaze. Dolazi do kidanja lanaca i intermolekularne preraspodjele. Najčešće sadrže 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica. Molekularna struktura ciklodekstrina izgleda poput krnjeg stošca zbog konformacije stolca glukopiranoznih jedinica povezanih α -1,4-glikozidnim vezama. Unutarnja šupljina je hidrofobna, a vanjski dio je hidrofilan zbog brojnih hidroksilnih skupina. U unutarnju šupljinu mogu se smjestiti male hidrofobne molekule ili molekule koje veličinom odgovaraju šupljini (Topuz i Uyar, 2018.).



Slika 6. 3D prikaz ciklodekstrina i glukopiranozne jedinice, (Topuz i Uyar, 15.05.2017.)

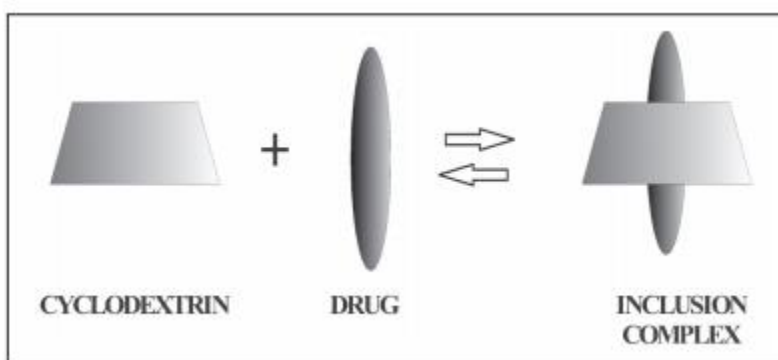
Ciklodekstrini ne mogu sadržavati manje od 6 glukopiranoznih jedinica zbog steričkih smetnji, a u literaturi su opisani ciklodekstrini sa više od 8 glukopiranoznih jedinica, ali njihova važnost u farmaceutici još se istražuje (Jug i Bećirević-Laćan, 2008).

U tablici 1 prikazanoj ispod navedena su fizikalno-kemijska svojstva nekih farmaceutski važnih ciklodekstrina. Ciklodekstrini su sposobni stvarati inkluzijske komplekse s različitim organskim i anorganskim spojevima u vodenim otopinama. Molekularna enkapsulacija može pozitivno utjecati na svojstva spojeva uklopljenih u ciklodekstrine te im tako poboljšati svojstva kao što su topljivost i kemijska stabilnost što pruža mnogo novih mogućnosti (Martin de Valle, 2018). Formiranje inkluzijskog kompleksa može zaštititi molekule od redukcije, oksidacije, hidrolize, racemizacije ili enzimske razgradnje (Jug i Bećirević-Laćan, 2008).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva nekih farmaceutski važnih ciklodekstrina

Ciklodekstrin	N ⁽¹⁾	R	Supstitucija ⁽²⁾	Mr (g/mol)	Topljivost ⁽³⁾
α-CD	6	-H	-	972	145
β-CD	7	-H	-	1135	18,5
HP-β-CD	7	-CH ₂ CHOHCH ₃	0,65	1400	>600
SBE-β-CD	7	-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺	1,8	1312	>500
METIL-β-CD	7	-CH ₃	0,9	2163	>500
γ-CD	8	-H	-	1297	80

(1)- broj glukopiranoznih jedinica; (2) - prosječan broj supstituenata po glukopiranoznoj jedinici; (3) - topljivost u vodi pri 25 °C



Slika 7. Nastajanje inkluzijskog kompleksa (Jug i Bećirević Laćan 2008.)

Kada se govori o novim ekscipijensima, sigurnost je na prvom mjestu te su zato na ciklodekstrinima provedena brojna toksikološka i biološka istraživanja. Ciklodekstrini su otporni na djelovanja pankreasne amilaze i razgradnju ljudskom slinom. Unatoč velikoj molarnoj masi, relativno teško prolaze kroz biološke membrane. Samo 1 - 3 % ciklodekstrina apsorbira iz gastrointestinalnog trakta dok je apsorpcija preko sluznice nosa, kože i oka još niža. Apsorbirani ciklodekstrini izlučuju se bubrezima. Toksikološka istraživanja pokazala su da oralno primljeni ciklodekstrini nisu toksični, a pokazalo se da su γ-CD i HP-β-CD netoksični i pri parenteralnoj primjeni (Jug i Bećirević Laćan, 2008).

1.6. Zeta potencijal

Zeta ili elektrokinetički potencijal je potencijal na udaljenosti od plohe smicanja, a bitan je parametar u procjeni stabilnosti koloidnih disperzija. Naime, koloidni sustavi s velikom apsolutnom vrijednosti zeta potencijala su stabilni, a sustavi kod kojih je vrijednost zeta potencijala manja su nestabilni i teže flokulaciji. Na površini koloidne čestice nalazi se električni dvostruki sloj, sačinjen od sloja slabo pokretnih iona i naziva se Sternov sloj te sloj suprotno nabijenih pokretnih iona iz otapala. Zajedno s česticom se giba Sternov sloj, ali i dio vezanih molekula otapala koji je od ostalih molekula otapala odijeljen plohom smicanja (Bhattacharjee, 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U našem je području komina masline široko dostupna, ali se najčešće smatra otpadom te njezin potencijal nije dovoljno prepoznat. Znanstvenim istraživanjima potvrđeno je kako je komina bogata polifenolima koji djeluju kao antioksidansi te pokazuju učinkovitost u prevenciji mnogih bolesti u kojima je oksidacijski stres važan dio etiologije. Unos polifenola prehranom ili dodacima prehrani pomaže u regulaciji krvnog tlaka i lipidnog statusa, smanjuje rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti, doprinosi održavanju zdravlje kože, a neki polifenoli također pokazuju i protuupalni učinak.

U ovom radu korišteni su liposomi kao model stanične membrane kako bi se procijenio antioksidacijski potencijal nativnih polifenolnih ekstrakata komine masline i ekstrakata pripremljenih korištenjem različitih vrsta ciklodekstrina. Model liposoma koji je odabran za istraživanje antioksidacijske aktivnosti predstavlja značajan iskorak u odnosu na postojeće kemijske modele određivanja antioksidacijskog potencijala jer daje specifičan uvid u mogućnosti inhibicije lipidne peroksidacije u biološkim membranama te ponašanja ekstrakata komine masline u nutritivnim matricama emulzijskog tipa. Dobiveni rezultati pružit će originalni uvid u mogućnosti korištenja polifenolnog ekstrakta komine masline kao nutriceutika s primarno antioksidacijskim učinkom te kao prirodnog aditiva u sustavima emulzija. Također, rezultati će doprinijeti trenutnim saznanjima o mogućnostima primjene inkapsulacijskih tehnika u poboljšanju funkcionalnih karakteristika prirodnih ekstrakata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i pribor

- Sojin lecitin
- Bakrov (II) sulfat pentahidrat (Kemig, Hrvatska)
- Octena kiselina (Kemig, Hrvatska)
- NA-dodecil sulfat (Sigma, SAD)
- 2-tiobarbiturna kiselina (Sigma, SAD)
- Etanol (Kemig, Hrvatska)
- N-butanol (Sigma, SAD)
- Natrijev klorid (Kemig, Hrvatska)
- Malondialdehid (MDA)-tetrabutilamonijeva sol (Sigma, SAD)

3.2. Instrumenti

- Vodena kupelj s mogućnosti soniciranja
- Analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
- Vodena kupelj (GFL 1086, Helago, Češka)
- Vortex miješalica (Multimode Plate Reader Victor™ X3 PerkinElmer®, Velika Britanija)
- UV-VIS spektrofotometar UV 4-100, (ATI Unicam, Velika Britanija) Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)
- Mikser (MIXER UZUSIO HARMONY VTX-3000L LMS®)
- Rotavapor (Buchi, Švicarska)
- Liofilizator (Christ Alpha 1-4 LOC-1, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
- Vakuum pumpa (Trivac E2 Leybold, Njemačka))

3.3. Plan eksperimentalnog rada

- Priprema praznih liposoma (bez antioksidansa)
- Optimiziranje TBARS pokusa
- Priprema liposoma s različitim koncentracijama nativnog ekstrakta i određivanje koncentracijskog raspona
- Priprema liposoma s različitim ekstraktima komine masline unutar koncentracijskog raspona
- Priprema liposoma s BHA-om (referentni antioksidans)

3.4. Priprema reagensa

- **Standardne otopine malonaldehida (MDA)**

Pripremljene su standardne otopine MDA koncentracija 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 μM . Odgovarajući volumen stock otopine standarda ($c=3035\mu\text{M}$) otopi se u pročišćenoj vodi, octenoj kiselini i TBA. Za standard je korištena malondialdehid (MDA)-tetrabutylamonijeva sol jer MDA nije stabilan kao takav, no kvantitativno se oslobađa kad je sol pomiješana s kiselinom.

- **30 mM bakrov (II) sulfat 5-hidrat**

Za pripremu 50 ml 30 mM bakrovog (II) sulfat 5-hidrata otopi se 374.8 mg bakrovog (II) sulfat 5-hidrata u 50 ml destilirane vode.

- **20% octena kiselina**

100 ml 20% octene kiseline pripremi se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 ml dodaje 19,22 ml 99,5 % octene kiseline i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- **SDS 1,1 %**

100 ml 1,1 % SDS-a pripremi se tako da se 1,1 g SDS-a otopi u 100 ml destilirane vode.

- **TBARS reagens**

20 ml TBARS reagensa pripremi se tako da se 0,16 g 2-tiobarbiturne kiseline otopi u 20 ml prethodno pripravljenog 1,1 % SDS-a pomoću plamenika.

- **60 % etanol**

Otopina 60%-tnog etanola izrađuje se iz 96%-tnog etanola. 625 ml 96%-tnog etanola nadopunjuje do 1000 ml destiliranom vodom.

3.5. Uzorci

U ovom diplomskom radu istraživana je antioksidacijska učinkovitost slijedećih uzoraka:

1. BHA (standard)
2. Nativni ekstrakt komine masline (pripravljen bez ciklodekstrina)
3. Ekstrakt komine masline inkapsuliran s hidroksipropil-beta ciklodekstrinom (HP- β)
4. Ekstrakt komine masline inkapsuliran s nasumično metiliranim beta ciklodekstrinom (RAMEB)

3.5.1. Priprema ekstrakata

Nativni ekstrakt priprema ekstrakcijom prosušene, odmašćene i prosijane komine, 60 %-nim etanolom ekstrakcijom 2 sata na 70 °C uz konstantno protresanje (110 rpm). Inkapsulirani ekstrakti pripremaju se na isti način uz dodatak nasumično metiliranog odnosno hidroksi-propil- β -ciklodekstrina.

Nakon ekstrakcije uzorci se profiltriraju kroz glatki i gusti filter papir u prethodno izvagane tikvice. Filtrati se na rotavaporu upare do 30 - 40% početnog volumena kako bi se uklonio etanol., a zatim se liofiliziraju 48 sati i iz razlike masa odredi se prinos. Uzorci se sjedine i pohrane u plastične spremnike na – 20 °C.

3.5.2. Priprema liposoma

Priprema ishodne otopine liposoma napravljena je prema protokolu kojeg su opisali Huang i Frenkel (1997).

Za pripremu ishodne otopine liposoma 2.4 g sojinog lecitina miješa se s 300 ml deionizirane vode na magnetskoj miješalici. Sadržaj se nakon toga sonicira 15 minuta u UZV kupelji. Ishodna otopina liposoma korištena je za pripremu kontrolne otopine liposoma i liposoma s uzorkom/BHA.

Za pripremu kontrolne otopine liposoma uzima se alikvot od 50 ml ishodne otopine liposoma i dodaje 1 ml etanola za pripravu kontrolnog liposoma i sonicira još 5 minuta, a za pripremu otopina liposoma s uzorkom umjesto etanola dodaje se 1 ml ishodne otopine uzorka (ekstrakta komine masline/BHA). Zatim se u otopinu dodaje 30 mM bakrovog acetata i dobro promiješa pomoću miješalice.

Alikvot od 1 ml tako pripremljenih otopina koristi se za izvođenje TBARS reakcije.



Slika 8. Izrada liposoma (Fotografija: Valentina Šćur)

3.5.3. Priprema liposoma s različitim koncentracijama BHA

Etanolna otopina BHA pripremi se u koncentraciji 0,25 mg/ml. Liposomi s BHA pripremljeni su tako da je u 50 ml otopine liposoma dodan 1ml etanolne otopine BHA. U tablici 2 je prikazana priprava uzoraka za ispitivanje antioksidacijskog učinka BHA u modelu liposoma.

Tablica 2. Priprema kontrolne otopine i uzorka

	1 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	3 ⁽³⁾
µL stock BHA (0.25 mg/mL)	1000	200	100
60% EtOH (µL)	0	800	900
ug BHA/1 mL liposoma	5	1	0,5

(1)-volumen stock otopine BHA u µl; (2)- volumen 60% etanola u µl; (3)- koncentracija BHA (µg /ml liposoma)

Tako dobiveni liposomi koriste se za određivanje antioksidacijskog potencijala BHA TBARS testom. Za provedbu pokusa paralelno se priprema i slijepa proba koja umjesto TBARS reagensa sadrži samo 1,1 % otopinu SDS-a.

3.5.3. Priprema liposoma s različitim koncentracijam nativnog ekstrakta komine masline

Ishodna otopina uzorka izrađuje se otapanjem 160 mg ekstrakta u 1600 µl 60%-tnog etanola kako bi se dobila koncentracija sishodne otopine uzorka od 100 mg/ml. Uzorak se otapa u 60%-tnom etanolu zbog bolje topljivosti. Otopine antioksidansa su koncentracija 100, 75, i 50 mg/ml kako bi u reakcijskoj smjesi mjerenja antioksidacijskog potencijala TBARS metodom dobio raspon količina uzorka 0.5 - 2 mg. Za pripremu otopine liposoma s uzorkom u alikvot od 50 ml ishodne otopine liposoma dodaje se 1 ml etanolne otopine nativnog ekstrakta te se dalje mjeri antioksidacijska aktivnost nativnog ekstrakta TBARS metodom.. Slijepa proba priprema se paralelno zbog obojenosti uzorka koji reagira s TBA-om i stvara lažno pozitivan rezultat. U slijepu probu se uz TBA i octenu kiselinu dodaje količina uzorka koja je prisutna u liposomu, ali ne i liposom. U tablici 3 prikazana je priprema reakcijskih smjesa.

Tablica 3. Priprema reakcijskih smjesa s uzorkom komine masline

v(STOCK) μl ⁽¹⁾	v(EtOH 60%) μl ⁽²⁾	c(STOCK) μg/μl ⁽³⁾	m(mg/25 ml liposoma) ⁽⁴⁾	c (mg/ml liposoma) ⁽⁵⁾
0	1500	0	0	0
750	750	100	75	2,83
1500	0	100	150	5,66

(1)- volumen stock otopine uzorka koja se dodaje u 50 ml liposoma; (2)- volumen 60% etanola u μl; (3)- koncentracija stock otopine uzorka; (4)-mg uzorka u 25 ml liposoma; (5)- koncentracija uzorka izražena kao ekvivalenti nativnog uzorka

3.5.4. Priprema liposoma s ekstraktima komine masline inkapsuliranih s ciklodekstrinima

Maseni udio polifenola komine u ekstraktima pripremljenim s RAMEB-om i HPB-om je 23,0 i 26,0 %. Kako bi se dobili liposomi sa koncentracijama polifenola komine ekvivalentnima liposomima sa 3 i 6 mg/ml nativnog ekstrakta u liposomu, napravljene su ishodne otopine otopine inkapsuliranih ekstrakata koncentracija 435 mg/ml (RAMEB) i 385 mg/ml (HPB). Njihova izrada prikazana je u tablici 4. Za svaki su uzorak pripremljene dvije paralele. Ispitivana otopina pripremi se na način da se u ishodnu otopinu liposoma dodaje 1,5 ml etanolne otopine uzorka. S obzirom na bolju topljivost za liposome s uzorkom koristimo 60%-tni etanol. Za provođenje TBARS reakciju uzima se 1ml tako pripremljene otopine.

Tablica 4. Priprema liposoma s ciklodekstrinima (RAMEB i HPB)

v (STOCK) (μl) ⁽¹⁾	c(STOCK) (μg /ml) ⁽²⁾	v (60% EtOH) (μl) ⁽³⁾	c (mg/ml liposoma) ⁽⁴⁾	Ceqkom (mg/ml liposoma) ⁽⁵⁾
0	0	1500	0	0
750	435	750	12,312	2,832
1500	435	0	24,623	5,663

(1) - volumen stock otopine uzorka koja se dodaje u 50 ml liposoma; (2) - koncentracija stock otopine uzorka; (3)- volumen 60%etanola u μl; (4) - mg uzorka u 1m liposoma (u reakcijskoj smjesi) - ukupan volumen je 26,5 ml; (5) - koncentracija uzorka izražena kao ekvivalenti nativnog uzorka (uzet u obzir % komine u uzorku).

Slijepa proba se priprema kada se pripremaju i liposomi s uzorcima. Uz TBA i octenu kiselinu u reakcijsku smjesu dodaje se ona količina uzorka koja je prisutna u 1 ml liposoma, ali se ne dodaju i liposomi iz razloga što je uzorak sam po sebi obojen, stvara kompleks s TBA i lažno pozitivan signal.

3.6. Karakterizacija liposoma

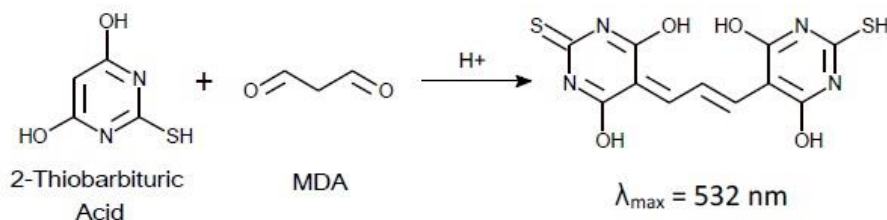
U okviru karakterizacije liposoma određeni su srednji promjer lipidnih vezikula, indeks polidisperznosti i zeta potencijal.

Srednji promjer lipidnih vezikula i indeks polidisperznosti određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) na uređaju Zetasizer HS 3000 . Ova tehnika se još naziva i dinamičko raspršenje svjetla (engl. *dynamic light scattering*; DLS), a omogućava neinvazivno i nedestruktivno određivanje veličine čestica u nanometarskom do mikrometarskom rasponu. Mjere se o vremenu ovisne promjene raspršenja svjetlosti koje uzrokuju dispergirane čestice Brownovim gibanjem, a dobivaju se podaci o hidrodinamičkoj veličini čestica (Allen, 2016). Mjerenja su provedena pri 25 °C, korištenjem je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$), dok je kut detekcije raspršene svjetlosti bio 90 °.

Zeta potencijal određen je temeljem elektroforetske pokretljivosti čestica. Uzorci fosfolipidnih vezikula razrijeđeni su 10 mM otopinom natrijevog klorida u omjeru 1:10 kako bi se osigurala elektroforetska pokretljivost te je vrijednost zeta potencijala određena na Zetasizer HS 3000 uređaju, korištenjem 10mW He-Ne lasera i pri 25 °C. Intenzitet raspršene svjetlosti mijenja se frekvencijom ovisnom o brzini gibanja čestica, a zeta potencijal se izračunava iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlost

3.7. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti TBARS metodom

TBARS metodom može se izmjeriti razina oksidativnog stresa u sustavu određivanjem produkata lipidne peroksidacije (Ćosić i sur. 2017). Lipidnom peroksidacijom nastaje malonaldehid (MDA) koji s 2-tiobarbiturnom kiselinom stvara kompleks čija se apsorbancija može izmjeriti pri apsorpcijskom maksimumu od 532 nm.



Slika 9. Reakcija kompleksacije TBA s MDA (Azizi i sur. 2017.)

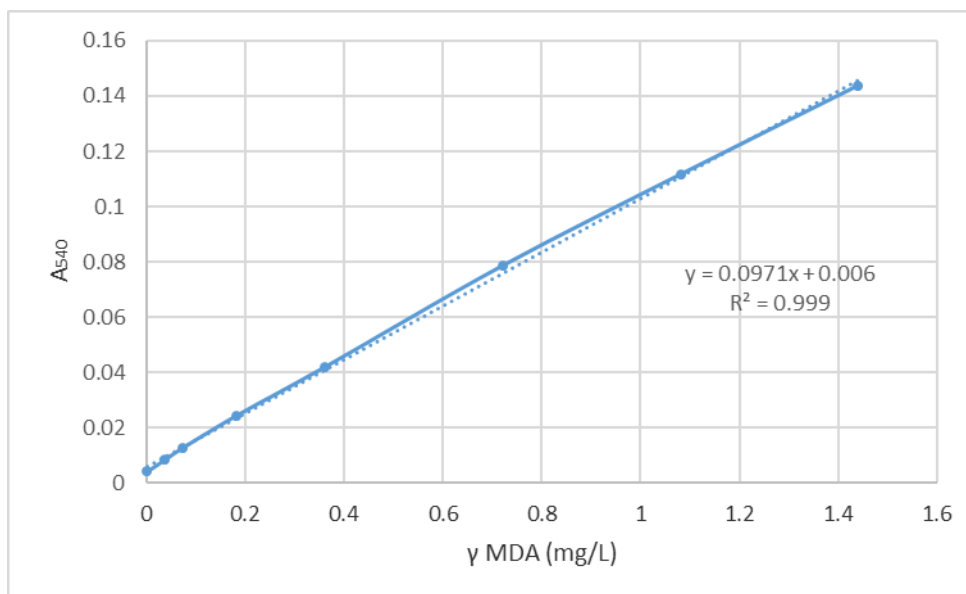
Nakon mjerenja apsorbancije iz kalibracijske krivulje može se očitati koncentracija MDA u uzorku. Kalibracijska krivulja MDA izrađuje se tako da se mjeri ovisnost koncentracije MDA o apsorbanciji pri 540 nm. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati izrade kalibracijske krivulje MDA

γ MDA /mgL- 1 ⁽¹⁾	c MDA / mM ⁽²⁾	A540_1 ⁽³⁾	A540_2 ⁽³⁾	Avg ⁽⁴⁾	Stdev ⁽⁵⁾	rsd/% ⁽⁶⁾
0	0	0,0035	0,0048	0,00415	0,000919	22,2
0,03603	0,5		0,0085	0,00850	0	0
0,07206	1	0,0116	0,014	0,01280	0,001697	13,3
0,18015	2,5	0,0253	0,0234	0,02435	0,001344	5,5
0,36030	5	0,0417	0,0424	0,04205	0,000495	1,2
0,72060	10	0,0784	0,0789	0,07865	0,000354	0,4
1,08090	15	0,1122	0,1110	0,1116	0,000849	0,8
1,44120	20	0,1437		0,1437	0	0

(1) γ MDA- masena koncentracija MDA izražena u miligramima po litri; (2) cMDA –molarna koncentracija izražena u mikromolima; (3) A540_1, A540_2 – izmjerena apsorbancija MDA u pripravljenim otopinama; (4) avg- srednja vrijednost A540_1 i A540_2; (5) stdev- standardna devijacija; (6) rsd% - relativna standardna devijacija

Slika 10 prikazuje linearnu ovisnost izmjerene apsorbancije na 540 nm o masenoj koncentraciji MDA.



Slika 10. Kalibracijska krivulja ovisnosti apsorbancije (540 nm) o koncentraciji MDA u radnoj otopini (mg/L)

3.7.1. Izvođenje TBARS pokusa

Otopina liposoma zagrijava se u vodenoj kupelji na 75 °C tokom 60 minuta. Nakon hlađenja otopine uzme se alikvot od 1 ml i pomiješa s 1,5 ml 20% octene kiseline 1,5 ml 0,8 % TBA otopljene u 1,1 % SDS. Sve se vorteksira 30 sekundi i kuha se na 100 °C u vodenoj kupelji pri 100 rpm. Nakon hlađenja reakcijskoj smjesi dodaje se 5 ml n-butanola i vorteksira 30 sekundi. Uzorci se centrifugiraju 3 minute na 4000 rpm. Gornji sloj koristi se za spektrofotometrijsko određivanje TBARS-a na 540 nm koji su pokazatelji stupnja lipidne peroksidacije. Spektrofotometar se nulira s n-butanolom. Prije mjerenja potrebno je provjeriti zamućenje jer se mjerne otopine lako zamute što je glavni izvor pogrešaka ove metode.

Na kraju postupka iz izmjerene apsorbancije izračuna se postotak gašenja apsorbancije ΔA (%) prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A (\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} * 100$$

gdje A_0 predstavlja srednju vrijednost izmjerene apsorbancije u otopini liposoma koja ne sadrži BHA, a A_x predstavlja srednju vrijednost izmjerene apsorbancije otopine liposoma s određenom koncentracijom BHA

3.8. Optimizacija uvjeta oksidacije

Za optimizaciju uvjeta oksidacije liposoma korištena je kontrolna otopina liposoma čija je izrada opisana u prethodnom poglavlju. Glavni cilj postupka optimizacije bio je definirati koja će količina bakrovog acetata te temperatura i vrijeme zagrijavanja dovesti do značajne lipidne peroksidacije masnih kiselina u liposomu. Nakon zagrijavanja pri različitim temperaturama i u različitom vremenskom razdoblju te hlađenja, u otopine su dodani TBARS reagens, octena kiselina i SDS. Otopine su zatim dobro promiješane pomoću vorteksa te su inkubirane u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom jednog sata pri 100 rpm. Nakon hlađenja u smjese se dodaje 4 ml n-butanola i centrifugira pri 2000 rpm nakon čega se mjeri apsorbancija. Kao slijepe probe korištene su kontrolne otopine liposoma podvrgnute istim uvjetima, izuzev što u njih nije dodan TBARS reagens nego samo 1,1%-tna otopina SDS-a.

Tablica 6. Optimizacija uvjeta oksidacije kontrolne otopine liposoma

Bakar($\mu\text{mol/L}$) ⁽¹⁾	T (°C) ⁽²⁾	T (min) ⁽³⁾	Auz ⁽⁴⁾	Asp ⁽⁵⁾	A ⁽⁶⁾
3	45	15	0,0573	0,0124	0,0449
3	45	30	0,0638	0,0124	0,0514
3	60	15	0,0633	0,0124	0,0509
3	60	30	0,0787	0,0124	0,0663
3	60	45	0,0819	0,0124	0,0659
4,5	75	60	0,0894	0,0094	0,0800

(1) - koncentracija bakrovog acetata u mikromolima po litri; (2) - temperatura inkubacije; (3) - vrijeme trajanja inkubacije; (4) - izmjerena apsorbancija kontrolnih otopina liposoma; (5) - izmjerena apsorbancija slijepe probe; (6) - Auz-Asp

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija liposoma

Za karakterizaciju liposoma pripremljene su tri kontrolne otopine liposoma te je za svaku otopinu određen promjer fosfolipidnih vezikula, polidisperznost i zeta potencijal. Promjeri pripremljenih liposoma bili su u rasponu veličina 133 do 147 nm, indeks polidisperznosti $0,278 \pm 0,06$, dok je zeta potencijal bio negativan i kretao se a u rasponu $-53,1 \pm 1.8$ mV što ukazuje na fizički stabilne disperzije liposoma, prikladne za daljnja mjerenja (tablica 7). Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da su karakteristike liposoma u trima kontrolnim otopinama u prihvatljivim granicama odstupanja te da će se, ponovi li se isti postupak, dobiti liposomi jednakih karakteristika.

Tablica 7. Rezultati mjerenja promjera liposoma, polidisperznosti i zeta potencijala

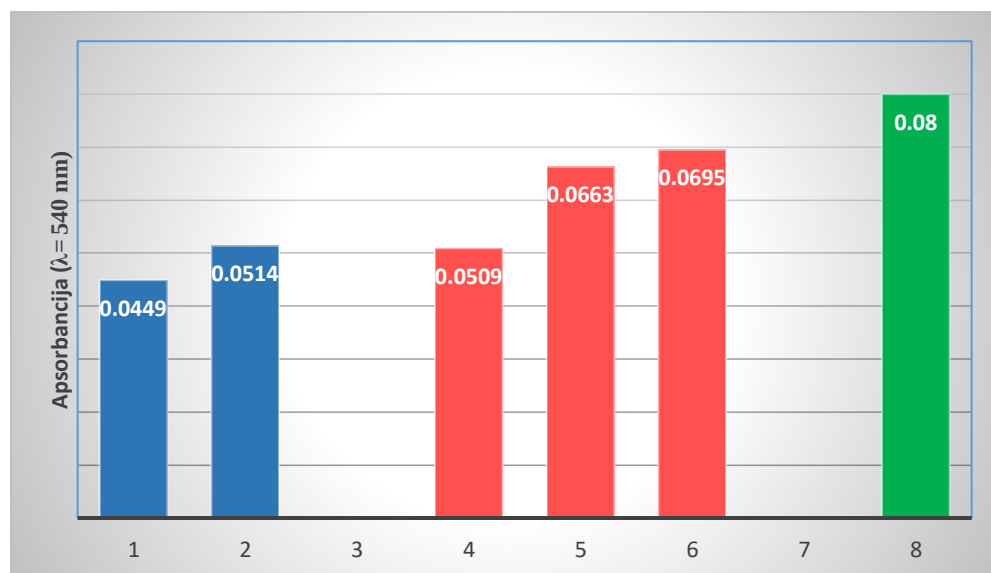
Z-ave (nm)⁽¹⁾	PDI⁽²⁾	Zeta potencijal (mv)
133+- 0,3	0,326+-0,015	-51,2+-0,3
147,1+-0,3	0,214+-0,005	-53,5+-3,3
139,1+-1,2	0,296+-0,016	-53,8+-1,3

(1) – prosječan promjer liposoma; (2) – prosječan indeks polidisperznosti. Uzorci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

4.2. Optimizacija uvjeta oksidacije

Optimizacija uvjeta oksidacije provedena je istraživanjem utjecaja različitih temperatura i trajanja inkubacije liposoma sa 30 mM bakrovim acetatom na stupanj oksidacije liposoma korištenjem TBARS metode. Iz rezultata se može zaključiti da je stupanj oksidacije veći što je otopina podvrgnuta duljem trajanju inkubacije i višoj temperaturi. Otopine su podvrgnute temperaturama u rasponu od 45 do 75 °C, trajanju inkubacije od 15 do 60 min i dodana im je količina bakrovog acetata da raspon koncentracija u reakcijskoj smjesi bude od 3 do 4,5 $\mu\text{mol/l}$. Veća apsorbancija ukazuje na veći stupanj oksidacije. Najveći stupanj oksidacije postignut je inkubacijom na 75 °C tijekom sat vremena uz dodatak 30 μL 30 mM bakrovog acetata te su ti uvjeti izabrani za daljnje provođenje eksperimenta.

Slika 11 grafički prikazuje stupanj oksidacije 6 ispitivanih kontrolnih otopina liposoma podvrgnutih različitim uvjetima oksidacije.



(1) - Plava boja 1: 45 °C, 15 min, 3 $\mu\text{mol/l}$ bakra; (2) - Plava boja 2: 45 °C, 30 min, 3 $\mu\text{mol/l}$ bakra; (4) - Ružičasta boja 4: 60 °C, 15 min, 3 $\mu\text{mol/l}$ bakra; (5) - Ružičasta boja 5 : 60 °C, 30 min, 3 $\mu\text{mol/l}$ bakra; (6) - Ružičasta boja 6: 60 °C, 45 min, 3 $\mu\text{mol/l}$ bakra; (8) - Zelena boja 8: 75 °C, 60min, 4,5 $\mu\text{mol/l}$ bakra

Slika 11. Prikaz apsorbancije kontrolnih otopina liposoma pri optimizaciji uvjeta oksidacije

4.3. Antioksidacijski učinak BHA u modelu liposoma

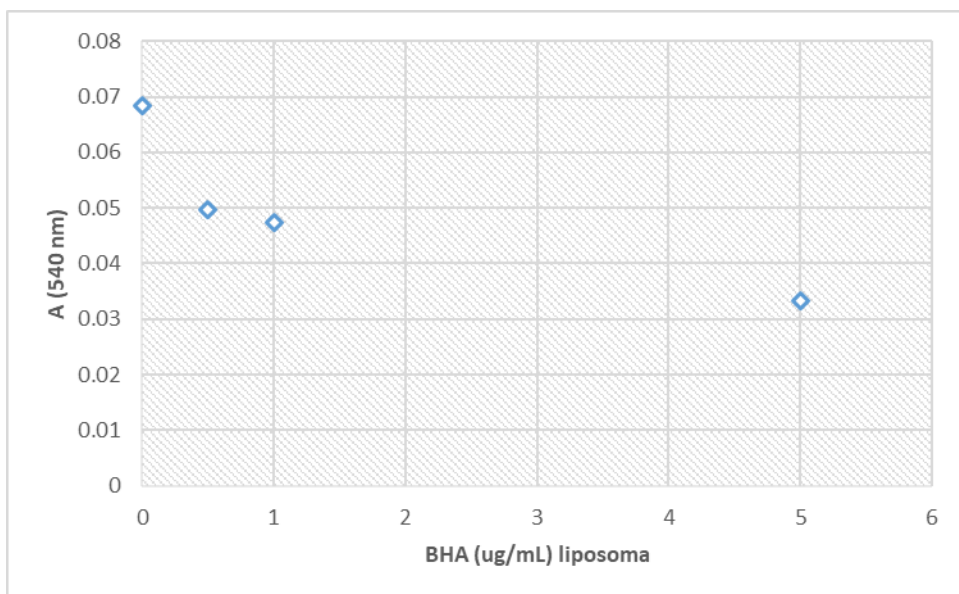
Kako bi se istražila antioksidacijska učinkovitost standardnog antioksidansa na modelu liposoma, TBARS metodom određena je antioksidacijska učinkovitost BHA.

Izmjereni rezultati i izračunat postotak gašenja apsorbancije navedeni su u tablici 8. Na slici 12 je prikazana ovisnost stupnja oksidacije liposoma o koncentraciji inkorporirane BHA. Iz slike 12 možemo zaključiti da je stupanj oksidacije najveći u kontrolnoj otopini liposoma, što ukazuje na najveći stupanj oksidacije u otopini koja uopće ne sadrži antioksidans. Povećanjem koncentracije antioksidansa u liposomu smanjuje se stupanj oksidativnog oštećenja liposoma. Slika 13 prikazuje linearnu ovisnost postotka gašenja apsorbancije o koncentraciji BHA. Najveći postotak gašenja apsorbancije utvrđen je u otopini liposoma sa sadržajem BHA 5 µg/ml i iznosi 51,0 %.

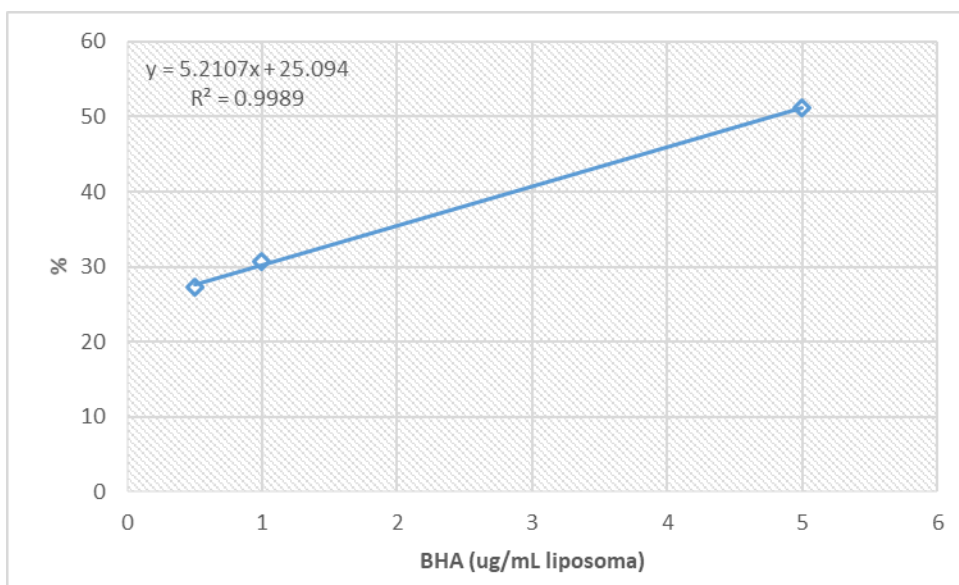
Tablica 8. Rezultati mjerenja apsorbancije liposoma s BHA i izračunati postotak gašenja apsorbancije

BHA mg/l ⁽¹⁾	Au1 ⁽²⁾	Au2 ⁽²⁾	Asp ⁽³⁾	A1 ⁽⁴⁾	A2 ⁽⁵⁾	A av. ⁽⁶⁾	ΔA (%) ⁽⁷⁾
0	0,0840	0,0894	0,0184	0,0656	0,0710	0,0683	0
0,5	0,0634	0,0699	0,0170	0,0464	0,0529	0,04965	27,3
1,5	0,0522	0,0594	0,0100	0,0452	0,0494	0,0473	30,7
5	0,0418	0,0438	0,0094	0,0340	0,0344	0,0334	51,0

(1) - koncentracija BHA u miligramima po litri liposoma; (2) – izmjerena apsorbancija uzoraka; (3) – izmjerena apsorbancija slijepe probe; (4) – Au1 - Asp; (5) – Au2 – Asp; (6) – (A1+ A2) / 2; (7) – postotak gašenja apsorbancije



Slika 12. Ovisnost stupnja oksidacije o koncentraciji BHA u otopini liposoma



Slika 13. Ovisnost postotka gašenja apsorbancije o koncentraciji BHA u otopini liposoma

4.4. Antioksidacijski učinak nativnog ekstrakta komine masline u modelu liposoma

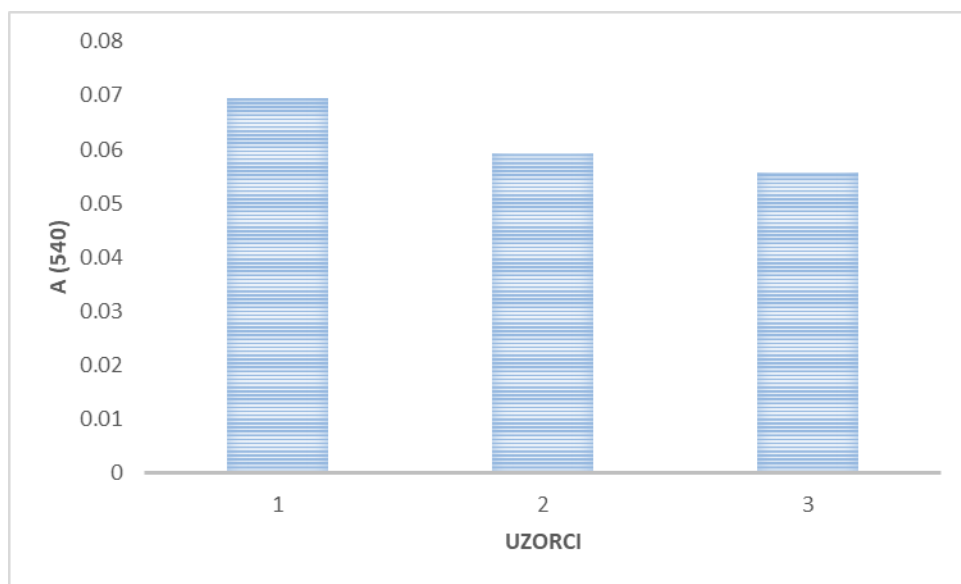
Rezultati mjerenja antioksidacijske učinkovitosti nativnog ekstrakta komine masline prikazani su kao postotak gašenja apsorbancije ΔA (%) koji je izračunat po istoj formuli kao što je izračunat i kod uzoraka sa BHA. U tablici 9 prikazani su rezultati izmjenjenog stupnja oksidacije liposoma s ekstraktom nativnog uzorka komine masline, kontrolne otopine liposoma i slijepe probe te je izračunat postotak gašenja apsorbancije.

Tablica 9. Rezultati izmjereni na uzorcima liposoma s kominom masline

c(mg/ml) ⁽¹⁾	Au1 ⁽²⁾	Au2 ⁽²⁾	Asp ⁽³⁾	A1 ⁽⁴⁾	A2 ⁽⁵⁾	average	STD	RSD	ΔA (%)
0	0,0724	0,0846	0,0091	0,0633	0,0755	0,0694	0,008627	12,43	
3	0,0727	0,0760	0,0150	0,0577	0,0610	0,05935	0,002333	3,93	14,48
6	0,0773	0,0773	0,0206	0,0567	0,0549	0,0558	0,001237	2,28	19,60

(1)- koncentracija uzorka u otopini liposoma(mg/ml liposoma); (2) - apsorbancija uzoraka; (3) - apsorbancija slijepe probe; (4) – Au1- Asp; (5) – Au2 – Asp; (6) – $(A1 + A2) / 2$ (7) – standardna devijacija; (8) – relativna standardna devijacija; (9) – postotak gašenja apsorbancije

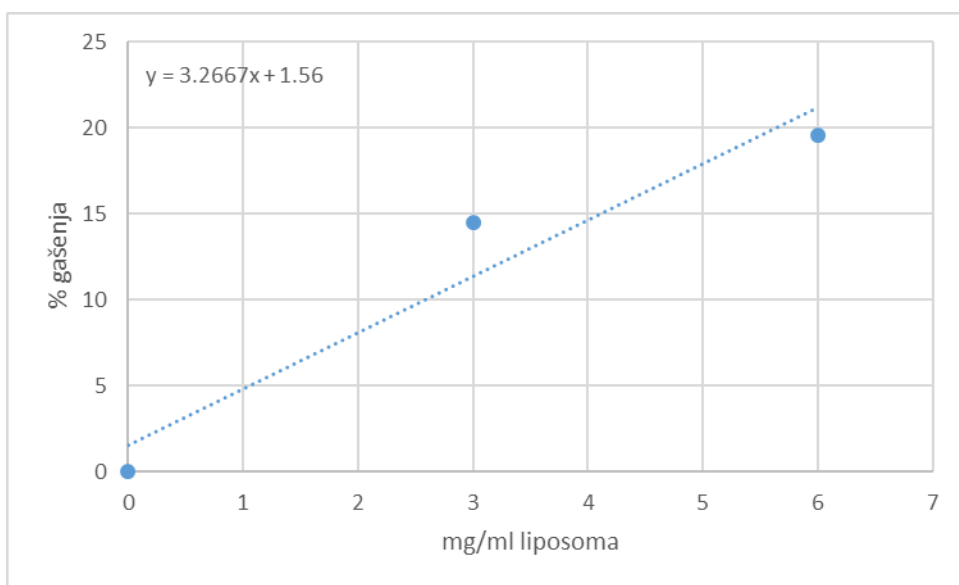
Srednje vrijednosti apsorbancija analiziranih uzoraka prikazane su na slici 14 te je vidljivo kako je najmanja apsorbancija izmjerena u uzorku koji je sadržavao najveću koncentraciju ekstrakta komine masline uz postotak gašenja apsorbancije od 19,6 %.



(1)- kontrolna otopina liposoma; (2) - c (2,83 mg komine masline po ml liposoma); (3) - c (5,66 m komine masline po/ml liposoma)

Slika 14. Stupanj oksidacije kontrolne otopine liposoma i liposoma s ekstraktom komine masline

Iz slike 15 je vidljivo da je ovisnost postotka gašenja apsorbancije i koncentracije antioksidansa inkorporiranog u liposom linearna.



Slika 15. Ovisnost postotku gašenja apsorbancije o koncentraciji antioksidansa inkorporiranog u liposom.

4.5. Učinak inkapsulacije ciklodekstrinima na antioksidacijsku aktivnost komine masline u modelu liposoma

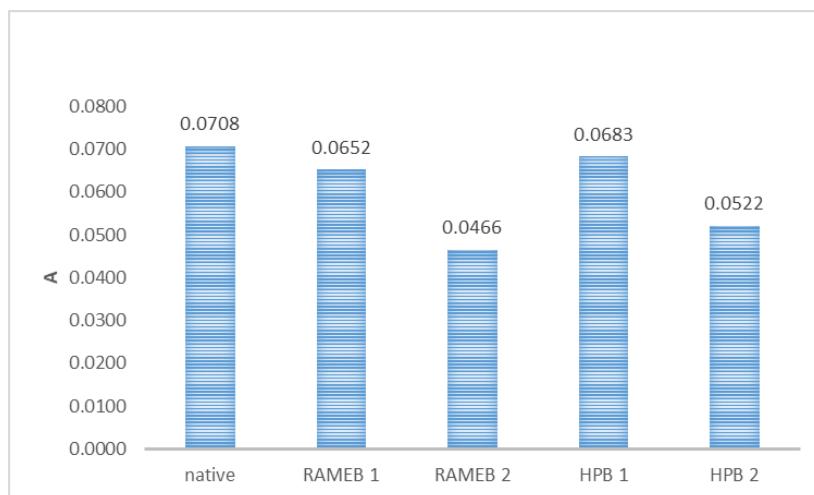
U tablici 10 prikazani su rezultati izmjerene apsorbancije uzoraka s ciklodekstrinima RAMEB i HPB te je izračunat postotak gašenja apsorbancije uzoraka s ciklodekstrinima po već prethodno navedenoj formuli.

Tablica 10. Rezultati izmjereni na uzorcima s kominom masline i ciklodekstrinima

Uzorci	uzorak (mg/ml liposoma)	Au1 ⁽¹⁾	Au2 ⁽¹⁾	Asp ⁽²⁾	A1 ⁽³⁾	A2 ⁽³⁾	average	Stdev	RSD	% gašenja
Kontrola	0	0,0747	0,0846	0,0089	0,0658	0,0757	0,0708	0,0070	9,89	0,00
RAMEB1	2,8	0,0821	0,0791	0,0154	0,0667	0,0637	0,0652	0,0021	3,25	7,84
RAMEB2	5,7	0,0672	0,0669	0,0205	0,0467	0,0464	0,0466	0,0002	0,46	34,20
HPB1	2,8	0,0834	0,0839	0,0154	0,0680	0,0683	0,0683	0,0004	0,52	3,53
HPB2	5,7	0,0724	0,0729	0,0205	0,0519	0,0524	0,0522	0,0004	0,68	26,29

(1) - izmjerena apsorbancija uzorka; (2) - apsorbancija slijepe probe; (3) - razlika izmjerene apsorbancije i apsorbancije slijepe probe (Au-Asp); (4) – $(A1 + A2) / 2$; (5) – standardna devijacija; (6) – relativna standardna devijacija; (7) – postotak gašenja apsorbancije

Na slici 16 prikazan je stupanj oksidacije liposoma pripremljenog uz dodatak nativnog ekstrakta komine masline i liposoma pripremljenih uz dodatak ekstrakata komine masline inkapsuliranih ciklodekstrinima. Iz rezultata može se zaključiti da uzorci komine masline inkapsulirani ciklodekstrinima imaju antioksidacijski učinak sličan nativnom ekstraktu jer je stupanj oksidacije liposoma usporediv. Bitno je napomenuti da je koncentracije polifenola komine korištena za pripremu dijela analiziranih liposoma podjednaka (native, RAMEB 1 i HPB1) te da se oni međusobno razlikuju samo po udjelu ciklodekstrina. Najmanji stupanj oksidacije izmjeren je uzorcima većih koncentracija RAMEB2 i HPB2, dok uzorci manjih koncentracija RAMEB1 i HPB1 pokazuju neznatno manji stupanj oksidacije u odnosu na kontrolnu otopinu liposoma. Te niže apsorbancije izmjerene u uzorcima s CD ukazuju na poboljšanje ugradnju inkapsulirang ekstrakta u liposom (imajući na umu da CD ne inhibiraju lipidnu peroksidaciju).

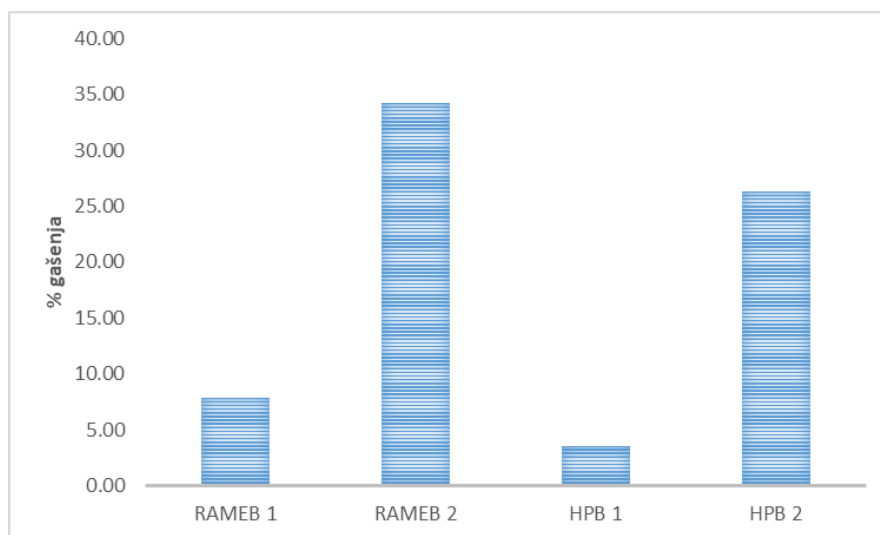


Slika 16. Stupanj oksidacije liposoma s nativnim ekstraktom komine masline i liposoma s ekstraktom komine masline inkapsuliranih ciklodekstrinima

Na slici 17 grafički je prikazan postotak gašenja apsorbcije uzoraka inkapsuliranih ciklodekstrinima.

Uzorci s RAMEB ciklodekstrinom pokazuju antioksidacijski učinak, gašenje apsorbcije uzorka koncentracije 5,7 mg/ml liposoma iznosi čak 34,20 %, a gašenje apsorbcije uzorka koncentracije 2,8 mg/ml liposoma iznosi 7,84%. Iz tih rezultata može se zaključiti da je gašenje apsorbcije ovisno o koncentraciji uzorka. Što je koncentracija uzorka veća, veće je i gašenje apsorbcije, što ukazuje na veći antioksidacijski učinak.

Za uzorke inkapsulirane s HPB može se također donijeti isti zaključak. Gašenje apsorbcije uzorka koncentracije 5,7 mg/ml iznosi 26,9 % a uzorka koncentracije 2,8 mg/ml liposoma iznosi 3,53%. Izmjereni rezultati ukazuju na to da uzorci inkapsulirani RAMEB ciklodekstrinom imaju veći antioksidacijski učinak od uzoraka inkapsuliranih ciklodekstrinom HPB.



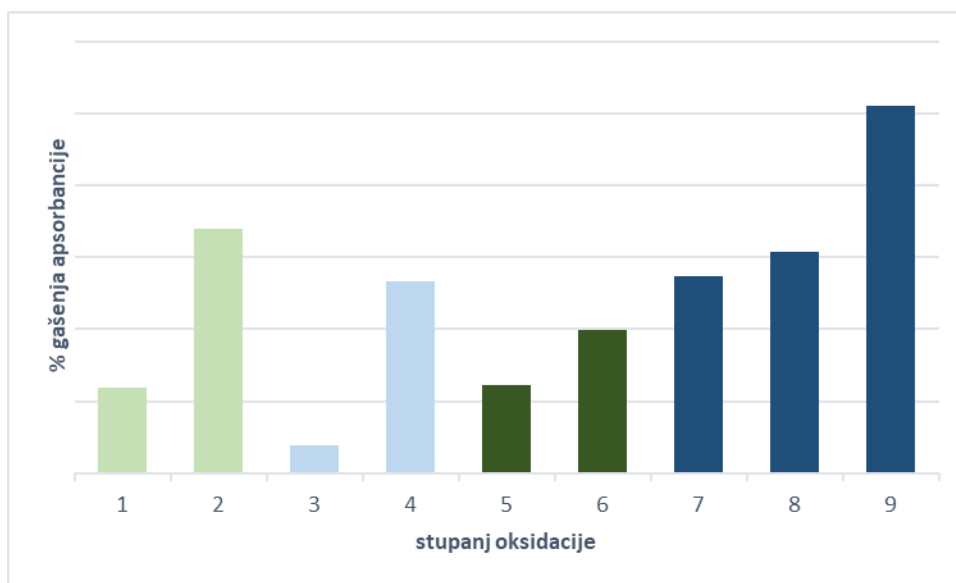
Slika 17. Postotak gašenja apsorbancije uzoraka inkapsuliranih ciklodekstrinima

5. RASPRAVA

U dosadašnjim ispitivanjima antioksidacijskog učinka na modelu liposoma korišteni su različiti uzorci i metode koji su se pokazali uspješnim i dokazali inhibiciju lipidne peroksidacije. Ispitani su uzorci poput ploda Kineskog gloga (*Crataegus pinnatifida* Bge var. *major*) čija se antioksidacijska aktivnost ispitivala tokom enzimatske hidrolize svinjskog mesa na 50 °C (Liu i sur., 2009). Ekstrakti začina (ružmarin, muškatni oraščić, kardamom, klinčić, cimet) u kuhanom mesu ispitani su TBARS metodom koja je korištena i u ovom radu. Rezultati su pokazali znatan potencijal ekstrakata začina kao prirodnih antioksidansa u kuhanim mesnim proizvodima (Kong i sur., 2010). Provedeno je mjerenje antioksidacijskog učinka destiliranog lista ružmarina i timijana te nusprodukata pri proizvodnji eteričnih ulja ružmarina i timijana inicijacijom oksidacije liposoma L- α -fosfatidilkolin hidrofilnim azo-inicijatorima. Za usporedbu je isti eksperiment proveden s cijelim listovima timijana. Svi su uzorci pokazali antioksidacijski učinak, a najveći su pokazali cjeloviti listovi timijana (Nieto i sur., 2011). Esteri hidroksitirozila s različitim duljinama postraničnih lanaca pokazuju različitu antioksidacijsku aktivnost s obzirom na duljinu postraničnog lanca što je dokazano pomoću ispitivanja raspršenja svjetlosti, fluorescencije, gelfiltracije, turbidimetrije i mikrofiltracijskih mjerenja (Balducci i sur., 2017).

Rezultati ovog diplomskog rada pokazali su kako ekstrakti komine masline koja je kao nusprodukt koji zaostaje pri izradi maslinovog često nije iskorištena, pokazuje značajan antioksidacijski te inhibiraju nastajanje produkata lipidne peroksidacije, uključujući i MDA. Postotak gašenja apsorbancije kretao se u rasponu od 27,3 - 51,1 % a gašenje apsorbancije proporcionalno je koncentraciji antioksidansa u otopini. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je uzorak inkapsuliran RAMEB ciklodekstrinom u koncentraciji 5,7 mg/ml liposoma čiji je postotak gašenja apsorbancije iznosio 34,2 %. Postotak gašenja za uzorak s HPB-om iste koncentracije iznosio je 26,3 %, dok je najmanju aktivnost pokazao nativni uzorak iste koncentracije s postotkom gašenja 21,1 %. Postotak gašenja znatno je veći kod uzoraka veće koncentracije te se može zaključiti kako antioksidacijski učinak ovisi o koncentraciji ekstrakta komine masline u liposomima. Iz ovih rezultata vidi se da ciklodekstrini kao ekscipijensi povećavaju antioksidacijski učinak komine masline u modelu liposoma te je lipidna peroksidacija manja. Takvi se podaci slažu s literaturnim podacima koji ukazuju na to da ciklodekstrini protektivno djeluju na polifenole u biljnim

ekstraktima. Polifenoli uklopljeni u centralnu šuplinu β -ciklodekstrina stvaraju inkluzijske komplekse što omogućuje bolji antioksidativni učinak. Zbog organoleptičkih svojstava komine masline korištenje ekscipijensa za njezinu upotrebu je nužno. Nativni uzorak komine masline je gumast, ljepljiv i higroskopian dok su uzorci s ciklodekstrinima fini prašci. Vrijednosti standardne devijacije i relativne standardne devijacije ukazuju na točnost ovih mjerenja.



(1) -RAMEB1 (2,8 mg/ml liposoma); (2)-RAMEB2 (5,7 mg/ml liposoma); (3)-HPB1 (2,8 mg/ml liposoma); (4)-HPB2 (5,7 mg/ml liposoma); (5)-NAT1 (3 mg/ml liposoma); (6)-NAT2 (6 mg/ml liposoma); (7)-BHA1 (0,5 mg/l liposoma); (8)-BHA2 (1,5 mg/l liposoma); (9)-BHA3 (5 mg/l liposoma)

Slika 18. Utjecaj inkapsulacije ciklodekstrina na inhibiciju oksidacije liposoma

6. ZAKLJUČCI

1. Model-sustav liposoma predstavlja dobar sustav za praćenje djelovanja antioksidansa na inhibiciju lipidne peroksidacije. Predstavlja model stanične membrane gdje se izaziva lipidna peroksidacija i prati stvaranje MDA.
2. BHA inhibira lipidnu peroksidaciju proporcionalno koncentraciji. Provođenjem TBARS pokusa s uzorcima BHA dobiveni su linearno povezani rezultati koncentracije BHA i postotka gašenja apsorbancije.
3. Nativni uzorak komine masline pokazuje antioksidacijski učinak u model-sustavu liposoma. Uzorci veće koncentracije dovode do veće inhibicije lipidne peroksidacije.
4. Uzorci s ciklodekstrinima RAMEB i HPB pokazuju antioksidacijski učinak u model-sustavu liposoma. Pokazuju veći antioksidacijski učinak nego nativni uzorak zbog protektivnog djelovanja ciklodekstrina na polifenole komine masline.
5. Najveći postotak gašenja pokazuje uzorak s RAMEB ciklodekstrinom u koncentraciji od 5,7 mg/ml liposoma.
6. Dobiveni rezultati uglavnom su u skladu s literaturnim podacima. Model-sustav liposoma pokazao se učinkovitim za praćenje antioksidacijskog učinka komine masline, ali rezultati koje smo dobili nisu pokazali linearnu ovisnost. Postotak gašenja mnogo je veći kod uzoraka veće koncentracije, ali rezultati ne pokazuju linearnost između koncentracije i postotka gašenja.

7. LITERATURA

1. Akbarzadeh Abolfazl, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi and Kazem Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters*, 2013, 8, 102
2. Allen P. Minton, Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences, *Analytical Biochemistry*, 2016, 501, 4-22
3. Ashu Johri and M. Flint Beal, Antioxidants in Huntington's disease, *Biochim Biophys Acta. (BBA)- Biomembranes* 2012, 1822, 664–674
4. Balducci Valentina, Sandra Incerpi, Pasquale Stano, Daniela Tofani, Antioxidant activity of hydroxytyrosyl esters studied in liposome models, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 2017, 1860, 600-610
5. Bhattacharjee Sourav, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release*, 2016, 235, 337–351
6. Bianco Armandodoriano, Maria A. Chiacchio, Giovanni Grassic, Daniela Iannazzo, Anna Piperno, Roberto Rom, Phenolic components of *Olea europea*: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives, *Food Chemistry*, 2006, 95, 562-565
7. Brlek Tea, Jurišić Vanja, Krčka Tanja, Voća Neven, Komina masline kao izvor energije, *Glasnik zaštite bilja*, 32, 3
8. Butylated Hydroxyanisole, 2012, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 14.12.2018.

9. Castro-Barquero Sara, Rosa M. Lamuela-Raventós, Mónica Doménech, Ramon Estruch, Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity, *Nutrients*, 2018, 10, 1523
10. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Rašić, Lidija; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines, Laboratory methods in the diagnosis of oxidative stress on the example of an animal model of excessive salt intake, *Cardiologija Croatica*, 2017, 3, 12
11. Frankel E1, Bakhouch A, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez, Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols, *Agric Food Chem.* 2013, 61, 5179-88
12. Jančić Snežana i Stošić Bojan, Cadmium and lipid peroxidation, *Vitamins & Hormones*, 2014, 94, 391-425,
13. Jug Mario i Bećireveić-Laćan Mira, Cyclodextrin-based pharmaceuticals, Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, Medicinske znanosti, 2008, Knj. 32, str. 9-26.
14. Kong Baohua, Huiyun Zhang, Youling L. Xiong, Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action, *Meat science*, 2010, 85, 772-778
15. Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb, Tehnička knjiga, 2005, str. 192-195.
16. Liu Tongxiu, Yanni Cao, Mouming Zhao, Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. *major*) fruits, *Food chemistry*, 2010, 190, 1656-1662
17. Losada-Ecchberria M, Herranz-Lopez M., Micol V., Barrajon-Catalan E., Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures, *Antioxidants (Basel)*, 2017, 6, 88-91

18. Martin de Valle Eva, Cyclodextrins and their uses: A review, *Process biochemistry*, 2006, 39, 1033-1046
19. Mishra Gyan P., Mahuya Bagui, Viral Tamboli, and Ashim K. Mitra, Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery, *Journal of Drug Delivery*, 2011, 86, 14-28
20. Nieto Gema, Kevin Huvaere, Leif H. Skibsted, Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system, *Eur Food Res Technol*, 2011, 233, 11-18
21. Priroda i bilje, Maslina (Olea Europea), 2015., <https://www.plantea.com.hr/maslina/>, pristupljeno 2.10.2018.
22. Sajad Azizi¹, Maryam Khoubnasabjafari, Aziz Shahriza, Mehry Khoubnasabjafari, Jafar Soleymani, Abolghasem Jouyban, Effects of Analytical Procedures on the Repeatability of Malondialdehyde Determinations in Biological Samples, *Pharmaceutical Sciences*, 2017, 23, 193-197
23. Shichiri Mototada, YasukazuYoshida, EtsuoNiki, Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health, Elsevier Inc., 2014, str.31-55
24. Sladonja Barbara, Brkić Karolina, Radulović Marina, I. Lukić, E. Šetić, M. Krapac, Oil content in fruits of leading autochthonous olive varieties in Istria, *Pomologia Croatica, Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 2006, 12, 2,
25. Štefan Leo, Tepšić Tina, Zaviđić Tina, Urukalo Marta, Tota Dalibor, Domitrović Robert, Lipidna peroksidacija- uzroci i posljedice, *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

26. Topuz, F.; Uyar, T. Electrospinning of Cyclodextrin Functional Nanofibers for Drug Delivery Applications, *Pharmaceutics* 2019, 11, 6
27. Tsao Rong, Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2010, 2, 1231-1246
28. Wannes Wissem Aidi, Marzouk Brahim, Research progress of Tunisian medicinal plants used for acute diabetes, *Journal of Acute Disease*, 2016, 5, 357-363

8. SAŽETAK

Komina masline bogata je polifenolima koji imaju antioksidacijski učinak. Mogu djelovati protuupalno, smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze, karcinoma i neurodegenerativnih bolesti. Nakon proizvodnje maslinovog ulja ostaje velika količina komine masline čije zbrinjavanje predstavlja ekološki problem. Najčešće predstavlja otpad, a ponekad se koristi kao gnojivo ili za proizvodnju energije. Ovaj diplomski rad izrađen je u svrhu ispitivanja antioksidacijskog učinka komine masline na model-sustavu liposoma gdje je ispitana inhibicija lipidne peroksidacije nativnog uzorka komine masline, uzoraka komine masline s ciklodekstrinima RAMEB (nasumično metilirani ciklodekstrin) i HPB (hidroksipropil- β -ciklodekstrin) kao ekscipijensima i BHA kao dokazanim antioksidansom. Optimizirani su uvjeti oksidacije u kojima se na model-sustavu liposoma može pratiti stvaranje MDA. Svi uzorci pokazali su inhibiciju lipidne peroksidacije, a najveću je pokazao uzorak s RAMEB ciklodekstrinom što ukazuje na protektivno djelovanje ciklodekstrina na polifenole komine masline. Komina masline, koja prethodno nije puno ispitivana, predstavlja potencijalan izvor sirovine za izolaciju prirodnih polifenola koji bi se mogli primijeniti u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji i zato ovaj rad predstavlja važan korak u istraživanju njezinih potencijala kako bi se u budućnosti ona mogla iskoristiti.

SUMMARY

Olive pomace is rich in polyphenols, a substance which can have antioxidant and anti-inflammatory effect and also reduce the risk of cardiovascular diseases, diabetes, osteoporosis, carcinoma and neurodegenerative diseases. It ensues in large quantities as a result of the extraction of olive oil. However, the disposal of such large quantities of olive pomace creates enviromental problems. In most cases, olive pomace represents waste, but it can sometimes be used as fertilizer or as a material for energy production. This diploma paper aims to investigate the antioxidant effect of olive pomace on liposome model system which was used to examine the inhibition of lipid peroxidation of the original olive pomace sample, olive pomace and randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) and hydroxypropyl β -cyclodextrins (HPB) sample, used as excipients, and β -hydroxyanisol (BHA) sample, used as a proven antioxidant. The conditions for oxidation have been optimized so the creation of malonaldehyde (MDA) could be observed on liposome model system. All samples have shown the inhibition of lipid peroxidation. The sample consisting RAMEB has shown the greatest inhibition which may indicate the protective effect the cyclodextrin has on polyphenols in olive pomace. Therefore, olive pomace, which was not previously researched in greater detail, represents a potential source of raw material that can be used for the isolation of natural polyphenols, which may be utilized in pharmaceutical and food industry. Thus, this diploma paper represents an important step towards researching the potential of olive pomace and its future uses.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Antioksidacijski učinak komine masline u model-sustavu liposoma

Valentina Šćur

SAŽETAK

Komina masline bogata je polifenolima koji imaju antioksidacijski učinak. Mogu djelovati protuupalno, smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze, karcinoma i neurodegenerativnih bolesti. Nakon proizvodnje maslinovog ulja ostaje velika količina komine masline čije zbrinjavanje predstavlja ekološki problem. Najčešće predstavlja otpad, a ponekad se koristi kao gnojivo ili za proizvodnju energije. Ovaj diplomski rad izrađen je u svrhu ispitivanja antioksidacijskog učinka komine masline na model-sustavu liposoma gdje je ispitana inhibicija lipidne peroksidacije nativnog uzorka komine masline, uzoraka komine masline s ciklodekstrinima RAMEB (nasumično metilirani ciklodekstrin) i HPB (hidroksipropil- β -ciklodekstrin) kao ekscipijensima i BHA kao dokazanim antioksidansom. Optimizirani su uvjeti oksidacije u kojima se na model-sustavu liposoma može pratiti stvaranje MDA. Svi uzorci pokazali su inhibiciju lipidne peroksidacije, a najveću je pokazao uzorak s RAMEB ciklodekstrinom što ukazuje na protektivno djelovanje ciklodekstrina na polifenole komine masline. Komina masline, koja prethodno nije puno ispitivana, predstavlja potencijalan izvor sirovine za izolaciju prirodnih polifenola koji bi se mogli primijeniti u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji i zato ovaj rad predstavlja važan korak u istraživanju njezinih potencijala kako bi se u budućnosti ona mogla iskoristiti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 18 grafička prikaza, 10 tablica i 28 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, antioksidacijska aktivnost, liposomi, ciklodekstrini

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutskobiokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr.sc. Lovorka Vujić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Food chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Antioxidant effect of olive pomace on liposome model system

Valentina Šćur

SUMMARY

Olive pomace is rich in polyphenols, a substance which can have antioxidant and anti-inflammatory effect and also reduce the risk of cardiovascular diseases, diabetes, osteoporosis, carcinoma and neurodegenerative diseases. It ensues in large quantities as a result of the extraction of olive oil. However, the disposal of such large quantities of olive pomace creates environmental problems. In most cases, olive pomace represents waste, but it can sometimes be used as fertilizer or as a material for energy production. This diploma paper aims to investigate the antioxidant effect of olive pomace on liposome model system which was used to examine the inhibition of lipid peroxidation of the original olive pomace sample, olive pomace and randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) and hydroxypropyl β -cyclodextrins (HPB) sample, used as excipients, and β -hydroxyanisole (BHA) sample, used as a proven antioxidant. The conditions for oxidation have been optimized so the creation of malonaldehyde (MDA) could be observed on liposome model system. All samples have shown the inhibition of lipid peroxidation. The sample consisting RAMEB has shown the greatest inhibition which may indicate the protective effect the cyclodextrin has on polyphenols in olive pomace. Therefore, olive pomace, which was not previously researched in greater detail, represents a potential source of raw material that can be used for the isolation of natural polyphenols, which may be utilized in pharmaceutical and food industry. Thus, this diploma paper represents an important step towards researching the potential of olive pomace and its future uses.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 18 figures, 10 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, antioxidant effect, liposomes, cyclodextrins

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Vujić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry