

Citotoksična svojstva ekstrakta pčelinjeg peluda hrasta medunca (*Quercus pubescens*)

Čačija, Kristijan

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:118328>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Kristijan Čačija

**CITOTOKSIČNA SVOJSTVA EKSTRAKTA
PČELINJEG PELUDA HRASTA MEDUNCA
(*Quercus pubescens*)**

Završni rad

Split, 2024.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Kristijan Čačija

**CITOTOKSIČNA SVOJSTVA EKSTRAKTA
PČELINJEG PELUDA HRASTA MEDUNCA
(*Quercus pubescens*)**

Završni rad

Split, 2024

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Marina Kranjac i komentorstvom izv.
prof. dr. sc. Željana Fredotović, predan je na
ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu
radi stjecanja zvanja prvostupnik Biologije i kemije.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Saši Prđunu i suradnicima s Agronomskog fakulteta u Zagrebu na pomoći oko prikupljanja i izbora uzoraka, mentorici doc. dr. sc. Marina Kranjac i komentorici izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović na izuzetnoj pomoći i vodstvu kroz cijeli rad. Te za kraj veliko hvala svim prijateljima, profesorima i obitelji što su me motivirali i poticali na bolje.

Ovaj završni rad je izrađen u okviru institucijskog znanstvenog projekta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu naziva "Istraživanje kemijske raznolikosti i bioaktivnog potencijala prirodnih produkata".



Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ulica Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

CITOTOKSIČNA SVOJSTVA EKSTRAKTA PČELINJEG PELUDA HRASTA MEDUNCA

(Quercus pubescens)

Kristijan Čačija

Sažetak: Pčelinji pelud je sačinjen od cvjetnog peluda, pčelinjih izlučevina, nektara i/ili meda. Može biti heterofloran ili unifloran tj. od više biljnih vrsta ili od samo jedne. U svome sastavu sadrži pregršt primarnih i sekundarnih metabolita koji pokazuju različita bioaktivna svojstva, a jedno od njih je antitumorsko djelovanje u vidu citotoksičnosti. Cilj istraživanja je pripremiti metanolni ekstrakt pčelinjeg peluda hrasta medunca i testirati njegovu citotoksičnost na dvije stanične linije raka (osteosarkoma (U2OS) i raka debelog crijeva (HCT116)). Rezultati pokazuju da određene komponente ekstrakta peluda imaju slabo citotoksično djelovanje na testirane stanične linije i to gotovo jednako kod oba uzorka staničnih linija (U2OS; $IC_{50}=22,1117$ mg/mL, a za HCT116; $IC_{50}=23,9218$ mg/mL).

Ključne riječi: Pčelinja pelud; Citotoksičnost; Ultrazvučna ekstrakcija; Ekstrakt

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 20 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice, 15 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Mentor: doc. dr. sc. Marina Kranjac, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Komentor: izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, izvanredni profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Povjerenstvo na obrani:

doc. dr. sc. Marina Kranjac, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, izvanredni profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

mag. educ. biol. et chem Martina Gudelj, asistent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad prihvaćena: 13. rujna 2024.

Basic documentation card

University of Split

B. Sc. Thesis

Faculty of science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

**CYTOTOXIC PROPERTIES OF THE EXTRACT OF PUBESCENT OAK
BEE POLLEN**

(Quercus pubescens)

Kristijan Čačija

Abstract: Bee pollen is made of flower pollen, bee secretions, nectar and/or honey. It can be heterofloral or unifloral, i.e. from several plant species or from only one. In its composition, it contains a handful of primary and secondary metabolites that present different bioactive properties, and one of them is antitumor activity in the form of cytotoxicity. The aim of the research was to prepare a methanolic extract of pubescent oak bee pollen and test its cytotoxicity on two cancer cell lines (osteosarcoma (U2OS) and colon cancer (HCT116)). The results show that certain components of the pollen extract have weak cytotoxic effects on the tested cell lines, almost equally in both samples of cell lines (U2OS; $IC_{50}=22,1117$ mg/mL, a za HCT116; $IC_{50}=23,9218$ mg/mL).

Keywords: Bee polen; Cytotoxicity; Ultrasonic extraction; Extract

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

Thesis consists of: 20 pages, 8 figures, 2 tables and 15 references, original in: Croatian

Mentor: doc. dr. sc. Marina Kranjac, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Assistant Supervisor: izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, Ph.D. Associate

Professor of Faculty of Science, University of Split

Reviewers: doc. dr. sc. Marina Kranjac, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, Ph.D. Associate Professor of Faculty of Science, University of Split

mag. educ. biol. et chem. Martina Gudelj, Assistant of Faculty of Science, University of Split

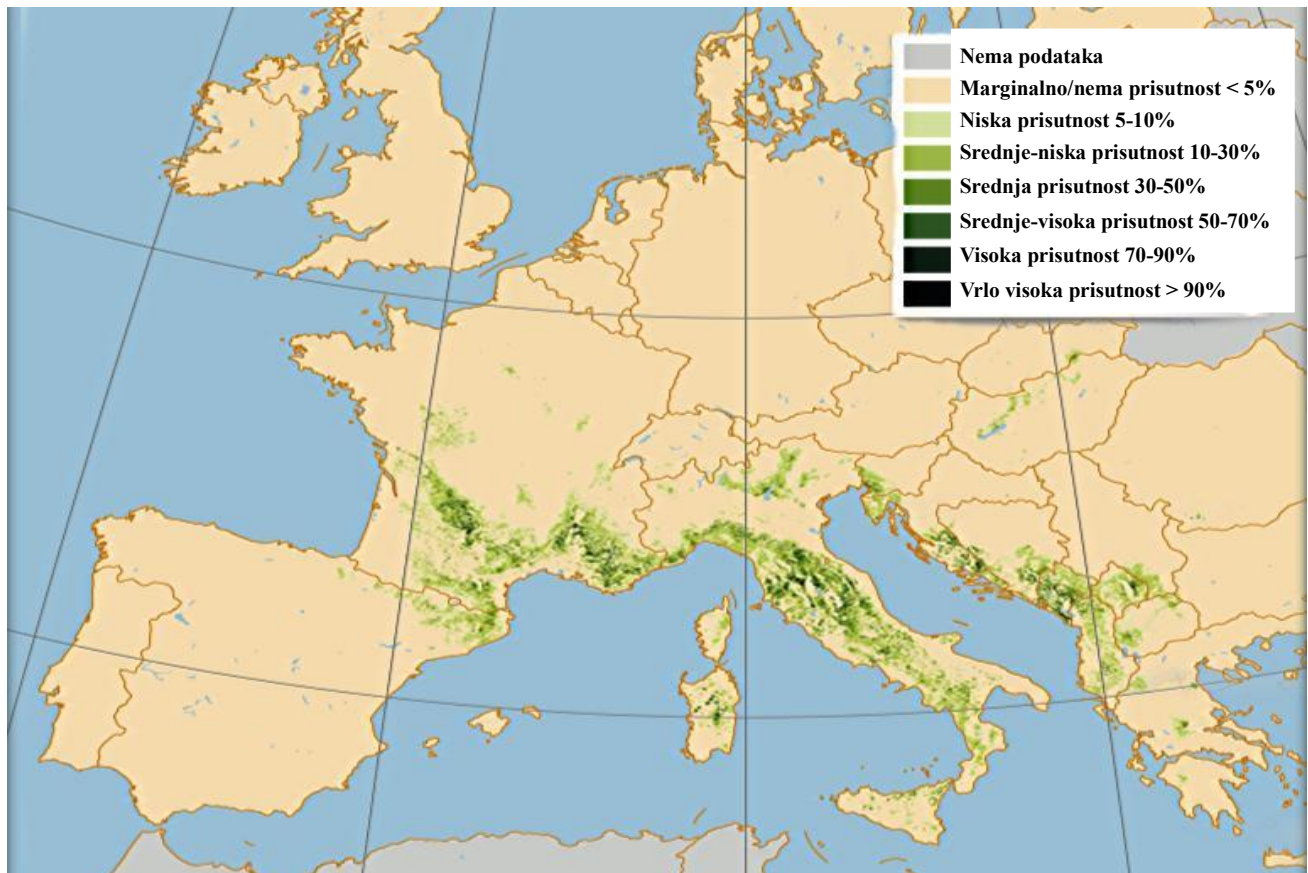
Thesis accepted: September 13th 2024

1. UVOD	1
1.1. Hrast medunac (<i>Quercus pubescens</i>)	1
1.2. Pelud.....	3
1.2.1. Kemijski sastav pčelinjeg peluda.....	3
1.2.2 Bioaktivna svojstva pčelinjeg peluda	5
1.2.2.1 Antitumorska aktivnost pčelinjeg peluda	5
1.3. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalima	6
1.4. Cilj	7
2. RAZRADA TEME	8
2.1 Materijali i postupak	8
2.1.1 Materijali	8
2.1.2 Priprema uzorka	9
2.1.3 Ultrazvučna ekstrakcija uzorka pčelinjeg peluda	11
2.1.4 Priprema ekstrakta za određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom	13
2.1.5 Priprema stanica za određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom	13
2.1.6 Postupak određivanja metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom.....	15
3. REZULTATI	16
4. ZAKLJUČAK	18
5. LITERATURA	19

1. UVOD

1.1. Hrast medunac (*Quercus pubescens*)

Hrast medunac; lat. *Quercus pubescens* Willd. je listopadno ili polulistopadno stablo srednje veličine (15-20m visine, rijetko 25m). Spada u porodicu Fagaceae; rod Quercus (hrastovi). Hrast medunac ima izrazito visoku morfološku varijabilnost zbog mnogo faktora kojima si je osigurao preživljavanje. Neki od razloga su mutacije, migracije tijekom pleistocenih glacijacija, tvorenje hibrida s drugim simpatričnim listopadnim hrastovima, itd. Ponaša se kao heliofilna i termofilna vrsta te je savršeno prilagođen podnošenju stresa umjerenih ljetnih suša i zimskih niskih temperatura, no ipak slabije raste u kontinentalnim dijelovima koji imaju više mraza (Slika 1).



Slika 1: Rasprostranjenost hrasta medunca (*Quercus pubescens*) po Europi*

*Preuzeto i prilagođeno iz Pasta *et al.* *Quercus pubescens* in Europe: distribution, habitat, usage and threats (2016.) (Pasta, et al., 2016)

Najčešće se nalazi u područjima od 200m do 800m nadmorske visine no može se pronaći i na područjima 1200-1300m nadmorske visine. Ima izrazito dlakave sivo-zelene listove koji starenjem gube dlakavost s gornje strane lista i postaju tamnozeleni i kožasti. Razlikuju se muške i ženske jedinke. Muški cvjetovi imaju 6-10 prašnika i grupirani su tako da tvore dlakavi cvat tzv. maca koja raste u podnožju novih izdanaka skupa s novim listovima (Slika 2). (Pasta, et al., 2016)

Prvenstveno se oprašuje vjetrom te zbog toga proizvodi velik broj prašnika (i peluda), obično 25-100 prašnika po cvatu. (Tantray, et al., 2017)



Slika 2: Muški cvat "maca" hrasta medunca (*Quercus pubescens*)*

*Preuzeto s Monaco Nature Encyclopedia. <https://www.monaconatureencyclopedia.com/quercus-pubescens/?lang=en> (Grossoni & Beltramini, n.d.)

1.2. Pelud

Pčelinji pelud je glavni izvor hrane cijele košnice. Građen je od cvjetnih peludnih zrnaca koje zajedno drže izlučevine pčelinjih žlijezda, nektar i/ili med. Pčele sakupljačice svojim rilom kupe cvjetni nektar i vodu koje izlučuje cvijeće i nose ga u košnicu. U košnici predaju sakupljeni nektar i vodu drugim pčelama radilicama koje na sebi nose cvjetni pelud. Zatim pčele radilice stražnjim nogama sa sitnim dlačicama zbijaju sakupljeni cvjetni pelud, oblažu s izlučevinama, nektarom i/ili medom. Tako pripremljen pčelinji pelud se skladišti u otvore košnice i zapečati voskom gdje se dalje fermentira prisustvom bakterija (*Pseudomonas* koji osigurava anaerobne uvjete, *Lactobacillus* koji prevodi ugljikohidrate u mliječnu kiselinu) i kvasca (*Saccharomyces*). Time se smanjuje pH okoline u kojoj se skladišti pelud, sprječava se klijanje peludi, a povećava njegova nutritivna vrijednost. (El Ghouizi, et al., 2023) Kemijski sastav peluda, tako i sastav biološki aktivnih spojeva, ovisi o botaničkom i geografskom podrijetlu kao i o vremenu nastanka i sakupljanja peluda. Sakupljen pčelinji pelud može biti uniflorni ili heteroflorni, tj. od samo jedne biljne vrste ili više biljnih vrsta. Uniflorni pčelinji pelud mora sadržavati minimalno 80% peluda jedne biljne vrste da bi se smatrala uniflornom. (Barth, et al., 2010) Botaničko podrijetlo peluda se određuje palinološki (mikroskopski). Peludna zrna razlikuju se po svojim morfološkim karakteristikama kao što su veličina zrna, oblik, otvori i procijepi na zrnu, boja i izgled. Boja i ostale navedene karakteristike peludnog zrna se mogu koristiti pri određivanju o kojem je rodu biljke riječ, a nekad i o kojoj je biljnoj vrsti točno riječ. (Aličić, et al., 2014)

1.2.1. Kemijski sastav pčelinjeg peluda

Kao što je u prošlom poglavlju navedeno pelud može biti od različitih biljaka, različito prikupljena, skladištena i samim time će varirati u svome biološkom i kemijskom sastavu. No unatoč razlikama i varijacijama, može se raspisati sastav kemijskih spojeva i biološki aktivnih makro i mikromolekula koje se najčešće nalaze u peludu. Nekoliko studija je uspjelo odrediti udio vode u peludu i ona varira ovisno o botaničkom i geografskom podrijetlu te o načinu skladištenja peluda (sušeni pelud ili svježi pelud). Kod svježeg peluda je udio vode oko 20-30% što nije povoljno za skladištenje zbog pogodnih uvjeta za rast bakterija i gljivica. Zbog toga se pelud isušuje različitim tehnikama da bi se smanjio udio vode. Ne postoji svjetski konsenzus o tome koji je maksimalni dopušteni udio vode u suhom peludu već se u svakoj državi zasebno propisuje. Pčele koriste pelud kao jedan od glavnih izvora hrane budući da sadrži proteine. Udio proteina uvelike ovisi o biljnom

i geografskom podrijetlu, varira i čini 10-40% ukupne suhe mase peluda. Udio aminokiselina (esencijalnih i nesencijalnih) ovisi o mnogo faktora te se vrijednost njihova udjela može koristiti za određivanja svježine peluda, pronalaženje adekvatne tehnike sušenja i skladištenja. Glavninu kemijskog sastava peluda čine ugljikohidrati, prisutni u udjelu od 13-55% i to većinom polisaharidi i građevni materijal stanične stijenke. U studijama karakterizacije pčelinjeg peluda, najvažniji parametar kvalitete peluda je udio šećera i kao takav ne bi smio biti ispod 40%. Lipidni profil i masne kiseline peluda se manje istražuju pa zato o njima nema toliko podataka, a dostupni podaci pokazuju dosta različite rezultate čak i kod peluda istih biljnih vrsta, ali različitih geografskih područja. Esencijalni minerali bitni za razvoj čovjeka (i pčela) čine 2-6% mase peluda. Među njima u većoj mjeri nalazimo: kalij (K), fosfor (P), magnezij (Mg), kalcij (Ca), željezo (Fe), cink (Zn), bakar (Cu), mangan (Mn); a u manjoj mjeri kobalt (Co), selenij (Se), molibden (Mo), bor (B) i natrij (Na). Pčelinji pelud u svom sastavu sadrži gotovo sve vitamine, 0,02-0,7% ukupnog sadržaja peluda opada na vitamine i zbog toga se kao hrana smatra tzv. "vitaminskom bombom". No možda najzanimljiviji od svih sastojaka pčelinjeg peluda su biološki aktivni spojevi među koje spadaju karotenoidi i fenoli (polifenoli, flavonoli, flavonoidi, itd.). Karotenoidi su skupina žuto-crvenih pigmenata, u peludu je najzastupljeniji karotenoid β -karoten. Riječ je o antioksidativnom provitaminu s antitumorskim, antileukemijskim i blagotvornim djelovanjem protiv kardiovaskularnih bolesti. Fenoli unutar sastava peluda imaju možda najveća biološki aktivna svojstva, stoga se određivanje fenolnog profila smatra prvim korakom prema standardizaciji i predviđanju korisnosti danog proizvoda. Ukupni udio fenolnih spojeva pčelinjeg peluda čini 3-5%, 0,19% čine fenolne kiseline među kojima su od najvećeg interesa benzojeva kiselina, feniloctena kiselina i cimetna kiselina zbog izrazite antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s drugim fenolnim kiselinama. No najbitnija skupina fenolnih spojeva su ipak flavonoidi koji čine 0,25-1,4% sastava peluda. Flavonoidi su izvrstan indikator kvalitete peluda, u najvećoj mjeri se nalaze u obliku glikozida (veze sa šećerima), a manje u slobodnoj formi. U slučaju kad tvore glikozide smanjuje im se antioksidacijska aktivnost zbog steričkih smetnji, samim time što je veći udio slobodnih flavonoida, veća je antioksidacijska aktivnost i time je bolja kvaliteta proizvoda. Najčešći flavonoidi unutar peluda su flavonoli; kvercetin, kempferol i rutin, flavoni; apigenin, krizin i luteolin, flavanoni; naringenin i pinocembrin, dok je genistein glavni izoflavon identificiran u pčelinjoj peludi. Uz sve navedene komponente unutar peluda nalazimo još hlapljive spojeve koji nisu puno istraženi, većinom se nalaze na cvijeću sa svrhom privlačenja oprašivača. (El Ghouizi, et al., 2023)

1.2.2 Bioaktivna svojstva pčelinjeg peluda

1.2.2.1 Antitumorska aktivnost pčelinjeg peluda

Trenutačne metode liječenja raka (većinom operativno, kemoterapija i zračenja) često štete i zdrave stanice što uzrokuje nepoželjne nuspojave pa ne iznenađuje da se traže alternativne metode liječenja koje će možda biti sigurnije i efektivnije. Jedna od alternativnih metoda koja se istražuje je djelovanje određenih spojeva pčelinjih produkata (npr. pčelinjeg peluda) na tumorske stanice. (Rodríguez-Pólit, et al., 2023) U posljednje vrijeme se pčelinji pelud promovira kao dodatak prehrani odlične nutritivne vrijednosti i terapijskih učinaka. Unatoč takvom promoviranju mnoga svojstva peluda nisu dovoljno istražena dok su se neka pokazala neučinkovitima u terapiji. Ipak je više studija pokazalo da pčelinji pelud sadrži mnogo primarnih i sekundarnih metabolita koji pokazuju pregršt različitih svojstava poput protuupalnih, protutumorskih, antioksidacijskih, antialergijskih i antibakterijskih. Nekoliko studija je pokazalo da pčelinji pelud ima antimitotična svojstva kod određenih vrsta raka, dok su neka istraživanja pokazala da pčelinji pelud čak inducira apoptozu i stimulira lučenje alfa-faktora nekroze tumora (TNF- α). Smatra se da antitumorsko djelovanje pčelinjeg peluda proizlazi iz njegovih antioksidacijskih svojstava tj. supresije formiranja kisikovih reaktivnih vrsta (ROS) i/ili uklanjanja/inaktivacije već formiranih kisikovih reaktivnih vrsta (ROS). U skladu s rezultatima studija pretpostavlja se da ekstrakti peluda bogati određenim spojevima, naročito fenolnim kiselinama i flavonoidima utječu na kontrolu rasta stanica (inhibiraju tumorski rast). (Denisowa & Denisow-Pietrzykb, 2016) Pčelinji pelud je proučavan na mnoštvu *in vitro* tumorskih staničnih kultura te je uočena razlika u antiproliferativnom djelovanju u ovisnosti o različitim faktorima kao što su metoda pripreme ekstrakta (različita otapala), bioaktivni sastav peluda (koji ovisi o botaničkom i geografskom podrijetlu peluda), vrsta pčela koje su prikupile pelud, itd. Neki od rezultata tih studija su da heteroflorni pčelinji pelud ima izraženiju citotoksičnu aktivnost od uniflornog pčelinjeg peluda, da postoji sinergistički učinak između metanolnog ekstrakta pčelinjeg peluda malezijske pčele bez žalca *L. terminata* i cisplatina, itd. Na poslijetku iako postoje rezultati koji pokazuju određenu antitumorsku aktivnost, nema ih dovoljno za utvrđivanje učinkovitosti pčelinjeg peluda na stanice raka, a neki od njih su još i proturječni. Jasno je da je potrebno provesti još *in vitro* i *in vivo* istraživanja (većina do sada su rađena *in vitro*) da se razjasne mehanizmi antitumorskog djelovanja pčelinjeg peluda, no i jednako tako je jasno da ima potencijala i uporišta za njih. (Rodríguez-Pólit, et al., 2023)

1.3. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalima

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (skraćeno UAE, engl. *ultrasound assisted extraction*) je metoda ekstrakcije koja se smatra zelenom metodom zato što ima kraće vrijeme trajanja postupka, visoku reproducibilnost, koristi manje otapala, manje otpadnih tvari, veća čistoća produkta, itd. Funkcionira na način da ultrazvuk putuje kroz otapalo, raste brzina gibanja molekula te nastaje kavitacijski mjehur. Taj mjehur pri sudaru sa stjenkom uzorka uzrokuje kavitaciju tj. puknuće. Ujedno se ultrazvukom potiče ubrzano gibanje molekula otapala, pucanje stjenke uzorka, usitnjavanje i samim time povećanje površine uzorka. Svi ti faktori utječu na poboljšanu ekstrakciju tako što se usitnjavanjem povećava dodirna površina uzorka i otapala, kavitacijom nastaju otvori na uzorku kroz koje otapalo prodire dublje u uzorak i jednako tako povećanjem brzine gibanja molekula otapala ono dublje prodire u uzorak i povećava se topljivost tvari u njemu. Još veći prinos ekstrakta se postiže promjenom temperature pri kojoj se vrši UAE. Primjerice, kod nekih otapala povećanjem temperature se može smanjiti viskoznost i površinska napetost otapala čime će se osigurati bolje uvjete prodora otapala u uzorak. Kod ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih spojeva (npr. fenolnih spojeva) obično se koristi metanol, etanol ili smjese navedenih otapala sa vodom. (Oroian, et al., 2020) No ovisno o tome koji se spojevi od interesa žele ekstrahirati iz uzorka mogu se koristiti različita organska otapala. Prilikom izbora otapala trebamo uzeti u obzir više faktora kao što su polarnost, vrelište otapala, reaktivnost (otapalo ne smije reagirati sa ekstraktom, niti se smije razgrađivati), viskoznost otapala, stabilnost na zraku i svjetlu, stabilnost pri promjeni temperature, otrovnost i štetnost za ljude i okoliš te dostupnost i cijena. (Drmić & Jamrak, 2010) Liu *et al.* su uočili značajan porast u ukupnom sadržaju fenola i flavonoida u uzorcima *Pinus massoniana* peluda podvrgnutih tretmanu sonifikacije u usporedbi sa svježim nesonificiranim uzorcima i uzorcima obrađenima metodom naglog zamrzavanja i odmrzavanja (kontrolni uzorci). (Liu, et al., 2015)

1.4. Cilj

- Pripraviti ekstrakt uniflornog pčelinjeg peluda hrasta medunca (*Quercus pubescens*) primjenom ultrazvučne ekstrakcije metanolom.
- Upariti otapalo (metanol) iz dobivenog ekstrakta primjenom rotacijskog vakuum-uparivača te otapanjem suhog ekstrakta pripremiti otopine odgovarajuće koncentracije za daljnje istraživanje i korištenje.
- Ispitati citotoksično djelovanje pripremljenog ekstrakta na stanice osteosarkoma (U2OS) i stanice raka debelog crijeva (HCT116).
- Odrediti IC_{50} vrijednost, odnosno koncentraciju pri kojoj je postignuta 50%-tna smrtnost stanica u funkciji vremena.

2. RAZRADA TEME

2.1 Materijali i postupak

2.1.1 Materijali

Kemijsko posuđe i pribor:

- Analitička vaga (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG)
- Čaše
- Erlenmeyerove tikvice s brušenim čepom
- Okrugle tikvice s brušenim čepom
- Lijevak za filtriranje
- Pamuk
- Povratno hladilo
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonis easy 60 H , Elma Schmidbauer GmbH; U: 220-240V, P: 550W, f: 50-60Hz)
- Rotavapor s vodenoj kupelji (Büchi rotavapor R-124 s Büchi B-480 vodenoj kupelji, BÜCHI Labortechnik AG)
- Eksikator
- Parafilm (Parafilm® M Sealing Film)
- Pipeta jednokanalna promjenjiva 100-1000 µL
- Šprice
- Celulozni filteri (CA Syringe Filter (Cellulose Acetate), Nantong FilterBio Membrane Co.,Ltd: promjer 25mm, veličina pore 0,45µm)
- Invertni mikroskop
- Petrijeva ploča
- Falcon epruveta (Isolab Laborgeräte GmbH)
- Automatski brojač stanica (Scepter 3.0 (Merck, Darmstadt, Germany))
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica
- Multikanalna mikropipeta
- Vlažni inkubator
- Laminar

Kemikalije:

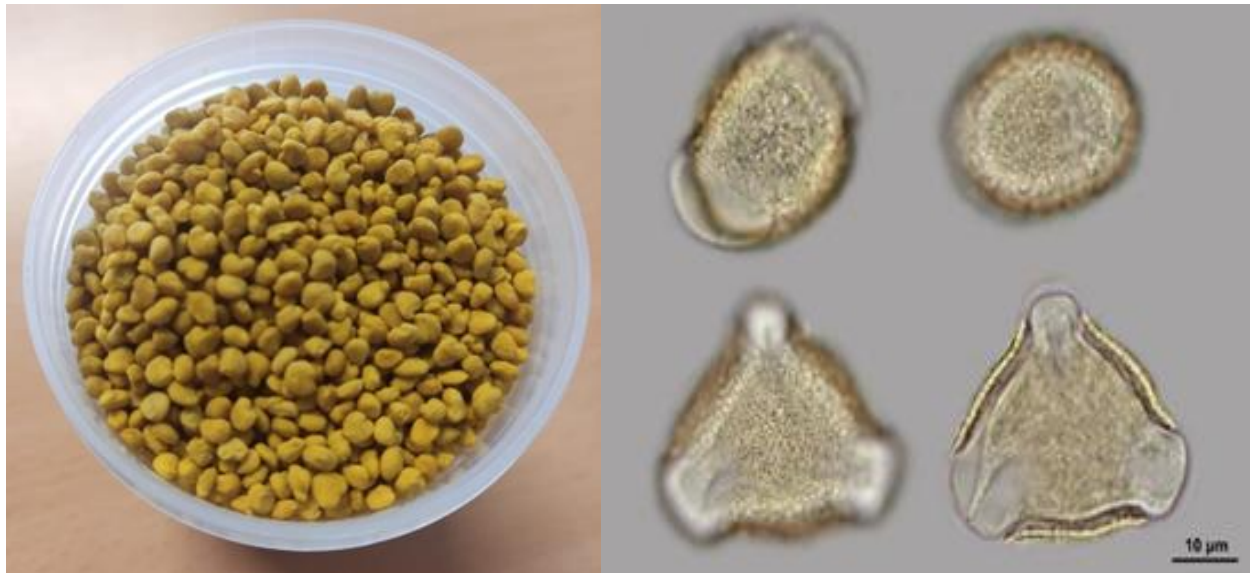
- Metanol, p.a. (Gram Mol)
- Bezvodni natrijev sulfat (Gram Mol)
- DMSO; w=10%
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Trypsin
- MTS-based CellTiter 96® Aqueous Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)

Uzorak peluda i stanične linije:

- Uniflorni pčelinji pelud hrasta medunca (*Quercus pubescens*)
- Kultura stanične linije osteosarkoma (U2OS)
- Kultura stanične linije raka debelog crijeva (HCT116)

2.1.2 Priprema uzorka

Istraživanje se vrši na uzorku uniformnog pčelinjeg peluda hrasta medunca (*Quercus pubescens*) poslanog s Agronomskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu, sakupljenog u Otočcu 15.05.2023. Preliminarna diferencijacija i sortiranje pčelinjeg peluda istog botaničkog podrijetla se zasniva na izgledu peludnog zrna i boji. Samo botaničko podrijetlo je zatim dalje potvrđeno palinološkom analizom provedenom na Agronomskom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu (Slika 3). Uzorak koji sadrži više od 80% peludnih zrna jedne biljne vrste se smatra uniflornom pčelinoj peludi. Uzorak je skladišten u Falcon epruveti u hladnoj komori pri temperaturi od cca 5°C u kartonskoj kutiji. Na početku praktičnog rada je približno 3,0000 g peluda izvagano na analitičkoj vagi i prebačeno u Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim grlom za daljnji postupak.



Slika 3: Peludna zrna hrasta medunca (*Quercus pubescens*) (lijevo) i pod svjetlosnim mikroskopom (desno)*

*Slika pod svjetlosnim mikroskopom preuzeta s PalDat - Palynological Database: an online publication on recent pollen. (Auer & Waltraud, 2021)

https://www.palдат.org/pub/Quercus_pubescens/306156

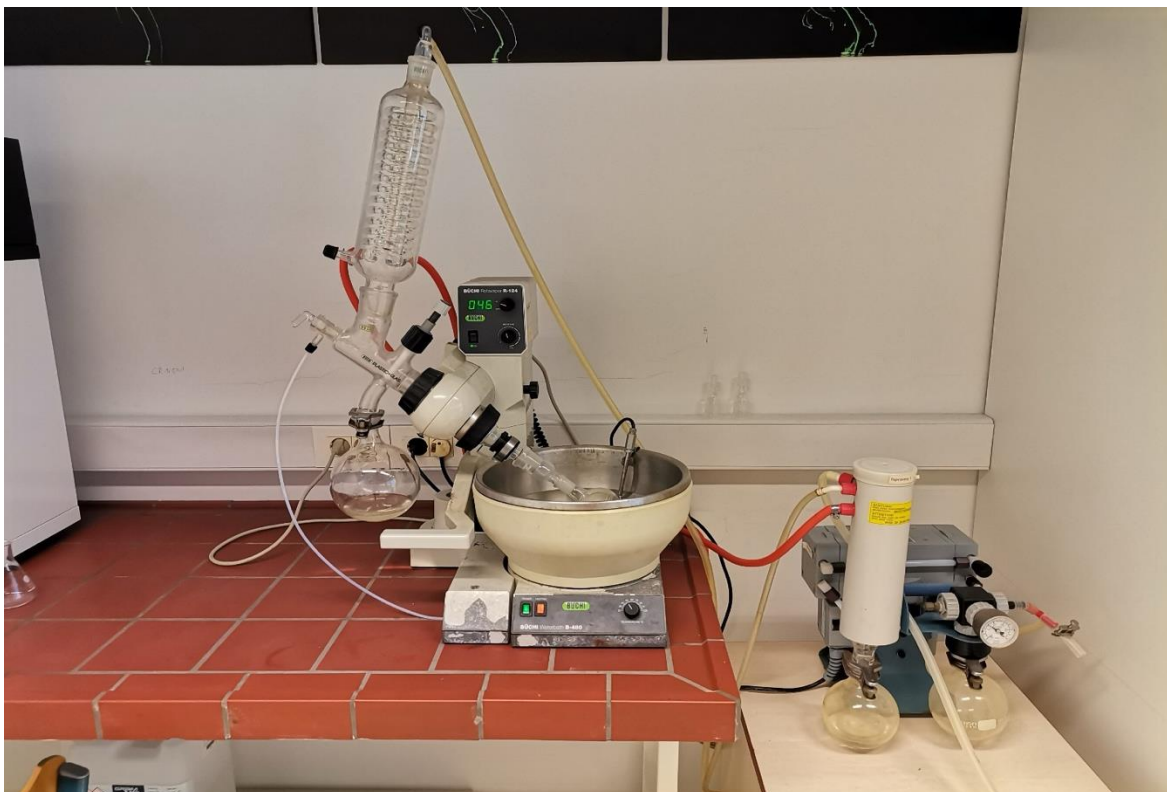
2.1.3 Ultrazvučna ekstrakcija uzorka pčelinjeg peluda

U tikivcu s prethodno izvaganim uzorkom se doda 20 mL metanola i spoji se na povratno hladilo s pamučnim čepom na gornjem otvoru. Tako pripremljena aparatura se postavi nad ultrazvučnu kupelj (Elma Schmidbauer GmbH, Germany) na način da je Erlenmeyerova tikvica u centru kupelji, ne dira nijednu stijenku kupelji i sav sadržaj u tikvici se nalazi ispod razine vode kupelji (Slika 4).



Slika 4: Pripremljena aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju

Nakon što je cijela aparatura provjerena i sve brtvi kako treba, uključi se voda na povratnom hladilu, upali se ultrazvučna kupelj prethodno ugrijana na 40°C i vrši sonifikacija i ekstrakcija uzorka u intervalu od 15 min pri frekvenciji 50-60Hz. Pri isteku 15 min kupelj se automatski gasi, tikvica se skida s povratnog hladila, pričekava da se sadržaj slegne, a zatim se ekstrakt prebaci i filtrira preko lijevka u suhu Erlenmyerovu tikvicu s brušenim čepom. Sa zaostalom peludi u tikvici ponavlja se postupak ekstrakcije s još dva obroka od 20 mL metanola kako bi se postigao veći ekstrakcijski iscrpak. Dobiveni ekstrakti se suše na bezvodnom natrijevom sulfatu, te filtriraju kroz celulozni filter (Nantong FilterBio Membrane Co.,Ltd, Nantong City, Jiangsu P.R China; veličina pora 0,45 µm) u čistu prethodno izvaganu tikvicu s okruglim dnom i brušenim grlom da bi bili sigurni da u ekstraktu nemamo zaostalih nečistoća i čestica peluda. Okrugla tikvica se zatim spaja na rotavapor (Büchi rotavapor R-124 s Büchi B-480 vodenoj kupelji) gdje uparimo ekstrakt do suha pri temperaturnom intervalu 40-50°C. (Slika 5). Tikvica se preko noći ostavi u eksikatoru da izvuče zaostalu vlagu iz uzorka te se zatim važe, začepi i izolira s parafilmom do upotrebe ekstrakta.



Slika 5: Uparivanje ekstrakta do suha na rotavaporu

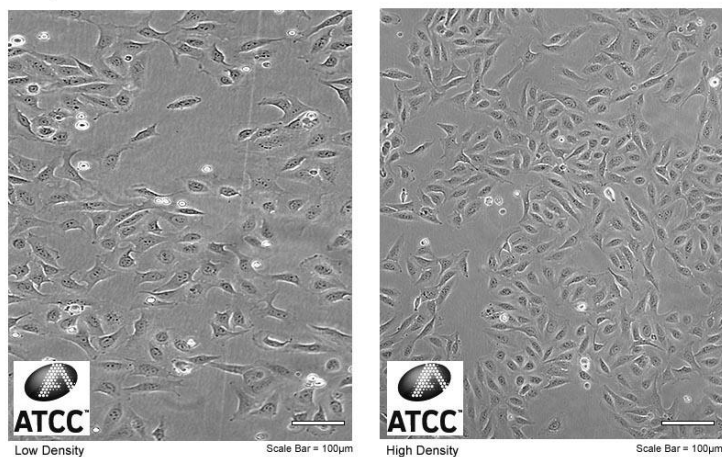
2.1.4 Priprema ekstrakta za određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom

Tikvica s ekstraktom se izvadi iz eksikatora, skine se parafilm i važe prije upotrebe. Od ukupne mase se oduzima masa prazne tikvice i čepa da se dobije masa ekstrakta. Dobiveni ekstrakt se otapa par minuta u 2 mL DMSO; w=10% uz konstatno miješanje. Zatim se dodaje još 1 mL DMSO; w=10% uz konstatno miješanje da se što više ekstrakta skine sa stijenke tikvice. Netom prije same upotrebe ekstrakta kod određivanja metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) MTS metodom potrebno je 500 µL ekstrakta prebaciti u Falcon epruvetu i pomiješati s 500 µL DMEM medija (razrjeđenje). Pri završetku eksperimenta je potrebno ponovo izvagati tikvicu u kojoj je bio ekstrakt da se sazna kolika je masa ekstrakta zaostalog na stijenci tikvice, oduzme se ta masa od ukupne mase ekstrakta i izračuna prava koncentracija korištenog ekstrakta.

2.1.5 Priprema stanica za određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom

Stanične linije osteosarkoma (U2OS) i raka debelog crijeva (HCT116) nakon odmrzavanja uzgojene su u vlažnom inkubatoru pri 37°C uz 5% CO₂ u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju. Uzgojena kultura stanica pregleda se pod invertnim mikroskopom i ukoliko je ploča 80-100% konfluentna, potrebno ju je rasaditi (Slika 6)(Slika7). Sterilnim nastavkom odsiše se medij te se doda 2 mL prethodno ugrijanog tripsina kojim se stanice pokuša odlijepiti s ploče. Kad se sve stanice odlijepe, u istu ploču doda se 8 mL prethodno ugrijanog DMEM medija kojim se neutralizira tripsin i resuspendira stanice. Pripremi se nova ploča s 8 mL svježeg DMEM medija (ugrijanog na 37°C) i u nju se doda 2 mL suspenzije stanica sa stare ploče koje se miješanjem ravnomjerno rasporede po ploči. Stanice se pogledaju pod mikroskopom (moraju biti malene, okrugle, odvojene jedne od drugih i plivati po ploči) te se ostave 48 h na 37°C i 5% CO₂ u inkubatoru.

ATCC Number: **HTB-96**™
Designation: **U-2 OS**



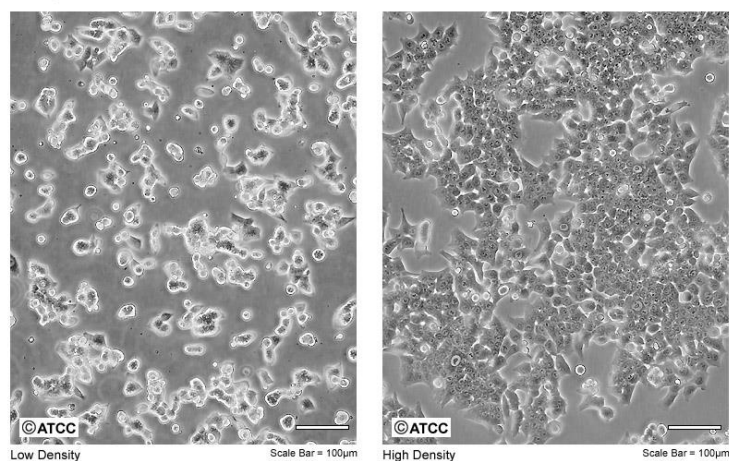
Slika 6: Stanična linija osteosarkoma (U2OS) male gustoće nasadenosti (lijevo) i velike gustoće nasadenosti pod invertnim mikroskopom*

*Preuzeto s ATCC (American Type Culture Collection).

(ATCC, n.d.)

<https://www.atcc.org/products/htb-96#detailed-product-images>

ATCC Number: **CCL-247**
Designation: **HCT 116**



Slika 7: Stanična linija raka debelog crijeva (HCT116) male gustoće nasadenosti (lijevo) i velike gustoće nasadenosti pod invertnim mikroskopom*

*Preuzeto s ATCC (American Type Culture Collection).

(ATCC, n.d.)

<https://www.atcc.org/products/ccl-247#detailed-product-images>

2.1.6 Postupak određivanja metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom

MTS kolorimetrijski test koristi se kod određivanja metaboličke aktivnosti stanica, a time i citotoksičnog potencijala određene tvari/ekstrakta. Zasniva se na sposobnosti zdravih stanica da reduciraju žuti MTS ((3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3- karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u tamnoljubičasti formazan. Vidljiva promjena boje iz žute u ljubičastu karakteristična je za metabolički aktivne odnosno žive stanice (Riss, et al., 2013)

Za određivanje citotoksične aktivnosti ekstrakta uniflornog pčelinjeg peluda hrasta medunca (*Quercus pubescens*) korišten je MTS-based CellTiter 96® Aqueous Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). Uzgojene stanice odlijepe se s ploče prema postupku opisanom u 2.1.5 te se skupe u falcon tubu od 15 mL nakon čega im se uz pomoć automatskog brojača stanica (Scepter 3.0 (Merck, Darmstadt, Germany)) odredi koncentracija. Stanice se razrijede DMEM medijem do koncentracije $1 \cdot 10^5$ stanica/mL. U mikrotitarsku ploču s 96 jažica u prvi stupac se doda po 100 μ L razrijeđenog ekstrakta. Zatim se stavlja po 100 μ L DMEM medija u donje četiri i 50 μ L u gornje četiri jažice posljednjeg stupca ploče. Dodaje se po 50 μ L DMEM medija u sve jažice od predzadnjeg do drugog stupca. Multikanalnom mikropipetom se iz prvog stupca uzima 50 μ L ekstrakta, prenosi u idući, dobro resuspendira, usiše 50 μ L, prebaci u novi stupac i tako sve do predzadnjeg gdje se nakon resuspenzije usiše 50 μ L i baci. Na taj način se na ploči dobije po stupcima serija razrjeđenja ekstrakta. Stanice se potom izliju iz Falcon epruvete u petrijevu ploču (koja se konstantno treba miješati da se uvijek uzima otprilike isto stanica koje se dodaje u jažice) te se mikropipetom prenosi po 50 μ L stanica iz petrijeve ploče u prve četiri gornje jažice zadnjeg stupca, a onda u sve jažice od predzadnjeg do prvog stupca (uključujući prvi stupac). Pripremljena ploča se dobro izmiješa i ostavi u inkubatoru 48 h na 37°C i 5% CO₂.

Po završetku tretmana, u svaku jažicu doda se 20 μ L MTS ((3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3- karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) reagensa te se ploča inkubira još 3 sata na 37°C i 5% CO₂. Nakon završetka inkubacije mjeri se apsorbancija u svakoj jažici na čitaču mikrotitarskih ploča pri valnoj duljini od 490 nm. Metabolička aktivnost stanica se zatim izračuna kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Citotoksična aktivnost se izražava kao IC₅₀ vrijednosti koja označava koncentraciju ekstrakta pri kojoj 50% stanica prestaje biti metabolički aktivno, a računa se kao srednja vrijednost dva neovisna eksperimenta.

3. REZULTATI

$m_{uk}(\text{ekstrakt}) = 2,0666 \text{ g}$ → *početna (ukupna) masa ekstrakta

$m_{is}(\text{ekstrakt}) = 1,5030 \text{ g}$ → *masa ekstrakta otopljenog u 3 mL DMSO; w= 10%

$\rho(\text{ekstrakt}) = 0,5010 \text{ g/mL}$ → *masena koncentracija ekstrakta otopljenog u DMSO

$\rho(\text{ekstrakt}) = 0,2505 \text{ g/mL}$ → *masena koncentracija ekstrakta nakon razrijeđenja s medijem

Podatci očitani s čitača mikrotitarskih ploča su dalje obrađeni u programu Excel, a rezultati su iskazani preko dvije tablice. IC_{50} vrijednosti koncentracija ekstrakta su prikazane u tablici 1, a srednja vrijednost i standardna devijacija su prikazane u tablici 2.

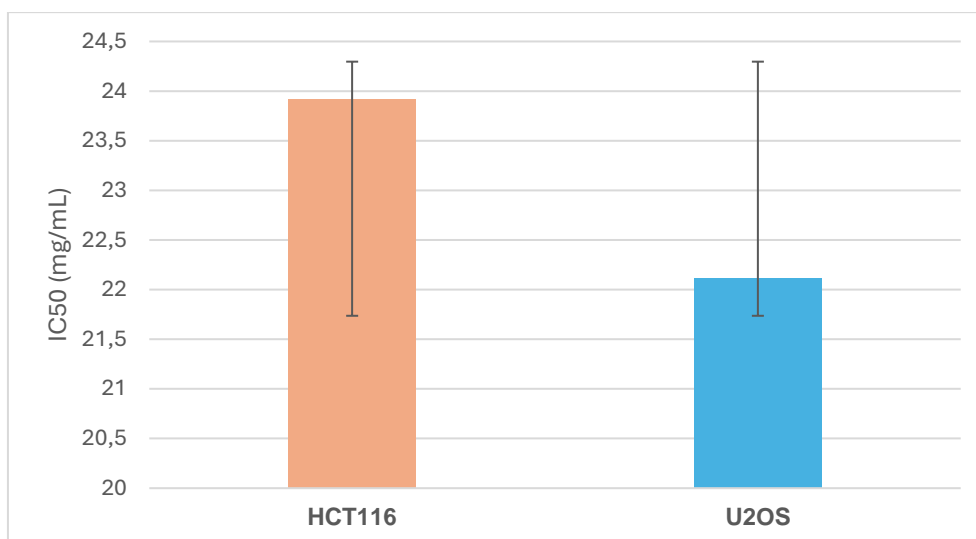
Tablica 1: IC_{50} vrijednosti ekstrakta hrasta medunca (*Quercus pubescens*)

IC_{50} vrijednost ekstrakta hrasta medunca (<i>Quercus pubescens</i>) (mg/mL)		
Stanične linije	Ekperiment 1	Ekperiment 2
U2OS	25,0235	19,1999
HCT116	25,9511	21,8925

Tablica 2: Srednje IC_{50} vrijednosti i standardne devijacije ekstrakta hrasta medunca (*Quercus pubescens*) na U2OS i HCT116 stanične linije dobivene iz dva neovisna eksperimenta

Stanične linije	Srednja vrijednost (mg/mL)	Standardna devijacija
U2OS	22,1117	4,1179
HCT116	23,9218	2,8699

Iz dobivenih podataka je sastavljen graf koji nam pokazuje da određene komponente ekstrakta peluda imaju slabo citotoksično djelovanje na testirane stanične linije i to gotovo jednako kod oba uzorka staničnih linija (U2OS; $IC_{50} = 22,1117 \text{ mg/mL}$, a za HCT116; $IC_{50} = 23,9218 \text{ mg/mL}$)(Graf 1).



Graf 1: Citotoksična aktivnost ekstrakta peluda hrasta medunca (*Quercus pubescens*) na stanične linije osteosarkoma (U2OS) i raka debelog crijeva (HCT116).*

*Prikazane IC₅₀ vrijednosti su srednje vrijednosti koncentracija s pripadajućom standardnom devijacijom (▬).

4. ZAKLJUČAK

- Indirektna sonifikacija uzorka u ultrazvučnoj kupelji je pogodna metoda za ekstrakciju pčelinjeg peluda, a njenom upotrebom se može izostaviti proces usitnjavanja uzorka pčelinjeg peluda.
- Metanol je pogodno otapalo u pripremi ekstrakta pčelinjeg peluda za određivanje citotoksičnosti jer se obično koristi za izolaciju polifenolnih spojeva od koji se očekuje najveća citotoksična aktivnost.
- Metanol je pogodno otapalo u pripremi ekstrakta pčelinjeg peluda za određivanje citotoksičnosti jer se jednostavno i lako ukloni upotrebom rotacijskog vakuum-uparivača.
- Ekstrakt pčelinjeg peluda hrasta medunca (*Quercus pubescens*) pokazuje slabu citotoksičnu aktivnost na obje stanične linije raka (rak debelog crijeva i osteosarkom).

5. LITERATURA

1. Aličić, D. i dr., 2014. Antioxidant properties of pollen.. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, III(1), pp. 6-12.
2. ATCC, n.d. *American Type Culture Collection (ATCC)*. [Mrežno]
Available at: <https://www.atcc.org/products/htb-96#detailed-product-images>
[Pristupljeno 23 kolovoza 2024].
3. ATCC, n.d. *American Type Culture Collection (ATCC)*. [Mrežno]
Available at: <https://www.atcc.org/products/ccl-247#detailed-product-images>
[Pristupljeno 23 kolovoza 2024].
4. Auer & Waltraud, 2021. *PalDat - Palynological Database an online publication on recent pollen*. [Mrežno]
Available at: https://www.paldat.org/pub/Quercus_pubescens/306156
[Pristupljeno 18 kolovoza 2024].
5. Barth, O. M. i dr., 2010. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization.. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, IV(82), pp. 893-902.
6. Denisowa, B. & Denisow-Pietrzykb, M., 2016. Biological and therapeutic properties of beepollen: a review.. *J Sci Food Agric*, Issue 96, p. 4303–4309.
7. Drmić, H. & Jamrak, A. R., 2010. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva.. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, II(2), pp. 22-33.
8. El Ghouizi, A. i dr., 2023. Bee Pollen as Functional Food: Insights into Its Composition and Therapeutic Properties.. *Antioxidants*, Issue 12, p. 557.
9. Grossoni, P. & Beltramini, M., n.d. *Quercus pubescens - Monaco Nature Encyclopedia*. [Mrežno]
Available at: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/quercus-pubescens/?lang=en>
[Pristupljeno 18 kolovoza 2024].
10. Liu, X. i dr., 2015. Effect of sonication on different quality parameters of Pinus massoniana Pollen.. *Ultrasonics Sonochemistry*, Issue 22, pp. 174-181.
11. Oroian, M., Ursachi, F. & Dranca, F., 2020. Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from Crude Pollen.. *Antioxidants*, Issue 9, p. 322.

12. Pasta, S., de Rigo, D. & Caudullo, G., 2016. *Quercus pubescens* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: *European Atlas of Forest Tree Species*. s.l.:an., pp. 156-157.
13. Riss, T. L. i dr., 2013. *Cell Viability Assays*.. U: *Assay Guidance Manual*... Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, pp. 1-27.
14. Rodríguez-Pólit, C. i dr., 2023. Chemical Properties and Biological Activity of Bee Pollen.. *Molecules*, Issue 28, p. 7768.
15. Tantray, Y. R., Wani, M. S. & Hussain, A., 2017. Genus *Quercus*: An Overview.. *International Journal of Advance Research in Science and Engineering (IJARSE)*, VI(8), pp. 1880-1886.