

Antioksidacijska svojstva odabranih Micromeria vrsta

Švob, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:708841>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Monika Švob

**Antioksidacijska svojstva odabranih *Micromeria*
vrsta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina. 2021

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija II Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Bival Štefan.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Maji Bival Štefan na pomoći pri odabiru teme za ovaj rad, te na stručnom vodstvu, savjetima i razumijevanju.

Zahvaljujem mojem Miji i cijeloj obitelji na podršci i strpljenju.

Hvala Kikiju na nesebičnoj pomoći.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Botanička obilježja.....	1
1.1.1. Porodica Lamiaceae.....	1
1.1.2. Biljne vrste roda <i>Micromeria</i> Bentham.....	2
1.1.3. <i>Micromeria croatica</i> (Pers.) Schott, hrvatska bresina.....	2
1.1.4. <i>Micromeria juliana</i> (L.) Bentham ex Rchb., primorska bresina.....	3
1.1.5. <i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch, točkasta bresina.....	4
1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja odabranih vrsta roda <i>Micromeria</i>	5
1.3. Polifenoli i ostale sastavnice vrsta roda <i>Micromeria</i>	8
1.3.1. Polifenoli.....	8
1.3.2. Ostale sastavnice roda <i>Micromeria</i>	10
1.4. Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija i učinci NO.....	10
1.4.1. Oksidacijski stres.....	10
1.4.2. Lipidna peroksidacija.....	11
1.4.3. Učinci NO.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Istraživani biljni materijal.....	15
3.1.2. Instrumenti i pribor.....	15
3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije.....	15
3.2. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja.....	17
3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata vrsta roda <i>Micromeria</i>	17
3.2.2. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog(II) oksida.....	17
3.2.3. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije.....	18
3.3. Statistička analiza.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida.....	20
4.2. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije.....	25
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA	30
7. SAŽETAK/SUMMARY	33
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Slobodni radikali i ostali aktivni derivati kisika neizbježni su nusprodukti bioloških redoks reakcija. Povećano stvaranje toksičnih derivata kisika smatra se univerzalnom značajkom stresnih uvjeta (Arora i sur., 2002). Carstvo biljaka izvor je velikog broja sastavnica koje ispoljavaju antioksidacijski učinak. Polifenolne sastavnice kao što su flavonoidi, fenolne kiseline i tanini najviše pridonose antioksidacijskom djelovanju ljekovitih biljaka, voća i povrća. Porodica Lamiaceae uključuje mnogo biljaka s izraženim ljekovitim djelovanjem koje se tradicionalno koriste u terapiji srčanih poremećaja, glavobolje, prehlade, rana, infekcija kože, kao herbicidi i insekticidi, te u kulinarstvu (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Rod *Micromeria* su, prema arheološkim spisima, koristili stanovnici Mediteranskog područja tisućama godina (Azab, 2016). U sklopu ovog diplomskog rada odabrane su tri vrste roda *Micromeria*: *Micromeria juliana* (L.) Benth. ex. Rechb., *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch., *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. Fitokemijska istraživanja pokazala su da ove vrste roda *Micromeria* sadrže eterično ulje, flavonoide i triterpene (Vladimir-Knežević i sur., 2011)

1.1. Botanička obilježja

1.1.1. Porodica Lamiaceae

Lamiaceae, prijašnjeg naziva Labiateae, obitelj je aromatskih cvjetnica koja obuhvaća 236 rodova i više od 7000 vrsta.. Rasprostranjene su diljem svijeta, no mnoge se vrste uzgajaju zbog svojih mirisnih listova i privlačnih cvjetova. Većina članova porodice polugodišnje su i godišnje biljke kockaste stabljike, iako su neke vrste drvenasti grmovi i polugrmovi. Listovi su jednostrani i nasuprotni i imaju žlijezde s eteričnim uljem, dok se cvjetovi razvijaju u pazušcima listova i čine paštite cvatove. Plod je kalavac koji se pri dozrijevanju raspada na četiri suha jednosjemena plodića.. Mnoge vrste su samonikle u našim krajevima, a veliki broj vrsta se uzgaja za potrebe farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije, najviše radi eteričnih ulja

koja daju karakterističan miris i okus vrstama ove porodice (Kuštrak, 2005, <https://www.britannica.com/>).

1.1.2. Biljne vrste roda *Micromeria* Bentham

Rod *Micromeria* Bentham predstavlja 130 vrsta sa središtem rasprostranjenosti u zemljama Sredozemlja. Glavne vrste roda *Micromeria* u Hrvatskoj su *M. croatica*, *M. thymifolia* i *M. juliana*. *M. croatica* i *M. thymifolia* endemske su vrste u Hrvatskoj i nekim susjednim zemljama, dok je *M. juliana* rasprostranjena na Mediteranu (Vladimir-Knežević i sur., 2011) Mali, razgranjeni polugrmovi, slični onima iz roda *Thymus*, često dlakavi i mirisavi. Listovi su sitni, širokojajasti ili okruglasti, ili pak kopljasti do linearni, te manje-više prevrnutog ruba. Cvjetovi su sjedeći ili na kratkim stapkama, crvene, ljubičaste, blijedoljubičaste boje ili bijeli. Vjenčić i prašnici slični su kao u roda *Satureja*, a čaška ima 13 do 15 žila i 5 jednakih zubaca s dugim šiljcima (Forenbacher, 2001).

1.1.3. *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, hrvatska bresina

M. croatica niska je trajnica kratkih stabljika, združenih u busen, koje su malo razgranjene i obrasle dlakama. Listovi su sjedeći, cjeloviti i dlakavi. Donji su okruglasti, a gornji više jajasti ili jajasto kopljasti i šiljati. Po 2 do 3 cvijeta zajedno su u pazušcima gornjih listova. Čaška je cjevasta i dlakava, a vjenčić ljubičaste ili purpurne boje, izvana dlakav. Gornja je usna izrubljena, a donja trorežnjasta. Cvate od 7. do 9. mjeseca. Hrvatska bresina endemična je biljka sjeverozapadnog dijela Dinarskih planina, osobito Velebita, te karakteristična vrsta tog područja. Raste u pukotinama stijena s humusom i na kamenjarskim travnjacima gorskog i pretplaninskog područja (Forenbacher, 2001).



Slika 1: *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, hrvatska bresina, (preuzeto s <https://hirc.botanic.hr/fcd/>)

1.1.4. *Micromeria juliana* (L.) Bentham ex Rchb., primorska bresina

M. juliana patuljasti je grm uspravnih stabljika visokih do 40 cm, prekrivenih dlačicama. Listovi su 3-8 mm dugački, 1-2,5 mm široki, prekriveni kratkim dlačicama, ponajviše na naličju. Cvjetovi su dvodomni, 4-20 uređenih u pršljenove. Lapovi su iste duljine kao časica cvijeta. Čaška je duga 2,5-3,5 mm, bez dlačica u podnožju, s izduženim, rigidnim, blago nejednakim zupcima. Vjenčić je ljubičast, dug 5 mm. Rasprostranjena je u Portugalu, jugoistočnoj Francuskoj, Korzici, Kreti, Italiji, Siciliji, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Makedoniji, Bugarskoj, Turskoj i Grčkoj (Kremer i sur., 2014).



Slika 2: *Micromeria juliana* (L.) Bentham. ex Rechb., primorska bresina (preuzeto s <https://hirc.botanic.hr/fcd/>)

1.1.5. *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, gorska bresina

M. thymifolia je polugrm tankih i krkih grana smeđe i sjajne kore. Stabljike su uspravne ili povijene (20-40cm), a listovi su tanki, blijede zelene boje i goli, na posve kratkoj peteljci. Oblika su jajasto kopljastog, tupog vrha, dugi 1-2 cm, a široki 3-8 mm. Gornji su listovi prema vrhu stabljike sve manji i sjedeći. Cvjetovi su skupljeni u duge klasaste cvjetove sastavljene od 8 do 18 pršljenasto raspoređenih skupina od 5 do 10 cvjetova. Čaška ima kratke, trokutaste zupce, često ljubičaste boje. Vjenčić ima oko 0,5 cm dugu, bijelu cijev i dvousnat obod. Gornja je usna bjelkaste do blijede ljubičaste boje, a donja bijela s ljubičastim točkama. Cvate u 8. i 9. mjesecu. Ova vrsta bresine česta je među kamenjem, u pukotinama stijena i na točilima (Velebita), počevši od donje granice bukve pa do pretplaninskih (700-1500m) položaja (Forenbacher, 2001).



Slika 3: *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, (gorska bresina), (preuzeto s <https://hirc.botanic.hr/fcd/>)

1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja odabranih vrsta roda *Micromeria*

Vladimir-Knežević i suradnici 2011. ispitivali su antioksidacijsku aktivnost 3 odabrane *Micromeria* vrste koje rastu u Hrvatskoj (*M. juliana*, *M. thymifolia*, *M. croatica*) koristeći 5 različitih ispitivanja u usporedbi s biljnim polifenolnim sastavnicama i referentnim antioksidansima. Svi proučavani etanolni ekstrakti uzoraka biljaka pokazali su značajnu aktivnost u neutralizaciji slobodnih OH i DPPH radikala, sposobnost redukcije i kelacije metala, te ukupnu antioksidativnu sposobnost s poretkom *M. croatica* >*M. juliana* > *M. thymifolia*.. Snažna korelacija utvrđena je između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja fenolnih kiselina i tanina indicirajući da su oni uzrok djelotvornosti ispitivanih biljaka.

Vuko i suradnici 2019. proučavali su antifitoviralnu aktivnost eteričnog ulja *M. croatica* i rezultati su indicirali da sastavnice eteričnog ulja mogu potaknuti odgovor na virusnu infekciju. Tretman eteričnim uljem promijenio je razinu genske ekspresije alternativne oksidaze

u zaraženim *Arabidopsis* biljkama, indicirajući povezanost između tretmana eteričnim uljem *M. croatica*, ekspresije aox gena i razvoja virusne infekcije.

Vladimir-Knežević i suradnici 2015. napravili su studiju o hepatoprotektivnoj aktivnosti i mogućim mehanizmima etanolnog ekstrakta *M. croatica* koristeći model inducirane ozljede jetre miševa pomoću tetraklorougljika. Rezultati studije pokazali su da *M. croatica* uz antifibrotički potencijal ima i *in vivo* antioksidacijsko i protuupalno djelovanje, te da ima sposobnost prevencije nekroze jetre i suprimiranja hepatičke fibrinogeneze.

Šamec i suradnici 2015. objavili su prvi rad o polifenolnom sastavu i antioksidacijskom kapacitetu metanolnih ekstrakata *M. croatica* u ovisnosti o biljnom organu i području rasta. Ekstrakt lista *M. croatica* sa Bačić kuka sadržavao je najveći udio ukupnih polifenola i flavonoida, posljedično pokazujući najveći antioksidacijski kapacitet, te je isti ekstrakt imao najviši ACI (Antioxidant composite index). Rezultati su pokazali da udio analiziranih sastavnica u vrsti *M. croatica* više ovisi o organu biljke nego o lokaciji rasta.

List *M. croatica* s Bačić kuka pokazao je protektivno djelovanje prema lipidima i DNA, dok je u ispitivanjima djelovanja na proteine imao antioksidacijsko djelovanje u niskim koncentracijama, a prooksidativno u višim koncentracijama. U višim koncentracijama ekstrakt je imao citotoksično djelovanje u Hep2 stanicama i inducirao stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva.

Bukvički i suradnici 2016. istražili su kemijski sastavi i antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja *M. thymifolia*, te njegovu djelovanje na međustaničnu komunikaciju između bakterija vrste *Pseudomonas aeruginosae*. Limonen, piperiton oksid i piperiton epoksid utvrđeni su kao glavne sastavnice koristeći GC-masenu spektrometriju.

In vitro antimikrobna aktivnost eteričnog ulja testirana je na 6 bakterijskih i 7 gljivičnih sojeva, te je uočen visoki antimikrobni potencijal.

Inhibitorni učinak eteričnog ulja na međustanične komunikacije testiran je pri subMIC koncentracijama. Ova studija pokazala je da eterično ulje *M. thymifolia* posjeduje sposobnost inhibicije međustanične komunikacije bakterija.

Tošić i suradnici 2019. ispitivali su fitokemijski sastav i antimikrobnu aktivnost samonikle i *in vitro* uzgojene vrste *M. croatica*. *In vitro* uzroci su uzgajani na MS mediju bez biljnih faktora rasta ili su suplementirane kinetinom. Dokazano je da eterično ulje samonikle i *in vitro* uzgojene vrste *M. croatica* ima 44 sastavnice od kojih su dominantni oksigenirani monoterpeni. Borneol je glavna sastavnica identificirana u nativnim (25,28%) i *in vitro* uzgojenim biljkama (20,30%). Udio ukupnih seskviterpena bio je znatno manji u *in vitro* uzgojenim uzrocima nego u samoniklim uzrocima. Tretman kinetinom uzrokovao je pojačano stvaranje eteričnog ulja i produkciju oksigeniranih monoterpena od čega su najvišu koncentraciju imali borneol i cis-p-menta-1(7),8-dien-ol. *In vitro* uzgoj uzrokovao je povećano stvaranje eteričnog ulja kao i kvantitativne promjene u njegovom sastavu.

Antimikrobna aktivnost analizirana je mirkodilucijskom metodom. Ekstrakti dobiveni iz *in vitro* kulture imali su bolje antibakterijsko djelovanje od nativnih kultura, pri čemu su *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus* bili najosjetljiviji.

Stojanović i suradnici 2005. ispitivali su sastav i antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja *M. juliana* i *M. cristata* GC-MS analizom. Glavne sastavnice *M. cristata* koje su određene su isoborneol (11,3%), borneol (8,5%), verbenon (8,2%), 10-epi- α -cardinol i tujan-3-ol, a kod *M. juliana* verbenol (11,8%), timol (10,8%), kariofilen oksid (10,5%), borneol (9,3%) i mirtenal (7,1%). Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata ispitivana je disk difuzijskom metodom s ampicilinom kao standardom na 6 mikroorganizama (*E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enteridis* i *A. niger*). Pri razrjeđenju 1:20 djelovanje djelovanje oba eterična ulja bilo je umjereno, dok pri 1:40 razrjeđenju ulja su pokazala slabu do gotovo nikakvu aktivnost.

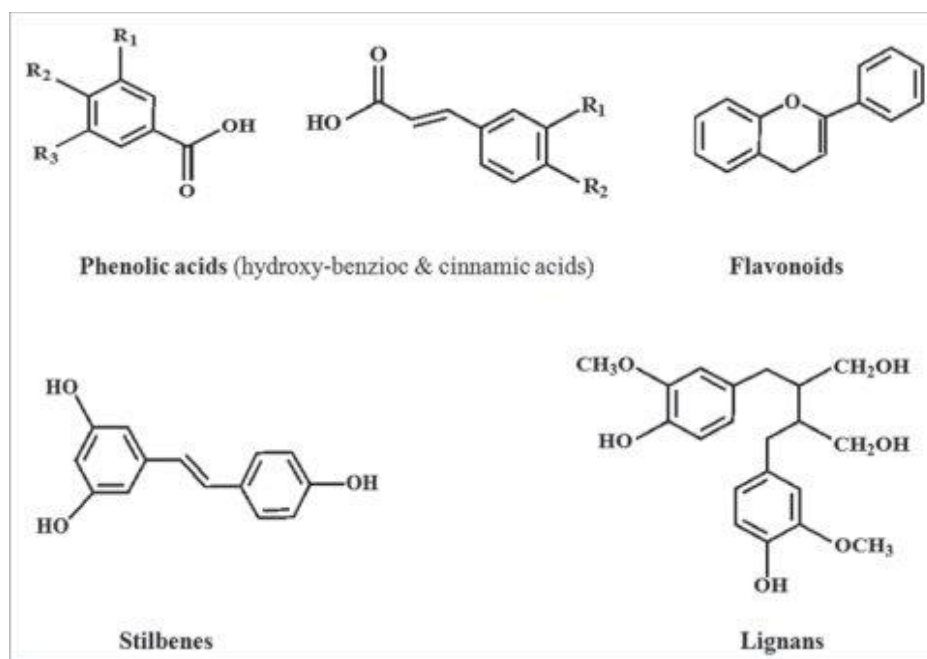
1.3. Polifenoli i ostale sastavnice vrsta roda *Micromeria*

1.3.1. Polifenoli

Široko rasprostranjeni u biljnom carstvu i u našoj prehrani, polifenoli su danas jedni od najpopularnijih fitokemijskih spojeva. Poznato je nekoliko tisuća komponenti dobivenih iz biljaka, koje imaju više od jedne fenolne hidroksilne grupe koja se nalazi na benzenskom prstenu, što ih klasificira u polifenole. U posljednje vrijeme polifenoli su postali važni zbog njihove potencijalne upotrebe u profilaksi i terapiji mnogih bolesti zbog čega su postali tema mnogih znanstvenih radova koji se fokusiraju na njihove antioksidacijske učinke. Biljni polifenoli osobito su proučavani zbog zaštite od mnogih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom i štetom uzrokovanom slobodnim radikalima pri čemu dolazi do kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, raka, dijabetesa, autoimunih poremećaja i nekih upalnih bolesti. Fenolne sastavnice sveprisutne su u biljkama, ali njihova distribucija u biljnom tkivu, staničnim i substaničnim razinama nije jednaka. Netopljivi fenoli prisutni su u staničnim stijenkama, dok su topljivi prisutni u vakuolama. U biljkama sudjeluju u različitim funkcijama kao što su struktura, pigmentacija, oprašivanje, otpornost na patogene i biljojede, rast i razvoj. Netopljivi fenoli daju mehaničku snagu stanicama i imaju regulatornu ulogu u rastu i morfogenezi biljke, dok su topljivi fenoli odgovorni za obranu od stresa i patogena.

Većina biljnih fenola potječe od *trans*-cimetne kiseline, koja nastaje iz L-fenilalanina. Biljke sintetiziraju nekoliko tisuća poznatih različitih fenolnih sastavnica čija karakterizacija kontinuirano raste. Okarakterizirane su kao najobilniji biljni sekundarni metaboliti s visoko varijabilnim strukturama, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline, do visoko polimeriziranih supstanci kao što su tanini. Zajednička značajka svih biljnih fenolnih sastavnica prisustvo je hidroksilno supstituiranog benzenskog prstena u njihovoj strukturi, te su klasificirani u različite grupe prema broju fenolnih prstena, ili prema strukturnim elementima koji te prstene povezuju, dok su ustanovljene razlike između flavonoida, fenolnih kiselina, stilbena i lignana (Slika 4). Najčešće se pojavljuju u konjugiranoj formi s jednim ili više šećernih ostataka vezanih za hidroksilne grupe, iako postoje oblici koji imaju direktno vezan šećer na aromatski C atom. Studije na ljudima pokazuju da biljni polifenoli mogu smanjiti rizik od različitih kroničnih bolesti, ali mora biti provedeno još znanstvenih istraživanja koji bi definitivnim dokazima potkrijepili njihovu protektivnu ulogu. Smatra se da polifenoli mogu biti

antioksidansi putem različitog broja mehanizama – neutralizacijom slobodnih radikala u kojem polifenoli prekidaju njihov lanac djelovanja, kao i smanjivanjem njihove produkcije putem regulacije enzimske aktivnosti ili kelacijom metalnih iona uključenih u formiranje slobodnih radikala. Interakcija između polifenolnih sastavnica i drugih fizioloških antioksidansa također je jedan od mogućih fizioloških puteva. Polifenolne sastavnice posjeduju idealnu strukturu za neutralizaciju slobodnih radikala zbog toga što imaju fenolne hidroksilne grupe koje posjeduju sposobnost doniranja vodikovog atoma ili elektrona slobodnom radikalu i konjugirani aromatski sustav koji može delokalizirati nesparesni elektron (Vladimir-Knežević i sur., 2012). TLC kromatografijom utvrđeno je da etanolni ekstrakti *M. croatica*, *M. thymifolia* i *M. juliana* sadrže flavonoide, fenolne kiseline i tanine. Potvrđeno je da su flavonoidi derivati apigenina, acacetina i luteolina. Dvije fenolne kiseline identificirane su kao klorogenska i ružmarinska, pri čemu je utvrđeno da je ružmarinska kiselina dominantna komponenta etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* (Vladimir Knežević i sur., 2011).



Slika 4: Prikaz kemijskih struktura fenolnih kiselina, flavonoida, stilbena i lignana (Pandey i sur., 2009)

1.3.2. Ostale sastavnice vrsta roda *Micromeria*

Eterično ulje *M. juliana* analizirano je GC/MS analizom i ustanovljeno je da sadržava 64 sastavnice od kojih su važni ugljikovodici alfa pinen (7.2-10.6%) i beta pinen (4.9-7.0%), kao i monoterpeni, te beta kariofilen (2.5-4.2%) i seskviterpen alfa gurjunen (2.1-6.4%). Najznačajniji oksigenirani monoterpeni su linalol (4.7-7.6%), uključujući i njegove furanoidne *cis*- i *trans*- okside (3.5-4.6%), te borneol (2.2-3.5%). Ostali monoterpeni, seksviterpeni kao i ostale ne terpenoidne sastavnice prisutni su u tragovima (Mastelić i sur., 2005).

U eteričnom ulju *M. thymifolia* identificirana je 21 sastavnica koja obuhvaća 78.2% od ukupnog sastava eteričnog ulja. Najznačajnije sastavnice su pulegon (50,4%), piperitenon (10,3%) i piperitenon oksid (4,3%) (Šavikin i sur., 2010).

Sastav eteričnog ulja *M. croatica* obuhvaća 27 do 39 sastavnica među kojima su najznačajniji kariofilen oksid i E- kariofilen (Kremer i sur., 2012).

1.4. Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija i učinci NO

1.4.1. Oksidacijski stres

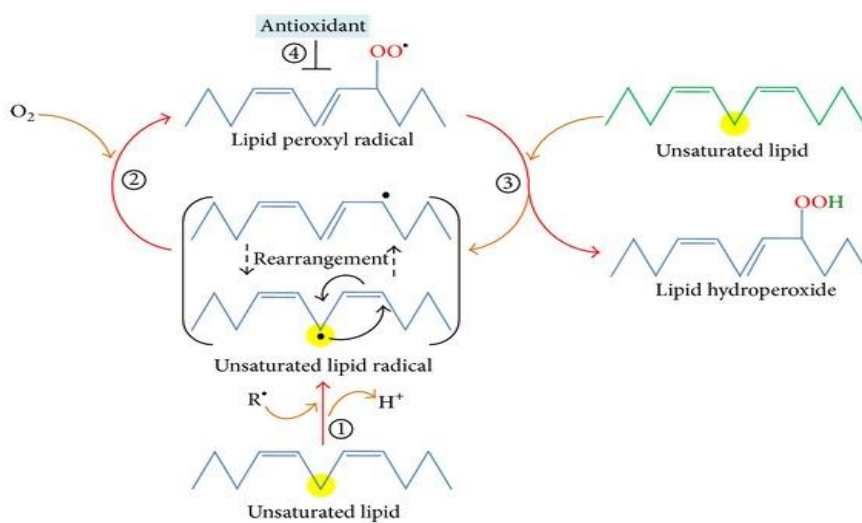
Prirodni antioksidansi intenzivno se istražuju desetljećima u svrhu sprječavanja različitih bolesti koje su uzrokovane oksidacijskim stresom i djelovanjima slobodnih radikala. Oksidacijski stres povezan je s patogenim mehanizmima mnogih bolesti uključujući aterosklerozu, neurodegenerativne bolesti, karcinom, dijabetes, upalne bolesti i proces starenja. Definiran je kao neravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih metabolita, tzv. oksidansa, te također uključuje njihovu eliminaciju putem zaštitnih mehanizama, koji se još nazivaju i antioksidativni sustavi. Ta neravnoteža uzrokuje oštećenje važnih biomolekula i organa s potencijalnim djelovanjem na cijeli organizam. Antioksidansi mogu odgoditi, inhibirati ili prevenirati oksidaciju tvari sklonih oksidacijskom procesu uklanjanjem slobodnih radikala te smanjenjem oksidacijskog stresa. (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Slobodni radikali jesu vrlo nestabilne kemijske čestice koje u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Zbog nesparenog elektrona, slobodni su radikali vrlo reaktivni i njihovo je

stvaranje u uskoj sprezi s aerobnim metabolizmom. Relativno male količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) trajno se proizvode u svim aerobnim organizmima. Velike količine ili nedovoljno učinkovito uklanjanje ROS uzrokuje oksidacijskim stresom koji može oštetiti biološke makromolekule i uzrokovati metaboličke poremećaje. ROS ima neprijepornu važnost u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi i imunološkom odgovoru. Aktivirane fagocitičke stanice poput monocita, neutrofila, eozinofila i makrofaga, proizvode ROS kao dio mehanizma uništavanja mikroorganizama nakon fagocitoze. S druge strane pak, kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, te oksidirati gotovo svaku molekulu (Štefan i sur., 2007.). Hidroksilni radikali uzrokuju oksidacijsko oštećenje stanica jer nespecifično napadaju biomolekule locirane manje od nekoliko nanometara od mjesta njegove generacije uzrokujući različite stanične poremećaje kao što su neurodegenerativne bolesti, rak i kardiovaskularne bolesti. Smatra se da se hidroksilni radikali u biološkim sustavima formiraju putem redoks cikličkog sustava pomoću Fentonove reakcije, gdje slobodni ion željeza (Fe^{2+}) reagira sa vodikovim peroksidom i Haber-Weissove reakcije koja rezultira produkcijom Fe^{2+} kad superoksid reagira s feri ionom željeza (Fe^{3+}). Također, različiti prijelazni metali uključujući Cu, Ni, Co i V mogu uzrokovati stvaranje hidroksilnih radikala u živim stanicama (Ayala i sur., 2014)

1.4.2. Lipidna peroksidacija

Trigliceridi su pohranjeni u različitim stanicama, ali posebice u masnom tkivu, te su glavni oblik rezervne energije u sisavaca. Polarni lipidi strukturne su komponente stanične membrane gdje sudjeluju u stvaranju permeabilne membrane stanica i organela u obliku lipidne barijere, te modificiranjem biofizičkih aspekata membrane kao što su polarnost i permeabilnost utječu na njezino fiziološko stanje, te također imaju ključnu ulogu u biologiji kao signalne molekule (Ayala i sur., 2014). Lipidna peroksidacija dio je etiologije različitih bolesti. Njezin proces može započeti različitim oksidansima uključujući vodikov peroksid, superoksid i visoko reaktivne hidroksilne radikale tijekom patoloških stanja ili izloženosti ksenobioticima i onečišćenjima okoliša (Slika 5). Lipidna peroksidacija može uzrokovati promjene proteinske strukture staničnih membrana i njezine funkcije, dok neprimijećena može biti uzrokom stanične disfunkcije i oštećenja tkiva (Ramana i sur., 2016). Hidroperoksilni radikal ima važnu ulogu u mehanizmu lipidne peroksidacije. Ova protonirana forma superoksida potiče stvaranje

vodikovog peroksida koji može reagirati s redoks aktivnim metalima uključujući željezo i bakar pri čemu nastaju hidroksilni radikali putem Fentonove i Haber-Weissove reakcije. Hidroperoksilni radikal jači je oksidans od anionskog radikala superoksida i ima sposobnost inicijacije lančane reakcije polinezasićenih masnih kiselina, te kao posljedicu ima oštećenje stanične membrane. Pri subtoksičnim uvjetima lipidne peroksidacije, stanice se pomoću sustava antioksidansa ili aktivacije signalnog puta koji regulira antioksidanse mogu održati i preživjeti. U suprotnosti, pri toksičnim uvjetima opseg lipidne peroksidacije veći je od sposobnosti popravka stanice i stanica inducira apoptozu ili nekrotičnu programiranu smrt. Posljedično, oba procesa uzrokuju oštećenje stanice što može uzrokovati različita patološka stanja i ubrzati starenje. Primarni produkti lipidne peroksidacije su lipidni hidroperoksidi, dok su sekundarni produkti aldehidi, pri čemu je malondialdehid najveći mutagen, a 4-hidroksinonenal najtoksičniji produkt procesa. Glavni izvori endogene proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta su mitohondriji, plazma membrane, endoplazmatski retikulum i peroksisomi putem različitih mehanizama, uključujući enzimatske reakcije i/ili autooksidaciju različitih sastavnica kao što su kateholamini i hidrokinoni. Različiti egzogeni stimulansi kao ionizacijsko i UV zračenje, duhanski dim, infekcije patogenima, okolišni toksini te izloženost herbicidima i insekticidima izvori su produkcije reaktivnih kisikovih vrsta *in vivo*. (Ayala i sur., 2014)



Slika 5: Prikaz procesa lipidne peroksidacije. U inicijacijskom procesu prooksidansi oduzimaju nezasićenom lipidu vodikov ion čime se formira nezasićeni lipidni radikal koji je nestabilan i prelazi u stabilniji oblik - konjugirani dien (reakcija 1). U fazi propagacije konjugirani dien reagira s kisikom i nastaje lipidni peroksi radikal (reakcija 2). Lipidni peroksi radikal može oduzeti vodik drugom nezasićenom lipidu i generirati novi nezasićeni lipidni radikal i lipidni hidroperoksid (reakcija 3). U fazi terminacije antioksidanti doniraju vodikov atom lipidnom peroksi radikalumu čime nastaju neradikalni spojevi (reakcija 4). (Ayala i sur., 2014).

1.4.3. Učinci NO

Dušikov oksid plin je i slobodni radikal koji ima važnu ulogu u fiziologiji. Sintetizira se enzimatski iz aminokiseline L-arginina u velikom broju tkiva pomoću 3 izoforme dušik oksid sintaze, od kojih je jedna inducibilna i može formirati velik broj molekula dušikovog oksida. Dušikov oksid važan je u endotel ovisnoj regulaciji protoka krvi i krvnog tlaka, kao i u aktivaciji trombocita. Također, prepoznat je kao neurotransmiter u određenim neuronima, te s ostalim slobodnim radikalima važan je kao primarni obrambeni mehanizam od napada različitih mikroorganizama. Ulazi u bliske interakcije s proteinima koji sadrže željezo i veže se za hem čime aktivira gvanil ciklazu koja sudjeluje u sintezi cikličkog GMP koji na molekularnoj razini aktivira različite puteve čija je uloga propagacija različitog fiziološkog djelovanja dušikovog oksida. Različite modifikacije strukture enzima i strukturnih proteina posljedica su reakcije molekula dušikovog oksida sa slobodnim radikalima kao što su kisikov i superoksidni anion pri čemu nastaju reaktivni oksidansi koji modificiraju proteine, aminokiseline i tiolne grupe nitracijom i nitrozacijom. Modifikacije proteina pod utjecajem dušikovog oksida evidentne su u upalnim procesima i u određenom opsegu u patologiji vezanoj za te procese (Bruckdorfer, 2005). Uslijed hipoksičnih uvjeta respiratorni lanac u mitohondrijima proizvodi dušikov oksid koji može generirati stvaranje reaktivnih dušikovih vrsta (RNS). ROS/RNS mogu dalje generirati ostale reaktivne vrste inducirajući lipidnu peroksidaciju (Vladimir Knežević i sur., 2012). Iako reaktivne kisikove i dušikove vrste igraju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima i uključeni su u obranu domaćina, njihovo preveliko stvaranje, kao i stvaranje hidroksil radikala, hidrogen peroksida, superoksidnih aniona i peroksil nitrita doprinosi imunopatologiji različitih stanja, uključujući upalne bolesti, rak, aterosklerozu, dijabetes, hipertenziju, AIDS, proces starenja i propadanja hrane (Awah i Verla, 2010). Kako bi spriječili štetni utjecaj ROS/RNS, antioksidacijske strategije uključuju ili pojačanje endogene obrane

putem antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze i katalaze) ili pojačanjem neenzimatske obrane (glutacion, vitamini) pomoću farmakoloških sredstava ili prehrane (Vladimir Knežević i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Zbog stresnog i ubrzanog načina života, sve je veći interes za istraživanjem prirodnih antioksidansa kao što su polifenoli, koji ne samo da se potencijalno mogu primijeniti u terapiji različitih bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom i slobodnim radikalima, nego i u njihovoj prevenciji. Stoga u okviru ovog diplomskog rada istražene su tri vrste roda *Micromeria* kod kojih je potvrđen polifenolni sastav i dio su hrvatske flore: *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia*. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti antioksidacijsko djelovanje nadzemnih dijelova odabranih vrsta roda *Micromeria* određujući sposobnost hvatanja radikala dušikovog (II) oksida i inhibiciju lipidne peroksidacije spektrofotometrijskim metodama kako bi se doprinjelo znanstvenim spoznajama o antioksidacijskoj aktivnosti istih.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Istraživani biljni materijal

Nadzemni dijelovi tri odabrane vrste roda *Micromeria* Bentham (Lamiaceae) sakupljani su u razdoblju pune cvatnje na različitim lokacijama u Republici Hrvatskoj

3.1.2. Instrumenti i pribor

analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)

centrifuga EBA 20 (Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Njemačka)

tekator Cyclotec (Foss, Hilleroed, Danska)

UV-VIS spektrofotometar Helios γ (Spectronic unicam, Cambridge, Velika Britanija).

rotacijski vakum-uparivač Büchi (Büchi labortechnik AG, Postfach, Švicarska)

ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)

automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

Askorbinska kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)

Butilhidroksitoluen (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)

Dimetil sulfoksid (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)

Ekstrakt goveđeg mozga (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Fosforna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Fosfatni pufer (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Natrij-nitroprusid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Natrij hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Naftiletilendiamin hidroklorid (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Rutin (Fluka, Buchs, Švicarska)

Ružmarinska kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)

Sulfanilamid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Tiobarbiturna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

Trikloroetna kiselina (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)

Željezo (III) klorid (bezvodno) (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.2. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria*

Osušeni i praškasto usitnjeni nadzemni dijelovi ispitivaih vrsta roda *Micromeria* (5 g) ekstrahirani su s 50 mL 70%-tnog etanola na ultrazvučnoj kupelji 30 minuta. Dobiveni ekstrakti filtrirani su preko Whatman br. 1 filter-papira, uz pomoć Buchnerovog lijevka. Biljni materijal koji je zaostao na filter-papiru ponovno je ekstrahiran na gore naveden način. Sjedinjeni filtrati su upareni primjenom rotacijskog vakuum-uparivača pri 50 C, a dobiveni smolasti ostatak je liofiliziran. Iskoristivost ekstrakcije iznosila je 21,60%, 19,25% i 18,28% za ekstrakte vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia*. Pripremljeni biljni ekstrakti pohranjeni su na -20 C i korišteni kao uzorci za fitokemijska ispitivanja.

3.2.2. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog(II) oksida

Korištena je spektrofotometrijska metoda (Razali i sur., 2008) u određivanju sposobnosti hvatanja radikala dušikovog(II) oksida. U 7 epruveta pripremili smo niz serijskih razrijeđenja uzorka u 1,0 mL prikladnog otapala (otapalo s kojim je pripremljen ekstrakt) tako da konačne koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi budu u rasponu koncentracija 6,25-400 µg/mL. U 3 kontrolne epruvete umjesto uzorka stavili smo 96%-tni etanol, svako određivanje provodi se u duplikatu. U svaku epruvetu dodali smo po 1,0 mL svježije pripremljene 10mM otopine natrijeva nitroprusida u PBS-u (0,01 mM, pH 7,4) primjenom repetitivne pipete da se ujedno promiješa sadržaj epruvete. Zatim se reakcijska smjesa se inkubira pri sobnoj temperaturi tijekom 120 min. Nakon inkubacije, 0,5 mL reakcijske smjese prebacili smo u čiste epruvete i pomiješali s 0,1%-tnom otopinom naftiletildiamina hidroklorida (NED), te se sadržaj epruvete promiješa. Odmah nakon dodatka reagensa izmjerili smo apsorbanciju na 540 nm, u odnosu na slijepu probu koja sarži 250 µL PBS-a, 250 µL etanola, 1,0 mL 5%-tne fosforne kiseline i 1,0 mL destilirane vode (zero base).

Postotak inhibicije: Sposobnost hvatanja NO radikala, izražena u postocima, izračna se prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ NO antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala, dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine. Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak (IC_{50}) dobivena je interpolacijom na temelju regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

3.2.3. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije odredili smo spektrofotometrijskom metodom (Houghton i sur., 1995). Pripremili smo niz serijskih razrijeđenja uzorka u DMSO-u tako da konačne koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi budu 3,125 do 200 $\mu\text{g/mL}$. 500 μL suspenzije ekstrakta goveđeg mozga pomiješali smo s 10 μL otopine uzorka. U 4 kontrolne epruvete umjesto uzorka dodali smo 10 μL DMSO-a (2 epruvete za pozitivnu i 2 epruvete za negativnu kontrolu). U svaku epruvetu osim u negativne kontrole dodali smo redom 100 μL 1mM otopine železovog(III) klorida, 290 μL 10mM PBS-a (pH 7,4) i 100 μL 1mM otopine askorbinske kiseline, dok smo u negativne kontrole dodali po 100 μL FeCl_3 i askorbinske kiseline i 200 μL H_2O . Reakcijsku smjesu inkubirali smo 60 minuta na 37 C. Zatim smo dodali 1mL 1%-tne otopine tiobarbiturne kiseline u 0,05 M otopini NaOH, 1 mL 2,8%-tne otopine trikloroctene kiseline i 0,1 mL 2%-tne otopine BHT-a. Sadržaj smo zagrijavali 20 minuta u vodenoj kupelji na 100 $^{\circ}\text{C}$ (epruvete smo stavili u čašu s vodom, pokrili papirnatim ručnicima i petrijevom zdjelicom, te stavili u vodenu kupelj). Nakon hlađenja dodali smo 2 mL n-butanola i centrifugirali tijekom 5 minuta pri 3000 okretaja/min, te po 1 mL prebacili u čiste epruvete. Izmjerali smo apsorbanciju na 532 nm u odnosu na n-butanol kao slijepu probu (zero base). Usporedno se testira neki flavonoid (fisetin, kvercetin, luteolin) koji služi kao referentni inhibitor lipidne peroksidacije.

Postotak inhibicije lipidne peroksidacije izračunat je za svaki ispitivani uzorak prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ inhibicije lipidne peroksidacije} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Gdje je A_0 apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (DMSO), a A_1 apsorbancija ispitivane otopine

3.3. Statistička analiza

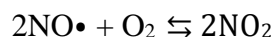
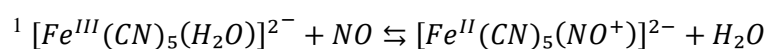
Za statističku analizu korišten je program Microsoft Excel 2016 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju određivanja. Koncentracije uzoraka koje iskazuju 50%-tni učinak (IC_{50}) dobivene su interpolacijom na temelju linijske regresijske analize koncentracije i apsorbancije.

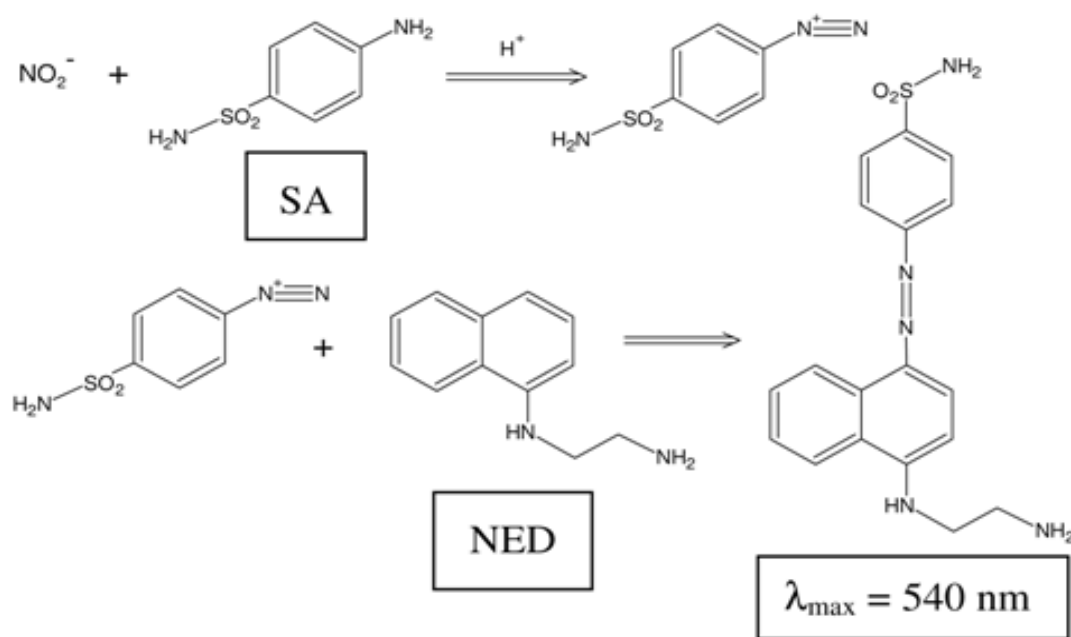
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida

Da bi se ispitala sposobnost hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida provedeno je spektrofotometrijsko ispitivanje odabranih vrsta roda *Micromeria*. Na temelju dobivenih apsorbancija u usporedbi s rutinom, askorbinskom i ružmarinskom kiselinom koji su korišteni kao poredbene tvari, mogao se izračunati postotak inhibicije odabranih vrsta roda *Micromeria*. Izvor NO radikala u korištenoj metodi je natrijev nitroprusid, reagens koji u vodenoj otopini pri fiziološkom pH (7,4) spontano oslobađa NO. Nastali NO radikal reagira s kisikom, a njegovom oksidacijom nastaju nitrit ioni kojima se koncentracija u reakcijskoj smjesi određuje spektrofotometrijski na temelju Griess-ove reakcije diazotacije (Slika 6). Apsorbancija kromofora nastalog tijekom diazotacije nitrita sulfanilamidom i nakon toga sparivanjem s naftililetildiaminom očitana je pri 532 nm u usporedbi s poredbenim otopinama. Antioksidansi se natječu s kisikom pri čemu dolazi do smanjene produkcije NO. (Sreejayan i Rao, 1997) Intenzitet ljubičastog kompleksa ovisit će o antioksidativnoj sposobnosti ispitivanih vrsta i poredbenih tvari, kao i o njihovoj koncentraciji.

Kemijska reakcija: Nitroprusid pri fiziološkom pH oslobađa NO radikal koji reagira s kisikom i nastaju nitrit ioni:





Slika 6: Griessova reakcija diazotacije (Sun i sur., 2003). Nitrit ioni reagiraju sa sulfanilamidom i NED-om pri kiselom pH, te nastaju ljubičasti kompleks pri valnoj duljini 532 nm.

Da bi se ispitala antioksidativna sposobnost tri odabrane *Micromeria* vrste, pripremljen je koncentracijski niz u duplikatu u rasponu od 12,5 $\mu\text{g/ml}$ do 1600 $\mu\text{g/ml}$, te za poredbene otopine rutina, ružmarinske i askorbinske kiseline u rasponu od 0,39 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$. Apsorbancija je izmjerena na 532 nm u odnosu na n-butanol kao slijepu probu. Izračunata inhibicija slobodnih radikala dušikovog (II) oksida za pojedine koncentracije izražena je u postocima (%). Iz rezultata prikazanih u tablici uočljivo je da ekstrakti *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* posjeduju sposobnost hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida. Pri koncentracijama od 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ biljni ekstrakti pokazivali su antioksidacijska aktivnost izraženu kao postotak inhibicije redom 17 - 23%, 40,7 - 41,2%, 56,2 - 56,8% (Tablica 1, Slika 7). Ispitivani biljni ekstrakti nisu pokazali značajnije razlike u antioksidacijskoj aktivnosti. Kod ekstrakata poredbenih otopina uočljivo je da pri koncentracijama od 3,13 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ i 12,5 $\mu\text{g/ml}$ pokazuju antioksidacijsku sposobnost u rasponu od 15 - 41%, 33 - 52%, 55 - 65% (Tablica 2, Slika 8). Najveću antioksidacijsku sposobnost pri ovim koncentracijama ima ružmarinska kiselina koja je pri koncentraciji 6,25 $\mu\text{g/ml}$ neutralizirala više od 50% slobodnih radikala dušikovog (II) oksida, no pri koncentracijama višim od 12,5 $\mu\text{g/ml}$ askorbinska kiselina je pokazala je najjači antioksidacijski učinak neutraliziravši preko 98% slobodnih radikala.

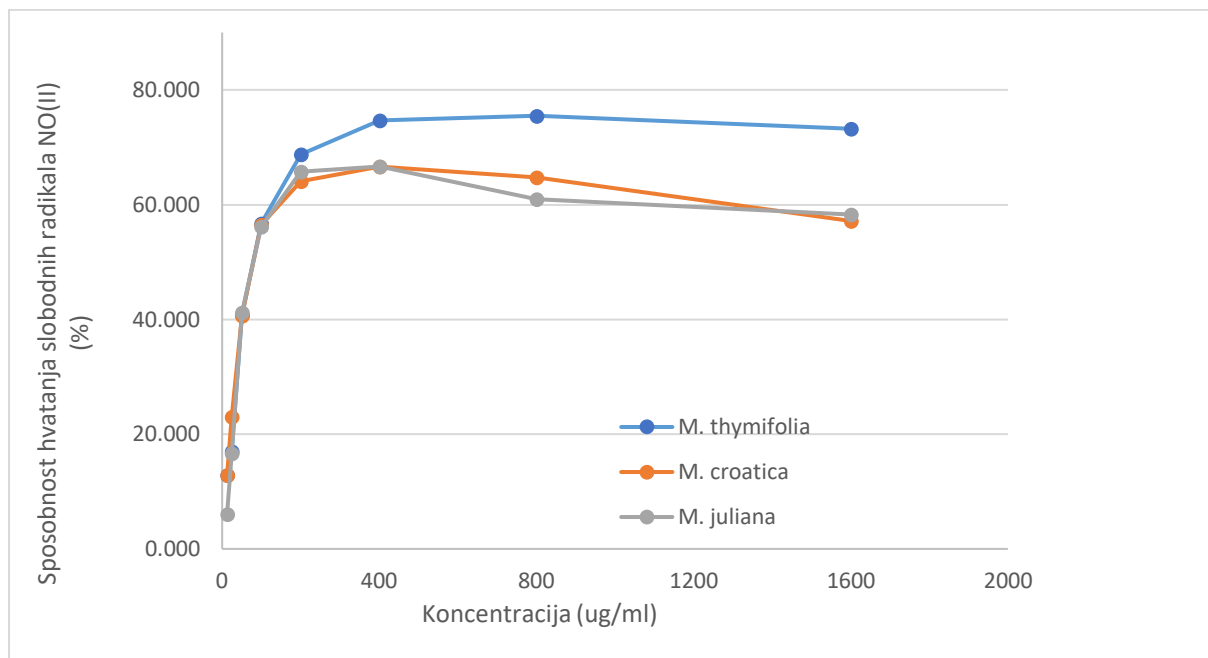
Tablica 1: Sposobnost hvatanja slobodnih NO(II) radikala etanolnih ekstrakata *Micromeria* vrsta

Koncentracija (ug/ml)	Sposobnost hvatanja slobodnih NO(II) radikala (%)		
	<i>M. croatica</i>	<i>M. juliana</i>	<i>M. thymifolia</i>
1600	57,2 ± 3,6	58,2 ± 3,0	73,2 ± 0,1
800	64,7 ± 1,6	60,9 ± 0,0	75,5 ± 0,1
400	66,6 ± 0,9	66,6 ± 0,4	74,7 ± 1,1
200	64,1 ± 0,4	65,8 ± 1,5	68,8 ± 0,1
100	56,5 ± 2,3	56,2 ± 0,0	56,8 ± 2,1
50	40,7 ± 0,4	41,2 ± 0,0	40,7 ± 3,3
25	23,0 ± 4,1	16,6 ± 0,0	16,9 ± 7,9
12,5	12,8 ± 4,4	6,1 ± 0,0	12,8 ± 6,3

Tablica 2: Sposobnost hvatanja slobodnih NO(II) radikala ružmarinske kiseline, askorbinske kiseline i rutina

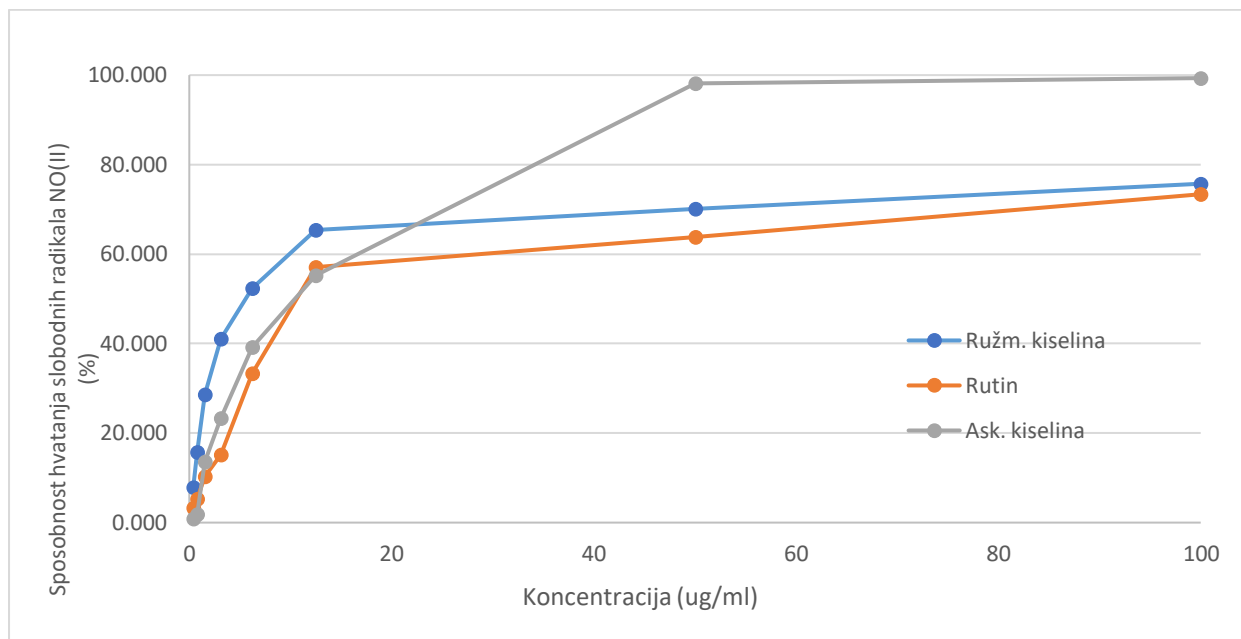
Koncentracija (ug/ml)	Sposobnost hvatanja slobodnih NO(II) radikala (%)		
	Askorbinska kiselina	Rutin	Ružmarinska kiselina
100	99,3 ± 0,0	73,4 ± 0,7	75,8 ± 1,5
50	98,1 ± 0,3	63,7 ± 1,5	70,2 ± 0,8
12,5	55,3 ± 1,3	57,1 ± 3,3	65,4 ± 0,6
6,25	39,1 ± 2,8	33,3 ± 5,9	52,3 ± 1,4
3,13	23,3 ± 2,9	15,1 ± 1,4	41,0 ± 1,1
1,56	13,6 ± 7,0	10,3 ± 2,5	28,6 ± 3,3
0,78	-	5,3 ± 0,1	5,7 ± 0,9
0,39	-	3,2 ± 3,5	7,9 ± 6,3

Slika 7: Sposobnost hvatanja slobodnih NO(II) radikala ekstrakata *Micromeria* vrsta u ovisnosti o koncentraciji.



Graf pokazuje antioksidacijsku sposobnost *Micromeria* vrsta, pri čemu su *M. thymifolia* i *M. juliana* imale sličnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala, a *M. croatica* pokazala je nešto veći antioksidacijsku aktivnost pri nižim koncentracijama, te je također pri koncentraciji od 81,5 ug/ml neutralizirala 50% slobodnih radikala. Pri višim koncentracijama *M. thymifolia* pokazala je najveći antioksidativni kapacitet neutraliziravši nešto više od 70% slobodnih radikala pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji.

Slika 8: Sposobnost hvatanja slobodnih radikala NO(II) ružmarinske kiseline, askorbinske kiseline i rutina u ovisnosti o koncentraciji.



Graf prikazuje antioksidacijsku sposobnost etanolnih ekstrakata poredbenih otopina, pri čemu jeružmarinska kiselina pokazala najveću antioksidativnu sposobnost pri niskim koncentracijama jer je već pri 6,25 µg/ml neutralizirala više od 50% slobodnih radikala, dok su askorbinska kiselina i rutin imali slične rezultate, no pri višim koncentracijama askorbinska kiselina pokazala je veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala neutraliziravši 99,3% slobodnih radikala pri koncentraciji od 100 µg/ml, dok su ružmarinska kiselina i rutin pri istoj koncentraciji neutralizirale nešto manje od 75,8 odnosno 73,4% slobodnih radikala.

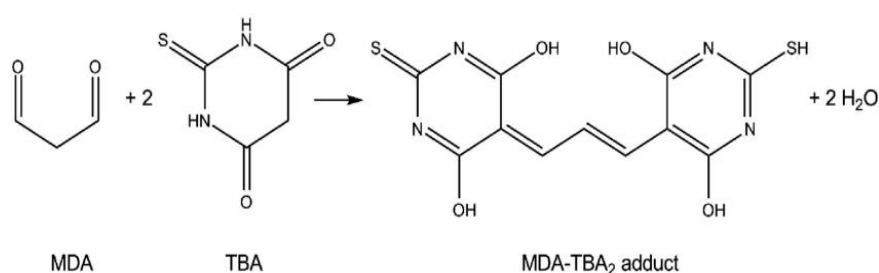
Tablica 3: Prikaz IC₅₀ vrijednosti etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* i poredbenih tvari u ispitivanju hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida.

IC ₅₀ (µg/ml)					
<i>M. croatica</i>	<i>M. thymifolia</i>	<i>M. juliana</i>	Ask. kiselina	Rutin	Ružm. kis.
81,5 ± 1,4	82,0 ± 3,8	88,1 ± 4,4	10,6 ± 0,1	10,7 ± 0,9	6,1 ± 0,1

IC₅₀ predstavlja koncentraciju pri kojoj ispitivana tvar iskazuje sposobnost da neutralizira 50% slobodnih radikala. Rezultati prikazuju srednju vrijednost IC₅₀ ± standardna devijacija.

4.2. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

Sposobnost lipidne peroksidacije ekstrakata odabranih *Micromeria* vrsta određena je spektrofotometrijski. Lančana reakcija oksidacijskih oštećenja fosfolipidnih liposoma pripremljenih iz ekstrakta govedjeg mozga potaknuta je dodatkom Fe^{3+} iona i askorbinske kiseline. Količina nastalih produkata, malondialdehida i drugih reaktivnih aldehida (4-hidroksinonenal i 8-izoprostan), može se odrediti spektrofotometrijski nakon reakcije s tiobarbiturnom kiselinom, pri čemu nastaje ružičasto obojeni kromogen s maksimumom apsorpcije na 532 nm (Slika 9). Intenzitet obojenog kromogena ovisit će o antioksidacijskoj sposobnosti ekstrakata odabranih *Micromeria* vrsta, kao i o njihovoj koncentraciji.



Slika 9: Reakcija malondialdehida i tiobarbiturne kiseline (Weitner i sur., 2016). Nastaje ružičasto obojeni kromogen s maksimumom apsorpcije na 532 nm.

Da bi se ispitala sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije ekstrakata odabranih *Micromeria* vrsta, pripremljen je koncentracijski niz u duplikatu u rasponu od 50-800 $\mu\text{g/ml}$ za svaki ekstrakt, te u rasponu od 0,2-12,5 $\mu\text{g/ml}$ za rutin i 3,13-100 $\mu\text{g/ml}$ za ružmarinsku kiselinu koji su se u ispitivanju koristili kao poredbene tvari. Apsorbancija je izmjerena na 532 nm u odnosu na n-butanol kao slijepu probu. Izračunata sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije izražena je u postocima (%). Iz rezultata prikazanih u Tablici 4 uočljivo je da ekstrakti *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* posjeduju antioksidacijsku sposobnost, te su pri koncentracijama 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ pokazivali sposobnost inhibicije izraženu kao postotak redom 26,6-65,2%, 55,1-78,1%, 79,9-87,5%. *M. croatica* već pri 54,5 $\mu\text{g/ml}$ pokazala antioksidacijsku sposobnost neutraliziravši 50% slobodnih radikala. Najveću antioksidacijsku sposobnost pri ovim koncentracijama pokazala je *M. croatica*, a najslabiju *M. thymifolia*. Pri koncentraciji od 800 $\mu\text{g/ml}$ sva tri ekstrakta pokazala su sposobnost inhibicije više od 90%

slobodnih radikala. Poredbena otopina rutina (Tablica 5, Slika 10) je pri koncentracijama 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 1,56 $\mu\text{g/ml}$ imala antioksidativnu sposobnost 12,8%, 35,9% i 81,4%, dok je pri koncentracijama 3,13 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ i 12,5 $\mu\text{g/ml}$ pokazala sposobnost neutralizacije više od 90% slobodnih radikala. Poredbena otopina ružmarinske kiseline (Tablica 6, Slika 10) je pri koncentracijama 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ i 50 $\mu\text{g/ml}$ imala sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije izraženu kao postotak redom 28,5%, 44,2% i 64,9%, te je pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ neutralizirala 70,2% slobodnih radikala.

Tablica 4: Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije ekstrakata odabranih *Micromeria* vrsta.

Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (%)		
	M. croatica	M. juliana	M. thymifolia
800	98,8 \pm 1,7	90,5 \pm 1,3	94,3 \pm 1,2
400	87,5 \pm 4,9	79,9 \pm 6,7	84,1 \pm 16,1
200	78,1 \pm 0,9	55,1 \pm 6,9	54,5 \pm 0,9
100	65,2 \pm 2,3	41,2 \pm 7,3	26,6 \pm 2,6
50	45,2 \pm 1,0	36,7 \pm 2,6	26,4 \pm 0,4

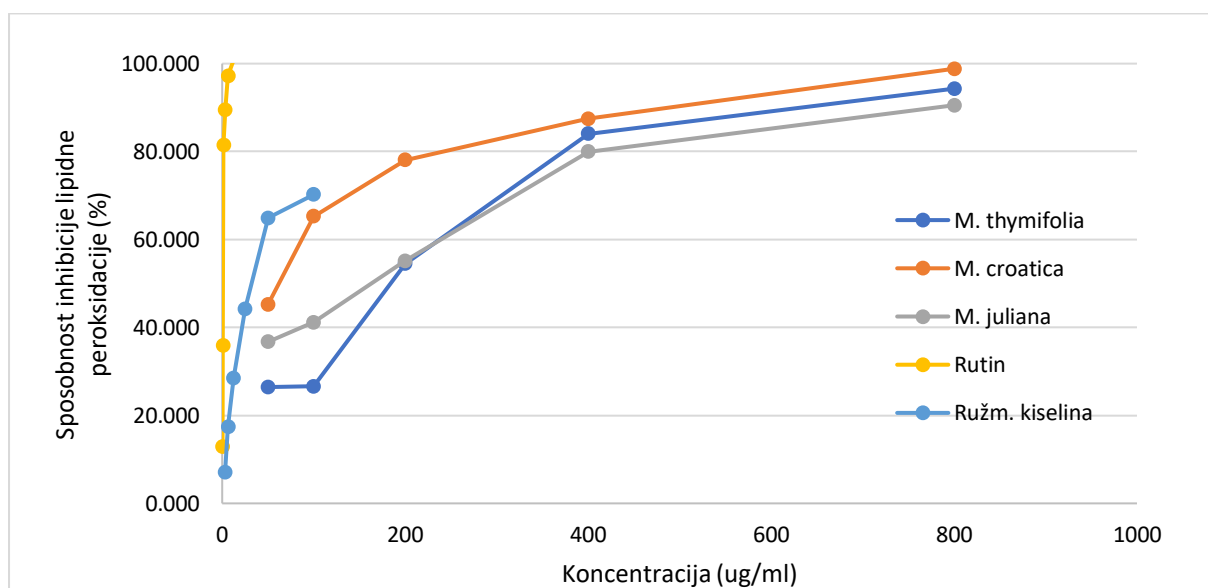
Tablica 5: Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije poredbene otopine rutina.

Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (%)
	Rutin
12,5	100,0 \pm 1,9
6,25	97,1 \pm 3,5
3,13	89,5 \pm 3,0
1,56	81,4 \pm 1,8
0,78	35,9 \pm 2,8
0,39	12,8 \pm 3,5
0,2	-

Tablica 6: Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije poredbene otopine ružmarinske kiseline

Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (%)
	Ružmarinska kiselina
100	$70,2 \pm 0,5$
50	$64,9 \pm 0,8$
25	$44,2 \pm 0,7$
12,5	$28,5 \pm 1,5$
6,25	$17,3 \pm 1,3$
3,13	$7,1 \pm 1,0$

Slika 10: Ovisnost inhibicije lipidne peroksidacije ekstrakata *M. thymifoliae*, *M. croatica*, *M. juliana* i poredbenih otopina rutina i ružmarinske kiseline u ovisnosti o njihovoj koncentraciji.



Graf prikazuje sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije izraženu kao postotak 3 odabrane *Micromeria* vrste u rasponu koncentracije od 50 µg/ml do 800 µg/ml, te poredbenih otopina rutina u rasponu od 0,2 µg/ml do 12,5 µg/ml i ružmarinske kiseline od 3,13 µg/ml do 100 µg/ml. Najveću antioksidacijsku sposobnost pokazala je *M. croatica*, dok je pri najnižoj koncentraciji od 50 µg/ml najmanju antioksidativnu sposobnost imala *M. thymifolia*, no pri koncentraciji od 200 µg/ml pokazala je jednako antioksidacijsko djelovanje kao *M. juliana*, dok je *M. juliana* pokazala najmanje antioksidacijsko djelovanje pri najvećoj koncentraciji od 800 µg/ml. IC₅₀ koncentracija je pri kojoj dolazi do neutralizacije 50% slobodnih radikala, pri čemu je *M. croatica* neutralizirala 50% slobodnih radikala pri najnižoj koncentraciji (54,5 µg/ml), dok su *M. thymifolia* i *M. juliana* imale slične rezultate. Rutin je već pri koncentraciji od 1,5 µg/ml neutralizirao preko 80% slobodnih radikala, dok je pri koncentraciji od 12,5 µg/ml neutralizirao 100% slobodnih radikala pokazaviši tako vrlo jako antioksidativno djelovanje. Ružmarinska kiselina je pri koncentraciji od 33,53 µg/ml neutralizirala 50% slobodnih radikala, dok je pri koncentraciji od 100 µg/ml neutralizirala nešto više od 70% slobodnih radikala. Time je pokazala dobro antioksidacijsko djelovanje ali ipak slabije od rutina koji je već pri koncentraciji od 1 µg/ml neutralizirao 50% slobodnih radikala.

Tablica 7: Usporedni prikaz IC₅₀ vrijednosti odabranih *Micromeria* vrsta, rutina i ružmarinske kiseline u ispitivanju inhibicije lipidne peroksidacije.

IC ₅₀ (µg/ml)				
M. croatica	M. juliana	M. thymifolia	Rutin	Ružm. kis.
54,5 ± 1,7	165,2 ± 55,4	206,0 ± 25,5	1,0 ± 0,1	33,53 ± 0,7

IC₅₀ predstavlja koncentraciju pri kojoj ispitivana tvar iskazuje sposobnost da neutralizira 50% slobodnih radikala. Rezultati prikazuju srednju vrijednost IC₅₀ ± standardna devijacija

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena su spektrofotometrijska ispitivanja tri odabrane *Micromeria* vrste hrvatske flore – *M. juliana*, *M. croatica* i *M. thymifolia*. Provedeno je ispitivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala NO(II) oksida i inhibicije lipidne peroksidacije. Rezultati oba ispitivanja pokazali su da sve tri odabrane *Micromeria* vrste posjeduju antioksidacijsku sposobnost. Sve tri vrste pokazale su sličnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala NO(II) oksida (IC₅₀ 81,5-88,1 µg/ml) pri čemu je *M. thymifolia* pri koncentracijama većim od 400 µg/ml pokazala nešto bolji učinak u odnosu na druge dvije vrste. Rutin i ružmarinska kiselina, kao predstavnici polifenola zastupljenih u ispitivanim vrstama pokazala su dobru sposobnost hvatanja radikala. Njihove IC₅₀ vrijednosti usporedive su sa standardnim antioksidansom askorbinskom kiselinom. Ružmarinska kiselina je već pri vrlo koncentraciji od 6,1 µg/ml neutralizirala 50% slobodnih radikala.

Ispitivanjem inhibicije lipidne peroksidacije zaključili smo da je najveću antioksidacijsku sposobnost pokazala *M. croatica* koja je pri koncentraciji 54,5 µg/ml neutralizirala 50% slobodnih radikala, te je pri svim ispitivanim koncentracijama pokazala bolji učinak u odnosu na druge dvije vrste. *M. juliana* i *M. thymifolia* pokazale su slične rezultate uz nešto bolji učinak *M. thymifolia* pri koncentracijama od 50 µg/ml i 10 µg/ml. Poredbena otopina rutina već je pri koncentraciji od 1 µg/ml neutralizirala 50% slobodnih radikala, dok je poredbena otopina ružmarinske kiseline pokazala slabije antioksidacijsko djelovanje od rutina neutraliziravši 50% slobodnih radikala pri koncentraciji od 33,53 µg/ml.

Ovim ispitivanjima dokazali smo da su ispitivane *Micromeria* vrste bogat izvor antioksidansa, te su pogodne za daljnja istraživanja i potencijalni razvoj biljnih lijekova u liječenju bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom koje sve više preuzimaju ulogu glavnog uzročnika smrtnost pacijenata.

6. LITERATURA

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci*, 2002, 82, 1227-1238.

Awah FM, Verla AW. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. *Res J Med Plant*, 2010, 4, 2479-2487.

Ayala A, Muñoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hidroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014, 1-31.

Azab A. Micromeria: Chemistry and medicinal activities. *Eur Chem Bull*, 2016, 5, 300-307.

Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*, 2005, 26, 3-31.

Bukvički D, Cirić A, Soković M, Vannini L, Nissen L, Novaković M, Vujisić Lj, Asakawa Y, Marin DP. *Micromeria thymifolia* essential oil suppresses quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Prod Commun*, 2016, 11, 1903-1906.

Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet II. obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2001, str. 587-588.

Franke A, Oszajca M, Brindell M, Stochel G, Van Eldik R. Metal-assisted activation of nitric oxide – mechanistic aspects of complex nitrosylation processes. *Adv Inorg Chem*, 2015, 67, 171-241.

Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med*, 1995, 61(1), 33-36.

Kremer D, Stabentheiner E, Dunkić V, Dragojević Muller I, Vujić L, Kosalec I, Ballian D, Bogunić F, Bezić N. Micromorphological and chemotaxonomical traits of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Chem & Biodivers*, 2012, 9, 755-768.

Kuštrak D. Farmakognozija - Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing - Tehnička knjiga; 2005. str. 226-228; 289-294.

Mastelić J, Jerković I, Kuštrak D. Aromatic compounds of *Micromeria juliana* (L.) Bentham ex Richenb. From Croatia. *J Essent Oil Res*, 2005, 17, 516-518.

Micromeria croatica (Pers.) Schott, (hrvatska bresina) 2009., <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 29.08.2021.

Micromeria juliana (L.) Benth. ex Richenb. (primorska bresina) 2018., <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 29.08.2021.

Micromeria thymifolia (Scop.) Fritsch (točkasta bresina) 2006., <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 29.08.2021.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.

Porodica Lamiaceae, 2021., <https://www.britannica.com/>, pristupljeno 29.08.2021.

Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013, 1-2.

Razali N, Razab R, Junit SM, Aziz AA. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chem*, 2008, 111, 38-44.

Sreejayan, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by Curcuminoids. *J Pharm Pharmacol*, 1997, 49, 105-107.

Stojanović G, Palić I, Uršić-Janković J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Micromeria cristata* and *Micromeria juliana*. *Flavour Fragr J*, 2005, 21, 77-79.

Sun J, Zhang X, Broderick M. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sens*, 2003, 3, 276-284.

Šamec D, Gruz J, Durgo K, Kremer D, Kosalec I, Valek Žulj L, Martinez S, Salopek-Sondi B, Piljac-Žegarac J. Molecular and cellular approach in the study of antioxidant/pro-oxidant properties of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Nat Prod Res*, 2015, 29, 1770-1774.

Šavikin KP, Menković NR, Zdunić GM, Tasić SR, Ristić MS, Stević TR, Dajić-Stevanović ZP. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, *M. dalmatica* Benth. and *Satureja cuneifolia* Ten. and its secretory elements. *J Essent Oil Res*, 2010, 22, 91-96.

Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

Tošić S, Stojičić D, Slavkowska V, Mihailov-Krstev T, Zlatković B, Budimir S, Uzelac B. Phytochemical composition and biological activities of native and in vitro-propagated *Micromeria croatica* (Pers.) Schott (Lamiaceae). *Planta*, 2019, 249, 1365-1377.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Koszegi T, Petrik J. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules*, 2011, 16, 1454-1470.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. Rao V, urednik, London, IntechOpen, 2012, str.155-180.

Vladimir-Knežević S, Cvijanović O, Blažeković B, Kindl M, Bival Štefan M, Domitrović R. Hepatoprotective effects of *Micromeria croatica* ethanolic extract against CCl₄- induced liver injury in mice. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15, 1-12.

Vuko E, Rusak G, Dunkić V, Kremer D, Kosalec I, Rađa B, Bezić N. Inhibition of satellite RNA associated cucumber mosaic virus infection by essential oil of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Molecules*, 2019, 24, 1-15.

Weitner T, Inić S, Jablan J, Gabričević M, Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croat Chem Acta*, 2016, 89, 133-139.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada provedena su dva spektrofotometrijska istraživanja tri odabrane *Micromeria* vrste hrvatske flore – *M. croatica*, *M. thymifolia* i *M. juliana*. Prvo spektrofotometrijsko istraživanje koje smo proveli određivanje je sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida u usporedbi s poredbenim otopinama askorbinske i ružmarinske kiseline, te rutina. Sve tri *Micromeria* vrste pokazale su antioksidacijski potencijal (IC₅₀ 81,5-88,1 µg/ml), dok je *M. croatica* pri najnižoj koncentraciji (81,5 µg/ml) neutralizirala 50% slobodnih radikala. *M. thymifolia* ipak je neutralizirala preko 70% slobodnih radikala pri većim koncentracijama (400-1600 µg/ml).

Drugo spektrofotometrijsko istraživanje koje smo proveli određivanje je sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije u usporedbi s poredbenim otopinama rutina i ružmarinske kiseline. Sve tri *Micromeria* vrste pokazale su sposobnost inhibicije (IC₅₀ 54,5-206 µg/ml). Najveću antioksidacijsku sposobnost imala je *M. croatica* koja je već pri koncentraciji od 54,5 µg/ml neutralizirala 50% slobodnih radikala

Two spectrophotometrical researches of three *Micromeria* species of Croatian flora – *M. croatica*, *M. thymifolia* and *M. juliana* where examined in this thesis. First spectrophotometrical research we examined was capacity of inhibition of free NO(II) radicals compared to ascorbic acid, rosmarinic acid and rutin. All three *Micromeria* species expressed antioxidative capacity (IC₅₀ 81,5 – 88,1 µg/ml), while *M. croatica* had neutralized 50% of free radicals at lowest concentration (81,5 µg/ml). *M. thymifolia* had neutralized over 70% of free radicals at highest levels of concentration (400-1600 µg/ml).

Second spectrophotometrical research we conducted was to determine capacity of inhibition of lipid peroxidation in comparison to rutin and rosmarinic acid. All three *Micromeria* species expressed antioxidative capacity (IC₅₀ 54,5-206 µg/ml). *M. croatica* had highest capacity of three examined species and had neutralized over 50% of free at concentration of 54,5 µg/ml.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA ODABRANIH *MICROMERIA* VRSTA

Monika Švob

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena su dva spektrofotometrijska istraživanja tri odabrane *Micromeria* vrste hrvatske flore – *M. croatica*, *M. thymifolia* i *M. juliana*. Prvo spektrofotometrijsko istraživanje koje smo proveli određivanje je sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida u usporedbi s poredbenim otopinama askorbinske i ružmarinske kiseline, te rutina. Sve tri *Micromeria* vrste pokazale su antioksidacijski potencijal (IC_{50} 81,5-88,1 $\mu\text{g/ml}$), dok je *M. croatica* pri najnižoj koncentraciji (81,5 $\mu\text{g/ml}$) neutralizirala 50% slobodnih radikala. *M. thymifolia* ipak je neutralizirala preko 70% slobodnih radikala pri većim koncentracijama (400-1600 $\mu\text{g/ml}$). Drugo spektrofotometrijsko istraživanje koje smo proveli određivanje je sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije u usporedbi s poredbenim otopinama rutina i ružmarinske kiseline. Sve tri *Micromeria* vrste pokazale su sposobnost inhibicije (IC_{50} 54,5-206 $\mu\text{g/ml}$). Najveću antioksidacijsku sposobnost imala je *M. croatica* koja je već pri koncentraciji od 54,5 $\mu\text{g/ml}$ neutralizirala 50% slobodnih radikala.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 10 grafičkih prikaza, 7 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: dušikov (II) oksid, lipina peroksidacija, *Micromeria*

Mentor: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Biljana Blažeković, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Jasna Jablan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF SELECTED *MICROMERIA* SPECIES

Monika Švob

SUMMARY

Two spectrophotometrical researches of three *Micromeria* species of Croatian flora – *M. croatica*, *M. thymifolia* and *M. juliana* where examined in this thesis. First spectrophotometrical research we examined was capacity of inhibition of free NO(II) radicals compared to ascorbic acid, rosmarinic acid and rutin. All three *Micromeria* species expressed antioxidative capacity (IC₅₀ 81,5 – 88,1 µg/ml), while *M. croatica* had neutralized 50% of free radicals at lowest concentration (81,5 µg/ml). *M. thymifolia* had neutralized over 70% of free radicals at highest levels of concentration (400-1600 µg/ml).

Second spectrophotometrical research we conducted was to determine capacity of inhibition of lipid peroxidation in comparison to rutin and rosmarinic acid. All three *Micromeria* species expressed antioxidative capacity (IC₅₀ 54,5-206 µg/ml). *M. croatia* had highest capacity of three examined species and had neutralized over 50% of free at concentration of 54,5 µg/ml.

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

Thesis includes: 33 pages, 10 figures, 7 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nitric oxide, lipid peroxydation, *Micromeria*

Mentor: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Blažeković, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.