



Co-funded by  
the European Union



## PRIRUČNIK

**Naslov projekta:** Primjena inovativnih metoda u primjeni ljekovitog bilja sa središnjom ulogom u farmaciji, poljoprivredi i prehrani

**Akronim projekta:** EURO-PLANT-ACT

**Project no:** 2022-1-RO01-KA220-HED-000088958

Priručnik namijenjen stručnjacima iz različitih područja kao što su poljoprivreda, biotehnologija, prehrambena industrija, farmacija, nutricionizam predstavlja metodologije vezane uz: (i) selekciju, uzgoj, berbu i karakterizaciju organskog ljekovitog bilja, (ii) procjenu kemijskog sastava i analizu farmakoloških svojstava, (iii) utvrđivanje profila farmakokinetičke sigurnosti i metoda valorizacije ljekovitog bilja i (iv) proizvoda dobivenih od njega (ekstrakta, eteričnih ulja).

### **Profesori odgovorni za teorijski dio:**

Kordinator (UMFVBT): Dehelean Cristina Adriana, Pînzaru Iulia Andreea, Macaşoi Ioana Gabriela, Şoica Codruţa Marinela

Partner 1 (USVT): Alexa Ersilia, Negrea Monica, Cocan Ileana, Obistoiu Diana, Pop Georgeta

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Ravlić Marija

Partner 3 (UNICAL): Conforti Filomena, Statti Giancarlo

Partner 4 (ROMPAN): Voica Daniela, Avram Dana

### **Profesori odgovorni za praktični dio:**

Kordinator (UMFVBT): Dehelean Cristina Adriana, Pînzaru Iulia Andreea, Minda Daliana Ionela, Drăghici George Andrei

Partner 1 (USVT): Alexa Ersilia, Negrea Monica, Cocan Ileana, Obistoiu Diana, Pop Georgeta

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Ravlić Marija

Partner 3 (UNICAL): Conforti Filomena, Statti Giancarlo

Partner 4 (ROMPAN): Voica Daniela, Avram Dana



## Sadržaj

<b>Poglavlje 1. Metode istraživanja antifungalnog djelovanja eteričnih ulja na fitopatogene gljive (P2 - UNIOS)</b> .....	<b>5</b>
1.1. Uvod .....	5
1.2. Volatilni test za procjenu utjecaja eteričnih ulja <i>in vitro</i> .....	5
1.3. <i>In vitro</i> ispitivanje kontaktnog djelovanja eteričnih ulja na gljive .....	10
<b>Poglavlje 2. Herbicidno djelovanje biljnih ekstrakata i eteričnih ulja (P2 - UNIOS)</b> .....	<b>13</b>
2.1. Uvod .....	13
2.2. Herbicidno djelovanje biljnih ekstrakata .....	14
2.3. Herbicidni učinak eteričnih ulja .....	19
<b>Poglavlje 3. Primjena ljekovitih biljaka kao sastojaka dodane vrijednosti u industriji funkcionalnih pekarskih i slastičarskih proizvoda (P1 - USVT)</b> .....	<b>22</b>
3.1. Uvod .....	22
3.2. Ljekovite biljke koje se koriste za poboljšanje okusa, boje i mirisa pekarskih proizvoda .....	23
3.3. Ljekovite biljke kao antioksidansi u pekarskim proizvodima .....	25
3.4. Ljekovite biljke kao antimikrobna sredstva u pekarskim proizvodima .....	36
3.5. Djelovanje ljekovitog bilja protiv patogenih bakterija koje prevladavaju u prehrambenoj industriji .....	38
<b>Poglavlje 4. Trenutačni trendovi i metode za in vitro procjenu biološke aktivnosti (CO - UMFVB)</b> .....	<b>41</b>
4.1. Uvod .....	41
4.2. Priprema stanične linije za stanične testove .....	44
4.2.1. Opća pravila za sigurnost u laboratoriju za kulturu stanica .....	44
4.2.2. Tablica s ključnim resursima za odmrzavanje/subkultiviranje/krioprezervaciju stanične linije .....	46
4.2.3. Pojednosti metode (korak po korak) .....	50
4.3. STANIČNE ANALIZE KORIŠTENJEM 2D STANICA .....	59
4.3.1. Testovi vijabilnosti stanica .....	59



4.3.2. Metode imunofluorescentnog bojenja za procjenu morfologije stanica .....	67
4.3.3. Metode za procjenu sposobnosti migracije stanica .....	74
4.3.4. Testovi molekularne biologije za proučavanje mehanizama djelovanja <b>Reverzna transkripcija polimerazne lančane reakcije (RT-PCR)</b> .....	76
4.4. Pokus na stanicama koristeći 3D (trodimenzionalne) modele.....	79
4.4.1. Određivanje potencijala iritacije (EpiDerm test iritacije kože – OECD TG 439)....	80
4.4.2. Određivanje fototoksičnosti (EpiDerm test fototoksičnosti – OECD TG 498) .....	82
<b>Poglavlje 5. Uporaba in vivo metoda u procjeni biološke aktivnosti (CO - UMFVBT) ...</b>	<b>86</b>
5.1. Uvod .....	86
5.2. Određivanje antiangiogenog potencijala korištenjem CAM testa .....	87
5.3. Određivanje iritativnog i antiiritativnog potencijala.....	90
<b>Poglavlje 6. Metode za dobivanje preparata iz biljaka (ekstrakti i eterična ulja) (P3 - UNICAL) .....</b>	<b>93</b>
6.1. Uvod .....	93
6.2. Maceracija .....	94
6.3. Soxhletova ekstrakcija.....	96
6.4. Inovativne tehnike ekstrakcije.....	98
6.4.1. Ekstrakcija uz upotrebu ultrazvuka .....	98
6.4.2. Ekstrakcija uz pomoć enzima .....	100
6.4.3. Ekstrakcija uz pomoć mikrovalova.....	101
6.4.4. Ekstrakcija superkričnim fluidima .....	102
6.4.5. Naviglio extractor ®.....	103
6.5. Ekstrakcija eteričnih ulja .....	105



Co-funded by  
the European Union





## Poglavlje 1. Metode istraživanja antifungalnog djelovanja eteričnih ulja na fitopatogene gljive (P2 - UNIOS)

### 1.1. Uvod

Eterična ulja (EO) poznata su kao biološki pristup u kontroli štetnih organizama. Biološke metode uključuju korištenje organizama i proizvoda dobivenih od njih za izravno ili neizravno upravljanje populacijama štetnika. Slično tome, biljni ekstrakti imaju dobra antifungalna svojstva protiv širokog spektra štetnih gljivica. Ovi prirodni ekstrakti nude ekološki prihvatljive alternative za zaštitu poljoprivrednih usjeva od bolesti [Wilson i sur., 1997.].

Alternativni pristup kemijskoj zaštiti biljaka od štetnih organizama uključuje korištenje različitih biljnih spojeva i ekstrakata, poput eteričnih ulja i njihovih komponenti [Kishore i sur., 2007.]. Važno je napomenuti da je više od 1300 biljnih vrsta identificirano zbog svoje sposobnosti sintetiziranja spojeva s antimikrobnim svojstvima [Wilkins i Board, 1989.]. Eterična ulja su vrlo složenog sastava i često su u njihovom sastavu brojne komponente. Najčešće u sastavu ulja dominiraju tri glavne komponente, koje čine približno 90 % ukupnog volumena, dok se preostale komponente nalaze u malim količinama [Dorman i Deans, 2000.]. Brojna su nastojanja istraživača da eterična ulja i biljni ekstrakti postanu alternativa za kontrolu biljnih patogena jer su izvor biološki aktivnih spojeva, što može dovesti do razvoja novih, sigurnijih načina zaštite biljaka od uzročnika bolesti [Al-Reza i sur., 2010.; Veloz-Garcia i sur., 2010.].

EO se pojavljuju kao tekuće, hlapljive, bistre i obojene mješavine većeg broja aromatskih spojeva. Dobivaju se iz svih biljnih dijelova. Poznato je oko 3000 eteričnih ulja, od kojih je 300 komercijalno važnih te se uglavnom koriste na tržištu aroma i mirisa, ali danas postoje brojna istraživanja o njihovoj upotrebi u zaštiti bilja. Brojni *in vitro* testovi pokazuju da su ulja vrlo učinkovita protiv fitopatogenih gljiva.

U cilju određivanja antifungalnog djelovanja koriste se različiti testovi među kojima je značajna podjela na testovima u kojima se ispituje volatilni i testove u kojima se ispituje kontaktni utjecaj ulja na ciljane organizme. Ulja se koriste u različitim koncentracijama.

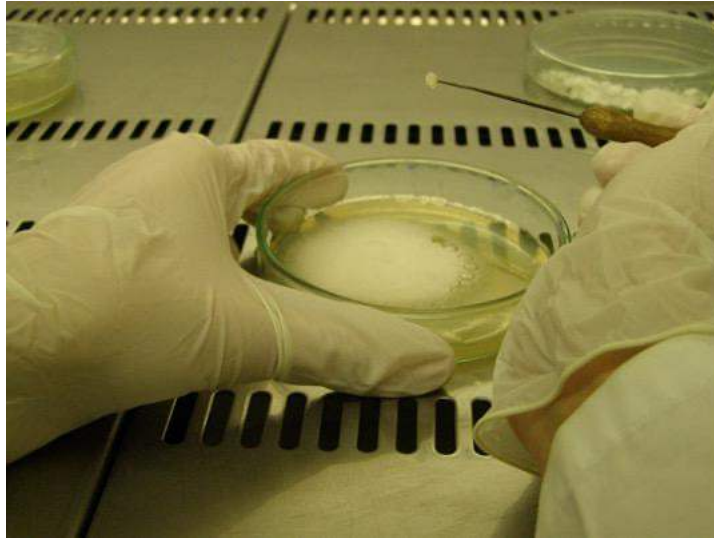
### 1.2. Volatilni test za procjenu utjecaja eteričnih ulja *in vitro*

Za istraživanje volatilnog utjecaja eteričnih ulja koristi se disk difuzijska metoda koju su opisali Edris i Farrag [2003.] i Silva i sur. [2019.].



**Protokol-** korak po korak

1. U sredinu Petrijevih zdjelica ( $V = 65 \text{ mL}$ ) s 15 mL KDA podloge (krumpir-dekstrozni agar), sterilnom iglom se stavlja 7 dana star kružni isječak micelija (4 mm) (slika 1.1) koji je uzgojen na KDA.



**Slika 1.1.** Kružni isječak micelija

2. U poklopac Petrijeve zdjelice stavi se sterilni filter papir promjera 7 mm u koji se doda eterično ulje (slika 1.2) kako bi se dobio eksperimentalno predviđen volumni udio ulja u zraku.



**Slika 1.2.** Apliciranje eteričnog ulja



Co-funded by  
the European Union



3. Petrijeve zdjelice pripremljene na opisani način odlažu se u termostat komore na temperaturu 18 do 25 °C (temperature ovisi o vrsti ciljanog organizma) i svjetlosni režim 12 sati svjetlo / 12 sati mrak (slika 1.3).



Slika 1.3. Petrijeve zdjelice u thermostat komori

4. rast micelija mjeri se nakon 72 i 168 sati (ovisno o brzini rasta i vrsti gljive) (slike 1.4 i 1.5). Kao kontrola koristi se filter papir na koji je aplicirana odgovarajuća količina sterilne destilirane vode. Nakon posljednjeg mjerenja promjera micelija u pokusu s gljivama koje stvaraju sklerocije npr. *Sclerotinia sclerotiorum*, prebroje se sklerociji, odredi njihova prosječna masa i nakon 4 mjeseca čuvanja na temperaturi od 4 °C odredi im se klijavost.

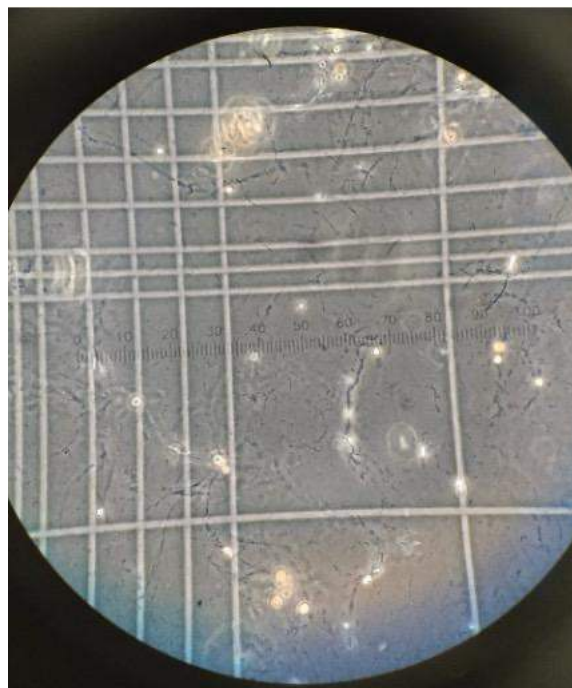


Slika 1.4. Rast micelija mjeri se nakon 48, 72 i 168 sati.



**Slika 1.5.** Utjecaj različitih eteričnih ulja na rast micelija gljive *Neofusicoccum parvum*

5. U pokusu s gljivama koje produciraju konidije, a nakon zadnjeg mjerenja promjera micelija, sporulacija se može odrediti tako da se pripremi suspenzija konidija u 100 mL sterilne destilirane vode i pomoću hemocitometra odredi koncentracija konidija po ml suspenzije za sve varijante pokusa (slika 1.6).



**Slika 1.6.** Brojanje spora pomoću hemocitometra

6. Za određivanje klijavosti konidija iz pripremljene suspenzije za svaku varijantu pokusa uzima se 20  $\mu$ L i razmazuje na PDA supstrat prethodno izliven u Petrijeve zdjelice promjera 60 mm. Petrijeve zdjelice stavljaju se u termostatsku komoru na temperaturu između 18 i 25 °C i svjetlosni





Co-funded by  
the European Union

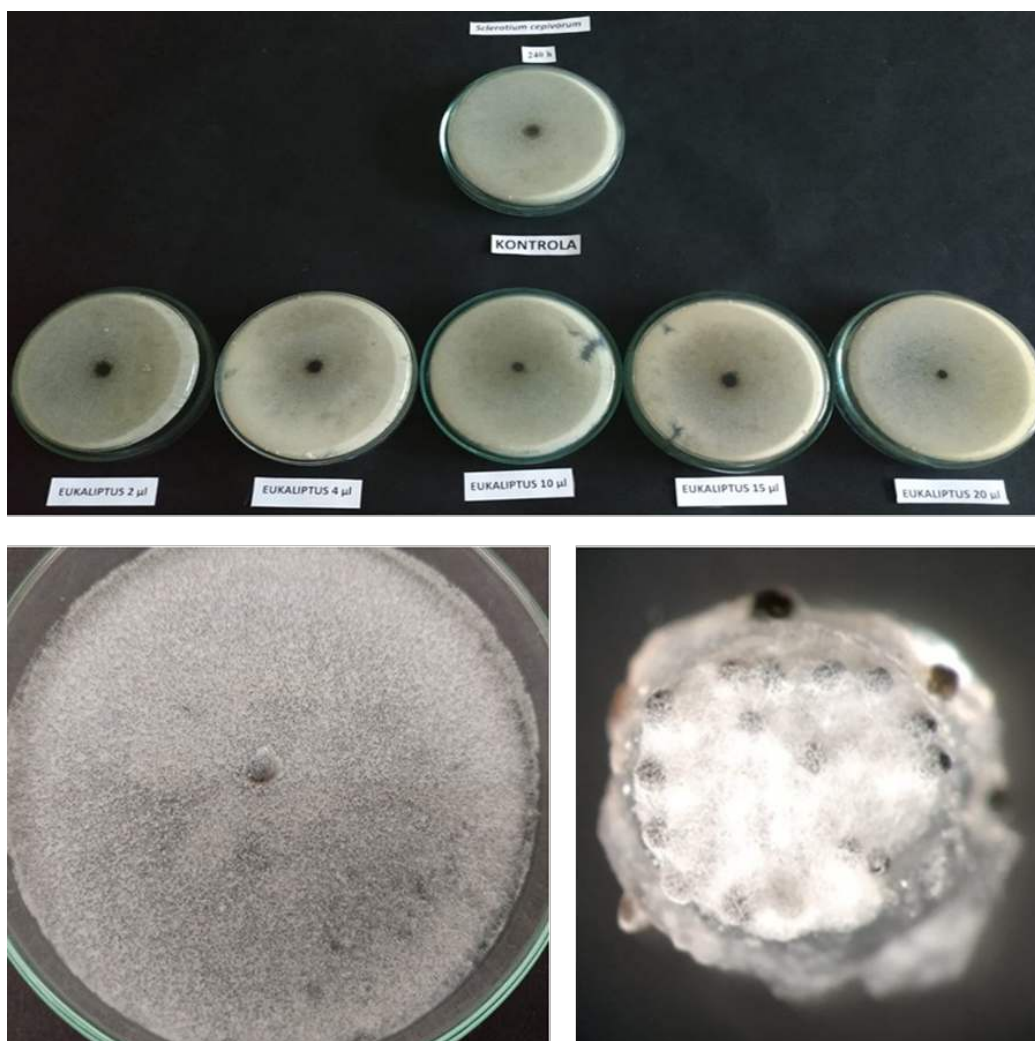


režim 12 sati svjetla / 12 sati tame. Nakon 24 sata na uzorku od 3 x 20 konidija određuje se broj prokljalih konidija. Konidije se smatraju prokljalima ako je klična cijev jednaka ili veća od duljine konidija (slika 1.7).



**Slika 1.7.** Klijanje konidija

7. Za gljive koje tvore mikrosklerocije (npr. *Stromatinia cepivora* i *Macrophomina phaseolina*), nakon posljednjeg mjerenja rasta micelija, može se uzeti kružni isječak micelija promjera 4 mm i mikrosklerocije se mogu prebrojati. Kružni isječak za određivanje broja mikrosklerocija mora se uzeti na udaljenosti od 10 mm od ruba diska postavljenog u sredinu Petrijeve zdjelice (slika 1.8).



Slika 1.8. Utjecaj eteričnih ulja na gljivu *Stromatinia cepivora*

### 1.3. *In vitro* ispitivanje kontaktnog djelovanja eteričnih ulja na gljive

Metoda ispitivanja kontaktnog djelovanja eteričnih ulja vrlo je slična prethodno opisanoj metodi st tim da se ovdje ulje umiješa u PDA podlogu.

#### **Postupak- korka po korak**

1. U Petrijeve zdjelice promjera 90 mm ulije se 10 mL KDA u koje se prethodno umiješa eterično ulje kako bi se dobio istraživanjima predviđen volumni udio ulja u supstratu. Negativna kontrola je sterilna destilirana voda.
2. Petrijeve zdjelice se zatvore parafilm trakom i pohrane u termostatsku komoru na temperaturu od 18 do 25°C. Tijekom inkubacije razvija se micelij čiji porast mjerimo u mm i reproduktivne strukture gljiva (npr. sklerocije ili konidije).



Co-funded by  
the European Union



3. Porast micelija mjeri se obično nakon 62 i 168 sati.

4. Inhibicija rasta micelija izračunava se pomoću formule Wu et al. (2013):

$$I(\%) = [(C-T)/(C-0,4)] \times 100,$$

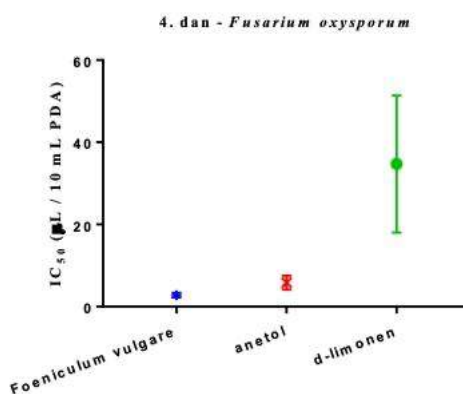
gdje je:

I (%) - postotak inhibicije rasta micelija na testiranim spojevima

C - promjer rasta gljive na čistom KDA,

T - promjer rasta gljive na KDA u koji je umiješano eterično ulje.

5. Na temelju dobivenih podataka mogu se izračunati EC<sub>50</sub> vrijednosti za svako eterično ulje. Vrijednosti EC<sub>50</sub> pokazuju koja su eterična ulja i u kojoj količini utjecala na smanjenje rasta micelija za 50 % (slika 1.9).



**Slika 1.9.** Usporedba EC<sub>50</sub> za eterično ulje komorača (*Foeniculum vulgare*) i njegove komponente (anetol i d-limonen) za *Fusicarium oxysporum* korištenjem analize varijance (ANOVA) i Tukey testa.

Rezultati su predstavljeni kao granice pouzdanosti od 95 %.

### Napomene!!!

- U obje varijante pokusa (kontaktni i volatilni učinak ulja) gdje zadnjim mjerenjem nije utvrđen rast micelija, uzme se kružni isječak s micelijem i prenese u novu Petrijevu zdjelicu s KDA podlogom (bez ulja).
- Ovako pripremljeni uzorci inkubiraju se 48 sati (npr. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*) ili 72 sata (npr. *Stromatinia cepivora*) u termostat komori na 25 °C.
- Ako je gljiva nakon inkubacije počela razvijati micelij ulje djeluje fungistatično, a ako nema razvoja novog micelija ulje djeluje fungicidno.
- Najniža koncentracija (količina) ulja pri kojoj je utvrđena potpuna inhibicija rasta micelija označava se kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), a najniža koncentracija (količina)



Co-funded by  
the European Union



ulja pri kojoj je utvrđeno fungicidno djelovanje označava se kao minimalna fungicidna koncentracija (MFC).

### Literatura

Al-Reza SM, Rahman A, Ahmed Y, Kang SC. Inhibition of Plant Pathogens In Vitro and In Vivo with Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic. Biochem Physiol* 2010.; 96: 86-92.

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000.; 88: 308-316.

Edris AE, Farrag ES. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their mayor aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/Food* 2003.; 47(2): 117-121.

Kishore GK, Pande S, Harish S. Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut, *Plant Disease* 2007.; 91(4): 375-379.

Silva FFA, Alves CCF, Oliveria Filho JG, Vieira TM, Crotti AEM, Miranda MLD. Chemical constituents of essential oil form *Murraya paniculata* leaves and its application to in vitro biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Food Sci. Technol, Campinas* 2019.: 39 (Supl.2): 413-417.

Veloz-Garcia R, Marin-Martinez R, Veloz-Rodriguez R, Rodriguez-Guerra R, Torres-Pacheco I, Monzalez-Chavira MM, et al. Antimicrobial Activities of Cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) Phenolics- Containing Extract against Fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Ind Crops Prod* 2010.; 31: 134-138.

Wilkins KM, Board RG. Natural antimicrobial systems, in: *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, G. W. Gould, ed., Elsevier, New York 1989.; 285–362.

Wilson CL, Solar JM, El-Ghaouth A, Wisniewski ME. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 1997.; 81: 204-210.

Wu J, Kang S, Luo L, Shi Q, Ma J, Yin J, et al. Synthesis and antifungal activities of novel nicotinamide derivatives containing 1, 3, 4-oxadiazole. *Chemistry Central Journal* 2013.; 7(1): 64.



## Poglavlje 2. Herbicidno djelovanje biljnih ekstrakata i eteričnih ulja (P2 - UNIOS)

### 2.1. Uvod

Suzbijanje korova u suvremenoj poljoprivredi prvenstveno se oslanja na korištenje sintetskih herbicida zbog njihove visoke učinkovitosti, jednostavne primjene i isplativosti. Ipak, njihova nepravilna i prekomjerna primjena dovodi do pojave rezistentnih populacija korova, rezidua herbicida u hranidbenom lancu i štetnih učinaka na okoliš te na zdravlje ljudi i životinja [Macías i sur., 2003.; Singh i sur., 2003.]. Osim toga, česta zabrana aktivnih tvari, nedostatak registriranih sredstava za zaštitu bilja i ograničenja u primjeni sintetskih herbicida u sustavima ekološke poljoprivrede kao i u zaštićenim područjima zahtijeva drugačiji pristup u suzbijanju korova.

Alelopatija je biološki fenomen, definiran kao bilo koji izravan ili neizravan, štetan ili koristan učinak jedne biljke na klijanje i rast druge kroz proizvodnju alelokemikalija koje se ispuštaju u okoliš [Rice, 1984.]. Alelopatija se smatra alternativnom metodom za održivo suzbijanje korova. Alelopatički usjevi koji imaju snažan herbicidni učinak mogu se primijeniti kao prirodni herbicidi u obliku biljnih ekstrakata, prašiva i eteričnih ulja koji smanjuju ili inhibiraju klijanje i rast korova [Singh i sur., 2003.; Ravlić i sur., 2016.].

Ljekovite biljke iz različitih botaničkih porodica, kultivirane i samonikle, predstavljaju veliki izvor bioaktivnih spojeva za razvoj novih, sigurnih i biorazgradivih bioherbicida [Bhowmik i Inderjit, 2003.; Fujii i sur., 2003.; Amini i sur., 2016.]. Bioaktivni biljni sekundarni metaboliti (alelokemikalije) prisutni su u različitim koncentracijama u svim biljkama i biljnim dijelovima [Alam i sur., 2001.]. Fitotoksični potencijal biljnih ekstrakata i eteričnih ulja ovisi o više čimbenika, kao što su geografsko podrijetlo, uvjeti rasta, sezonske varijacije i faza rasta biljke, kao i o abiotičkim i biotičkim čimbenicima okoliša koji mogu povećati proizvodnju sekundarnih metabolita u biljkama i pojačati njihov inhibitorni učinak [Safdar i sur., 2014.; Sarić-Krsmanović i sur., 2019.; Medina-Villar i sur., 2020.; Appiah i sur., 2022.; Ravlić i sur., 2022.]. Na aktivnost utječu koncentracija, metoda ekstrakcije i je li biljni materijal svjež ili osušen, ali također uvelike ovisi o ciljanim vrstama jer se one razlikuju u svojoj osjetljivosti [Fujii i sur., 2003.; Norsworthy, 2003.; Souza Filho i sur., 2009.; Ravlić i sur., 2016.; Ravlić i sur., 2022.].

Various tests and techniques are used for laboratory screening of plants in order to evaluate their herbicidal potential. Za laboratorijski probir biljaka koriste se različiti testovi i tehnike kako bi se procijenio njihov herbicidni potencijal.



Co-funded by  
the European Union



## 2.2. Herbicidno djelovanje biljnih ekstrakata

Prvi korak za pripremu biljnih ekstrakata je sakupljanje biljnog materijala. Pravilna botanička identifikacija biljnih vrsta je ključna, a sve prikupljene biljke identificirane su prema njihovim morfološkim obilježjima pomoću dihotomnih ključeva i atlasa. Biljni materijal bez vidljivih simptoma bolesti i fizičkih oštećenja prikuplja se na različitim lokacijama, izložen različitim čimbenicima okoliša i u različitim razvojnim fazama biljke.



**Slika 2.1.** Sakupljanje biljnog materijala (*Solidago gigantea*) u fazi cvatnje.

Ako se istražuju različiti dijelovi biljke, prije sušenja biljni dijelovi se razdvajaju (slika 2.2).



Co-funded by  
the European Union



**Slika 2.2.** Razdvajanje svježeg biljnog materijala na biljne dijelove (*Oenothera biennis*)

Za pripremu ekstrakata može se koristiti svježa ili osušena biomasa. Materijal se suši na zraku od 24 do 72 h, a zatim u sušioniku pri 40 do 50 °C. Suha biomasa se usitnjava na male komadiće, zatim melje električnim mlinom u fini prah (slika 2.3) i skladišti u papirnatim vrećama na suhom i hladnom mjestu.



**Slika 2.3.** Biljni materijal nakon mljevenja.

### **Protokol korak po korak za pripremu vodenog ekstrakta biljaka**

Vodeni ekstrakti pripremaju se prema Norsworthyja (2003.) uz pojedine modifikacije.



- 1) svježa ili suha biljna biomasa u količini od 10 g ekstrahira se u 100 ml destilirane vode na sobnoj temperaturi  $22 (\pm 2)$  °C tijekom 24 sata (slika 2.4). Alternativno, biljni materijal se može ekstrahirati vrućom vodom.



**Slika 2.4.** Priprema vodenih ekstrakata

- 2) smjesa se nakon toga filtrira kroz muslinsko platno kako bi se uklonili grubi ostatci i nakon toga kroz filter papir kako bi se dobio vodeni ekstrakt koncentracije 10 %. Ekstrakti u različitim koncentracijama dobivaju se daljnjim razrjeđivanjima destiliranom vodom. Korištene koncentracije kreću se od 1 % do 10 %.

### **Protokol korak po korak za pripremu etanolskog ekstrakta biljaka**

- 1) etanolski ekstrakti se dobivaju maceracijom biljnog prašiva u etanolu od 24 do 72 sata (slika 2.5).



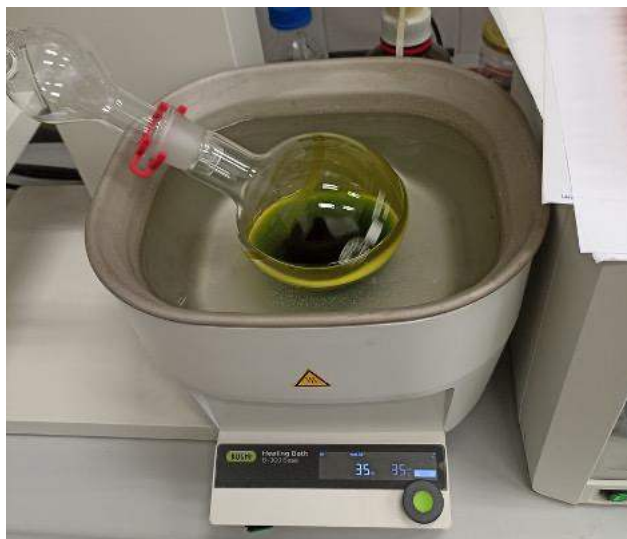
**Slika 2.5.** Priprema etanolskih ekstrakata – maceracija biljnog materijala u etanolu.

- 2) nakon ekstrakcije, ekstrakt se filtrira i otapalo se uklanja pod tlakom na nižim temperaturama kako bi se dobio sirovi etanolski ekstrakt (slika 2.6). Različite





koncentracije dalje se dobivaju suspendiranjem sirovog ekstrakta u destiliranoj vodi i Tween-u kao disperzantu [Silva i sur., 2018.]. Korištene koncentracije su u rasponu od 0,01 % do 5 %.



Slika 2.6. Priprema etanolskih ekstrakata – dobivanje sirovog ekstrakta.

### **Protokol pokusa**

- 1) sjemenke korovnih vrsta koje se koriste u pokusu kao testne vrste čiste se i suše na sobnoj temperaturi (Slika 2.7).

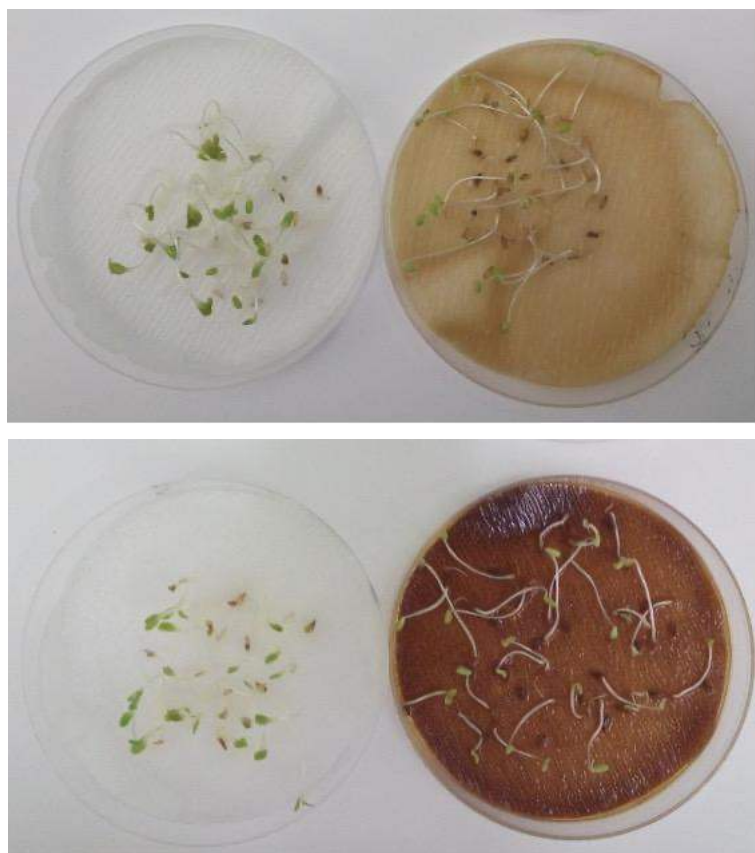


Slika 2.7. Čišćenje i odvajanje sjemena korova prije pokusa.

- 2) prije pokusa procjenjuje se klijavost sjemena korova kako bi se utvrdilo postoji li zadovoljavajući postotak klijavosti. Sjeme salate (slika 2.8) ili rotkvice koristi se pri probiru velikog broja ekstrakata, a ekstrakti s najvećim učinkom dalje se procjenjuju na korovne vrste.



Co-funded by  
the European Union

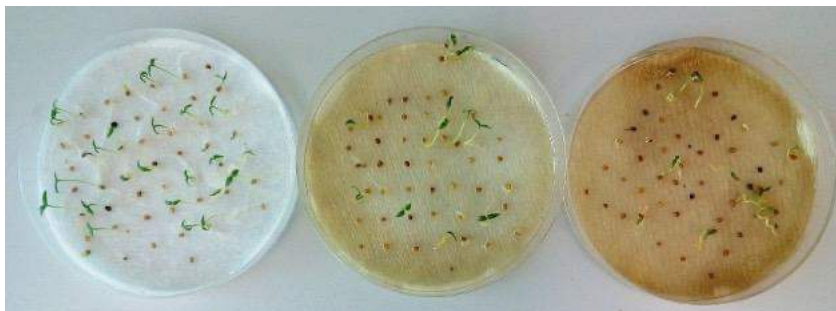


**Slika 2.8.** Testiranje ekstrakata *Oenothera biennis* iz različitih biljnih dijelova (stabljika i list) na salati.

- 3) 3) učinak ekstrakata se procjenjuje u pokusu u Petrijevim zdjelicama u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Sjeme korova stavlja se u sterilizirane Petrijeve zdjelice obložene filter papirom. Filter papir se navlaži sa 4 do 6 mL ekstrakta (ovisno o testiranoj vrsti) u svakoj koncentraciji, dok se u kontroli koristi destilirana voda (slika 2.9, 2.10, 2.11). Sjeme se inkubira na izmjeničnim ili konstantnim temperaturama i uvjetima svjetla/tame optimalnim za klijanje i rast svake korovne vrste.



**Slika 2.9.** Herbicidni učinak vodenog ekstrakta *Salvia pratensis* na *Abutilon theophrasti*.



**Slika 2.10.** Herbicidni učinak različitih koncentracija ekstrakata *Chelidonium majus* na *Solanum nigrum*.



**Slika 2.11.** Herbicidni učinak različitih koncentracija vodenih ekstrakata bosiljka na *Solanum nigrum*.

### 2.3. Herbicidni učinak eteričnih ulja

Herbicidno djelovanje eteričnih ulja na klijanje i rast korovnih vrsta procjenjuje se kao volatilno [Souza Filho i sur., 2009] i izravno kontaktno djelovanje [Sarić-Krsmanović i sur., 2019].

#### **Protokol korak po korak**

- 1) koriste se komercijalna eterična ulja ili se dobivaju iz sakupljenog i na zraku osušenog biljnog materijala hidrodestilacijom u trajanju od 2,5 h u u aparaturi po Clevenger-u.
- 2) otopina eteričnih ulja se priprema u različitim koncentracijama (od 0,1 do 1 %) s destiliranom vodom i emulgira s Tweenom.
- 3) u pokusu s volatilnim učinkom, sjeme korovnih vrsta stavlja se u Petrijeve zdjelice na filter papir navlažen vodom, a na filter papir pričvršćen s gornje strane poklopca nanosi se otopina eteričnog ulja. U kontroli se koristi samo destilirana voda.
- 4) u pokusu s izravnim kontaktom sjeme istraživanih vrsta stavlja se u Petrijeve zdjelice na filter papir navlažen otopinom eteričnih ulja. U kontrolnom tretmanu sjeme pokusnih vrsta naklijava se bez eteričnih ulja, samo s destiliranom vodom.
- 5) u obje metode, sjeme se inkubira na izmjeničnim ili konstantnim temperaturama i različitim uvjetima svjetlo/tama optimalnim za klijanje i rast svake korovne vrste.



### Procjena herbicidnog potencijala biljnih ekstrakata i eteričnih ulja

Za sve navedene metode, na kraju inkubacije, za određivanje herbicidnog potencijala mjere se sljedeći parametri: klijavost, duljina korijena i izdanka klijanaca te svježa i suha masa klijanaca.

- Postotak klijavosti izračunava se za svako ponavljanje pomoću formule:
  - **$K$  (klijavost) = (proklijalo sjeme/ukupno sjeme) × 100.**
- Razdoblje inkubacije je različito za svaku ispitivanu vrstu i prosječno je od 8 do 12 dana.
- Svi prikupljeni podaci se statistički analiziraju pomoću ANOVA-e, a razlike između srednjih vrijednosti tretmana izmjerenih parametara za svaku korovnu vrstu testiraju se LSD testom na razini vjerojatnosti od 0,05.
- Biljni ekstrakti i eterična ulja rangirani su prema njihovom inhibitornom potencijalu, tj. postotku inhibicije u usporedbi s kontrolnim tretmanom. Materijali koji najviše obećavaju dalje se ispituju u stakleničkim pokusima.

### Literatura

Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A, Varela RM, Simonet AM, Carrera C, Molinillo JMG. Allelopathy as new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Sciences in Space* 2003.; 17(1): 18-23.

Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2003.; 22: 239-311.

Rice EL. *Allelopathy*. 2nd edition. Academic Press, Orlando, Florida, 1984.

Ravlić M, Baličević R, Nikolić M, Sarajlić A. Assessment of allelopathic potential of fennel, rue and sage on weed species hoary cress (*Lepidium draba*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2016.; 44(1): 48-52.

Bhowmik PC, Inderjit. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection* 2003.; 22: 661–671.

Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y, Iida O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biology and Management* 2003.; 3(4): 233-241.

Amini S, Azizi M, Joharchi MR, Moradinezhad F. Evaluation of allelopathic activity of 68 medicinal and wild plant species of Iran by Sandwich method. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 2016.; 3(2): 243-253.



Co-funded by  
the European Union



- Alam SM, Ala SA, Azmi AR, Khan MA, Ansari R. Allelopathy and its Role in Agriculture. *Journal of Biological Sciences* 2001.; 1(5): 308-315.
- Safdar ME, Tanveer A, Khaliq A, Naeem MS. Allelopathic action of parthenium and its rhizospheric soil on maize as influenced by growing conditions. *Planta Daninha* 2014.; 32(2): 243–253.
- Sarić-Krsmanović M, Gajić Umiljendić J, Radivojević LJ, Šantrić LJ, Potočnik I, Đurović-Pejčev R. Bio-herbicidal effects of five essential oils on germination and aerly seedling growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.). *Journal of Environmental Science and Health Part B* 2019.; 54: 247-251.
- Medina-Villar S, Uscola M, Pérez-Corona ME, Jacobs DF. Environmental stress under climate change reduces plant performance, yet increases allelopathic potential of an invasive shrub. *Biological Invasions* 2020.; 22: 2859–2881
- Appiah KS, Omari RA, Onwona-Agyeman S, Amoatey CA, Ofosu-Anim J, Smaoui A, et al. Seasonal Changes in the Plant Growth-Inhibitory Effects of Rosemary Leaves on Lettuce Seedlings. *Plants* 2022.; 11: 673.
- Ravlić M, Markulj Kulundžić A, Baličević R, Marković M, Viljevac Vuletić M, Kranjac D, Sarajlić A. Allelopathic Potential of Sunflower Genotypes at Different Growth Stages on Lettuce. *Applied Sciences* 2022.; 12(24): 12568.
- Norsworthy JK. Allelopathic potential of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Technology* 2003.; 17: 307-313.
- Souza Filho APS, Guilhon GMSP, Zoghbi MGB, Cunha RL. Comparative analyses of the allelopathic potential of the hydroalcoholic extract and essential oil of "Cipo-d'alho" (Bignoniaceae) leaves. *Planta Daninha* 2009.; 27(4): 647-653.
- Silva CGV e, Oliveira JCS de, Camara CAG da. Insecticidal activity of the ethanolic extract from *Croton* species against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 2018.; 71(2): 8543-8551.



### **Poglavlje 3. Primjena ljekovitih biljaka kao sastojaka dodane vrijednosti u industriji funkcionalnih pekarskih i slastičarskih proizvoda (P1 - USVT)**

#### **3.1. Uvod**

Aromatično i ljekovito bilje obuhvaća vrlo velik broj biljaka koje pripadaju različitim botaničkim porodicama i imaju godišnji, dvogodišnji ili višegodišnji životni vijek.

Ljekovite biljke:

- koriste se tisućama godina u kuhinji i jeftini su, lako dostupni i zdravi
- u obrocima se smatraju alternativom korištenju sintetičkih kemikalija
- koriste se u nekoliko medicinskih formulacija za liječenje i prevenciju bolesti
- koriste se u prehrambenom sektoru kao prirodni antioksidansi za sprječavanje oksidacije lipida
- povećavaju hranjivu vrijednost hrane i daju okus raznim pićima

Ljekovite biljke se mogu dodavati kao takve ili u obliku ekstrakata, eteričnih ulja u pekarske proizvode sa sljedećom namjenom:

- i) poboljšati senzorna svojstva proizvoda
- ii) za antioksidativni učinak određen polifenolnim aktivnim principima
- iii) za antimikrobnu ulogu zahvaljujući biološki aktivnim antifungalnim i antibakterijskim spojevima koji se nalaze u ljekovitom bilju

Biljke sadrže fenolne spojeve, glukozinolate, cijanogene glikozide, oksilipine i alkaloide.

Namirnice bogate sekundarnim metabolitima i bioaktivnim spojevima poput flavonoida, alkaloida i drugih preporučuju se prehrambenim smjernicama za prevenciju stresa, hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti [Rivera i sur., 2010.].

Vrijednost ljekovitog bilja iz porodice Lamiaceae leži u proizvodnji širokog spektra sekundarnih metabolita sa snažnim antibakterijskim, antioksidativnim, protuupalnim, antimikrobnim, antivirusnim i antikancerogenim djelovanjem [Carović-Stanko i sur., 2016.].

U sljedećim odjeljcima bit će prikazano nekoliko primjera ljekovitih biljaka koje se koriste u pekarskim proizvodima za poboljšanje senzorskih svojstava, ali i za antioksidativno i antifungalno djelovanje.



Co-funded by  
the European Union



### 3.2. Ljekovite biljke koje se koriste za poboljšanje okusa, boje i mirisa pekarskih proizvoda

Ljekovite biljke dodane u različite oblike pripreme tijesta poboljšavaju senzorna svojstva, pozitivno ili negativno utječu na njegova reološka svojstva (*Lavandula*, *Cichorium intybus*) (slika 3.1).



Slika 3.1. *Cichorium intybus* i *Lavandula*

Zbog široke namjene koriste se tijekom cijele godine, svježi ili suhi.

Kod potrošača sve više prevladava tendencija korištenja prirodnih bojila nauštrb umjetnih, sintetskih, a neke ljekovite biljke svojim karakteristikama boje mogu predstavljati zdravu alternativu sintetskim kemijskim bojilima u prehrambenoj industriji, kao što su:

**Metvica** - osvježavajuća biljka koja se može koristiti u kolačima, keksima, kremama, glazurama i čokoladama. Njegov hladan i blago sladak okus savršen je za deserte. Paprena metvica i metvica najčešće su vrste koje se koriste u slastičarstvu. Dobro se slaže s čokoladom i voćem poput bobičastog voća i citrusa [Sik i sur., 2023.].

**Bosiljak** - biljka slatkog, blago paprenog okusa koja se može koristiti u slatkim pekarskim proizvodima poput kolača, kolača i sladoleda, kao i u slanim pekarskim proizvodima poput focaccia kruha ili pizze. Dobro se slaže s voćem poput jagoda, breskvi i malina [Calderón Bravo i sur., 2021.].

**Lavanda** - mirisna biljka koja se često koristi u slasticama poput kolačića, kolača i sladoleda. Njegov blago slatki okus daje pekarskim proizvodima jedinstvenu ljubičastu boju. Dobro se slaže s okusima citrusa i dodaje jedinstvenu aromu pečenim proizvodima [Valková i sur., 2021.].



Co-funded by  
the European Union



**Korijander** - popularna biljka koja se koristi u pečenju za dodavanje svježeg, citrusnog okusa hrani. Osušeni korijander također se može dodati u tijesta, krušne mrvice ili njime začiniti slana peciva. Dobro se slaže s čokoladom i može se koristiti za dodavanje jedinstvenog okusa pecivima, kruhu, krekerima i keksima [Sriti i sur., 2019.].

**Majčina dušica** - biljka koja se često koristi u slanim jelima kao što su kruh, pizza i focaccia, ali se također može koristiti u slatkim pekarskim proizvodima poput kolačića od prhkog tijesta. Njegov zemljani i blago mentasti okus odličan je dodatak pečenim proizvodima s maslacem. Kadulja - ima blago gorak, zemljani okus i često se koristi u slanim pekarskim proizvodima poput kruha, keksa i preljeva. Također se može koristiti u slatkim pekarskim proizvodima poput prhkog peciva i pogačica [Bassiouny i sur., 1990.].

**Ružmarin** - drvenasta, aromatična biljka koja se može koristiti u slatkim pekarskim proizvodima poput kruha i keksa. Također može dodati jedinstven okus pekarskim proizvodima, posebno kruhu, quicheevima i kolačima. Jednostavno nasjeckajte svježe listove ružmarina i umiješajte ih u tijesto za kruh ili pecivo prije pečenja [Valková i sur., 2021.].

**Origano** - aromatična biljka koja dobro funkcionira u slanim pekarskim proizvodima poput kore za pizzu i focaccie. Može se sitno nasjeckati i umiješati u tijesto ili koristiti kao preljev sa soli i maslinovim uljem.

**BIO FUNKCIONALNI TPA MUFFINI** na bazi integralnog pšeničnog brašna, cvijeta lavande i korijena cikorije visokih nutritivnih svojstava, niskog glikemijskog indeksa, visokog biološkog potencijala i ekonomski učinkoviti, čija se tehnologija izrade može implementirati u pekarskim pogonima (slika 3.2).





Co-funded by  
the European Union



Slika 3.2. BIO FUNKCIONALNI TPA MUFFINS

### 3.3. Ljekovite biljke kao antioksidansi u pekarskim proizvodima

Dodatak 5% ekstrakata *Camellia sinensis*, *Asparagus racemosus* i *Curcuma longa* (slika 3.3) povećao je antioksidativni kapacitet kruha bez promjene senzorskih svojstava. Antioksidativna svojstva zelenog čaja u prahu koji zamjenjuju dio brašna u biskvitu također su izvjestili Sik i sur. (2023.).



Slika 3.3. *C. sinensis*, *A.s racemosus* i *C. longa* – ljekovite biljke s antioksidativnim svojstvima.

Galna i taninska kiselina utjecale su na svojstva glutena i proizvele čvršće i deblje filmove s nižom paropropusnošću.

Sljedeći dijelovi obuhvaćaju različite recepture pekarskih proizvoda s dodatkom ljekovitog bilja, uz detaljan opis korištenih sastojaka i izgleda konačnog proizvoda.



Co-funded by  
the European Union



### ***Kruh s đumbirom (C. longa L.) (slika 3.4)***

#### Protokol- korak po korak - Sastojci

- brašno za bijeli kruh
- sol
- kurkuma u prahu
- brzodjelujući kvasac
- maslinovo ulje
- voda.



**Slika 3.4.** Presjek kruha s đumbirom

#### **Napomene!!!**

Prah kurkume (*C. longa L.*) korišten je kao zamjena za 0 %, 2 %, 4 %, 6 % i 8 % pšeničnog brašna za izradu pšeničnog kruha s kurkumom.

- Dnevni unos 50 g ili dvije kriške kruha s kurkumom koji ima 4 % zamjene pšeničnog brašna kurkumom u prahu može isporučiti približno 4,6 mg kurkumina i 40,12 mg GAE ukupnih fenolnih spojeva koji mogu pružiti dodatne zdravstvene dobrobiti ljudskom tijelu [Lim i sur., 2011.].
- Podaci o točnim preporučenim dozama ovih fitokemikalija nisu dostupni, međutim, provedene su različite in vitro i in vivo studije kako bi se analizirali njihovi biološki učinci.

### ***Dijetalni kolač sa želeom od pasjeg trna (Hippophae rhamnoides) (slika 3.5)***

#### Protokol korak po korak – Sastojci

- **integralno pšenično brašno**
- **mlijeko**
- šećere
- maslac
- jaja



Co-funded by  
the European Union



- žele od krkavine (*H. rhamnoides*).



Slika 3.5. Torta s želeom od krkavine

### ***Kruh od kiselog tijesta kadulje (slika 3.6)***

#### Protokol korak po korak - Sastojci

- Voda - 697 g (73 %)
- Kvasac - 191 g (20 %)
- Ukupno brašno - 955 g (100 %)
- Brašno za kruh - 859 g (90 %)
- Integralno pšenično brašno - 95 g (10 %)
- Pečeni češnjak - 29 g (3 %)
- Kadulja - 10 g (1 %)
- Sol - 19 g (2 %)
- **Ukupno 1900 g (199 %)**

[<https://vituperio.com/roasted-garlic-sage-sourdough-bread/>].



Co-funded by  
the European Union



Slika 3.6. Kruh s kaduljom

### ***Krušna pšenica, raž i cikorija (slika 3.7)***

#### Protokol korak po korak - Sastojci

- Brašno - 275 g
- Raženo brašno - 275 g
- Sol - 1,5 tsp.
- Šećer - 1,5 tbsp
- Kvasac - 1,5 tsp.
- Ocat - 1/2 žličice.
- Cikorija - 1,5 tbsp
- Kumin - 2 žličice.
- Voda – 400-420 ml
- Biljno ulje - 3 žlice.



Slika 3.7. Raženi kruh s cikorijom



Co-funded by  
the European Union



### ***Kruh od maslačka (slika 3.8)***

#### Protokol korak po korak - Sastojci

- Latice maslačka -  $\frac{1}{3}$  šalice
- Mlijeko - 1 šalica
- Suhi aktivni kvasac - 1 žlica
- Topla voda -  $\frac{1}{2}$  šalice
- Med -  $\frac{1}{4}$  šalice
- Sol - 2 žličice
- Maslac, omekšao -  $\frac{1}{2}$  šalice
- Jaja - 2
- Pšenično brašno - 5 šalica.



**Slika 3.8.** Kruh od maslačka

### ***Kruh s origanom (Slika 3.9)***

#### Protokol korak po korak - Sastojci

- Pšenično brašno
- Aktivni suhi kvasac ili svježi kvasac
- Šećer
- Ekstra djevičansko maslinovo ulje
- Med
- Morska sol
- Svježi origano [<https://thegreekfoodie.com/greek-bread-with-oregano-and-olive-oil/>]



Co-funded by  
the European Union



**Slika 3.9.** Kruh s origanom

### **Napomene!!!**

- ❖ Varijacije podataka u parametrima izrade kruha primijećene su kada su kruhovi pripremljeni dodavanjem sušenog origana na razini od 1, 2, 3 i 4 % u brašnu [Dhillon i Kaur Amarjeet, 2013.].
- ❖ Specifični volumen (4,72 cc/g) bio je najbolji na razini od 1% i smanjio se na 4,22 cc/g na razini 4% origana u mješavini.
- ❖ Origano je također povećao težinu štruce sa 145 g na razini 1 % na 149 g na razini 4 % origana u kruhu.
- ❖ Na razini od 2% origana, upijanje vode je bilo 72,24 % i poraslo je na 75 % na razini od 4%.
- ❖ Ovo je pokazalo da povećana količina origana ima štetan učinak na specifični volumen kruha.

### ***Peciva s majčinom dušicom (Satureja hortensis L.) (slika 3.10)***

#### Protokol korak po korak - Sastojci

- Integralno pšenično brašno - 4 šalice (512 g)
- Sol - 2 žličice (10 g)
- Šećer - 2 žličice (8 g)
- Suhi kvasac - 2 žličice (8 g)
- Mljeveno svježe lišće timijana - 2 žlice
- Voda - 2 šalice (454 g)

[[https://www.sidechef.com/recipes/8333/no\\_knead\\_thyme\\_dinner\\_rolls/](https://www.sidechef.com/recipes/8333/no_knead_thyme_dinner_rolls/)].



Co-funded by  
the European Union



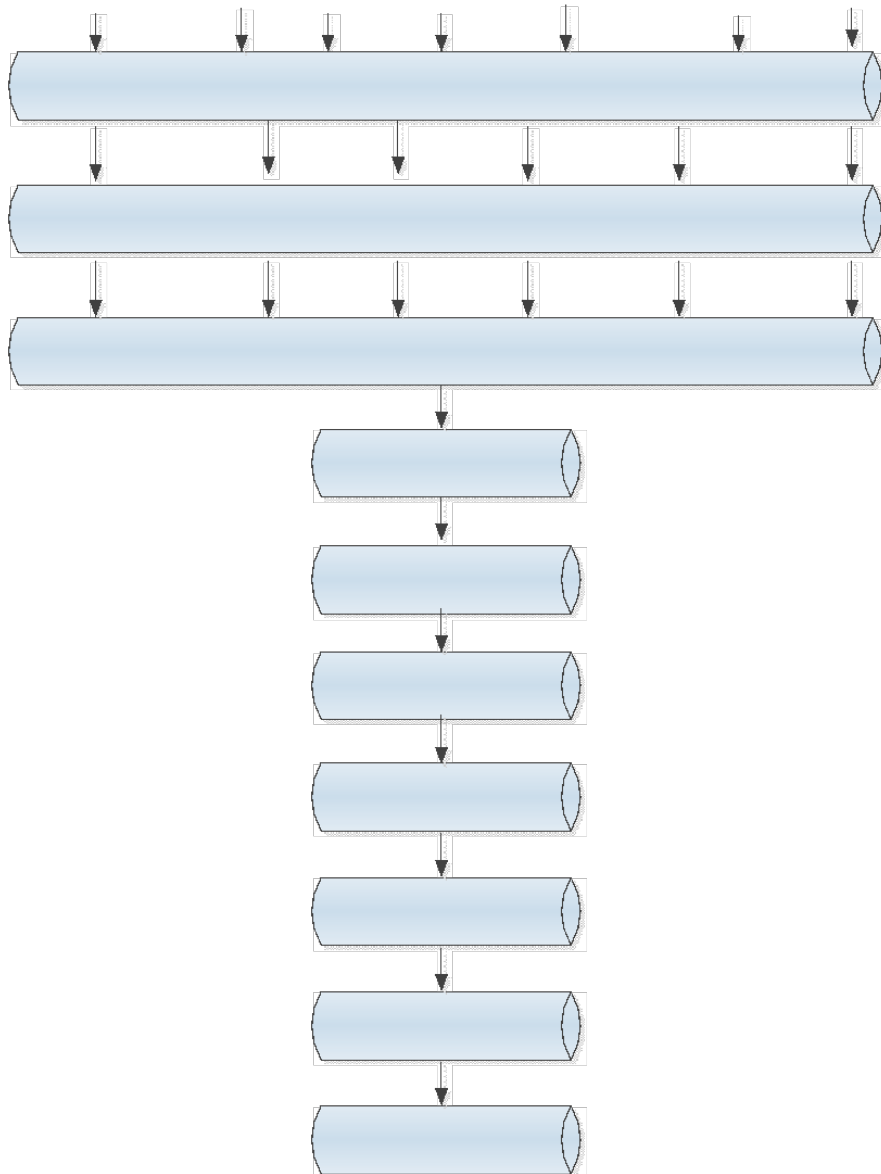
Slika 3.10. Pecivo s timjanom.

### Napomene!!!

- ❖ Dodatak aromatične majčine dušice (suhe tvari kao i eteričnog ulja) u receptu za kruh rezultirao je antifungalnim djelovanjem protiv *Penicilliuma* i *Aspergillus*.
- ❖ Dodatak timijana nije pokazao gljivično ili bakterijsko kvarenje tijekom četiri dana, što ukazuje na njegov potencijal kao konzervansa za kruh [Skendi I sur., 2020.].
- ❖ Inkorporiranjem aromatične biljke u suhom obliku in vitro, može dovesti do antifungalnog učinka u pekarskim proizvodima [Skendi i sur., 2020.].

### ***Kiflice od ružmarina***

Protokol korak po korak – Sastojci (slika 3.11)



**Slika 3.11.** Shema protokola priprave peciva od ružmarina [<https://www.gimmesomeoven.com/one-hour-rosemary-garlic-dinner-rolls/>]





Co-funded by  
the European Union



Slika 3.12. Rolice od ružmarina

### ***Muffini s mentom (slika 3.13)***

#### Protokol korak po korak – Sastojci

- Špinat, svježi - 2 šalice
- Kokosovo ulje, otopljeno - 1/2 šalice
- Umak od jabuka - 1 šalica
- Ekstrakt metvice - 1 tsp
- Jaja (ili jaja od lana) - 2
- Zobeno brašno - 1 3/4 šalice
- Prašak za pecivo - 1 1/2 žličice
- Soda bikarbona - 1/2 žličice
- Sol - 1/2 žličice
- Komadići čokolade - 1 šalica

(-muffins-naturally-colored-gluten-free-dairy-free-sugar-free-option-vegan-option/)



Slika 3.13. Mafini od mente



Co-funded by  
the European Union



### **Slatki kruh od lavande (slika 3.14)**

#### Protokol korak po korak – Sastojci

- Mlijeko - 3/4 šalice
- Sušeni cvjetovi lavande nasjeckani - 2 žlice
- Pšenično brašno - 2 šalice
- Prašak za pecivo - 1 1/2 žličice
- Sol - 1/4 žličice
- Maslac omekšao - 6 žlica
- Šećer - 1 šalica
- Jaja – 2
- Jednostavna glazura
- Šećer u prahu - 1 šalica
- Ekstrakt vanilije - 1/2 žličice
- Sok od limuna - 1/2 žlice

Mlijeko - 1 1/2 žlica [<https://www.aliikulalavender.com/lavender-tea-bread/>]

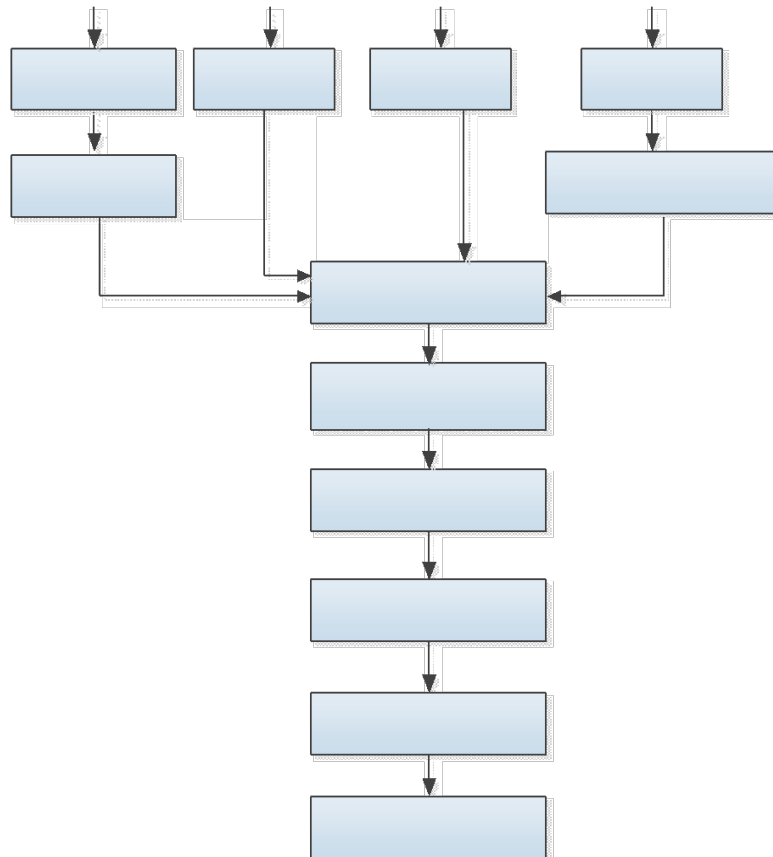


**Slika 3.14.** Slatki kruh od lavande



### *Keksi s klinčićima*

#### Protokol korak po korak – Sastojci (slika 3.15)



**Slika 3.15.** Shematski protokol pripreme keksa s klinčićima  
[<https://www.bbcgoodfood.com/recipes/clove-sugar-cookies>]



**Slika 3.16.** Keksi s klinčićima



### 3.4. Ljekovito bilje kao antimikrobna sredstva u pekarskim proizvodima

Ljekovito bilje se u pekarstvu koristi kao začin, za poboljšanje okusa i mirisa proizvoda, ali i kao antimikrobno sredstvo protiv štetnih mikroorganizama u pekarskim proizvodima. Kruh i pekarski proizvodi sklone su kvarenju plijesni (nakon nekoliko dana skladištenja) i da bi se izbjegla ova pojava potrebni su konzervansi za hranu ili pakiranje u modificiranoj atmosferi.

Najčešće vrste plijesni koje se pojavljuju u pekarskim proizvodima su: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Neurospora* i *Mucor*, a *Penicillium* se identificira kao najčešći izvor kvarenja kruha.

Nekoliko vrsta eteričnih ulja, posebno ona iz obitelji *Lamiaceae* i *Umbellifere*, spominju se kao antimikrobna sredstva u pekarskoj industriji, što rezultira proizvodom s produljenim rokom trajanja i povećanom sigurnošću.

Rok trajanja pekarskih proizvoda koji se čuvaju na sobnoj temperaturi ograničen je na 3-4 dana i pod utjecajem je mikrobnog kvarenja uzrokovanog plijesnima, uglavnom *Penicillium* sp. i druge gljive (*Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* ili *Rhizopus*). *Origanum vulgare* zahvaljujući svom kemijskom sastavu pomaže u produljenju roka trajanja, nutritivnih svojstava mnogih proizvoda, poput kruha i pekarskih proizvoda, žitarica.

Dva antifungalna elementa prisutna u eteričnim uljima, karvakrol i eugenol, mogu se smatrati snažnim antifungalnim agensima. Eterična ulja imaju antifungalna svojstva. Poznato je da ulja timijana, cimeta i klinčića inhibiraju gljivice kvarenja, dok su ulja naranče, kadulje i ružmarina imala samo zanemariv učinak (slika 3.17).



Co-funded by  
the European Union



**Slika 3.17.** Majčina dušica, cimet i klinčić korišteni u pekarskim proizvodima

Rizik za ljudsko zdravlje predstavlja činjenica da kontaminacija gljivicama uzrokuje stvaranje mikotoksina s hepatotoksičnim, kancerogenim djelovanjem.

Mikotoksini su sekundarni metaboliti gljivica koji izazivaju akutne i kronične toksične učinke kod ljudi i životinja. Istovremena kontaminacija proizvoda na bazi žitarica višestrukim mikotoksinima je sve više prijavljena, uključujući hranu koju obično konzumiraju djeca.

Najvažnije skupine mikotoksina su:

- Aflatoksini (AFLA)
- Ochratoxin A (OTA)
- Trihoteceni (deksinivalenol DON, nivalenol)
- Zearalenon (ZEA)
- Fumonizini (FUMO)

Mikotoksini se mogu naći u kruhu, žitaricama za doručak, pecivima.

- Preradom se može samo smanjiti broj mikotoksina, a ne njihova potpuna eliminacija
- Pokazalo se da neke tradicionalno korištene biljke pokazuju svojstva toksična za gljive



- Ljekovite biljke kao što su: *Occimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus*, *Xylopi aethiopica*, *Monodera myristica*, *Sizygium aromaticum*, *Cinnamomum verum* i *Piper nigrum* učinkovite su u inhibiciji stvaranja nesorbinske kiseline, prekursora u procesu sinteze aflatoksina.
- Prirodni pripravci emulzija na bazi eteričnih ulja korišteni su kao antifungicidi u pekarstvu.
- Potrebna su daljnja istraživanja za razvoj zajedničkih strategija za kontrolu i prevenciju razvoja gljivica i mikotoksina u pekarskim i slastičarskim proizvodima.

### 3.5. Djelovanje ljekovitog bilja protiv patogenih bakterija koje prevladavaju u prehrambenoj industriji

Sprječavanje kvarenja hrane i pojave patogena koji uzrokuju trovanje hranom obično se postiže upotrebom kemijskih dodataka koji imaju niz negativnih učinaka, uključujući: štetnost kemijskih spojeva za ljudsko zdravlje, pojavu kemijskih ostataka u hrani i hranidbenom lancu i stjecanje otpornosti mikroba na korištene kemikalije.

Kao rezultat ovih negativnih čimbenika, važnije je nego ikad pronaći prirodnu, zdravu i sigurnu alternativu konzervansima. Već neko vrijeme biljni ekstrakti koriste se za sprječavanje trovanja hranom i konzerviranje hrane.

Neki od izazova s kojima se suočavaju proizvođači kruha uključuju produljenje roka trajanja smanjenjem užeglosti i smanjenjem mikrobnog kvarenja, jer te promjene dovode do kvarenja kruha i drugih pekarskih proizvoda. Kako bi se prevladale te poteškoće i produljio rok trajanja, koriste se komercijalno dostupni antioksidansi i kemijski konzervansi kao što su inhibitori plijesni.

Razna eterična ulja mogu zaustaviti razvoj opasnih klica u kruhu, produžujući im vijek trajanja i poboljšavajući njihovu sigurnost, poput majčine dušice, cimeta, origana, limunske trave itd.

Većina jestivih ljekovitih biljnih dijelova sadrži tragove hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, dvije vrste fenolnih kiselina.

Zbog svog potencijala kao prirodnih konzervansa hrane, agensa za poboljšanje okusa i dekontaminatora, biljna eterična ulja privlače veliko zanimanje u prehrambenoj industriji jer su također općenito priznata kao sigurna – GRAS (slika 3.18).



Co-funded by  
the European Union



Slika 3.18. Hidroksibenzojeva i hidroksicinamenska kiselina

### Literatura

Bassiouny SS, Hassanien FR, Abd El-Razik Ali F, El-Kayati Sohair M. Efficiency of antioxidants from natural sources in bakery products. *Food Chemistry* 1990.; 37 (4): 297-305.

Calderón Bravo H, Vera Céspedes N, Zura-Bravo L, Muñoz LA. Basil Seeds as a Novel Food, Source of Nutrients and Functional Ingredients with Beneficial Properties: A Review. *Foods* 2021.; 10(7):1467

Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Herak Ćustić M, Satovic Z. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods - a review. *Czech J. Food Sci* 2016.; 34(5):377-390.

Dhillon G, Kaur Amarjeet. Effect of Oregano Herb on Dough Rheology and Bread Quality. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* 2013.; 40-44.

Lim HS, Park SH, Ghafoor K, Hwang SY, Park J, Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated in South Korea. *Food Chemistry* 2011.; 124(4):1577-1582.

Rivera G, Bocanegra-García V, Monge A. Traditional plants as source of functional foods: a review *Plantas tradicionales como fuente de alimentos funcionales: una revisión. CyTA - J. Food* 2010.; 8:159–167.

Sik B, Kovács K, Lakatos E, Kapcsándi V, Székelyhidi R. Increasing the functionality of sponge cakes by mint, and cocoa powder addition. *Heliyon*. 2023.; 9(9): e20029.

Skendi A, Katsantonis DN, Chatzopoulou P, Irakli M, Papageorgiou M. Antifungal Activity of Aromatic Plants of the Lamiaceae Family in Bread. *Foods*. 2020.; 9(11):1642.

Sriti J, Bettaieb I, Bachrouch O, Talou T, Marzouk B. Chemical composition and antioxidant activity of the coriander cake obtained by extrusion. *Arabian Journal of Chemistry* 2019.; 12(7): 1765-1773.



Co-funded by  
the European Union



Valková V, Ďúranová H, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, Kačániová M. In Vitro Antimicrobial Activity of Lavender, Mint, and Rosemary Essential Oils and the Effect of Their Vapours on Growth of *Penicillium* spp. in a Bread Model System. *Molecules* 2021.; 26(13):3859.

<https://vituperio.com/roasted-garlic-sage-sourdough-bread/>

<https://thegreekfoodie.com/greek-bread-with-oregano-and-olive-oil/>

[https://www.sidechef.com/recipes/8333/no\\_knead\\_thyme\\_dinner\\_rolls/](https://www.sidechef.com/recipes/8333/no_knead_thyme_dinner_rolls/)

<https://www.gimmesomeoven.com/one-hour-rosemary-garlic-dinner-rolls/>

<https://www.milehighmitts.com/mint-chocolate-chip-oat-muffins-naturally-colored-gluten-free-dairy-free-sugar-free-option-vegan-option/>

<https://www.aliikulalavender.com/lavender-tea-bread/>

<https://www.bbcgoodfood.com/recipes/clove-sugar-cookies>

<https://www.swissbake.in/blog/unlocking-the-potential-role-of-herbs-in-professional-baking>





## Poglavlje 4. Trenutačni trendovi i metode za in vitro procjenu biološke aktivnosti (CO - UMFVBT)

### 4.1. Uvod

*In vitro* testovi temeljeni na stanicama predstavljaju prvi korak u pretkliničkim istraživanjima koji se primjenjuju kao ključni alat u probiru biološke aktivnosti kandidata za nove lijekove. Štoviše, *in vitro* studije nude relevantne podatke o njihovom potencijalnom mehanizmu djelovanja (signalni putovi) i njihovoj toksičnosti. Navedene su druge prednosti u vezi s upotrebom staničnih linija kao *in vitro* modela, kako slijedi: (i) uključuju vremenski i troškovno učinkovite metode, (ii) modeli su "kontrolirani" (uglavnom u slučaju jednoslojnih kultura), i (iii) u literaturi je dostupno više standardiziranih tehnika [Capula i sur., 2019].

Osim prednosti korištenja *in vitro* modela i testova temeljenih na stanicama, identificirano je nekoliko čimbenika koji bi mogli utjecati na rezultate, dovodeći do nepouzdanih podataka, stoga se **moraju uzeti u obzir neka osnovna načela** pri dizajniranju i izvođenju *in vitro* eksperimenata [Capula i sur., 2019], kao:

#### 1) Odabir odgovarajuće stanične linije

Prije dizajniranja *in vitro* eksperimenta, obvezno je odabrati vrstu staničnih linija koje se smatraju prihvatljivim modelima za navedeni cilj istraživanja.

Stanične linije mogu se nabaviti: (i) unutar kuće (zahtijevaju autentifikaciju, detaljne kliničke informacije i eksplicitnu oznaku stanica), (ii) nabavom iz drugih laboratorija (zahtijevaju karantenu, autentifikaciju i karakterizaciju kako bi se potvrdile njihove specifične značajke) ili (iii) kupnjom od odobrenih staničnih banaka (uključuju podatke o autentičnosti, rezultate testova kontaminacije mikroorganizmima i informacije o pohranjivanju stanične linije i metodi subkulture) [Geraghty i sur., 2014].

**Važno!!! Sve stanične linije korištene u eksperimentima moraju biti provjerene i bez zagađivača!!!**

**Priznate zbirke staničnih kultura/banke stanica:** American Type Culture Collection (ATCC) ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)); CellBank Australia ([www.cellbankaustralia.com](http://www.cellbankaustralia.com)); Coriell Cell Repository (<http://ccr.coriell.org>); Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)); Europska zbirka kultura životinjskih stanica (ECACC) ([www.phe-culturecollections.org.uk](http://www.phe-culturecollections.org.uk)); Nacionalni instituti za biomedicinske inovacije, zdravlje i prehranu, Japanska zbirka istraživačkih bioresursa (JCRB) (<https://cellbank.nibiohn.go.jp/english>); Jedinica NIH-a za matične stanice (<https://stemcells.nih.gov/NIH-Stem-Cell-Research>);



Co-funded by  
the European Union



RIKEN Gene Bank (<https://web.brc.riken.jp/en/>), UK Banka matičnih stanica (UKSCB) (<https://nibsc.org/ukstemcellbank>); WiCell ([www.wicell.org](http://www.wicell.org)) [Geraghty i sur., 2014].

### **Vrste staničnih kultura i staničnih linija:**

**Kultura stanica** je izraz koji se koristi za opisivanje održavanja ili uzgoja stanica in vitro, uključujući kulturu pojedinačnih stanica. Stanične kulture mogu biti:

- *primarne kulture* – dobivaju se izravno iz izrezanog tkiva i kultura bilo kao kultura eksplantata ili nakon cijepanja u suspenziju jedne stanice putem enzimske digestije
- *kontinuirane kulture* – formiraju se od jedne vrste stanica koje se mogu uzastopno razmnožavati u kulturi bilo ograničenim brojem staničnih dioba ili neograničeno dugo.

**Stanična linija** potječe iz primarne kulture i rezultat je prve uspješne subkulture.

Stanične linije se mogu klasificirati kao:

- *primarne stanice* - dobivaju se izravno iz ljudskog tkiva i poznate su kao "konačne" jer njihova proliferacija prestaje nakon ograničenog broja staničnih dioba
- *transformirane stanice* – mogu se razviti prirodno ili genetskom manipulacijom, a poznate su i kao besmrtne stanične linije
- *samoobnavljajuće stanice* – imaju sposobnost diferencijacije u niz drugih tipova stanica; primjeri ove vrste stanica: embrionalne matične stanice, neuralne i intestinalne matične stanice, inducirane pluripotentne matične stanice [Seegeritz i Vallier, 2017.; Coecke i sur., 2005.].

### **2) Odabir odgovarajućeg otapala za ispitivane spojeve:**

- neodgovarajuće otapalo može utjecati na stabilnost lijeka što dovodi do netočnog određivanja koncentracije
- odabrano otapalo ne smije biti toksično za stanice u konačnoj korištenoj koncentraciji [Capula i sur., 2019.]

### **3) Koncentracija lijeka ispitivanih spojeva**

- treba testirati široki raspon koncentracija kada se provodi probir novih spojeva, nakon čega slijedi uski raspon nakon što se identificira koncentracija koja je izazvala odgovor [Capula i sur., 2019.].

### **4) Izloženost lijeku/trajanje liječenja**

- trajanje tretmana in vitro uvjetima mora odgovarati in vivo situaciji
- također treba uzeti u obzir metabolizam ispitivanog lijeka [Capula i sur., 2019.]



**5) Gustoća nasađivanja i vrijeme analize** – ovisi o staničnoj liniji [Capula i sur., 2019.]. Prije početka rada sa staničnim linijama, preporučuje se poznavanje sljedećih temeljnih aspekata:

- ❖ stanične linije utjelovljuju stanice koje imaju sposobnost produljene proliferacije *in vitro* i mogu se zadržati serijskim supkulturama (pasiranjem)
- ❖ konačne stanične linije mogu se supkulturirati više puta, ali nakon određenog broja pasaža (60-70 udvostručenja stanične populacije) postižu stanje starenja i prestaju se razmnožavati; mogu se održavati dobro okarakterizirani, ali se mogu pojaviti promjene u njihovoj morfologiji kako se približavaju starenju
- ❖ kontinuirane stanične linije mogu se beskonačno supkultivirati; potječu iz tumora ili normalnog embrionalnog tkiva; pokazuju visoku stabilnost tijekom dugotrajnih prolaza *in vitro*, ali ipak mogu pretrpjeti značajne i nepovratne promjene [Coecke i sur., 2005.].

**Napomena!!!**Preporuča se za sve vrste staničnih linija da imaju krioprezervirane zalihe ranih stanica!!!

- ❖ faze rasta normalnih stanica su:
  - **lag faza** – faza nakon nasađivanja kada se stanice ne dijele, samo se prilagođavaju uvjetima kulture; ovisi o fazi rasta stanične linije u vrijeme prolaza i o gustoći nasađivanja
  - **logaritamska (log) ili eksponencijalna faza rasta** – karakterizirana je eksponencijalnim rastom stanica koji traje dok se ne zauzme cijela ploča ili koncentracija stanica ne pređe kapacitet medija za rast; smatra se da je stanična populacija u ovom trenutku najodrživija; je odgovarajuća faza za procjenu staničnih funkcija i određivanje vremena udvostručavanja populacije; također se preporučuje provesti postupak subkulture (prekasno provođenje pasaže može dovesti do prenapučenosti stanica, apoptoze i starenja)
  - **plato ili stacionarna faza** – populacija stanica postaje konfluentna i proliferacija se usporava; to je faza kada su stanice najosjetljivije na ozljede
  - **faza opadanja** – karakterizirana je povećanom smrću stanica i smanjenjem broja stanica sposobnih za život zbog prirodnog napredovanja staničnog ciklusa.
- ❖ *in vitro* starost stanične kulture može se definirati pomoću:
  - **broja prolaza** – broj puta kada je stanična linija subkultivirana/pasirana



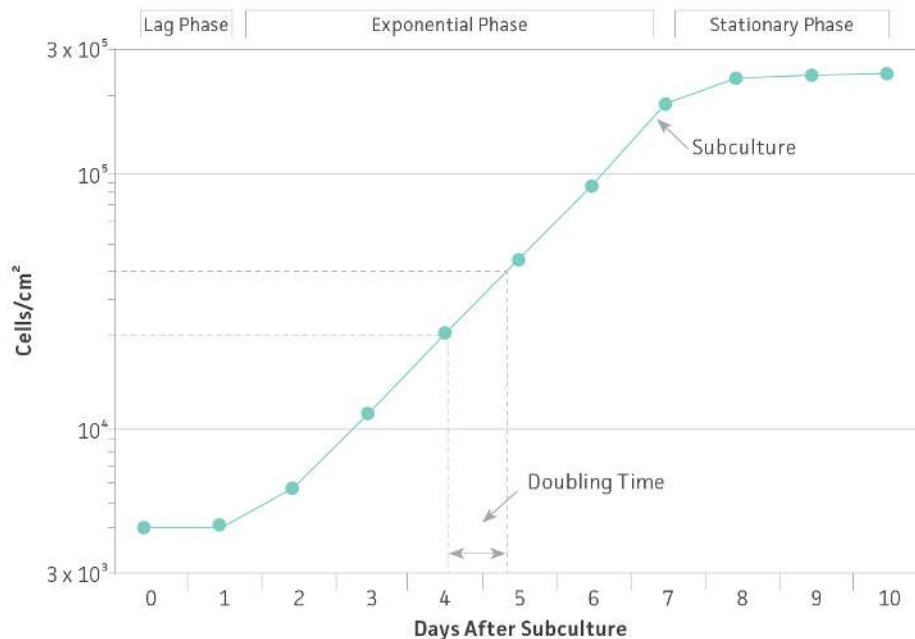
- o **vremena udvostručavanja populacije (DT)** – vrijeme potrebno kulturi da udvostruči brojnost

$$DT = T \ln 2 / \ln(X_e / X_b),$$

Gdje je T vrijeme inkubacije u bilo kojoj jedinici

X<sub>b</sub> je broj stanica na početku vremena inkubacije

X<sub>e</sub> je broj stanica na kraju vremena inkubacije [ATCC - Animal Cell Culture Guide].



**Slika 4.1.** Primjer krivulje rasta stanica u kulturi. Preporuča se provesti postupak subkulture kada su stanice u logaritamskoj (eksponencijalnoj) fazi rasta [ATCC - Vodič za kulturu životinjskih stanica].

U sljedećim odjeljcima bit će dano nekoliko smjernica u vezi s koracima uključenim u pripremu stanične linije za 2D stanične testove od trenutka primanja materijala iz stanične banke do dodavanja ispitivanih spojeva. Protokol se odnosi na adherentne stanice sisavaca uzgojene u jednom sloju.

## 4.2. Priprema stanične linije za stanične testove

### 4.2.1. Opća pravila za sigurnost u laboratoriju za kulturu stanica

- ❖ Rad u laboratoriju smije obavljati samo obučeno osoblje.
- ❖ Osoblje bi uvijek trebalo nositi osobnu zaštitnu opremu (laboratorijske kute i ogrtače, kape, navlake za cipele, rukavice, zaštitne naočale) pri ulasku u laboratorij i skinuti je pri izlasku.



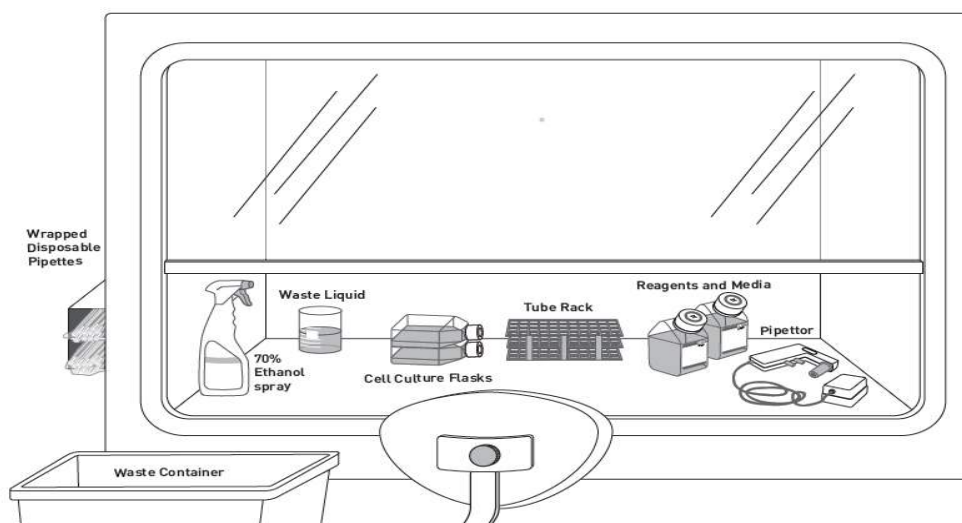
Co-funded by  
the European Union



- ❖ Ne preporučuje se izlaganje kože u otvorenim cipelama, kratkim hlačama i suknjama.
- ❖ U laboratoriju za kulturu stanica zabranjeno je konzumiranje hrane, pića, skladištenje namirnica, pušenje, nanošenje kozmetike ili rukovanje kontaktnim lećama.
- ❖ Mobiteli se ne smiju koristiti tijekom rada u laboratoriju za kulturu stanica.
- ❖ Široke dijelove odjeće (npr. šalove, viseće ogrlice) treba skinuti prije početka rada, a kosu svezati.
- ❖ Sve radne površine moraju se dekontaminirati prije i poslije pokusa, te odmah nakon bilo kakvog izlivanja ili prskanja potencijalno zaraznog materijala odgovarajućim dezinficijensom. Laboratorijska oprema mora se redovito čistiti, čak i ako nije kontaminirana.
- ❖ Svi laboratorijski predmeti koji su bili u kontaktu s potencijalno zaraznim ili opasnim agensima moraju se dekontaminirati prije i nakon rada s njima.
- ❖ Radne površine treba temeljito dezinficirati etanolom (EtOH) 70% prije i poslije upotrebe.
- ❖ Za sterilno rukovanje, ruke i radna područja moraju se uvijek obrisati EtOH 70%, a sve vanjske tikvice, boce s medijima, ploče ili drugi spremnici moraju biti obrisani EtOH 70% prije nego što se unesu u poklopac stanične kulture.
- ❖ Medij za rast stanica i druge reagense ne treba izljevati izravno iz boca ili bočica kako bi se izbjegla kontaminacija; treba koristiti sterilne serološke pipete.
- ❖ Ruke treba oprati prije napuštanja laboratorija za kulturu stanica.
- ❖ Službenik za sigurnost u laboratoriju trebao bi biti obaviješten o izlaganju ili izlivanju zaraznih ili opasnih agenasa kako bi dao savjet o prikladnoj strategiji za zadržavanje i dekontaminaciju [Segeritz i Vallier, 2017.; Osnove kulture stanica Gibco; ATCC - Vodič za kulturu životinjskih stanica; ECACC priručnik].



Co-funded by  
the European Union



**Slika 4.2.** Primjer rasporeda organizacije stanične kulture [Gibco Cell Culture Basics].

#### 4.2.2. Tablica s ključnim resursima za odmrzavanje/subkultiviranje/krioprezervaciju stanične linije

**Tablica 1.** Materijali i oprema potrebni za korake odmrzavanja/subkultiviranje i krioprezervaciju stanične kulture

Stanična linija	Proizvođač
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testirana stanična linija</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, US</li> <li>• The European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC), Salisbury, UK</li> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> </ul>
Reagensi/Kemikalije	Proizvođač
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medij za rast stanične kulture (specifičan za svaku staničnu liniju)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, US</li> <li>• The European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC), Salisbury, UK</li> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• PAN-Biotech GmbH, Bayern, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fetalni goveđi serum (FBS/FCS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ATCC, Manassas, US</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• PAN-Biotech GmbH, Bayern, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Specifični dodaci za rast stanica (ovisno o staničnoj liniji)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ATCC, Manassas, US</li> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiotička otopina za kulturu stanica (ovisno o staničnoj liniji)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ATCC, Manassas, US</li> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trypsin/EDTA (TE) otopina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trypan plavo otopina 0.4%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etanol 70% (za dezinfekciju)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chimopar SA, Bucharest, Romania</li> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfatno puferirana fiziološka otopina (PBS), pH=7,4 za kulturu stanica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimetil sulfoksid (DMSO)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> <li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O (bez pirogena)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li> </ul>

\* Napomena: mogu se koristiti i ekvivalentni reagensi/kemikalije drugih dobavljača.

Potrošni materijal	Proizvođač
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tikvica za kulturu stanica (75 cm<sup>2</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tikvica za kulturu stanica (25 cm<sup>2</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ploče s 96 jažica (ravno dno) (Eppendorf, Cyto-one)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li> <li>• Starlab Schweiz AG, Switzerland</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Falcon epruvete za centrifugu (15 mL)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Falcon epruvete za centrifugu (50 mL)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf epruvete (1.5 mL, 2 mL, 5 mL)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Stalci za epruvete</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Krioviala (2 mL)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Nastavci za pipete (tips)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sterilne serološke pipete (10 mL, 25 mL)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eppendorf, Hamburg, Germany</li><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sterilne Pasteurove pipete</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li><li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Spremnici reagensa za višekanalno pipetiranje</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li><li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Countess™ komorna stakalca za brojanje stanica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Komora za brojanje po Neubauer-u</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Brojač stanica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Merck KGaA, Darmstadt, Germany</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Spremnici za otpad</li></ul>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Trajni marker</li></ul>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Olovka</li></ul>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sterilne rukavice</li></ul>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Rukavice za rukovanje tekućim dušikom</li></ul>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Laboratorijska osobna zaštitna oprema (laboratorijska kuta i ogrtači, kapa, navlake za cipele, štitnici za lice, zaštitne naočale ili naočale)</li></ul>	





Co-funded by  
the European Union



\* Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni potrošni materijali drugih dobavljača. Sav potrošni materijal mora biti sterilan kada se koristi za kulturu stanica.

Oprema/oznaka	Proizvođač
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mikrobiološki sigurnosni ormar (Microflow ABS Class II Cabinet ABS 1500 CLS2-MK2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bioquell UK LTD</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Inkubator za kulturu stanica (Binder CB-170)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Invertirani mikroskop s faznim kontrastom i fluorescencijom (Olympus IX73 and Cytation 1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Olympus, Tokyo, Japan</li> <li>BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Vodena kupelj (Raypa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>R. Espinar, S.L., Spain</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifuga (Boeco S-8)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Boeco, Hamburg, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifuga s modulom za zamrzavanje (Hermle Centrifuge Z 326 K)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hladnjak (4°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Arctic, Romania</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Zamrzivač (-20°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Arctic, Romania</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Zamrzivač (-80°C) (Ultra Low Temperature Freezer MDF-U3386S)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sanyo, Osaka, Japan</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Spremnik dušika (MVE Cryosystem 750)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>MVE Biological Solutions, GA 30107</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Komora za brojanje stanica (Neubauer komora)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neubauer Hemacytometer</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Automatski brojač stanica (Countess II FL Automated Cell Counter)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipeta s podesivim volumenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eppendorf, Hamburg, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Višekanalna pipeta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eppendorf, Hamburg, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Set za pipetiranje (Easypet® 3)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eppendorf, Hamburg, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Analytical scale (Sartorius CP 324S)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sartorius, Göttingen, Germany</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mr. Frosty spremnik za zamrzavanje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Autoklav (Pol-EKO SLW 53)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>POL-EKO®, Wodzisław Śląski, Poland</li> </ul>

\* Napomena: može se koristiti i ekvivalentna oprema drugih dobavljača.



#### 4.2.3. Pojedinih metode (korak po korak)

**Opće napomene!!!** Za svaku stečenu staničnu liniju treba slijediti protokol koji preporučuje proizvođač!!! Sve otopine i pribor koji dolaze u dodir sa stanicama moraju biti sterilni!!! Osim ako nije drugačije navedeno, sve postupke treba provoditi u sterilnim uvjetima laminarnog protoka, stanice treba držati u vlažnim inkubatorima na 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> i 95 % vlažnosti, a cijeli medij za rast treba prethodno zagrijati u vodenoj kupelji. na 37°C 30 min!!! Svi predmeti koji će biti uneseni u napu laminarnog protoka moraju se obrisati EtOH 70%!!! Tijekom svih koraka protokola, osoblje mora nositi osobnu zaštitnu opremu!!!

##### A. Smjernice za uzgoj - postupak odmrzavanja zamrznutih stanica po primitku

🕒 **Vrijeme 30 min – 1 sat**

- 1) pripremite kompletan medij za rast specifičan za staničnu liniju u skladu s tehničkim podacima i prethodno ga zagrijte u vodenoj kupelji na 37°C (**!!! Medij se priprema u aseptičnim uvjetima u laminaru!!!**)
- 2) stavite sterilnu epruvetu za centrifugiranje (15 mL Falcon epruveta) u poklopac laminarnog protoka i dodajte 10 mL toplog cjelovitog medija za rast u epruvetu (**!!! Napišite na epruvetu trajnim markerom naziv stanične linije!!!**)
- 3) pripremite odgovarajuću sterilnu tikvicu za kulturu stanica (25 cm<sup>2</sup>) dodavanjem 10 mL cjelovitog medija za rast stanica (**!!! Ako se u podatkovnom listu preporučuje drugačiji volumen medija, tada treba slijediti upute proizvođača! !!**). Vrsta tikvice za kulturu stanica ili količina medija za rast mogu ovisiti o stanici. Na pločici treba postojanim markerom ispisati: datum postupka odmrzavanja, naziv/šifru stanične linije, broj pasaže i ime osobe koja je izvršila postupak.
- 4) premjestite kriovijalu koja sadrži zamrznute stanice kupljene/dobivene iz spremnika za pohranu (suhi led ili tekući dušik) u toplu vodenu kupelj postavljenu na 37°C (**!!! Koristite zaštitne rukavice i štitnik za lice u slučaju rukovanja tekućim dušikom !!!**)

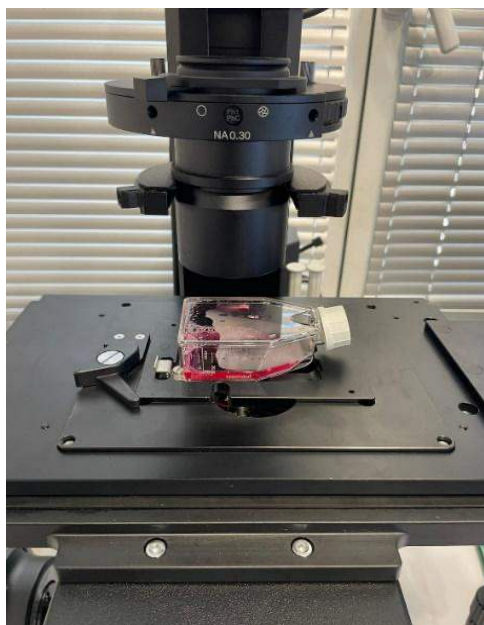
**Bilješka!!!** Kriovijalama sa zamrznutim stanicama treba rukovati jednom po jednom; ne otapajte dvije ili više krioviala odjednom!!!

- 5) držite kriovijalu u vodenoj kupelji < 1 minute i otopite sadržaj laganim vrtenjem sve dok u bočici ne ostane malo leda
- 6) prebacite kriovijalu u poklopac laminarnog protoka i obrišite je 70% EtOH prije otvaranja
- 7) prenesite otopljene stanice iz krioviale **kap po kap** u prethodno pripremljenu epruvetu centrifuge (2. korak). Lagano vrtite epruvetu dok dodajete kapi kako biste smanjili osmotski šok za stanice!!! Ovo je ključni korak i sa stanicama treba postupati što je moguće nježnije!!!



- 8) provjerite kriovijalu kako biste bili sigurni da je sav sadržaj uklonjen, a ako nije, isperite s 1 mL cjelovitog medija za rast specifičnog za staničnu liniju
- 9) centrifugirajte stanice na 1700 okretaja u minuti 5-10 minuta (ovisno o staničnoj liniji – podaci se nalaze u podatkovnoj tablici)
- 10) nježno odbacite supernatant u spremnik za otpad koji se nalazi u poklopcu s laminarnim protokom bez ometanja taloga stanica
- 11) nježno resuspendirajte talog u 1-2 mL cjelovitog medija za rast i premjestite suspenziju u prethodno pripremljenu tikvicu za kulturu stanica (korak 3). Lagano ljuljajte ploču s jedne strane na drugu i naprijed-natrag (!!! medij ne smije ući u čep!!!) kako biste ravnomjerno rasporedili stanice po ploči i inkubirajte na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>.

**Bilješka!!!** Preporuča se slikanje stanica odmah nakon odmrzavanja, 24 i 48 sati i kada se postigne 70-80% konfluencije (Slika 4.3)!!!



**Slika 4.3.** Procjena izgleda stanica pomoću invertnog mikroskopa nakon postupka odmrzavanja stanica.



### !!! Savjeti za rješavanje problema!!!

Problem	Reason	Solution
No viable cells after thawing stock	Cells were stored incorrectly	Obtain new stock and store in liquid nitrogen. Keep the cells in liquid nitrogen until thawing.
	Home made freezer stock is not viable	Freeze cells at a density recommended by the supplier.
		Use low-passage cells to make your own freezer stocks.
		Follow procedures for freezing cells exactly as recommended by the supplier. Note that the freezing procedure recommended in this handbook is a general procedure provided as a guideline only.
		Obtain new stock.
	Cells were thawed incorrectly	Follow procedures for thawing cells exactly as recommended by the supplier. Note that the thawing procedure recommended in this handbook is a general procedure provided as a guideline only.
		Make sure that you thaw the frozen cells quickly, but dilute them slowly using pre-warmed growth medium before plating.
Thawing medium is not correct	Use the medium recommended by the supplier. Make sure the medium is pre-warmed.	
Cells are too dilute	Plate thawed cells at high density as recommended by the supplier to optimize recovery.	
Cells not handled gently	Freezing and thawing procedures are stressful to most cells. Do not vortex, bang the flasks to dislodge the cells (except when culturing insect cells), or centrifuge the cells at high speeds.	
Glycerol used in the freezing medium was stored in light (if applicable)	If stored in light, glycerol is gets converted to acrolein, which toxic to cells. Obtain new stock.	
Cells grow slowly	Growth medium is not correct	Use pre-warmed growth medium as recommended by the supplier.
	Serum in the growth medium is of poor quality	Use serum from a different lot.
	Cells have been passaged too many times	Use healthy, low passage-number cells.
	Cells were allowed to grow beyond confluency	Passage mammalian cells when they are in the log-phase before they reach confluence.
	Culture is contaminated with mycoplasma	Discard cells, media, and reagents. Obtain new stock of cells, and use them with fresh media and reagents.

**Slika 4.4.** Potencijalna rješenja za rješavanje problema koji se javljaju tijekom postupka odmrzavanja stanične linije [Gibco Cell Culture Basics].

## B. Subkultiviranje adherentnih staničnih linija sisavaca

🕒 **Vrijeme 30 min – 1 sat**

Kada stanice dostignu odgovarajuću konfluenciju (70-80%), mora se primijeniti protokol subkulture, kako slijedi:

- 12) pripremite sterilnu Falcon epruvetu – 15 mL i broj boca sa staničnom kulturom potreban za nasađivanje. I Falcon epruveta i tikvice za kulturu stanica moraju biti označene (datum postupka potkulture, naziv/šifra stanične linije, broj pasaža, ime osobe koja je izvršila postupak)
- 13) uzmite tikvicu sa stanicama iz inkubatora i provjerite morfologiju stanica pomoću invertnog mikroskopa



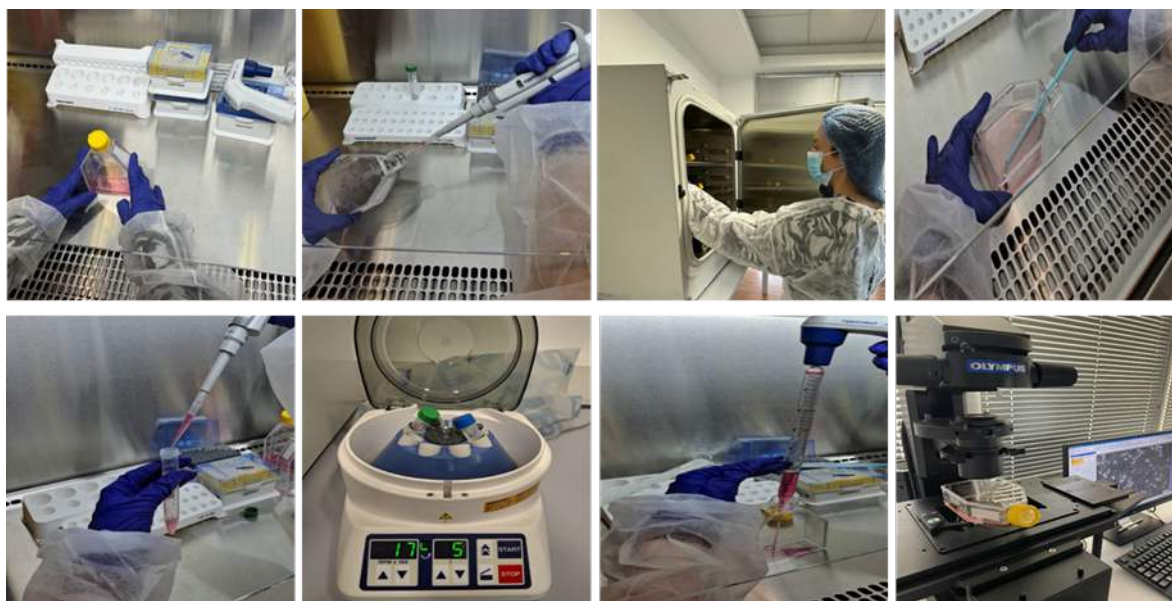
**Bilješka!!!** Preporuča se slikanje stanica odmah nakon odmrzavanja, 24 i 48 sati i kada se postigne 70-80% konfluencije!!!

- 14) odbacite stari medij za rast iz tikvice stanične kulture pomoću vakuumske pumpe ili sterilne serološke pipete pričvršćene na pomagalo za pipetiranje (Easypet ® 3, Eppendorf)
- 15) isprati stanice prethodno zagrijanom fosfatnom puferском otopinom (PBS) bez  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  – 10 mL za tikvice stanične kulture od 75 cm<sup>2</sup> (T75) i 5 mL za stanične tikvice od 25 cm<sup>2</sup> (T25)!!! Otopinu PBS-a treba lagano dodati na suprotno mjesto tikvice gdje su stanice pričvršćene kako bi se spriječilo odvajanje stanica, i izvršite ispiranje tako da nekoliko puta njišete tikvicu naprijed-natrag!!! **Ako je poznato da su stanice jako pranjale, preporuča se ponoviti korak pranja!!!**

**Bilješka!!!** Ovaj korak pranja je obavezan kako bi se uklonili tragovi goveđeg seruma i drugih komponenti medija (kalcij, magnezij) koji inaktiviraju djelovanje enzima (Trypsin/EDTA otopina) koji se koristi za odvajanje sloja stanica!!!

- 16) odbaciti PBS
- 17) dodajte 3 mL otopine tripsina/EDTA (TE) (koncentracija otopine TE navedena je u podatkovnoj tablici koju ste dobili od proizvođača) za tikvicu T75 i 1,5 mL za tikvicu T25 i okrenite tikvicu kako biste ravnomjerno rasporedili otopinu TE
- 18) vratite tikvicu u inkubator na 2-10 minuta (vrijeme inkubacije ovisi o staničnoj liniji)
- 19) pregledajte stanice pod invertnim mikroskopom kako biste provjerili jesu li sve stanice odvojene i plutaju li. Kada se odvoji manje od 90% stanica potrebno je vrijeme inkubacije produžiti za nekoliko minuta, uz napomenu da se svakih 30 sekundi radi pretraga na odvajanje stanica!!! bočna strana tikvice može se nježno lupnuti kako bi se odvojile preostale slijepnjene stanice!!! (Slika 4.5).

**Bilješka!!!** Dugotrajno izlaganje stanica otopini Tripsin/EDTA može oštetiti receptore na površini stanice!!! Neutralizacija otopine tripsina/EDTA obavezna je prije sadnje stanica, inače se stanice neće pričvrstiti!!!



**Slika 4.5.** Slike koraka specifičnih za postupak tripsinizacije

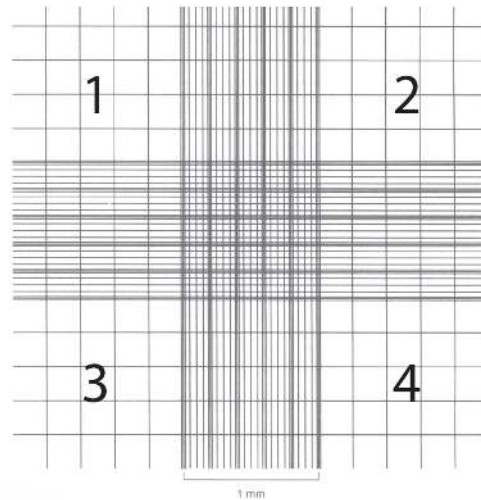
- 20) nakon odvajanja  $\geq 90\%$  stanica, treba dodati 10 mL prethodno zagrijanog cjelovitog medija za rast za bočicu T75 ili 5 mL za bočicu T25 kako bi se inaktivirao učinak otopine TE (ili dvostruki volumen dodane otopine TE, ovisno o preporuci proizvođač) i diseminirajte medij pipetiranjem preko sloja stanica nekoliko puta.
- 21) prebacite suspenziju stanica u Falcon epruvetu – 15 mL prethodno pripremljenu (korak 12) i centrifugirajte na 1700 okretaja u minuti 5 minuta na sobnoj temperaturi. *!!! Brzina i vrijeme centrifuge ovise o vrsti stanice!!!*
- 22) odbacite supernatant, resuspendirajte talog stanica u minimalnom (1 mL) volumenu prethodno zagrijanog cjelovitog medija za rast i uklonite količinu (10  $\mu\text{L}$ ) stanične suspenzije kako biste izvršili brojanje stanica
- 23) određivanje ukupnog broja stanica i postotka vitalnosti može se provesti pomoću hemacitometra (Neubauer komora) u prisutnosti otopine Trypan blue ili Countess II FL automatskog brojača stanica.

#### **Brojanje stanica pomoću hemacitometra – Neubauerove komore**

- ❖ očistite (pomoću EtOH 70%) i temeljito osušite hemacitometar i pokrovno stakalce prije upotrebe
- ❖ pripremite Eppendorf epruvetu (1,5 mL) označenu nazivom stanične linije dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  Trypan blue i 10  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije i promiješajte pipetiranjem



- ❖ prenesite 10  $\mu\text{L}$  mješavine u posebnu komoru hemacitometra i nježno stavite pokrovno stakalce kako biste izbjegli stvaranje mjehurića zraka
- ❖ stavite hemacitometar pod invertni mikroskop i pregledajte stanice pod velikim povećanjem (40x ili 100x)
- ❖ staviti u fokus kvadrante označene s 1, 2, 3 i 4, kao što se vidi na slici 4.6.



Slika 4.6. Kvadranti hemacitometra (Neubauerove komore)

- ❖ izbrojite broj stanica iz svakog kvadranta pomoću ručnog brojača stanica
- ❖ ukupan broj stanica može se izračunati pomoću sljedeće formule:

**Ukupan broj stanica/mL = prosjek broja stanica dobivenih brojanjem kvadranta X 10 000 X faktor razrjeđenja**

#### **Brojanje stanica pomoću automatiziranog brojača stanica Countess II FL**

- ❖ pripremite Eppendorf epruvetu (1,5 mL) označenu nazivom stanične linije dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  Trypan blue i 10  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije i promiješajte pipetiranjem
- ❖ prenesite 10  $\mu\text{L}$  mješavine u posebno stakalce za automatizirani brojač stanica Countess II FL
- ❖ umetnite stakalce u automatizirani brojač stanica Countess II FL i pritisnite gumb za čitanje
- ❖ za manje od 1 minute automatski će se dobiti ukupan broj stanica/mL i dalje će se množenjem izračunati broj stanica koji odgovara cijelom volumenu stanične suspenzije

Na primjer:

U 1 mL suspenzije .....1 400 000 stanica



Co-funded by  
the European Union



U suspenziji od 3 mL .....X stanica

X= 4 200 000 stanica

- 24) prenesite potrebni broj stanica (preporučena gustoća nasađivanja) u novu označenu tikvicu prethodno pripremljenu (korak 12) koja sadrži 10 mL cjelovitog medija za rast (T25) ili 18 mL – 20 mL medija (T75) i inkubirajte stanice prema preporučenim uvjetima
- 25) ponovite korake 12-24 svaki put kada to zahtijevaju karakteristike rasta stanične linije
- 26) sljedeći dan pregledajte tikvicu kako biste provjerili jesu li se stanice ponovno spojile i aktivno rastu
- 27) mijenjati podlogu za uzgoj kulture onoliko puta koliko je potrebno; 2-3 puta tjedno je uobičajeno za većinu stanica koje aktivno rastu.

### Korisni savjeti!!!

- ❖ *Prije početka postupka potkulture stanične linije provjerite list proizvođača*
- ❖ *Većinu cjelovitih medija za rast treba držati na 2°C do 8°C mjesec dana i povremeno ih pregledavati*
- ❖ *Zamrzavanje cijelog medija za rast se ne preporučuje jer bi dodani dodaci mogli precipitirati*
- ❖ *Ispitivanje kultura treba uključivati:*
  - *makroskopski pregled medija na postojanje mikrobne kontaminacije: promjene boje medija zbog promjena pH (žuta ili ljubičasta), zamućenje, čestice, male kolonije gljivica koje plutaju*
  - *mikroskopska procjena medija: male, svjetlucave crne točkice unutar prostora između stanica ukazuju na bakterijsku kontaminaciju; zaobljene i pupajuće čestice – kontaminacija kvascem; i tanki nitasti micelij – kontaminacija gljivama*
  - *mikroskopska procjena morfologije stanica: prirasle stanice trebaju biti čvrsto pričvršćene na površinu tikvice; neke zdrave stanice se zaokružuju i odvajaju tijekom mitoze i lomljive su, ali nakon mitoze ponovno se pričvršćuju; mrtve stanice se zaokružuju i plutaju u mediju te su manje i tamnije*
  - *kao referenca, slike različitih staničnih linija mogu se pronaći na web stranici proizvođača (npr. ATCC)*
- ❖ *redovita uporaba antibiotika za kulturu stanica se ne preporuča osim ako nisu izričito potrebni zbog njihove sposobnosti maskiranja kontaminacije mikoplazmom i*





rezistentnim bakterijama; ako se koriste, preporučuje se konačna koncentracija od 50 do 100 IU/mL penicilina i 50 do 100 µg/mL streptomycina.

- ❖ *serumi iz fetalnih i goveđih izvora obično se koriste za potporu rasta stanica u kulturi!!! Koristite serum koji je rigorozno testiran na uzročnike infekcije i dolazi samo iz SAD-a!!!*
- ❖ *nemojte dopustiti nakupljanje otpada u mikrobiološkim sigurnosnim ormarima ili inkubatorima kako biste izbjegli rizik od kontaminacije*
- ❖ *ne preporučuje se imati previše ljudi u laboratoriju odjednom*
- ❖ *izbjegavajte da stanične kulture postanu potpuno konfluentne; uvijek subkulturu na 70-80% konfluencije ili prema preporuci proizvođača*
- ❖ *izbjegavajte kontinuirano držanje staničnih linija u kulturi bez pravljenja zaliha u ranim pasażama i bez vraćanja na zamrznute zalihe*
- ❖ *održavajte vodenu kupelj čistom*
- ❖ *održavajte opremu kalibriranom*
- ❖ *odrediti redoviti program testiranja na mikoplazmu [Geraghty et al., 2014.; ATCC - Vodič za kulturu životinjskih stanica; ECACC priručnik].*

### !!! Savjeti za rješavanje problema!!! [ATCC - Vodič za kulturu životinjskih stanica]

**Tablica 2.** Moguća rješenja za probleme koji su se pojavili tijekom postupka potkulture.

Problemi	Potencijalni uzroci	Rješenja
Poteškoće s odvajanjem stanica nakon dodavanja otopine Tripsin/EDTA (TE).	Serum ili drugi dodaci prisutni u mediju inaktiviraju TE  Otopina TE bila je preslaba  Stanice su bile previše konfluentne i spojevi između stanica su vrlo uski	Isperite stanice dva puta otopinom PBS-a bez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> prije dodavanja otopine TE Koristite TE otopinu umjesto PBS-a za prvo pranje Koristite veće koncentracije enzima, veće koncentracije EDTA ili druge enzime Također se preporučuje inkubacija na 37°C kako bi se povećala aktivnost otopine TE Upotrijebite stanice prije nego što postanu konfluentne
Stvaranje nakupina stanica nakon disocijacije s TE otopinom	Odvajanje je bilo pregrubo i genomski DNK je oslobođen iz ozlijeđenih stanica Pipetiranje je bilo previše snažno Otopina TE bila je previše koncentrirana ili previše toksična	Dodajte sterilnu otopinu DNAze (1 mg/mL) u suspenziju stanica kako biste uništili formirane DNA lance Izvedite pipetiranje nježnije Koristite manje koncentriranu otopinu TE; smanjiti razdoblje inkubacije



	Agregacija stanica prije razrjeđivanja i resuspendiranja u mediju  Dugo i oštro centrifugiranje	Držite suspenziju stanica na ledu ako će doći do kašnjenja između trenutka odvajanja stanica i nasađivanja u novu tikvicu Nježno centrifugiranje
Problemi s ponovnim pričvršćivanjem stanica na bočicu	Postupak odvajanja bio je predug i utjecao je na pričvršne proteine sa stanične membrane Nedovoljno seruma ili drugih komponenti sa svojstvima pričvršćivanja u mediju za rast Otopina TE nije inaktivirana niti odbačena centrifugiranjem	Koristite tikvicu obloženu proteinima (kolagen, poli-L-lizin, fibronektin, želatina, itd.).  Dodavanje seruma i faktora pričvršćivanja u medij  Dodavanje seruma ili drugih inhibitora enzima, centrifugiranje i resuspendiranje stanica u svježem cjelovitog mediju za rast
Smanjena sposobnost preživljavanja	Postupak odvajanja bio je pregrub pH ili osmolalnost uravnotežene otopine soli koja sadrži otopinu TE je pogrešna Dugo razdoblje ostavljanja suspenzije odvojenih stanica na previsokoj koncentraciji stanica prije ponovnog zasijavanja Podloga za rast je oštećena	Ponašajte se nježnije pri izvođenju postupka Provjerite otvorenu bočicu i/ili upotrijebite novu  Držite stanice na ledu  Pripremite novu bocu cjelovitog svježeg medija za rast specifičnog za staničnu liniju koja se koristi

### C. Protokol krioprezervacije adherentne stanične linije sisavaca

#### 🕒 Vrijeme trajanja - 1 sat

**!!! Za izvođenje protokola krioprezervacije adherentne stanične linije sisavaca potrebno je slijediti korake 12-23 opisane za postupak potkulture stanične linije sisavaca!!!**

- 28) pripremiti označenu kriovijalu koja sadrži sljedeće podatke: datum krioprezervacije, naziv/šifra stanične linije, broj prolaza, broj stanica, ime osobe koja je izvršila zahvat (olovkom pisati na kriovijalu)
- 29) nakon brojanja stanica, suspenziju stanica centrifugirajte na 1700 okretaja u minuti 5 minuta.!!! Brzina i vrijeme centrifuge ovise o vrsti stanice!!!
- 30) resuspendirajte stanice u odgovarajućem volumenu medija za zamrzavanje (prema preporuci proizvođača) i dodajte 1710 µL stanične suspenzije u prethodno pripremljenu kriovijalu (korak 28) + 90 µL DMSO (dimetil sulfoksid – krioprotektivno sredstvo)
- 31) stavite kriovijalu u kutiju Nalgene Mr. Frosty koja je napunjena izopropanolom i prebacite Mr. Frostyja u zamrzivač na -80°C preko noći
- 32) Prebacite zamrznute stanice u tekući dušik



**Bilješka!!!** *Obavezno je da su stanice zdrave, bez zagađivača i u log fazi rasta!!!*

**Korisni savjeti!!!**

- ❖ Koristite kao krioprotektivno sredstvo DMSO – je li najčešće korišten, ako proizvođač drugačije preporučuje, slijedite njegove upute
- ❖ Da biste dobili zdrave stanice u fazi log rasta, preporuča se korištenje pre-konfluentnih kultura (stanice koje su ispod svoje maksimalne gustoće stanica) i mijenjanje medija kulture 24 sata prije postupka krioprezervacije
- ❖ Alternativa mediju za zamrzavanje je: 70% bazalni medij + 20% FBS + 10% DMSO, ipak medij za zamrzavanje ovisi o vrsti stanice
- ❖ Smrznute stanice držane na temperaturi iznad  $-65^{\circ}\text{C}$  brzo će se oštetiti [ATCC - Vodič za kulturu životinjskih stanica; ECACC priručnik].

### 4.3. STANIČNE ANALIZE KORIŠTENJEM 2D STANICA

#### 4.3.1. Testovi vijabilnosti stanica

Provjera različitih skupina spojeva, uglavnom lijekova, u smislu procjene njihovog utjecaja na staničnu proliferaciju ili citotoksičnog potencijala provodi se pomoću staničnih testova. Za procjenu broja živih stanica mogu se primijeniti različite metode, kao što su: tetrazolium test, rezazurin test, detekcija ATP-a, kao i protočna citometrija i snimanje visoke sadržajnosti [Riss i sur., 2016.].

Vijabilnost stanica je parametar koji se odnosi na broj vijabilnih/zdravih stanica u testnom uzorku i njegova se kvantifikacija često određuje u testovima toksičnosti, za probir odgovora stanica na različite lijekove ili kemikalije ili za povezivanje ponašanja stanice s brojem stanica [Kamiloglu i sur., 2020.]. Testovi stanične vijabilnosti prate različite stanične funkcije, kao što su: propusnost stanične membrane, metabolizam ili aktivnost enzima, proizvodnja ATP-a, adhezija stanice ili aktivnost usvajanja nukleotida [Adan i sur., 2016.; Kamiloglu i sur., 2020.]. Ovisno o mehanizmu djelovanja, testovi vijabilnosti stanica klasificirani su kao: (i) testovi isključenja boje (tripan plavo, eozin, kongo crveno i eritrozin B); (ii) kolorimetrijski testovi (MTT, MTS, WST-1, XTT, WST-8, LDH, sulfohodamin B (SRB), unos neutralnog crvenog (NRU)); (iii) luminometrijski testovi (ATP test i test vijabilnosti u stvarnom vremenu) i fluorometrijski testovi (Alamar blue i CFDA-AM test) [Aslanturk, 2017.; Adan i sur., 2016.; Kamiloglu i sur., 2020].

U narednim odjeljcima ovog vodiča bit će detaljno predstavljeno nekoliko testova vijabilnosti stanica kao što su tripan plavo, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide



(MTT) i Alamar blue testovi, metode koji se često koriste u našem laboratoriju za kulturu stanica.

### **Metoda tripan plavo**

Tehnika isključivanja boje razvijena od 1975. za određivanje broja živih stanica i još uvijek se primjenjuje za potvrdu promjena u broju vijabilnih stanica nakon izlaganja lijeku ili toksičnom spoju. Ova metoda predstavlja višestruke prednosti kao što su jednostavnost, smanjeni troškovi i podaci o integritetu staničnih membrana [Aslanturk, 2017.; Kamiloglu i sur., 2020.].

**Princip metode:** Tripan plavo je velika negativno nabijena molekula koja ne prodire kroz netaknutu staničnu membranu živih stanica, dok su mrtve stanice propusne i obojene u plavo. Mrtve stanice s citoplazmom obojenom u plavo promatraju se svjetlosnim mikroskopom i mogu se izbrojati ručnim ili automatskim brojačem stanica [Aslanturk, 2017.; Kamiloglu i sur., 2020.].

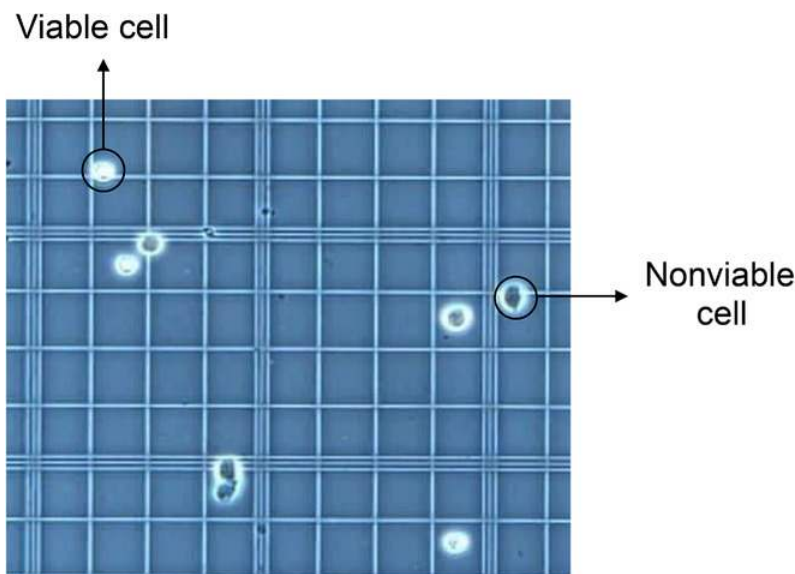
### **Protokol - korak po korak**

🕒 **Vrijeme trajanja 2-4 dana (ovisno o trajanju liječenja – 24/48/72 h)**

*!!!Za određivanje vijabilnosti adherentne stanične linije sisavaca korištenjem testa tripan plavo, moraju se pratiti koraci 12-22 opisani za Postupak subkultiviranja stanične linije sisavaca! !!!  
Tablica ključnih resursa opisana za odmrzavanje/subkultiviranje/krioprezervacija stanične linije potrebna je za ovaj test!!!*

Ukratko, potrebno je izvršiti sljedeće korake:

- (i) očistite (koristeći 70% EtOH) i temeljito osušite hemocitometar i pokrovno stakalce prije upotrebe
- (ii) pripremite Eppendorf epruvetu (1,5 mL) označenu imenom stanične linije dodajući 50  $\mu$ L tripan plavog i 10  $\mu$ L stanične suspenzije, te ih pomiješajte pipetiranjem
- (iii) prebacite 10  $\mu$ L smjese u specifičnu komoru hemocitometra i pažljivo postavite pokrovno stakalce kako biste izbjegli stvaranje mjehurića zraka
- (iv) postavite hemocitometar pod invertni mikroskop i pregledajte stanice pri visokom povećanju (40x ili 100x)
- (v) usredotočite se na kvadrante označene s 1, 2, 3 i 4, kao što je prikazano na slici 4.7.
- (vi) izbrojite sve stanice iz svakog kvadranta koristeći ručni brojač stanica



**Slika 4.7.** Princip tripan pavo testa [Kamiloglu i sur., 2020.].

(vii) izbrojite stanice obojene plavom bojom iz svakog kvadranta koristeći ručni brojač stanica

(viii) vijabilnost stanica (%) trebala bi biti barem 95 % u slučaju zdravih stanica u fazi logaritamskog rasta.

Postotak vijabilnih stanica može se izračunati pomoću sljedeće formule [Kamiloglu i sur., 2020.]:

$$\begin{aligned} & \% \text{ Viable cells} \\ &= \frac{\text{Total number of viable cells per milliliter of aliquot}}{\text{Total number of cells per milliliter of aliquot}} \times 100. \end{aligned}$$

Ukupan broj stanica/mL = prosjek broja stanica dobivenih brojanjem kvadranta x 10 000 x faktor razrjeđenja.

### **MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij bromid test**

MTT test predstavlja prvu tehniku za procjenu vijabilnosti stanica razvijenu za format sa 96 jažica, koja se široko koristi u istraživanjima kao test za procjenu vitalnosti/proliferacije stanica [Kamiloglu i sur., 2020.].

**Princip metode:** ovaj test temelji se na mjerenju aktivnosti sukcinat dehidrogenaze (poseban enzim poznat kao Kompleks II koji je dio Krebsovog ciklusa): žuta tetrazolium sol podliježe kemijskoj reakciji, rezultirajući kristalima obojenim u ljubičasto. Ovi kristali se zatim otapaju, a dobivena otopina se analizira kako bi se izmjerila apsorbancija [Aslantürk, 2017.].



Reagens MTT ili 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij-bromid) je mono-tetrazolium sol koja može prolaziti kroz staničnu membranu i unutarnju membranu mitohondrija živih stanica, a zatim se reducira na formazan od strane metabolički aktivnih stanica. Produkt formazana MTT tetrazoliuma nakuplja se kao netopljivi talog, a formazan se mora otopiti prije mjerenja apsorpcije. Redoks kemijska reakcija koja se proizvodi u ovom testu omogućuje kolorimetrijsko mjerenje intrastaničnog proizvodnje formazana i sada se koristi s velikom primjenom [Ghasemi i sur., 2021.].

**Materijali potrebni za provedbu testa uz ključne resurse opisane za odmrzavanje /subkultiviranje /krioprezervaciju stanične linije:**

- Komplet za proliferaciju stanica I (MTT) Roche (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Pozitivna kontrola za izazivanje smrti stanica - SDS (0,05% u vodi bez pirogena, konačna koncentracija – 0,005%) ili Triton-X 100
- Cytation 5 Multimode Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- Negativna kontrola – netretirane stanice
- Testni spojevi
- Odabir prikladnog otapala za otapanje testnih spojeva

**Napomena: Također se mogu koristiti ekvivalentni reagensi, potrošni materijali i oprema drugih dobavljača.**

**Protokol - korak po korak**

🕒 **Vrijeme trajanja: 2-4 dana (ovisno o vremenskom razdoblju tretmana – 24/48/72 h)**

- (i) priprema specifičnih cjelovitih medija za rast za svaku staničnu liniju prema protokolu proizvođača
- (ii) subkultura stanične linije u bocama za stanične kulture (koraci 12-22 iz protokola subkultiviranja)
- (iii) brojanje stanica pomoću hemacitometra ili automatiziranog brojača stanica Countess II FL (korak 23 iz protokola subkultiviranja)
- (iv) nasađivanje stanica pri odgovarajućoj gustoći nasađivanja (specifično za svaku staničnu liniju) -  $1 \times 10^4$  stanica/jažici/ 200  $\mu$ L cjelovitog medija za rast u ploče s 96 jažica
- (v) mikroskopski pregled konfluencije stanica kako bi se započela faza stimulacije/tretmana
- (vi) pripremanje razrjeđenja testnih spojeva u sterilnim Eppendorf epruvetama od 1,5 mL označenim nazivom/kodom i koncentracijom spoja

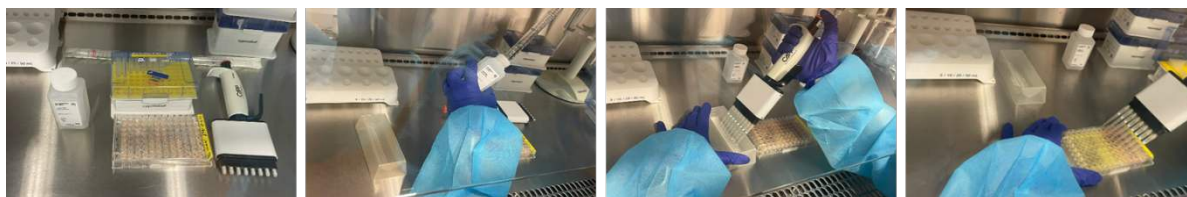


- (vii) priprema otopine pozitivne kontrole (SDS ili Triton-X 100 – ovisno o preporuci proizvođača)
- (viii) oblikovanje uzorka za ploču koja odgovara pokusu (procjena različitih koncentracija testnih spojeva) koji uključuje: negativnu kontrolu (netretirane stanice), pozitivnu kontrolu (SDS ili Triton-X 100 otopine), praznu jažicu (jažica samo za medij za rast), serije razrjeđenja za ispitivane spojeve i serije razrjeđenja za otapalo
- (ix) kada stanice dostignu odgovarajuću konfluenciju (70-80%), stari medij se odstranjuje i zamjenjuje svježim rastom koji sadrži testne spojeve (triplikate), odnosno razrjeđenja otapala.
- (x) inkubacija ploče 24/48/72 h (ovisno o cilju istraživanja) na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>
- (xi) nakon perioda inkubacije, medij se ukloni i u sve jažice doda se 100 µL kompletnog medija za rast
- (xii) morfologija stanica provjerava se pomoću invertnog mikroskopa, a snimaju se slike kako bi se uočile moguće promjene nakon primjene tretmana
- (xiii) volumen od 10 µL MTT otopine (komplet 1 MTT) dodaje se u svaku jažicu, a stanice se inkubiraju 3 sata na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> (slika 4.8).



**Slika 4.8.** Dodavanje kompleta-1 MTT u svaku jažicu (10 µl/jažici)

- (xiv) nakon razdoblja inkubacije od 3 sata, 100 µl pufera za solubilizaciju (komplet 2) dodaje se u svaku jažicu kako bi se otopili kristali formazana i ploča se inkubira još 30 minuta zaštićena od svjetla na sobnoj temperaturi (Slika 4.9)



**Slika 4.9.** Dodavanje kompleta-2 MTT u svaku jažicu (100 µl/jažici)



Co-funded by  
the European Union



- (xv) apsorbancija se očitava na 570 nm pomoću Cytation 5 Multimode Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD) (Slika 4.10).



**Slika 4.10.** Očitavanje apsorbancija na 570 nm.

- (xvi) Postotak vijabilnosti stanica izračunava se pomoću sljedeće formule [Kamiloglu i sur., 2020.], gdje je OD vrijednost apsorbancije izmjerena:

$$\begin{aligned} \% \text{ Viability} \\ &= \frac{\text{Mean OD}_{\text{sample}}}{\text{Mean OD}_{\text{blank}}} \times 100. \end{aligned}$$

- (xvii) interpretacija podataka: vrijednosti apsorbancije koje su niže od kontrolnih stanica ukazuju na smanjenje brzine proliferacije stanica; obrnuto, viša brzina apsorbancije ukazuje na povećanje proliferacije stanica [MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K].

**!!! Savjeti za rješavanje problema!!!** [MTT testiranje stanične proliferacije ATCC® 30-1010K]





**Problem:** MTT Reagent is blue-green.

Cause	Remedy
Contamination with a reducing agent or cell/bacterial contamination.	Discard. Remove aliquots of new MTT Reagent using sterile technique.
Excessive exposure to light.	Store solution in the dark at 4°C.

**Problem:** Blanks (medium only) give high absorbance readings.

Cause	Remedy
The medium is contaminated with cells/bacteria/yeast (visible under microscope).	Discard. Check medium before plating. Use sterile technique for cell plating in biological hood. Use sterile 96-well plate.
The medium contains ascorbic acid.	Incubate plate in the dark. Find alternative medium if possible.

**Problem:** Absorbance readings too high.

Cause	Remedy
Cell number per well too high.	Decrease cell density at plating.
Contamination of culture with bacteria or yeast.	Discard. View wells prior to addition of MTT Reagent to check for contamination.

**Problem:** Absorbance readings are too low.

Cause	Remedy
Cell number per well is too low.	Increase cell density at plating.
Incubation time for reduction of MTT is too short. No purple color visible in cells when viewed under microscope.	Increase incubation time with MTT Reagent until purple color is evident inside cells when viewed under microscope. Longer incubation of up to 24 hours may be required for some cell types.
Incubation time for solubilization of formazan dye too short (intact cells with intracellular dye visible when viewed under the microscope).	Increase incubation time with Detergent Reagent or incubate at 37°C. View under microscope to ensure no crystals remain out of solution.
Cells not proliferating due to improper culture conditions or inadequate time of recovery after plating.	Check that culture conditions (medium, temperature, humidity, CO <sub>2</sub> , etc.) are appropriate. View cells periodically to check condition. Increase time in culture after plating for cell recovery.

**Problem:** Replicates have different values.

Cause	Remedy
Inaccurate plating or pipetting.	Increase accuracy of cell plating, check accuracy of pipette.

**Slika 4.11.** Savjeti za rješavanje problema preporučeni za MTT test.

### Alamar blue metoda

Ova tehnika je također poznata kao test redukcije resazurina. Resazurin je fenoksazin-3-on boja i netoksičan redoks indikator koji može prolaziti kroz stanične membrane. Ovaj se spoj može koristiti za određivanje broja živih stanica primjenom protokola sličnih onima koji koriste spojeve tetrayoliuma [Aslanturk, 2017.].

**Princip metode:** nakon ulaska u stanice, resazurin se reducira u resorufin. Resorufin je crvene boje i visoko fluorescentni spoj. Žive stanice kontinuirano pretvaraju resazurin u resorufin, što povećava ukupnu fluorescentnost i boju medija za kulturu stanica. Količina proizvedenog resorufina povezana je s brojem vijabilnih stanica [Aslanturk, 2017.].



### Protokol - korak po korak

- 🕒 **Vrijeme trajanja 2-4 dana (ovisno o vremenskom razdoblju tretmana – 24/48/72 h)**
- (i) priprema specifičnih cjelovitih medija za rast za svaku staničnu liniju prema protokolu proizvođača
  - (ii) subkultura stanične linije u bocama za stanične kulture (**koraci 12-22 iz protokola subkultiviranja**)
  - (iii) brojanje stanica pomoću hemacitometra ili automatiziranog brojača stanica Countess II FL (**korak 23 iz protokola subkultiviranja**)
  - (iv) nasađivanje stanica pri odgovarajućoj gustoći nasađivanja (specifično za svaku staničnu liniju) -  $1 \times 10^4$  stanica/jažici/ 200  $\mu$ L cjelovitog medija za rast u ploče s 96 jažica
  - (v) mikroskopski pregled konfluencije stanica kako bi se započela faza stimulacije/tretmana
  - (vi) pripremanje razrjeđenja testnih spojeva u sterilnim Eppendorf epruvetama od 1,5 mL označenim nazivom/kodom i koncentracijom spoja
  - (vii) priprema otopine pozitivne kontrole (SDS ili Triton-X 100 – ovisno o preporuci proizvođača)
  - (viii) oblikovanje uzorka za ploču koja odgovara pokusu (procjena različitih koncentracija testnih spojeva) koji uključuje: negativnu kontrolu (netretirane stanice), pozitivnu kontrolu (SDS ili Triton-X 100 otopine), praznu jažicu (jažica samo za medij za rast), serije razrjeđenja za ispitivane spojeve i serije razrjeđenja za otapalo
  - (ix) kada stanice dostignu odgovarajuću konfluenciju (70-80%), stari medij se odstranjuje i zamjenjuje svježim rastom koji sadrži testne spojeve (triplikate), odnosno razrjeđenja otapala.
  - (x) inkubacija ploče 24/48/72 h (ovisno o cilju istraživanja) na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>
  - (xi) nakon perioda inkubacije, medij se ukloni i u sve jažice doda se 100  $\mu$ L kompletnog medija za rast
  - (xii) morfologija stanica provjerava se pomoću invertnog mikroskopa, a snimaju se slike kako bi se uočile moguće promjene nakon primjene tretmana
  - (xiii) volumen od 10  $\mu$ L Alamar blue reagensa dodaje se u svaku jažicu, a stanice se inkubiraju 3 sata na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> (slika 4.8).
  - (xiv) apsorbancija se očitava na 570 i 600 nm [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf>]



Co-funded by  
the European Union



(xv) postotak vijabilnih stanica izračunava se pomoću sljedeće formule:

$$\text{Percentage of viable cells (\%)} = \left\{ \frac{(\epsilon_{OX})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \text{ of test agent dilution}}{(\epsilon_{OX})_{\lambda_2} A^{\circ}_{\lambda_1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} A^{\circ}_{\lambda_2} \text{ of untreated positive growth control}} \right\} \times 100,$$

Gdje:  $\epsilon_{OX}$  = molarni koeficijent apsorpcije oksidirane forme Alamar Blue (BLUE)

A = apsorbanca testnih jažica

$A^{\circ}$  = apsorbanca pozitivne kontrolne jažice (stanice bez ispitivanih spojeva)

$\lambda_1 = 570 \text{ nm}$  and  $\lambda_2 = 600 \text{ nm}$  [Iftode i sur., 2021.].

#### 4.3.2. Metode imunofluorescentnog bojenja za procjenu morfologije stanica

Imunofluorescencija je metoda bojenja poznata od 1950-ih, koja se smatra izvrsnim alatom u pretkliničkim eksperimentima, modernoj biologiji i srodnim područjima medicinsko-farmaceutskih istraživanja. Također se može opisati kao kombinacija morfološke tehnologije i tehnika imunofluorescencije za razvoj fluorescentnih stanica. Ova metoda omogućuje vizualizaciju više komponenti tkiva ili stanice (stanične jezgre, proteini, jezgrene kiseline ili druge stanične komponente). Među prednostima tehnike imunofluorescencije navodi se visoko pojačanje signala, ciljana specifičnost, visoka razlučivost i analitičke mogućnosti [Im i sur., 2019.].

Općenito, načelo postupka temelji se na upotrebi specifičnih fluorescentnih protutijela za promatranje utjecaja testnih uzoraka na ekspresiju staničnih markera.

U sljedećim odjeljcima bit će predstavljeno nekoliko testova primijenjenih za vizualizaciju imunofluorescentnim bojenjem jezgre i citoskeletnih karakteristika adherentnih kultiviranih stanica u prisutnosti ili odsutnosti specifičnog spoja/tretmana.

#### **Nuklearno bojanje**

##### **Hoechst 33342 bojanje**

Hoechst 33342 (2'-[4-etoksifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorid trihidrat) je stanično propusna boja koja se veže na adenin-timin (AT) sekvence dvolančane DNA, koja se intenzivno primjenjuje kao nuklearna boja s plavom fluorescencijom na 460-490 nm. Posebno je poznat po razlikovanju kondenziranih jezgri u apoptotičnim stanicama. Boja Hoechst 33342 koristi se za žive stanice i propusna je za stanice [Thermo Fisher Scientific Hoechst 33342 protokol].

**Princip metode:** nakon dodavanja u kulturu stanice, Hoechst 33342 boja ulazi u stanicu i koncentrira se u jezgri, omogućujući njezinu vizualizaciju u plavoj boji; smatra se pokazateljem



statusa jezgre i također se može koristiti za procjenu statusa staničnog ciklusa ili u testovima apoptoze.

Materijali potrebni za provođenje testa uz tablicu ključnih resursa opisanih za odmrzavanje/potkulturu/krioprezervaciju stanične linije:

- Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Pozitivna kontrola za induciranje apoptoze - otopina staurosporina (5  $\mu$ M; Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) ili nekroza Triton-X 100 (0,5%; Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- automatizirani mikroskop Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- Negativna kontrola – netretirane stanice
- Ispitivani spojevi
- Odabir odgovarajućeg otapala za solubilizaciju ispitivanih spojeva

**\* Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni reagensi, potrošni materijal i oprema drugih dobavljača.**

#### **Protokol korak po korak**

- (i) priprema specifičnog cjelovitog medija za rast za svaku staničnu liniju prema protokolu proizvođača
- (ii) subkultura stanične linije u bocama za stanične kulture (**koraci 12-22 iz protokola subkultiviranja**)
- (iii) brojanje broja stanica pomoću hemacitometra ili automatiziranog brojača stanica Countess II FL (**korak 23 iz protokola subkultiviranja**)
- (iv) nasađivanje stanica pri odgovarajućoj gustoći nasađivanja (specifično za svaku staničnu liniju) -  $1 \times 10^5$  stanica/jažici/ 1500  $\mu$ L potpunog medija za rast u ploče s 12 jažica
- (v) mikroskopski pregled konfluencije stanica kako bi se započela faza stimulacije/liječenja
- (vi) pripremanje razrjeđenja ispitnih spojeva u sterilnim Eppendorf epruvetama od 1,5 mL označenim nazivom/kodom i koncentracijom spoja
- (vii) priprema otopine pozitivne kontrole (5  $\mu$ M staurosporina i 0,5 % Triton-X 100 – ovisno o preporuci proizvođača)
- (viii) oblikovanje uzorka za ploču koja odgovara eksperimentu (procjena različitih koncentracija ispitnih spojeva) koji uključuje: negativnu kontrolu (netretirane



- stanice), pozitivnu kontrolu (5  $\mu$ M staurosporina i 0,5% otopine Triton-X 100), razrjeđenje serije za ispitivane spojeve i serije razrjeđenja za otapalo
- (ix) kada stanice dostignu odgovarajuću konfluenciju (70-80%), stari medij se odbacuje i zamjenjuje svježim rastom koji sadrži ispitivane spojeve, odnosno razrjeđenja otapala
- (x) inkubacija ploče 24/48/72 h (ovisno o cilju istraživanja) na 37°C i 5 % CO<sup>2</sup>.
- (xi) nakon isteka željenog vremena, medij kulture se odbaci iz svake jažice
- (xii) pripremljena otopina za bojenje (20 mM Hoechst matična otopina razrijeđena u PBS 1:2000) doda se u svaku jažicu u odgovarajućem volumenu (300 – 500  $\mu$ L) da pokrije stanice
- (xiii) ploča s jažicom se inkubira 5-10 minuta na mjestu zaštićenom od izravne svjetlosti na sobnoj temperaturi
- (xiv) nakon vremena inkubacije, otopina za bojenje se uklanja
- (xv) svaka jažica se zatim ispere 2-3 puta s 1500  $\mu$ L PBS otopine
- (xvi) posljednji korak je fotografiranje stanica pomoću invertnog mikroskopa ili posebnih uređaja za tu svrhu  
[<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/hoechst-33342-imaging-protocol.html>]

**Bilješka!!!** *Protokol bojenja Hoechst 33342 također se može izvesti u formatima ploča s 96 jažica ili 6 jažica uz napomenu da se broj ili nasađene stanice i volumeni reagensa moraju sukladno tome prilagoditi!!!*

#### **DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)**

DAPI se koristi u modernoj biologiji, u *in vitro* tehnikama, kao plava fluorescentna boja za DNK. Može se koristiti za analizu staničnih jezgri, kvantifikaciju apoptoze ili analizu temeljenu na DNK. Poznato je da boji fiksne stanice i da je nepropustan za stanice.

**Princip metode:** DAPI boja prolazi kroz intaktnu staničnu membranu i veže se na DNA niti koje se nalaze u jezgri i emitira plavu fluorescenciju. Može se koristiti za bojenje i živih stanica i fiksnih stanica (zahtijevaju fiksaciju i permeabilizaciju).

**Materijali potrebni za provođenje testa uz tablicu ključnih resursa opisanih za odmrzavanje/potkulturu/krioprezervaciju stanične linije:**

- DAPI otopina za bojenje (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

**Bilješka!!!** *Osnovna otopina DAPI (5 mg/mL) može se dobiti korištenjem deionizirane vode (diH<sub>2</sub>O) ili dimetilformamida (DMF) kao otapala. DAPI je slabo topljiv u vodi, pa potrebna*



sonikacija koliko je potrebno da se otopi. Osnovna otopina DAPI od 5 mg/mL može se čuvati na 2–6°C do 6 mjeseci ili na  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  dulje vrijeme!!!

- Pozitivna kontrola za induciranje apoptoze - otopina staurosporina (5  $\mu\text{M}$ ; Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) ili nekroza Triton-X 100 (0,5%; Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- automatizirani mikroskop Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- Negativna kontrola – netretirane stanice
- Ispitivani spojevi
- Odabir odgovarajućeg otapala za solubilizaciju ispitivanih spojeva

\* **Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni reagensi, potrošni materijal i oprema drugih dobavljača.**

#### **Protokol korak po korak**

- (i) priprema specifičnog cjelovitog medija za rast za svaku staničnu liniju prema protokolu proizvođača
- (ii) subkultura stanične linije u bocama za stanične kulture (**koraci 12-22 iz protokola subkultiviranja**)
- (iii) brojanje broja stanica pomoću hemacitometra ili automatiziranog brojača stanica Countess II FL (**korak 23 iz protokola subkultiviranja**)
- (iv) nasađivanje stanica pri odgovarajućoj gustoći nasađivanja (specifično za svaku staničnu liniju) -  $1 \times 10^5$  stanica/jažici/ 1500  $\mu\text{L}$  potpunog medija za rast u ploče s 12 jažica
- (v) mikroskopski pregled konfluencije stanica kako bi se započela faza stimulacije/liječenja
- (vi) pripremanje razrjeđenja ispitnih spojeva u sterilnim Eppendorf epruvetama od 1,5 mL označenim nazivom/kodom i koncentracijom spoja
- (vii) priprema otopine pozitivne kontrole (5  $\mu\text{M}$  staurosporina i 0,5 % Triton-X 100 – ovisno o preporuci proizvođača)
- (viii) oblikovanje uzorka za ploču koja odgovara eksperimentu (procjena različitih koncentracija ispitnih spojeva) koji uključuje: negativnu kontrolu (netretirane stanice), pozitivnu kontrolu (5  $\mu\text{M}$  staurosporina i 0,5 % otopine Triton-X 100), razrjeđenje serije za ispitivane spojeve i serije razrjeđenja za otapalo



- (ix) kada stanice dostignu odgovarajuću konfluenciju (70-80 %), stari medij se odbacuje i zamjenjuje svježim rastom koji sadrži ispitivane spojeve, odnosno razrjeđenja otapala
- (x) inkubacija ploče 24/48/72 h (ovisno o cilju istraživanja) na 37 °C i 5 % CO<sup>2</sup>.
- (xi) nakon isteka željenog vremena, medij kulture se odbaci iz svake jažice i stanice se isperu 2-3 puta s 1,5 mL PBS-a
- (xii) dodatak 300 nM otopine za bojenje DAPI/jažici u količini potrebnoj da pokrije sve stanice
- (xiii) ploča se inkubira do 5 minuta na mjestu zaštićenom od izravne svjetlosti
- (xiv) otopina za bojenje se aspirira
- (xv) stanice su isprane s PBS 2-3 puta
- (xvi) stanice se fotografiraju pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa ili Cytationa 1 [<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>]

**Bilješka!!!** *Protokol DAPI bojenja također se može izvesti u formatima ploča s 96 jažica ili 6 jažica uz napomenu da se broj ili nasađene stanice i volumeni reagensa moraju prilagoditi u skladu s tim!!!*

### **Bojenje citoskeleta**

Citoskelet je matrica koja podržava oblik i funkciju stanica koje obavljaju bitne uloge u transportu organela, diobi, pokretljivosti i signalizaciji, kao i u zdravlju stanica i procesima bolesti.

### **TexasRed™-X bojenje faloidinom na fiksnim stanicama**

Texas Red-X faloidin se koristi za kvantifikaciju F-aktina, boja je kompatibilna s drugim fluorescentnim bojama koje se koriste *in vitro*. Ova se metoda koristi za visokokontrastnu diskriminaciju bojenja aktina. Općenito, tekšaški crveni faloidin također se može istraživati u kombinaciji s drugim bojama za šira promatranja i analizu s većom specifičnošću.

**Princip metode:** Faloidin je biciklički peptid i veže se na F-aktin visokom selektivnošću što omogućuje vizualizaciju aktinskih vlakana u crvenoj fluorescenciji. Faloidin nije reagens koji propušta stanice, pa se preporučuje fiksacija i permeabilizacija stanica prije dodavanja boje Texas Red-X faloidin [[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777\\_Phalloidins\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf)].



**Materijali potrebni za provođenje testa uz tablicu ključnih resursa opisanih za odmrzavanje/potkulturu/kriokonzervaciju stanične linije:**

- Texas Red™-X Phalloidin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- automatizirani mikroskop Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- Negativna kontrola – netretirane stanice
- Ispitivani spojevi
- Odabir odgovarajućeg otapala za solubilizaciju ispitivanih spojeva

**\* Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni reagensi, potrošni materijal i oprema drugih dobavljača.**

**Protokol korak po korak**

- (i) priprema specifičnih cjelovitih medija za rast za svaku staničnu liniju prema protokolu proizvođača
- (ii) subkultura stanične linije u bocama za stanične kulture (koraci 12-22 iz protokola subkultiviranja)
- (iii) brojanje broja stanica pomoću hemacitometra ili automatiziranog brojača stanica Countess II FL (korak 23 iz protokola subkultiviranja)
- (iv) nasađivanje stanica ( $1 \times 10^4$  stanica/jažica/200  $\mu$ L) u crne ploče s 96 jažica s ravnim staklenim dnom i prozirnim jažicama
- (v) mikroskopski pregled konfluencije stanica kako bi se započela faza stimulacije/liječenja
- (vi) pripremanje razrjeđenja ispitnih spojeva u sterilnim Eppendorfovima epruvetama od 1,5 mL označenim nazivom/kodom i koncentracijom spoja
- (vii) izradu uzorka za ploču koja odgovara eksperimentu (procjena različitih koncentracija ispitivanih spojeva) koji uključuje: negativnu kontrolu (netretirane stanice), niz razrjeđenja za ispitivane spojeve i niz razrjeđenja za otapalo
- (viii) kada stanice dostignu odgovarajuću konfluenciju (70-80%), stari medij se odbacuje i zamjenjuje svježim rastom koji sadrži ispitivane spojeve, odnosno razrjeđenja otapala
- (ix) inkubacija ploče 24/48/72h (ovisno o cilju istraživanja) na 37°C i 5 % CO<sup>2</sup>.
- (x) nakon perioda inkubacije, medij kulture se ukloni i stanice se isperu s PBS dva puta





Co-funded by  
the European Union



- (xi) uzorak se fiksira u 3,7% otopini formaldehida bez metanola u PBS-u 15 minuta na sobnoj temperaturi - 100  $\mu$ L/jažici
- (xii) isprati 2x s PBS
- (xiii) inkubirajte uzorak u otopini za blokiranje koja sadrži 1% BSA u PBS-u otprilike 45 minuta na sobnoj temperaturi u volumenu od 100  $\mu$ L/jažici
- (xiv) uzorci se inkubiraju u otopini za bojenje 30-60 minuta na sobnoj temperaturi;
- (xv) isprati 2x s PBS;
- (xvi) ako je potrebno, dodajte DNA kontrast (za analizu jezgri). Na primjer, može se dodati DAPI bojenje (bojenje izvedeno prema koracima opisanim gore u odjeljku - DAPI bojenje);
- (xvii) Snimite stanice (adekvatno skladištenje ploča oko mjesec dana za konačne slike)

**Bilješka!!!** Ploče se mogu čuvati na 4°C Celzija i može se dodati konzervans; pohranjene ploče su zapečaćene posebnim ljepljivom i zatim omotane aluminijskom folijom!!!

### CellLight™ GFP Protokol bojenja tubulinom na živim stanicama

**Princip metode:** CellLight reagents contain fluorescent protein-signal peptide fusions targeting specific cellular structures, in the present case, tubulin fibers, for live-cell imaging applications. It can also be applied on fixed cells [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>].

**Materijali potrebni za provođenje testa uz tablicu ključnih resursa opisanih za odmrzavanje/potkulturu/kriokonzervaciju stanične linije:**

- CellLight™ Tubulin-GFP, reagens BacMam 2.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- automatizirani mikroskop Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- Negativna kontrola – netretirane stanice
- Ispitivani spojevi
- Odabir odgovarajućeg otapala za solubilizaciju ispitivanih spojeva

**\* Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni reagensi, potrošni materijal i oprema drugih dobavljača.**

### **Protokol korak po korak**

- (i) slijedite korake (i) – (ix) prethodno opisane za bojenje TexasRed™-X faloidinom



- (ii) izračunajte volumen CellLight®-a za broj stanica pomoću formule dane u protokolu proizvođača [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>]

$$\text{Volume of CellLight}^{\circledR} \text{ Reagent (mL)} = \frac{\text{number of cells} \times \text{desired PPC}}{1 \times 10^8 \text{ CellLight}^{\circledR} \text{ particles/mL}}$$

Where the number of cells is the estimated total number of cells at the time of labeling, PPC is the number of particles per cell, and  $1 \times 10^8$  is the number of particles per mL of the reagent.

For example, to label 40,000 cells with a PPC of 30:

$$\text{Volume of CellLight}^{\circledR} \text{ Reagent (mL)} = \frac{40,000 \times 30}{1 \times 10^8} = 0.012 \text{ mL (12 } \mu\text{L)}$$

- (iii) CellLight® reagens se miješa inverzijom da se dobije homogena otopina;  
(iv) prethodno izračunati volumen reagensa lagano se pomiješa s punim staničnim medijem za rast i doda u jažice sa stanicama  
(v) stanice se inkubiraju preko noći  
(vi) snimite slike stanica pomoću odgovarajuće opreme (automatski mikroskop Cytation 1/ Lionheart FX)

**Bilješka!!!** Ako je potrebno, jezgre stanica također se mogu obojiti s Hoechst 33342 (bojenje se izvodi prema koracima opisanim gore u odjeljku – Bojenje s Hoechst 33342).

#### 4.3.3. Metode za procjenu sposobnosti migracije stanica

##### **Scratch test**

Migracija stanica ima središnju ulogu u različitim temeljnim biološkim procesima, poput razvoja embrija, imunološke obrane, formiranja tkiva, zacjeljivanja rana, upale, kao i u napredovanju raka. Sposobnost stanica da migriraju naglašava njihovu sposobnost prilagodbe određenom okruženju u smislu ponovnog zauzimanja odgovarajućeg položaja i obavljanja svojih funkcija; međutim, oslabljena migracija stanica često se susreće u brojnim patologijama (upala, napredovanje raka, invazija i metastaze) ili nakon izloženosti različitim spojevima [Pijuan i sur., 2019.].

In vitro 2D testovi zacjeljivanja rana, poput Scratch testa (ogrebotinskog testa), predstavljaju izvrsne i pouzdane pristupe za proučavanje i praćenje migracijskog ponašanja stanica kao odgovor na različite podražaje (supstance od interesa) ili u različitim patologijama [Pijuan i sur., 2019.]. Kod zdravih stanica, zacjeljivanje rana često se koristi za promatranje migracijskog ponašanja stanica nakon tretiranja stanica spojevima od interesa. Kod bolesnih stanica, posebno stanica raka, metoda se koristi za procjenu utjecaja tretmana na sposobnost stanica da invadiraju i razviju metastaze.



Co-funded by  
the European Union



**Načelo metode:** ova metoda se koristi za mjerenje sposobnosti stanica da migriraju unutar određenog vremenskog okvira (24 h) nakon izlaganja različitim podražajima (spojevima koji se analiziraju zbog bioloških ili štetnih učinaka).

**Materijali potrebni za provođenje testa** uz tablicu ključnih resursa opisanu za odmrzavanje, podkultiviranje i krioprezervaciju stanične linije:

- Lionheart FX automatizirani mikroskop (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- BioTek AutoScratch alat za izradu rana (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)
- Ispitivani spojevi
- Odgovarajuće otapalo za otapanje ispitivanih spojeva

**\*Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni reagensi, potrošni materijal i oprema drugih dobavljača.**

### **Protokol- koraka po korak**

- nasadivanje stanica ovisno o staničnoj liniji prema protokolima proizvođača (**vidi korake 12-22 iz protokola za subkultiviranje**).
- prikladan broj stanica (ovisno o staničnoj liniji) uzgaja se u pločicama s 96 ili 24 jažica dok se ne postigne željena konfluencija (općenito 90-95%).
- izrada predloška za ploču prema eksperimentu (procjena različitih koncentracija ispitivanih spojeva) koji uključuje: negativnu kontrolu (neobrađene stanice), seriju razrjeđenja za ispitivane spojeve i seriju razrjeđenja za otapalo.
- kada se postigne željena konfluencija, stari medij se odbacuje, a linija ogrebotine se ručno crta (koristeći sterilan vrh pipete) ili automatski koristeći alat BioTek AutoScratch za izradu rana u sredini svake jažice.
- uklanjanje krhotina i nepričvrščenih stanica pranjem 2x s prethodno zagrijanim PBS-om.
- zamjena PBS-a svježim kompletnim rastvornim medijem koji sadrži spojeve od interesa i razrjeđenja otapala.
- inkubacija pločice 24 h na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
- tijekom cijelog postupka prati se razvoj stanica i snimaju slike kako bi se na kraju dodijeljenog vremena za eksperiment rezultati mogli analizirati.
- analiza podataka pomoću specifičnih bioinformatičkih alata.

**Napomene!!!**



- ❖ *Metoda ima za cilj procijeniti učinak različitih spojeva ili tvari na stanične linije; taj učinak može biti stimulirajući ili inhibirajući na proces migracije/invazije kultiviranih stanica.*
- ❖ *Za bolju analizu podataka, pločice se fotografiraju u različitim vremenskim točkama (0h, 3h, 8h i 24h) do kraja razdoblja tretmana.*
- ❖ *Ogrebotine se mogu izvoditi ručno ili automatski koristeći posebne uređaje za tu svrhu (auto-scratchers)(slika 4.12).*



Slika 4.12. Uređaj za izradu rana BioTek AutoScratch

#### 4.3.4. Testovi molekularne biologije za proučavanje mehanizama djelovanja **Reverzna transkripcija polimerazne lančane reakcije (RT-PCR)**

RT-PCR je laboratorijska tehnika koja se koristi za izradu višestrukih kopija genetske sekvence u svrhu analize. Ova metoda je poznata i kao reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom [<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/rt-pcr>].

**Princip metode:** Postupak određuje učinak koji uzorci za analizu imaju na ekspresiju gena na razini mRNA (messenger RNA) specifičnih markera, ovisno o predloženom eksperimentu. Ova tehnika procjenjuje promjene koje se mogu dogoditi u genu, kromosomu ili za aktivaciju gena, što često dovodi do dijagnoze patologije.

**Materijali potrebni za izvođenje testa, uz ključne resurse za odmrzavanje /subkultiviranje /krioprezervaciju stanične linije:**

- QuantStudio 5 Real-Time PCR sustav (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Tadvanced Biometra proizvodna linija (Analytik Jena AG, Göttingen, Njemačka)
- DS-11 spektrofotometar (DeNovix, Wilmington, DE, SAD)
- ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)



Co-funded by  
the European Union

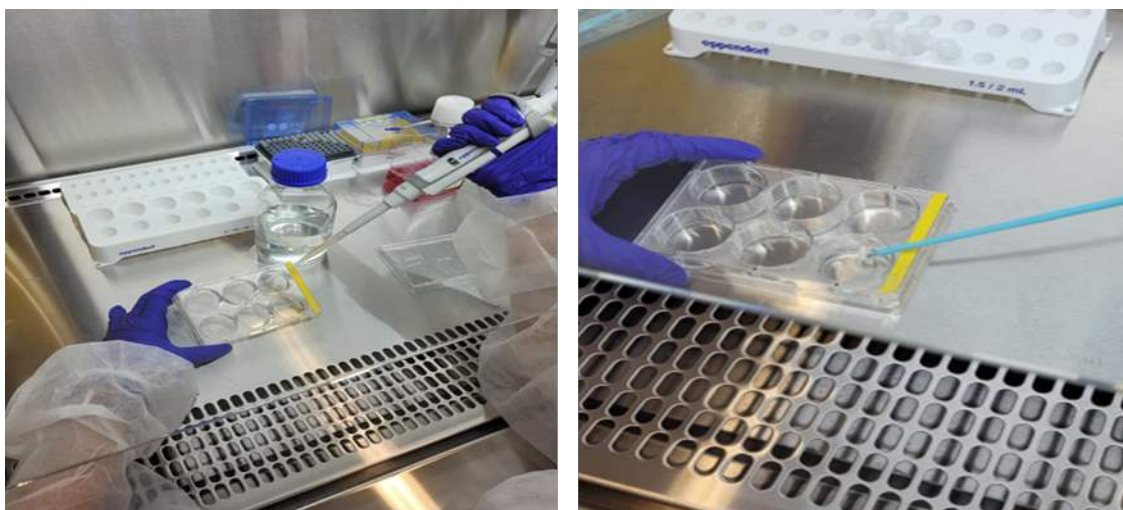


- peqGold RNAPure™ paket (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Njemačka) Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- Power SYBR-Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- Parovi primera (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SAD) PCR specifične pločice s 96 jažica ili epruvete (Eppendorf, Hamburg, Germany, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- Ispitivane tvari
- Odabir odgovarajućeg otapala za otapanje ispitivanih tvari

**Napomena: Također se mogu koristiti ekvivalentni reagensi, potrošni materijali i oprema drugih dobavljača.**

#### **Protokol- korak po korak**

- (i) nasađivanje stanica prema protokolima proizvođača, ovisno o staničnoj liniji (**vidi korake 12-22 iz protokola za subkultiviranje**)
- (ii) uzgajanje odgovarajućeg broja stanica (ovisno o staničnoj liniji) u pločama s 6 jažica do postizanja željene konfluencije
- (iii) izrada predloška za ploču u skladu s eksperimentom (procjena različitih koncentracija ispitivanih tvari) koji uključuje: negativnu kontrolu (netretirane stanice), serije razrjeđenja za ispitivane tvari i serije razrjeđenja za otapalo
- (iv) stimulacija stanica tvarima od interesa, nakon čega slijedi inkubacija pod optimalnim uvjetima tijekom željenog vremena - 24, 48 ili 72 sata
- (v) korak izolacije RNA, koji se provodi na ledu prema sljedećim uputama:
  - a. Stari kultivacijski medij se uklanja, a stanice se ispiraju s 2 mL PBS-a.
  - b. Stanice se odvajaju s ploče koristeći strugač stanica u 1 mL PBS-a (slika 4.13).



**Slika 4.13.** Priprema stanica za korak izolacije RNA

c. Svaka suspenzija formirana u jažicama prenosi se u prethodno pripremljene Eppendorf epruvete od 1,5 mL (označene imenom/kodom uzorka i datumom postupka, te omotane samoljepljivom trakom) i drži na ledu do dodavanja suspenzije (slika 4.14).



**Slika 4.14.** Aspiracija suspenzije stanica

- d. Suspenzija se centrifugira pri 12,000xg tijekom 5 minuta na 4°C.
- e. Supernatant se uklanja, a talog se pohranjuje na -20°C ako se izolacija RNA ne provodi odmah.
- f. Izolacija RNA provodi se koristeći peqGold RNAPure™ paket (ili drugi ekvivalentni set), prema uputama proizvođača.



Co-funded by  
the European Union



g. Talog dobiven nakon izolacije RNA resuspendira se u 50  $\mu$ L DEPC-vode, zagrijava 30 minuta na 55 °C (kako bi se povećala topljivost RNA), a zatim se mjeri koncentracija RNA pomoću DS-11 spektrofotometra.

(vi) sljedeći korak je sinteza komplementarne DNA uz pomoć specifičnog kompleta (Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit).

(vii) RT-PCR postupak obuhvaća:

- Odabir odgovarajućih parova primera
- Pripremu smjese koja uključuje primere, dobivenu cDNA i SYBR-Green PCR Master Mix
- Pipetiranje smjese u pločicu
- Provođenje PCR reakcije korištenjem QuantStudio 5 Real-Time PCR sustava

(viii) Analiza rezultata.

#### 4.4. Pokus na stanicama koristeći 3D (trodimenzionalne) modele

2D *in vitro* modeli, koji predstavljaju monoslojne adhezivne kulture stanica, najčešće se koriste u istraživanjima. Međutim, zbog ograničenja ravne geometrije, ovi modeli slabije predviđaju ponašanje u živom organizmu. Stoga, noviji 3D *in vitro* modeli služe kao most između *in vitro* i *in vivo* modela, jer bolje reproduciraju fiziološke i patofiziološke karakteristike izvornih tkiva, simulirajući trodimenzionalnu strukturu u organizmu. 3D strukture, zahvaljujući svojoj prostornoj konfiguraciji, bolje prikazuju kontakt između stanica i između stanica i matrice u prirodnom mikrokruženju unutar organizma. Ovi modeli omogućuju realističan prikaz prijenosa plinova, hranjivih tvari i signalisirajućih molekula. Osim toga, 3D *in vitro* modeli mogu rekonstruirati složenu strukturu tumora i očuvati njegove genotipske i fenotipske karakteristike, uključujući heterogenost tumora [Leonard i Godin, 2016.; Jubelin i sur., 2022.; Mu i sur., 2023.]. 3D modeli koje koristimo u našem laboratoriju za farmakotoksiološka istraživanja uključuju 3D rekonstruirani ljudski epidermis (RHE) i EpiDerm tkiva tvrtke MatTek Corporation (Slovačka). Ovi 3D rekonstruirani EpiDerm modeli su gotovi sustavi koji se sastoje od normalnih ljudskih epidermalnih keratinocita (NHEK) uzgojenih na specijalno pripremljenim umetnutim podlogama za kulturu tkiva [<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>].

3D EpiDerm tkiva prikazuju ljudsku epidermalnu strukturu, uključujući proliferativni bazalni sloj, bodljikavi i zrnasti sloj, kao i rožnate epidermalne slojeve [<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>]. Ovaj 3D *in vitro* model je potvrđen prema smjernicama ECVAM-a (Europski centar za validaciju alternativnih metoda) i OECD-a



Co-funded by  
the European Union



(Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj) kao *in vitro* modelni sustav za ispitivanje kemikalija, farmaceutskih proizvoda i proizvoda za njegu kože.

#### 4.4.1. Određivanje potencijala iritacije (EpiDerm test iritacije kože – OECD TG 439)

**Princip metode:** Test se sastoji od topičke primjene čistih testnih spojeva na rekonstruirani ljudski epidermis (RhE) model, nakon čega slijedi test životne sposobnosti stanica. Smanjenje životne sposobnosti tkiva izloženih kemikalijama u usporedbi s negativnim kontrolama (koje su tretirane vodom) koristi se za predviđanje potencijala iritacije kože [<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>].

**Materijali potrebni za izvođenje testa uz ključne resurse za odmrzavanje /subkultiviranje/ krioprezervaciju stanične linije:**

- Komponente EPI-200-SIT kompleta (MatTek Corporation)
- Komponente MTT-100 kompleta (MatTek Corporation)
- Ispitivane tvari
- Odabir odgovarajućeg otapala za otapanje ispitivanih tvari

**\*Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni potrošni materijali i oprema drugih dobavljača.**

**Protokol- korak po korak (prema preporukama proizvođača)**

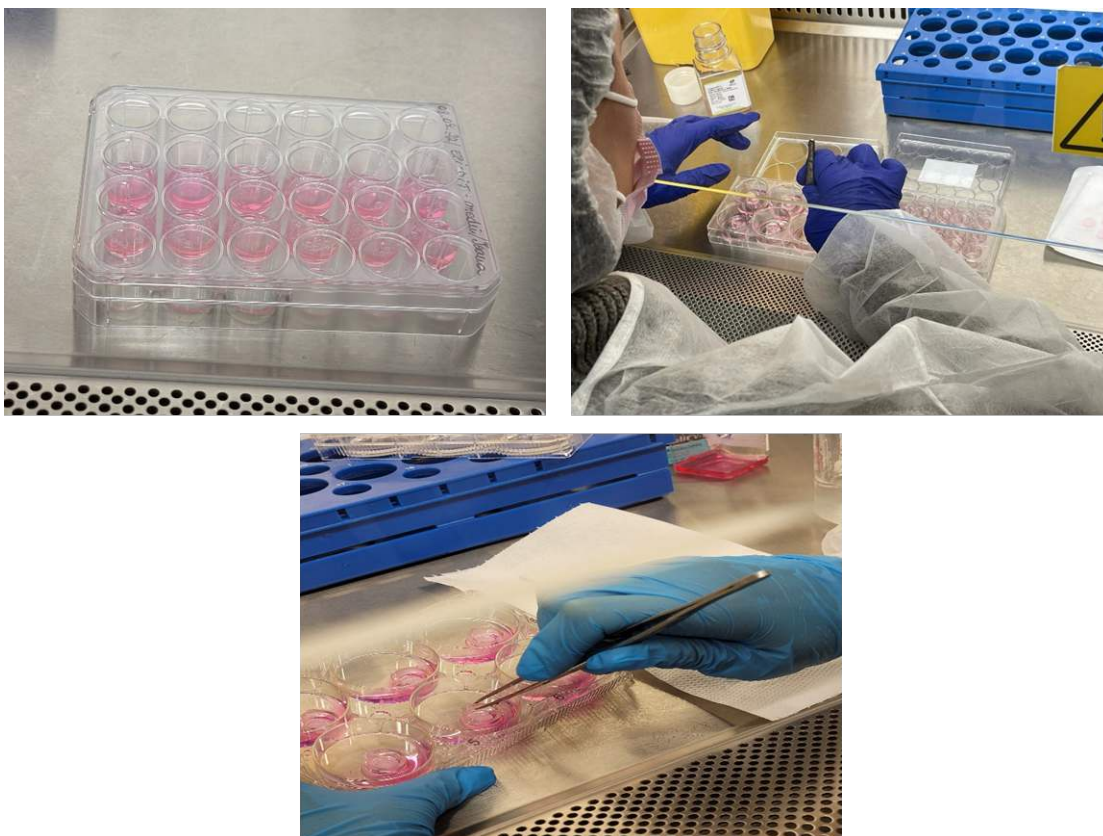
#### Trajanje 4 dana

- (i) Nakon primitka, umetci koji sadrže tkiva uklanjaju se iz agaroze i prenose u ploču sa 6 jažica u 900  $\mu$ L/jažici testnog medija na 4 sata, pod specifičnim uvjetima (37 °C i 5% CO<sub>2</sub>).
- (ii) Nakon 4 sata, inicijalno dodani medij zamjenjuje se s 900  $\mu$ L/jažici svježeg prethodno zagrijanog medija, koji se inkubira do sljedećeg dana.





(iii) Sljedećeg dana mijenja se medij, a testni uzorci primjenjuju se na vrh umetaka koji sadrže tkiva; prvo se površina tkiva navlaži (25  $\mu$ L Dulbeccoove fosfatno-buferirane otopine - DPBS), nakon čega se dodaje 100 mg uzorka/mjesto i inkubira 18 sati (slika 4.15).



**Slika 4.15.** Postupak obrade 3D rekonstruiranih EpiDerm tkiva nakon primitka

(iv) Pozitivna kontrola (PC) – Triton X-100 1 % i negativna kontrola (NC) – ultrapure voda, također se dodaju na vrh umetaka s tkivima i inkubiraju 18 sati;

(v) MTT test se provodi na sljedeći način:

- a. Nakon 18-satne stimulacije, umetci se isperu s DPBS-om i prenose u ploču s 24 jažice koja sadrži 300  $\mu$ L/jažici MTT (1 mg/mL), te se inkubiraju 3 sata.
- b. Nakon 3 sata inkubacije, umetci se uklanjaju i stavljaju u 2 mL otopine za ekstrakciju u novu ploču s 24 jažice, na 2 sata na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetlosti.



- c. Zatim se 200  $\mu$ L/jažici otopine za ekstrakciju prenosi u novu ploču s 96 jažica, gdje se mjeri apsorbancije se mjere spektrofotometrijski na odgovarajućim valnim duljinama (570 nm i 650 nm).
- d. Relativna vijabilnost uzoraka izračunava se pomoću formule [Pinzaru i sur., 2021.]:

$$\begin{aligned}\text{Relativna vijabilnost \%} &= \text{OD}_{\text{uzorka}} / \text{OD}_{\text{NC}} \times 100 \\ \text{Relativna vijabilnost TS \%} &= \text{OD}_{\text{TS}} / \text{Srednja vrijednost OD}_{\text{NC}} \times 100 \\ \text{Relativna vijabilnost NC \%} &= \text{OD}_{\text{NC}} / \text{Srednja vrijednost OD}_{\text{NC}} \times 100 \\ \text{Relativna vijabilnost PC \%} &= \text{OD}_{\text{PC}} / \text{Srednja vrijednost OD}_{\text{NC}} \times 100\end{aligned}$$

Gdje je: TS = ispitivana tvar, NC = negativna kontrola, PC = pozitivna kontrola, OD = optička gustoća.

#### 4.4.2. Određivanje fototoksičnosti (EpiDerm test fototoksičnosti – OECD TG 498)

**Princip metode:** Mjeri akutnu toksičnu reakciju nakon izlaganja kože određenim kemikalijama i naknadnog izlaganja svjetlu, ili reakciju uzrokovanu sličnim načinom, odnosno zračenjem kože nakon sistemske primjene kemijske tvari.

[<https://www.mattek.com/application/phototoxicity/>].

**Materijali potrebni za izvođenje testa,** uz ključne resurse opisane u tablici za odmrzavanje /subkultiviranje/krioprezervaciju stanične linije:

- Komponente EPI-200 kompleta (MatTek Corporation)
- Komponente MTT-100 kompleta (MatTek Corporation)
- UVA-vis zračenja oprema – Biospectra
- Ispitivane tvari
- Odabir odgovarajućeg otapala za otapanje ispitivanih tvari

**\*Napomena: Mogu se koristiti i ekvivalentni potrošni materijali i oprema drugih dobavljača.**

#### **Protokol- korak po korak (prema preporukama proizvođača)**

##### 🕒 Trajanje 4 dana

- (i) Nakon primitka, umetci koji sadrže tkiva uklanjaju se iz agaroze i prenose u ploču s 6 jažica, gdje se u svaku rupu dodaje 900  $\mu$ L/jažici testnog medija. Inkubiraju se 1 sat pod specifičnim uvjetima (37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>).
- (ii) Nakon 1 sata, inicijalno dodani medij zamjenjuje se s 900  $\mu$ L/jažici svježeg prethodno zagrijanog medija, koji se zatim inkubira do sljedećeg dana.



- (iii) Sljedećeg dana mijenja se medij, a testni uzorci nanose se na vrh umetaka s tkivima. Najprije se površina tkiva navlaži s 25  $\mu$ L Dulbeccoove fosfatno-buferirane otopine (DPBS), nakon čega se dodaje 100 mg uzorka po umetku i inkubira 18 sati.
- (iv) Prekriveni umetci izlažu se UVA zračenju na 6 J/cm<sup>2</sup>, dok se ploče bez izlaganja drže na sobnoj temperaturi u tami. Oznacite poklopce ploča kako biste identificirali tkiva izložena UVA zračenju.
- (v) Nakon ovog koraka, svaki umetak se ispere s DPBS-om i prenese u nove ploče koje sadrže 900  $\mu$ L medija po jažici te se inkubira 18-24 sata na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.
- (vi) Trećeg dana umetci se isperu s DPBS-om i prenose u ploču s 24 jažice koja sadrži 300  $\mu$ L MTT po jažici, nakon čega se analiziraju prema gore opisanom protokolu.

$$\text{RTV \%} = \text{OD}_{\text{uzorka}} / \text{OD}_{\text{kontrola otapala}} \times 100$$

$$\text{RTV kontrola \%} = \text{OD}_{\text{kontrola otapala}} / \text{OD}_{\text{prosječna kontrola otapala}} \times 100$$

Gdje je: RTV = relativna vijabilnost tkiva, OD = optička gustoća

## Literatura

Capula M, Corno C, El Hassouni B, Li Petri G, Arandžević S; EORTC PAMM Group. A Brief Guide to Performing Pharmacological Studies In Vitro: Reflections from the EORTC-PAMM Course "Preclinical and Early-phase Clinical Pharmacology". *Anticancer Res* 2019.; 39(7): 3413-3418.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I. i sur. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* 2014.; 111(6): 1021-46.

Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017.:151–72.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*. 2005.; 33(3): 261-87.

American Type Culture Collection (ATCC) Animal Cell Culture Guide. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>

ThermoFisher Scientific. Gibco Cell Culture Basics. <https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>



- Merck. ECACC Handbook - Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 4th Edition. <https://www.sigmaaldrich.com/RO/en/campaigns/ecacc-handbook-download>
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013., May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. Food Frontiers 2020.; 1(3):332-349.
- Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Curr Pharm Biotechnol 2016; 17(14): 1213-1221.
- Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Larramendy ML, Soloneski S (Eds). InTechOpen, Rijeka, 2017.
- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int J Mol Sci. 2021; 22(23): 12827.
- MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K. <https://www.atcc.org/products/30-1010k>  
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf>
- Iftode A, Drăghici GA, Macașoi I, Marcovici I, Coricovac DE, Dragoi R, et al. Exposure to cadmium and copper triggers cytotoxic effects and epigenetic changes in human colorectal carcinoma HT-29 cells. Exp Ther Med. 2021; 21(1): 100.
- Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. Methods Mol Biol. 2019; 1897: 299-311.  
[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011717\\_Hoechst\\_33342\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf)  
<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>  
[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777\\_Phalloidins\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf)  
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>
- Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. Front Cell Dev Biol 2019.; 7: 107. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/rt-pcr>
- Leonard F, Godin B. 3D In Vitro Model for Breast Cancer Research Using Magnetic Levitation and Bioprinting Method. Methods Mol Biol. 2016.; 1406: 239-51.



Co-funded by  
the European Union



Jubelin C, Muñoz-Garcia J, Griscom L, Cochonneau D, Ollivier E, Heymann MF, et al. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell Biosci* 2022.; 12(1): 155.

Mu P, Zhou S, Lv T, Xia F, Shen L, Wan J, et al. Newly developed 3D in vitro models to study tumor-immune interaction. *J Exp Clin Cancer Res* 2023.; 42(1): 81. <https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>. <https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>

Pinzaru I, Tanase A, Enatescu V, Coricovac D, Bociort F, Marcovici I. I sur. Proniosomal Gel for Topical Delivery of Rutin: Preparation, Physicochemical Characterization and In Vitro Toxicological Profile Using 3D Reconstructed Human Epidermis Tissue and 2D Cells. *Antioxidants (Basel)* 2021.; 10(1): 85. <https://www.mattek.com/application/phototoxicity/>



## Poglavlje 5. Uporaba in vivo metoda u procjeni biološke aktivnosti (CO - UMFVBT)

### 5.1. Uvod

Angiogeneza, stvaranje novih krvnih žila iz već postojećih, igra ključnu ulogu u raznim fiziološkim i patološkim procesima, uključujući rast tumora i metastaze. Procjena antiangiogenog potencijala spojeva ključna je u razvoju novih terapijskih strategija. U tom kontekstu, analiza korioalantoične membrane (CAM) pojavila se kao vrijedan alat za procjenu biološke aktivnosti tvari na angiogenezu [Moreno-Jiménez i sur., 2016.].

CAM test uključuje korištenje korioalantoične membrane pilećih embrija u razvoju, koja je visoko vaskularizirana i osjetljiva na angiogene podražaje. Ovaj model omogućuje izravno promatranje formiranja krvnih žila i pruža isplativu i etički prihvatljivu alternativu tradicionalnim in vivo testovima. CAM test naširoko se koristi u proučavanju angiogeneze zbog svoje jednostavnosti, ponovljivosti i važnosti za ljudsku fiziologiju [Moreno-Jiménez i sur., 2016.].

Istraživači koriste CAM test za procjenu antiangiogenog potencijala različitih spojeva. Na primjer, pokazalo se da biokonjugat derivata rodamin B-oleanolne kiseline pokazuje antiangiogene sposobnosti, pokazujući značajne inhibitorne učinke na stvaranje krvnih žila [Mangir i sur., 2019]. Slično tome, prirodni spojevi poput onih izoliranih iz nadzemnih dijelova *Salvia officinalis* istraženi su zbog njihove antiangiogene aktivnosti korištenjem CAM testa, pokazujući obećavajuće rezultate u inhibiciji stvaranja krvnih žila potrebnih za embrionalni rast [Reichling i sur., 2006].

Štoviše, CAM analiza je kompjuterizirana u procjeni antiangiogenih svojstava različitih spojeva, uključujući organometalne komplekse [Fathalla i sur., 2017], dendrimere [Kluge i sur., 2016] i frakcije otrova [Coelho i sur., 2019]. Ove studije naglašavaju svestranost CAM testa u procjeni učinaka različitih tvari na angiogenezu, pružajući dragocjene uvide u potencijalne terapijske intervencije usmjerene na nenormalno stvaranje krvnih žila.

Nadalje, CAM test korišten je ne samo u području onkologije, već i u bioinženjeringu tkiva, pokazujući njegovu primjenjivost u proučavanju regeneracije kostiju i biokompatibilnosti biomaterijala [Butt i sur., 2018]. Sposobnost testa za procjenu i biokompatibilnost i angiogenetski odgovor na biomaterijale naglašava njegovu korisnost u različitim područjima istraživanja izvan studija angiogeneze. In ovo CAM test služi kao vrijedan i svestran alat za procjenu antiangiogenog potencijala spojeva. Njegova jednostavnost, isplativost i relevantnost za ljudsku fiziologiju čine ga prvim izborom za istraživače koji istražuju angiogenezu i razvijaju nove terapijske agense koji ciljaju stvaranje krvnih žila.



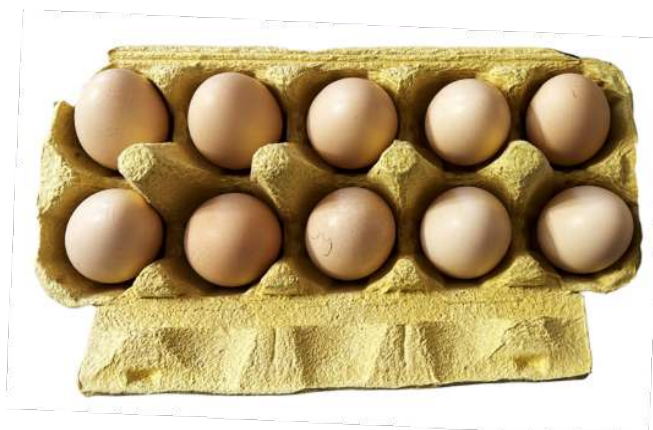
## 5.2. Određivanje antiangiogenog potencijala korištenjem CAM testa

### Protokol- korak po korak

**Napomena !!! Ovo je modificirana verzija ICCVAM-Recommended Test Method Protocol!!!**

Priprema jaja:

- inkubator se priprema nekoliko sati prije inkubacije jaja. Cijela površina inkubatora se dezinficira maramicama i 70 % etanolom. Temperatura je postavljena na 37,5 °C, a vlažnost na 60 %.
- koriste se svježa, oplođena jaja mase između 50 i 60 g od kokoši (slika 5.1.) uzgojenih u optimalnim uvjetima. Prije stavljanja u inkubator jaja se operu mlakom vodom i spužvom ili se mogu bez mućkanja obrisati maramicama i 70 % etanolom.



Slika 5.1. Oplođena kokošja jaja mase između 50 i 60 g

- Na jajima se označava datum kada su stavljena na inkubaciju (slika 5.2).



Slika 5.2. Dezinficirana i označena jaja



Co-funded by  
the European Union

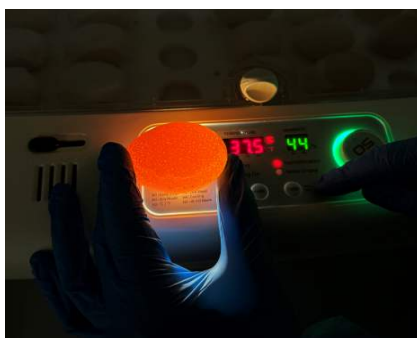


- Jaja se stavljaju na policu inkubatora u vodoravnom položaju (slika 5.3).



**Slika 5.3.** Jaja stavljena u inkubator (1. dan)

- Četvrtog dana inkubacije naprave se dvije rupice na dva kraja jajeta, a 5-8 mL bjelanjka (albumena) ekstrahira se s vrha jajeta i pretoči u posudu za sakupljanje. Dvije rupice se zatim prekriju medicinskom ljepljivom trakom i vrte u inkubator (slike 5.4 i 5.5).



**Slika 5.4.** Provjera razvoja embrija (4. dan)



**Slika 5.5.** Jaja nakon uzimanja bjelanjka (4. dan)





- Petog dana inkubacije, veliki komad ljepljive trake zalijepi se horizontalno na jaje kako bi se škarama mogao izrezati veliki otvor za otkrivanje korioalantoične membrane i krvnih žila. Otvor jaja koja pokazuju održive embrije zatim se prekriva velikim komadom ljepljive trake kako bi se izbjegla dehidracija i jaja se ponovno unose u inkubator dok se ne provedu eksperimentalni testovi (slike 5.6 - 5.8).



**Slika 5.6.** Izrezivanje otvora škarama za otkrivanje korioalantoične membrane i krvnih žila (5. dan)



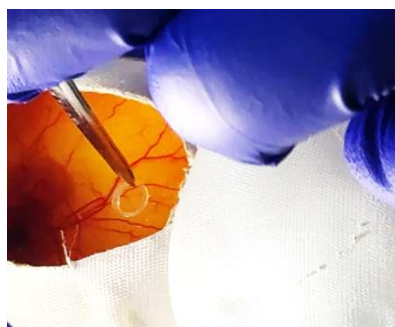
**Slika 5.7.** Jaja prekrivena trakom za sprečavanje dehidracije (5. dan)



**Slika 5.8.** Embrij okružen krvnim žilama (5. dan)

- Svaki dan se provjerava održavaju li se parametri temperature i vlažnosti na zadanim vrijednostima za optimalan razvoj embrija [Međuagencijski koordinacijski odbor za provjeru valjanosti alternativnih metoda (ICCVAM), ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane. 2010. [Dostupno na internetu: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>].

1) prsten na vaskulariziranom području 8. dana inkubacije jaja, unutar prstena se nanosi 10  $\mu$ L uzorka (slika 5.9.)



**Slika 5.9.** Aplikacija prstena u CAM s ciljem aplikacije uzorka za angiogeno testiranje (8. dan)

- 2) uzorci se stavljaju 5 dana u prsten, slikanje prije svake aplikacije i nakon aplikacije uzoraka
- 3) tijekom cijelog pokusa jaja se drže u inkubatoru na optimalno zadanim parametrima.

### 5.3. Određivanje iritativnog i antiiritativnog potencijala

HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) test je široko korištena metoda za procjenu iritativnog i antiiritativnog potencijala različitih tvari. Ovaj test uključuje promatranje korioalantoične membrane oplođenih kokošnjih jaja kako bi se procijenili učinci ispitivanih tvari. CAM test je prepoznat kao pouzdan model za proučavanje odgovora tkiva, angiogeneze i biokompatibilnosti [Moreno-Jiménez i sur., 2016.; Mangır i sur., 2019.].

Istraživači su prilagodili HET-CAM test za određivanje potencijala iritacije tvari poput eteričnih ulja i njihovih komponenti, pružajući vrijedan alat za procjenu blagih iritansa za oči i sluznicu [Reichling i sur., 2006.]. Osim toga, studije su koristile HET-CAM test za potvrdu nenadražujućeg djelovanja formulacija kao što su in situ gelovi, pokazujući njihovu sposobnost zaštite od jako nadražujućih tvari [Fathalla i sur., 2017.].

HET-CAM test također je korišten u raznim područjima izvan procjena biokompatibilnosti. Na primjer, korišten je za procjenu mutagenosti tretmana mlazom plazme i za procjenu citotoksičnosti nano-hidroksiapatita u kozmetici za oralnu njegu [Kluge i sur., 2016.; Coelho i sur., 2019.]. Nadalje, test je bio ključan u proučavanju potencijala iritacije konjunktive mikroemulzija dizajniranih za borbu protiv ophthalmia neonatorum uzrokovane patogenima kao što su *Neisseria gonorrhoeae* i *Staphylococcus aureus* [Butt i sur., 2018.].

Štoviše, test HET-CAM prepoznat je kao vrijedan alat za predviđanje potencijala oftalmološke iritacije, pokazujući dobru korelaciju sa situacijama in vivo [McKenzie i sur., 2015.]. Ovo naglašava njegovu važnost u farmaceutskoj industriji za procjenu iritacije različitih formulacija namijenjenih uporabi u oftalmologiji.



### **Protokol- korak po korak**

**Napomena!!!** Priprema jaja je opisana pod točkom 1 opisa metode za determinaciju antiangiogenog potencijala!!!

1) osmog dana inkubacije 600  $\mu$ L ispitnog uzorka aplicira se na korioalantoičnu membranu embrija, a promjene u vaskularnom pleksusu promatraju se stereomikroskopski u trajanju 300 sekundi (slika 5.10).



**Slika 5.10.** Otvor kroz koji su vidljivi CAM i krvne žile pilećeg embrija (8. dan)

2) uočavaju se znakovi lize, krvarenja ili zgrušavanja, a vrijeme nastanka ovih procesa bilježi se u tablici

3) na temelju dobivenih vrijednosti izračunava se rezultat nadražljivosti iz kojeg se procjenjuje potencijal nadražljivosti ispitnih uzoraka.

Zaključno, HET-CAM test je svestrana i pouzdana metoda za procjenu iritativnog i antiiritativnog potencijala u različitim primjenama. Njegova sposobnost pružanja vrijednih uvida u reakcije tkiva, biokompatibilnost i iritaciju čini ga vrijednim alatom za istraživače i industrije uključene u razvoj proizvoda u rasponu od kozmetičkih do farmaceutskih proizvoda.

### **Literatura**

Butt U, ElShaer A, Snyder L, Al-Kinani A, Gresley A, Alany R. Fatty Acid Based Microemulsions To Combat Ophthalmia Neonatorum Caused By Neisseria gonorrhoeae And Staphylococcus aureus. *Nanomaterials* 2018.; 8(1): 51.

Coelho C, Grenho L, Gomes P, Quadros P, Fernandes M. Nano-Hydroxyapatite In Oral Care Cosmetics: Characterization And Cytotoxicity Assessment. *Scientific Reports* 2019.; 9(1).

Fathalla Z, Vangala A, Longman M, Khaled K, Hussein A, El-Garhy O, et al. Poloxamer-Based Thermoresponsive Ketorolac Tromethamine In Situ Gel Preparations: Design,



Co-funded by  
the European Union



Characterisation, Toxicity, And Transcorneal Permeation Studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2017.; 114: 119-134.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane. 2010. Available online: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, et al. Investigating The Mutagenicity Of A Cold Argon-Plasma Jet In An HET-MN Model. *Plos One* 2016.; 11(9):

Mangır N, Dikici S, Claeysens F, MacNeil S. Using Ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay To Evaluate The Biocompatibility And Angiogenic Response To Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2019.; 5(7): 3190-3200.

McKenzie B, Kay G, Matthews K, Knott R, Cairns D. The Hen's Egg Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test To Predict The Ophthalmic Irritation Potential Of A Cysteamine-Containing Gel: Quantification Using Photoshop® And ImageJ. *International Journal of Pharmaceutics* 2015.; 490(1-2): 1-8.

Moreno-Jiménez I, Hulsart-Billström G, Lanham S, Janeczek A, Kontouli N, Kanczler J et al. The Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay For The Study Of Human Bone Regeneration: A Refinement Animal Model For Tissue Engineering. *Scientific Reports* 2016.; 6(1).

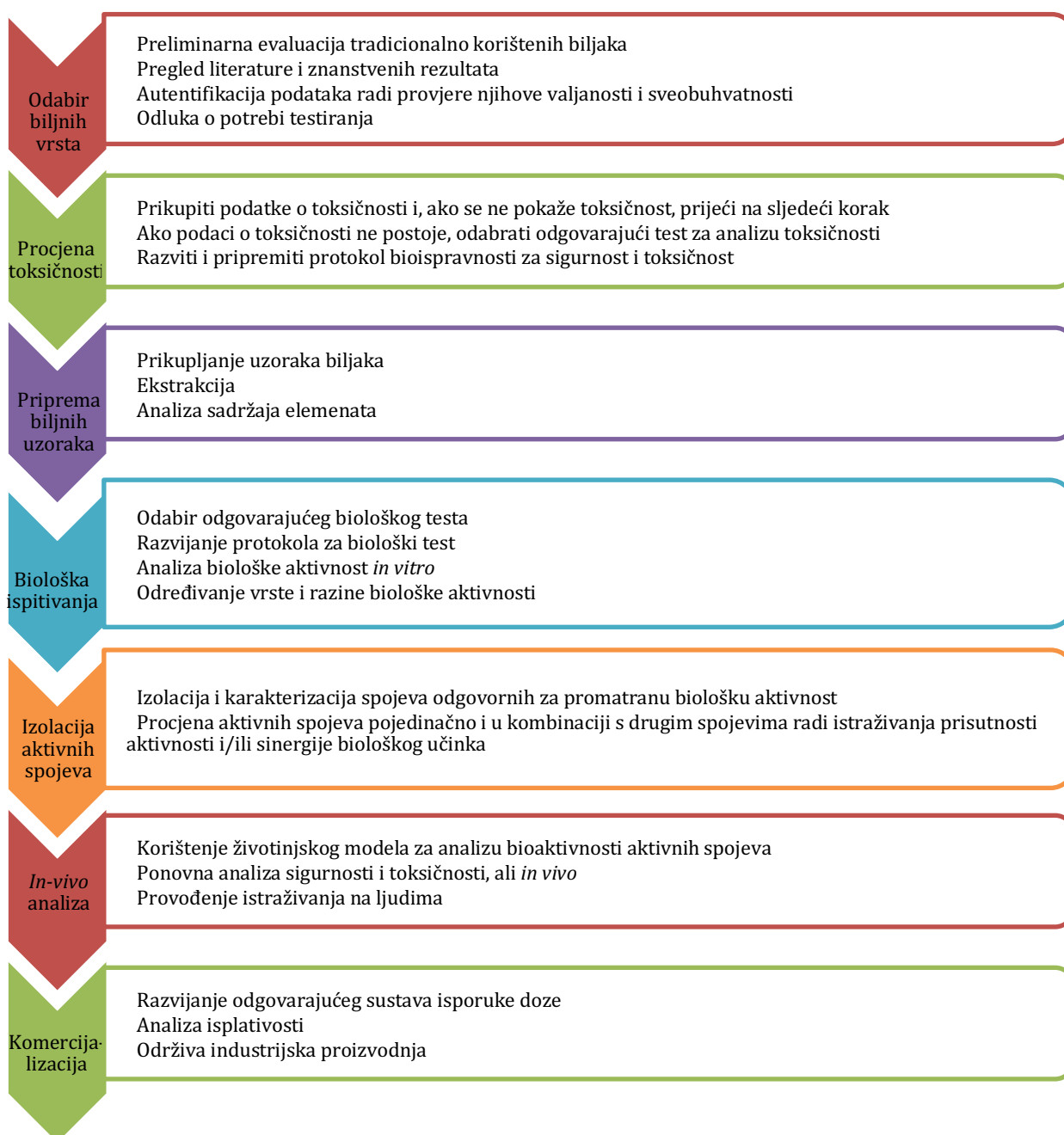
Reichling J, Suschke U, Schnee J, Geiss H. Antibacterial Activity And Irritation Potential Of Selected Essential Oil Components – Structure-Activity Relationship. *Natural Product Communications* 2006.; 1(11): 1934578X0600101.



## Poglavlje 6. Metode za dobivanje preparata iz biljaka (ekstrakti i eterična ulja) (P3 - UNICAL)

### 6.1. Uvod

Industrije koje se temelje na biljnim proizvodima ovise o procesu pripreme proizvoda iz biljaka. Ekstrakcija je prvi korak u svakom istraživanju ljekovitih biljaka i ima važnu i ključnu ulogu u konačnom rezultatu i ishodu (slika 6.1).

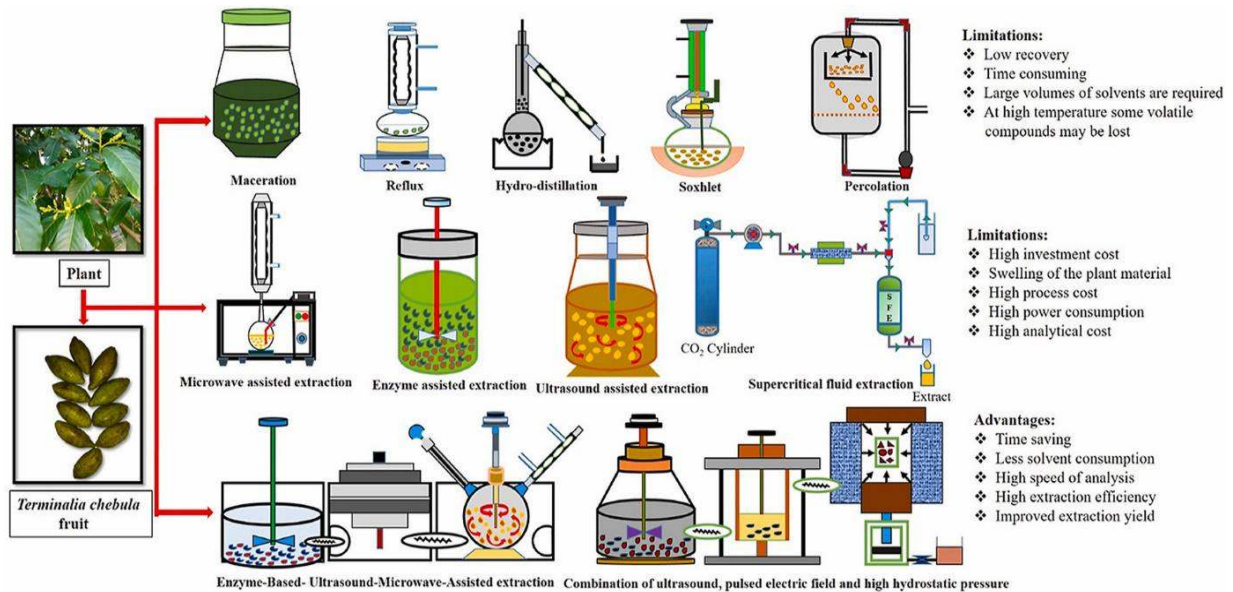




Co-funded by  
the European Union



Slika 6.1. Dijagram tijeka istraživanja ljekovitih biljaka i položaj tehnika ekstrakcije (Azmir i sur., 2013.)  
Bioaktivni spojevi iz biljnih materijala mogu se ekstrahirati različitim postupcima ekstrakcije (slika 6.2).



Slika 6.2. Tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva (Jha i Sit, 2022.)

## 6.2. Maceracija

Većina ovih tehnika temelji se na ekstraktivnoj snazi različitih otapala koja se koriste, poput maceracije (slika 6.3 i 6.4).



Slika 6.3. Maceracija *Pinus nigra* subsp. *laricio* Poiret (izvorne fotografije)



Slika 6.4. Maceracija *Capsicum baccatum* (izvorne fotografije)

Ekstrakcija označava odvajanje jedne ili više tvari iz matrice putem obrade mehaničkim, kemijskim i toplinskim sredstvima.

Maceracija se provodi u čeličnim posudama koje mogu imati kapacitet od malih do velikih (1.000–10.000 litara) ili drugim inertnim materijalom prema čvrstoj matrici i otapalu za ekstrakciju. Čvrsti materijal koji treba ekstrahirati stavlja se u posudu potpuno prekrivenu otapalom kako bi se postigla što potpunija ekstrakcija. Proces ekstrakcije obično je prilično dugotrajan i zahtijeva dane ili čak tjedne da bi se dovršio. U ovom procesu ekstrakcije sudjeluju fenomeni difuzije i osmoze, koji su u velikoj mjeri ovisni o temperaturi.

Obično, upotreba topline mijenja termolabilnu komponentu ljekovite tvari; stoga je u većini slučajeva potrebna upotreba kemijskih reagensa, najčešće organskih otapala koja čine kemijsku strukturu stanične membrane propusnom.

Maceracija, koja se provodi na sobnoj temperaturi, smanjuje rizik od toplinske degradacije uzorka

### **Protokol- korak po korak**

Biljka se najprije odvaja od stranih materijala poput tla i dijelova koji nisu prikladni za ekstrakciju. Da bi se povećao kontakt između uzorka koji se ekstrahira i otapala, biljka se odgovarajuće nasjecka. Čestice ne smiju biti prevelike, inače otapalo neće moći prodrijeti u najdublje stanice, ali ni previše sitne da ne bi došlo do gubitka hlapivih aktivnih sastojaka u biljci i otežane separacije biljnih materijala od tekućine nakon završetka maceracije.

- 1) Zatim se svaki uzorak uranja u organsko otapalo na 48 sati, unutar hermetički zatvorene posude, uz ponavljanje postupka 3 puta

*Otapala navedena u Farmakopeji za ekstrakciju aktivnih sastojaka iz biljnih lijekova su: voda, etil alkohol i etil eter. U industriji se mogu koristiti i druga otapala, poput izopropil alkohola i toluena, koja mogu imati povoljne karakteristike s komercijalnog stajališta ili zbog svoje*



ekstraktivne snage. Otapalo treba odabrati prema kemijskoj prirodi spojeva sadržanih u uzorku. Alkohol je općenito najčešće korišteno otapalo jer može ekstrahirati većinu molekula sadržanih u biljci (aktivnih sastojaka), bilo da su hidrofilne, tj. topljive u vodi, ili lipofilne i stoga topljive u ulju ili drugim organskim otapalima.

- 2) Nakon toga, uzorak se filtrira i suši pomoću rotacijskog isparivača s vodenom kupelji na 37 °C, čija je posebnost isparavanje pod niskim tlakom uz pomoć vakuumske pumpe koja omogućava niže temperature ključanja nego pri ambijentalnom tlaku, kako bi se smanjila temperatura ključanja otapala i olakšala njegova isparavanje.

Kombinacija temperature kupke i vakuumnog tlaka omogućuje preciznu destilaciju frakcija otapala (Slika 6.5).



Slika 6.5. Sušenje ekstrakta (Izvorna fotografija)

Tehnika maceracije u vodenoj fazi ima nekoliko varijacija: **infuzija**, koja se može predstaviti kao maceracija vrlo kratkog trajanja u kipućoj vodi. U ovom slučaju, ekstrakcija je svakako brža, ali fenomen degradacije koji utječe na termolabilne tvari također se odvija brže. Druga varijanta klasične maceracije je **dekokcija**. Ona se provodi stavljanjem matrice u kontakt s otapalom, pri temperaturi ključanja, tijekom varijabilnog vremena do 30 minuta ili više.

Stoga je ova tehnika pogodna za kompaktne materijale s aktivnim sastojcima koji su otporni na toplinu i čija ekstrakcija zahtijeva primjenu topline. Dekokcije, kao i infuzije, sklone su promjenama i imaju ograničen rok trajanja.

### 6.3. Soxhletova ekstrakcija

Soxhletov ekstraktor (slika 6.6) je uređaj koji omogućuje kontinuiranu ekstrakciju slabo topivih komponenti iz čvrstih smjesa, odvajajući ih od netopivih tvari pomoću hlapljivog otapala.





Co-funded by  
the European Union



Uređaj je nazvan po Franzu von Soxhletu (1848-1926), koji ga je izumio 1879. godine za ekstrakciju lipida iz čvrstog materijala, koristeći etil eter kao otapalo; kompleks odvojenih kemijskih komponenti dobio je naziv eterealni ekstrakt.



**Slika 6.6.** Soxhletov ekstraktor (Izvorna fotografija)

Soxhletov ekstraktor u osnovi se sastoji od 3 dijela: a) posude koja sadrži otapalo; b) samog ekstraktora; c) kondenzatora za povratni kondenzat, hlađenog vodom. Također, u ekstraktoru lateralni rukavac (1) omogućuje prolazak para otapala do kondenzatora, dok sifon (2) omogućuje periodično pražnjenje ekstraktora. Čvrsti materijal koji sadrži spoj za ekstrakciju stavlja se u prstenasti filter, često izrađen od porozne celuloze (3), koji se umetne u glavnu komoru ekstraktora. Najvažnije prednosti Soxhletove ekstrakcije su: i) jednostavnost postupka, ii) mogućnost rada na visokim temperaturama, što poboljšava brzinu procesa, iii) niski početni troškovi, iv) nema potrebe za filtriranjem, v) stalna prisutnost otapala i uzorka tijekom cijelog postupka ekstrakcije. Jedan od glavnih problema ove metode ekstrakcije je njezina ograničenost zbog slabe učinkovitosti ekstrakcije, dugotrajnog postupka i potrebe za velikom količinom otapala. Pripravci dobiveni iz biljaka su brojni. Ekstrakti su pripravci koji mogu biti tekući, polučvrsti ili kruti, ovisno o tehnici ekstrakcije (Azwanida, 2015.). Koristeći procese maceracije ili perkolacije, ekstrakti koji se dobivaju mogu se klasificirati na sljedeći način: (i) tekući ekstrakti: ovi ekstrakti sadrže istu količinu aktivnog sastojka koji se nalazi u početnom biljnom lijekovnom materijalu; (ii) polučvrsti ekstrakti: tijekom procesa koncentracije postiže se konzistencija slična medu, a oni su 2 do 6 puta koncentriraniji od tekućih ekstrakata; (iii) suhi



ekstrakti: to su čvrsti prahovi dobiveni potpunim isparavanjem otapala korištenog za ekstrakciju (Abubakar i Haque, 2020.). Druge pripravke dobivene maceracijom ili perkolacijom nazivamo tinkturama. To su tekuće otopine dobivene preradom biljnih droga odgovarajućim otapalom. Najčešće se koristi hidroalkoholna otopina (mješavina vode i alkohola), pri čemu se udio alkohola odabire prema topljivosti aktivnih sastojaka koje treba ekstrahirati.

Glavna razlika između ekstrakata i tinktura je u tome što se kod ekstrakata koristi proces isparavanja za povećanje koncentracije aktivnih sastojaka. Tinkture, s druge strane, mogu se dobiti jednostavnim razrjeđivanjem tekućeg ekstrakta. Druga tvar koja se ekstrahira iz biljnih materijala je oleorezina, koja sadrži mješavinu eteričnih ulja (hlapljivih aromatskih komponenti) i smola (nehlapljivih komponenti). Ova ekstrakcija obično se provodi postupcima ekstrakcije otapalima ili pod visokim tlakom (Hudz i sur., 2020.).

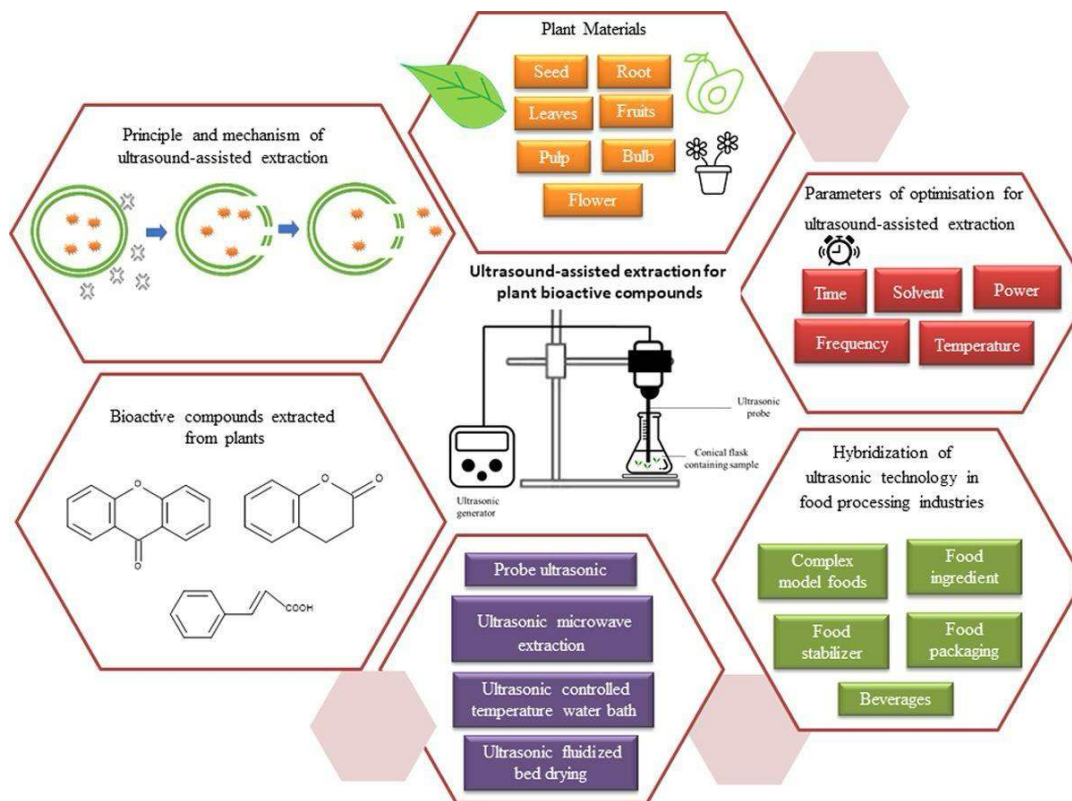
#### **6.4. Inovativne tehnike ekstrakcije**

Primjena inovativnih metoda ekstrakcije u prehrambenoj industriji intenzivno se istražuje zbog povećanih očekivanja potrošača za ekološki prihvatljivijim opcijama. Ove metode su ekološki prihvatljivije jer smanjuju upotrebu sintetičkih i organskih kemikalija, skraćuju vrijeme obrade te omogućuju bolji prinos i kvalitetu ekstrakta.

Neke od najperspektivnijih tehnika uključuju ekstrakciju uz pomoć ultrazvuka, enzimsku ekstrakciju, ekstrakciju uz pomoć mikrovalova, ekstrakciju uz pomoć pulsirajućih električnih polja, ekstrakciju superkritičnim fluidima i ekstrakciju tekućinama pod tlakom. Korištenje novih i kombiniranih tehnologija povećava iskoristivost, što dovodi do većih prinosa i viših stopa ekstrakcije.

##### 6.4.1. Ekstrakcija uz upotrebu ultrazvuka

Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka koristi ultrazvučnu energiju i otapala za vađenje ciljnih spojeva iz različitih biljnih materijala (Kumar i sur., 2021.). Ovaj postupak omogućuje izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljaka koristeći mehaničko djelovanje ultrazvuka na stijenke biljaka.



Slika 6.7. Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (Yusoff i sur., 2022.).

Ultrazvučna ekstrakcija obično koristi manji frekvencijski raspon (16 kHz – 100 kHz) jer bi više frekvencije mogle biti previše energetske i uzrokovati degradaciju aktivnih sastojaka u biljnim matricama. Ovi valovi čine niz ciklusa kompresije i rarifikacije koji se mogu prenijeti kroz čvrste, tekuće ili plinovite medije, uzrokujući pomicanje i oslobađanje molekula iz njihovih izvornim položaja. Ultrazvučna tehnologija omogućava potpuno izdvajanje biljnih materijala, pri čemu se očuvava integritet svih molekula u biljci, bez obzira na to jesu li termolabilne (kao što su proteini, amino kiseline, vitamini, enzimi), termostabilne, vodotopive ili topive u mastima. Ovo je moguće zahvaljujući udarnom valu koji ultrazvuk generira, uzrokujući mehaničko pucanje stijenki stanica.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka u usporedbi s konvencionalnom maceracijom

Glavne prednosti ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka u usporedbi s konvencionalnom maceracijom	Nedostaci ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka
Značajno smanjenje vremena proizvodnje jer ultrazvukovi razbijaju stijenke stanica i skraćuju vrijeme prijenosa aktivnih sastojaka iz biljnih materijala u otapalo.	Kod ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka nije moguće provesti selektivnu ekstrakciju jer dolazi do potpune ekstrakcije svih molekula sadržanih u biljnom materijalu, bez obzira na njihovu afinitet prema korištenom otapalu.



Moguće je dobiti litru macerata za samo 15 minuta.	Ako je potrebno odvojiti aktivne sastojke iz biljnih materijala, potrebno je primijeniti dodatne metode.
To je tehnika ekstrakcije koja je dobila Bio akreditaciju zbog svoje čisto fizičke prirode, jer ne koristi niti dodaje kemijske proizvode. U praksi se koriste prirodna otapala (ulje, voda i alkohol), bez obzira na topljivost aktivnih sastojaka.	
Postignuti prinosi aktivnih sastojaka su vrlo zadovoljavajući, s obzirom na gotovo potpuno iscrpljivanje biljnog materijala.	

### **Protokol- korak po korak**

- 1) Biljni materijal se usitnjava ili reže na male komade kako bi se povećala površina za ekstrakciju.
- 2) Biljni materijal se zatim miješa s otapalom (kao što je etanol ili voda).
- 3) Ultrazvuk se koristi za poboljšanje procesa ekstrakcije primjenom visokointenzivnih, niskofrekventnih ultrazvučnih valova na približno 20 kHz na smjesu. Ovi valovi uzrokuju akustičnu kavitaciju, što je stvaranje mjehurića u tekućini koji se brzo urušavaju. Ovaj učinak stvara intenzivne vibracije otapala, što dovodi do disintegracije i pucanja stijenki stanica biljaka te oslobađanja bioaktivnih tvari poput polifenola, flavonoida i vitamina.
- 4) Smjesa se zatim filtrira kako bi se odvojio čvrsti biljni materijal od tekućine koja sadrži ekstrahirane bioaktivne spojeve.
- 5) Tekućina se potom isparava ili dodatno obrađuje kako bi se odstranilo otapalo i koncentrirale bioaktivne molekule.
- 6) Konačni proizvod je ekstrakt bogat bioaktivnim tvarima koji se može primjenjivati u različitim područjima, uključujući dodatke prehrani, funkcionalnu hranu i kozmetiku.

#### **6.4.2. Ekstrakcija uz pomoć enzima**

Fitokemikalije koje se nalaze u specifičnim matricama koje sadrže polisaharid lignin stabiliziran vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama, ostaju raspodijeljene u citoplazmi stanica i nisu dostupne putem procesa ekstrakcije otapalom. Fitokemikalije vezane u takvim uzorcima učinkovito se oslobađaju u visokom prinosu prethodnim tretmanom biljnih materijala s određenim enzimima (celulaza, pektinaza i amilaza) koji se dodaju tijekom ekstrakcije kako bi se povećao prinos fitokemikalija razgrađivanjem staničnih stijenki. Nadalje, ti enzimi hidroliziraju ugljikohidrate poput celuloze i lipidne komponente (Bitwell i sur., 2023.).



### **Protokol po koracima**

- 1) usitnjavanje biljnog materijala
- 2) suspenzija u vodi
- 3) korištenje specifičnih hidrolitičkih enzima koji imaju zadatak osloboditi sve molekule prisutne u fitokompleksu
- 4) dodavanje glicerina
- 5) filtracija
- 6) dodavanje limunske kiseline za stabilizaciju i dugoročnu stabilnost proizvoda
- 7) pakiranje

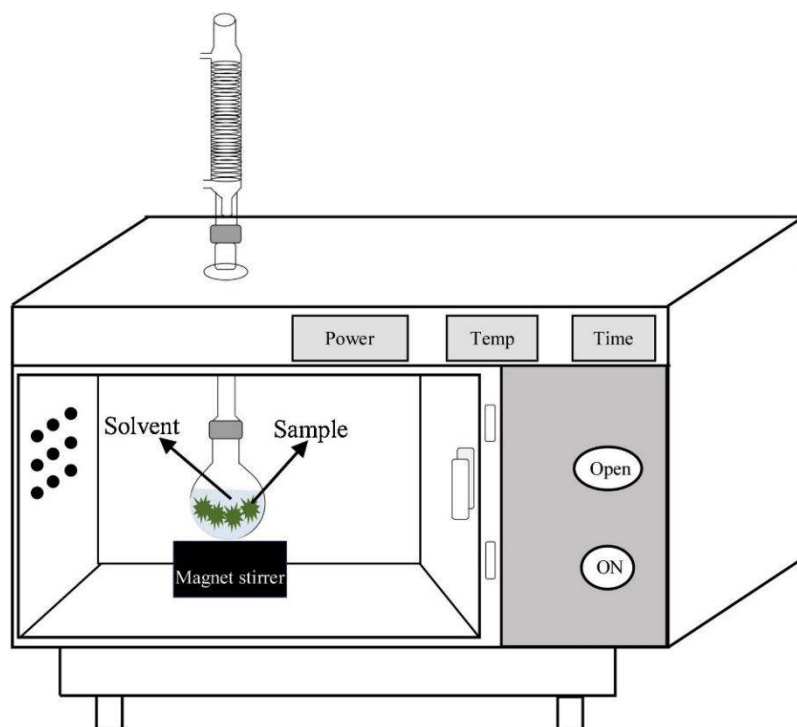
**Prednosti** korištenja hidroenzimatskih ekstrakata u usporedbi s klasičnim fitoterapijskim pripravcima, kao što su majčine tinkture ili macerati u glicerinu, prvenstveno su u njihovoj učinkovitosti, visokoj bioraspoloživosti zahvaljujući upotrebi hidrolitičkih enzima, brzom djelovanju te sigurnosti proizvoda, budući da ne sadrži ni alkohol ni šećer.

#### **6.4.3. Ekstrakcija uz pomoć mikrovalova**

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi s frekvencijom između 300 MHz i 300 GHz. U spektru elektromagnetskih valova, smješteni su između infracrvenih zraka i X-zraka. Izravnim djelovanjem ovih valova na tvar elektromagnetska energija se pretvara u toplinsku energiju. Mikrovalovi se sastoje od dva oscilirajuća okomita polja – magnetskog i električnog, koja omogućuju zagrijavanje. Ekstrakcija uz pomoć mikrovalova (MAE) (slika 6.8) ovisi o zagrijavanju otapala i uzorka, a odvija se pod utjecajem dvaju fenomena: rotacije dipola i ionske provodljivosti. Rotacija dipola podrazumijeva prilagodbu dipola molekule brzim promjenama električnog polja, što uzrokuje zagrijavanje dielektričnih materijala i otapala s trajnim dipolima pod utjecajem mikrovalova. Pod ionskom provodljivošću podrazumijeva se prijenos iona izazvan promjenom električnog polja. Taj prijenos uzrokuje trenje (zbog otpora otopine), što rezultira zagrijavanjem otopine.



Co-funded by  
the European Union



**Slika 6.8.** Shematski prikaz sustava za ekstrakciju uz pomoć mikrovalova (Mirzadeh i sur., 2020.).

Ekstrakcija se može provoditi na vlažnim i suhim matricama, koristeći tragove vlage prisutne u uzorku koji se zagrijava (npr. voda unutar staničnih zidova biomase). Isparavanje koje nastaje stvara iznimno visoke tlakove unutar stanica, što uzrokuje pucanje staničnih zidova i povećava prinos fitokondenzata u mediju. Alvarez i sur. (2017.) pokazali su da korištenje mikrovalova kao predobrade za pogaču povećava prinos ekstrakcije i ukupnu količinu ekstrahiranih polifenola. S druge strane, Caldas i sur. (2018.) primjećuju da su prinosi polifenola veći kada se koriste metode koje uključuju mikrovalove kao medij za ekstrakciju u usporedbi s metodama konvencionalne ekstrakcije.

#### 6.4.4. Ekstrakcija superkričnim fluidima

Ekstrakcija superkričnim fluidima važna je tehnika separacije koja se koristi u prehrambenoj, nutraceutičkoj i farmaceutskoj industriji za izolaciju aktivnih sastojaka iz materijala primjenom visokog tlaka u prisutnosti plina, najčešće CO<sub>2</sub>.

Ekstrakcija superkričnim fluidima je zelena tehnologija koja osigurava okolišnu održivost procesa te visok stupanj kvalitete i čistoće ekstraktiranog proizvoda. Kao čista i selektivna tehnologija koja ne zahtijeva visoke temperature, ekstrakcija superkričnim fluidima nudi alternativu konvencionalnoj ekstrakciji s organskim otapalima. Ova tehnika omogućuje

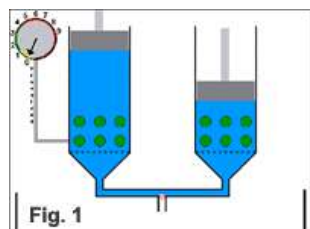


ekstrakciju spojeva osjetljivih na toplinu i oksidaciju, poput polinezasićenih masnih kiselina ( $\omega 3$ ,  $\omega 6$ ), vitamina, kanabinoida, flavonoida, sterola, tokoferola i drugih spojeva visoke dodane vrijednosti, uz potpunu sigurnost da neće doći do njihovog oštećenja. Rezultat su ekstrakti izuzetne čistoće i vrlo rafinirane organoleptičke karakteristike.

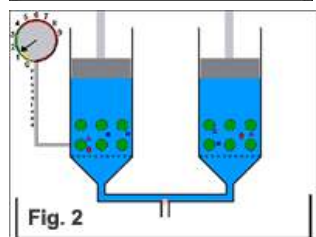
#### 6.4.5. Naviglio extractor ®

Brzi dinamički ekstraktor (Naviglio ekstraktor ®) (slika 6.9) predstavlja inovativnu tehnologiju ekstrakcije čvrsta-tekućina koja omogućuje učinkovito isušivanje čvrstih matrica koje sadrže tvari izvadive u organskim ili neorganskim otapalima, ili njihovim mješavinama, u znatno kraćem vremenskom periodu u usporedbi s drugim trenutno dostupnim tehnikama ekstrakcije. Novost ekstraktora leži u tome što se mijenja pristup ekstrakciji, nasuprot trenutnim metodama koje zagrijavaju ekstrakcijski sustav kako bi povećale prinos i ubrzale vrijeme ekstrakcije. Naviglio Estrattore® provodi ekstrakciju na sobnoj ili blago povišenoj temperaturi, koristeći povećanje tlaka ekstraktora na čvrstu matricu. Ekstrakcija na niskim temperaturama je važna jer pomaže u izbjegavanju termičkog stresa na termolabilne tvari.

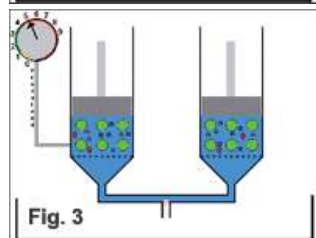
#### **Shematski prikaz rada Naviglio ekstraktora ®**



**Korak 1.** Ekstrakcijske komore se napune čvrstom matricom koja se ekstraktira i ekstraktnim otapalom, pri atmosferskom tlaku. Na dnu svake cilindrične ekstrakcijske komore nalaze se porozne pregrade koje omogućuju prolaz tekućine, dok blokiraju čvrstu matricu.



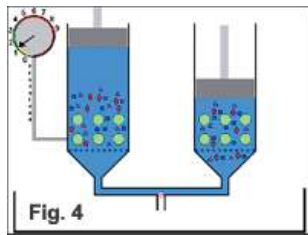
**Korak 2.** Nakon punjenja, sustav se zatvori i stavlja pod tlak (obično između 7 i 9 bara). Tlak koji stvaraju klipovi prenosi se na tekućinu jer su dvije ekstrakcijske komore povezane putem cijevi.



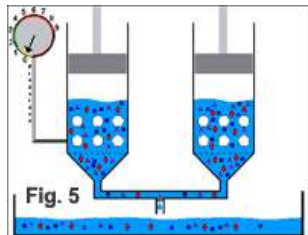
**Korak 3.** Kada se postigne zadani tlak, sustav ostaje nepomičan koliko je potrebno da se uspostavi ravnoteža između unutrašnjosti i vanjšine čvrste matrice. Ovo je statička faza.



Co-funded by  
the European Union



**Korak 4.** Nakon tog razdoblja, klipovi se pokreću, što uzrokuje naglo smanjenje tlaka u sustavu. Time započinje dinamička faza u kojoj se odvija ekstrakcija; ekstraktibilne tvari prelaze u ekstraktno otapalo zbog usisnog učinka uzrokovanog negativnim tlakom između unutrašnjosti i vanjskog dijela čvrste matrice.



**Korak 5.** Dinamička faza uključuje i miješanje ekstraktne tekućine, što sprječava stvaranje koncentracijskih gradijenata u blizini izložene površine čvrste matrice. Naizmjenično provođenje statičke i dinamičke faze čini jedan ekstrakcijski ciklus; ponavljanje više ciklusa dovodi do potpune ekstrakcije čvrste matrice. Na kraju

procesa, ekstraktno otapalo se ispušta kroz solenoidni ventil i prikuplja u posebnom spremniku.



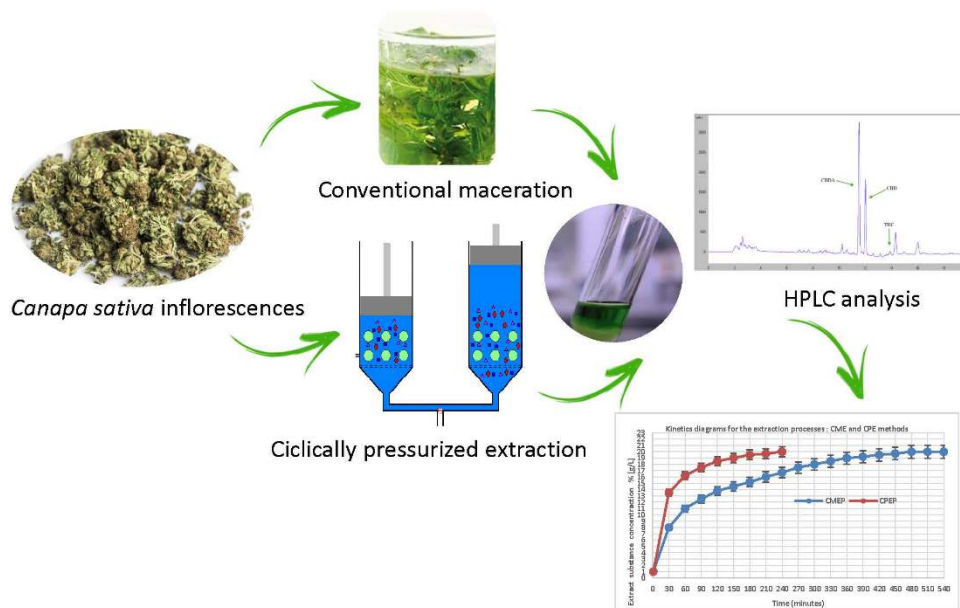
Slika 6.9. Naviglio extractor ®

Gallo i sur. (2020) analizirali su kinetiku procesa ekstrakcije iz ženskih cvatova *Cannabis sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*, na temelju određivanja sadržaja kanabinoida: kanabidiolske kiseline (CBDA),  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinolske kiseline (THCA), kanabidiola (CBD) i  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinola (THC), prije i nakon dekarboksilacije u pećnici, s ciljem procjene moguće primjene dobivenog ekstrakta konoplje u prehrambenoj industriji. Prinos ekstrakcije bio je isti





u oba ispitivana slučaja, a konačne kvalitete bile su gotovo identične. Međutim, vremena ekstrakcije bila su značajno različita: maceracija je trajala najmanje 24 sata, dok je s Naviglio ekstraktorom ekstrakcija završena za samo 4 sata (slika 6.10).



Kinetics diagrams for the extraction processes

**Slika 6.10.** Proces ekstrakcije za proizvodnju ekstrakata iz cvatova konoplje pomoću konvencionalne maceracije i brze dinamičke ekstrakcije čvrsta-tekućina (Naviglio ekstraktor) (Gallo i sur., 2020.).

## 6.5. Ekstrakcija eteričnih ulja

Eterična ulja mogu se dobiti iz biljnog materijala koji se podvrgava destilaciji parom, hidrodestilaciji ili hladnom prešanju, ovisno o biljci i vrsti ulja koje se želi dobiti. Sadržaj eteričnog ulja u biljnom materijalu je nizak, obično 1 do 3 % težine biljke. Eterična ulja sastoje se od kompleksne mješavine kemijskih spojeva, uključujući terpene, aldehide, ketone, alkohole i druge, koji im daju karakterističan miris i potencijalna terapijska svojstva (Aziz i sur., 2018.). Eterična ulja su kompleksna mješavina hlapljivih i mirisnih organskih tvari različite kemijske prirode.

### **Neki od komponenti eteričnih ulja uključuju:**

- **MONOTERPENI:** antifungalna, antimicrobna, antipiretska i zacjeljujuća svojstva (npr. lavanda, majčina dušica, cipres, kadulja, limun...);



**SESKVITERPENI:** umirujuća, antifungalna i dezinfekcijska svojstva (npr. melisa, ylang-ylang, cedar, borovnica...);

**FENOLI:** antifungalna i antimicrobna svojstva (npr. majčina dušica, origano, vrsina, klinčić...);

**ALDEHIDI:** antibakterijska, protuupalna svojstva i u glavnoj mjeri odgovorni za miris (npr. limun, melisa, cimet, eukaliptus...);

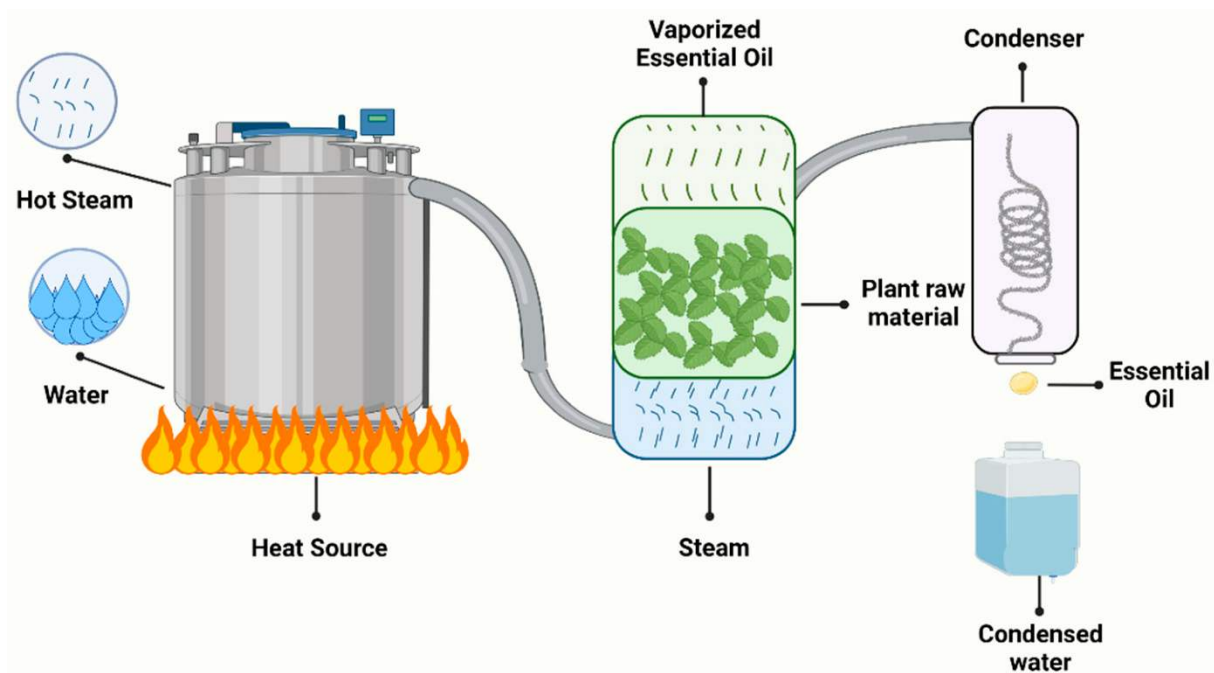
**KETONI:** balzamična i koleretička svojstva (mogu također biti toksični sastojci) (npr. pelin, absint, ružmarin, tuja, metvica, ljekovita kadulja...);

**ESTERI:** uravnotežujuća, dekongestivna, antispazmodična i umirujuća svojstva (npr. lovor, lavanda, kamilica, ružičasti geranij...).

### ***Karakteristike eteričnih ulja***

1. Sastoje se od kompleksne mješavine ugljikovodika, monoterpena i seskviterpena, kisik-izvedenih materijala, fenil-deriviranih propanoida, spojeva iz kiselinskog metabolizma masti i aminokiselina, te dušičnih i sumpornih spojeva;
2. Mogu biti mono-, di- ili trimolekularni, ali većinom su polimolekularni (>250);
3. Snažna, ugodna, većinom bezbojna ili samo blago mirisna i obojena;
4. Sastoje se od izrazito hlapljivih molekula; they are insoluble or slightly soluble in water;
5. Netopiva su ili slabo topljiva u vodi;
6. Veoma topljiva u alkoholu, mastima, octenoj kiselini, eteru, kloroformu...;
7. Imaju manju gustoću od vode (IZUZECI: eterična ulja cimeta, karanfile, senfa...).

Najčešće korištena metoda za ekstrakciju eteričnih ulja je destilacija parom (slika 6.11). Koriste je različiti sektori kao izvor sirovina za kozmetiku, farmaceutsku industriju, aromaterapiju, prehrambene arome, konzerviranje i kućne potrepštine (Machado i sur., 2022.).



Slika 6.11. Pregled koraka u procesu destilacije parom (Machado i sur., 2022.).

Ova metoda koristi neka fizička svojstva eteričnih ulja koja su prethodno navedena, kao što su hlapljivost, topljivost u vodi i gustoća. Destilacija je proces kojim se eterična ulja odvajaju od biljnih tkiva pomoću njihove "prijenosne" sposobnosti u vodenoj pari. Iako eterična ulja imaju visoku temperaturu ključanja, njihova hlapljivost omogućuje da se lako prenose vodenom parom. Nakon što se ispare, eterična ulja se učinkovito prenose tokovima vodene pare. Povrće, nakon odgovarajuće pripreme, stavlja se u "destilacijski rezervoar", u koji se zatim uvodi vodena para. Para nosi eterična ulja, stvarajući mješavinu eteričnog ulja i vodene pare koja, prolazeći kroz hladnu kolonu, kondenzira i odvajaju vodu od eteričnog ulja. Ova separacija nastaje zato što se voda i eterična ulja ne miješaju i imaju različite gustoće. Odvajaju se jednostavnim dekantiranjem. Ova metoda ekstrakcije je najčešće korištena zbog niza prednosti koje pruža:

- A. Temperatura vrenja mješavine pare/eteričnog ulja približava se 100 °C, što je još uvijek daleko od temperature vrenja eteričnih ulja. Ona ne raste tijekom cijelog trajanja obrade, čime se izbjegava rizik od pogoršanja eteričnih ulja i osigurava njihova dobra hlapljivost.
- B. Vodena para proširuje biljna tkiva, širi pore i razbija stanične stijenke, čime olakšava oslobađanje eteričnih ulja
- C. Eterično ulje dobiveno na taj način lako se odvajaju od kondenzirane vode dekantacijom, budući da su spojevi nemješivi i imaju različite gustoće.



- D. Gubitak eteričnog ulja je minimalan zbog njegove vrlo slabe topljivosti u vodi. Ovaj gubitak može se dodatno smanjiti korištenjem aromatične vode, koja se upravo odvojila od eteričnih ulja, za regeneraciju pare.
- E. Proces je vrlo jeftin (koristi se pitka voda iz slavine) i ne stvara posebne sigurnosne probleme na radu.
- F. Tok vodene pare ne sadrži kisik; stoga eterična ulja nisu podložna oksidaciji. Jedini nedostatak je mogućnost termalne razgradnje i hidroloških procesa.

### Literatura

Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioapplied Sciences* 2020.;12(1):1.

Álvarez A, Poejo J, Matias AA, Duarte CM, Cocero MJ, Mato RB. Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing* 2017.; 106: 162-170.

Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D. i sur. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review *Curr Drug Metab.* 2018.; 19(13): 1100-1110.

Azmir J, Zaidul, ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F. i sur. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 2013.; 117(4): 426-436.

Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants.* 2015.; 4(196): 2167-0412.

Bitwell C, Indra SS, Luke C, Kakoma MK. A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African* 2023.; 19: e01585.

Caldas TW, Mazza KE, Teles AS, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA i sur. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* 2018.; 111: 86-91.

Gallo M, Formato A, Ciaravolo M, Formato G, Naviglio D. Study of the kinetics of extraction process for the production of hemp inflorescences extracts by means of conventional maceration (CM) and rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE). *Separations* 2020.; 7(2): 20.



Co-funded by  
the European Union



Hudz N, Makowicz E, Shanida M. i sur. Phytochemical Evaluation of Tinctures and Essential Oil Obtained from *Satureja montana* Herb. *Molecules*. 2020.; 25(20): 4763.

Jha AK i Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2022.; 119: 579-591.

Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 2021.; 70: 105325.

Machado CA, Oliveira FO, de Andrade MA, Hodel KVS, Lepikson H, Machado BAS. Steam distillation for essential oil extraction: An evaluation of technological advances based on an analysis of patent documents. *Sustainability* 2022.; 14(12): 7119.

Mirzadeh M, Arianejad MR, Khedmat L. Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate Polymers* 2020.; 229: 115421.

Yusoff IM, Taher ZM, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International* 2022.; 157: 111268.