

# Antikancerogena aktivnost nanočestica selena funkcionaliziranih ekstraktom komine masline

---

Vrček, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:856581>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

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



**Ena Vrčec**

**Antikancerogena aktivnost nanočestica selena  
funkcionaliziranih ekstraktom komine masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj diplomski rad je nastao kao rezultat istraživanja u sklopu projekta „Primjena nanobiotehnologije u suplementaciji hrane sa selenom (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost.

This Master thesis was done as a result of investigations under the project entitled „Application of Nanobiotechnology for Nutritional Supplementation with Selenium – (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financed by Croatian Science Foundation.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na mentorstvu, strpljivosti i pomoći tijekom pisanja ovog rada. Zahvaljujem se i dr.sc. Kristini Radić na svim objašnjenjima i ponavljanju objašnjenja, te mag.ing.preh.ing. Nikolini Golub na pomoći u laboratoriju te odgovaranju na poruke u kasnim noćnim satima.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. SELEN .....	1
1.1.1. Utjecaj nedostatka i viška selena na ljudsko zdravlje .....	1
1.1.2. Nutritivni izvori selena i dodaci prehrani .....	2
1.1.3. Nanoselen .....	4
1.1.4. Antikancerogena aktivnost nanočestica selena.....	5
1.1.5. Sinteza nanočestica selena.....	6
1.1.6. Zelena sinteza nanočestica selena korištenjem biljnih ekstrakata .....	7
1.1.7. Funkcionalizacija nanočestica selena .....	8
1.2. KOMINA MASLINE .....	9
1.2.1. Otpad prehrambene industrije.....	9
1.2.2. Komina masline .....	10
1.2.3. Polifenoli masline i njihovo antikancerogeno djelovanje .....	11
1.3. STANIČNI MODELI ZA ISTRAŽIVANJE TOKSIČNOSTI .....	11
1.3.1. Caco-2 stanična linija .....	12
1.3.2. HepG2 stanična linija .....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	14
3.1. KEMIJSKI I BIOLOŠKI MATERIJALI I PRIBOR.....	14
3.2. INSTRUMENTI .....	15
3.3. ZELENA SINTEZA NANOČESTICA SELENA.....	16
3.3.1. Priprema otopina.....	16
3.3.2. Postupak sinteze SeNP .....	17
3.3.3. Čišćenje uzoraka SeNP dijalizom.....	18
3.4. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE RELATIVNE KONCENTRACIJE NANOSELENA.....	19
3.4.1. Izrada baždarnog dijagrama na 405 nm .....	20
3.4.2. Postupak UV-Vis spektrofotometrijskog određivanja koncentracije.....	21
3.4.3. Statistička analiza.....	22
3.5. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA I ZETA POTENCIJALA....	22
3.5.1. Uparavanje uzoraka na rotavaporu .....	22
3.5.2. Mjerenje veličine čestica i zeta potencijala .....	22
3.5.3. Statistička analiza.....	24
3.6. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI NANOČESTICA IN VITRO.....	24
3.6.1. Tretiranje stanica.....	25
3.6.2. MTT test .....	26

3.6.3. Statistička analiza.....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
4.1. RELATIVNI PRINOSI POSTUPAKA SINTEZE NANOSELENA .....	28
4.2. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA I ZETA POTENCIJAL.....	29
4.3. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI UZORAKA.....	33
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>37</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....</b>	<b>38</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>40</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>44</b>

# 1. UVOD

## 1.1. SELEN

Selen je kemijski element koji se u okolišu može naći u elementarnom stanju ( $\text{Se}^0$ ) te u obliku selenida ( $\text{Se}^{2-}$ ), selenata ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) ili selenita ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Nalazi se u tlu kao dio raznih minerala (klaustalit ( $\text{PbSe}$ ), naumanit ( $\text{Ag}_2\text{Se}$ ), bercelijanit ( $\text{Cu}_2\text{Se}$ )), u atmosferi, u koju dolazi erupcijom vulkana, te se u tragovima nalazi i u vodi. Zbog eluiranja selena iz stijena i prekomjerne gnojidbe tla mješavinama bogatim spojevima selena, veća količina selena se nalazi u podzemnoj vodi nego u morskoj vodi (Kieliszek, 2019).

Selen je esencijalni mikronutrijent neophodan za funkcioniranje organizma. U ljudskom organizmu djeluje kao antioksidans (npr. kao dio glutacion peroksidaze) te tako štiti od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Selen utječe i na rad štitnjače, povećava aktivnost makrofaga i proizvodnju imunoglobulina te povećava fleksibilnost tkiva. Postoji nekoliko o selenu ovisnih enzima u kojima aktivno središte enzima sadrži selen u obliku selenocisteina. To su, primjerice, već spomenuta glutacion peroksidaza, selenoprotein P i tiroksin 5-dejodinaza. Glutacion peroksidaza katalizira biosintezu glutationa, tripeptida koji igra važnu ulogu u zaštiti organizama od oksidativnog djelovanja vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i organskih peroksida. U prisutnosti glutaciona peroksidi se reduciraju u hidroksilne spojeve, odnosno alkohol ili vodu. Eliminacijom vodikovog peroksida iz tijela, ovaj enzim štiti masne kiseline, crvena krvna zrnca, hemoglobin te stanične komponente, poput staničnih membrana i deoksiribonukleinske kiseline, od oksidacije. Tiroksin 5-dejodinaza katalizira dejodiranje tiroksina ( $\text{T}_4$ ) u njegov aktivni oblik 3,3',5'-trijodtironin ( $\text{T}_3$ ) ili u neaktivni oblik 3,3',5'-trijodtironin ( $\text{rT}_3$ ) što ukazuje na važnost selena u metabolizmu hormona štitnjače (Kieliszek, 2019).

### 1.1.1. Utjecaj nedostatka i viška selena na ljudsko zdravlje

Prosječne koncentracije selena u ljudskom serumu su 60-120 ng/mL, a nedostatak ovog elementa se opaža kada je njegova koncentracija u plazmi manja od 85 ng/mL. Niska koncentracija selena u plazmi povezana je sa četiri do pet puta većim rizikom od raka prostate. Dugotrajan nedostatak selena u ljudskom organizmu dovodi do ozbiljnih bolesti. Primjerice, nedostatak ovog elementa negativno utječe na rad kardiovaskularnog sustava i može biti izravan uzrok infarkta miokarda; može negativno utjecati na funkcioniranje živčanog sustava

uzrokujući razvoj depresije, anksioznosti i Alzheimerove bolesti, dok nedostatak selena u trudnica negativno utječe na razvoj embrija (Kieliszek, 2019).

No, previsoke koncentracije također mogu imati negativne učinke. Trovanje ovim elementom dovodi do razvoja teške anemije, ukočenosti kostiju, gubitka kose i sljepoće, a ovi simptomi su uočeni kod ljudi i životinja koji žive u područjima gdje je sadržaj selena u tlu bio i do 1000 puta veći u usporedbi s tlima s prosječnom količinom selena (0,33-2 mg/kg tla). Toksičnost selena (ovisna o dozi) je uzrokovana kompeticijom između selena i sumpora. Selen može zamijeniti sumpor u aminokiselinama (cistein i metionin) čime nastaju nefunkcionalni enzimi i proteini. Simptomi trovanja selenom uključuju lezije kože i noktiju, pojavu hipotenzije i tahikardije, tremor, mišićne kontrakcije, suhi kašalj, groznicu te hipersalivaciju. Karakteristični simptom trovanja selenom je miris češnjaka u izdahnutom dahu zbog prisutnosti hlapljivog metabolita - dimetil selenida (Kieliszek, 2019).

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučuje dnevnu dozu selena od 55 µg za odrasle te 25 µg za djecu. Doza koja ne pokazuje nikakav štetni učinak za odrasle procjenjuje se na 800 µg/dan, dok doza koja uzrokuje početak toksičnosti kreće od 1540 do 1600 µg/dan (Kieliszek, 2019).

### 1.1.2. Nutritivni izvori selena i dodaci prehrani

Značajne količine selena nalazimo u hrani i biljnog i životinjskog podrijetla. Biljke akumuliraju selen u obliku anorganskih spojeva, selenata, koje zatim pretvaraju u organske oblike, posebice selenometionin i selenocistein. Selenocistein dominira u proizvodima životinjskog podrijetla. Proizvodi od žitarica pokrivaju oko 50% dnevnog unosa selena; meso, perad i ribe 35%, a voda i pića 5-25%. Udio voća u zadovoljavanju dnevnog unosa selena je relativno mali i iznosi manje od 10%, dok svježe i termički neobrađeno povrće osigurava oko 11% selena u pravilno uravnoteženoj prehrani. Toplinska obrada prehrambenih proizvoda može dovesti do gubitka selena u hrani zbog stvaranja hlapljivih spojeva selena. Ovi gubici su značajni i mogu doseći i desetak posto (Kieliszek, 2019).

Isti proizvodi podrijetlom iz različitih zemalja sadrže različite koncentracije selena što je uzrokom različite količine selena u tlu (Tablica 1).

**Tablica 1.** Sadržaj selena u odabranim prehrambenim proizvodima (prema Kieliszek, 2019).

Hrana	Sadržaj selena ( $\mu\text{g/g}$ )
brazilski oraščići	0,2–544
kvasac	500–2400
žitarice	0,01–0,31
kruh	0,06–0,20
riba	0,06–1,08
jaja	0,09–0,33
piletina	0,081–0,15
govedina	0,01–0,73
svinjetina	0,27–0,39
mlijeko	0,01–0,11
bademi	0,0043–0,0177
sezam	0,72–0,98
bijela riža	0,05–0,08

Primjerice, morske ribe ulovljene u sjeverozapadnom dijelu Atlantskog oceana sadrže više selena (168–825 ng/g) u usporedbi sa slatkovodnim ribama iz zapadnog dijela SAD-a (143–576 ng/g). Na sadržaj selena u kokošnjim jajima u najvećoj mjeri utječe prehrana kokoši. Selen je u žumanjku jajeta prisutan u obliku vezanom za fosfoavidin, dok je u bjelanjku jajeta u obliku vezanom za ovalbumin. Modificirano mlijeko za djecu sadrži gotovo četiri puta manje selena u odnosu na ljudsko mlijeko. Kao rezultat hranjenja dojenčadi modificiranim mlijekom, dnevno se u organizam unosi oko 3,5  $\mu\text{g}$  selena, dok dojene bebe unose oko 13,3  $\mu\text{g}$  ovog elementa iz majčinog mlijeka (Kieliszek, 2019).



Nedostatak selena kod zdravih osoba posljedica je niskog sadržaja ovog elementa u njihovoj prehrani. Što se tiče bolesnika, nedostatak selena se češće javlja kod onih osoba koje boluju od metaboličkih bolesti te kod parenteralno hranjenih bolesnika s malapsorpcijom. Bolesnici koji su podvrgnuti kemoterapiji i radioterapiji također su izloženi riziku manjka ovog elementa. Zbog raširenog nedostatka selena kod ljudi treba obratiti pozornost na potrebu suplementacije ovog elementa. Unošenje ovog elementa u ljudski organizam može se postići neizravno, dodavanjem selena gnojivima ili stočnoj hrani koja se koristi za ishranu životinja. Među metode izravne suplementacije možemo ubrojiti korištenje dodataka prehrani koji sadrže vitamine i mikronutrijente. Učinci suplementacije selena mogu se primijetiti nakon nekoliko tjedana, a ovise o stupnju nedostatka selena u organizmu te dozi i kemijskom obliku selena u suplementu. Učinci se brže uočavaju nakon suplementacije organskog oblika – selenometionina – u usporedbi s anorganskim oblicima selena, kao što su selenit (oksidacijskog stanja IV) i selenat (oksidacijskog stanja VI). Osim što suplementacija selenom nadopunjuje nedostatak tog elementa, povoljno utječe i na kardiovaskularni sustav i rad štitnjače. Selen u obliku anorganskih ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  i  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) i organskih spojeva (selenocistein, selenometionin i selenoglutation), unesenih u organizam hranom ili vodom za piće, rezultira značajnom redukcijom kemijski izazvanih karcinoma (Kieliszek, 2019).

Bioraspoloživost selena ovisi o mnogim čimbenicima, od kojih se glavni čimbenik pripisuje kemijskom obliku ovog elementa. Selen se u gastrointestinalnom traktu ljudi najlakše apsorbira u obliku organskih spojeva selena. Bioraspoloživost selena je povećana u prisutnosti proteina niske molekularne težine koji sadrže metionin te vitamina A, D i E, dok je smanjena u prisutnosti teških metala i sumpora (Kieliszek, 2019).

### 1.1.3. Nanoselen

Nanotehnologija je obećavajuća grana u mnogim područjima istraživanja kao što su farmacija, informacijska tehnologija, inženjering, elektronika i kemijska industrija. Nanomaterijali imaju posebna fizička i kemijska svojstva povezana s njihovom nano-veličinom (Skalickova i sur., 2017).

Tradicionalni dodaci prehrani sa selenom općenito imaju niži stupanj apsorpcije i povećanu toksičnost u odnosu na nano-oblike selena, stoga se žele razviti inovativni sustavi kao prijenosnici spojeva selena koji bi pokazali bolju biodostupnost ovog elementa, omogućili njegovo kontrolirano oslobađanje u organizmu te smanjili toksičnost. Nanočestice selena

(SeNP) su privukle veliko zanimanje kao dodatak prehrani zbog brojnih prednosti kao što su bolji okus, miris i topljivost, otpornost na oksidaciju i enzimsku razgradnju, produljeno djelovanje te učinkoviti prolazak kroz gastrointestinalni trakt. Prednost SeNP je i mogućnost korištenja selen u nultom oksidacijskom stanju koje predstavlja nisku toksičnost i izvrsnu bioraspoloživost u usporedbi s drugim oksidacijskim stanjima (IV, VI). Međutim, SeNP su vrlo nestabilne i lako se pretvaraju u neaktivan oblik. No, moguća je stabilizacija uklapanjem u prikladne nano-nosače. Biološka svojstva SeNP ovise o njihovoj veličini. Primjerice, *in vitro* je utvrđeno da je apsorpcija čestica od 0.1  $\mu\text{m}$  2,5 odnosno 6 puta veća u odnosu na čestice veličine 1 i 10  $\mu\text{m}$ . Dakle, u pripremi dodataka prehrani sa selenom treba se pažljivo odabrati odgovarajuća veličina i morfologija čestica kao i materijal za kapsuliranje. Uklapanjem selen u prikladne nosače postiže se, kako je već spomenuto, stabilizacija, ali i poboljšanje bioraspoloživosti s mogućnošću modifikacije svojstava, kao što su otpornost na promjenu pH, probavu i enzimsko cijepanje (Hosnedlova i sur., 2018).

SeNP pokazuju antikancerogena, antimikrobna i antifungalna svojstva, a dokumentirani su i njihovi zaštitni učinci protiv trovanja metalima. Antioksidativni učinak SeNP, povezan s povećanjem aktivnosti glutathion S-transferaze (GST), usporediv je s antioksidativnim učinkom selenometionina, a razlika je u smanjenoj toksičnosti SeNP (Hosnedlova i sur., 2018).

#### 1.1.4. Antikancerogena aktivnost nanočestica selen

Mnoga istraživanja su pokazala učinkovitost nanoselena kao potencijalnog lijeka protiv raka, ali i kao nosača lijekova protiv raka (Hosnedlova i sur., 2018). Antikancerogeni učinci SeNP su posredovani njihovom sposobnošću inhibicije rasta stanica raka i zaustavljanja staničnog ciklusa u S fazi. Zaustavljanje staničnog ciklusa u S fazi se događa zbog deregulacije proteinskog kompleksa eIF3 (eukariotskog faktora inicijacije translacije). Stanice raka mogu endocitozom unijeti SeNP u sebe nakon čega SeNP mogu uzrokovati apoptozu takvih stanica aktivacijom prijenosnih putova apoptotičnog signala. Nanoselen inhibira rast stanica na način ovisan o dozi (Hosnedlova i sur., 2018).

Osim njihovih izravnih antikancerogenih učinaka, SeNP su i potencijalni prijenosnici lijekova protiv raka. Nano-veličina takvih pripravaka omogućuje učinkovitu apsorpciju i ulazak u različite stanice te selektivno nakupljanje lijeka na ciljanom mjestu. Učinkovita citotoksičnost lijekova na bazi nanomaterijala obično zahtijeva visoku razinu akumulacije unutar stanica raka, a to poboljšava upotreba različitih funkcionaliziranih SeNP (Hosnedlova i sur., 2018).

### 1.1.5. Sinteza nanočestica selena

Sinteza SeNP zahtijeva kontrolu čimbenika koji mogu utjecati na svojstva nanočestica kao što su njihova veličina, oblik, funkcionalnost površine i sastav. To se postiže odabirom metode sinteze te kontroliranjem koncentracije prekursora, pH, temperature reakcije i vremenom pripreme (Skalickova i sur., 2017). SeNP mogu biti sintetizirane kemijskim ili fizikalnim postupcima, ali i biološkim putem korištenjem mikroorganizama ili biljnih ekstrakata (tzv. zelena sinteza).

Redukcija otopine selenitne kiseline ( $\text{H}_2\text{SeO}_3$ ) askorbinskom kiselinom ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) u prisutnosti polisaharida, kao što su glukomanan, karboksimetilceluloza, kitozan ili arapska guma, predstavlja kemijsku sintezu SeNP. Drugi primjer kemijske pripreme SeNP je sinteza izazvana ionskom tekućinom s natrijevim selenosulfatom kao prekursorom selena, u prisutnosti polivinil alkohola kao stabilizatora koji može proizvesti sferične SeNP u rasponu veličina 76-150 nm (Hosnedlova i sur., 2018).

Fizikalni postupci pripreme SeNP nisu toliko zastupljeni, ali imaju prednosti u odnosu na kemijske postupke jer kemijski postupci često zahtijevaju završni korak kalcinacije, što ih čini neprikladnim za određene primjene. Kalcinacija je postupak zagrijavanja ili žarenja tvari na visoku temperaturu (nižu od njihova tališta) pri čemu se iz tvari istjeruje ili voda ili ugljikov dioksid ili oboje. Među fizikalne postupke ubraja se sinteza pulsnom laserskom ablacijom (PLA) pri čemu se veličina nanoklastera može kontrolirati laserskim parametrima kao što su valna duljina i trajanje impulsa te uvjetima okolnog plina, kao što su parametri protoka i tlaka. SeNP se sintetiziraju pomoću tekućeg lasera u deioniziranoj vodi iz kristalnih peleta selena do koloidne otopine. Odvajanje malih čestica od čestica većih od 100 nm se može provesti centrifugiranjem čime se dobivaju čestice veličine oko 60 nm (Hosnedlova i sur., 2018). Zbog nemogućnosti kontaminacije kemijskim reagensima, jeftine opreme, jednostavnog sakupljanja nanočestica i visoke stabilnosti, postupak PLA pokazuje mnoge prednosti u usporedbi s drugim postupcima sinteze nanočestica. U fizikalne postupke ubrajaju se i hidrotermalni tretmani te sinteza potpomognuta mikrovalovima. Sinteza potpomognuta mikrovalovima kao prekursor SeNP-a koristi vodenu otopinu soli selena. SeNP se stvaraju na 750 W nakon 4 minute zagrijavanja. Agregati SeNP su veličine 200-800 nm. Dodatkom natrijevog dodecil sulfata dobiju se manje čestice veće homogenosti, dok se dodatkom polietilen glikola i cetiltrimetilamonijevog bromida veličina čestica poveća i homogenost je smanjena. Vrijeme zagrijavanja utječe na veličinu čestica tako da se može postići i veličina čestica 5-25 nm. (Skalickova i sur., 2017).

Visoka cijena proizvodnje kemijskim postupcima i prisutnost toksičnih nusprodukata doveli su do razvoja novih metoda sinteze nanočestica. Biološki organizmi kao što su biljke, gljive i bakterije imaju sposobnost pretvaranja nekih otrovnih metalnih iona u manje otrovne oblike. Zahvaljujući toj prednosti, istraživanja su se usredotočila na njihovu upotrebu za sintezu nanočestica. Što se tiče zelene sinteze, SeNP se mogu sintetizirati korištenjem vodenog ekstrakta *Allium sativum*, ekstrakta čaja ili lista biljke *Clausena dentata*, otopine polisaharida biljke *Undaria pinnatifida* i ekstrakta lista *Terminalia arjuna*. Biosinteza nanomaterijala korištenjem biljnih ekstrakata ima više prednosti od ostalih bioloških metoda jer je jeftina i ne zahtijeva nikakve posebne uvjete (Hosnedlova i sur., 2018). Primjerice, SeNP se mogu dobiti pomoću ekstrakta vinove loze (*Vitis vinifera*). Grožđe se ostavi natopljeno preko noći, a zatim se zdrobi kako bi se dobio sok koji se filtrira i pomiješa sa selenitnom kiselinom te refluksira 15 minuta. Iz soka grožđa mogu se izolirati SeNP obložene ligninom veličine 3-18 nm (Skalickova i sur., 2017). Sinteza nanočestica pomoću bakterija je učinkovitija od kemijske sinteze zahvaljujući boljoj mogućnosti kontrole parametara, jeftinijem i bržem procesu proizvodnje te nastanku selenskih sfera visoke čistoće koje su relativno pravilne i ujednačene, a njihova veličina ovisi o vrsti mikroorganizma. Različiti sojevi bakterija mogu reducirati selenit i selenat u manje toksičan elementarni selen uz stvaranje SeNP. Vrste bakterija koje su korištene za sintezu SeNP su, primjerice, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia fungorum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus* i *Bacillus subtilis*. Za *in vivo* sintezu SeNP koristila se i protozoa *Tetrahymena thermophila*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i genetski modificirana *Pichia pastoris* kao jednostanični organizmi, a gljivica *Aspergillus terreus* je poslužila za sintezu SeNP kao višestanični organizam (Hosnedlova i sur., 2018).

#### 1.1.6. Zelena sinteza nanočestica selena korištenjem biljnih ekstrakata

Sinteza nanočestica korištenjem biljnih ekstrakata je privukla pozornost zbog svoje ekološki prihvatljive i netoksične prirode, ali i zato što je brza i ne zahtijeva posebne uvjete. Sharma i sur., (2014) su koristili ekstrakt suhog ploda vinove loze (*Vitis vinifera*) koji sadrži šećere, flavonoide, fenolne spojeve i minerale koji mogu pomoći u sintezi nanočestica selena. Ti spojevi mogu poslužiti za redukciju prilikom sinteze nanočestica, ali i za stabilizaciju sintetiziranih nanočestica. Osušeni plodovi vinove loze su ostavljeni natopljeni preko noći nakon čega su se zdrobili i usitnili. Nakon toga su se refluksirali pri čemu se dobio ekstrakt koji se filtrirao i dodao otopini selenitne kiseline. Smjesa se refluksirala, a nanočestice su

centrifugirane i precipitirane nakon čega su se karakterizirale atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS), transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM), metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS), difrakcijom rendgenskih zraka (XRD) i infracrvenom spektroskopijom Fourierove transformacije (FTIR). Dobivene SeNP bile su sferične i veličine 3-18 nm. FTIR je poslužila kako bi se istražili biološki spojevi zaslužni za sintezu i stabilnost dobivenih SeNP. Pokazano je kako je lignin bio povezan sa SeNP, to jest, prekrivao je sfere nanočestica selena tako ih stabilizirajući (Sharma i sur., 2014). Vyas i Rana, (2017) su sintetizirali SeNP pomoću ekstrakta Aloe vere dobivši sferične nanočestice veličina u rasponu od 7 do 48 nm, dok su Mellinas i sur., (2019) koristili ekstrakt ljuske kaka (Theobroma cacao) dobivši sferične SeNP veličine 1-3 nm sintezom potpomognutom mikrovalovima.

### 1.1.7. Funkcionalizacija nanočestica selena

Korištenje nanočestica u biomedicini zahtijeva kontrolirane interakcije s biomakromolekulama. Same nanočestice imaju veći kapacitet prijenosa raznih tvari, ali i poboljšanu sposobnost prolaska kroz stanične membrane, za razliku od čestica koje nisu nanometarske veličine. No, funkcionaliziranje površine nanočestica može omogućiti bolju selektivnost i specifično prepoznavanje pojedinih struktura potrebnih za željeni učinak lijeka. Nanočestice mogu biti funkcionalizirane raznim ligandima kao što su male molekule, surfaktanti, polimeri i biomolekule. Nanočestice funkcionalizirane s pozitivno nabijenim ligandima pokazuju veću sposobnost prolaska staničnih membrana u odnosu na one s neutralnim i negativno nabijenim ligandima. Oblaganje nanočestica polimerima, kao što je polietilen glikol (PEG), olakšava pasivno ciljanje tumorskog tkiva putem EPR efekta (eng. *enhanced permeability and retention effect*). Nastanak EPR efekta se objašnjava stvaranjem novih krvnih žila djelovanjem endotelnih faktora rasta koje luče stanice raka. Takve žile imaju povećanu permeabilnost endotela što omogućuje molekulama određenih veličina olakšani prolazak kroz njih te nakupljanje u tumorskom tkivu mnogo više nego u normalnim tkivima. Polimeri sprječavaju adsorpciju proteina krvnog seruma, povećavaju vrijeme cirkulacije i vjerojatnost prodiranja čestica u tumorska tkiva te mogu omogućiti kontrolirano oslobađanje lijekova. Nanočestice obložene biomolekulama imaju specifične karakteristike koje je teško postići korištenjem sintetskih materijala. Biomolekule osiguravaju učinkovitu isporuku s minimalnom citotoksičnošću. Nanočestice obložene proteinima i antitijelima mogu se vezati na receptore na površini stanice osiguravajući ciljanu isporuku (Mout i sur., 2012).

## 1.2. KOMINA MASLINE

Maslina (*Olea europea*) je vazdazelena biljna vrsta koja naraste i do 10 metara. Samonikla maslina raste grmoliko te je visine 4-5 metara. Grančice masline su bodljikave, a listovi su mali, duguljasti, kožasti, tvrdi i manji nego kod kultivirane masline. Lice lista je svijetlozelene boje, a naličje bijelo. Lišće je po granama pravilno raspoređeno – uvijek su po dva lista nasuprot, a na vrhu grane je jedan list. U pazušcima listova se nalaze šiljasti ili okrugli pupovi. Šiljasti pupovi su drveni, a okrugli cvjetni. Grozdasti, žućkasto bijeli cvjetovi rastu samo na jednogodišnjim (prošlogodišnjim) granama. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod koji je prvo zelen, a kad sazrije mijenja boju u tamnoljubičastu ili gotovo crnu. Kada je plod zelen, meso je gorko, a dozrijevanjem se gubi gorčina i povećava se sadržaj ulja u plodu (Kantoci, 2006).

### 1.2.1. Otpad prehrambene industrije

Proizvodnja hrane se sastoji od niza složenih procesa koji stvaraju velike količine otpada. Taj otpad predstavlja sav prehrambeni materijal, jestiv ili nejestiv, koji se ne prodaje za ljudsku prehranu kao primarni prehrambeni proizvod; odnosno prehrambeni materijal koji je izgubio dio ili svu svoju ekonomsku vrijednost. Postupanje s takvim otpadom, kao što je spaljivanje, kompostiranje, anaerobna digestija i odlaganje, često pruža nisku ekonomsku i ekološku vrijednost (Garcia-Garcia i sur., 2018). Otpad prehrambene industrije predstavlja ekološki problem zbog negativnog utjecaja na okoliš, sigurnost hrane i zdravlje ljudi (Goula i Lazarides, 2015). Međutim, otpad prehrambene industrije sadrži i brojne sastojke sa širokim rasponom potencijalnih komercijalnih primjena što ga čini prikladnom sirovinom za valorizaciju. Valorizacija otpada predstavlja proces pretvaranja otpada u korisnije proizvode (Garcia-Garcia i sur., 2018). Do danas se većina otpada prehrambene industrije koristila kao izvor goriva, hrane za stoku ili kao organsko gnojivo, no danas, s napretkom modernih tehnologija, otpad i nusproizvodi prehrambene industrije se mogu koristiti za stvaranje proizvoda s dodanom vrijednošću za prehrambenu, kozmetičku i farmaceutsku industriju (Ben-Othman i sur., 2020). Neke vrste otpada prehrambene industrije su prepoznate kao vrijedan izvor nutraceutika (Goula i Lazarides, 2015). Biološki aktivni spojevi izolirani iz otpada hrane uključuju polifenole, flavonoide, tanine, vitamine A i E, masne kiseline, antocijanine i esencijalne minerale. Iz istraživanja je uočeno da nejestivi dijelovi voća, kao što su kora, grančice i dijelovi kožice, često sadrže veće količine biološki aktivnih spojeva u odnosu na jestive dijelove. Na primjer,

kora jabuke, grožđa i citrusa ima 15% veći sadržaj polifenolnih spojeva od pulpe. Pri proizvodnji pića voće stvara goleme količine otpada koji je u obliku komine (mješavina pulpe, sjemenki, kožice i peteljki). Zbog visoke kvarljivosti komine nastaju ozbiljni ekološki i tehnički problemi. Zbog toga se preporuča korištenje voćne komine kao stočne hrane ili prerada u biognojivo ili biogorivo pomoću kompostiranja. Komina voća, poput one od jabuke i bobičastog voća, predložena je kao dodatak pekarskim i mliječnim proizvodima kako bi se povećao sadržaj prirodnih antioksidansa i vlakana u njima (Ben-Othman i sur., 2020).

### 1.2.2. Komina masline

Plod masline se sastoji od kožice, pulpe i sjemenke (Brlek i sur., 2009). Za jelo se beru zeleni plodovi masline, a za ulje se beru dozreli plodovi koji su poprimili tamnoljubičastu boju. Kod berbe je vrlo važno da se plodovi što prije i što manje oštećeni odvezu na prešanje jer stajanjem gube na kvaliteti (Kantoci, 2006). Nakon čišćenja i pranja plodova slijedi mljevenje s ciljem oslobađanja ulja iz pulpe ploda. Maslinovo tijesto dobiveno mljevenjem se zatim miješa, a nakon miješanja se provodi ekstrakcija ulja koja se temelji na prešanju, centrifugiranju ili selektivnoj filtraciji (Brlek i sur., 2009). Najbolje ulje se dobiva procesom hladnog prešanja pri kojem je temperatura vode do 25 °C (Kantoci, 2006). Preradom maslina u ulje dobiva se velika količina otpada u obliku komine masline kao čvrstog otpada i biljne vode kao tekuće faze. Komina masline se sastoji od kožice ploda, pulpe i dijelova koštice (Brlek i sur., 2009). Biljna voda dobivena preradom maslina niske je pH vrijednosti, visoke vodljivosti i visokog organskog opterećenja. Glavni spojevi prisutni u njoj su voda, fenoli, šećeri, organske kiseline, celuloza, bjelančevine, lignin i polifenoli, a među mineralnim tvarima se ističu kalij, kalcij i natrij. Komina masline je blago kisela, pH vrijednosti 4,8-6,5, te ima vrlo visok udio organske tvari. S obzirom na visok sadržaj fenola, lipida i drugih organskih spojeva, i biljna voda i komina masline imaju fitotoksično djelovanje i time negativne učinke na tlo (Kučić Grgić i sur., 2020). Komina masline se kod nas rijetko iskorištava. Taj otpad se najčešće baca, a zapravo ima višestruku primjenu i korist. Najjednostavniji način iskorištavanja komine masline je njezino kompostiranje čime se dobiva kvalitetno gnojivo. Osim toga, može se koristiti i za stočnu hranu te za preradu u brikete za loženje (Kantoci, 2006). Komina masline se može koristiti i kao izvor energije i to na dva načina – biokemijski anaerobnom fermentacijom uz proizvodnju bioplina ili termokemijski sagorijevanjem u pećima za dobivanje biomase (Brlek i sur., 2009). Polifenoli prisutni u komini masline imaju antioksidativno djelovanje zbog kojeg pokazuju zaštitni učinak na deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i mogu se koristiti u kremama

i drugim proizvodima za osobnu higijenu. Nadalje, komina masline se može koristiti u polimernoj industriji kao punilo u polimernim materijalima (Kučić Grgić i sur., 2020).

### 1.2.3. Polifenoli masline i njihovo antikancerogeno djelovanje

Polifenoli masline, kao što su hidroksitirozol i tirozol i njihovi derivati oleuropein i oleacin, pokazuju antikancerogeno djelovanje na različite vrste raka, primjerice, rak dojke, rak debelog crijeva, rak prostate, melanom i druge. Osim toga oni imaju i antioksidativno djelovanje te antiaterogene, antimikrobne i protuupalne učinke. Antikancerogeno djelovanje postižu učinkom na ekspresiju gena koji kontroliraju proliferaciju, apoptozu i diferencijaciju stanica raka. Primjerice, moguće mete djelovanja mogu biti geni koji kontroliraju proizvodnju faktora rasta ili receptora faktora rasta. Prekomjerna ekspresija faktora rasta u stanicama raka dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica i proizvodnje signalnih molekula koje potiču proliferaciju susjednih stanica i rast raka. Polifenoli masline mogu spriječiti oksidativno oštećenje DNK, uzrokovati apoptozu stanica raka te inhibirati ključne faze u razvoju raka kao što su inicijacija, promocija, stvaranje metastaza i njihova migracija. Polifenoli djeluju aditivno, sinergistički ili antagonistički, kako međusobno, tako i s drugim komponentama hrane i s lijekovima. Tako kombinacija nekoliko polifenola često ima sinergističko djelovanje i bolji antikancerogeni učinak nego pojedinačni polifenol (Torić i sur., 2019).

### 1.3. STANIČNI MODELI ZA ISTRAŽIVANJE TOKSIČNOSTI

Premda pokusi na životinjama slijede pokuse na stanicama, njihovi rezultati nisu uvijek primjenjivi u ljudskih pacijenata zbog brojnih fizioloških razlika između ljudi i životinja. Stoga će nam za razjašnjavanje molekularnih mehanizama djelovanja toksina koji se odnose na ljudsku fiziologiju i terapiju bolje poslužiti stanični modeli (Vollmer i Stegmayr, 2022). Osim toga, stanični modeli, posebice *in vitro* sustavi, omogućuju ispitivanje toksikoloških mehanizama u kontroliranim uvjetima. Jedan od načina na koji se takvi mehanizmi mogu proučavati je određivanje reproducibilnih promjena koje toksini induciraju u strukturi kultiviranih stanica. Postupak uključuje pripremu staničnog modela, tretman stanica, procjenu promjena uzrokovanih toksinom te zaključke dobivene tim pokusom. Korištenje *in vitro* sustava daje informacije o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i sudbini kemikalija unutar pojedine vrste tkiva (Walton i Buckley, 1975).



### 1.3.1. Caco-2 stanična linija

Stanična linija ljudskog karcinoma debelog crijeva (Caco-2) široko se upotrebljava kao *in vitro* model za proučavanje funkcije epitelnih stanica tankog crijeva jer Caco-2 stanice pokazuju strukturne i funkcionalne karakteristike apsorpcijskih enterocita tankog crijeva. Epitelne stanice tankog crijeva tvore jednoslojni epitel koji oblaže površinu lumena tankog crijeva i odvajaju lumen crijeva od sistemske cirkulacije sprječavajući ulazak toksičnih spojeva u cirkulaciju te invaziju bakterija kroz gastrointestinalni trakt. Toksični spojevi mogu oštetiti crijevne epitelne stanice i time narušiti zaštitnu funkciju crijevnog epitela (Wang, 2008). Caco-2 stanična linija je heterogena zbog čega će uvjeti uzgoja stanica dovesti do rasta određene subpopulacije stanica što rezultira staničnim modelom sa svojstvima koja se mogu razlikovati od izvorne stanične linije. Dakle, rezultati dobiveni istim eksperimentalnim uvjetima u različitim laboratorijima možda neće biti međusobno usporedivi te su stoga napravljene različite klonirane Caco-2 stanične linije. Caco-2 stanična linija može pružiti informacije o biološkoj i biokemijskoj osnovi barijernih svojstava crijevne sluznice, o apsorpciji lijekova i prehrambenih sastojaka relevantnih i za farmaceutsku i za prehrambenu industriju te o potencijalnim toksičnim učincima kandidata za lijekove ili metabolita hrane u crijevnoj sluznici. Pomoću Caco-2 stanica mogu se proučiti mehanizmi i učinci mikrobiote i metabolita mikrobiote te bioaktivnih komponenti hrane na barijernu funkciju crijeva. Također se mogu razjasniti putovi transporta kroz crijevni epitel (Lea, 2015).

Caco-2 stanice se spontano diferenciraju pokazujući morfološke i funkcionalne karakteristike zrelih enterocita tankog crijeva, no, u usporedbi s normalnim crijevnim epitelom, Caco-2 stanice imaju nekoliko ograničenja. Kao prvo, normalni epitel sadrži više od jedne vrste stanica, a ne samo enterocite, te, za razliku od Caco-2 stanica, ima na sebi sloj sluzi i nepromiješane vode. Nadalje, brojni nestanični parametri će utjecati na apsorpciju određenog spoja u stanice. Primjerice, na transport lipofilnih molekula *in vivo* utječe prisutnost žučnih kiselina i fosfolipida kao i sloj vode koji se ne miješa u blizini epitela (Lea, 2015).

### 1.3.2. HepG2 stanična linija

HepG2 stanice su linija jetrenih tumorskih stanica koje se koriste za razna istraživanja, od onkogeneze do citotoksičnosti. Te stanice su prve pokazale ključne karakteristike hepatocita dok, primjerice, ranije otkrivena linija SK-Hep1 ne posjeduje važne markere jetrenih stanica kao što je ekspresija albumina i alfa- i gama-fibrinogena. Patent za staničnu liniju HepG2

podnijeli su istraživači s Instituta Wistar, a kao staničnu liniju dobivenu iz ljudskog hepatoma, to jest, staničnu liniju dobivenu iz tkiva jetre 15-godišnjeg dječaka s dobro diferenciranim hepatoblastomom. HepG2 stanična linija se koristi za *in vitro* ispitivanje toksičnih učinaka teških metala, nanočestica i lijekova. Već 40 godina se koristi kao model za normalne hepatocite, hepatocelularni karcinom i stanice hepatoblastoma u različitim istraživanjima. Proučavanjem molekularnog sastava HepG2 stanica na genomskoj, transkriptomskoj i proteomskoj razini uočava se da su te stanice samo djelomično slične primarnim hepatocitima i stanicama raka. Ta je činjenica važna ako se želi proučavati metabolizam lijekova ili procesi koji se javljaju kod određene vrste raka na HepG2 stanicama. Ključni proteini uključeni u metabolizam tvari su kod HepG2 stanica slabo izraženi, a nedostaju i transporter i enzimi faze I metabolizma (Arzumanian i sur., 2021).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dodatke prehrani sa selenom (osobito one koji sadrže selen u obliku selenita) karakterizira relativno niska bioraspoloživost i uska terapijska širina što može smanjiti potencijalnu zdravstvenu dobrobit dodatka prehrani. Nanočestice selena se uvelike istražuju zbog brojnih pozitivnih karakteristika kao što su bolji okus i miris, povoljnija topljivost, produljeno djelovanje, otpornost prema oksidaciji i enzimskoj razgradnji, te učinkoviti prolazak kroz gastrointestinalni trakt čime se povećava bioraspoloživost selena. Mnoga istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja nanoselena kao nosača antitumorskih lijekova.

Komina masline je otpad koji zaostaje nakon prerade ploda masline u maslinovo ulje te je vrlo bogata polifenolima koji pokazuju značajan antioksidativni i antikancerogeni učinak.

Cilj ovog rada je sintetizirati nanočestice selena procesom zelene sinteze uz dodatak ekstrakta komine masline bogatog biološki aktivnim polifenolima. Glavna hipoteza predloženog istraživanja je da će takvim postupkom biti dobiveni kompleksni nanosustavi selena i polifenola masline čime će se potencijalno proširiti spektar bioloških učinaka nanoselena odnosno pojačati njegovi antikancerogeni učinci. Rezultati ovog rada će pomoći u boljem razumijevanju i razvoju korištenja ekstrakta komine masline kao prirodnog sredstva za funkcionalizaciju metalnih nanočestica.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. KEMIJSKI I BIOLOŠKI MATERIJALI I PRIBOR

- polivinilpirolidon (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- polisorbit 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- liofilizirani ekstrakt komine masline
- natrijev selenit (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- stanične linije ljudskog karcinoma debelog crijeva (Caco-2 [Caco2] (ATCC HTB-37), Virginia, SAD)
- stanične linije jetrenih tumorskih stanica (HepG2 [HEPG2] (ATCC HB-8065), Virginia, SAD)
- MEM neesencijalne aminokiseline (NEAA-B, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- antibiotska/antimikotska otopina (AAS-B, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- fetalni goveđi serum (FBS-HI-11A, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- 2,5%-tni tripsin u HBSS-u bez kalcija i magnezija (BE17-160E, Lonza, Basel, Švicarska)
- 0,02%-tna etilendiamintetraoctena kiselina u DPBS-u (E8008, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- fosfatni pufer bez kalcija i magnezija (BE17-517Q, Lonza, Verviers, Belgija)
- DMEM medij (CP19-3058, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- EMEM medij (M2279, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- L-glutamin 200 mM (G7513, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- odmjerne tikvice 5/20 mL (BRAND GMBH + CO KGWertheim, Njemačka)
- plastična Falcon epruveta 50 mL, 30x120 mm (ISOLAB, Njemačka)
- plastična samostojeća Falcon epruveta 50 mL, 30x120 mm (ISOLAB, Njemačka)
- stakleni štapići (LLG-Labware, Njemačka)
- laboratorijske čaše 5/25/1000 mL (BRAND GMBH + CO KGWertheim, Njemačka)
- mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Eppendorf safe-lock tube 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- plastične žlice (ISOLAB, Njemačka)

- špatule (ISOLAB, Njemačka)
- plastične šprice 5 mL (LLG-Labware, Njemačka)
- kivete 50 mL (ISOLAB, Njemačka)
- Chromafil filteri Xtra PES 25 mm, 0,45 µm (Macherey-Nagel, Njemačka)
- Erlenmayerove tikvice širokog grla 50 mL (Scherf-Präzision Europa GmbH, Meiningen, Njemačka)
- membrana za dijalizu, MWCO =14000 (D9527-100FT, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica (Sarstedt AG & Co. KG, Njemačka)
- polistirenske kivete 10x10x45 mm (Sarstedt AG & Co. KG, Njemačka)
- kivete za mjerenje zeta potencijala (DTS1070, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- multikanalna pipeta (L8-200XLS+, Mettler Toledo, Ohio, SAD)
- sterilne serološke pipete 5/10/25 mL (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- sterilne tikvice za uzgoj stanica 75 cm<sup>2</sup> (353136, Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- polipropilenska Falcon tuba za centrifugu 15/50 mL (339650, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

### 3.2. INSTRUMENTI

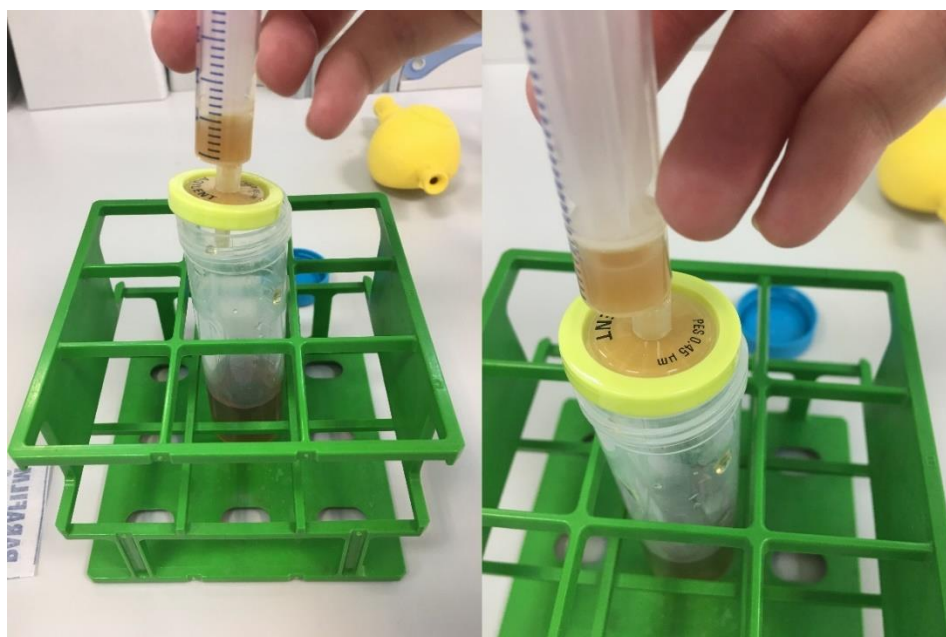
- analitička vaga (AB265-S, Metler Toledo, Indija)
- centrifuga (Centric 322A, Tehnica, Slovenija)
- Vortex miješalica (VTY-3000L, Mixer Uzusio, LMS, Japan)
- magnetska miješalica (MIX 15 eco, 2mag AG, Njemačka)
- Rotavapor (R-200, Buchi, Švicarska)
- čitač mikrotitarskih pločica Victor X3 (Pelkin Elmer, SAD)
- Zetasizer Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- pH metar/konduktometar (S47 SevenMulti, Mettler Toledo, SAD)
- CO<sub>2</sub> inkubator (MCO-20AIC, Sanyo Electric Biomedical Co., Osaka, Japan)
- sigurnosni biološki kabinet klase II (laminar flow) MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- invertni mikroskop Primovert, (491206-0001-000, Carl Zeiss microscopy GmbH, Gottingen, Njemačka)

### 3.3. ZELENA SINTEZA NANOČESTICA SELENA

Zelena sinteza nanočestica selena provedena je korištenjem 1%-tne otopine ekstrakta komine masline. L-askorbinsku kiselinu je potrebno pripremiti neposredno prije sinteze, a ostale kemikalije se mogu pripremiti i dan ranije.

#### 3.3.1. Priprema otopina

Za pripremu 1%-tne otopine ekstrakta komine masline (EKM) odvažuje se 400 mg liofiliziranog ekstrakta komine masline u Falcon epruvetu i doda 40 mL ultračiste vode (milliQ-voda). Potom se ta smjesa ishomogenizira miješanjem i profiltrira kroz Chromafil® filtere veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  koristeći plastičnu špricu od 5 mL (Slika 1). Filtrat se skuplja u Falcon epruvete i pohrani se u hladnjak do sljedećeg dana (ako je filtracija rađena dan prije same sinteze). U filtratu se nalaze polifenoli koji su nam bitni za proces sinteze.



**Slika 1.** Filtracija smjese liofiliziranog ekstrakta komine masline i ultračiste vode.

Zatim se izvažuje 86,45 mg natrijevog selenita u odmjernu tikvicu od 5 mL i doda milliQ-voda do oznake čime se dobije 0,1 M otopina  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Za pripremu 1%-tne otopine polivinilpirolidona (PVP) odvažuje se 200 mg PVP-a u odmjernoj tikvici od 20 mL i doda malo milliQ-vode kako bi se PVP otopio. Nakon toga se odmjerna tikvica nadopuni do oznake. Zadnja otopina koja se može pripremiti dan prije sinteze je otopina polisorbata 20 (PS). Za

dobivanje 10%-tne otopine polisorbata 150 mg se razrijedi vodom na 1500 mg i homogenizira vorteksiranjem.

Otopina L-askorbinske kiseline pripremi se vaganjem 3,524 g L-askorbinske kiseline u odmjernu tikvicu od 20 mL nadopunjavanjem do oznake sa milliQ-vodom i otopi (nastane otopina koncentracije 1 mol/L). Zbog nestabilnosti, otopina L-askorbinske kiseline se priprema netom prije postupka sinteze.

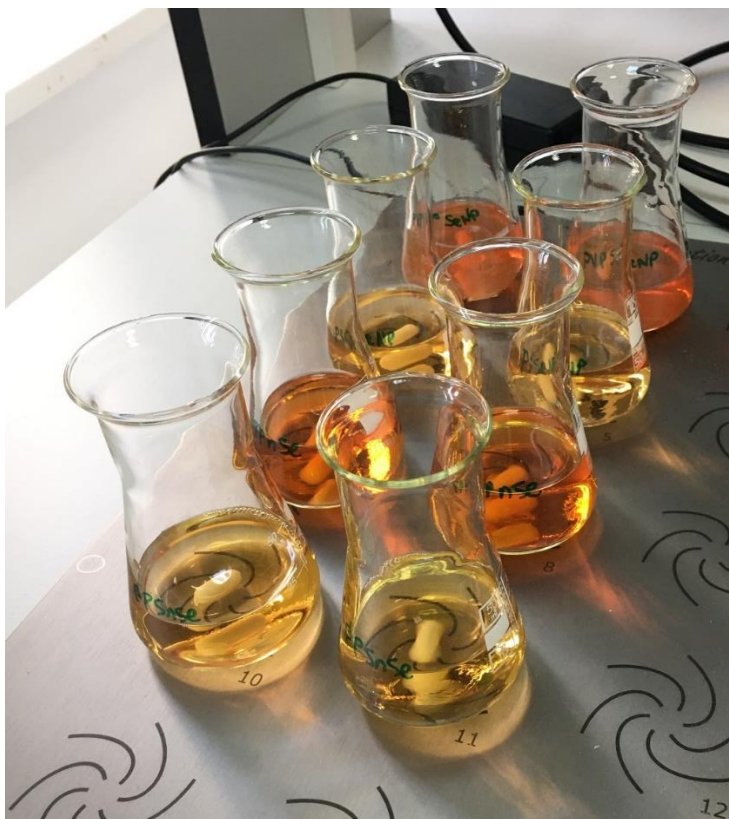
### 3.3.2. Postupak sinteze SeNP

Pripremi se osam Erlenmayerovih tikvica od 50 mL, širokog grla, za pripremu četiri različite reakcijske smjese (svaka u duplikatu). U svaku se doda određeni volumen milliQ-vode, kako je navedeno u Tablici 2. Zatim se doda stabilizirajući agens, PVP ili PS, te se smjesa miješa 15 minuta na magnetskoj miješalici uz magnetski mješač brzine okretaja 300. Potom se doda L-askorbinska kiselina i EKM te na kraju  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  brzinom od 1 kap/2 sekunde. Već tijekom dodavanja  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  otopina mijenja boju u crvenu što je pokazatelj redukcije selenita u selen (Slika 2). Nakon dodatka prve kapi  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  reakcijska smjesa se miješa još 20 minuta.

**Tablica 2.** Shema pripreme reakcijskih smjesa.

	milliQ-voda	PVP(1%)	PS (10%)	L-askorbinska kiselina (1M)	EKM (1%)	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (0.1M)
PVPSenP	26,34 mL	3 mL	0	0,33 mL	0	0,33 mL
PSSenP	29,33 mL	0	0,15 mL	0,17 mL	0	0,35 mL
fPVPSenP	21,34 mL	3 mL	0	0,33 mL	5 mL	0,33 mL
fPSSenP	24,33 mL	0	0,15 mL	0,17 mL	5 mL	0,35 mL

Otopine u koje je dodan EKM su potencijalno modificirane adsorpcijom polifenola iz komine masline na površinu nanočestica (što može rezultirati promjenom bioloških učinaka) pa ih nazivamo funkcionaliziranim, a označavamo ih sa fPVPSenP i fPSSenP, ovisno o tome koji je stabilizirajući agens dodan (PVP ili PS). Otopine u koje nije dodan EKM označavamo sa PVPSenP i PSSenP, također ovisno o dodanom stabilizirajućem agensu (PVP ili PS). Pojedinačni ukupan konačni volumen svih reakcijskih smjesa je 30 mL.



**Slika 2.** Reakcijske smjese na magnetskoj miješalici.

### 3.3.3. Čišćenje uzoraka SeNP dijalizom

Sintetizirane nanočestice selena se nalaze u reakcijskoj smjesi zajedno sa reagensima koji su korišteni za njihovu sintezu. Kako bi se sintetizirane SeNP mogle koristiti u daljnjim ispitivanjima potrebno ih je pročistiti i izolirati od neizreagiranih ostataka reaktanata u smjesi postupkom dijalize. Za dijalizu uzoraka se koristi dijalizacijska membrana koja ima MWCO (eng. *molecular weightcut-off*) 14000 i kapacitet od 175 mL/ft, to jest, 175 mL/0,305 m (5,8 mL/cm). MWCO 14000 znači da takva membrana zadržava sve čestice koje su veće od 14000 Da.

Dijalizacijska membrana se izreže na osam jednakih dijelova duljine 14 cm koji se ostave preko noći u milliQ-vodi kako bi se uklonili tragovi glicerola. Potrebno je tri puta promijeniti vodu. Pripremi se osam staklenih čaša volumena 1000 mL te se napune sa milliQ-vodom. U svaku od njih će se staviti jedna dijalizacijska membrana sa novosintetiziranom otopinom nanoselena (Slika 3). Postupak punjenja membrana je isti za svaki uzorak. Membrana se na jednom kraju presavine i pričvrsti štikaljkom, a kroz drugi kraj se, pomoću plastične šprice, ulije sadržaj Erlenmayerove tikvice ukupnog volumena od 30 mL. Prilikom punjenja se mora paziti da unutar membrana ne zaostanu mjehurići zraka. Potom se i drugi kraj membrane presavine i

pričvrsti štupaljkom nakon čega se takva napunjena membrana stavi u pripremljenu staklenu čašu od 1000 mL, napunjenu milliQ-vodom, tako da ne dodiruje stijenke čaše i da je potpuno uronjena u vodu. Čaše sa milliQ-vodom, napunjenim membranama i magnetskim mješačem (veličine 1,5 cm) se stave na magnetsku miješalicu i ostave se miješati preko noći pri brzini okretaja 600. Vodu je potrebno promijeniti najmanje tri puta – prvi puta nakon 30 minuta do 3 sata, drugi put nakon 4-5 sati, a treći put sljedeći dan, ujutro. Nakon što se zadnji put promijeni voda, miješa se još 1 sat.



**Slika 3.** Čišćenje novosintetiziranih otopina nanoselena dijalizom.

### 3.4. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE RELATIVNE KONCENTRACIJE NANOSELENA

UV-Vis spektrofotometrija je neinvazivna analitička metoda koja se koristi za određivanje koncentracije uzoraka pri čemu je potrebna minimalna priprema uzorka za analizu. Osnovni princip rada ove metode je apsorpcija elektromagnetskog zračenja određene valne duljine. Ultraljubičasti dio spektra (UV) obuhvaća valne duljine u rasponu 170-380 nm, a vidljivi dio spektra (Vis) obuhvaća valne duljine u rasponu 380-780 nm.

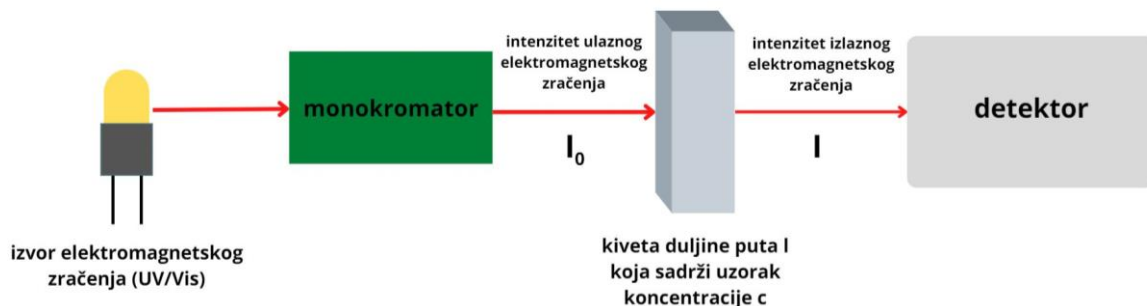


Jednadžba koja povezuje izmjerenu apsorbanciju uzorka i njegovu koncentraciju je Beer-Lambertov zakon:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon cl.$$

$A$  je apsorbancija uzorka izmjerena na određenoj valnoj duljini, a jednaka je logaritmu omjera intenziteta ulaznog elektromagnetskog zračenja ( $I_0$ ) i intenziteta izlaznog elektromagnetskog zračenja ( $I$ ).  $\epsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent mjerne jedinice L/mol cm,  $c$  je molarna koncentracija tvari u ispitivanom uzorku mjerne jedinice mol/L, a  $l$  je duljina puta kroz uzorak izražena u centimetrima. Iz jednadžbe Beer-Lambertovog zakona je vidljiva proporcionalnost apsorbancije i koncentracije mjerene tvari u uzorku. Ta linearna ovisnost je upotrijebljena u kvantitativnoj analizi sintetiziranih uzoraka nanočestica selena (Quevedo i sur., 2021).

Spektrofotometar je uređaj pomoću kojeg se mjeri apsorbancija uzorka, a sastoji se od izvora elektromagnetskog zračenja, monokromatora koji na uzorak propušta svjetlost određene valne duljine, nosača uzorka (kiveta duljine puta  $l$ ) i detektora (Slika 4) (Picollo i sur., 2019).



**Slika 4.** Shematski prikaz spektrofotometra.

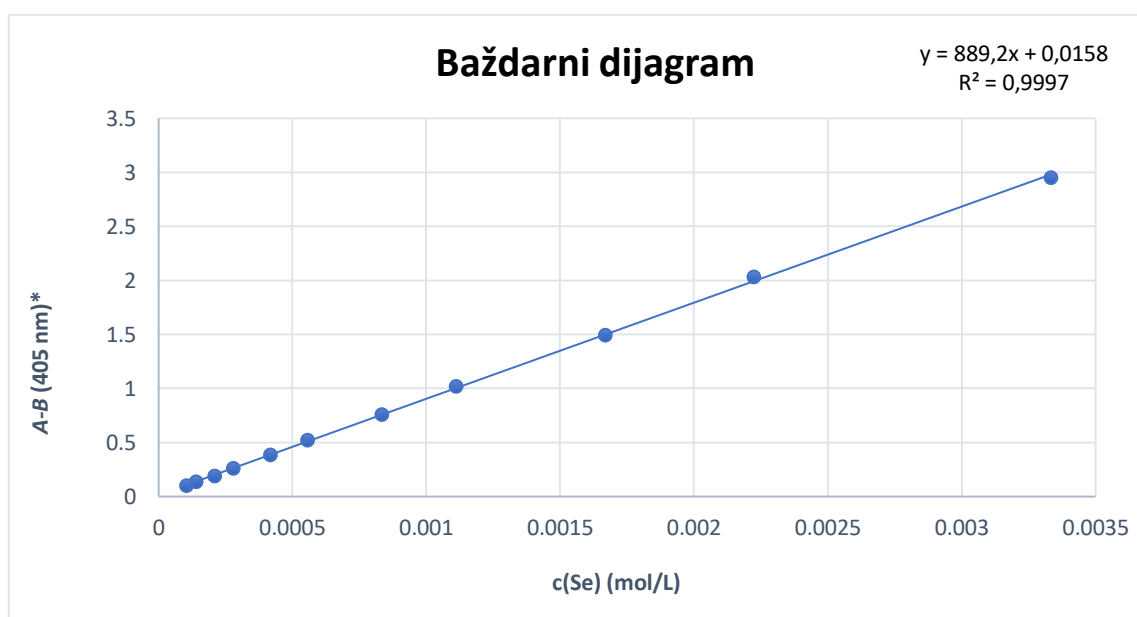
### 3.4.1. Izrada baždarnog dijagrama na 405 nm

Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nanoselena u smjesi izrađen je pomoću stock otopine PVPSenP. Stock otopina se pripremi prema gore navedenom postupku, a pomoću nje se izradi koncentracijski niz otopina razrjeđivanjem sa milliQ-vodom (Tablica 3). Koncentracije nanoselena u ispitivanim otopinama su procijenjene na temelju inicijalnih koncentracija Se dodanih u reakcijsku smjesu (u obliku natrijevog selenita) i uz pretpostavku 90%-tne konverzije u nanoselen te unimodalne raspodjele veličine čestica nanoselena s maksimumom apsorpcije na 405 nm.

**Tablica 3.** Izrada koncentracijskog niza otopina.

oznaka uzorka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	B
V stock otopine (μL)	200	133,33	100	66,67	50	33,33	25	16,67	12,5	8,33	6,25	0
V milliQ-vode (μL)	0	66,67	100	133,33	150	166,67	175	183,33	187,5	191,67	193,75	200
molarne koncentracija Se ( $\cdot 10^{-3}$ mol/L)	3,333	2,222	1,667	1,111	0,833	0,556	0,417	0,278	0,208	0,139	0,104	0

Dobivenim otopinama, ukupnog volumena 200 μL, napune se jažice na mikrotitarskoj ploči koja se stavi u čitač mikrotitarskih ploča i pokrene mjerenje na 405 nm. Kao slijepa proba koristi se milliQ-voda. Nakon statističke obrade rezultata dobije se baždarni dijagram (Slika 5).



**Slika 5.** Baždarni dijagram otopine uzorka PVPSenP na 405 nm.

\*A-apsorbancija uzorka; B-apsorbancija slijepa probe; c(Se)-molarne koncentracija nanočestica selena

### 3.4.2. Postupak UV-Vis spektrofotometrijskog određivanja koncentracije

Mjerenje koncentracije nanoselena u analiziranim uzorcima provodi se na način da se po dvije paralele uzoraka pipetiraju na mikrotitarsku pločicu u volumenu od 200 μL u kvadriplikat. Kao slijepa proba korištena je milliQ-voda.

### 3.4.3. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao koncentracije SeNP u mol/L i ppm sa odgovarajućim standardnim devijacijama (*SD*). Analiza dobivenih podataka i izrada grafičkih prikaza provedena je pomoću GraphPad Prism 9 i Microsoft Office Excel programa.

## 3.5. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA I ZETA POTENCIJALA

### 3.5.1. Uparavanje uzoraka na rotavaporu

Dijalizati, koji su u duplikatu, sjedine se u tikvici s okruglim dnom te se uparavaju na rotavaporu na volumen od 3-4 mL. Temperatura vodene kupelji se podesi na 60°C, a početni tlak na 400 mbar. Pošto je pri nižem tlaku brže uparavanje, tlak se polako spušta do 80 mbara (Slika 6).



**Slika 6.** Uparavanje uzorka na rotavaporu

### 3.5.2. Mjerenje veličine čestica i zeta potencijala

Neinvazivna metoda koja zahtijeva minimalnu količinu uzorka za analizu veličine čestica i njihove raspodjele je metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (eng. *dynamic light scattering*). Rezultati te metode ovise o viskoznosti otapala, o instrumentu, temperaturi te indeksu loma materijala. Čestice u koloidnoj disperziji se izlažu monokromatskom koherentnom laserskom

snopu svjetlosti koji raspršuju, a takva raspršena svjetlost pada pod određenim kutom na detektor. Intenzitet raspršene svjetlosti fluktuiraju tijekom vremena jer se čestice kontinuirano gibaju, a pomoću analize takvih fluktuacija konstruira se vremenski ovisna korelacijska funkcija iz koje se dobiva vrijednost difuzijskog koeficijenta  $D$ . Za izražavanje veličine čestica koristi se hidrodinamički polumjer  $R_H$  koji je preko Stokes-Einsteinove jednadžbe povezan sa difuzijskim koeficijentom  $D$ :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

gdje je  $k_B$  Boltzmannova konstanta ( $1,3806 \cdot 10^{-23}$  J/K),  $T$  temperatura i  $\eta$  apsolutna viskoznost. Hidrodinamički polumjer je polumjer hipotetske okrugle čestice koja difundira istom brzinom kao i čestica koja je analizirana metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. U realnosti su čestice rijetko pravilnog okruglog oblika, stoga  $R_H$  samo približno opisuje stvarnu veličinu čestica.

Kao držač uzorka koristi se čista četvrtasta kiveta izrađena od stakla ili optički prozirne plastike za jednokratnu primjenu. Sam uzorak mora biti čist, homogen i proziran. Detektor je najčešće postavljen pod kutom od  $173^\circ$  što omogućuje detekciju povratnog raspršenja i isključuje višak raspršene svjetlosti.

Elektrokinetički ili zeta potencijal je razlika potencijala između dvostrukog električnog sloja koloidne čestice i sloja disperznog sredstva oko nje, u ravnini smicanja. Dvostruki električni sloj se sastoji od dva dijela: unutarnji (Sternov) sloj gdje se nalaze ioni naboja suprotnog naboju čestice i vanjski (difuzni) sloj gdje se nalaze ioni naboja istog ili suprotnog naboju same koloidne čestice. Sastav dvostrukog električnog sloja je ovisan o različitim čimbenicima, kao što su pH, ionska jakost i koncentracija pa o tim čimbenicima ovisi i vrijednost zeta potencijala. pH pri kojem je zeta potencijal jednak nuli naziva se izoelektrična točka. Približavanjem pH izoelektrične točke koloidni sustav gubi stabilnost i dolazi do aglomeracije i flokulacije čestica. Zeta potencijal je jedan od pokazatelja stabilnosti koloidnog sustava. Povećanje debljine dvostrukog električnog dvosloja koloidne čestice, a time i zeta potencijala, rezultira povećanjem elektrostatskih odbijanja što pridonosi smanjenju agregacije i flokulacije čestica. Smjernice uobičajene u literaturi klasificiraju nanočestice sa zeta potencijalom  $\pm 0-10$  mV kao vrlo nestabilne,  $\pm 10-20$  mV kao relativno stabilne,  $\pm 20-30$  mV kao umjereno stabilne i one sa zeta potencijalom većim od  $\pm 30$  mV kao vrlo stabilne. No, iako zeta potencijal daje korisne informacije o odbojnim elektrostatičkim silama, ne daje nikakav uvid u privlačne van der

Waalsove sile. Stoga nije rijetkost naići na stabilne koloidne sustave s niskim zeta potencijalom i obrnuto.

Zeta potencijal se obično mjeri pomoću metode elektroforetskog raspršenja svjetlosti (eng. *electrophoretic light scattering*) koja se u nizu instrumenata (npr. Malvern Zetasizer®) nalazi u kombinaciji s metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti čime se omogućuje istovremeno mjerenje zeta potencijala i veličine čestica uzorka unutar istog instrumenta. Za mjerenja zeta potencijala se koriste jednokratne plastične (polikarbonatne) kivete s ugrađenim pozlaćenim bakrenim elektrodama i savijenom kapilarnom cijevi u koju se stavlja 0,75 mL uzorka (Bhattacharjee, 2016).

U ovom radu je za mjerenje zeta potencijala i veličine nanočestica selena u uzorcima korišten uređaj Zetasizer Ultra. Nakon adekvatnog razrjeđenja uzorka milliQ-vodom izmjeri se pH vrijednost uzorka tri puta. Nakon izmjerenog pH, uzorak se ispipetira u polistirensku kivetu, kiveta se stavi u uređaj i metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti sa „zelenim“ laserom ( $\lambda=532$  nm), kutom mjerenja od  $173^\circ$  te pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ , odredi se veličina čestica. Postupak se ponovi tri puta za svaki uzorak.

Za određivanje zeta potencijala uzorak se pipetira u kivetu za mjerenje zeta potencijala. Postupak mjerenja zeta potencijala se ponovi tri puta za svaki uzorak.

### 3.5.3. Statistička analiza

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 9 programi.

Dobivene korelacijske funkcije nakon određivanja raspodjele veličine čestica analizirane su algoritmima u Zetasizer programskom paketu, a rezultati su prikazani kao raspodjela veličine čestica po intenzitetu. Rezultati određivanja veličine čestica i zeta potencijala su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije.

## 3.6. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI NANOČESTICA IN VITRO

U ovom radu korištene su stanične linije ljudskog karcinoma debelog crijeva (Caco-2 stanice) i jetrenih tumorskih stanica (HepG2 stanice).

Caco-2 stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u tikvicama za uzgoj stanica površine  $75\text{ cm}^2$  pri  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  i 95% relativne vlažnosti, prema protokolu Caco-2 [Caco2] (ATCC HTB-

37). Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom. Kao hranidbeni medij korišten je DMEM medij (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) koji se mora čuvati na 4°C, dok se ostali sastojci potpunog medija čuvaju na -20°C. Potpuni medij napravljen je pomoću 500 mL DMEM medija, 100 mL fetalnog goveđeg seruma (FBS), 5 mL antibiotske/antimikotske otopine (penicilin/streptomycin/ampicilin), 5 mL MEM neesencijalnih aminokiselina pohranjenih na 4°C i 10 mL L-glutamina. Nakon postizanja 80% konfluentnosti (koncentracija stanica između  $8 \cdot 10^4$  i  $1 \cdot 10^5$  živih stanica/cm<sup>2</sup>), stanice se presađuju u novu tikvicu. Prilikom presađivanja medij se ukloni i stanice se ispiru fosfatnim puferom (PBS) 1x (2x5 mL) kako bi se uklonili svi tragovi seruma (serum sadrži inhibitor tripsina). Potom se u tikvicu doda 2-3 mL otopine tripsina, koji je 10x razrijeđen u etilendiamintetraoctenoj kiselini (EDTA), i stanice se promatraju pod invertnim mikroskopom dok se stanični sloj ne rasprši (obično unutar 5 minuta). Prilikom čekanja da se stanice odvoje od površine tikvice, tikvica se ne smije udarati niti tresti kako ne bi došlo do zgrušavanja stanica. Ako se stanice teško odvajaju, mogu se staviti na 37°C kako bi se olakšalo njihovo odvajanje. Nakon odvajanja stanica, doda se 6-8 mL medija za rast i stanice se resuspendiraju nježnim pipetiranjem. Odgovarajući alikvoti stanične suspenzije se dodaju u nove tikvice i inkubiraju na 37°C. Preporučeni inokulum je  $1 \cdot 10^4$  živih stanica/cm<sup>2</sup>. Stanični medij se mijenja svaka dva dana.

HepG2 stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u tikvicama za uzgoj stanica površine 75 cm<sup>2</sup> pri 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i 95% relativne vlažnosti, prema protokolu HepG2 [HEPG2] (ATCC HB-8065). Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom. Kao hranidbeni medij korišten je EMEM medij (eng. *Eagle's Minimum Essential Medium*) koji se mora čuvati na 4°C, dok se ostali sastojci potpunog medija čuvaju na -20°C. Potpuni medij napravljen je pomoću 500 mL EMEM medija, 50 mL fetalnog goveđeg seruma, 5 mL antibiotske/antimikotske otopine, 5 mL MEM neesencijalnih aminokiselina pohranjenih na 4°C i 10 mL L-glutamina. Nakon postizanja 80% konfluentnosti stanice se presađuju u novu tikvicu. Postupak presađivanja je sličan kao i kod Caco-2 stanica, a razlikuje se samo u mediju za rast stanica. Stanični medij se mijenja svaka dva dana.

### 3.6.1. Tretiranje stanica

Dva dana prije tretiranja, HepG2 i Caco-2 stanice se nasade na mikrotitarske ploče sa 96 jažica prema gore navedenom protokolu. Iz tikvice za uzgoj stanica ukloni se medij, stanice se ispiru fosfatnim puferom i potom se doda 3 mL tripsina. Nakon odvajanja stanica od stijenke tikvice,

doda se 17 mL odgovarajućeg medija za rast i stanice se resuspendiraju nježnim pipetiranjem. Za brojanje stanica otpipetira se 50  $\mu$ L stanične suspenzije i pomoću hemocitometra se odredi ukupan broj stanica u 1 mL suspenzije. Stanična suspenzija se razrijedi odgovarajućim medijem do koncentracije 200 000 stanica/mL te se pomoću multikanalne pipete pipetira po 100  $\mu$ L suspenzije u pojedinu jažicu na mikrotitarsku ploču. Kao slijepa proba koristi se milliQ-voda, u kvadriplikatu, na svakoj mikrotitarskoj ploči. Suspenzija se konstantno miješa u lađici pazeći da se ne prolije. Stanice se zatim inkubiraju 48 sati kako bi postigle konfluentnost.

Na dan tretmana, medij se ukloni iz jažica i doda se 90  $\mu$ L svježeg medija. Pripremljeni uzorci nanoselena (nakon uparavanja) se razrijede 10-1000 puta sa PBS-om (kako bi se utvrdio radni raspon koncentracija). Od tako pripremljenih razrijeđenih otopina nanoselena otpipetira se 10  $\mu$ L i doda u jažice sa stanicama, u kvadriplikatu. Zatim se stanice inkubiraju preko noći. Na mikrotitarsku ploču se, osim uzoraka, dodaje pozitivna i negativna kontrola u osmeroplikatu. Pozitivnu kontrolu čini 100  $\mu$ L stanične suspenzije i tert-butil hidroperoksid (tBOOH) čija koncentracija u jažici mora biti 50  $\mu$ M. Negativnu kontrolu čini 100  $\mu$ L stanične suspenzije i 10  $\mu$ L PBS-a. Kako bi se usporedila toksičnost između samog selena i nanočestica selena, pripremi se otopina natrijevog selenita i razrijedi 10-1000 puta sa PBS-om. Od tako pripremljenih razrijeđenih otopina  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  otpipetira se 10  $\mu$ L i doda u jažice sa stanicama, u kvadriplikatu.

### 3.6.2. MTT test

Kako bi se ispitao citotoksični učinak uzoraka nanoselena na HepG2 i Caco-2 stanice, korišten je MTT test koji koristi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) kao komponentu za određivanje vijabilnosti stanica. Vijabilne stanice pretvaraju MTT reagens u ljubičasto obojeni formazanski produkt, dok mrtve stanice gube tu sposobnost te je stoga nastanak ljubičaste boje marker vijabilnih stanica. Formazanski produkt se akumulira kao netopivi precipitat unutar stanica, a njegova koncentracija se određuje mjerenjem apsorbancije na 570 nm. Prije samog određivanja apsorbancije, formazanski produkt se mora otopiti, a za otapanje se najčešće koriste zakiseljeni propranolol, dimetilsulfoksid (DMSO) ili dimetilformamid (Riss i sur., 2013).

Za pripremu reagensa, MTT se otopi u PBS-u da se dobije koncentracija 0,5 mg/mL. Mikrotitarske ploče se izvade iz inkubatora i iz jažica se ukloni medij te se potom iste isperu sa 100  $\mu$ L PBS-a. Potom se doda 40  $\mu$ L MTT reagensa u svaku jažicu. Dodavanje MTT reagensa u jažice je potrebno raditi u mraku zbog osjetljivosti reagensa na svjetlost. Ukupno vrijeme

inkubacije stanica je 3 sata, a počinje se mjeriti nakon dodatka MTT reagensa u prvu jažicu. Nakon 3 sata stanice se izvade iz inkubatora i u svaku jažicu se doda po 170  $\mu$ L DMSO-a te se mikrotitarska ploča stavi na tresilicu kako bi se ljubičasti kristalići formazanskog produkta otopili (otprilike 30 minuta). Apsorbancija se mjeri na 530 nm. Što je veća količina nastalog formazanskog produkta u jažici, to će i izmjerena apsorbancija biti veća.

Citotoksičnost pojedinih uzoraka nanoselena i natrijevog selenita je prikazana kao *IC50* vrijednost. *IC50* vrijednost je kvantitativni pokazatelj količine određene tvari koja je potrebna da dovede do 50%-tne *in vitro* inhibicije nekog biološkog procesa (Hosnedlova i sur., 2018). Da bi se mogla odrediti *IC50* vrijednost pomoću GraphPad Prism 9 programa, potreban nam je logaritam koncentracije uzoraka (*logc*) i *POI* vrijednost (eng. *percentage of inhibition*) izražena u postotku. Logaritam koncentracije uzoraka se dobije pomoću baždarnog pravca (Slika 5), a *POI* vrijednost pomoću formule:

$$POI = \frac{U - N}{P - N} \times 100\%$$

gdje je

$$U = \frac{\bar{A}(\text{uzorak}) - \bar{A}(\text{slijepa proba})}{\bar{A}(\text{negativna kontrola}) - \bar{A}(\text{slijepa proba})} \times 100\%$$

$$N = \frac{\bar{A}(\text{negativna kontrola}) - \bar{A}(\text{slijepa proba})}{\bar{A}(\text{negativna kontrola}) - \bar{A}(\text{slijepa proba})} \times 100\%$$

$$P = \frac{\bar{A}(\text{pozitivna kontrola}) - \bar{A}(\text{slijepa proba})}{\bar{A}(\text{negativna kontrola}) - \bar{A}(\text{slijepa proba})} \times 100\%.$$

Vrijednosti  $\bar{A}$  su srednje apsorbancije određenog uzorka.

### 3.6.3. Statistička analiza

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 9 programi. Rezultati su prikazani kao *IC50* vrijednosti te kao grafovi ovisnosti *POI* vrijednosti o *logc*.



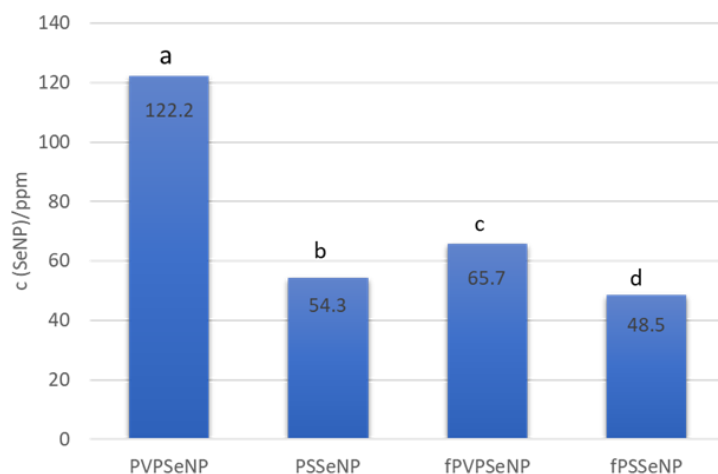
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. RELATIVNI PRINOSI POSTUPAKA SINTEZE NANOSELENA

Relativne koncentracije nanoselena u reakcijskim smjesama određene su spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije reakcijskih smjesa (nakon postupka dijalize) na 405 nm. Naime, nanočestice selena apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra u širokom rasponu valnih duljina (250-600 nm), a maksimumi apsorbancije primarno ovise o srednjem promjeru nanočestica u otopini pri čemu nanočestice većeg promjera apsorbiraju na višim valnim duljinama (Lin i Chris-Wang, 2005). Snimanjem UV-Vis spektara istraživanih reakcijskih smjesa utvrđeno je da se maksimumi apsorbancija kreću između 390 i 420 nm pa su relativne koncentracije nanoselena u istraživanim smjesama određene mjerenjem apsorbancije na 405 nm. Dobivene vrijednosti poslužile su za procjenu prinosa procesa sinteze te istraživanje antikancerogene aktivnosti čestica, međutim u svrhu dobivanja potpuno točnih rezultata potrebno ih je provjeriti točnijim analitičkim postupcima (npr. pomoću atomske apsorpcijske spektrometrije, induktivno spregnute plazma emisijske spektrometrije i slično).

Dobivene vrijednosti prikazane su na Slici 7, a kretale su se između 48,5 i 122,2 ppm. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se prinosi sintetskih procesa statistički značajno razlikuju te ovise i o vrsti korištenog sredstva za stabilizaciju (PVP ili PS) i o prisutnosti EKM u reakcijskoj smjesi.

Može se vidjeti kako su najveće koncentracije postignute u uzorcima u kojima je PVP korišten kao stabilizirajući agens, a koncentracija SeNP je manja u funkcionaliziranim uzorcima u odnosu na one koji nisu funkcionalizirani sa ekstraktom komine masline što ukazuje na značajan utjecaj sastava reakcijske smjese na prinos postupka sinteze. Sličan značajan utjecaj sastava reakcijske smjese na prinos postupka sinteze uočen je i u istraživanju primjene pektina u zelenoj sintezi nanoselena (Tesla, 2022).

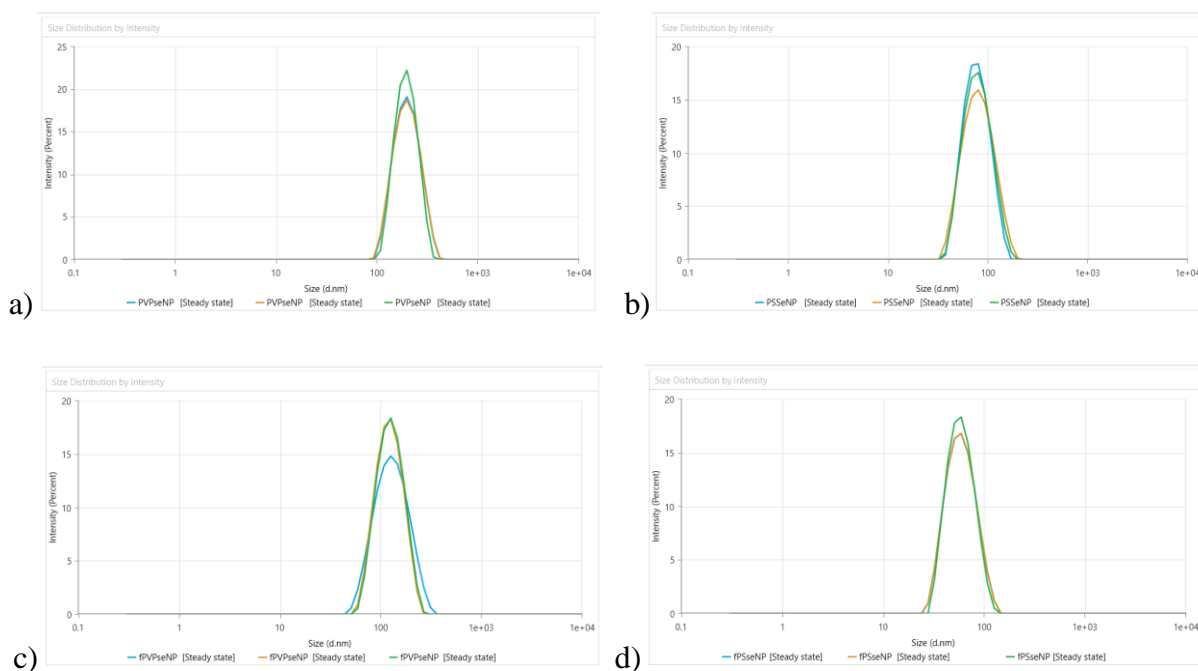


**Slika 7.** Koncentracije SeNP u analiziranim uzorcima.

*\*PVPSeNP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSeNP-uzorak stabiliziran polisorbitom; fPVPSeNP-uzorak stabiliziran PVP-om i funkcionaliziran ekstraktom komine masline; fPSSeNP- uzorak stabiliziran polisorbitom i funkcionaliziran ekstraktom komine masline. Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ; prema ANOVA i post-hoc Tukey testu)*

## 4.2. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA I ZETA POTENCIJAL

Rezultati raspona veličina nanočestica selena po intenzitetu su prikazani na Slici 8 (a-d).



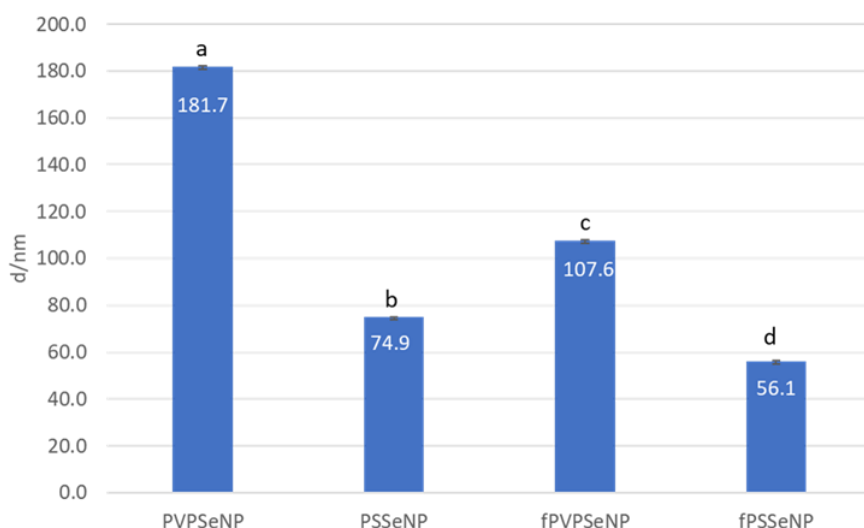
**Slika 8.** Raspodjela veličine čestica nanoselena po intenzitetu za PVPSeNP uzorak (a); PSSeNP uzorak (b); fPVPSeNP uzorak (c); fPSSeNP uzorak (d).

*\*PVPSeNP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSeNP-uzorak stabiliziran polisorbitom; fPVPSeNP-uzorak stabiliziran PVP-om i funkcionaliziran ekstraktom komine masline; fPSSeNP- uzorak stabiliziran polisorbitom i funkcionaliziran ekstraktom komine masline.*

Iz dijagrama raspodjele veličine čestica nanoselena po intenzitetu vidljivo je da su u uzorku PVPSenP prisutne čestice raspona veličine 100-400 nm, u uzorku PSSenP 30-200 nm, u uzorku fPVPSenP 50-300 nm, a u uzorku fPSSenP 30-150 nm. U svim uzorcima raspodjela veličine čestica je bila unimodalna s niskim indeksima polidisperznosti što ukazuje na homogenost dobivenih sustava te upućuje na to da se predloženi postupci sinteze nanočestica selena te metoda čišćenja uzoraka dijalizom mogu smatrati uspješnima i primjenjivima.

Prosječni promjeri dobivenih nanočestica prikazani na Slici 9 međusobno su se značajno razlikovali ( $p < 0,05$ ) i kretali su se od 56,1 nm (fPSSenP) do 181,7 nm (PVPSenP). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da veličina nanočestica ovisi o korištenom stabilizacijskom sredstvu (PVP ili PS) pri čemu se značajno veće čestice dobivaju primjenom PVP-a. Funkcionalizacija dodatkom ekstrakta komine masline značajno smanjuje promjer nastalih nanočestica. Navedena opažanja su u suprotnosti sa dostupnim sličnim istraživanjem, gdje je funkcionalizacija selenovih nanočestica EKM-om dovela do malog, ali statistički značajnog povećanja prosječnog promjera (Tesla, 2022). U navedenom istraživanju kao sredstvo za stabilizaciju korišteni su pektini izolirani iz komine rajčice i mandarine. Iz navedenog se može zaključiti da učinak dodatka biljnih ekstrakata u reakcijsku smjesu značajno utječe na veličinu dobivenih nanočestica, ali konkretni učinci značajno variraju ovisno o specifičnim interakcijama polifenola i ostalih komponenata reakcijske smjese (primjerice stabilizacijskog sredstva).

Prosječne veličine nanočestica usporedive su sa vrijednostima o kojima izvještavaju drugi autori. Primjerice, Sharma i sur., (2014) su sintetizirali SeNP veličine 3-18 nm funkcionalizacijom sa ekstraktom sjemenki grožđa (*Vitis vinifera*), dok su Vyas i Rana, (2017) dobili SeNP veličine 7-48 nm funkcionalizacijom sa ekstraktom aloe vere (*Aloe vera*).



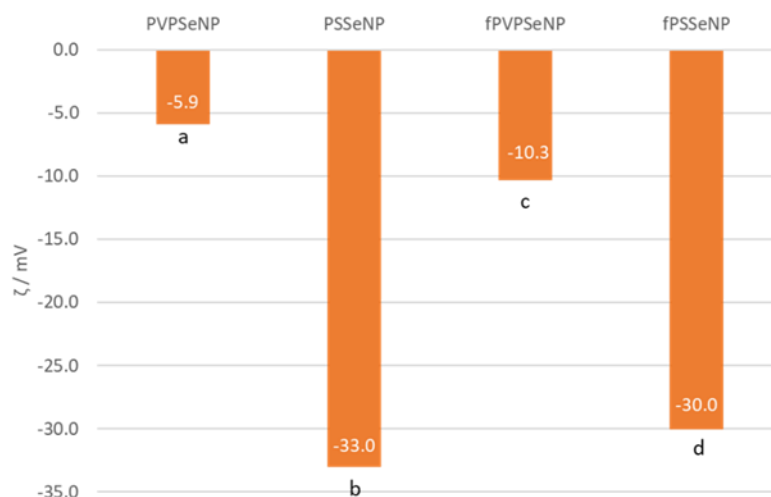
**Slika 9.** Prosječni promjer nanočestica selena u analiziranim uzorcima.

*\*PVPSeNP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSeNP-uzorak stabiliziran polisorbatom; fPVPSeNP-uzorak stabiliziran PVP-om i stabiliziran ekstraktom komine masline; fPSSeNP- uzorak stabiliziran polisorbatom i stabiliziran ekstraktom komine masline. Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ; prema ANOVA i post-hoc Tukey testu).*

Dobivene vrijednosti (osim PVPSeNP) možemo smatrati pogodnima ukoliko planiramo razvoj nutraceutika na bazi SeNP s obzirom na činjenicu da se nanočestice promjera manjeg od 100 nm smatraju dobro biorasploživima nakon oralne primjene zbog lakšeg prolaska kroz mukus te učinkovitijeg transmembranskog transporta (Wang i sur. 2020).

Ipak, u kontekstu primjene SeNP kao nutraceutika smanjenje srednjeg promjera prema još manjim vrijednostima (<50 nm) nije poželjno. Naime, brojna istraživanja pokazuju da toksičnost nanočestica raste sa smanjenjem njihovog promjera. Razlog veće toksičnosti malih SeNP je zbog većeg broja čestica po jedinici mase i njihove veće površine koja pokazuje veću reaktivnost te dovodi do pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta. (Sukhanova i sur., 2018). S obzirom da želimo postići dobru oralnu biodostupnost, ali ne i veću toksičnost (koja je prisutna kod nanočestica manjih od 50 nm) težimo sintezi nanočestica većih od 50 nm, što smo našim pokusom i postigli.

Zeta potencijal istraživanih nanočestica prikazan je na Slici 10. Iz prikazanih podataka vidljivo je da i stabilizacijsko sredstvo i funkcionalizacija EKM-om značajno utječu na vrijednosti zeta potencijala. SeNP stabilizirane PVP-om imaju mali negativni zeta potencijal (-5,9 i -10,3 mV), dok su SeNP stabilizirane PS-om puno negativnije nabijene (-33 i -30 mV).



**Slika 10.** Prosječni zeta potencijal analiziranih uzoraka.

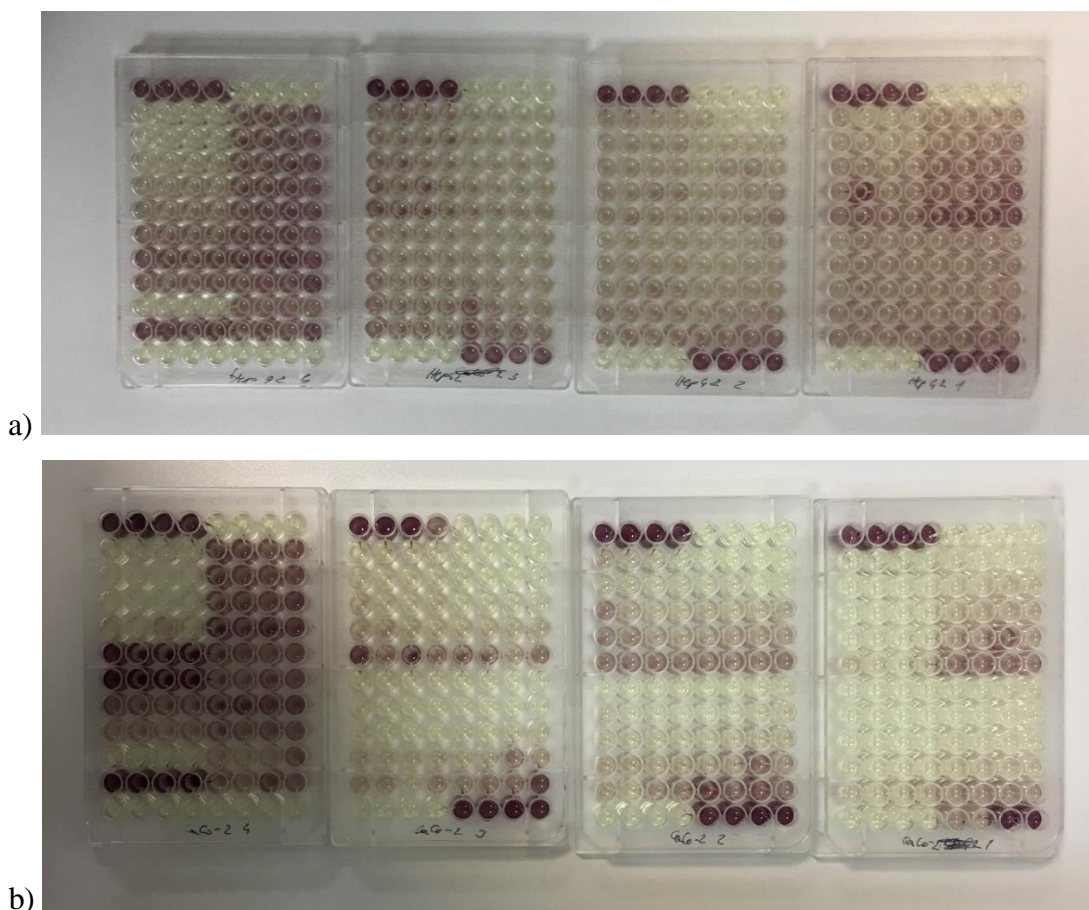
*\*PVPSenP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSenP-uzorak stabiliziran polisorbatom; fPVPSenP-uzorak stabiliziran PVP-om i stabiliziran ekstraktom komine masline; fPSSenP- uzorak stabiliziran polisorbatom i stabiliziran ekstraktom komine masline. Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ; prema ANOVA i post-hoc Tukey testu).*

Funkcionalizacija EKM-om značajno je smanjila zeta potencijal nanočestica stabiliziranih PVP-om, a malo, ali statistički značajno, povećala zeta potencijal nanočestica stabiliziranih PS-om. Iz navedenog se može zaključiti da adsorpcija polifenola na površinu SeNP ovisi o primijenjenom stabilizacijskom sredstvu. PVP, kao nenabijeni sterički stabilizator, postaje negativniji nakon adsorpcije polifenola iz EKM na površinu nanočestice. Kod nanočestica stabiliziranih PS-om taj učinak nije vidljiv (s obzirom na prisutnost negativno nabijenih skupina na samom PS-u).

Zeta potencijal je parametar koji ukazuje na stabilnost nanočestica, važnu značajku za njihovu primjenu u različitim područjima. Veća apsolutna vrijednost zeta potencijala je uglavnom indikator i veće stabilnosti (zbog međusobnog odbijanja nanočestica u sustavu čime se sprečava agregacija i taloženje). S obzirom na navedeno nanočestice stabilizirane sa PS možemo smatrati stabilnijima od onih stabiliziranih PVP-om. Ipak važno je napomenuti da apsolutna vrijednost zeta potencijala ne mora nužno značiti i manju stabilnost takvog pripravka jer nanočestice se mogu stabilizirati i poticanjem steričkih interakcija (što je i slučaj s PVP-om kao stabilizacijskim agensom) (Bhattacharjee, 2016).

### 4.3. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI UZORAKA

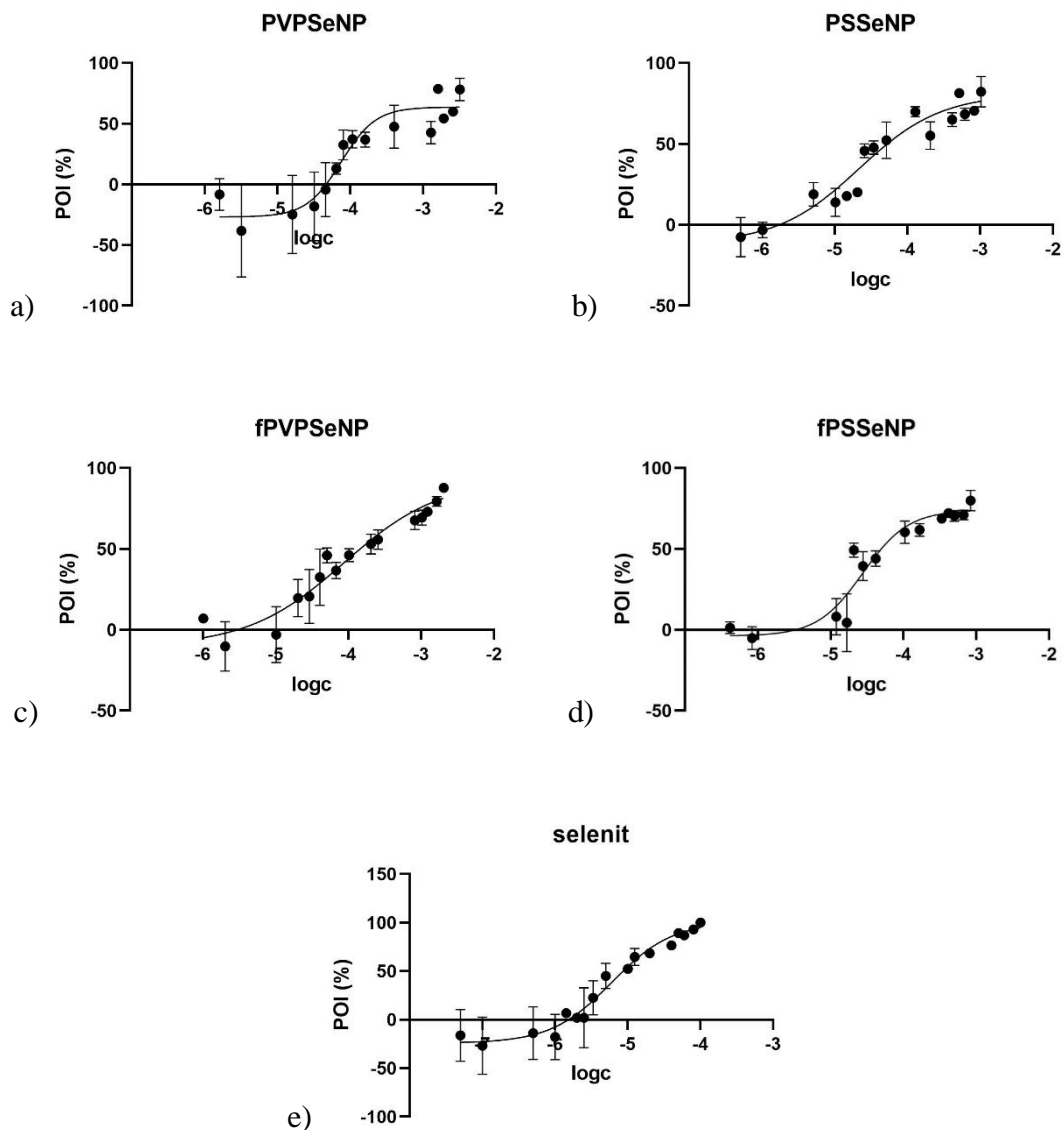
Na Slici 11 prikazane su mikrotitarske ploče nasadene HepG2 i Caco-2 staničnim linijama, dodanim uzorcima nanoselena i MTT reagensom.



**Slika 11.** Mikrotitarske ploče sa staničnim linijama HepG2 (a) i Caco-2 (b), uzorcima nanoselena i dodanim MTT reagensom.

Što je bila veća količina nastalog formazanskog produkta u jažici, to je bila izmjerena veća apsorbanacija. To znači da je u takvim jažicama više preživjelih stanica koje mogu svojim metabolizmom prevesti MTT reagens u formazanski produkt. Tako su jažice koje su predstavljale pozitivnu kontrolu bile bez boje, a one koje su predstavljale negativnu kontrolu bile su tamno obojene.

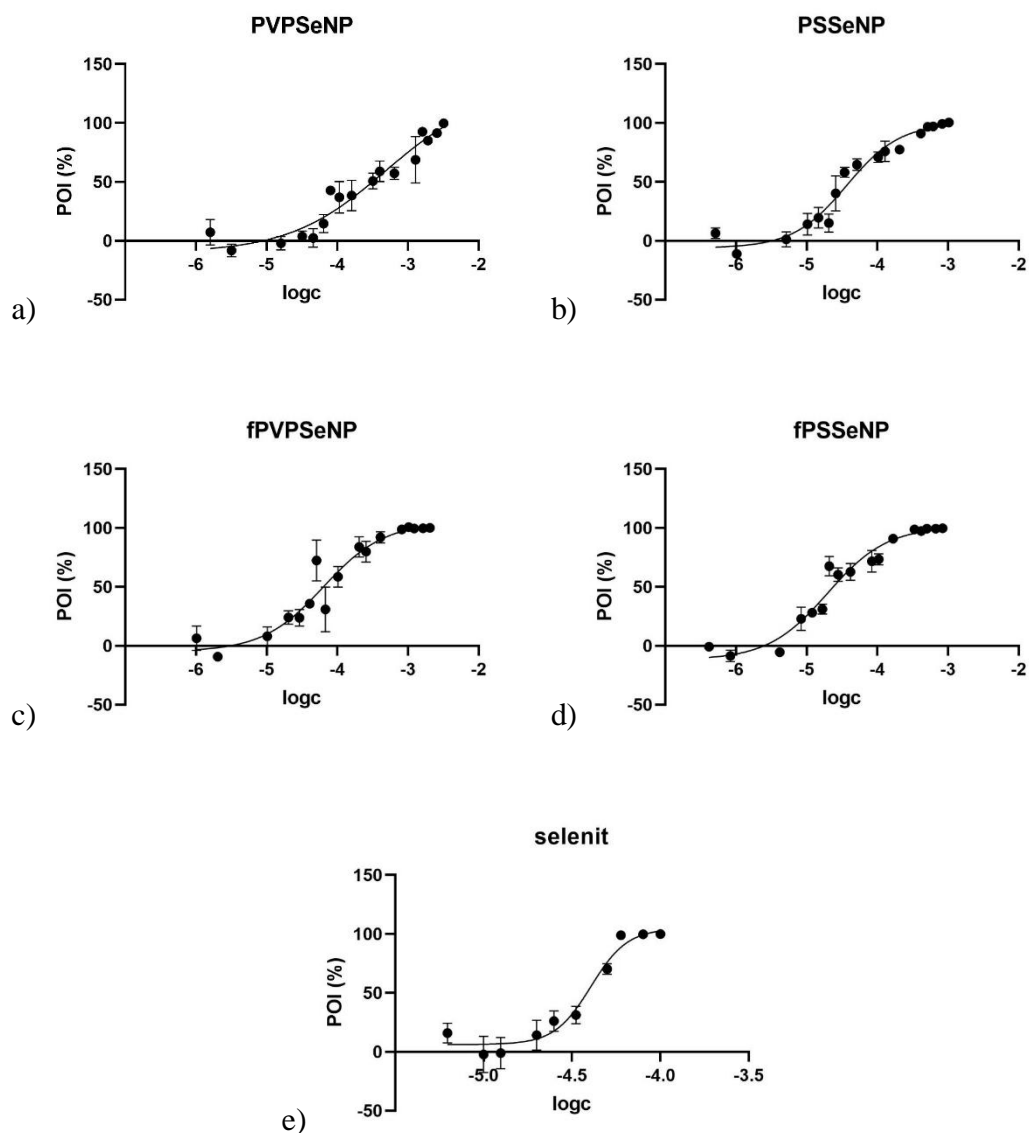
Slika 12 prikazuje ovisnost *POI* vrijednosti HepG2 stanične linije o *log<sub>c</sub>* vrijednosti uzorka. Dobivena je krivulja nelinearne regresije koja prikazuje pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije nanoselena, to jest, natrijevog selenita.



**Slika 12.** Ovisnost  $POI$  vrijednosti o  $\log c$  vrijednosti PVPSenP uzorka (a); PSSenP uzorka (b); fPVPSenP uzorka (c); fPSSenP uzorka (d); uzorka sa selenitom (e) na HepG2 staničnoj liniji.

\*PVPSenP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSenP-uzorak stabiliziran polisorbitom; fPVPSenP-uzorak stabiliziran PVP-om i stabiliziran ekstraktom komine masline; fPSSenP- uzorak stabiliziran polisorbitom i stabiliziran ekstraktom komine masline.

Slika 13 prikazuje ovisnost  $POI$  vrijednosti Caco-2 stanične linije o  $\log c$  vrijednosti uzorka. Dobivena je krivulja nelinearne regresije koja prikazuje pad vijabilnosti stanica s povećanjem koncentracije nanoselena, to jest, natrijevog selenita.

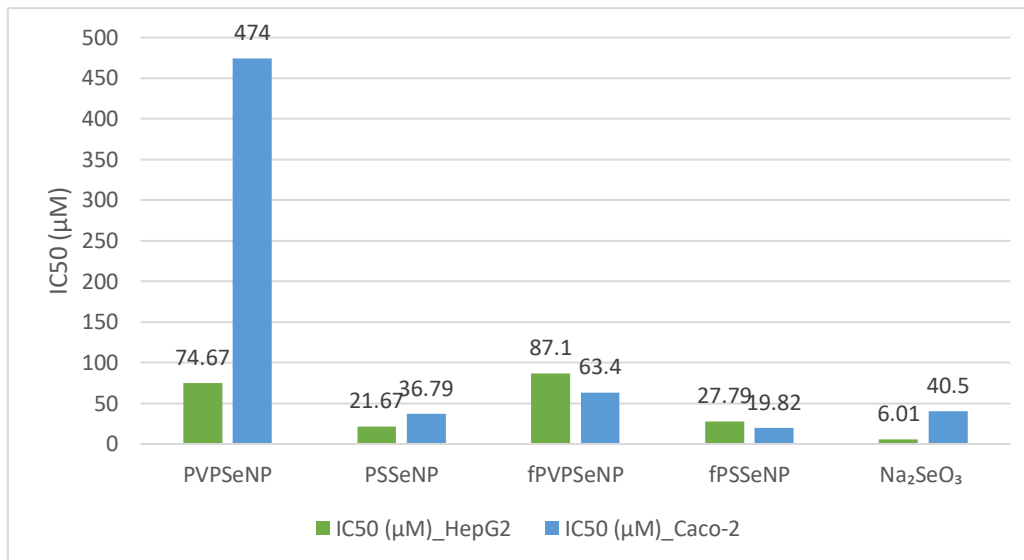


**Slika 13.** Ovisnost *POI* vrijednosti o *logc* vrijednosti PVPSenP uzorka (a); PSSenP uzorka (b); fPVPSenP uzorka (c); fPSSenP uzorka (d); uzorka sa selenitom (e) na Caco-2 staničnoj liniji.

\*PVPSenP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSenP-uzorak stabiliziran polisorbitom; fPVPSenP-uzorak stabiliziran PVP-om i stabiliziran ekstraktom komine masline; fPSSenP- uzorak stabiliziran polisorbitom i stabiliziran ekstraktom komine masline.

Pomoću prikazanih ovisnosti *POI* vrijednosti o *logc* vrijednosti uzorka dobivene su *IC50* vrijednosti za pojedine uzorke, koje su prikazane na Slici 14.





**Slika 14.** Citotoksičnost natrijevog selenita i različitih uzoraka nanoselena na HepG2 i Caco-2 staničnim linijama iskazana pomoću  $IC_{50}$  vrijednosti.

\*PVPSenP- uzorak stabiliziran PVP-om; PSSenP-uzorak stabiliziran polisorbatom; fPVPSenP-uzorak stabiliziran PVP-om i funkcionaliziran ekstraktom komine masline; fPSSenP- uzorak stabiliziran polisorbatom i funkcionaliziran ekstraktom komine masline.

Što je  $IC_{50}$  vrijednost nekog uzorka manja to je taj uzorak toksičniji za određenu staničnu liniju. Glavni zaključak ovog istraživanja je da su istraživani nanosustavi manje toksični za HepG2 staničnu liniju od natrijevog selenita što je u skladu sa istraživanjima ostalih autora (Hosnedlova, 2018). Ipak rezultati na Caco-2 staničnoj liniji su drugačiji; tu su najveću toksičnost pokazale SeNP stabilizirane sa PS-om. Iz prikaza dobivenih rezultata (Slika 14) vidljivo je da su HepG2 stanice uglavnom osjetljivije na učinke SeNP od Caco-2 stanica. Navedeno je u skladu s istraživanjima Sahu i sur., (2014) koji su na Caco2 i HepG2 staničnim linijama istraživali toksičnost SeNP.

Iz dobivenih  $IC_{50}$  vrijednosti možemo vidjeti kako su one manje za uzorke stabilizirane polisorbatom, svejedno radi li se o funkcionaliziranom ili nefunkcionaliziranom uzorku što ukazuje na veći toksični učinak odnosno jaču antikancerogenu aktivnost. Navedeno se može objasniti manjim srednjim promjerom SeNP stabiliziranih sa PS što doprinosi njihovoj većoj toksičnosti naspram ispitivanih staničnih linija (Sukhanova i sur., 2018). Sama funkcionalizacija uzorka SeNP s ekstraktom komine masline uzrokovala je manjom toksičnošću za HepG2 staničnu liniju, to jest većom toksičnošću za Caco-2 staničnu liniju. Na nefunkcionalizirane uzorke je više osjetljiva HepG2 stanična linija, dok je na funkcionalizirane uzorke više osjetljiva Caco-2 stanična linija. Navedeni rezultati upućuju na različit mehanizam toksičnosti SeNP kod jedne i kod druge stanične kulture. Navedeno je u skladu sa rezultatima

istraživanja toksičnosti nanočestica srebra gdje autori zaključuju da je mehanizam citotoksičnosti drugačiji za Caco-2 odnosno HepG2 staničnu liniju (Sahu i sur., 2014). S obzirom da polifenoli iz EKM pokazuju izrazit antioksidativni učinak na staničnim modelima (Radić i sur., 2020) može se pretpostaviti da je citotoksični učinak SeNP na HepG2 staničnim linijama barem dijelom uzrokovan poticanjem intracelularnog oksidativnog stresa, kojeg onda polifenoli adsorbirani na površinu funkcionaliziranih nanočestica smanjuju što rezultira manjim toksičnim učinkom takvih funkcionaliziranih nanočestica. S druge strane, funkcionalizacija SeNP pojačala je toksičnost naspram Caco-2 stanica što ukazuje na sinergistički antikancerogeni učinak EKM i SeNP na stanice karcinoma kolona.

## 5. ZAKLJUČCI

- prinos predloženih postupaka zelene sinteze SeNP značajno varira s obzirom na vrstu korištenog stabilizacijskog sredstva i prisutnost EKM u reakcijskoj smjesi
- postupcima zelene sinteze SeNP dobivena je unimodalna raspodjela veličine čestica što ukazuje na homogenost dobivenih sustava; prosječni promjeri dobivenih nanočestica kretali su se od 56.1 nm (fPSSeNP) do 181.7 nm (PVPSeNP) što te sustave čini osobito prikladnima za peroralnu primjenu
- vrsta stabilizacijskog sredstva i funkcionalizacija EKM-om značajno utječu na vrijednosti zeta potencijala; SeNP stabilizirane PVP-om imaju malu apsolutnu vrijednost zeta potencijala (-5,9 i -10,3 mV), dok su SeNP stabilizirane PS-om karakterizirane puno negativnijim nabojem (-33 i -30 mV); navedeni rezultati mogu ukazivati na veću stabilnost nanočestica stabiliziranih PS-om
- istraživani nanosustavi manje su toksični za HepG2 stanične kulture od natrijevog selenita; rezultati na Caco-2 staničnoj liniji su drugačiji - tu su najveću toksičnost pokazale SeNP stabilizirane PS-om; navedeni rezultati ukazuju na različite mehanizme toksičnosti SeNP na različitim staničnim linijama
- nanočestice stabilizirane PS-om pokazale su veću toksičnost što, između ostalog, može biti posljedica njihovog značajno manjeg srednjeg promjera
- funkcionalizacija SeNP EKM-om reducirala je toksičnost SeNP na HepG2 staničnoj liniji dok takav učinak nije primijećen na Caco-2 stanicama; navedeno ukazuje na različit mehanizam toksičnosti SeNP na dva istraživana tipa staničnih kultura; s obzirom

na pokazan protektivni učinak EKM i njegov snažan antioksidativni učinak, može se pretpostaviti da je toksičnost SeNP na HepG2 staničnim linijama barem dijelom uzrokovana izazivanjem intracelularnog oksidativnog stresa

- funkcionalizacija SeNP EKM-om pojačala je toksičnost naspram Caco-2 stanica što ukazuje na sinergistički antikancerogeni učinak EKM i SeNP na stanice karcinoma kolona

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

A	apsorbancija uzorka
$\bar{A}$	srednja vrijednost apsorbancije uzorka
AAS	atomska apsorpcijska spektroskopija
Ag <sub>2</sub> Se	naumanit
c	molarna koncentracija
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	askorbinska kiselina
Caco-2	stanice ljudskog karcinoma debelog crijeva
Cu <sub>2</sub> Se	bercelijanit
D	difuzijski koeficijent
DLS	metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
eIF3	eukariotski faktor inicijacije translacije
EKM	ekstrakt komine masline
EMEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
EPR	<i>enhanced permeability and retention effect</i>
FBS	fetalni goveđi serum
fPSSeNP	uzorak nanočestica selena stabiliziran sa polisorbitom 20 i funkcionaliziran s ekstraktom komine masline
fPVPSeNP	uzorak nanočestica selena stabiliziran sa polivinilpirolidonom i funkcionaliziran s ekstraktom komine masline
FTIR	infracrvena spektroskopija Fourierove transformacije

GST	glutation S-transferaza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	selenitna kiselina
HepG2	jetrene tumorske stanice
<i>I</i>	intenzitet izlaznog elektromagnetskog zračenja
<i>I</i> <sub>0</sub>	intenzitet ulaznog elektromagnetskog zračenja
<i>l</i>	duljina puta kroz uzorak
<i>k<sub>B</sub></i>	Boltzmannova konstanta
<i>logc</i>	logaritam koncentracije
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
milliQ-voda	ultračista voda
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
MWCO	<i>molecular weightcut-off</i>
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	natrijev selenit
PBS	fosfatni pufer bez kalcija i magnezija
PbSe	klaustalit
PEG	polietilen glikol
PLA	pulsna laserska ablacija
<i>POI</i>	<i>percentage of inhibition</i>
PS	polisorbat 20
PSSeNP	uzorak nanočestica selena stabiliziran sa polisorbatom 20
PVP	polivinilpirolidon
PVPSeNP	uzorak nanočestica selena stabiliziran sa polivinilpirolidonom
<i>R<sub>H</sub></i>	hidrodinamički polumjer
rT3	3,3',5'-trijodtironin
<i>SD</i>	standardna devijacija
Se <sup>0</sup>	elementarno stanje selena
Se <sup>2-</sup>	selenid
SeNP	nanočestice selena
SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	selenit
SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	selenat
<i>T</i>	temperatura
T3	3,3,5-trijodtironin
T4	tiroksin

tBOOH	tert-butil hidroperoksid
TEM	transmisijski elektronski mikroskop
UV	ultraljubičasti dio spektra
Vis	vidljivi dio spektra
WHO	svjetska zdravstvena organizacija
XRD	difrakcija rendgenskih zraka
$\varepsilon$	molarni apsorpcijski koeficijent
$\lambda$	valna duljina
$\eta$	apsolutna viskoznost
$\zeta$	zeta potencijal

## 7. LITERATURA

Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23), 13135.

Ben-Othman S, Jõudu I, Bhat R. Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules*, 2020, 25, 510.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, 2016, 235, 337-351.

Brlak T, Voća N, Krička T, Jurišić V. Komina masline kao izvor energije, *Glasnik Zaštite Bilja*, 2009, 32 (3), 13-18.

Garcia-Garcia G, Stone J, Rahimifard S. Opportunities for waste valorization in the food industry – A case study with four UK food manufacturers. *J. Clean. Prod*, 2018, 211, 1339–1356.

Goula AM, Lazarides HN. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *J. Food Eng.*, 2015, 167, 45–50.

Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, Baron M, Melcova M, Opatrilova R, Zidkova J, Bjørklund G, Sochor J, Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13, 2107-2128.

Kantoci D. Maslina. *Glasnik zaštite bilja*, 2006, 29 (6), 4-14.

Kieliszek M. Selenium-Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules*, 2019, 24 (7), 1298.

Kučić Grgić D, Gavran M, Miškić K, Škunca A, Očelić Bulatović V. Utjecaj komine masline na okoliš. *Kem. Ind.*, 2020, 69 (3-4), 153–162.

Lea T. Caco-2 Cell Line. U: The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., urednici, Cham (CH), Springer, 2015, str. 103-111.

Lin, ZH, Chris-Wang, CR. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* 2005, 92, 591–594.

Mahmoud AE, Fathy SA, Ali MM, Ezz MK, Mohammed AT. Antioxidant and anticancer efficacy of therapeutic bioactive compounds from fermented olive waste. *Grasas Y Aceites*, 2018, 69(3), e266.

Mellinas C, Jiménez A, Garrigós MDC. Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using Theobroma Cacao L. Bean Shell Extract. *Molecules*, 2019, 24 (22), 4048.

Mout R, Moyano DF, Rana S, Rotello VM. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev*, 2012, 41 (7), 2539-2544.

Quevedo AC, Guggenheim E, Briffa SM, et al. UV-Vis Spectroscopic Characterization of Nanomaterials in Aqueous Media. *J Vis Exp*, 2021, 176.

Picollo M, Aceto M, Vitorino T. UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, 2019, 4(4), 1-14.

Radić K, Vinković Vrček I, Pavičić I, Vitali Čepo D. Cellular Antioxidant Activity of Olive Pomace Extracts: Impact of Gastrointestinal Digestion and Cyclodextrin Encapsulation. *Molecules*, 2020, 25, 5027.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. U: *Assay Guidance Manual*. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanarayan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Sittampalam GS, Tarselli M, Trask OJ Jr, Wang Y, Weidner JR, Wildey MJ, Wilson K, Xia M, Xu X, urednici, Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

Sahu SC, Zheng J, Graham L, Chen L, Ihrle J, Yourick JJ, Sprando RL. Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture. *J Appl Toxicol*. 2014, 34, 1155-1166.

Sharma G, Sharma AR, Bhavesh R, Park J, Ganbold B, Nam JS, et al. Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried *Vitis vinifera* (raisin) extract. *Molecules*, 2014, 19, 2761–2770.

Skalickova S, Milosavljevic V, Cihalova K, Horoky P, Richtera L, Adam V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, 2017, 33, 83-90.

Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett*. 2018, 13, 44

Tesla L. Antikancerogena aktivnost nanočestica selena stabiliziranih pektinima rajčice i mandarine. [Diplomski rad], 2022

Torić J, Karković Marković A, Jakobušić Brala C, Barbarić M. Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs. *Acta Pharm*, 2019, 69(4), 461-482.

Vollmer T, Stegmayr B. Establishing Cell Models to Understand Cellular Toxicity: Lessons Learned from an Unconventional Cell Type. *Toxins (Basel)*. 2022, 14(1), 54.

Vyas J, Rana S. Antioxidant activity and biogenic synthesis of selenium nanoparticles using the leaf extract of Aloe vera. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2017, 9, 147-152.

Walton JR, Buckley IK. Cell models in the study of mechanisms of toxicity. *Agents Actions*. 1975, 5(1), 69-88.

Wang L, Nagesha DK, Selvarasah S, Dokmeci MR, Carrier RL. Toxicity of CdSe Nanoparticles in Caco-2 Cell Cultures. *J Nanobiotechnology*, 2008, 6, 11.

Wang Y, Pi C, Feng X, Hou Y, Zhao L, Wei Y. The Influence of Nanoparticle Properties on Oral Bioavailability of Drugs. *Int J Nanomedicine*. 2020, 15, 6295-6310.



## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovog rada bio je sintetizirati nanočestice selena (SeNP) procesom zelene sinteze uz dodatak ekstrakta komine masline (EKM) koji bi potencijalno sa selenom ostvario sinergistički antikancerogeni učinak. SeNP imaju sposobnost inhibicije rasta stanica raka, dok polifenoli EKM-a pokazuju širok spektar povoljnih bioloških učinaka uključujući i antikancerogeni učinak. Prinosi predloženih postupaka sinteze određeni su primjenom UV-Vis spektrofotometrije, a raspodjela veličine čestica i zeta potencijal metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti. Antikancerogeni učinak je ispitan na staničnim linijama ljudskog karcinoma debelog crijeva (Caco-2) i jetrenih tumorskih stanica (HepG2) pomoću MTT testa. Dobivena je unimodalna raspodjela veličine čestica, a prosječni promjeri dobivenih nanočestica kretali su se od 56,1 nm (za SeNP stabilizirane PS-om i funkcionalizirane s EKM-om (fPSSeNP)) do 181,7 nm (za SeNP stabilizirane PVP-om (PVPSeNP)) što te sustave čini osobito prikladnima za peroralnu primjenu. PVPSeNP uzorci imaju malu apsolutnu vrijednost zeta potencijala (-5,9 i -10,3 mV), dok su PSSeNP uzorci bili karakterizirani puno negativnijim nabojem (-33 i -30 mV) što može ukazivati na veću stabilnost PSSeNP uzoraka. Najveću toksičnost za HepG2 staničnu liniju pokazao je natrijev selenit, dok su za Caco-2 staničnu liniju PSSeNP uzorci bili najtoksičniji. Funkcionalizacija SeNP EKM-om reducirala je, odnosno pojačala toksičnost SeNP na HepG2, odnosno Caco-2 staničnoj liniji, što ukazuje na različite mehanizme toksičnosti SeNP na različitim staničnim linijama.

The aim of this study was to synthesize selenium nanoparticles (SeNP) by the process of green synthesis with the addition of olive pomace extract (OPE), which would potentially achieve a synergistic anticancer effect with selenium. SeNPs have the ability to inhibit the growth of cancer cells, while OPE polyphenols show wide spectrum of biological effects, including anticancer efficiency. Yields of proposed green synthesis processes were determined using UV-Vis spectrophotometry, and the particle size distribution and zeta potential were determined using the dynamic- and electrophoretic light scattering methods. The anticancer efficiency was tested on human colon cancer cell lines (Caco-2) and liver tumor cells (HepG2) using the MTT test. A unimodal particle size distribution was obtained, and the average diameters of the obtained nanoparticles ranged from 56.1 nm (for SeNP stabilized with PS and functionalized with OPE (fPSSeNP)) to 181.7 nm (for SeNP stabilized with PVP (PVPSeNP)) which makes these systems particularly suitable for oral administration. PVPSeNP samples have a small absolute value of zeta potential (-5.9 and -10.3 mV), while PSSeNP samples were much more negatively charged (-33 and -30 mV) which may indicate a higher stability of PSSeNP samples. Sodium selenite showed the highest toxicity for the HepG2 cell line, while for the Caco-2 cell line PSSeNP samples were the most toxic. Functionalization of SeNP with OPE reduced and increased the toxicity of SeNP on HepG2 and Caco-2 cell lines, respectively, which also indicates different mechanisms of SeNP toxicity in different cell lines.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ANTI-KANCEROGENA AKTIVNOST NANOČESTICA SELENA FUNKCIONALIZIRANIH EKSTRAKTOM KOMINE MASLINE

Ena Vrček

#### SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je sintetizirati nanočestice selena (SeNP) procesom zelene sinteze uz dodatak ekstrakta komine masline (EKM) koji bi potencijalno sa selenom ostvario sinergistički antikancerogeni učinak. SeNP imaju sposobnost inhibicije rasta stanica raka, dok polifenoli EKM-a pokazuju širok spektar povoljnih bioloških učinaka uključujući i antikancerogeni učinak. Prinosi predloženih postupaka sinteze određeni su primjenom UV-Vis spektrofotometrije, a raspodjela veličine čestica i zeta potencijal metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti. Antikancerogeni učinak je ispitan na staničnim linijama ljudskog karcinoma debelog crijeva (Caco-2) i jetrenih tumorskih stanica (HepG2) pomoću MTT testa. Dobivena je unimodalna raspodjela veličine čestica, a prosječni promjeri dobivenih nanočestica kretali su se od 56,1 nm (za SeNP stabilizirane PS-om i funkcionalizirane s EKM-om (fPSSeNP)) do 181,7 nm (za SeNP stabilizirane PVP-om (PVPSeNP)) što te sustave čini osobito prikladnima za peroralnu primjenu. PVPSeNP uzorci imaju malu apsolutnu vrijednost zeta potencijala (-5,9 i -10,3 mV), dok su PSSeNP uzorci bili karakterizirani puno negativnijim nabojem (-33 i -30 mV) što može ukazivati na veću stabilnost PSSeNP uzoraka. Najveću toksičnost za HepG2 staničnu liniju pokazao je natrijev selenit, dok su za Caco-2 staničnu liniju PSSeNP uzorci bili najtoksičniji. Funkcionalizacija SeNP EKM-om reducirala je, odnosno pojačala toksičnost SeNP na HepG2, odnosno Caco-2 staničnoj liniji, što ukazuje na različite mehanizme toksičnosti SeNP na različitim staničnim linijama.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 14 grafičkih prikaza, 3 tablice i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sinteza nanočestica, polivinilpirolidon, polisorbata 20, biološki otpad, Caco-2 stanice, HepG2 stanice

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

**Dr. sc. Petra Turčić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Kristina Radić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Food Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ANTICANCERGENIC ACTIVITY OF SELENIUM NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED BY OLIVE EXTRACT

Ena Vrček

#### SUMMARY

The aim of this study was to synthesize selenium nanoparticles (SeNP) by the process of green synthesis with the addition of olive pomace extract (OPE), which would potentially achieve a synergistic anticancer effect with selenium. SeNPs have the ability to inhibit the growth of cancer cells, while OPE polyphenols show wide spectrum of biological effects, including anti-cancer efficiency. Yields of proposed green synthesis processes were determined using UV-Vis spectrophotometry, and the particle size distribution and zeta potential were determined using the dynamic- and electrophoretic light scattering methods. The anticancer efficiency was tested on human colon cancer cell lines (Caco-2) and liver tumor cells (HepG2) using the MTT test. A unimodal particle size distribution was obtained, and the average diameters of the obtained nanoparticles ranged from 56.1 nm (for SeNP stabilized with PS and functionalized with OPE (fPSSeNP)) to 181.7 nm (for SeNP stabilized with PVP (PVPSeNP)) which makes these systems particularly suitable for oral administration. PVPSeNP samples have a small absolute value of zeta potential (-5.9 and -10.3 mV), while PSSeNP samples were much more negatively charged (-33 and -30 mV) which may indicate a higher stability of PSSeNP samples. Sodium selenite showed the highest toxicity for the HepG2 cell line, while for the Caco-2 cell line PSSeNP samples were the most toxic. Functionalization of SeNP with OPE reduced and increased the toxicity of SeNP on HepG2 and Caco-2 cell lines, respectively, which also indicates different mechanisms of SeNP toxicity in different cell lines.

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

Thesis includes: 45 pages, 14 figures, 3 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanoparticle synthesis, polyvinylpyrrolidone, polysorbate 20, biological waste, Caco-2 cells, HepG2 cells

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Petra Turčić, Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Radić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.