

Citotoksična aktivnost eteričnog ulja kadulje (*Salvia officinalis* L.) i smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.)

Jažo, Zvonimir

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:089222>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) I SMILJA (*HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G. DON.)

DIPLOMSKI RAD

ZVONIMIR JAŽO

Matični broj: 93

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJA
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) I SMILJA (*HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G. DON.)

DIPLOMSKI RAD

ZVONIMIR JAŽO

Matični broj: 93

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) AND
IMMORTELLE (*HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G. DON.) ESSENTIAL
OILS**

DIPLOMA THESIS

ZVONIMIR JAŽO

Parent number: 93

Split, october 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski sveučilišni studij Kemija, smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

Pomoć pri izradi rada: dr.sc. Ivana Carev, Mateo Glumac, mag.chem., Vlatka Paštar, mag.biol. et chem.

CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) I SMILJA (*HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G. DON.)

Zvonimir Jažo, 93

Sažetak:

Uzorci samoniklih biljaka, kadulje (lat. *Salvia officinalis* L.) i smilja (lat. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) sakupljeni su na području Dalmacije i Bosne i Hercegovine. Izolacija eteričnih ulja izvršena je postupkom hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Pretražnom elektronskom mikroskopijom na biljnom tkivu uočene su i fotografirane žlijezde u kojima biljka skladišti eterično ulje. Kemijski sastav eteričnih ulja određen je spregnutom instrumentalnom tehnikom koja povezuje plinsku kromatografiju i spektrometriju masa (GC-MS). *In vitro* citotoksična aktivnostog eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja određena je na staničnoj liniji humanog dermalnog fibroblasta (HDF/Tert) i na MDA-MB-231 staničnoj liniji karcinoma dojke. Nakon tretiranja otopinama eteričnog ulja, vijabilnost stanica praćena je upotrebom MTS reagensa i mjerenjem apsorbancije pri 492 nm. Rezultati citotoksične aktivnosti otopina eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja pokazuju nisku citotoksičnost na HDF/Tert stanice kože. Eterično ulje smilja na MDA-MB-231 staničnoj liniji karcinoma dojke pokazuje značajniju citotoksičnu aktivnost u odnosu na eterično ulje kadulje.

Ključne riječi: *Salvia officinalis*, *Helichrysum italicum*, eterična ulja, citotoksičnost, HDF/Tert, MDA-MB-231.

Rad sadrži: 59 stranica, 31 sliku, 6 tablica, 0 priloga, 29 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | | |
|--------------------------------------|---|-------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | - | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Mladen Miloš | - | član |
| 3. doc. dr. sc. Mila Radan | - | član-mentor |

Datum obrane: 30. listopada 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry, course: Organic chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Mila Radan – PhD, assistant prof.

Technical assistance: PhD Ivana Carev, Mateo Glumac MSc., Vlatka Paštar, MSc.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) AND IMMORTELLE (*HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G. DON.) ESSENTIAL OILS

Zvonimir Jažo, 93

Abstract:

Samples of two self-sown plants, sage (lat. *Salvia officinalis* L.) and immortelle (lat. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.), were collected in Dalmatia and Bosnia and Herzegovina. Isolation of the plants essential oil was carried by a hydrodistillation process in a modified Clevenger apparatus. With scanning electron microscopy of plant tissue a plant's glands with stored microdroplets of oils were visualized. The chemical composition of the essential oils is determined by a coupled instrumental technique linking gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). *In vitro* cytotoxic activity of sage essential oil and immortelle essential oil was determined on human dermal fibroblast (HDF/Tert) cells line and MDA-MB-231 breast cancer cells line. After treatment with the essential oil solutions, cell viability was tested using MTS reagents and measuring absorbance at 492 nm. Cytotoxic activity results show that solutions of sage essential oil and immortelle essential oil have a low cytotoxic effect on HDF / Tert skin cells. The immortelle essential oil tested on MDA-MB-231 cells line shows significantly higher cytotoxic activity than the sage essential oil.

Keywords: *Salvia officinalis*, *Helichrysum italicum*, essential oils, cytotoxic activity, HDF/Tert, MDA-MB-231.

Thesis contains: 59 pages, 31 figures, 6 tables, 0 supplements, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | | |
|---|---|--------------|
| 1. Ivica Blažević, PhD, Associate professor | - | chair person |
| 2. Mladen Miloš, PhD, Full professor | - | member |
| 3. doc. dr. sc. Mila Radan PhD, Assistant professor | - | supervisor |

Defence date: October 30, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu i u laboratoriju za stanične kulture, Mediteranskog instituta za istraživanje života u Splitu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od srpnja 2018. do rujna 2019. godine.

*Ovaj rad posvećujem prerano preminuloj
majčinoj sestri, svojoj tetki Nadi N.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima i svojoj braći na iskazanoj ljubavi i svakom obliku
podrške tijekom studiranja.*

*Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Mili Radan na iskazanom povjerenju, pomoći i
podršci tijekom izrade rada.*

*Zahvaljujem se laborantu Vladimiru Jelaski-Relji na korisnim savjetima i na tome što
je udovoljio svim mojim zahtjevima tijekom izvođenja eksperimenata.*

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Sakupiti uzorke samoniklog aromatičnog i ljekovitog bilja.
- Obaviti sušenje prikupljenog biljnog materijala.
- Uzorke biljnog tkiva pripremiti za pretražnu elektronsku mikroskopiju.
- Obaviti postupak pretražne elektronske mikroskopije.
- Izolirati eterično ulje iz sakupljenog i osušenog biljnog materijala
- Odrediti kemijski sastav eteričnog ulja.
- Odrediti citotoksičnu aktivnost eteričnih ulja na stanicama kože i stanicama karcinoma dojke.

SAŽETAK

Uzorci samoniklih biljaka, kadulje (lat. *Salvia officinalis* L.) i smilja (lat. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) sakupljeni su na području Dalmacije i Bosne i Hercegovine. Izolacija eteričnih ulja izvršena je postupkom hidroddestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Pretražnom elektronskom mikroskopijom na biljnom tkivu uočene su i fotografirane žlijezde u kojima biljka skladišti eterično ulje. Kemijski sastav eteričnih ulja određen je spregnutom instrumentalnom tehnikom koja povezuje plinsku kromatografiju i spektrometriju masa (GC-MS). *In vitro* citotoksična aktivnostog eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja određena je na staničnoj liniji humanog dermalnog fibroblasta (HDF/Tert) i na MDA-MB-231 staničnoj liniji karcinoma dojke. Nakon tretiranja otopinama eteričnog ulja, vijabilnost stanica praćena je upotrebom MTS reagensa i mjerenjem apsorbancije pri 492 nm. Rezultati citotoksićne aktivnosti otopina eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja pokazuju nisku citotoksićnost na HDF/Tert stanice koće. Eterično ulje smilja na MDA-MB-231 stanićnoj liniji karcinoma dojke pokazuje znaćajniju citotoksićnu aktivnost u odnosu na eterično ulje kadulje.

Ključne rijeći: *Salvia officinalis*, *Helichrysum italicum*, eterićna ulja, citotoksićnost, HDF/Tert, MDA-MB-231.

SUMMARY

Samples of two self-sown plants, sage (lat. *Salvia officinalis* L.) and immortelle (lat. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.), were collected in Dalmatia and Bosnia and Herzegovina. Isolation of the plants essential oil was carried by a hydrodistillation process in a modified Clevenger apparatus. With scanning electron microscopy of plant tissue a plant's glands with stored microdroplets of oils were visualized. The chemical composition of the essential oils is determined by a coupled instrumental technique linking gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). *In vitro* cytotoxic activity of sage essential oil and immortelle essential oil was determined on human dermal fibroblast (HDF/Tert) cells line and MDA-MB-231 breast cancer cells line. After treatment with the essential oil solutions, cell viability was tested using MTS reagents and measuring absorbance at 492 nm. Cytotoxic activity results show that solutions of sage essential oil and immortelle essential oil have a low cytotoxic effect on HDF / Tert skin cells. The immortelle essential oil tested on MDA-MB-231 cells line shows significantly higher cytotoxic activity than the sage essential oil.

Keywords: *Salvia officinalis*, *Helichrysum italicum*, essential oils, cytotoxic activity, HDF/Tert, MDA-MB-231.

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Eterična ulja	3
1.2. Biosinteza spojeva eteričnih ulja	3
1.2.1. Proces fotosinteze	4
1.2.2. Calvinov ciklus	6
1.2.3. Biosinteza derivata šikiminske kiseline	6
1.2.4. Biosinteza terpena	9
1.3. Izolacija eteričnih ulja	12
1.3.1. Izolacija eteričnog ulja destilacijom	13
1.3.2. Izolacija eteričnog ulja ekstrakcijom	14
1.3.3. Izolacija eteričnih ulja agruma	14
1.3.4. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija	15
1.3.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidom	17
1.4. Antimutagena svojstva eteričnih ulja	18
1.5. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja	19
1.6. Rak	21
1.6.1. Metabolizam zloćudnih stanica	21
1.6.2. Rak dojke	23
1.6.3. Kemoterapijski lijekovi.....	24
1.7. Citotoksičnost	24
1.7.1. <i>In vitro</i> testovi	25
1.7.2. Razvoj lijekova za rak.....	26
1.8. Fibroblasti.....	27
2. EKSPERIMENTALNI DIO	31
2.1. Sakupljanje samoniklog ljekovitog i aromatičnog bilja.....	31
2.2. Sušenje biljnog materijala	32
2.3. Detekcija i fotografiranje spremnika eteričnih ulja	33
2.4. Izolacija eteričnih ulja	36
2.5. Analiza eteričnih ulja	37
2.6. Odmrzavanje stanica	38
2.7. Postupak presađivanja satnica	39
2.8. Test citotoksične aktivnosti	40
3. Rezultati i rasprava	43

3.1. Elektronska mikroskopija.....	43
3.2. Analiza eteričnih ulja kadulje	46
3.3. Analiza eteričnih ulja smilja	47
3.4. Citotoksična aktivnost eteričnih ulja na stanicama kože.....	49
3.5. Citotoksična aktivnost eteričnih ulja na stanicama karcinoma dojke	51
4. Zaključak	55
Popis slika	56
Literatura.....	58

UVOD

Ljekovito i aromatično bilje (LAB) od davnina se u tradicionalnoj narodnoj medicini koristi kao lijek ili kao pomoćna ljekovita tvar, a osim toga upotrebljava se kao: hrana ili dodatak hrani, prirodni aditiv ili konzervans, prirodni herbicid, fungicid ili insekticid... Prema novijim procjenama između 50.000 i 80.000 biljnih vrsta ima primjenu u tradicionalnoj i modernoj medicini. Za 26.000 vrsta postoji službena dokumentacija o pozitivnom utjecaju na ljudsko zdravlje. Na svjetskom tržištu u prometu se nalazi oko 3.000 vrsta dok se na europskom tržištu nalazi oko 2.000 vrsta. Upotreba LAB u stalnom je porastu u zapadnoeuropskim zemljama, Americi i Kanadi. U novije vrijeme, u doba industrijalizacije LAB je osnovna sirovina koja služi kao izvor prirodnih organskih spojeva važnih za farmaceutsku i konditorsku industriju kao i za industriju alkoholnih i bezalkoholnih pića. [1]

Prirodni organski spojevi izolirani iz biljaka za koje se testom biološke aktivnosti dokaže pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi mogu se upotrijebiti za dizajniranje novih vrsta lijekova. Biološki aktivni spojevi izolirani iz biljaka nazivaju se fitokemikalije, odnosno fitonutrijenti. Biljka ih sintetizira u manjim količinama kako bi se zaštitila od biotskih i abiotskih stresnih faktora. [2] Ljekovite biljke sa specifičnim aromatskim svojstvima ugodnog mirisa pronašle su svoju primjenu i u kozmetičkoj industriji te u industriji parfema.

Sakupljanje samoniklog LAB može biti unosna komercijalna djelatnost koja je tipična za manje razvijene zemlje. Održivo sakupljanje samoniklog bilja potiče ne samo ruralni razvoj i razvoj lokalne zajednice već utječe na očuvanje prirodnih resursa LAB. Svaka ljudska djelatnost koja se u prirodi obavlja na adekvatan, pravilan i pravovremen način potiče obnavljanje prirodnih populacija i sprječava spontane promjene u ekosustavima koje vode k zarastanju, zakorovljavanju i zašumljavanju prirodnih livada i pašnjaka, što dovodi do nestanka mnogih populacija komercijalno značajnih vrsta. Sakupljanje, prerada i upotreba biljaka omogućava i očuvanje kulturnog identiteta nacije i naroda, kao i tradicionalnih znanja i praksi koje sve više nestaju. [1]

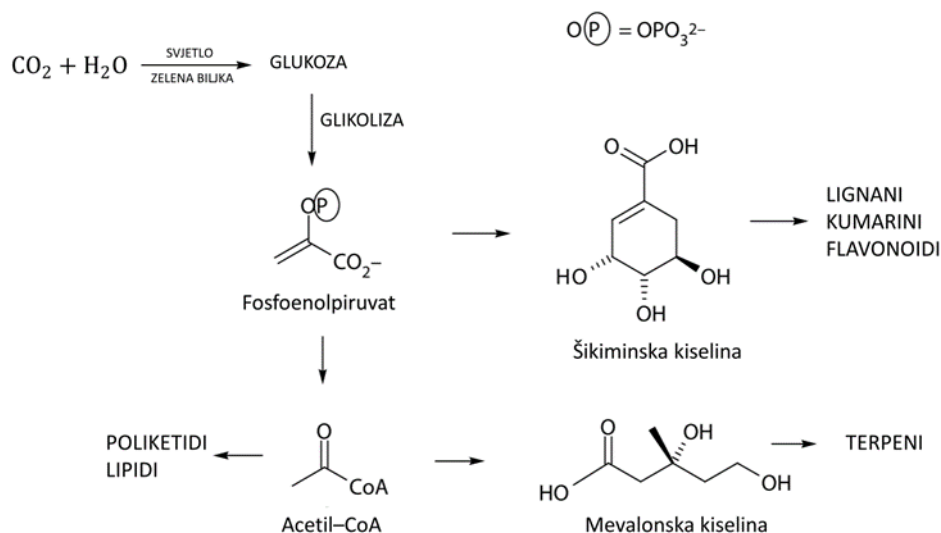
1. OPĆI DIO

1.1. Eterična ulja

Eterična ulja (engl. essential oils) su složene smjese lako isparljivih prirodnih organskih spojeva koje se dobivaju fizikalnim postupcima izolacije iz cijele biljke poznatog taksonomskog podrijetla ili jednog dijela biljke. Općenito, sve biljke imaju sposobnost proizvodnje isparljivih spojeva no vrlo često samo u tragovima. Iako u svome nazivu sadrže riječ „ulja“ eterična ulja se bitno razlikuju od ulja (masti u tekućem stanju) izoliranih iz biljnih i životinjskih masnih stanica koje su po kemijskom sastavu esteri karboksilnih kiselina i alkohola glicerola. Prirodni organski spojevi koji se nalaze u sastavu eteričnih ulja su sekundarni metaboliti koji se mogu svrstati u jednu od tri navedene grupe spojeva: terpeni, fenilpropanski derivati i ostali spojevi. Biljne stanice u kojima su pohranjeni oni spojevi koji čine eterično ulje mogu biti smještene u različitim dijelovima biljke i mogu se podijeliti u dvije vrste. Površinske stanice poput žljezdanih dlačica koje se nalaze na vanjskoj površini biljnog organa. Druga vrsta stanica, bile bi one stanice koje su ugrađene u biljno tkivo. Pojavljuju se kao slojevite stanice koje okružuju međustanični prostor pri čemu tvore kanale ili šupljine u kojima se nalaze biljni sekreti. Mogu se pojaviti i kao jedinstvene stanice bogate sekretima, okružene drugim vrstama biljnih stanica. Spojevi koji čine eterična ulja biološki su aktivne tvari koje unutar biljnog organizma imaju različite biološke funkcije: djeluju kao unutarnji glasnici, kao obrambene tvari koje štite biljku od nametnika ili kao tvari koje privlače insekte važne za oprašivanje biljaka. [3]

1.2. Biosinteza spojeva eteričnih ulja

Prirodni organski spojevi koji čine eterično ulje indirektno se biosintetiziraju iz molekule glukoze nastale procesom fotosinteze, koji se sastoji od niza složenih biokemijskih reakcija koje se odvijaju na svjetlu i u tami. Opći procesi biosinteze spojeva eteričnih ulja prikazani su na slici 1. Glikolizom se molekula glukoze prevodi u fosfoenolpiruvat iz kojeg nastaje šikiminska kiselina, odnosno u piruvat koji se prevodi u acetyl-CoA, iz kojeg je omogućeno nastajanje mevalonske kiseline. Iz navedenih kiselina, posredovanjem enzima, biosintetiziraju se organski spojevi koji čine eterično ulje.



Slika 1. Opći prikaz biosinteze spojeva eteričnih ulja

1.2.1. Proces fotosinteze

Stanične organele u kojima se odvija proces fotosinteze nazivaju se kloroplasti. Biljni kloroplasti su organele dugačke od 5–10 μm , omeđeni su dvostrukom membranom, posjeduju vlastitu DNA i dijele se diobom. Vanjska membrana koja obavija kloroplaste sadrži porinske proteine koji oblikuju kanale i dopuštaju slobodnu difuziju molekula manjih od 1000 daltona. Unutrašnja membrana kloroplasta omeđuje prostor koji se naziva stroma. Transport tvari kroz nepropusnu unutrašnju membranu odvija se posredovanjem proteina koji premošćuju membranu. Unutar strome nalaze se plosnate vrećice ili diskovi koji su obavijeni tilakoidnom membranom. [4]

Produkti fotosinteze koji nastaju u zelenim biljkama rezultat su kooperativnog djelovanja dviju vrsta proteinskih kompleksa vezanih za membranu i osjetljivih na svjetlo, a nazivaju se: fotosustav II i fotosustav I. Za uspješno odvijanje procesa fotosinteze biljki je potrebna svjetlosna energija koju apsorbira pomoću fotoreceptorskih molekula. Glavni fotoreceptor u kloroplastima je biljni pigment klorofil A koji uspješno apsorbira vidljivo svjetlo. U strukturi klorofila A nalazi se magnezijev ion koordiniran s četiri atoma dušika, koji potječu od četiri pirolana prstena. Na jednom od pirolnih prstena esterskom vezon povezan je fitol, a to je hidrofobni alkohol koji se sastoji od 20 ugljikovih atoma. Početak fotosintetskog procesa obilježen je fotokemijskom reakcijom koja započinje u fotosustavu II, pobuđivanjem posebnog para klorofilnih molekula. Obzirom da molekula klorofila A u posebnom paru apsorbira svjetlo na 680 nm, posebni par često se naziva P680. Sunčana svjetlost uzrokuje skok elektrona iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Kod mnogih molekula koje mogu apsorbirati Sunčanu svjetlost,

pobuđeni elektron se vraća u osnovno stanje dok se kod klorofila A pobuđeni elektron premješta s izvorne molekule na akceptorsku molekulu. Apsorpcijom fotona izbacuje se elektron iz P680, a pozitivno nabijeni posebni par $P680^+$ je veoma jak oksidans koji uzima elektrone molekulama vode vezanim za mangansko središte sačinjeno od dva kalcijeva i četiri manganova iona. Mangansko središte u reduciranom obliku, oksidira dvije molekule vode stvarajući jednu molekulu kisika. Nakon pobuđivanja, P680 brzo predaje elektrone obližnjem feofitinu s kojeg se elektroni prenose na čvrsto vezani plastokinon Q_A , a potom na pokretni plastokinon Q_B . Dolaskom drugog elektrona i prihvatanjem dvaju protona, pokretni se plastokinon reducira u QH_2 . Energija dvaju fotona sigurno je i učinkovito pohranjena u obliku redukcijskog potencijala QH_2 . Citokrom bf je proteinski kompleks koji povezuje fotosustav II s fotosustavom I, i omogućuje prijenos elektrona između dva fotosustava. Fotosustav I sadrži poseban par molekula klorofila A koji apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od 700 nm, stoga se taj par molekula klorofila naziva P700. Elektroni od P700 putuju preko klorofila na položaju A_0 i kinona na položaju A_1 do niza klastera $4Fe-4S$. Sljedeći korak je prijenos elektrona na topljivi protein feredoksin koji sadržava klaster $2Fe-2S$ koordinirane s četiri cisteinska ostataka. S feredoksina elektroni se prenose na $NADP^+$. Kada je udio NADPH veoma visok, tada $NADP^+$ može biti nedostupan za prihvatanje elektrona s feredoksina. U tom slučaju elektroni koji dolaze s P700 na feredoksin idu alternativnim putem kojim se prenose na citokrom bf. Tok elektrona kroz citokrom bf uzrokuje ulazak protona u tilakoidni prostor. Povratkom protona iz tilakoidnog prostora u stromu kroz kloroplastnu ATP-sintazu omogućeno je nastajanje ATP. Fotosintetskim reakcijama u tami, biljni organizmi iz plinovitog ugljikovog dioksida i vode sintetiziraju glukozu, nizom reakcija opisanih Calvinovim ciklusom. [5]

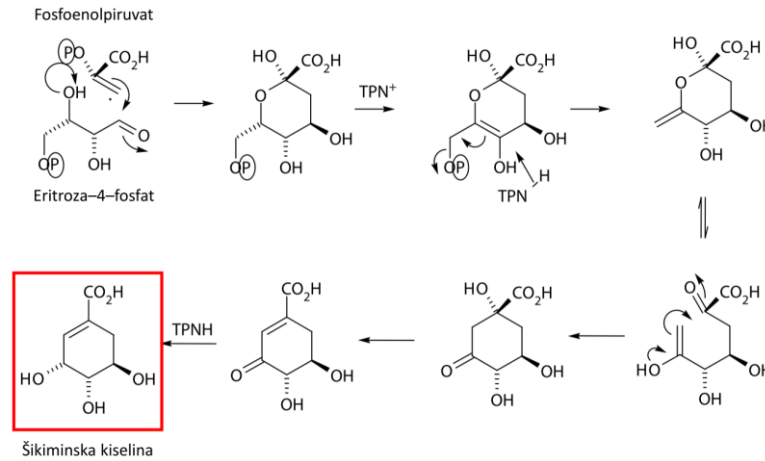
1.2.2. Calvinov ciklus

Nakon što se fotosintetskim reakcijama na svjetlu biljaka opskrbila energijom u obliku ATP i molekulama NADPH, u stromi kloroplasta može započeti Calvinov ciklus koji opisuje proces biosinteze heksoznih šećera–glukoze. Ciklus započinje fiksiranjem molekule CO₂ na molekulu ribuloza–1,5–bisfosfata čime nastaje nestabilan spoj koji se hidrolizom brzo raspada u dvije molekule 3–fosfoglicerata. Proces fiksacije CO₂ na bisfosfat katalitički je potpomognut djelovanjem enzima ribuloza–1,5–bisfosfat–karboksilaza/oksidaza čiji je skraćeni naziv „rubisko“. Za aktivnost enzima potreban je dvovalentni ion, obično Mg²⁺, koji služi za aktivaciju molekule supstrata stabilizacijom njegovog negativnog naboja. Osim dvovalentnog iona, rubisku je potrebna i dodatna molekula CO₂ koja se povezuje s aminokiselinskim ostatakom lizina na položaju 201. Vezivanjem dodatne molekule CO₂ na enzim, olakšano je vezivanje Mg²⁺. Daljnjim odvijanjem ciklusa, molekula 3–fosfoglicerata, nizom reakcija se prevodi u fruktozu–6–fosfat, koja se lako pretvara u svoje izomere glukoza–6–fosfat i u glukoza–1–fosfat. Završni korak Calvinovog ciklusa je regeneracija molekule ribuloza–1,5–bisfosfata. Za redukciju i ugradnju atoma ugljika u molekulu heksoze, potrebno je šest okretaja Calvinovog ciklusa, a to je energetski vrlo zahtjevan proces koji troši energiju u obliku ATP i molekule NADPH za redukcijske reakcije. [5]

1.2.3. Biosinteza derivata šikiminske kiseline

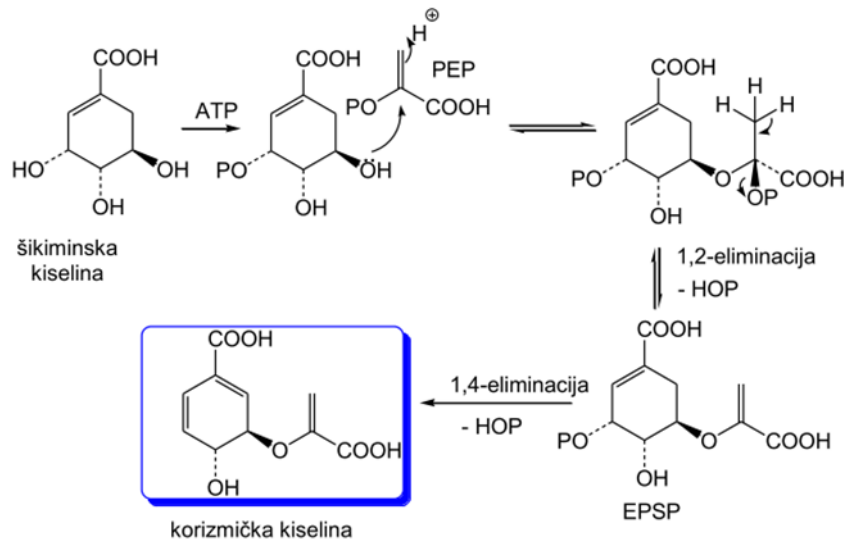
Procesom glikolize koji se odvija u prokariotskim i u eukariotskim stanicama započinje postupak anaerobne razgradnje jedne molekule glukoze u dvije molekule piruvata uz oslobađanje energije u obliku ATP. Kod eukariotskih stanica proces glikolize se odvija u citoplazmi. Početak glikolitičkog procesa obilježen je fosforilacijom molekule glukoze, čime nastaje glukoza-6-fosfat koja se djelovanjem izomeraze prevodi u fruktozu-6-fosfat. Nastali fruktozni produkt, djelovanjem fosfofruktokinaze se prevodi u fruktozu-1,6-bisfosfat. [5] Nizom reakcija u koje su uključeni mnogobrojni enzimi, fruktoza-1,6-bisfosfat se razgrađuje do fosfoenolpiruvata iz kojeg nastaje šikiminska kiselina koja je prekursor za biosintezu fenilpropanskih spojeva, flavonoida i lignina. U biljnom organizmu flavonoidi su važni jer imaju ulogu antioksidansa, biljci daju boju, štite biljku od štetnog ultraljubičastog zračenja... Lignin je važan strukturni element u biljkama, naročito u drvenastom tkivu. [3]

Šikiminska kiselina se biosintetizira reakcijom u kojoj sudjeluje fosfoenolpiruvat i eritroza-4-fosfat (slika 2.), a njeni derivati lako se prepoznaju po supstituiranom benzenovom prstenu.



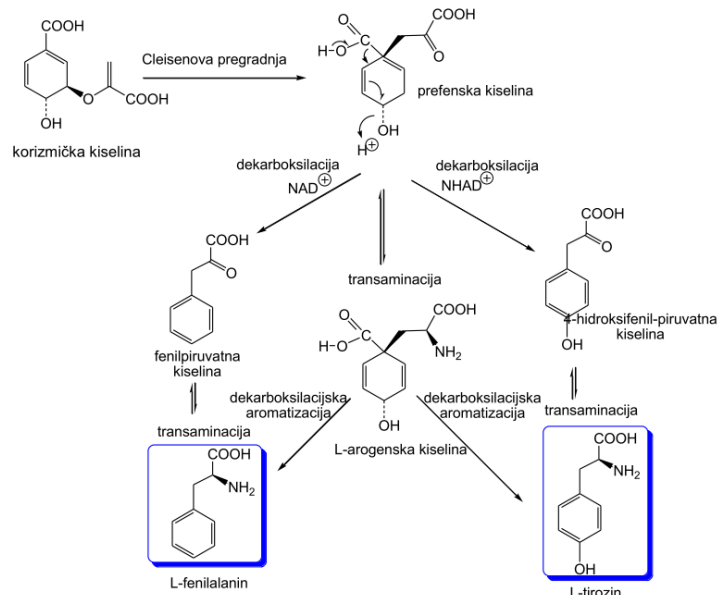
Slika 2. Biosinteza šikiminske kiseline

Za fosforilaciju jedne molekule šikiminske kiseline potrebno je utrošiti energiju u obliku jedne molekule ATP. Adicijsko–eliminacijskom reakcijom (slika 3.), fosfoenolpiruvat se vezuje na fosforiliranu šikiminsku kiselinu, dajući enolni eter, koji 1,4–eliminacijom protona i fosforne kiseline, prelazi u korizmičku kiselinu. [3] [6]



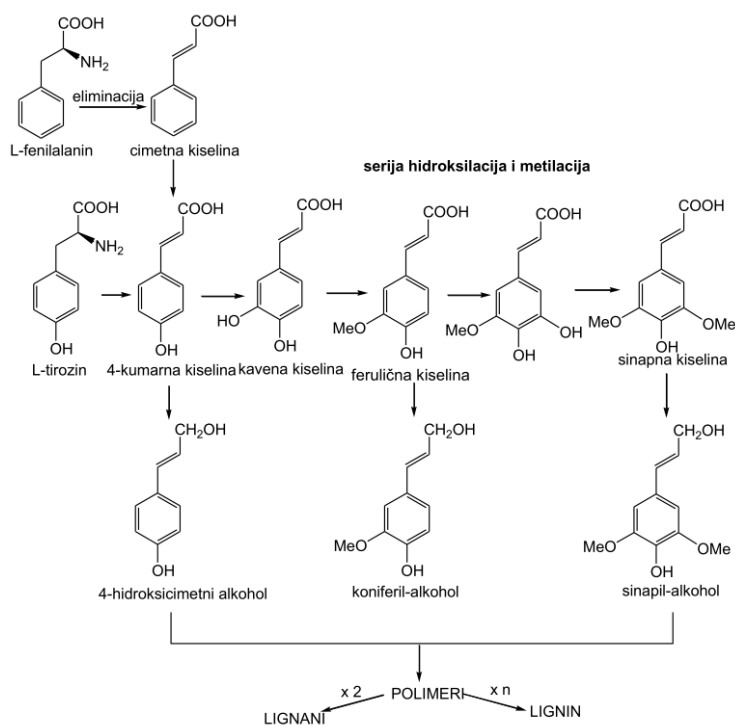
Slika 3. adicijsko–eliminacijska reakcija

Korizminska kiselina je važan međuprodukt šikiminskog biosintetskog puta. Reakcijom pregradnje korizminske kiseline prikazanoj na slici 4, tijekom koje se mijenja položaj bočnog lanca, iz položaja 3 u položaj 1, nastaje perfenska kiselina.



Slika 4. pregradnja korizminske kiseline i biosinteza aminokiselina

Kod biljaka, posredovanjem enzima, iz perfenske kiseline, reakcijom transaminacije nastaje L-arogenska kiselina, iz koje se biosintetizira L-fenilalanin i L-tirozin. Nastale aminokiseline imaju važnu ulogu u nastavku šikiminskog biosintetskog puta jer služe kao građevne jedinice za biosintezu velikog broja fenilpropanskih spojeva. Biosintetski put koji započinje od L-fenilalanina i L-tirozina, preko cimetine kiseline, odnosno 4-kumarinske kiseline, prikazan na slici 5, rezultira nastankom lignana i lignina. [6]



Slika 5. biosintetski putevi L-fenilalanina i L-tirozina

Reakcijama aromatizacije šikiminske kiseline u kojima ne dolazi do vezivanja ugljikovih atoma koji potječu od fosfoenolpiruvata nastaje benzojeva kiselina koja se javlja u nekim eteričnim uljima, a njezini esteri su široko rasprostranjeni. Benzojeva kiselina s hidroksilnom skupinom u ortho položaju, poznata je pod nazivom salicilna kiselina, koja je također u obliku estera prirodno veoma rasprostranjena. Aminobenzojeva kiselina s amino skupinom u ortho položaju, poznata je pod nazivom antranilna kiselina. Njen metilni ester, vrlo jakog mirisa, nalazi se u eteričnim uljima cvjeta gorke naranče i jasmína. [3]

1.2.4. Biosinteza terpena

Miris biljaka i cvijeća uglavnom potječe od lako isparljivih organskih spojeva koji se zajedničkim imenom nazivaju terpeni. Navedena skupina spojeva naziv je dobila od terpentina, isparljive tekućine koja se dobiva destilacijom borova drveta. Zbog svoje strukture terpeni su u vodi netopljivi ugljikovodici koji se dobivaju kao destilat pri zagrijavanju biljnog materijala. Nezasićena strukturna jedinica s dvostrukom vezom ugljik–ugljik, sačinjena od ukupno pet ugljikovih atoma nazvana izopren (2-metilbuta-1,3-dien) čini osnovni građevni element svih složenih terpena, stoga se terpeni nazivaju i izoprenoidi. Izopren se rijetko nalazi u sastavu eteričnog ulja, nije međuprodukt u biosintezi, ali se skelet 2–metilbutana lako prepoznaje u strukturi terpenskih spojeva.

Izoprenske jedinice u molekulama terpena obično su poredane na način „glava–rep“. Razgranati završetak jedne izoprenske jedinice veže se na ne razgranati završetak druge izoprenske jedinice. Međusobno povezivanje izoprenskih građevnih jedinica prisutnim u molekulama iz kojih nastaju složeniji terpeni, ne događa se njihovom direktnom interakcijom. Poput drugih prirodnih spojeva koji se nalaze u sastavu eteričnih ulja, terpeni nastaju složenim biosintetskim putevima koji se odvijaju unutar biljne stanice. Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinca odnosno prema broju ugljikovih atoma prikazana je u tablici 1. [7]

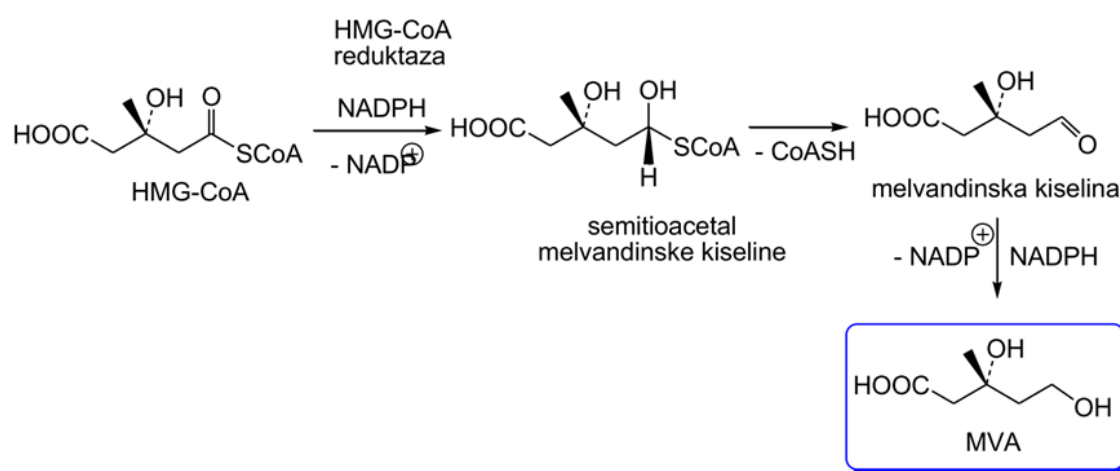
Tablica 1. Podjela terpena [7]

Vrsta	Broj ugljikovih atoma	Broj izoprenskih jedinica
Monoterpen	10	2
Seskviterpen	15	3
Diterpen	20	4
Triterpen	30	6
Tetraterpen	40	8

Fosfoenolpiruvat koji nastaje procesom glikolize, troši se za potrebe šikiminskog biosintetskog puta, ali i za pretvorbu u piruvat koji daje acetyl-CoA, iz kojeg nastaje mevalonska kiselina, važan međuprodukt za biosintezu velikog broja terpenkih spojeva. Prevođenje molekule piruvata u acetyl-CoA je složena reakcija, koja se odvija u tri stupnja, katalizirana je multienzimskim kompleksom piruvat-dehidrogenaza. U prvom stupnju reakcije, piruvat se povezuje s tiamin-pirofosfatom (TPP) i dekarboksilacijom nastaje hidroksietil-TPP. Prvi i drugi stupanj reakcije odvijaju se posredovanjem enzima koji se naziva piruvat-dehidrogenaza, isto kao i multienzimski kompleks. Tijekom drugog stupnja, hidroksietilna skupina vezana na TPP se oksidira i nastaje acetylna skupina, koja se istodobno prenosi na lipoamid, derivat lipoične kiseline, koji je povezan amidnom vezom s aminokiselinskim ostatkom lizina. Prijenos acetylne skupine rezultira stvaranjem energijom bogate tioesterske veze. U završnom trećem stupnju, reakciju prijenosa acetylne skupine s acetylipoamida na CoA katalizira dihidrolipoil-transacetylaza. Nastali acetyl-CoA ima višestruku sudbinu, osim za biosintezu mevalonske kiseline, koristi se i za biosintezu masnih kiselina ili ulazi u ciklus limunske kiseline. [5]

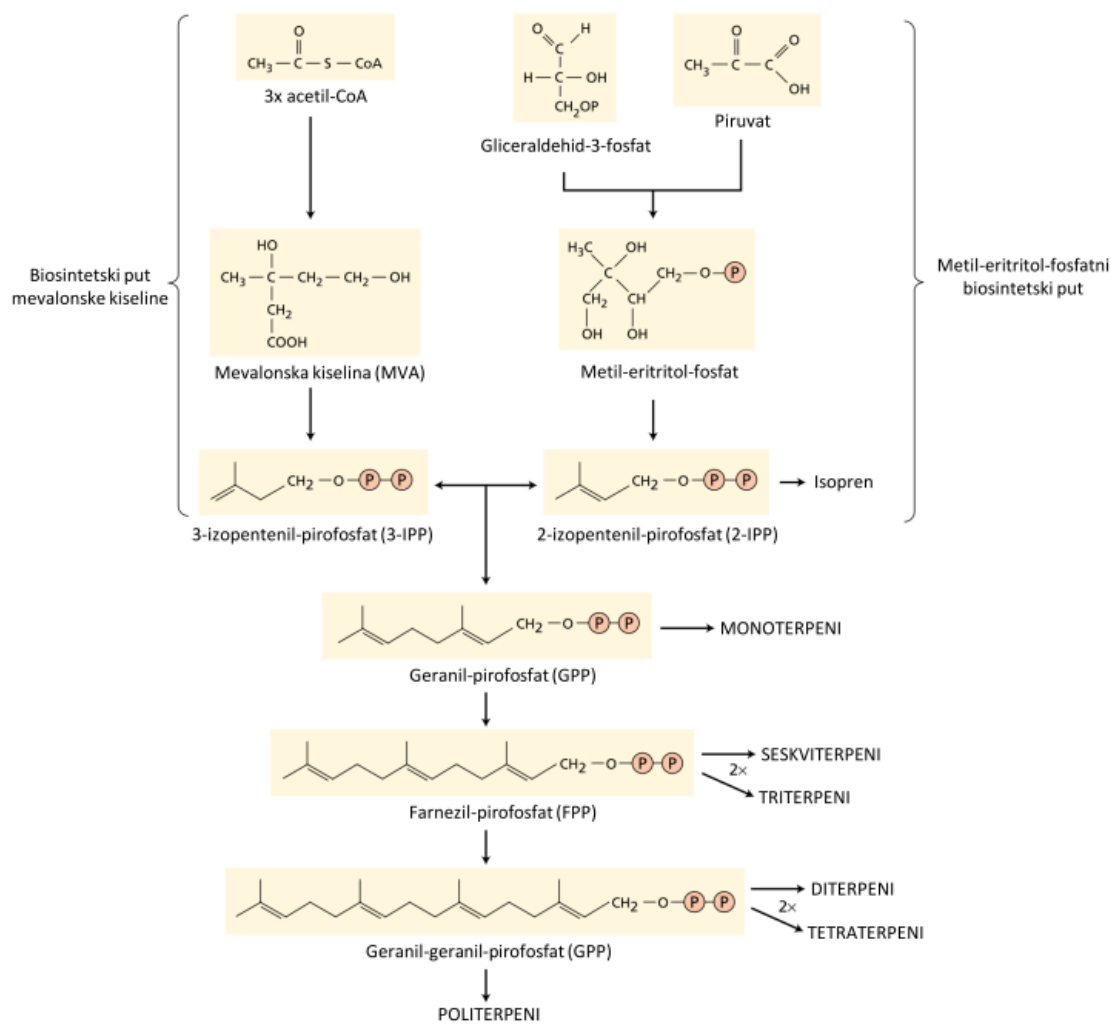
Biosinteza mevalonske kiseline započinje međusobnim povezivanjem dviju molekula acetyl-CoA u reakciji koja je slična Claisenovoj reakciji, čime nastaje acetoacetyl-CoA. Adicijom treće molekule acetyl-CoA na nastali acetoacetyl-CoA u reakciji koja je slična aldolnoj reakciji, nastaje β -hidroksi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Reakcija kojom iz

HMG-CoA nastaje mevalonska kiselina (MVA), prikazana na slici 6., je reakcija redukcije tioestera u aldehid preko semitioacetala, praćena redukcijom aldehidne skupine u alkoholnu. [7] Reakcijama pirofosforilacije, dekarboksilacije i dehidratacije, iz mevalonske kiseline nastaje 3-izopentenil-pirofosfat (3-IPP) koji je aktivirana građevna jedinica za biosintezu terpena. Otkriveno je kako 3-IPP može nastati i metileritritol-fosfatnim biosintetskim putem iz gliceraldehid-3-fosfata i piruvata. Djelovanjem odgovarajuće izomeraze, 3-IPP može se prevesti u 2-izopentenil-pirofosfat (2-IPP) koji se još naziva i dimetilalil-pirofosfat (DMAPP), i uz 3-IPP čini aktiviranu građevnu jedinicu za biosintezu složenih molekula terpena. [8]



Slika 6. Reakcija redukcije tioestera

Biosinteza složenih terpena započinje reakcijom između 3-IPP i 2-IPP čime nastaje geranil-pirofosfat (GPP). Nastali spoj je prekursor gotovo svih monoterpena. GPP se može povezati s drugom molekulom 3-IPP čime nastaje građevna jedinica gotovo svih seskviterpena koja se naziva farnezil-pirofosfat (FPP). Dodatnim vezivanjem nove molekule 3-IPP na FPP nastaje geranil-geranil-pirofosfat (GGPP), prekursor diterpena. Konačno, GGPP i FPP mogu se međusobno vezati, a posljedica toga je nastajanje triterpena i tetraterpena. Biosintetski putevi kojima se odvija biosinteza terpena prikazani su na slici 7. [8]



Slika 7. Biosinteza terprena

1.3. Izolacija eteričnih ulja

Prema ISO i AFNOR standardima, eterična ulja su proizvodi koji se dobivaju samo fizikalnim postupcima izolacije iz sirovog biljnog materijala. [9] Spojevi koji ulaze u sastav eteričnog ulja mogu se izolirati iz cijele biljke ili jednog dijela biljke. Svaka metoda izolacije ima svoje prednosti i nedostatke u odnosu na ostale metode. Metode za izolaciju eteričnih ulja međusobno se mogu uspoređivati obzirom na: prikladnost za stanje biljnog materijala (npr. parna destilacija nije korisna za praškaste materijale), vrijeme utrošeno za postupak izolacije, uvjetima temperature i tlaka koji se trebaju postići, utjecaju vode na hidrolizu, utjecaju temperature na termičku degradaciju, cijeni opreme, troškovima izvođenja postupka... Za primijenjenu metodu bitna je pouzdanost u smislu da ne uzrokuje nastajanje velikog broja artefakata, tj. spojeva koji prirodno nisu prisutni u biljnom materijalu. Metode kod koji se biljni materijal uranja u vodu, zbog hidrolize spojeva s polarnim funkcijskim skupinama moguće je nastajanje artefakata. Kod metoda

tijekom kojih se postiže visoka temperatura, nastajanje artefakata može biti uzrokovano termičkom degradacijom i/ili polimerizacijom spojeva. Laboratorijske aparature u kojima se izvode postupci izolacije eteričnih ulja su: aparatura po Ungeru, Clevengeru i farmakopeji te modifikacije navedenih aparatura, Soxhlet ekstraktor, Likens-Nickersonova aparatura koja omogućuje simultanu destilaciju i ekstrakciju. Tehnološki razvoj omogućio je i razvijanje novih metoda za izolaciju i pročišćavanje eteričnih ulja, baziranih na ekološki prihvatljivim zelenim tehnologijama. [6]

1.3.1. Izolacija eteričnog ulja destilacijom

Destilacija ima prednost u odnosu na druge metode izolacije zbog toga što se tijekom destilacijskog postupka ne izdvajaju oni spojevi koji nisu isparljivi. Postupak izolacije eteričnih ulja destilacijom može se obavljati na tri načina: hidrodestilacijom, parnom destilacijom i vodeno-parnom destilacijom. Tradicionalan način dobivanja eteričnih ulja je hidrodestilacija pri atmosferskom tlaku. Tijekom izvođenja hidrodestilacijskog postupka, aromatična biljka se zagrijava uronjena u vodu i pri temperaturi vrenja vode lako isparljivi biljni spojevi isparavaju zajedno s vodom iako imaju više vrelište od vode. Nastale pare vode i eteričnog ulja, se kondenziraju u hladilu i kondenzat se sakuplja u za to predviđenu posudu. Odvajanje eteričnog ulja od vode provodi se upotrebom organskog otapala i bezvodnog Na_2SO_4 za sušenje. Količina izoliranog eteričnog ulja ovisi o: kvaliteti biljnog materijala, vremenu tijekom kojeg se provodila destilacija, primijenjenom tlaku i temperaturi. [9] Službeno je dopuštena proizvodnja eteričnih ulja primjenom parne destilacije. Tijekom parne destilacije biljni materijal nije uronjen u vodu, a para nastaje zagrijavanjem vode u zasebnoj posudi koja se naziva generator pare. U posudu s biljnim materijalom para ulazi od dolje i gibajući se prema izlazu na vrhu posude, prolazi kroz biljni materijal, uzrokuje destrukciju žlijezda i iz njih oslobađa eterično ulje. Izolacija eteričnih ulja parnom destilacijom može se izvoditi i u uvjetima povišenog ili sniženog tlaka. [10] Kod vodeno–parne destilacije biljni materijali se nalazi na rešetki smještenoj na određenoj visini iznad vode, u istoj posudi. Zagrijavanjem nastaje zasićena i vlažna para koja se podiže i prolazi kroz biljni materijal. Ova metoda se upotrebljava u industrijske svrhe, rijeko kad u laboratoriju. [6]

1.3.2. Izolacija eteričnog ulja ekstrakcijom

Ekstrakcija čvrsto-tekuće, pomoću Soxhlet aparature upotrebljava se kod izolacije eteričnih ulja koja su djelomično topljiva u odabranom otapalu. Temperatura pri kojoj se obavlja ekstrakcija, približno je jednaka temperaturi pri kojoj upotrijebljeno otapalo isparava. Kod standardne Soxhlet aparature, u kivetu od poroznog materijala, uvodi se biljni materijal i kiveta se postavlja na predviđeno mjesto u aparaturi. Kondenzirane pare otapala kapaju u dio aparature u kojem se nalazi kiveta, a ekstrakcija se postiže kontaktom otapala i biljnog materijala. Kad otapalo dosegne određenu razinu, sifonskim cijevima zajedno s izoliranim eteričnim uljem, vraća se u tikvicu unutar koje se nalazi otapalo koje se konstantno zagrijava. Soxhlet aparatura omogućuje reciklažu upotrijebljenog otapala i višestruko, kontinuirano izvođenje većeg broja ekstrakcija. Nedostaci ekstrakcije pomoću Soxhlet aparatu su: za izvođenje ekstrakcije potrebno je nekoliko sati, izolirano eterično ulje se razrjeđuje u velikoj količini otapala i zbog neprestanog zagrijavanja tikvice u koju se sifonskim cijevima vraća reciklirano otapalo zajedno s eteričnim uljem, dolazi do termičke degradacije i gubitka lako isparljivih spojeva. [10]

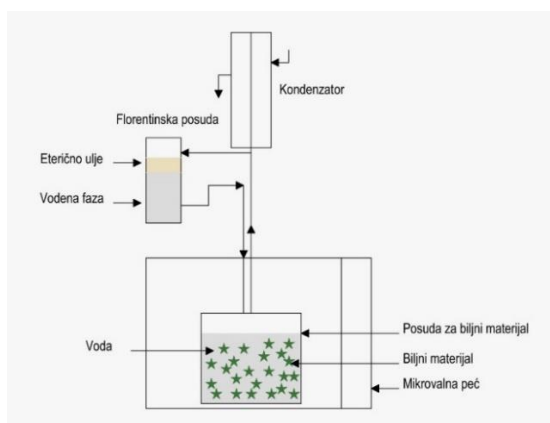
1.3.3. Izolacija eteričnih ulja agruma

Veliki broj eteričnih ulja dobiva se izolacijskim postupcima koji se temelje na destilaciji biljnog materijala, a iznimku čine eterična ulja agruma. Obzirom da je eterično ulje kod agruma sadržano u žlijezdama smještenim u obojenom dijelu kore koji se naziva flavedo, za izolaciju se koriste postupci koji se temelje na tiještenju agruma. Dobivanje eteričnih ulja agruma postupkom hladnog prešanja u određenom smislu jedna je od najstarijih metoda proizvodnje eteričnih ulja. Laboratorijski način dobivanja eteričnog ulja agruma hladnim prešanjem, temelji se na sljedećim postupcima: voće se izreže na sitnije komadiće, odvaja se unutrašnji dio ploda od kore, flavedo se pritišće rukom kako bi se poremetila struktura žlijezda, oslobođeno eterično ulje sakuplja se u posudu u kojoj se nalazi led i NaCl. Nakon centrifugiranja pri brzini od 4000 RPM pri temperaturi od 5 °C, tijekom 15 minuta, pažljivim dekantiranjem pomoću pipete odvoji se izdvojeno eterično ulje. Sušenje eteričnog ulja može se obaviti bezvodnim Na₂SO₄, tijekom 24h pri temperaturi od 5 °C kako bi se uklonile prisutne masti i voskovi. Osušeno i pročišćeno eterično ulje agruma čuva se pri temperaturi od -21 °C do trenutka analize ili upotrebe. [9]

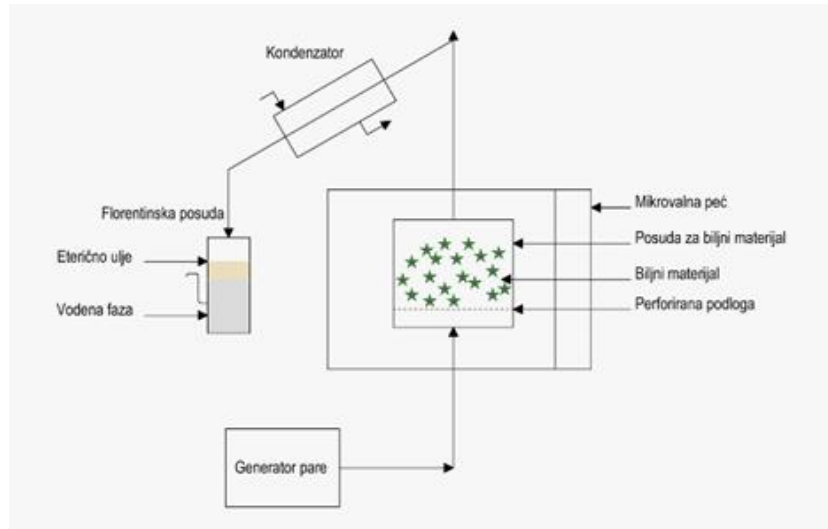
1.3.4. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija

Postupak izolacije eteričnih ulja mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom (engl. microwave assisted extraction, MAE) razlikuje se od klasičnih metoda zbog toga jer se izolacija postiže promjenama unutar stanice izazvanim djelovanjem elektromagnetskih valova. Način prijenosa energije glavna je karakteristika MAE. Kod klasičnih metoda izolacije energija se prenosi konvekcijom, kondukcijom i zračenjem kroz površinu biljnog materijal. Tijekom MAE, interakcijom molekula i elektromagnetskog polja u biljnim stanicama dolazi do transformacije elektromagnetskog zračenja u toplinsku energiju. U odnosu na klasične metode izolacije, MAE omogućuje izolaciju eteričnog ulja i veće iskorištenje u kraćem vremenu zbog dva sinergijska efekata: zagrijavanje biljnog materijala i transport izoliranih molekula odvija se u istom smjeru, iz unutrašnjosti stanica prema van. Uređaj za MAE sastoji se od četiri dijela: mikrovalne peći, posude za biljni materijal koja je povezan s vanjskim sustavom za kondenzaciju para i od posude u koju se sakuplja kondenzat. [11]

Postupak izolacije eteričnih ulja mikrovalnom hidrodestilacijom (engl. microwave hydrodistillation) temelji se na klasičnom postupku hidrodestilacije. Navedena tehnika je primjenjiva za izolaciju eteričnog ulja iz velikog broja biljaka i začina. U posudu u koju se uvodi biljni materijal, dodaje se i voda (2 L). Uređaj za mikrovalnu hidrodestilaciju prikazan je na slici 8. Na početku izolacije u postavkama uređaja podesi se očekivano vrijeme potrebno za izvođenja izolacije i snaga mikrovalova. Postupak mikrovalne parne destilacije (engl. microwave steam distillation) temelji se na klasičnom postupku parne destilacije. Generator za proizvodnju pare odvojen je od peći. Uređaj za mikrovalnu parnu destilaciju prikazan je na slici 9. [11]

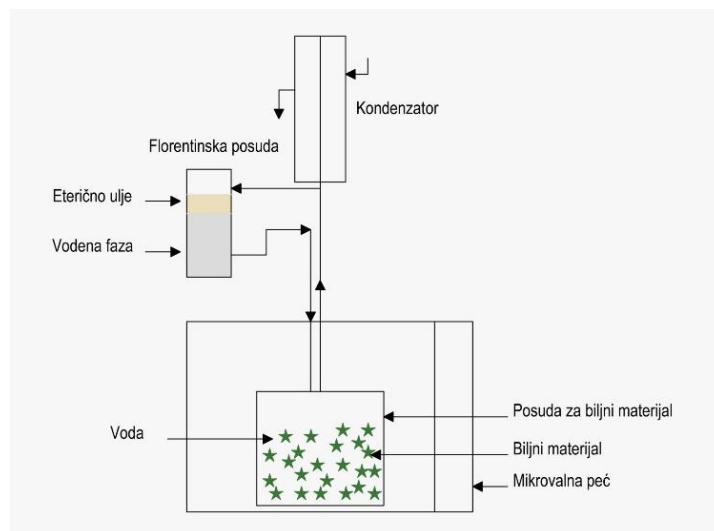


Slika 8. Mikrovalno hidrodestilacija



Slika 9. Mikrovalna parna destilacija

SFME (engl. Solvent-free-microwave-assisted extraction) je novija metoda izolacije eteričnih ulja postupkom ekstrakcije pri atmosferskom tlaku, bez upotrebe organskog otapala i vode. Na početku postupka u postavkama uređaja podese se željeni uvjeti: očekivano vrijeme potrebno za izvođenje izolacije, temperatura i snaga. Postupak ekstrakcije SFME metodom temelji se na zagrijavanju vode unutar biljnih stanica. Zagrijana voda u staničnim žlijezdama izaziva oslobađanje eteričnog ulja koje zajedno s vodom isparava iz stanica. Nakon izolacijskog postupka, eterično ulje od vode može se odvojiti na klasičan način, upotrebom organskog otapala i bezvodnog Na_2SO_4 za sušenje. [11]

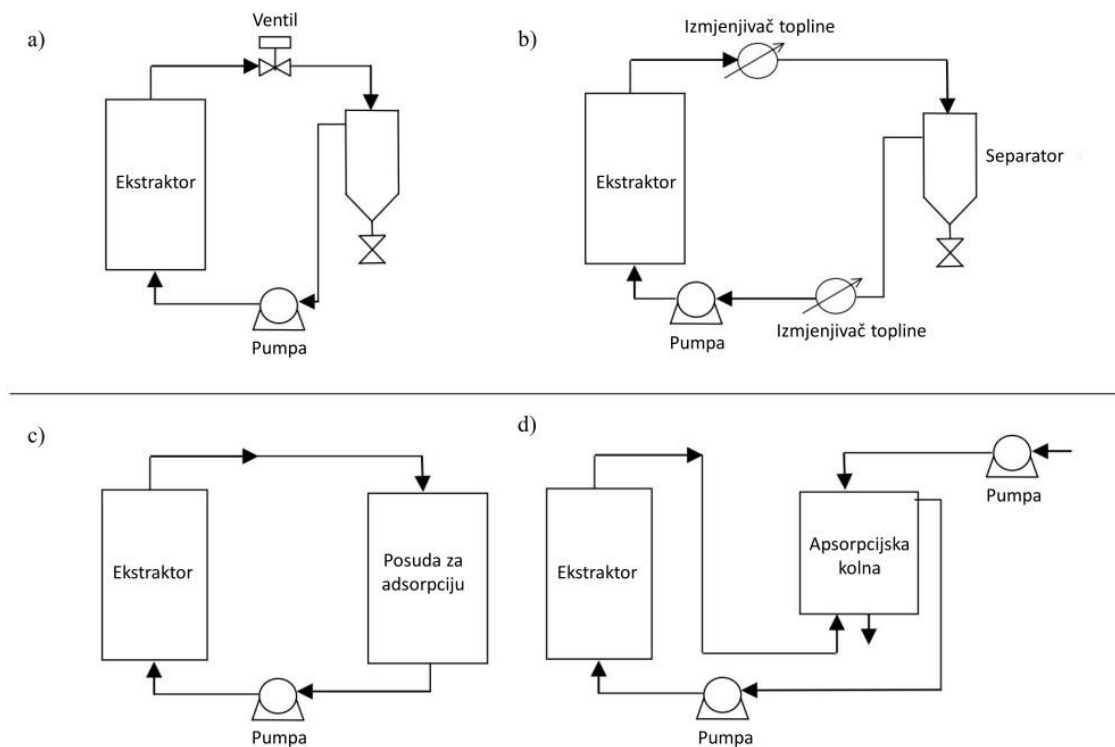


Slika 10. Mikrovalna parna destilacija

1.3.5. Ekstrakcija superkričnim fluidom

Prednost ekstrakcije eteričnih ulja superkričnim fluidima je u tome što se promjenom tlaka i temperature može utjecati na gustoću, a time i na selektivnost superkričnog fluida koji ima malu površinsku napetost, malu viskoznost i umjereno visok koeficijent difuzije. Zbog toga se ekstrakcija superkričnim fluidima često upotrebljava za selektivnu izolaciju i za pročišćavanje spojeva iz složenih smjesa. Fluidi koji se mogu upotrijebiti u superkričnim uvjetima su: CO₂, etan, propan, voda, n-heksan, metanol. Postupak izolacije spojeva eteričnih ulja superkričnim fluidom sastoji se od dvije faze: ekstrakcije spojeva iz biljnog materijala (topljivih u superkričnom fluidu) i separacije izoliranih, otopljenih spojeva od superkričnog fluida. [12]

Superkrična ekstrakcija fluidom omogućuje selektivno razdvajanje spojeva eteričnog ulja na temelju njihove isparljivosti. Ukoliko se ekstrakcija spojeva eteričnog ulja obavlja pri visokom tlaku, lako i teže isparljivi spojevi istovremeno se otopaju u superkričnom fluidu visoke gustoće. Provođenjem smjese superkričnog fluida i ekstrakta kroz više stupnjeva uređaja u kojima se tlak postepeno smanjuje, dolazi do odvajanja najprije frakcije spojeva koji teže isparavaju, u idućem stupnju, daljnjim smanjivanjem tlaka bit će omogućeno odvajanje lakše isparljivih spojeva eteričnog ulja. [12]



Slika 11. Opći prikaz separacije ekstrakta od superkričnog fluida: a) smanjenje tlaka, b) promjenom temperature, c) adsorpcijom, d) apsorpcijom.

Postupak separacije izoliranih spojeva od superkritičnog fluida može se provesti na dva načina: promjenom termodinamičkih parametara superkritičnog fluida, adsorpcijom ili apsorpcijom. Češće upotrebljavana metoda za separaciju izoliranih spojeva od superkritičnog fluida je izoentalpijsko smanjenje tlaka (slika 11. a), što uzrokuje smanjenje gustoće fluida, a time se smanjuje i moć otapanja tvari koju posjeduje superkritični fluid. Separacija se može provesti i promjenom temperature (slika 11. b) pri stalnom tlaku. Ako se topljivost spojeva poveća s povećanjem temperature, tada će smanjenje temperature uzrokovati smanjenje topljivosti spojeva te njihovu separaciju od superkritičnog fluida, i obratno. Ukoliko se separacija provodi pomoću nekog pomoćnog agensa koji djeluje kao adsorbens (slika 11. c), obavljanje ekstrakcije može se provesti bez značajnih promjena tlaka što pojeftinjuje proces izolacije spojeva. Ovaj način izvođenja ekstrakcijskog procesa daje manje iskorištenje, dolazi do velikih gubitaka ekstrakta, zbog toga jer se izolirani spojevi teško odvajaju od adsorbensa. Kako bi se smanjili gubici, separacija adsorpcijom može se zamijeniti s apsorpcijom (slika 11. d). Ekstrakt otopljen u superkritičnom fluidu protustrujno se ispiri s apsorpcijskim fluidom u koloni ili se unutar tornja raspršuje pod pritiskom. [12]

1.4. Antimutagena svojstva eteričnih ulja

Mutageni su kemijski spojevi ili fizikalne pojave (npr. ionizirajuće ili ultraljubičasto zračenje) koje u stanici izazivaju promjene ili oštećenje DNA molekule, što dovodi do promjene funkcije gena i svojstava kodiranih tim genom. [13] Antimutageni spojevi su učinkoviti jer potiču popravak DNA molekule ili inhibiraju one popravke koji vode k nastanku oštećene DNA molekule. Eterična ulja koja imaju antimutagena svojstva, različitim mehanizmima sprječavaju oštećenja DNA molekule: inhibiraju ulazak mutagena u stanicu, direktno uklanjaju mutagene iz stanice, inhibiraju mutagene nastale oksidacijom, aktiviraju antioksidacijske enzime, inaktiviraju metaboličku konverziju promutagena u mutagene. [14]

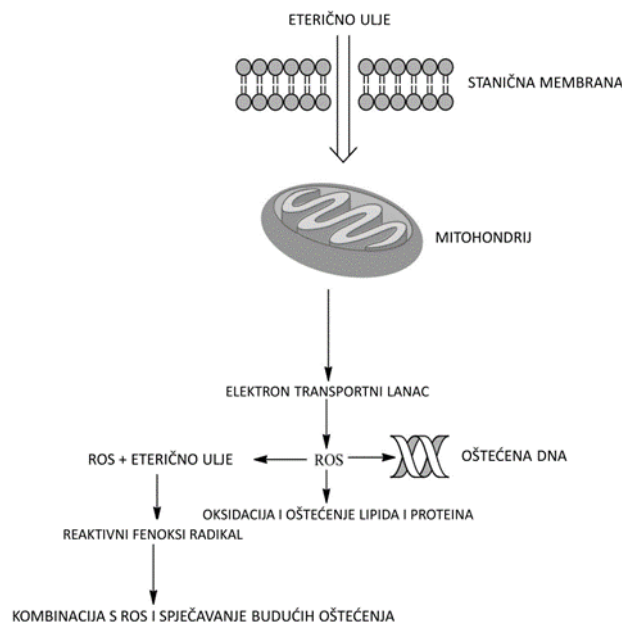
1.5. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja

U posljednje vrijeme mnogi istraživači eteričnih ulja istražuju njihova antioksidacijska svojstva zbog potrage za sigurnim prirodnim antioksidansima. Mnoge studije pokazuju kako su eterična ulja idealan prirodni izvor antioksidansa. Oksidacijskim procesima uzrokovanim djelovanjem slobodnih radikala, dolazi do modifikacija u strukturi i do oštećenja bioloških makromolekula. Posljedica oštećenja su starenje organizma i nastanka različitih bolesti kao što su: rak, oboljenja jetre, Alzheimerova bolest, artritis, dijabetes, javljaju se različite upale... Mnoge bolesti mogu se liječiti sprječavanjem oksidacijskog oštećenja. [14]

Slobodni radikal je atom ili skupina koja ima jedan ili više nesparenih elektrona. Mogu biti električni nabijeni ioni ili nenabijene vrste. Unutar biološkog sustava, slobodni radikali mogu nastati oksidacijsko-redukcijskim reakcijama tijekom kojih se elektroni prenose na atome ili ione metala, ili u suprotnom smjeru. Većina slobodnih radikala, zbog nesparenih elektrona je vrlo reaktivna i oni se obično ne mogu izolirati. Čak je u nekim slučajevima za otkrivanje slobodnih radikala potrebno primijeniti indirektne metode. [7] Pojam „reaktivne kisikove vrste“ (ROS) predložen je 1982. godine za opisivanje kemoluminiscencije aktiviranih ljudskih monocita, i brzo je prihvaćen od strane znanstvene zajednice, iako u to vrijeme nije bila poznata većina kisikovih spojeva, koji svojom reaktivnošću uzrokuju oštećenja bioloških makromolekula.

Mitochondriji su glavni izvori ROS. U eukariotskim stanicama, hidroksilni radikali uzrokuju velika oštećenja mitohondrijske DNA. Oštećena mitohondrijska DNA inhibira ekspresiju proteina za prijenos elektrona, što dovodi do nakupljanja ROS. Superoksidni anionski radikal (O_2^-) nastao oksidacijskom fosforilacijom u reakciji s dušikovim oksidom (NO) daje peroksinitritni ion koji je nestabilan, protoniranjem prelazi u peroksinitritnu kiselinu. Nastala kiselina je izuzetno reaktivna, hidroksilnim cijepanjem stvara hidroksilni radikal koji modificira aminokiselinske ostatke tirozina, fenilalanina, triptofana, histidina, metionina i cisteina. U anaerobnim uvjetima hidroksilni radikali potiču umrežavanje proteina stvaranjem disulfidnih mostova i tirozil–tirozil vezivanje, dok peroksi radikali induciraju fragmentaciju polipeptidnih lanaca. Prolin, arginin i lizin su osjetljivi na oksidaciju kataliziranu metalima, što dovodi do nastajanja karbonilnih derivata. Oksidacija biogenih amina u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, pomoću monoamin oksidaze dovodi do nastajanja vodikovog peroksida. Modifikacije unutar stanice uzrokovane ROS i reaktivnim dušikovim vrstama (RNS) dovode do umrežavanja

proteina i stvaranja agregata. Zbog strukturnih promjena, proteini postaju otporni na proteolitičku razgradnju i zbog toga se iz stanice teško uklanjaju. Akumulacija modificiranih proteina može utjecati na stanične signalne puteve promjenom enzimskih, regulatornih i transportnih potencijala specifičnog staničnog proteina. Reaktivni dušikovi spojevi koji ulaze u interakciju s aminokiselinskim ostacima cisteina, metionina, fenilalanina i tirozina, dovode do oštećenja membrane i inaktivacije ključnih enzima. Nitriranjem ostataka tirozina u proteinu se sintetizira 1,3-nitrotirozin koji predstavlja in vivo marker za oksidativni stres uzrokovan peroksinitritom. Ditirozina je oksidacijski produkt tirozina, koji nastaje u prisustvu vodikovog peroksida djelovanjem mieloperoksidaze između slobodnog tirozina i aminokiselinskog ostatka tirozina u proteinu. Lipidna peroksidacija uzrokuje nastajanje aldehydskih ROS, uključujući 4-hidroksinonenal i akrolein. Nastali 4-hidroksinonenal reagira sa sulfhidrilnom i amino skupinom pri čemu inhibira DNA polimerazu, dehidrogenaze i različite sustave za transport tvari. Akrolein koji u organizmu nastaje lipidnom peroksidacijom, najaktivniji je α,β -nezasićeni aldehid. Reakcijom s lizinom i histidinom lako se ugrađuje u proteine formirajući Michaelis-ove komplekse akrolein–aminokiselina. [15] Dodatkom eteričnih ulja u stanicama se potiče nastajanje reaktivnog fenoksi radikala koji će reagirati s novonastalim ROS i time spriječiti njihovo daljnje štetno djelovanje na biološke makromolekule. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja eteričnog ulja i fenoksi radikala s ROS prikazan je na slici 12. [14]



Slika 12. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja eteričnog ulja

1.6. Rak

Različite bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji, kliničkoj slici i načinu liječenja, zajednički se nazivaju rak. [16] Rak je naziv za sve zloćudne tumore koji se mogu podijeliti na: karcinome (tumori epitelnih i mukoidnih stanica), sarkome (tumori vezivnog i potpornog tkiva) i hemoblastome (tumori hematopoetičkog tkiva). [17] Svi oblici raka nastaju od zdravih stanica, procesom koji se naziva zloćudna pretvorba. Protoonkogeni su geni zdravih stanica koji reguliraju staničnu proliferaciju, diferenciju i uključeni su u prijenos signala. Stanica iz svog okruženja prima signale u obliku malih molekula koje se najčešće vežu za receptore na staničnoj membrani, čime se aktiviraju signali putevi koji vode sve do transkripcijskih mehanizama, a oni utječu na ekspresiju gena. Zdrava stanica zbog određenih promjena izgubi sposobnost odgovaranja na signale koji potječu od organizma, gubi svoju funkciju i dolazi do nekontrolirane diobe stanica. Onkogeni, to su prvi geni koji dovode do nastanka raka, nastaju izmjenama koje se događaju u protoonkogenima. Do aktivacije onkogeno može doći na više načina: zbog mutacijskih promjena, zbog povećanog broja kopija gena ili zbog kromosomske translokacije, a to je poremećaj kad se jedan dio kromosoma odvoji i veže se s drugim kromosom. Promjene unutar stanica koje dovode do nastanka raka uglavnom su genetske mutacije. U manjem broju slučajeva mutacije koje izazivaju rak mogu se naslijediti, a najčešće nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutageno ili nasumično zbog grešaka uslijed umnažanja DNA. Postoje dvije vrste mutacija: pokretačke (engl. driver) i usputne (engl. passenger). Većina mutacija koje se mogu pronaći u stanicama raka su usputne mutacije koje nisu bitne za nastajanje i napredovanje raka i vjerojatno su posljedica genetske nestabilnosti. Različiti tipovi raka imaju različite pokretačke mutacije. Svaka pojedina stanica ima više pokretačkih mutacija u različitim genima koji izazivaju pretvorbu zdrave stanice u stanicu raka. [16]

1.6.1. Metabolizam zloćudnih stanica

Prema biološkim i biokemijskim parametrima zloćudne i zdrave stanice se kvalitativno i kvantitativno razlikuju. Promjene koje dovode do nastanka raka u metabolizmu stanice na molekularnoj razini, započinju u jezgri i mitohondrijima, i biokemijskim procesima se odražavaju na biologiju cijele stanice. Kod zloćudnih stanica unutar jezgre i mitohondrija povećana je sinteza DNA, RNA, događa se modifikacija tRNA i povećava se aktivnost RNA-polimeraze koja sudjeluje u procesu transkripcije. Povećana sinteza nukleinskih

kiselina zahtjeva i veću količinu spojeva s dušikom. Dodatnu količinu spojeva s dušikom zloćudna stanica osigurava povećanjem metabolizma poliamina. Veći broj molekula DNA i RNA uzrokuje povećanu sintezu modificiranih proteina. Za zloćudne stanice je karakteristična smanjena aktivnost ili izostanak enzima i izoenzima koji sudjeluju u specifičnim funkcijama stanice. Nisu prisutni izoenzimi čija aktivnost podliježe regulaciji hormona ili drugim mehanizmima, umjesto njih pojavljuju se enzimi i proteini karakteristični za fetalne stanice. Smanjenja aktivnost adenilat-ciklaze dovodi do smanjenja koncentracije cAMP te izostaje utjecaj cAMP na enzimske sustave, na brzinu rasta, sintezu i razgradnju citoskeleta, oblik stanice i njihovu pokretljivost, adhezivnost i moć aglutinacije. Povećana je aktivnost proteinskih kinaza neovisnih o cAMP, što dovodi do pojačane fosforilacije proteina jezgre koji ne sadržavaju histone. Usporedbom zdravih i zloćudnih stanica uočena je razlika u veličini, strukturi i funkcionalnosti mitohondrija. Kod zloćudnih stanica mitohondriji su manji, sadrže manji broj krista, imaju promijenjen sastav membranskih proteina i lipida. Sve navedeno rezultira smanjenjem kapaciteta disanja mitohondrija i uzrokuje izraženiju anaerobnu glikolizu kojom zloćudne stanice osiguravaju potrebnu energiju. Stanične membrane i membrane mitohondrija kod zloćudnih stanica su bogatije kolesterolom i sadrže manji udio nezasićenih masnih kiselina. Aktivniji je transport šećera, aminokiselina i iona kroz membranu zloćudne stanice. Time se u stanici povećava količina supstrata za proces glikolize, što pridonosi proliferaciji zloćudne stanice. Poremećena je signalizacija unutar stanice, povećanim unosom i smanjenim otpuštanjem Ca^{2+} iz mitohondrija. U mitohondrijima je aktivnost peroksid-dismuzate smanjena, pa se nakupljaju peroksidni radikali koji oksidiraju SH skupine enzima, čime se mijenja redoks sustav stanice i pojačana je peroksidacija lipida. Kod zloćudnih stanica uočene su i promjene u razgradnji proteina, izrazito je povećana aktivnost kolagenaze, a taj enzim se smatra odgovornim za infiltraciju i destruktivno djelovanje zloćudnih stanica u zdravom okolnom tkivu. Zloćudne stanice otpuštaju jednu serinsku proteazu koja aktivira plazminogen i katepsin. Katepsin B otpušten iz zloćudnih stanica mogao bi biti uzrok promjenama proteina stanične membrane i smanjenoj adheziji. Metastaziranje se sastoji od nekoliko faza tzv. metastatske kaskade. Primarni tumor urasta u okolno tkivo, u krvne i limfne žile. Kada se zbog smanjenja adhezivnosti neke stanice odvoje od tumorske mase, one se krvlju i limfom prenose u druge organe. Iako najveći dio stanica tijekom tog puta umre, neke ipak dospijevaju u druge dijelove tijela, gdje se nakupljaju u krvnim žilama i prijanjaju uz stijenku krvne žile stvarajući novi tumor ili metastazu koja ponovno urasta u okolno tkivo. Za razvoj metastaza, dovoljno je

da samo jedna zloćudna stanica preživi put od primarnog mjesta nastanka tumora da zdravog dijela tijela. [17]

1.6.2. Rak dojke

U zemljama zapadnog svijeta rak dojke je drugi najčešći zloćudni tumor u čovjeka koji se može pojaviti i kod muškaraca. Čini 25% tumora u žena i uzrokuje oko 15% smrtnih slučajeva. Prema statističkim procjenama, tijekom života, svaka deveta žena će dobiti rak dojke. U Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira oko 2600 novih oboljenja, a oko 800 žena umre od raka dojke. U odnosu na zapadne zemlje i Hrvatsku, učestalost raka dojke u Aziji je mnogo niža. Istraživanja su pokazala kako je učestalost raka dojke veća u ekonomski razvijenim zemljama, na populaciji od 100 000 žena njih od 60 do 100 oboli od raka dojke, dok je u manje razvijenim zemljama broj oboljeli u rasponu od 20 do 60. Nastanak raka dojke uvjetovan je mnogim biološkim čimbenicima. Rak dojke najčešće se očituje kao bezbolan čvor u dojci, može se pojaviti krvavi iscjedak smečkaste boje, uvlačenje bradavice te otekline, navlačenje kože i upala u području tumora. Kod tumora koji su uznapredovali, zahvaćen je dio ili cijela dojka sa širenjem u okolne limfne čvorove. Upalni rak dojke je posljedica širenja raka u limfatične prostore dojke, očituje se upaljenom, crvenom, otečenom dojkom i kožom poput kore naranče. Pojava raka dojke kod žena mlađih od 20 godina iznimno je rijetka, a prvi znakovi koji mogu upućivati na razvoj raka dojke mogu se pojaviti u životnoj dobi od 35 do 40 godina. Jedan od najznačajnijih čimbenika koji doprinosi razvoju raka dojke je starija životna dob. U dobi od 80 godina, na populaciji od 100 000 žena, od raka dojke oboli od 200 do 300 žena. Kod nekih žena nastanak raka dojke je genetski uvjetovan zbog čega se javlja u mlađoj životnoj dobi i često je obostran. Otkrivena su dva gena koja dovode do raka dojke BRCA 1 i BRCA 2 (engl. breast cancer gene 1 i 2). Pojava mutacija na jednom ili na oba gena izaziva povećani rizik od oboljenja. Žene čija je majka ili teta imala rak dojke, imaju 8 puta veći rizik za oboljenje u odnosu na one žene kod koji pojava raka dojke nije genetski uvjetovana. Općenito gledano, samo 10% slučajeva raka dojke može se povezati s genetskim utjecajem. Povećana tjelesna masa može biti jedan od uzroka raka dojke. Kod pretilih žena u postmenopauzalnom razdoblju, zbog utjecaja estrogena koji se sintetizira u masnome tkivu, postoji povećan rizik od nastanka raka dojke. Pojava raka dojke može se povezati i upotrebom oralnih kontracepcijskih preparata. Žene koje su upotrebljavale oralne kontraceptive u dobi prije 25 godina, u vremenu duljem od 4 godine, za 52% imaju povećan rizik za nastanak raka dojke. Uzimanje kontraceptiva u dobi nakon 25 godina

nema štetne posljedice koje bi mogle dovesti do razvoja raka dojke. Nerotkinje imaju 4 puta veću učestalost raka dojke od žena koje su rađale. Poznato je da ranija trudnoća i porođaj imaju protektivnu ulogu u nastanku raka dojke. Žene koje prvi put rode u dobi od 30 do 35 godina imaju 4 puta veći rizik za nastanak raka dojke, u odnosu na populaciju žena koje su prvi porođaj imale u dobi od 20 do 25 godina. Veći broj porođaja povezan je s manjom vjerojatnošću nastanka raka dojke. [16]

1.6.3. Kemoterapijski lijekovi

Postojeći i na tržištu dostupni lijekovi koji se koriste u kemoterapijske svrhe imaju širok spektar nuspojava zbog čega je opravdano dovesti u pitanje njihovu učinkovitost i sigurnost. Citotoksini u trenutačno dostupnim lijekovima izazivaju opadanje kose, suzbijaju rast koštane srži, utječu na imunološki sustav, izazivaju osjećaj mučnine i povraćanje. Većina citotoksičnih kemoterapeutika utječe na sposobnost umnažanja stanica, ali ne i na glavne karakteristike koje omogućuju razvoj raka. Uzroci smrti većine pacijenata s rakom pripisuju se višestupanjskim biokemijskim procesima tijekom kojih dolazi do odvajanja i migracije invazivnih stanica s primarnog mjesta nastanka oboljenja. Implantacijom invazivnih stanica u zdravim tkivima i organima, dolazi do rasta krvnih žila potrebnih za širenje raka. Zbog svih navedenih razloga postoji potreba za pronalaskom novih djelatnih spojeva koji će omogućiti razvoj novih lijekova za rak. Od novih lijekova koji inhibiraju širenje raka na sekundarna mjesta očekuje se da djeluju na jedan ili više uzroka koji doprinose metastaziranju raka i time poboljšaju ishod i učinak kemoterapija. [18]

1.7. Citotoksičnost

Citotoksin je kemijski spoj koji u testu citotoksične aktivnosti izaziva staničnu smrt. Postoji nekoliko različitih testova citotoksične aktivnosti koji se međusobno razlikuju prema staničnom mehanizmu i samim time prema ishodu testa. Citotoksini mogu imati reverzibilan ili ireverzibilan učinak na stanicu koji se opaža trenutno ili tek nakon nekoliko tjedana. Učinak citotoksina može se objasniti fizikalno-kemijskim promjenama uočenim nakon tretiranja stanica na jedan od predloženih načina: citotoksin izaziva trenutni gubitak vijabilnosti; farmaceutski citotoksin može imati blagi trenutni učinak, ali progresivan učinak tijekom metaboliziranja, neki citotoksini mogu uzrokovati gubitak reprodukcijskog potencijala. Stanice kod kojih se dogodila nepovoljna fizikalno-kemijska promjena izazvana ireverzibilnim oštećenjem, vjerojatno će umrijeti nekrozom. Tijekom nekroze dolazi do raspadanja staničnih organela, oslobađaju se autokatalitički enzimi,

stanica postaje propusna. Drugi način umiranja stanica je proces apoptoze kao odgovor na specifične fiziološke signale. Do generiranja unutarstaničnih signala može doći zbog oštećenja na molekuli DNA, a vanstanični signal koji pokreće apoptozu može biti proizveden od strane tkiva kako bi se smanjila populacija određene vrste stanica. Ireverzibilna citostatska aktivnost događa se kod ulaska stanica u apoptozu, kod gubitka funkcije stanice ili kad su stanice inducirane da diferenciraju. Djelovanje citotoksina na stanicu ne mora uvijek biti pogubno, barem ne odmah. Stanice mogu proći promjene u metabolizmu ili zaustavljane staničnog ciklusa bez gubitka vijabilnosti. Ovo nazivano citostatički efekt i obično je reverzibilan, a najčešće nastaje zbog nedostatka hranjivih tvari ili faktora rasta te prisustva negativnih regulatora rasta. [19]

1.7.1. *In vitro* testovi

Testovi citotoksične aktivnosti u *in vitro* uvjetima koji se provode na specifičnim staničnim sojevima, omogućuju pažljivu kontrolu fizikalno-kemijskog i fiziološkog okruženja dajući konzistentnost uzrokovanja i reproducibilne podatke, što olakšava statističku obradu i smanjuje broj potrebnih ponavljanja. Izvođenjem *in vitro* testova koncentracija kemijskog spoja s kojim se stanice tretiraju i vrijeme izloženosti, lakše se kontrolira nego u *in vivo* uvjetima, naročito ako se radi o nestabilnim ili metabolički labilnim spojevima. Testovi vijabilnosti u *in vitro* uvjetima su oni testovi koji daju brzi rezultat o statusu stanica. Prikladni su za procjenu statusa stanica nakon smrzavanja i odmrzavanja. Većina testova vijabilnosti bazira se na mjerenju integriteta staničnih membrana dodatkom boje kao što je tripan plavo. Žive stanice čija je membrana očuvana, odupiru se apsorpciji boje dok kod mrtvih stanica boja ulazi unutar stanice. Iako su jednostavni za izvođenje, *in vitro* testovi imaju niz nedostataka u odnosu na *in vivo* testove koji se izvode upotrebom laboratorijskih životinja. Kod standardiziranih *in vitro* testova teško je simulirati kinetiku koja se događa u *in vivo* uvjetima. Metabolička aktivnost ispitivanog spoja u *in vitro* ovisi o utjecaju spoja na jednu vrstu stanica dok će u *in vivo* uvjetima ovisiti o utjecaju na različita tkiva. Iste stanice u *in vitro* i *in vivo* uvjetima mogu imati različitu propusnost zbog toga jer na propusnost stanice u *in vivo* uvjetima utječu hormoni te debljina i složenost tkiva. Kultivirane stanice koje se upotrebljavaju za izvođenje *in vitro* testova sklone su genskoj nestabilnosti, posebno kod upotrebe staničnih linija koje se više puta presađuju, čime može doći do rasta stanica koje se razlikuju u odnosu na primarne stanice koje su izolirane iz tkiva. Kulturama stanica nedostaje složenost

staničnog tkiva koja se očituje interakcijama stanica–matriks koja je potrebna za održavanje fenotipa. [19]

1.7.2. Razvoj lijekova za rak

Ukoliko se želi utvrditi da li određeni kemijski spojevi mogu poslužiti za izradu lijeka koji bi se upotrebljavao kao kemoterapeutik za liječenje karcinoma, potrebno je provesti opsežna znanstvena istraživanja. Najprije se provode preliminarna istraživanja citotoksične aktivnosti spojeva u in vitro uvjetima tijekom 48h na tri stanične linije: karcinoma dojke MX-1, karcinoma pluća LX-1 i karcinoma debelog crijeva LX-1. Za spojeve koji inhibiraju rast jedne ili više navedenih staničnih linija, provode se dodatna istraživanja, kojima se testira citotoksična aktivnost spoja na 60 staničnih linija. Tijekom 48h, stanice se tretiraju s pet različitih koncentracija određenog spoja. Ako kemijski spoj pokazuje neku od značajnih aktivnosti: ubija jednu ili više staničnih linija, djeluje poznatim mehanizmom, ili ako inhibira rast tumora i malignih stanica u vrlo maloj koncentraciji, tada se istraživanja s tim spojem nastavljaju u idućoj fazi. Praktična iskustva su pokazala kako od 2500 ispitanih spojeva, samo 2% spojeva pokazuje potencijal za daljnja istraživanja na životinjama. In vivo istraživanja tehnikom šupljih vlakana zasniva se na umetanju sitnih vlakana u miševе. Male, plastične cjevčice od polivinilidenfluorida, duljine 2 cm i promjera 1 mm, unutar koji se nalaze stanice humanih tumora uvode se u tjelesnu šupljinu miševa, ispod kože. Prosječno trajanje ovog testa je 4 dana. Spoj koji se ispituje u dvije doze tijekom dana se daje miševim. Testiranje se provodi na 12 tumorskih stanica u različitim plastičnim cjevčicama. Tijekom jedne godine, ovim istraživanjem može se ispitati 150 – 200 spojeva. Samo oni spojevi koji usporavaju rast tumorskih stanica, mogu se ispitivati u sljedećoj fazi. U idućoj fazi in vivo istraživanja, ispituju se metaboličke osobine spoja, vrijeme između svake doze i najbolji način unosa spoja kao lijeka. Daljnja toksikološka istraživanja temelje se na istraživanjima koja se provode na dvije različite životinjske vrste. Životinjama se daje ista formulacija koja bi se eksperimentalno testirala na ljudima. Ako spoj prođe testiranja bez značajnih teškoća, predlaže se doza, raspored i način primjene za klinička istraživanja na osobama oboljelih od karcinoma. Klinička istraživanja na ljudima mogu započeti tek nakon odobrenja nadležnih institucija, od strane znanstvenog tima koji se sastoji od uglednih znanstvenika i djelatnika institucije u kojima bi se provodilo kliničko istraživanje na ljudima. [18]

1.8. Fibroblasti

Fibroblasti su glavne stanice vezivnog tkiva odgovorne za sintezu kolagena, elastičnih i retikularnih vlakana te kompleksnih ugljikohidrata koji su izgrađenih od osnovnih građevnih jedinica. Istraživanja sugeriraju da je jedna stanica fibroblasta sposobna proizvesti sve komponente izvanstaničnog matrikasa (engl. *extracellular matrix*, ECM). Izvanstanični matriks je složena i zamršena strukturna mreža koja okružuje i podržava stanice unutar vezivnog tkiva, a sadrži kolagen i elastična vlakna, koji nastaju iz različitih vrsta strukturnih proteina. Svaka stanica vezivnog tkiva doprinosi stvaranju strukturnih tvorevina ECM izlučivanjem različitog omjera molekula u izvanstanični prostor. Prema tome ECM posjeduje mehanička i biokemijska svojstva tkiva u kojem se nalazi. Svojstva ECM u kostima i hrskavicama razlikuju se od svojstva ECM u labavijem vezivnom tkivu. Osim strukturne uloge ECM važan je zbog toga jer omogućuje izvanstaničnu komunikaciju. [20]

Dermalni fibroblasti nalaze se u dermisu kože, sudjeluju u proizvodnji proteina fibronektina i drugih vrsta proteina, a ujedno pomažu koži prilikom zacjeljivanja od ozljeda. Fibroblasti proizvode fibronektinske mRNA koje sadrže eksone EIIIA i EIIIB. Navedeni eksoni kodiraju aminokiselinske sekvence koje se vežu na proteine integrirane u staničnim membranama fibroblasta. Fibronektinska izoforma koja je kodirana egzonima EIIIA i EIIIB lijepi fibroblaste na ECM. [21] Fibronektin (250-280 kDa) je najzastupljeniji izvanstanični glikoprotein u vezivnom tkivu pronađen kod sisavaca. Građen je od dva polipeptidna lanca povezana disulfidnim vezama na karboksilnom kraju i na taj način tvori krakove dužine 50 nm. Fibronektin ima važnu ulogu u staničnoj adheziji, rastu, migraciji i diferencijaciji, a važan je i za procese embrionalnog razvoja kao i kod procesa zacjeljivanja rana. Stvarajući ECM između dermisa i epidermisa, fibroblasti omogućuju epitelnim stanicama epidermisa fiksiranje na ECM. Na taj način epitelnim stanicama omogućeno je učinkovito sjedinjenje u gornjem sloju kože. [20]

Za uspostavljanje primarnih staničnih kultura obično se koriste normalna životinjska tkiva (npr. koža, bubrezi, jetra) ili čitavi embriji. Kulture stanica mogu se uspostaviti i iz ljudskih tkiva. Presađivanjem ili subkultiviranjem primarnih staničnih kultura, razvija se stanična linija. Za uspostavljanje primarne kulture ljudskih fibroblasta najčešće se koriste uzorci zdrave kože dobivene prilikom obrezivanja novorođenčadi, uzorci uzeti prilikom biopsije i nakon plastičnih operacija kao i nakon različitih kirurških zahvata. Izolacija stanica iz tkiva zahtjeva kidanje veza stanica – stanica i stanica–matriks, a to se postiže

upotrebom proteaza u različitim kombinacijama. Oslobođene stanice se uvode u posude za uzgoj unutar koje se nalazi hranjivi medij i serum. Stjenka posude–podloga za uzgoj adherentnih stanica treba biti obložena tankim filmom lizina koji omogućuje prihvaćanje stanica za podlogu. Adherentne stanice rasti će sve dok ne popune podlogu ili dok ne iscrpe hranjivi medij. Neadherentne stanice rastu u suspenziji bez prihvaćanja za podlogu i one rastu sve dok ne iscrpe hranjivi medij. Kad stanice iscrpe hranjivi medij ili kad prekriju podlogu na kojoj rastu, potrebno ih je presaditi. Prilikom presađivanja adherentne stanice od podloge se odvajaju upotrebom tripsina koji svojom proteaznom aktivnošću razgrađuje one proteine pomoću kojih se stanica vezala za podlogu. Tripsin može štetno djelovati na neke proteine/receptore na površini stanica stoga može uzrokovati određene smetnje prilikom izvođenja eksperimenata. U tom slučaju za odvajanje stanica od podloge mogu se koristiti različite kombinacije proteaza, npr. one koje su se koristile za izolaciju stanica iz tkiva, ili se mogu upotrijebiti reagensi koji vežu dvovalentne katione (npr. EDTA). Odvajanje stanica od podloge može se obaviti i mehaničkim putem kojim se stanice sakupljaju u mali volumen hranjivog medija upotrebom pomagala za struganje. Tkiva iz kojih se izoliraju stanice sadrže različite vrste stanica. Fibroblasti koji potječu iz vezivnog tkiva u kulturi stanica često se dijele brže od drugih vrsta stanica. S vremenom postaju dominantna vrsta stanica u kulturi, osim ako se ne poduzmu odgovarajuće mjere za njihovo uklanjanje. Zbog jednostavnog uzgoja i brzog rasta, fibroblasti su često korištena primarna kultura stanica. Koriste se za proučavanje funkcije i metabolizma proteina, izvanstaničnog matriksa, modulacije imunološkog odgovora i upalnog procesa te za proučavanje niza drugih temeljnih procesa stanice. Metoda uspostavljanja primarne kulture fibroblasta putem kožnog eksplantata najjednostavnija je metoda koja ne zahtjeva veliko radno iskustvo i posebne reagensne, a komplementarna je postupku uspostavljanja primarne kulture keratinocita. Postupak kojim se istovremeno odvaja epidermis od dermisa omogućuje uspostavljanja kulture fibroblasta i kulture keratinocita iz istog uzorka kože. Uzorak cjelovite ljudske kože preuzet nakon operacije i transportiran u GM hranjivoj podlozi pri 4 °C najbolje je odmah obraditi. Ukoliko se s izolacijom stanica ne može započeti isti dan po primitku uzorka, postupak je moguće odgoditi (24–48 sati). Budući da se vijabilnost stanica smanjuje ovisno o vremenu, ne preporučuje se čuvanje uzoraka kože u hladnjaku pri 4 °C dulje od 48 sati. Ovisno o veličini uzorka kože, pripremi se 5 staklenih čašica s 10 mL otopine 5% ABAM/PBS bez Mg^{2+} i Ca^{2+} . Uzorak kože se prebaci pincetom u prvu čašicu, pričekava se 10 minuta, zatim se prebaci u drugu čašu itd. Sveukupno je dovoljno oko 40 minuta za ispiranje. Ako je prisutno, između

svakog ispiranja odstrani se masno tkivo koristeći škare i pincetu. Isprani uzorak pincetom se prebaci u Petrijevu zdjelicu s prethodno pripremljenom matičnom otopinom dispaze. Djelovanje dispaze omogućuje lako odvajanje slojeva kože. Treba paziti da uzorak kože u posudi bude okrenut tako da je epidermis dolje, a dermis gore. Petrijeva zdjelica s uzorkom kože u dispazi pažljivo se obloži aluminijskom folijom koja je kratko držana nad plamenikom i tako pripremljen uzorak čuva se u hladnjaku pri 4 °C tijekom noći. Idući dan, u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima u Petrijevoj zdjelici, potrebno je pažljivo odvojiti dermis od epidermisa koristeći pincete. U novoj Petrijevoj zdjelici s 5 mL PBS-a dermis se ispire od dispaze. Nakon ispiranja, upotrebom pincete, oštih škara (ili skalpela), dermis se isjecka na sitne komadiće veličine 2–3 mm koji se ravnomjerno trebaju rasporediti na dno nove, suhe Petrijeve zdjelice. Zdjelicu u kojoj se nalazi nasjeckano tkivo dermisa bez hranjive podloge, staviti 30 minuta u inkubator pri 37 °C. Tijekom inkubiranja dermis će se lagano prihvatiti za dno zdjelice. Vrijem inkubiranja pri 37 °C ne smije biti dulje od 30 minuta. Produljivanje vremena inkubiranja izazvalo bi isušivanje tkiva. Nakon inkubiranja u Petrijevu zdjelicu uz rubove, vrlo pažljivo potrebno je dodati 5 mL FM hranjive podloge nakon čega se zdjelica vraća u inkubator i ostavlja tijekom noći. Idući dan u zdjelicu se doda još 5 mL svježih FM hranjive podloge. Hranjivu podlogu potrebno je mijenjati svako dva dana. Nakon 7 dana uz pomoć mikroskopa trebale bi biti vidljive stanice fibroblasta. [22] Stanice koje se izdvoje iz životinjskog ili iz ljudskog tkiva, ili iz embrija podijeliti će se ograničen broj puta. Ljudski fetalni fibroblasti se podjele 50 puta nakon čega njihov rast prestaje. Počevši s 10^6 stanica, nakon 50 dijeljenja može nastati $10^6 \times 2^{50}$, ili više od 10^{20} stanica što je ekvivalentno masi od oko 10^5 ljudi. Iako je vijek trajanja jedne stanične kulture ograničen one se mogu očuvati tijekom dužeg vremenskog perioda smrzavanjem u suspenziji uz dodatak kriokonzervansa. Pripremljene i smrznute stanične suspenzije čuvaju se u spremniku s tekućim dušikom. [21]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Sakupljanje samoniklog ljekovitog i aromatičnog bilja

Samoniklo ljekovito i aromatično bilje (LAB) je ono bilje koje divlje raste u prirodi bez čovjekova utjecaja. Sakupljanje samoniklog LAB je postupak branja bilja na njegovom prirodnom staništu. Lokacije na kojima se biljke sakupljaju trebaju biti udaljene od tvornica, prometnica i drugih zagađivača okoliša. [23] Sakupljanje uzoraka samoniklih biljaka, kadulje (lat. *Salvia officinalis* L.) i smilja (lat. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) i obavljeno je tijekom ljeta 2018. godine. Navedene biljke sadrže mali udio prirodnih organskih spojeva koji ulaze u sastav eteričnog ulja i zbog toga ih je bilo potrebno sakupiti u nešto većoj količini. Uzorci kadulje i smilja sakupljeni su na širem dalmatinskom području u blizini Šibenika, Trogira, Kaštela te na otocima. Lokacije sakupljanja uzoraka navedene su u tablici 2. Sakupljanje uzoraka bilja obavljeno je prema literaturnim pravilima i iskustvima botaničara navedenim u nastavku.

Tablica 2. Popis sakupljenih uzoraka

Oznaka uzorka	Biljka	Lokacija	Koordinate
SO-KO	<i>S. officinalis</i>	Kornati	43.824694, 15.271778
SO-LO	<i>S. officinalis</i>	Lozovac	43.7924813, 15.9728708
SO-MA	<i>S. officinalis</i>	Marina	43.510193, 16.126393
SO-SV	<i>S. officinalis</i>	Seget Vranjica	43.510238, 16.190115
SO-HV	<i>S. officinalis</i>	Hvar	43.173106, 16.438410
SO-LA	<i>S. officinalis</i>	Lastovo	42.769698, 16.827879
SO-SP	<i>S. officinalis</i>	Šipan	42.729373, 17.864283
HI-KO1/1	<i>H. italicum</i>	Kornati	43.824694, 15.271778
HI-KO1/2	<i>H. italicum</i>	Kornati	43.824694, 15.271778
HI-MA	<i>H. italicum</i>	Marina	43.50905, 16.13032
HI-PT	<i>H. italicum</i>	Prgomet	43.617260, 16.246656
HI-PL	<i>H. italicum</i>	Plano	43.561733, 16.282107
HI-KS	<i>H. italicum</i>	Kaštel Stari	43.58035, 16.32676
HI-VV	<i>H. italicum</i>	Vitina	43.246582, 17.494882
HI-LA/P	<i>H. italicum</i>	Lastovo	42.756425, 16.914626
HI-LA/Z	<i>H. italicum</i>	Lastovo	42.745811, 16.871508

Osoba koja se bavi ozbiljnim sakupljanjem LAB za osobne ili komercijalne svrhe treba se pridržavati osnovnih pravila branja bilja kako bi ubrano bilje bilo što bolje kvalitete za izolaciju eteričnog ulja i njegovu kemijsku analizu. Na prirodnom staništu na kojem biljke samoniklo rastu, beru se samo poznate biljne vrste. Branje biljaka treba biti svjesna i odgovorna aktivnost. Sakupljanje određene vrste ne smije biti i njezino uklanjanje. Ukoliko se sakuplja veća količina biljne vrste za komercijalne svrhe, na jednom staništu

ostavlja se ne taknuta trećina populacije kako bi se vrsta mogla obnoviti. Otežavajuća okolnost prilikom branja bilja je ta što biljka tijekom godine različito izgleda. Uspješna identifikacija biljke u prirodi i razlikovanje od srodnih vrsta zahtjeva proučavanje izgleda biljke tijekom razvojnog stadija i izvan vegetacijskog razdoblja. Važan faktor koji utječe na kvalitetu ubrane biljne mase je vrijeme sakupljanja određene biljne vrste. Početak sezone sakupljanja biljne vrste nije strogo definiran, ovisi o specifičnosti biljne vrste, godišnjem dobu, klimatskim uvjetima, nadmorskoj visini. Vrijeme branja biljke u priobalnim dijelovima različito je od vremena branja iste biljke na kontinentu. Količina padalina može odgoditi početak sezone branja bilja za prije ili kasnije u odnosu na prethodnu godinu. Samoniklo LAB sakuplja se po suhom i sunčanom vremenu sredinom dana, osobito ako se sakuplja cvijet ili list. Zbog prisustva vlage na biljkama i prodiranja vode u unutrašnje dijelove biljke može doći do hidrolize prirodnih organskih spojeva s polarnim funkcijskim skupinama, a to bi uzrokovalo određene gubitke prilikom izolacije. Nakon kiše treba pričekati jedan sunčan dan kako bi se biljke osušile prirodnim putem i kako bi ponovno sintetizirale one spojeve koji su se hidrolizom razgradili. Za lakše branje bilja mogu se upotrijebiti različita pomagala i alati kao što su: škare, nož, srp, lopatice... Nadzemni dijelovi biljke koji su bogati ljekovitim i aktivnim sastojcima, beru se početkom cvatnje zbog toga jer biljka tada sadrži najveći udio aktivnih sastojaka. Ne beru se zaprašene i blatnjave biljke kao ni one biljke koje su bolesne ili čiji su dijelovi oštećeni. Ukoliko su takve biljke ubrane važno je pripaziti da ne dođu u kontakt s već sakupljenim biljkama. Za prijenos sakupljene biljne mase s prirodnog staništa do mjesta sušenja, ubrane biljke spremaju se u košare, vreće i u druge ambalaže izrađene od prirodnih materijala. Prilikom spremanja bilja u ambalažu važno je izbjeći nabijanje biljaka. Preporučljivo je upotrebljavati šupljikastu ambalažu jer omogućuje protok zraka i početak sušenja neposredno nakon branja dok je berač još uvijek na terenu. [23]

2.2. Sušenje biljnog materijala

Glavni uzročnik kvarenja sakupljenog biljnog materijala je voda koja pogoduje rastu mikroorganizama i enzimskoj aktivnosti što uzrokuje gubitak aktivnih sastojaka i prirodnih organskih spojeva koji čine eterično ulje. Sušenje predstavlja važan korak u očuvanju kvalitete i konzerviranju biljnog materijala. Vrijeme između sakupljanja bilja i sušenja treba biti što kraće. [1] Postupak sušenja sakupljenog biljnog materijala proveden je prirodnim putem u zatvorenoj i tamnoj prostoriji pri sobnoj temperaturi. Izvođenje sušenja u zatvorenim prostorijama doprinosi zaštiti biljnog materijala od vremenskih

neprilika i nepoželjnih životinja – kukac i insekata. Provjetravanje prostorije postignuto je otvaranjem prozora i vrata, pomoću propuha. Ljetne temperature u prostoriji u kojoj je bio izložen biljni materijal i cirkulacija zraka pridonosili su isparavanju vode. Biljni materijal bio je položen u tankom sloju na dno kartonskih kutija i na drvene, mrežaste okvire. Kutije i okviri bili su uzdignuti od poda kako biljni materijal ne bi povukao vlagu. Količina sunčane svjetlosti koja je prodirala u prostoriju bila je minimalna, a time se htjelo zaštititi bilje od direktnog sunčevog djelovanja jer bi ono moglo utjecati na fotosenzitivne spojeve prirodno prisutne u biljkama. Sušenje kadulje i smilja provedeno je u različitim prostorijama. Tijekom sušenja dolazi do gubitaka i isparavanja lako isparljivih spojeva. Ako bi se dvije različite biljne vrste sušile u blizini, to može dovesti do kontaminacije jedne biljne vrste lako isparljivim spojevima druge vrste. Biljka se smatra dobro osušenom ako je udio vode u biljci smanjen na 10–14 %. Suhoća biljke praktično se provjerava pritiskom i krhkošću biljnog tkiva. Sušenje se provodilo tijekom 15 dana nakon čega je biljni materijal usitnjen na odgovarajuću veličinu, dovoljno veliku za ulazak u tikvicu za destilaciju. Osušeni i usitnjeni biljni materijal do trenutka izolacije eteričnog ulja čuvan je u komercijalno dostupnoj papirnatij ambalaži za pakiranje čajeva.

2.3. Detekcija i fotografiranje spremnika eteričnih ulja

Pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (engl. *scanning electron microscope*; SEM) marke Tescan Mira 3 prikazanog na slici 13., na površini biljnog tkiva su detektirani i fotografirani spremnici eteričnog ulja–biljne žlijezde. Kako bi se očuvala prirodna struktura na površini biljnog tkiva od destruktivnih autokatalitičkih procesa i djelovanja snopa elektrona tijekom mikroskopiranja, biljno tkivo je fiksirano uranjanjem u otopinu standardnog fiksativa. Glavni sastojak otopine standardnog fiksativa koji se upotrebljava za fiksiranje bioloških uzoraka je glutaraldehid, spoj s pet ugljikovih atoma i dvije terminalne aldehidne skupine. Molekula glutaraldehyda ulazi u prostor između dva proteina, a terminalne aldehidne skupine reagiraju s aminokislinskim ostacima lizina u susjednim molekulama proteina i time se postiže umrežavanje. Nije nužno da oba kraja glutaraldehyda reagiraju s lizinskim ostacima u proteinima. U određenom stupnju glutaraldehid može reagirati s lipidima, ugljikohidratima i nukleinskim kiselinama. Niske koncentracije glutaraldehyda u otopini standardnog fiksativa imaju manji denaturirajući učinak na strukturne proteine na površini biljnog tkiva. Upotreba pufera važna je za pripremu standardne otopine fiksativa zbog održavanja fiziološke pH vrijednosti. Promjena pH vrijednosti uzrokuje nastanak većeg broja artefakta koji dovode do

destruktivnih učinaka na površini biljnog tkiva. Otopina standardnog fiksativa može se pripremiti upotrebom kakodilatnog, fosfatnog ili nekog drugog organskog pufera s kojim se može održati željena pH vrijednost. Za pripremu otopine standardnog fiksativa upotrijebljen je fosfatni pufer koji je pripremljen od natrijeva dihidrogenfosfata i natrijeva hidrogenfosfata. Fosfatni pufer se često koristi tijekom pripreme preparata zbog toga jer nije toksičan i fiziološki je kompatibilan s biljnim stanicama. Preparati biljnog tkiva za SEM pripremali su se tijekom tri radna dana. [24]



Slika 13. Pretražni elektronski mikroskop Tescan Mira 3

PRVI DAN:

1. Pripremljena je otopina standardnog fiksativa koja se sastojala od: 3% glutaraldehida u 25 mM Na-fosfatnom puferu (pH=7) i 0,01% Tritona X-100. Otopina fiksativa ohlađena je u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.
2. Ukoliko je potrebno, biljno tkivo se u kapljici hladnog fiksativa oštrom britvicom ili skalpelom izreže u sitne komadiće. Veličina komadića barem u jednoj dimenziji ne bi trebala biti veća od 1 mm.
3. List biljke ili drugo biljno tkivo uroni se u otopinu standardnog fiksativa.
4. Vakuom infiltracijom postignuto je potapanje uzoraka biljnog tkiva u otopinu standardnog fiksativa i uklonjeni su mjehurići zraka. U slučaju pojave pjene vakuum infiltracija se izvodi diskontinuirano.
5. Nakon vakuom infiltracije, biljno tkivo je preneseno i uronjeno u novu otopinu standardnog fiksativa koja se sastojala od 3% glutaraldehida i 25 mM Na-fosfatnog pufera (pH=7). U fiksativu bez Tritona X-100, biljno tkivo je čuvano tijekom noći u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.

DRUGI DAN:

6. Uzorak biljnog tkiva ispran je tri puta po 10 minuta u 25 mM Na-fosfatnom puferu (pH=7) kako bi se uklonio glutaraldehid koji nije reagirao s proteinima i drugim strukturnim molekulama na površini biljnog tkiva.
7. Pripravljena je serija otopina etanola 30%, 50%, 70%, i 95%.
8. Uzorak je ispran u destiliranoj vodi i dehidriran u seriji otopina etanola tijekom 30 minuta između svake serije. Namakanje u apsolutnom etanolu obavljeno je dva puta po 30 minuta.
9. Tijekom noći dehidrirani uzorak biljnog tkiva ostavljen je u apsolutnom etanolu u hladnjaku pri 4 °C.

TREĆI DAN:

10. Dehidrirani uzorci biljnog tkiva preneseni su u malu komoru koja se uvodi u uređaja za sušenje pri uvjetima kritične točke (engl. *critical point dryer*; CPD), prikan na slici 14.
11. Regulacijom temperature, tlaka postignuti su kritični uvjeti i pomoću CO₂ uklonjena je zaostala voda i apsolutni etanol.
12. Uzorak je postavljen na nosač promjera 12 mm pomoću obostrano ljepljive karbonske naljepnice.
13. Zajedno s nosačem uzorak je unesen u uređaj za nanošenje tankog sloja zlata približne debljine 20 nm. Uređaj za nanošenje zlata na površinu uzorka koji nije vodljiv prikazan je na slici 15.
14. Nakon nanošenja zlata obavljen je postupak mikroskopiranja.

**Slika 14.** Sušilica na principu kritične točke**Slika 15.** Uređaj za nanošenje zlata

2.4. Izolacija eteričnih ulja

Eterična ulja kadulje i smilja dobivena su izolacijom iz obrađenog biljnog materijala postupkom hidrodestilacije. Osušeni i usitnjeni biljni materijal veličine od 1–3 cm, izvagan na tehničkoj vagi, unesen je u tikvicu za destilaciju (od 2 L), nakon čega je dodana 1 L destilirane vode. Tijekom izvođenja hidrodestilacije može doći do pjenjenja uzrokovanog saponinima prirodno prisutnim u biljnom materijalu, zbog toga treba pripaziti na količinu vode i biljnog materijala prilikom unosa u tikvicu za destilaciju. Na tikvicu je postavljena modificirana aparatura po Clevengeru iznad koje je postavljeno vodeno hladilo. Zagrijavanje vode u kojoj se nalazio uronjeni biljni materijal obavljeno je pomoću grijača. Pare koje nastaju u tikvici, bočnim cijevima prolaze kroz aparaturu po Clevengeru i odlaze u vodeno hladilo gdje se kondenziraju. Središnja cijev aparature po Clevengeru do odgovarajuće visine ispunjena je vodom i dodana je mala količina organskog otapala (pentan) koje ima manju gustoću od gustoće vode, time su dobivena dva sloja – donji vodeni i gornji organski. Dodano organsko otapalo ima ulogu „trapa“ i ono omogućuje lakše odvajanje izoliranog eteričnog ulja od vodenog medija. Nastali kondenzat sakupljao se u središnjoj cijevi aparature po Clevengeru gdje se uz destilaciju događala i ekstrakcija. Nepolarne molekule prirodnih organskih spojeva koje čine eterično ulje zaostajale su u dodanom organskom otapalu dok su molekule prirodnih organskih spojeva veće gustoće i slične polarnosti kao voda prolazile kroz organsko otapalo i zadržavale se u vodenom mediju. Višak vodenog mediji koji bi se sakupio u središnjoj cijevi aparature po Clevengeru vraćao bi se sifonskim cijevima u tikvicu za destilaciju. Postupak hidrodestilacije izvodio se dva i pol sata. Istovremeno su se izvodile dvije hidrodestilacije pri čemu su se dvije aparature gumenim crijevima za vodu povezale u seriju. Po završetku hidrodestilacije, iz središnje cijevi aparature po Clevengeru, upotrebom kapaljke odvojen je organski sloj koji sadrži otopljeno eterično ulje. Za sušenje eteričnog ulja od zaostale vode upotrijebljen je bezvodni natrijev sulfat, a po potrebi je dodana mala količina organskog otapala. Bezvodni natrijev sulfat od smjese organskog otapala i eteričnog ulja odvojen je dekantiranjem. Čisto eterično ulje dobiveno je otparavanjem organskog otapala. U vialu koja je prethodno izvagana na analitičkoj vagi (bez čepa, s naljepnicom na kojoj je navedena vrsta eteričnog ulja, lokacija sakupljanja bilja, datum obavljanja izolacije) spremljeno je eterično ulje.

2.5. Analiza eteričnih ulja

Kemijski sastav eteričnih ulja određen je spregnutom instrumentalnom tehnikom koja povezuje plinsku kromatografiju i spektrometriju masa (engl. gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS, slika 16.) Uzorak čistog eteričnog ulja razrijeđen je s pentanom u omjeru 1:100 i u tekućem stanju uveden je zagrijani injektor. Unutar injektora pri temperaturi od 250 °C tekući uzorak preveden je u plinovito agregatno stanje. Iz injektora plinoviti uzorak odlazi u kromatografsku kolonu. Za analizu je upotrijebljena HP–5MS kapilarna kolona duljine 30 m i unutarnjeg promjera od 0,25 mm, debljina sloja nepokretne faze (5% difenil-95% dimetilpolisilksan) iznosi 0,2 µm. Kromatografska kolona se nalazi u termosatiranom prostoru–peći. Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3 min pri 70 °C, zatim zagrijavanje od 70 °C do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje 2 min pri 200 °C. Pokretna faza bio je plin helij protoka 1 mL/min. Za identifikaciju spojeva i kvantitativnu analizu kao detektor je upotrijebljen spektrometar masa. Na ulazu u detektor temperatura je iznosila 280 °C, pri toj temperaturi je izbjegnuta kondenzacija razdvojenih spojeva. Unutar detektora molekule spojeva su bombardirane snopom elektrona energije 70 eV što je dovodilo do pucanja veza unutar molekula i fragmentacije. Detektor je bilježio pozitivno nabijene fragmente i na osnovu informacija dobivenih od detektora, računalo je zabilježilo rezultate analize u obliku grafa (x–os: masa/naboj, y–os: intenzitet pika) za svaki spoj koji je izlazio iz kromatografske kolone.



Slika 16. GC-MS sustav

2.6. Odmrzavanje stanica

Stanice na kojima je proveden test citotoksične aktivnosti eteričnog ulja smilja i eteričnog ulja kadulje, čuvane su u spremniku s tekućim dušikom. Neposredno prije zamrzavanja, stanicama je dodano 10% DMSO koji ima ulogu kriokonzervansa (krioprezervativa). Postupkom odmrzavanja i tijekom pripreme stanica za izvođenje eksperimenata DMSO je uklonjen iz stanične suspenzije.

- Krioviala u kojoj su se nalazile zamrznute stanice izvađena je iz spremnika s tekućim dušikom i odmah je uronjena u vodenu kupelj zagrijanu pri temperaturi od 37 °C.
- Unutar vodene kupelji, krioviala je zadržana oko 1 minute uz pažljivo okretanje, sve dok u njoj ne preostane tek mala količina leda.
- Vanjska strana krioviale prebrisana je s 70% etanolom nakon čega je unesena u laminar za rad u sterilnim uvjetima.
- Pomoću pipete suspenzija stanica je prenesena u epruvetu za centrifugiranje.
- Zagrijan je tekući hranjivi medij pogodan za rast odabrane stanične linije.
- Željeni volumen hranjivog medija zagrijan pri temperaturi od 37 °C dodan je u epruvetu za centrifugiranje kako bi se u suspenziji neutralizirao učinak DMSO.
- Postupak centrifugiranja obavljen je pri brzini od 1500 RPM, tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi.
- Po završetku centrifugiranja, provjerena je bistrina supernatanta i vidljivost taloga stanica. Pažljivim postupanjem u sterilnim uvjetima odliven je supernatant zajedno s kojim je uklonjen i DMSO.
- Talog stanica je resuspendiran dodatkom hranjivog medija.
- Kako bi se stanice oporavile od stresa izazvanog zamrzavanjem i odmrzavanjem, resuspendirana otopina je prenesena u prikladnu posudu u kojoj se može odvijati nesmetan i siguran rast stanica.
- Svako 24h pomoću mikroskopa provjeravan je rast stanica i po potrebi je obavljeno presađivanje.

2.7. Postupak presađivanja satnica

Priprema hranjivog medija pogodnog za uzgoj HDF/Tert i MDA-MB-231 staničnih linija u laboratorijskim uvjetima: tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) dodano je 10% seruma goveđeg fetusa (engl. fetal bovine serum; FBS) i 1% odgovarajućeg antibiotika (Penicillin/Streptomycin). Pripremljeni hranjivi medij zagrijan je u vodenoj kupelji pri temperaturi od 37 °C. Postupak presađivanja stanica obavljen je prema sljedećem protokolu:

- Radna površina u laminaru za rad u sterilnim uvjetima i pribor potreban za rad sa staničnim linijama koji se unosi u laminar, prebrisan je sa 70% etanolom.
- Iz posude za uzgoj stanica (bočica T75) odstranjen je hranjivi medij.
- Stanice su isprane dva puta s 10 mL PBS (engl. Phosphate Buffer Saline) kako bi se uklonile mrtve stanice.
- Dodan je tripsin (2 mL za bočicu T75) za odvajanje stanica od stijenke posude. Tripsin svojom aktivnošću razgrađuje one proteine kojima su se adherentne stanice vezale za stijenku posude. Kako bi se pospješio učinak tripsina i ubrzalo odvajanje stanica, obavljena je inkubacija pri 37 °C u vremenu tijekom 2 minute. Postupak odvajanja stanica praćen je pomoću mikroskopa.
- Djelovanje tripsina neutralizirano je dodatkom hranjivog medija u omjeru 1:3.
- Suspenzija sačinjena od: stanica, tripsina i hranjivog medija je centrifugirana tijekom 5 minuta pri brzini od 1000 RPM, pri sobnoj temperaturi.
- Nakon pažljivog odlijevanja supernatanta, talog stanica je resuspendiran dodatkom 1 mL hranjivog medija.
- Neposredno prije brojanja stanica u steriliziranoj tubici je pomiješano 20 µL uzorka resuspendirane otopine s 20 µL boje tripan plavo. Smjesa uzorka i boje uvedena je u specijaliziranu komoru za brojanje stanica nakon čega je broj stanica određen pomoću automatskog brojača Luna.
- Ovisno o broju stanica, resuspendirana otopina je podijeljena na dva ili tri približno jednaka dijela. Stanice su presađene u novu posudu prikladnu za proliferaciju. Prilikom presađivanja treba obratiti pozornost na razrijeđenije uzimajući u obzir da je stanicama potrebna komunikacija za normalan rast i razmnožavanje.
- Presađene stanice inkubirane su pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5% CO₂.

2.8. Test citotoksične aktivnosti

Prvi dan:

- Prema protokolu za presađivanje stanica, dobiven je 1 mL resuspendirane otopine.
- Upotrebom boje tripan plavo i uređaja Luna za automatsko brojanje stanica u resuspendiranoj otopini izmjerena je koncentracija stanica, tj. broj stanica po mL.
- Izračunat je volumen resuspendirane otopine i volumen hranjivog medija potreban za presađivanje stanica u pločicu s 96 jažica.
- Izračunati volumen resuspendirane otopine pomiješan je s volumenom hranjivog medija, čime je dobiven konačan volumen suspenzije potreban za presađivanje stanica.
- Za lakši unos stanica, ispod pločice je postavljen poklopac kako bi se pločica nakosila i time omogućila bolja preglednost.
- U svaku jažicu dodano je 100 μ L suspenzije. Tijekom dodavanja potrebno je paziti da ne nastaju mjehurići. Neravnomjerno raspoređene stanice unutar suspenzije dovode do pogreške, u jažicama se javlja različit broj stanica. Za jednolik unos stanica u svaku jažicu, važno je često promiješati suspenziju kako bi se izbjeglo taloženje stanica na dno posude.
- Obavljeno je inkubiranje pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5% CO₂.

Drugi dan:

- 24 sata nakon presađivanja i inkubiranja, stanice su tretirane otopinama eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja.
- Otopine eteričnih ulja pripremljene su serijskim razrjeđenjem stock otopina koje su čuvane u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Prije upotrebe, stock otopine su odmrznute i promiješane pomoću vorteksa.
- Budući da su eterična ulja ne topljiva u vodenom mediju, za otapanje u hranjivom mediju upotrijebljen je DMSO. Velik udio DMSO je citotoksičan, zbog toga su pripremljene otopine eteričnih ulja u kojima je udio DMSO bio od 1 do 0,1%.
- Pomoću vakuum sisaljke pažljivo je uklonjen hranjivi medij, nakon čega je dodano 100 μ L hranjivog medija u kojem je otopljeno eterično ulje. Dodavanje svježeg hranjivog medija može se obaviti i pomoću multikanalne pipete, pri čemu je važno pripaziti da je u svaki tips usisan jednak volumen hranjivog medija.

- Stanična linija HDF/Tert, tretirana je otopinama eteričnog ulja kadulje i smilja koncentracije: 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L i 125 mg/L.
- Stanična linija karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirana je eteričnim uljem smilja koncentracije: 1000 mg/L, 700 mg/L, 500 mg/L, 320 mg/L, 200 mg/L i 100 mg/L.
- Nakon tretiranja stanica, pločica je spremljena u inkubator pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5% CO₂.

Treći dan:

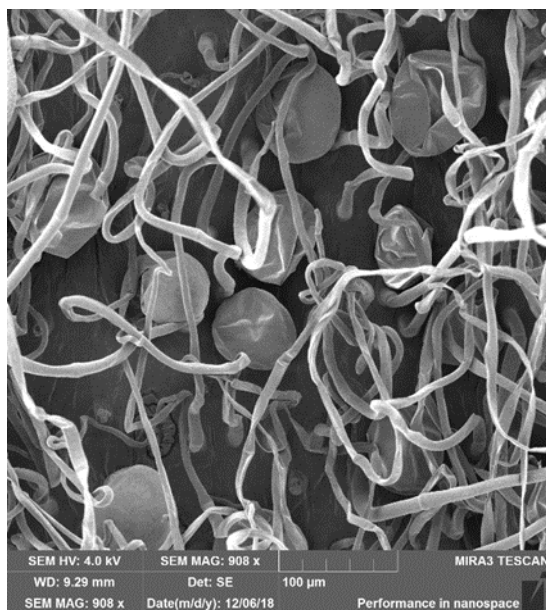
- 48h nakon tretiranja stanica eteričnim uljima i inkubiranja, određen je broj stanica kolorimetrijskom metodom koja se koristi za praćenje proliferacije.
- Za brojanje preživjelih stanica upotrijebljen je MTS reagens.
- Prema preporukama proizvođača 20 µL reagensa se razrijedi s 100 µL hranjivog medija. Stanicama je dodana otopina MTS reagensa pripravljena razrjeđivanjem 10 µL MTS u 50 µL hranjivog medija. Korištena otopina je iste koncentracije kao otopina koju preporučuje proizvođač.
- Pomoću vakuum sisaljke uklonjen je hranjivi mediji koji je sadržavao eterično ulje i dodano je 60 µL hranjivog medija u kojem se nalazio MTS reagens.
- Tijekom dodavanja reagensa ne smije doći do pojave mjehurića u jažicama. Svaki mjehurić stvara pogrešku prilikom mjerenja apsorbancije. Ukoliko dođe do pojave mjehurića, treba ih odmah ukloniti. Najbolji način uklanjanja mjehurića je cjelokupno uklanjanje medija iz jažice pomoću vakuum sisaljke. Naknadno uklanjanje mjehurića probijanjem pomoću vrha pipete ili nekim drugim pomagalom nije moguće zbog visoke površinske napetosti.
- Nakon što je stanicama dodan MTS reagens, pločica je spremljena u inkubator pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5% CO₂. Nakon dodavanja reagensa nije preporučljivo stanice promatrati pomoću mikroskopa. Izvor svjetlosti koji se koristi za mikroskopiranje obasjava jažicu i može izazvati degradaciju fotosenzitivnog reagensa.
- 4h nakon dodavanja MTS reagensa izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 492 nm. Ukoliko se pločica prenosi iz jednog u drugi laboratoriji u kojem se nalazi spektrofotometar, tada je važno pločicu zaštititi od direktnog djelovanja svjetla. Mjerenja apsorbancije obavljena su tri puta.

REZULTATI I RASPRAVA

3. Rezultati i rasprava

3.1. Elektronska mikroskopija

Pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa snimljena je površina biljaka, kadulje i smilja, čime je ustanovljeno da su obje biljke prekrivene dlačicama. Dlačice štite biljne organe od utjecaja zime, a tijekom visokih ljetnih temperatura od naglog isušivanja i isparavanja vode. Vizualnim pregledom ustanovljeno je kako kadulja u odnosu na smilje, na površini stabljike i lista ima veći broj žlijezda u kojima se nalazi eterično ulje. Zbog navedenog, iz biljnog materijala kadulje u odnosu na smilje, izolira se veća količina eteričnog ulja. Budući da neki proizvođači eteričnog ulja kadulje za izolaciju koriste samo list kadulje, na slici 17. koja prikazuje stabljiku može se vidjeti velik broj žlijezda u kojima se nalazi eterično ulje. Odbacivanje tog dijela biljnog materijala prilikom izolacije predstavlja značajne gubitke. Eterično ulje kadulje nalazi se u žlijezdama kuglastog oblika. Na slici 18. prikazan je deformirana, ne raspukla žlijezda. Promjena oblika uzrokovana je sušenjem i zbog utjecaja kemijske fiksacije tijekom pripreme preparata.

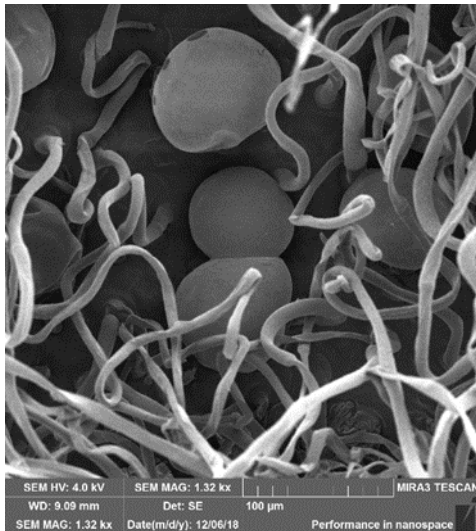


Slika 17. Kadulja, površina stabljike



Slika 18. Deformirani spremnik eteričnog ulja

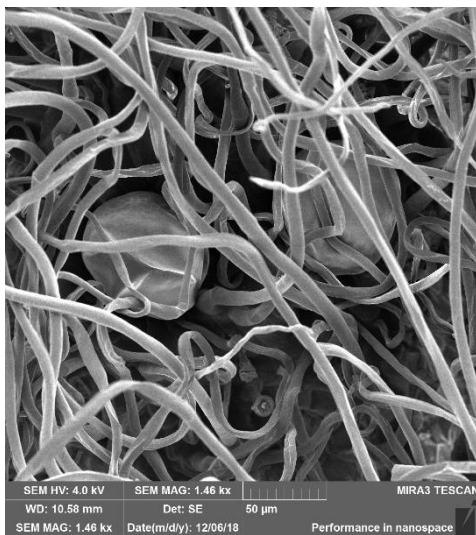
Biljne žlijezde u kojima se nalazi eterično ulje kadulje međusobno mogu biti spojene kao što je prikazano na slici 19. Tijekom pretraživanja površine stabljike, uočena je raspukla biljna žlijezda i djelomično je snimljena njena unutrašnjost, slika 20. Kod kadulje, žlijezde su smještene na površini biljnog organa, a dlačice se protežu oko i iznad žlijezda, to se najbolje uočava na slikama 21. i 22. koje prikazuje žlijezde na listu. Eterično ulje kadulje nalazi se u žlijezdama koje se nalaze na donjoj i gornjoj površini lista, slika 23. i 24.



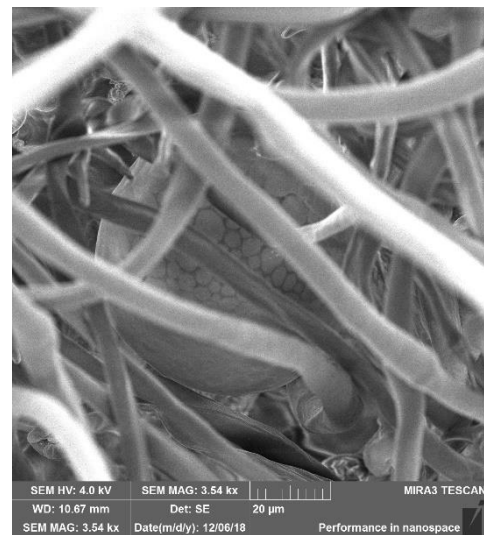
Slika 19. Spojene žlijezde



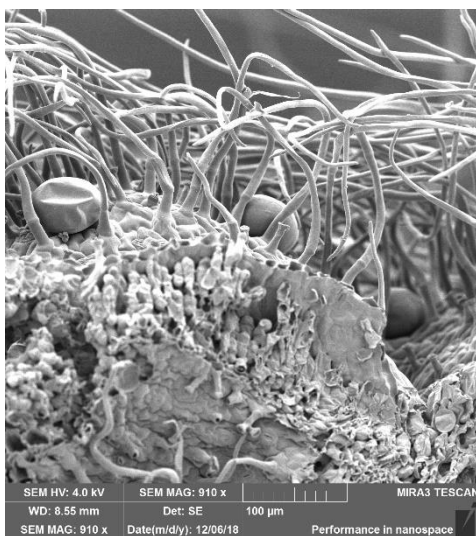
Slika 20. Raspuknuta žlijezda



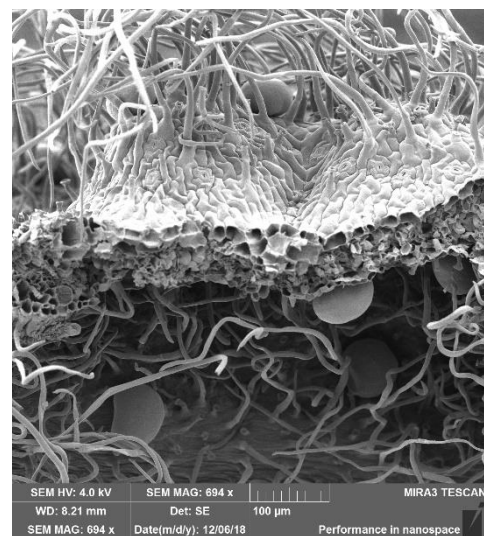
Slika 21. Žlijezde na listu



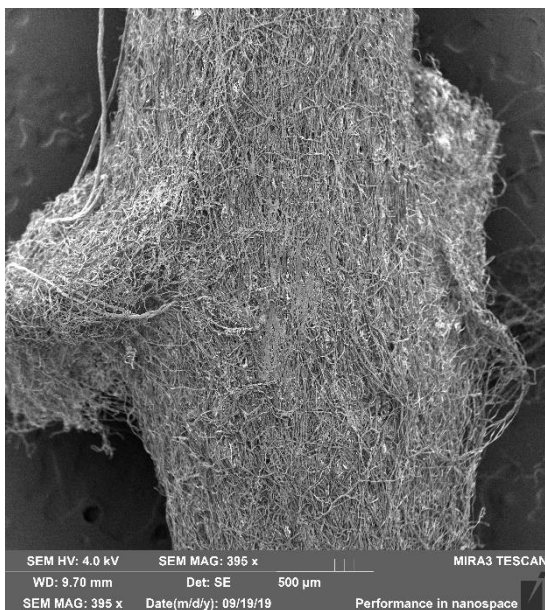
Slika 22. Žlijezda, list



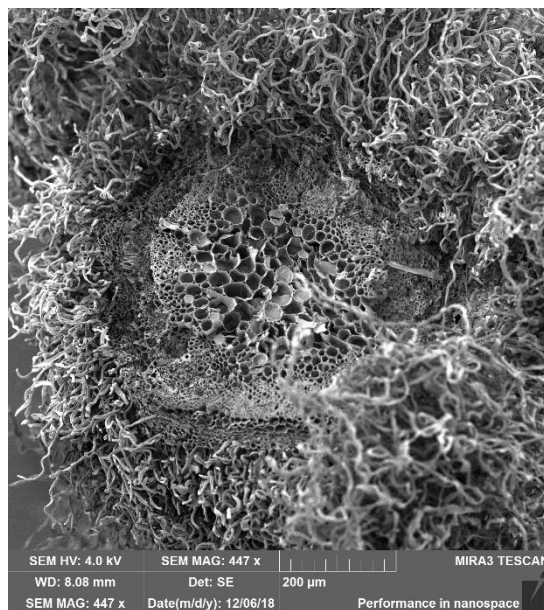
Slika 23. Žlijezde na gornjoj površini lista



Slika 24. Žlijezde na donjoj površini lista



Slika 25. Smilje, stabljika



Slika 26. Smilje, presjek stabljike



Slika 27. Smilje, površina lista



Slika 28. Smilje, spremnik eteričnog ulja

Na slici 25. može se vidjeti površina stabljike smilja, koje je u odnosu na kadulju mnogo dlakavije. Veličina i isprepletenost dlačica smilja bolje se uočava na slici 26. koja prikazuje stabljiku u presjeku. Zbog velikog broja dlačica, na površini smilja bilo je teško primijetiti i fotografirati žlijezde u kojima se nalazi eterično ulje. Površina lista prikazana je na slici 27. na kojoj se može uočiti veliki broj uvijenih dlačica. Žlijezda u kojoj se nalazi eterično ulje smilja, drugačijeg je oblika u odnosu na žlijezde kadulje, i po sredini se nalazi biološka pregrada koja unutrašnjost dijeli na dva odjeljka. Žlijezde smilja nalaze se na dlačicama i izloženije su atmosferskom utjecaju.

3.2. Analiza eteričnih ulja kadulje

Ciljanom kemijskom analizom 7 uzoraka eteričnog ulja kadulje navedenih u tablici 3., identificirano je 25 spojeva. Budući da se radi o eteričnim uljima izoliranim iz samoniklih biljka na čiji rast, a time i na biosintezu spojeva, utječu klimatski i mnogi drugi faktori, očekivane su varijacije u sastavu eteričnog ulja. U eteričnom ulju kadulje s otoka Šipana identificirano je 99,1% spojeva, potom slijedi eterično ulje iz Seget Vranjice u kojem je identificirano 96,8% spojeva. Najmanji broj spojeva eteričnog ulja (89,2%) identificiran je u kadulji iz Marine. Uzorak biljnog materijala samonikle kadulje iz Marine ubran je u masliniku i na rast te kadulje utjecala je obrada tla te dodatak umjetnih gnojiva. Ukoliko se zanemari podjela obzirom na funkcionalne skupine, najzastupljenija klasa spojeva su monoterpeni koji čine 80% sadržaja svih analiziranih eteričnih ulja. U eteričnim uljima su prisutna 4 seskviterpena (*trans*- β -kariofilen, α -humulen, kariofilen oksid, virdiflorol) i 1 diterpen (timol). U strukturi identificiranih spojeva uz ugljik i vodik kao heteroatom pojavljuje se kisik. Linalol i β -mircen su spojevi lančane strukture, ostali identificirani spojevi imaju cikličku strukturu. Alkeni i alkoholi su skupine spojeva koje prevladaju u svim uzorcima. Prema radu [25] u kojem je analizirano 25 uzoraka eteričnog ulja izoliranog iz kadulje prikupljene diljem Hrvatske i BiH, obzirom na glavne spojeve, eterična ulja mogu se podijeliti u tri skupine: kemotip A sadrži visok udio β -tujon, kemotip B sadrži visok udio α -tujona, dok kemotip C sadrži visok udio kamfora, β -pinena, borneola i bornil acetata. Svi analizirani uzorci imaju viši udio α -tujona u odnosu na β -tujon. Najveći udio α -tujona u iznosu od 42,6% detektiran je u uzorku SO-HV, dok je najmanji udio α -tujona (12,6%) detektiran u uzorku SO-KO. Šest uzoraka eteričnog ulja kadulje (kemotip B) ima viši udio α -tujona nego kamfora, iznimku čini uzorak SO-KO koji sadrži 33,3% kamfora i 12,6% α -tujona, i ono je kemotipa C. Iznimka se može objasniti činjenicom kako je kadulja na Kornatima ubrana sredinom mjeseca rujna, dok su uzorci kadulje na drugim lokacijama prikupljeni tijekom kolovoza. Osim toga, vrijeme sušenja biljnog materijala s Kornata bilo je kraće u odnosu na druge uzorke biljnog materijala koji su sušeni tijekom 15 dana. Uzorak SO-KO u odnosu na druge uzorke ima veći udio β -pinena, borneola i bornil acetata. Ostali identificirani spojevi s udjelom većim od 5% su: kamfen, 1,8-cineol, virdiflorol. Biljni fenol timol, s udjelom od svega 0,2% detektiran je samo u jednom uzorku eteričnog ulja kadulje (SO-LA).

Tablica 3. Kemijski sastav eteričnih ulja kadulje

Red. br.	Spoj	Ri	SO-KO	SO-LO	SO-MA	SO-SV	SO-HV	SO-LA	SO-SP
1.	α -Pinen	942	3,3	3,5	2,8	1,4	3,1	2,1	1,5
2.	Kamfen	959	7,4	2,5	5,0	3,7	2,1	2,9	3,8
3.	β -Pinen	985	1,8	1,1	0,9	0,8	0,4	1,3	1,0
4.	β -Mircen	994	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7	0,6	0,5
5.	p-Cimene	1031	0,6	1,0	1,0	0,9	1,3	0,8	0,8
6.	Limonen	1035	3,0	1,8	2,3	2,3	1,8	1,4	1,6
7.	1,8-Cineol	1039	9,8	9,8	8,6	9,9	4,2	7,2	8,1
8.	γ -Terpinen	1065	0,0	0,3	0,0	0,2	0,2	0,3	0,0
9.	α -Terpinolen	1092	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,4	0,0
10.	Linalol	1103	0,6	0,3	0,4	0,4	0,4	0,0	0,0
11.	α -Tujon	1111	12,6	33,1	27,3	25,3	42,6	32,5	26,5
12.	β -Tujon	1112	1,3	3,7	6,7	12,2	7,4	9,5	13,8
13.	Kamfor	1150	33,3	13,3	18,2	22,1	12,4	20,5	23,6
14.	Borneol	1172	5,7	3,8	3,3	4,0	2,6	3,2	3,5
15.	4-Terpineol	1182	0,6	0,7	0,5	0,6	0,8	0,8	0,0
16.	p-Cimen-8-ol	1191	0,0	0,2	0,0	0,0	0,9	0,1	0,0
17.	α -Terpineol	1195	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
18.	Bornil-acetat	1288	3,3	1,9	1,4	2,3	1,0	0,2	3,3
19.	Timol	1302	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
20.	Karvakrol	1312	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
21.	Trans- β -kariofilen	1422	0,7	1,1	0,0	0,3	0,1	0,7	0,0
22.	α -Humulen	1456	3,6	3,0	2,2	2,8	2,3	2,0	1,8
23.	Kariofilen oksid	1584	0,0	0,7	0,0	0,0	0,1	0,7	0,0
24.	Virdiflorol	1593	7,7	8,5	5,2	5,3	8,2	6,4	9,3
25.	Manol	2052	0,0	3,8	2,6	1,2	0,0	0,0	0,0

3.3. Analiza eteričnih ulja smilja

Kemijskom analizom 9 uzoraka eteričnih ulja smilja, detektirano je 56, a identificirano je 55 kemijskih spojeva. Pri vremenu zadržavanja 29,9 min u uzorku HI-KO 1/2 pojavljuje se neidentificirani kemijski spoj čiji udio iznosi 1,08%. Najveći broj spojeva sadržan je u uzorku HI-KO 1/2 (33 spoja), dok je u uzorku HI-LA/Z sadržan najmanji broj spojeva (24 spoja). Udio monoterpena u analiziranim uzorcima je od 30,3% do 42,3%, dok je udio seskviterpena od 44,4% do 61,5%. U uzorcima su detektirani i neterpenski spojevi čiji je udio u od 7,4 do 22,2%. Primijećen je velik udio cikličkih spojeva s kisikom, koji se pojavljuju u svim analiziranim uzorcima. Najzastupljeniji spojevi s kisikom su alkoholi. Prema literaturi, udio spojeva s kisikom može iznositi i do 80%. [26] Od ugljikovodičnih spojeva, najzastupljeniji su alkeni. Za analizirane uzorke, spojevi koji se pojavljuju u svim uljima bez obzira na količinu okarakterizirani su kao glavni spojevi. Iako nisu detektirani u jednom od analiziranih uzoraka: linalol, nerol, trans- β -kariofilen, β -selinen i α -kedrol, to su spojevi koji se literaturno smatraju glavnim spojevima eteričnog ulja smilja. Glavni spoj eteričnih ulja smilja je neril acetat. Uzorak HI-LA/Z sadrži najmanji udio neril acetata (4,48%), dok je najveći udio detektiran u uzorku HI-MA (21,36%). Prema literaturi udio neril acetat u eteričnom ulju smilja može

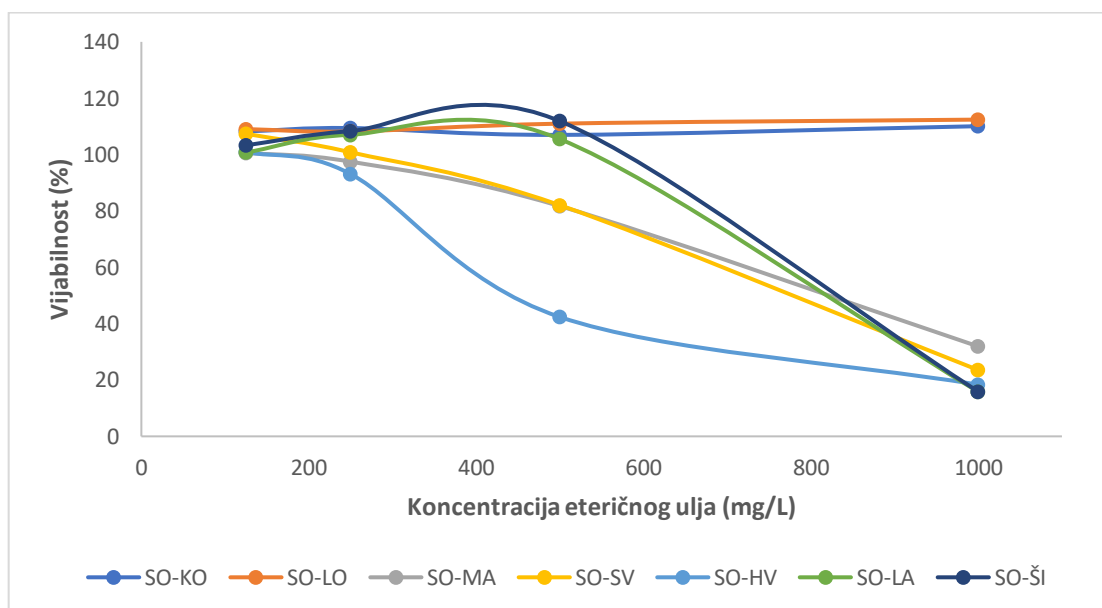
iznositi i do 44,5% [26] U ostalim uzorcima, udio neril acetata je od 10,63% do 20%, što je više u odnosu na literaturne podatke za eterična ulja smilja iz Hrvatske. [27]. Velik udio biološki aktivnog spoja, α -pinena detektiran je u uzorcima HA-LA/P (12,64%) i HI-LA/Z (11,28%). Aromatski ugljikovodik, ar-kurkumen pojavljuje se u svim uzorcima u značajnom udjelu od 5,92% do 10,65%. U navedenim uzorcima udio α -pinena je veći od udjela neril acetata. Prema kemijskom sastavu, eterična ulja smilja iz Hrvatske, slična su eteričnim uljima smilja iz Italije. [28] Detaljan kemijski sastav eteričnih ulja smilja za svaki uzorak prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Kemijski sastav eteričnih ulja smilja

Red. br.	Kemijski spoj	Rt	Ri	HI-LA/P	HI-LA/Z	HI-PL	HI-KO 1/1	HI-KO 1/2	HI-KS	HI-PT	HI-VV	HI-MA
1.	α -Pinen	4,925	942	12,64	11,28	9,99	7,30	4,01	4,25	12,49	8,45	7,41
2.	Kamfen	5,182	954	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00
3.	p-Cimen	7,311	1028	0,00	0,00	0,00	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4.	Limonen	7,431	1035	3,60	5,16	1,97	3,70	2,44	1,96	5,74	1,41	2,76
5.	1,8-Cineol	7,536	1039	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,00	0,00
6.	Izobutil-2-metilbut-2-enoat	8,115	1057	0,69	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73	0,57	0,00
7.	Linalol	9,842	1103	1,02	0,00	0,87	1,49	1,39	1,05	2,17	1,47	1,03
8.	2-Metil, 2-Metilbutil ester, Butanska kiselina	9,913	1104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00
9.	Isopentenil (Z)-2-metilbut-2-enoat	11,864	1158	1,42	0,00	0,98	3,41	2,17	0,83	2,89	3,27	2,23
10.	Borneol	12,417	1172	0,00	1,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11.	Terpinen-4-ol	12,842	1182	0,00	0,00	0,00	1,21	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00
12.	p-Cimen-8-ol	13,247	1188	1,75	3,44	2,64	1,97	2,35	1,95	3,61	2,43	2,26
13.	α -Terpineol	13,416	1194	1,79	2,60	1,82	1,73	1,73	1,55	1,65	1,01	1,35
14.	Nerol	14,931	1233	0,00	0,86	1,76	3,49	2,74	0,84	1,67	0,95	1,76
15.	Heksil senecionate	17,259	1287	0,00	0,00	0,00	1,20	1,05	0,87	0,00	0,00	0,00
16.	Neril-acetat	20,602	1369	10,63	4,48	15,50	10,97	11,12	11,00	17,60	20,00	21,36
17.	α -Kopaen	21,040	1379	2,47	3,10	2,77	2,90	2,95	2,70	1,70	0,48	1,99
18.	Italicen	22,178	1405	2,30	3,60	0,00	3,73	3,86	3,09	3,41	1,80	2,63
19.	cis- α -Bergamonten	22,653	1417	0,00	0,00	1,03	0,00	0,78	0,81	0,00	0,00	0,00
20.	trans- β -Kariofilen	22,817	1422	1,72	2,08	1,72	2,30	2,54	0,00	2,86	0,90	3,07
21.	4,6,9-Trimetildek-8-en-3,5-dion	23,724	1445	9,17	2,75	4,37	4,07	3,61	2,50	3,54	2,37	2,24
22.	Neril propionat/Geraniil propionate	24,245	1458	0,00	0,00	3,03	3,25	3,03	2,10	1,76	3,02	1,56
23.	γ -Murolen	25,044	1476	0,00	1,48	1,60	0,00	1,25	1,32	0,00	1,15	0,00
24.	γ -Kurkumen	25,302	1479	0,00	0,00	1,53	6,85	6,82	0,00	1,11	0,00	3,00
25.	Germakren D	25,136	1480	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26.	Ar-Kurkumen	25,425	1483	5,92	7,01	7,57	8,08	7,07	10,65	9,21	8,14	6,54
27.	β -Jonon	25,451	1485	6,88	3,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28.	cis- β -Guaien	25,479	1491	10,90	8,86	0,00	0,00	4,68	0,00	2,84	6,16	4,71
29.	β -Selenin	25,534	1489	0,00	4,85	6,44	5,25	5,21	2,27	2,42	6,85	6,89
30.	2,4,6,9-Tetrametildek-8-en-3,5-dion	25,629	1491	0,00	0,00	5,10	5,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31.	α -Selenin	25,885	1497	3,95	4,77	4,70	3,64	3,38	2,96	0,00	0,00	4,07
32.	δ -Kadinen	26,994	1526	1,07	1,15	1,19	1,12	1,30	0,00	0,00	0,00	1,22
33.	α -Kadinen	27,560	1538	0,00	0,00	0,00	0,00	0,92	1,51	0,00	0,51	0,00
34.	Nerolidol	28,586	1568	0,97	6,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35.	3,5,7,10-Tetrametilundek-9-en-4,6-dion	29,244	1584	9,54	10,78	8,35	6,73	5,20	7,36	10,14	13,79	5,45
36.	Viridiflorol	29,680	1590	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	0,00	0,00	0,00
37.	Guaiol	29,850	1600	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,00	0,00
38.	γ -Eudesmol	31,104	1633	1,15	4,47	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
39.	???	29,900	1599	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	0,00	0,00	0,00	0,00
40.	α -Kedrol	30,177	1606	3,22	0,00	2,28	2,14	3,16	5,87	1,07	0,00	3,67
41.	Rosifoliol	30,204	1607	1,14	0,00	0,00	4,67	3,54	1,01	0,00	0,00	0,00
42.	β -Oploponon	30,206	1607	0,00	0,00	1,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
43.	Humulen epoksid II	30,310	1609	0,00	0,00	0,00	0,00	0,74	0,00	4,13	0,00	6,24
44.	Tetradekanal	30,458	1612	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,00
45.	α -Kadinol	31,477	1643	1,26	1,44	0,00	0,00	2,87	1,48	0,00	0,00	0,00
46.	Biciklo[4.4.0]dek-1-en, 2-isopropil-5-metil-9-metilen	31,522	1644	0,00	0,00	0,00	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
47.	β -Eudesmol	31,871	1653	1,17	0,00	1,13	0,00	1,63	1,84	1,82	0,00	0,00
48.	α -Eudesmol	31,881	1655	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60	2,15	3,17
49.	t-Muurolol	32,050	1659	2,06	2,85	3,19	0,00	0,00	3,40	0,00	0,00	0,00
50.	3-Cikloheksen-1-ol	32,550	1672	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	0,22	0,00	0,00	0,00
51.	Oplopanon	34,647	1729	0,00	0,00	1,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00
52.	8- α -Acetoksielemen	36,563	1783	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	0,00	0,00	0,00	2,00
53.	(Z,E)- α -Farnesen	37,363	1806	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00
54.	Benzoilkamfer	37,508	1810	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,71	0,00	0,00	0,00
55.	Izopropil tetradekanoat	37,834	1827	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,03	0,00	2,24	1,38
56.	Methylheksadekanoat	40,784	1927	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,12	0,00	2,42	0,00

3.4. Citotoksična aktivnost eteričnih ulja na stanicama kože

Određena je citotoksična aktivnost eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja na staničnoj liniji humanog dermalnog fibroblasta (HDF/Tert). Navedena stanična linija poslužila je kao biološki model za procjenu utjecaja eteričnog ulja na stanice kože. Tijekom provođenja eksperimenta praćena je vijabilnost stanica, tj. broj preživjelih stanica nakon tretiranja eteričnim uljima, u odnosu na kontrolne stanice. Citotoksični utjecaj eteričnih ulja iskazan je pomoću IC_{50} vrijednosti. Navedena vrijednost označava koncentraciju eteričnog ulja pri kojoj je rast stanica inhibiran za vrijednost od 50%. Budući da se eterična ulja u razrijeđenom stanju koriste za njegu kože i za izradu kozmetičkih preparata, provedena su ispitivanja eteričnog ulja razrijeđenog u hranjivom mediju. Uzorci s višim IC_{50} pokazuju manju citotoksičnu aktivnost, tj. uzrokuju manju smrtnost stanica. Proveden je samo *in vitro* test vijabilnosti kojim se utvrđivao IC_{50} , stoga eksperimentalno nije utvrđeno da li ispitivana eterična ulja izazivaju reverzibilno ili ireverzibilno oštećenje stanica kože.



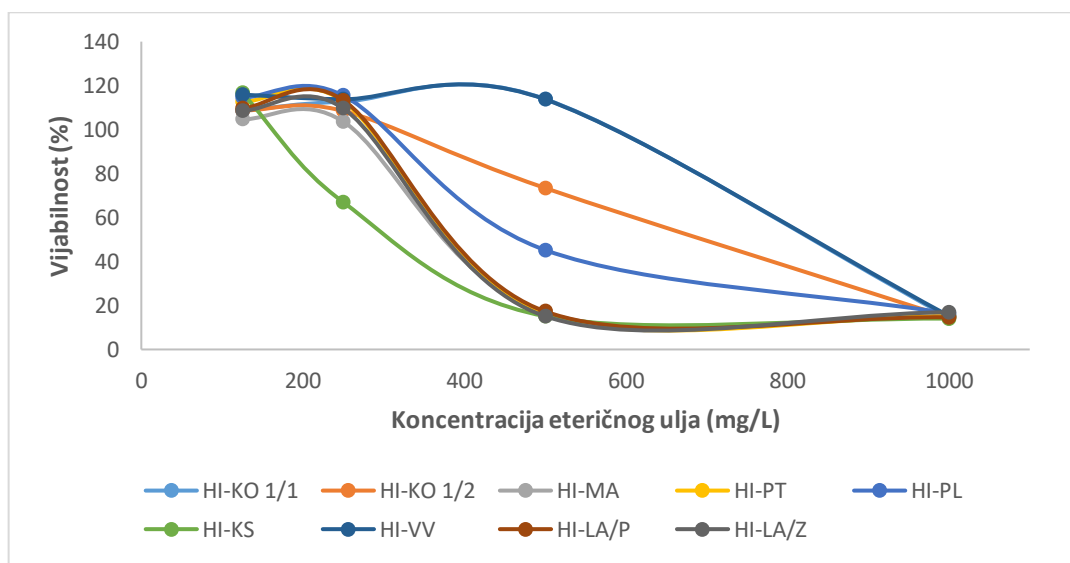
Slika 29. Citotoksična aktivnost eteričnog ulja kadulje na HDF/Tert

Ukoliko se eterična ulja kadulje međusobno usporede (slika 29.), najmanju citotoksičnu aktivnost imaju uzorci SO-KO i SO-LO. Za navedene uzorke nije određen točan IC_{50} , njihov IC_{50} je iznad 1000 mg/L, a to je najveća koncentracija otopine eteričnog ulja kadulje s kojim su stanice bile tretirane. Najveću citotoksičnu aktivnost, tj. najagresivniji učinak na HDF/Tert stanice pokazuje uzorak eteričnog ulja kadulje SO-HV (443 mg/L). Taj se uzorak ističe po visokom udjelu α -tujona (42,6%). Kod uzoraka koji također imaju veći udio α -tujona, SO-LO (33,1%) i SO-LA (32,5%) uočen je blaži učinak

na stanice, stoga se ne može potvrditi da je viši udio α -tujona odgovoran za agresivno djelovanje uzorka SO-HV na HDF/Tert stanice. Ostali uzorci eteričnog ulja kadulje imaju IC_{50} u intervalu od 778 do 830 mg/L, a točna IC_{50} vrijednost za pojedini uzorak, navedena je tablici 5.

Tablica 5. IC_{50} vrijednosti za eterična ulja kadulje i smilja na HDF/Tert stanicama

Uzorak	IC_{50} (mg/L)	Uzorak	IC_{50} (mg/L)
SO-KO	>1000	HI-KO 1/1	830
SO-LO	>1000	HI-KO 1/2	695
SO-MA	822	HI-MA	376
SO-SV	778	HI-PT	383
SO-HV	443	HI-PL	468
SO-LA	818	HI-KS	308
SO-ŠI	830	HI-VV	832
		HI-LA/P	386
		HI-LA/Z	378



Slika 30. Citotoksična aktivnost eteričnog ulja smilja na HDF/Tert

Citotoksična aktivnost eteričnih ulja smilja, iskazna preko IC_{50} vrijednosti, kreće se u intervalu od 308 mg/L do 832 mg/L. Na slici 30. prikazano je citotoksično djelovanje eteričnih ulja smilja na HDF/Tert staničnu liniju. Najmanju citotoksičnu aktivnost imaju uzorci HI-VV i HI-KO1/1, dok je najveću citotoksičnu aktivnost pokazao uzorak HI-KS. Ukoliko se usporede rezultati za IC_{50} od uzorka s iste lokacije HI-KO1/1 (830 mg/L) i HI-KO1/2 (695 mg/L), može se uočiti značajna razlika u citotoksičnoj aktivnosti. Uzorak HI-KO1/1 u kojem je detektiran manji broj spojeva u sastavu eteričnog ulja, ima manju citotoksičnu aktivnost, tj. blaže djeluje na stanice kože. U navedenom uzorku omjer

monoterpenskih i seskviterpenskih spojeva približno je jednak. Uzorak HI-KO1/2 koji agresivnije djeluje na stanice kože, sadrži veći broj spojeva i udio seskviterpena je skoro dvostruko veći u odnosu na monoterpene. Za drugu skupinu uzorka s iste lokacije HI-LA/P i HI-LA/Z citotoksična aktivnost je gotovo identična, njihovi rezultati za IC₅₀ razlikuju se za 8 mg/L. Ukoliko se rezultati citotoksične aktivnosti povežu s kemijskim sastavom uzoraka HI-LA/P i HI-LA/Z, može se uočiti da je kod oba uzorka udio seskviterpena dvostruko veći od udjela monoterpene. Iako je na osnovu kemijskog sastava i vrijednosti IC₅₀, za uzorke HI-KO1/1 i HI-KO1/2 pretpostavljeno da udio seskviterpena u eteričnom ulju može uzrokovati bitnu razliku u citotoksičnoj aktivnosti, rezultati za uzorke HI-LA/P i HI-LA/Z opovrgavaju navedenu pretpostavku. Za ostale uzorke IC₅₀ je u intervalu od 308 do 468 mg/L.

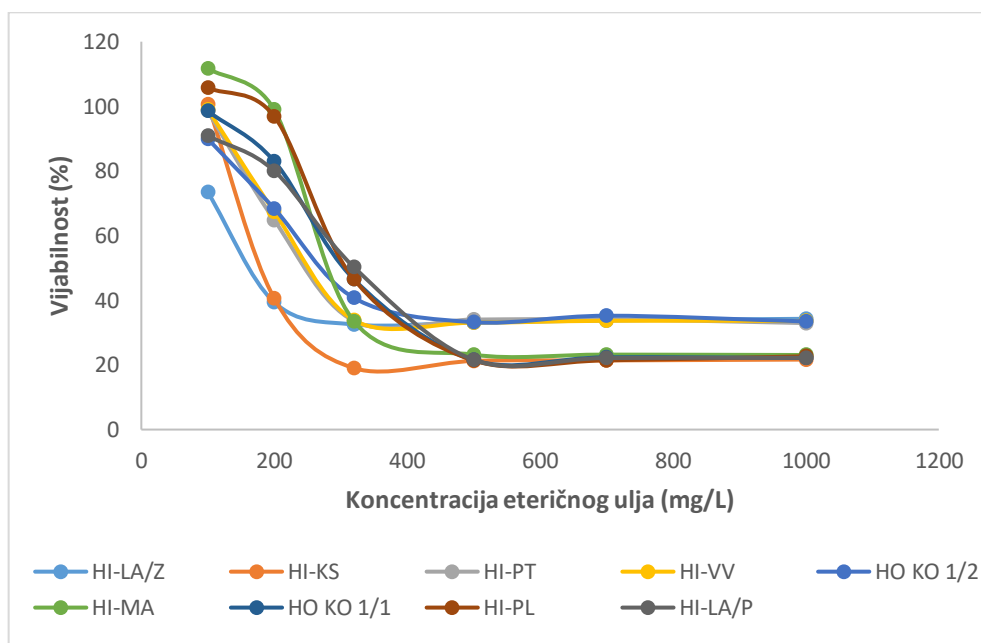
3.5. Citotoksična aktivnost eteričnih ulja na stanicama karcinoma dojke

Preliminarno je utvrđeno da eterična ulja kadulje ne pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost na stanice karcinoma dojke. Na staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231 ispitana je citotoksična aktivnost 9 uzoraka eteričnog ulja smilja. Kao i kod HDF/Tert stanica, citotoksična aktivnost eteričnog ulja smilja na MDA-MB-231 staničnim linijama, iskazana je pomoću IC₅₀ vrijednosti. U odnosu na HDF/Tert staničnu liniju kod koje je bilo poželjno da eterična ulja imaju što veći IC₅₀, kod MDA-MB-231 stanične linije poželjan je što niži IC₅₀. Jako citotoksično djelovanje iskazano pomoću niskog IC₅₀, govori da ispitivani uzorak u maloj koncentraciji uzrokuje visoku smrtnost stanica karcinoma dojke. Isti uzorak eteričnog ulja ispitana na HDF/Tert i MDA-MB-231 staničnim linijama, ne pokazuje jednaku citotoksičnu aktivnost na obje vrste stanica, IC₅₀ vrijednosti su navedene u tablici 6. Općenito, eterično ulje smilja ima blaži učinak na HDF/Tert stanice.

Tablica 6. IC₅₀ vrijednosti eteričnih ulja na dvije stanične linije

Uzorak	HDF/Tert stanice IC ₅₀ (mg/L)	MDA-MB-231 stanice IC ₅₀ (mg/L)
HI-KO 1/1	830	305
HI-KO 1/2	695	271
HI-MA	376	282
HI-PT	383	248
HI-PL	468	308
HI-KS	308	180
HI-VV	832	253
HI-LA/P	386	323
HI-LA/Z	378	162

Po pitanju citotoksične aktivnosti eteričnih ulja smilja na MDA-MB-231 stanicama, najniži IC₅₀ ima uzorak HI-LA/Z (162 mg/L), dok je najveći IC₅₀ kod uzorka HI-LA/P (323 mg/L). Na slici 31. prikazana je citotoksičnost eteričnog ulja smilja na staničnim linijama karcinoma dojke.



Slika 31. Citotoksična aktivnost eteričnog ulja smilja na MDA-MB-231

U računalnom programu Microsoft Excel, obavljena je statistička obrada podataka koja korelacijski povezuje rezultate GC-MS analize i citotoksične aktivnosti. Obradom podataka utvrđeno je kako pojedini spojevi više doprinose citotoksičnoj aktivnosti eteričnog ulja na stanicama karcinoma dojke. Budući da kemijski spoj pri različitim koncentracijama eteričnog ulja može pokazivati različitu citotoksičnu aktivnost, u obzir su uzeti samo oni spojevi koji djeluju citotoksično pri manjim koncentracijama, u koncentracijskom gradijentu u kojem se nalazi IC₅₀. Prema statističkoj obradi podataka na stanice karcinoma dojke citotoksično djeluju: β -jonon, *cis*- β -guaien i δ -kadinen. Pomoću besplatnog online sustav Way2Drug [29] izračunata je vjerojatnost citotoksičnog djelovanja za tri navedena spoja. Dok za *cis*- β -guaien i δ -kadinen nema dostupnih podataka, sustava Way2Drug s vjerojatnošću od 26% predviđa da će β -jonon biti citotoksičan za stanice karcinoma dojke. I prema korelacijskom koeficijentu za β -jonon se može očekivati bolja citotoksična aktivnost od *cis*- β -guaien i δ -kadinen. Spoj β -jonon detektiran je u uzorku HI-LA/Z (3,60%) koji je imao najmanji IC₅₀ i u uzorku HI-LA/P (6,88%) koji je imao najveći IC₅₀, u ostalim uzorcima nije prisutan. Prema statistici moglo se očekivati da će uzorak s većim udjelom β -jonona imati bolji citotoksični učinak na

stanice karcinom dojke. Budući da bolji citotoksični učinak ima onaj uzorka u kojem je prisutno manje β -jonona, to upućuje na zaključak da je za citotoksičnu aktivnost važno sinergijsko djelovanje spojeva, te odsustvo onih spojeva koji su detektirani u ostalim uzorcima sa slabijom citotoksičnom aktivnošću. Ono što uzorak HI-LA/Z čini drugačijim od ostalih uzorak je: udio α -pinena (11,28%) značajno je veći od udjela neril acetat (4,48%), sadrži visok udio limonena (5,16%), ne sadrži linalol, jedino je u ovom uzorku detektirano prisustvo borneola, značajno visok udjel nerolidola (6,46%) i γ -eudesmol (4,47%), dok α -kedrol nije detektiran.

ZAKLJUČAK

4. Zaključak

Rezultati citotoksične aktivnosti na staničnim linijama humanog dermalnog fibroblasta (HDF/Tert) opravdavaju tradicionalnu upotrebu eteričnog ulja kadulje i eteričnog ulja smilja za njegu kože. Provedenim istraživanjima ustanovljeno je da navedena eterična ulja imaju blagu citotoksičnu aktivnost, ne djeluju agresivno na stanice dermalnog fibroblasta koje se nalaze u unutrašnjem sloju kože.

Za razliku od eteričnog ulja kadulje, eterično ulje smilja pokazuje značajniju citotoksičnu aktivnost na MDA-MB-231 staničnu liniju karcinoma dojke. Provedenim testovima nije bilo moguće ustanoviti koji su spojevi odgovorni za veću citotoksičnu aktivnost eteričnog ulja smilja na stanicama karcinoma dojke. Eksperimentalni rezultati upućuju na zaključak da je citotoksična aktivnost rezultat sinergijskog djelovanja većeg broja spojeva sadržanih u eteričnom ulju smilja.

Popis slika

- Slika 1.** Opći prikaz biosinteze spojeva eteričnih ulja [3]
- Slika 2.** Biosinteza šikiminske kiseline [3]
- Slika 3.** adicijsko–eliminacijska reakcija [6]
- Slika 4.** pregradnja korizminske kiseline i biosinteza aminokiselina [6]
- Slika 5.** biosintetski putevi L-fenilalanina i L-tirozina [6]
- Slika 6.** Reakcija redukcije tioestera [6]
- Slika 7.** Biosinteza terpena [8]
- Slika 8.** Mikrovalno hidrodestilacija [11]
- Slika 9.** Mikrovalna parna destilacija [11]
- Slika 10.** Mikrovalna parna destilacija [11]
- Slika 11.** Opći prikaz separacije ekstrakta od superkritičnog fluida: a) smanjenje tlaka, b) promjenom temperature, c) adsorpcijom, d) apsorpcijom. [12]
- Slika 12.** Mehanizam antioksidacijskog djelovanja eteričnog ulja [14]
- Slika 13.** Pretražni elektronski mikroskop Tescan Mira 3, vlastita autorska fotografija
- Slika 14.** Sušilica na principu kritične točke, vlastita autorska fotografija
- Slika 15.** Uređaj za nanošenje zlata, vlastita autorska fotografija
- Slika 16.** GC-MS sustav, vlastita autorska fotografija
- Slika 16.** Test citotoksične aktivnosti, vlastita autorska fotografija
- Slika 17.** Kadulja, površina stabljike, vlastita autorska fotografija
- Slika 18.** Deformirani spremnik eteričnog ulja, vlastita autorska fotografija
- Slika 19.** Spojene žlijezde, vlastita autorska fotografija
- Slika 20.** Raspuknuta žlijezda, vlastita autorska fotografija
- Slika 21.** Žlijezde na listu, vlastita autorska fotografija
- Slika 22.** Žlijezda, list, vlastita autorska fotografija

Slika 23. Žlijezde na gornjoj površini lista, vlastita autorska fotografija

Slika 24. Žlijezde na donjoj površini lista, vlastita autorska fotografija

Slika 25. Smilje, stabljika, vlastita autorska fotografija

Slika 26. Smilje, presjek stabljike, vlastita autorska fotografija

Slika 27. Smilje, površina lista, vlastita autorska fotografija

Slika 28. Smilje, spremnik eteričnog ulja, vlastita autorska fotografija

Slika 29. Citotoksična aktivnost eteričnog ulja kadulje na HDF/Tert, vlastita autorska fotografija

Slika 30. Citotoksična aktivnost eteričnog ulja kadulje na HDF/Tert, vlastita autorska fotografija

Slika 31. Citotoksična aktivnost eteričnog ulja smilja na MDA-MB-231, vlastita autorska fotografija

Literatura

- [1] Z. Dajić Stevanović, D. Stešević i D. Pljevljakušić, Regionalni priručnik za sakupljače ljekovitog bilja, Općina Plužine (Crna Gora); Općina Ljubovij (Srbija), 2013..
- [2] I. Radojčić Redovniković, M. Cvjetko Bubalo, V. Gaurina Srček i K. Radošević, »Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka,« *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, pp. 169-175, 2016.
- [3] K. Hüsnü Can Başer i G. Buchbauer, Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, 2010..
- [4] G. M. Cooper i R. E. Hausman, Stanica, Zagreb: Medicinska naklada, 2004..
- [5] J. M. Berg, J. L. Tymoczko i L. Stryer, Biokemija, Zagreb: Školska knjiga, 2013..
- [6] J. Igor i I. Blažević, *Nastavni materijali iz Kemije i tehnologije aromatičnog bilja (nerencenzirani)*.
- [7] S. H. Pine, Organska kemija, Zagreb: Školska knjiga, 1994..
- [8] L. Taiz i E. Zeiger, Plant Physiology, Sinauer Associates, 2010..
- [9] M. Sawamura, Citrus essential oils Flavor and Fragrance, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010..
- [10] H. H. Rassem, A. H. Nour i R. M. Yunus, »Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review,« *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, pp. 117-127, 2016..
- [11] F. Chemat i G. Cravotto, Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, New York : Springer, 2013..
- [12] J. L. Martínez, Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds, New York: Taylor & Francis Group, 2007..
- [13] »Hrvatska enciklopedija,« [Mrežno]. Available: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=42588>. [Pokušaj pristupa 27. Listopad 2019.].
- [14] Y. Bhalla, V. K. Gupta i V. Jaitak, *Anticancer activity of essential oils: A review*.
- [15] Y.-J. Surh, Oxidative Stress, Inflammation, and Health, CRC Press, 2005..
- [16] E. Vrdolija, I. Belac Lovasić, Z. Kusić, D. Gugić i A. Juretić, Klinička onkologija, Zagreb: Medicinska naklada, 2018..

- [17] D. Čvorišćec i I. Čepelak, Štrausova medicinska biokemija, Zagreb: Medicinska naklada, 2000..
- [18] D. Sunil, P. R. Kamath i R. Chandrashekar H, In Vitro Bioassay Techniques for Anticancer Drug Discovery and Development, CRC Press, 2017..
- [19] G. Stace, D. Alan i M. Ferro, Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology, Springer, 2001..
- [20] M. H. Ross i W. Pawlina, Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology, Wolters Kluwer Health, 2016..
- [21] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott i L. Zipursky, Molecular Cell Biology, Macmillan Higher Education, 2004..
- [22] A. Ambriović Ristov, Metode u molekularnoj biologiji, Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2007..
- [23] I. Žilić, Udžbenik za sakupljanje samoniklog bilja, Glina: Poljoprivredna zadruga Glinska Banovina, 2014..
- [24] J. J. Bozzola, Electron microscopy, 1992..
- [25] M. Jug-Dujaković, M. Ristić, D. Pljevljakušić, Z. Dajic-Stevanovic, K. Hančević, Z. Liber, T. Radić i Z. Šatović, »High Diversity of Indigenous Populations of Dalmatian Sage (Salvia officinalis L.) in Essential-Oil Composition« *Chemistry & Biodiversity*.
- [26] J. Paolini, J.-M. Desjobert, J. Costa, A.-F. Bernardini, C. B. Castellini, P.-L. Cioni, G. Flamini i I. Morelli, »Composition of essential oils of Helichrysum italicum (Roth) G. Don fil subsp. italicum from Tuscan archipelago islands,« *Flavour and Fragrance Journal*, pp. 805-808.
- [27] J. Mastelić, O. Politeo i I. Jerković, »Contribution to the Analysis of the Essential Oil of Helichrysum italicum (Roth) G. Don.–Determination of Ester Bonded Acids and Phenols,« *Molecules*, pp. 795-803, 2008..
- [28] A. Bianchini, P. C. J. Tomi i A.-F. Bernardini, »Composition of Helichrysum italicum (Roth) G. Don fil. subsp. italicum essential oils from Corsica (France),« *Flavour and Fragrance Journal*, pp. 30-34, 2001..
- [29] »Way2Drug,« [Mrežno]. Available: <http://way2drug.com/Cell-line/index.php>. [Pokušaj pristupa 27. Listopad 2019.].