

# Antioksidativna aktivnost ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih nanočesticama selena

---

Mlinar, Jakov

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:201671>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

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



**Jakov Mlinar**

**Antioksidativna aktivnost ekstrakata rukole i  
špinata biofortificiranih nanočesticama selena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za prehranu i dijetoterapiju pod stručnim vodstvom dr.sc. Emerika Galića.

*Zahvaljujem se svojem mentoru dr.sc. Emeriku Galiću na vremenu, trudu i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada te na dugogodišnjem mentoriranju i suradnji u labosu. Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za prehranu i dijetoterapiju na pomoći i ugodnoj atmosferi prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, sestri Hanji, bratu Janku, i djevojci Antei na beskompromisnoj podršci tijekom studija.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Selen .....	1
1.1.1. Se u tlu.....	2
1.1.2. Uloga Se u biljkama .....	4
1.1.3. Metabolizam Se i uloga u ljudskom zdravlju .....	5
1.1.4. Biofortifikacija biljaka selenom .....	11
1.2. Nanočestice selena (SeNPs) .....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	16
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Kemikalije i pribor .....	16
3.1.2. Radni instrumenti i oprema .....	17
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprema suhih ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih nanočesticama selena (SeNPs) .....	18
3.2.2. Određivanje antiradikalnog učinka TEAC metodom .....	18
3.2.3. Određivanje ukupnog antioksidacijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom.....	21
3.2.4. Određivanje biokompatibilnosti na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2).....	23
3.2.5. Određivanje antioksidativnog učinka na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2).....	24
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	26
4.1. Antiradikalni učinak određen TEAC metodom.....	26
4.2. Ukupni reduktivni potencijal određen Folin-Ciocalteu metodom .....	28
4.3. Biokompatibilnost određena na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) .....	30
4.4. Antioksidativni učinak određen na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2).....	32
5. ZAKLJUČCI .....	36
6. POPIS KRATICA, TABLICA I SLIKA .....	37
7. LITERATURA .....	40
8. SAŽETAK.....	45

# 1. UVOD

## 1.1. Selen

Selen (Se) je nemetal atomskog broja 34 te se nalazi u šesnaestoj, halkogenoj, skupini periodnog sustava elemenata. Nalazimo ga u 4 prirodna oksidacijska stanja: elementarni Se (0), selenid (-2), selenit (+4) i selenat (+6). Elementarni Se može postojati u 3 alotropske modifikacije: sivi heksagonalni oblik, crveni monoklinski oblik, te amorfni oblik koji može doći u crnim ili crvenim formama. U obliku selenida može se pronaći u anorganskim te organskim spojevima od posebnog biološkog značaja kao što su selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) budući da izgrađuju selenoproteine (Barceloux, 1999). Od ostalih organskih oblika selena valja spomenuti i dimetilselenid (DMSe) i dimetildiselenid (DMDS<sub>e</sub>) koji se mogu pronaći u biljkama i životinjama. Anorganski oblici selenit i selenat dominantni su oblici Se u vodi i tlu (Fordyce, 2007).

Se u prirodi najvećim dijelom nalazimo u zemlji i rudama, no prisutan je i u vodi i u zraku kao posljedica izgaranja fosilnih goriva, vulkanske aktivnosti i isparavanja s površina životinja i biljaka. U površinske vode Se dolazi taloženjem iz atmosfere, pripajanjem tekućica koje sadrže Se, površinskim otjecanjem ili podzemnom drenažom. Obradom otpadnih voda također može doći do otpuštanja Se u vodu. Koncentracije Se u površinskim i podzemnim vodama variraju od 0,06 µg/L do 400 µg/L, dok je njegova koncentracija u morskoj vodi relativno niska (0,04-0,12 µg/L) (Barceloux, 1999).

Se je esencijalni mikronutrijent za ljude i životinje. Uzak raspon između nedovoljnog (<40 µg/dan) i prekomjernog (>400 µg/dan) unosa naglašava potrebu za pažljivom kontrolom unosa Se u organizam (Barceloux, 1999; Fordyce 2013). Za opće stanovništvo primarni način unosa Se u organizam je prehranom, nakon čega slijedi unos vodom i zrakom. Se se prehranom unosi primarno biljnom prehranom (kruh, žitarice), dok su meso, riba, jaja i mliječni proizvodi također dobri izvori Se (Kieliszek i Błazejak, 2013). Adekvatan unos Se nužan je za održavanje normalnih fizioloških funkcija koje se ispoljavaju djelovanjem selenoproteina. Do sada je u ljudskom genomu identificirano 25 gena za selenoproteine koji svi sadrže aminokiselinu SeCys. SeMet se pri translaciji proteina ugrađuje nasumično umjesto metionina (Kurokawa i Berry, 2013). Selenoproteini u čovjeka odgovorni su za niz bioloških funkcija poput antioksidativne

obrane, sinteze tiroidnih hormona, sinteze DNA, te imaju važnu ulogu u fiziologiji plodnosti i reprodukcije. (Kurokawa i Berry, 2013)

### **1.1.1. Se u tlu**

Biljke apsorbiraju Se iz tla te su odgovorne za njegovu primarnu akumulaciju u hranidbenom lancu. Toksičnost uzrokovana prekomjernim unosom Se pojavljuje se lokalno u područjima s izrazito visokim koncentracijama Se u tlu poput dijelova Walesa, Irske, jugozapadne Kine, Meksika, savezne države Kalifornije u SAD-u te dijelova Južne Amerike (Kaur i sur., 2014). Prekomjernim unosom Se pojavljuju se karakteristični znakovi i simptomi poput gubitka kose, lezija na koži i noktima, hipotenzije, tahikardije, grčeva u mišićima, anemije itd. (Kieliszek, 2019). Međutim, veći problem predstavlja njegov nedovoljan unos čime je zahvaćena oko 1 milijarda ljudi diljem svijeta. Tlo siromašno selenom te samim time i njegov smanjen unos zabilježen je u brojnim državama diljem Azije, Južne Amerike, Afrike i Europe među kojima je i Hrvatska (Galić i sur., 2023).

Za predviđanje koncentracije Se na nekom području često se koriste prediktivni modeli koji pokazuju da rasprostranjenost Se u tlu ovisi o nizu čimbenika poput topografije tla, matičnog supstrata i klime na tom području. U većini slučajeva postoji vrlo jaka korelacija između koncentracije Se u matičnom supstratu i koncentracije Se u tlu. Bioraspoloživost Se iz tla označava stopu apsorpcije Se od strane biljaka. Ono ovisi o nizu bioloških, fizičkih i kemijskih parametara poput pH, redoks uvjeta, kemijskog oblika Se, teksture i mineralogije tla, sadržaja organske tvari te prisustva mikroorganizama i iona (Galić i sur., 2023). Ukoliko Se nije u bioraspoloživom obliku, čak i na tlima sa zadovoljavajućom koncentracijom Se, neće doći do zadovoljavajuće apsorpcije od strane biljaka. Razumijevanje ovih čimbenika ključno je za predviđanje, sprječavanje i liječenje zdravstvenih rizika nastalih smanjenim ili prekomjernim unosom Se.

Selenit (+4) i selenat (+6) dominantni su anorganski oblici Se u tlu. Selenit se adsorbira na čestice tla s većim afinitetom od selenata te je njegova adsorpcija jača što je pH niži. Osim toga, u kiselom i neutralnom tlu selenit tvori teško topljive spojeve sa željezovim oksidom i željezovim oksihidroksidom. Slaba topljivost skupa s jakom adsorpcijom na čestice tla čini selenit slabije bioraspoloživim od selenata koji je uglavnom topljiv, mobilan te ga biljke lako apsorbiraju u neutralnim ili lužnatim uvjetima (Fordyce, 2007). Uz to, pokazano je da biljke

značajno bolje apsorbiraju Se u obliku selenata u usporedbi sa selenitom. Elementarni selen (0) i selenidi (-2) uglavnom se nalaze u reducirajućem i kiselom okolišu uz prisustvo organskih tvari i kao takvi su uglavnom slabo raspoloživi biljkama za apsorpciju (Fordyce, 2007). No, oksidacija i redukcija Se često su posljedica djelovanja mikroorganizama, što također utječe na njegovu biodostupnost. Poznato je da bakterija *Bacillus megaterium* oksidira elementarni Se do selenita (Fordyce, 2013),

Osim oksidacijskog stanja Se, na mobilnost Se utječu i ostala svojstva tla. Na primjer, bioraspoloživost Se negativno korelira sa sadržajem gline zbog pojačane adsorpcije Se na sitne čestice pa tako biljke dvostruko bolje apsorbiraju Se iz pjeskovitog tla nego iz ilovače ili glinenog tla. Željezo je također jedan od čimbenika koji utječe na bioraspoloživost Se. Osim već spomenutog stvaranja kompleksa s mineralima željeza, Se se može i adsorbirati na čestice željezovog oksida i to u jačoj mjeri nego što se adsorbira na minerale gline. Adsorpcija Se na čestice željezovog oksida i minerale gline je najpotentnija u rasponu pH od 3-5 te je adsorpcija slabija što je pH viši (Fordyce 2013). Organske tvari također mogu oslabiti biljni unos Se. Smatra se da organometalni spojevi fiksiraju Se i tako ga čine nedostupnim biljkama. Primjerice, unos Se u biljke na tlu bogatom organskim tvarima može biti i do nekoliko puta manji nego na mineralnim tlima. Ioni poput  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  mogu utjecati na stopu apsorpcije Se iz tla na dva načina. Mogu zauzimati vezna mjesta kojima se Se apsorbira u biljku, kao i adsorpcijska mjesta na česticama tla (Fordyce 2013). Na ova dva načina  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  mogu poboljšati, ali i smanjiti apsorpciju Se u biljke. (Fordyce 2013).

Sadržaj Se u biljkama uveliko varira ovisno o sadržaju Se u tlu. U regijama u kojima je sadržaj Se u tlu nizak, natrijev selenat se dodaje gnojivima kao i životinjskoj hrani. Žitarice, koje su jedan od primarnih izvora Se za čovjeka, sadržavaju SeMet kao veći dio (55%) ukupnog bioraspoloživog oblika Se. SeCys i anorganski oblici također se mogu detektirati u značajnim količinama u biljkama poput pšenice (20% od ukupnog bioraspoloživog Se). Voće i povrće uglavnom sadrže manje količine Se, no povrće koje raste na tlu bogatom selenom može akumulirati veće količine Se u obliku SeMet, MeSeCys i  $\gamma$ -glutamil-metilselenocistein (Kurokawa i Berry, 2013). Primjeri takvog povrća su luk, poriluk, češnjak, brokula.

### 1.1.2. Uloga Se u biljkama

Unatoč tome što Se nije esencijalan element za biljke, poznato je da ispoljava razne pozitivne učinke, prije svega na rast biljaka i njihov antioksidativni status. Koncentracije Se u različitim dijelovima biljaka određene su apsorpcijom Se iz tla kao i njegovom translokacijom iz korijena u ostale biljne organe (Jones i Winkel, 2017). Zbog svoje sličnosti sa sumporom, Se u obliku selenata transportira se kroz biljku pomoću sulfatnog transportnog sistema. Nakon ulaska u stanicu biljke, Se se može uključiti u metaboličke putove sumpora i tako se inkorporirati u aminokiseline SeCys i SeMet. Pokazano je da enzimi uključeni u ovaj proces određuju količinu apsorbiranog Se, otpornost biljke na toksičnost Se kao i na razinu akumulacije Se (Guignardi i Schiavon, 2017).

U visokim je koncentracijama Se toksičan za biljke što je posljedica povećanog oksidativnog stresa uzrokovanim nespecifičnim inkorporiranjem selenovih aminokiselina u proteine koji tako gube svoju strukturu i funkciju. Biljke su razvile različite mehanizame za smanjenje toksičnosti uzrokovane visokom koncentracijom Se. Jedan on mehanizama je prevođenje selenovih aminokiselina u manje štetne, hlapljive spojeve poput dimetilselenida (DMSe). Hiperakumulatori, biljke koje mogu tolerirati i akumulirati značajne količine Se u svojim tkivima, stvaraju hlapljivi dimetildiselenid (DMDS<sub>2</sub>). Dodatni mehanizmi kod hiperakumulatora uključuju metilaciju SeCys u metilselenocistein (MeSeCys) pomoću enzima SeCys metiltransferaza (SMT) i razgradnju SeCys na elementarni Se i alanin (Guignardi i Schiavon, 2017).

Adekvatne koncentracije Se u biljkama mogu ublažiti oksidativni stres uzrokovan raznim okolišnim čimbenicima te poboljšati obranu biljke od patogena i biljojeda. U slučajevima rajčice, brokule, bosiljka, endivije i češnjaka biofortificiranih selenom dolazi do povećanja ukupnog sadržaja fenolnih spojeva i poboljšanja antioksidativnog statusa biljke (Skrypnik i sur., 2019). Pretpostavlja se da je poboljšanje antioksidativnih svojstava posljedica triju procesa. Prvo, dodatkom Se dolazi do povećane biosinteze fenolnih spojeva i ostalih sekundarnih metabolita s antioksidativnim svojstvima. Drugo, Se iskazuje pozitivan učinak na metabolizam glutaciona. Osim toga, organski spojevi Se posjeduju direktan antioksidativni učinak (Skrypnik i sur., 2019).

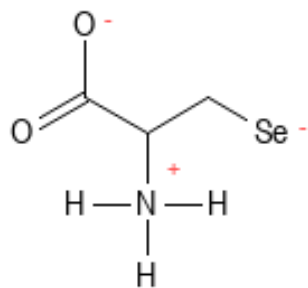
Fenolni spojevi su antioksidansi koji imaju ulogu u pigmentaciji, rastu i reprodukciji biljke. Osim toga, djeluju i kao signalni agensi, metalni kelatori, te sudjeluju u obrani od patogena i



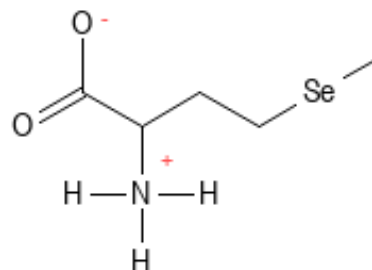
abiotskog stresa (Schiavon i sur., 2013). U studiji sa zelenom salatom tretiranom sa Se došlo je do povećane biosinteze pigmenta antocijanina (Liu i sur. 2017) dok je u istraživanju koje su radili Zhu i suradnici (2018) pokazana povezanost između tretiranja rajčice selenom i povećane razine flavonoida. Mehanizam kojim Se utječe na proizvodnju sekundarnih metabolita i fitonutrijenata nije u potpunosti razjašnjen, no smatra se da dodatak Se može izazvati stres u tretiranih biljaka što dovodi do obrambenog odgovora u biljnim stanicama i povećane biosinteze nekih fenolnih spojeva poput antocijanina (Skrypnik i sur., 2019). Pokazano je da Se u niskim koncentracijama može potaknuti fenilpropanoidni metabolički put sinteze raznih obrambenih spojeva poput polifenola (Schiavon i sur., 2013).

### **1.1.3. Metabolizam Se i uloga u ljudskom zdravlju**

Nakon unosa prehranom, Se se apsorbira u tankom crijevu. Različiti oblici Se imaju različiti stupanj i mehanizam apsorpcije. Pretpostavlja se da SeMet koristi aktivni transport ovisan o natriju putem kojega se apsorbira i metionin. SeCys se apsorbira putem nekoliko aminokiselinskih transportera (Mehdi i sur., 2013). Strukture spomenutih aminokiselina su prikazane na Slici 1. Nadalje, apsorpcija selenata se odvija putem sulfatnih transportera potpomognutih natrijem, uz utrošak energije. Za razliku od njega, selenit se apsorbira pasivnom difuzijom. Anorganski oblici imaju visok stupanj apsorpcije, međutim njihovo zadržavanje u organizmu je kraće u usporedbi s organskim oblicima (Mehdi i sur., 2013).



Selenocistein (SeCys)



Selenometionin (SeMet)

**Slika 1.** Strukture selenovih aminokiselina (napravljeno u programu PubChem Sketcher V2.4)

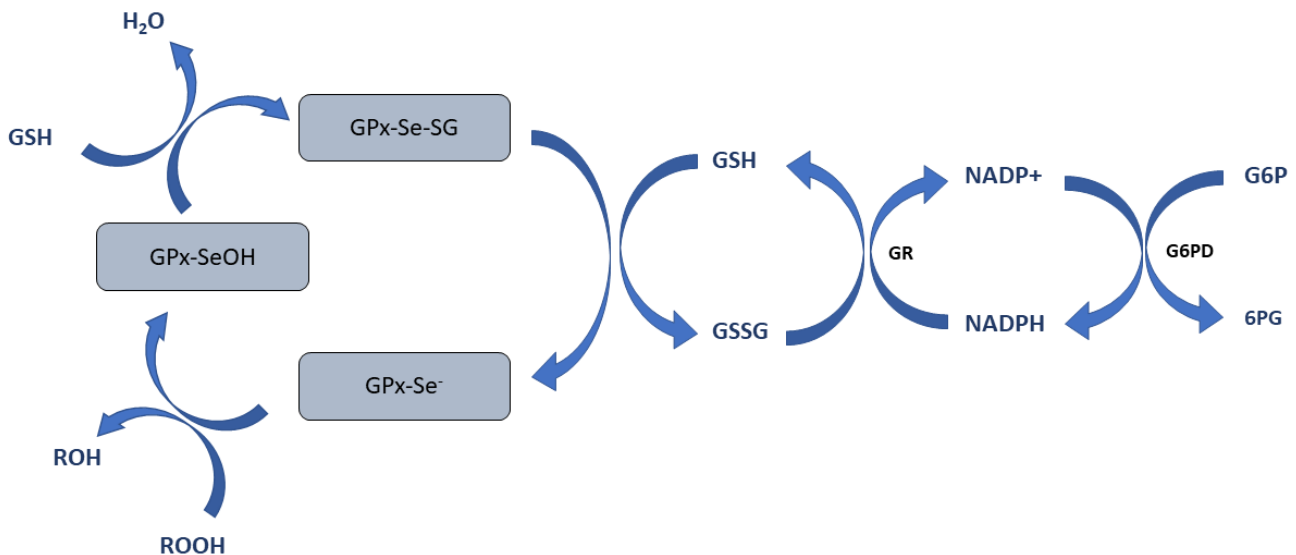
Svoju esencijalnu biološku funkciju u sisavaca Se iskazuje putem selenoproteina. U njihovom katalitičkom mjestu se nalazi SeCys koji je karakteriziran visokim redukcijskim potencijalom te je potentniji i reaktivniji od cisteina u redoks-reakcijama (Kurokawa i Berry, 2013). Funkcije ovih enzima uglavnom su poznate, a većina ih sudjeluje u redoks metabolizmu i staničnim signalnim putevima (Tablica 1).

**Tablica 1.** Porodice humanih selenoproteina i njihove funkcije (Kurokawa i Berry, 2013)

Humani selenoprotein	Funkcija
Selenoprotein K (SelK)	Regulacija stresa endoplazmatskog retikuluma i olakšavanje influksa kalcija u imunosne stanice
Selenoprotein S (SelS)	Induciran stresom endoplazmatskog retikuluma; uključen u zaštitu stanice od akumulacije pogrešno namotanih proteina
Selenoprotein O (SelO)	Funkcija nepoznata
Selenoprotein I (SelI)	Sadrži fosfotransferaznu domenu, ali fiziološka funkcija nepoznata

Metionin-R-sulfoksid reduktaza (MsrB, SelR)	Katalizira popravak R-enantiomera oksidiranog metioninskog ostatka u proteina
Tioredoxin reduktaza 1 (TR1)	Reduciraju oksidirani tioredoxin uz NADPH kao kofaktor
Tioredoxin reduktaza 2 (TR2)	
Tioredoxin reduktaza 3 (TR3)	
Glutation peroksidaza 1 (Gpx1)	Razgrađuju vodikov peroksid u reakciji s reduciranim glutationom kao ko-supstratom
Glutation peroksidaza 2 (Gpx2)	
Glutation peroksidaza 3 (Gpx3)	
Glutation peroksidaza 4 (Gpx4)	
Glutation peroksidaza 6 (Gpx5)	
Selenoprotein M (SelM)	Sadrži signal za endoplazmatski retikulum; eksprimiran u mozgu; uključen u metabolizam kalcija
Jodotironin dejodinaza 1 (DI1)	Kataliziraju dejodinaciju tiroidnih hormona
Jodotironin dejodinaza 2 (DI2)	
Jodotironin dejodinaza 3 (DI3)	
15kDa selenoprotein (Sep 15)	Regulira redoks homeostazu u endoplazmatskom retikulumu; posreduje u preventivnom učinku dijetalnog Se na razvoj karcinoma
Selenoprotein W (SelW)	Smatra se da je uključen u oksidativne metaboličke puteve; antioksidativna aktivnost
Selenoprotein T (SelT)	Organizacija ekstracelularnog matriksa i stanične strukture; sudjeluje u regulaciji homeostaze kalcija
Selenoprotein N (SelN)	Mutacije u genu za ovaj protein povezane s poremećajima mišića; vjerojatna uloga u metabolizmu kalcija
Selenoprotein V (SelV)	Strukturno sličan SelW, funkcija nepoznata
Selenoprotein H (SelH)	Lokaliziran u staničnoj jezgri; uključen u regulaciju transkripcije gena zaduženih za <i>de novo</i> sintezu glutationa
Selenofosfat sintetaza 2 (SPS2)	Katalizira sintezu selenofosfata koji djeluje kao aktivni donor Se nužnog za biosintezu SeCys
Selenoprotein P (SelP)	Sintetizira se u jetri i luči u plazmu; pretpostavlja se da služi kao donor Se perifernim tkivima

Glutation peroksidaze (Gpx) prvi su identificirani selenoproteini u čovjeka. Porodicu glutacion peroksidaza čini 8 poznatih homolognih proteina (Gpx1-Gpx8), od kojih je u čovjeka pronađeno 5 (Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Gpx6). Glutation peroksidaze razgrađuju vodikov peroksid u reakciji s reduciranim glutationom (GSH) kao ko-supstratom (Kurokawa i Berry, 2013). Shematski prikaz reakcije je prikazan na Slici 2.



**Slika 2.** Mehanizam djelovanja glutacion peroksidaza (napravljeno u programu Microsoft Office Powerpoint)

Gpx1 je eksprimirana u svim ljudskim stanicama, najviše u jetri i bubrezima. Ovaj enzim je homotetramer, a u stanicama se nalazi u citosolu i mitohondriju. Reagira s vodikovim peroksidom te s topljivim, niskomolekularnim hidroperoksidima poput *t*-butil hidroperoksida, hidroperoksimasnim kiselinama i hidroksiperoksilizofosfatidom. U tkivima koja ne eksprimiraju GSH sintetazu, Gpx1 može koristiti  $\gamma$ -glutamincistein kao reducens. Jetra i pluća miševa bez gena za Gpx1 pokazali su se izuzetno podložnim oksidativnom stresu (Kurokawa i Berry, 2013).

Gpx2 je eksprimirana u gastrointestinalnom epitelu. Ovaj je enzim također homotetramer i nalazi se u citosolu. U adenokarcinomu kolona, karcinomu skvamoznih stanica te plućnim adenokarcinomima povećana je ekspresija Gpx2. Smatra se da ovaj enzim djeluje kao barijera

hidroperoksidima unesenima putem prehrane. U miševa bez gena za Gpx2 utvrđena je povećana razina apoptoze u bazama kripti gastrointestinalnog trakta. Učinak je bio jači u miševa čija je prehrana bila siromašna selenom (Kurokawa i Berry, 2013). Obzirom da je suplementacija selenom djelomično prevenirala apoptozu, pretpostavlja se da u tom slučaju Gpx1 kompenzira manjak Gpx2. U miševa bez Gpx1 i Gpx2 dolazilo je do kolitisa i intestinalnog karcinoma (Kurokawa i Berry, 2013).

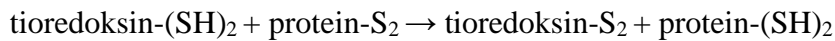
Gpx3 se primarno sintetizira u stanicama proksimalnog tubula bubrega te se izlučuje u plazmu. Veže se za proksimalne tubule, bazalne membrane epitelnih stanica crijeva, epididimis, bronhe, i pneumocite tipa II. Miševi s nefunkcionalnim genom za Gpx3 nisu pokazivali jasan fenotip te je funkcija Gpx3 nedovoljno razjašnjena. Smanjena proizvodnja Gpx3 primjetna je u mnogim tipovima karcinoma (Kurokawa i Berry, 2013).

Gpx4 je monomerni protein s 3 izoforme: citosolnom, mitohondrijskom i jezgrenom (isključivo u stanicama spermija). Gpx4 katalizira redukciju lipidnih peroksida i hidroksiperoksidnih estera kolesterola unutar staničnih membrana. Kao ko-supstrat koristi GSH ili druge tiolne molekule. Mitohondrijska izoforma Gpx4 od iznimne je važnosti prilikom spermatogeneze. Iako je potpuni *knockout* gena za Gpx4 letalan za miševe, nedostatak samo mitohondrijske Gpx4 je rezultirao neplodnošću u pokusnih miševa. Miševi s *knockout*-om gena za jezgrenu izoformu Gpx4 razvili su se normalno uz očuvanu plodnost (Kurokawa i Berry, 2013).

Gpx6 iznimno je slična enzimu Gpx3. Smatra se da je ekspresija najizraženija u epitelnim stanicama olfatornih organa embrionalnim stanicama (Kurokawa i Berry, 2013). Uloga ovog enzima nije u potpunosti razjašnjena, no pretpostavlja se da sudjeluje u transmisiji signala vezanih uz njih.

Dejodinaze tiroidnih hormona koje se još nazivaju i jodotironin dejodinaze je porodica koja se sastoji od 3 homologna enzima: DI1, DI2, DI3 koji kataliziraju reduktivnu dejodinaciju tiroidnih hormona. Hormon tiroksin (T4) dominantno se proizvodi u štitnoj žlijezdi, no afinitet T4 za receptore tiroidnih hormona značajno je manji od afiniteta trijodtironina (T3). DI1 i DI2 aktiviraju tiroidni hormon dejodinacijom vanjskog prstena T4 stvarajući tako aktivniji oblik T3. Jodotironin dejodinaze homodimerni su proteini koji se nalaze na membranama stanica. DI1 i DI3 nalaze se na staničnoj membrani, dok se DI2 nalazi na membrani endoplazmatskog retikuluma. DI1 proizvodi većinu cirkulirajućeg T3, a eksprimirana je najviše u jetri i bubrezima. Najveće količine DI2 nalazimo u štitnoj žlijezdi, srcu, skeletnim mišićima, smeđem adipoznom tkivu i središnjem živčanom sustavu (Kurokawa i Berry, 2013).

Porodica tioredoksin reduktaza (TR) sastoji se od tri selenoproteinska homologa: TR1, TR2 i TR3. TR reduciraju oksidirani tioredoksin (tioredoksin-S<sub>2</sub>) uz kofaktor NADPH. Tioredoksin reducira disulfidne veze u proteinima što je potrebno za očuvanje njihove tercijarne strukture. TR odlikuje široka specifičnost za supstrate pa tako mogu koristiti vodikov peroksid, selenit, lipoičnu kiselinu, askorbat i ubikvinon kao supstrat (Kurokawa i Berry, 2013). Mehanizam reakcije katalizirane od strane tioredoksin reduktaze izgleda ovako:



Dovoljan unos Se i funkcionalni selenoproteini su od iznimne važnosti za zdravlje čovjeka (Kieliszek, 2019). Nekoliko bolesti povezano je sa nedostatkom Se, a pojavljuju su na područjima s niskom koncentracijom Se u tlu te se mogu prevenirati i liječiti suplementacijom prehrane selenom. Smatra se da osim unosa Se, postoje i drugi čimbenici koji utječu na incidenciju i težinu oboljenja (Kurokawa i Berry, 2013).

Jedna od takvih bolesti je Keshanova bolest. Ona je prvotno opisana kao juvenilna kardiomiopatija u Kini 1930-ih godina. Keshanova bolest je u prošlosti imala visoku stopu smrtnosti, a posebno su bile podložne žene i djeca. Utvrđeno je da je bolest uzrokovana kombinacijom infekcije coxackie virusom B4 i niskim statusom Se. Suplementacija natrijevim selenitom preveniralo je razvoj spomenute bolesti. (Kurokawa i Berry, 2013).

Kashin-Beckova bolest se također povezuje s deficijencijom Se. To je kronična, endemska osteohondropatija kod koje dolazi do nekroze zglobova. Pojavljuje se u regijama Tibeta, sjevernoistočnim i jugoistočnim dijelovima Kine, Sibiru i Sjevernoj Koreji. Osim nedostatka Se, polimorfizam u genu za Gpx1 je potencijalni rizični čimbenik za razvoj Kashin-Beckove bolesti (Kurokawa i Berry, 2013).

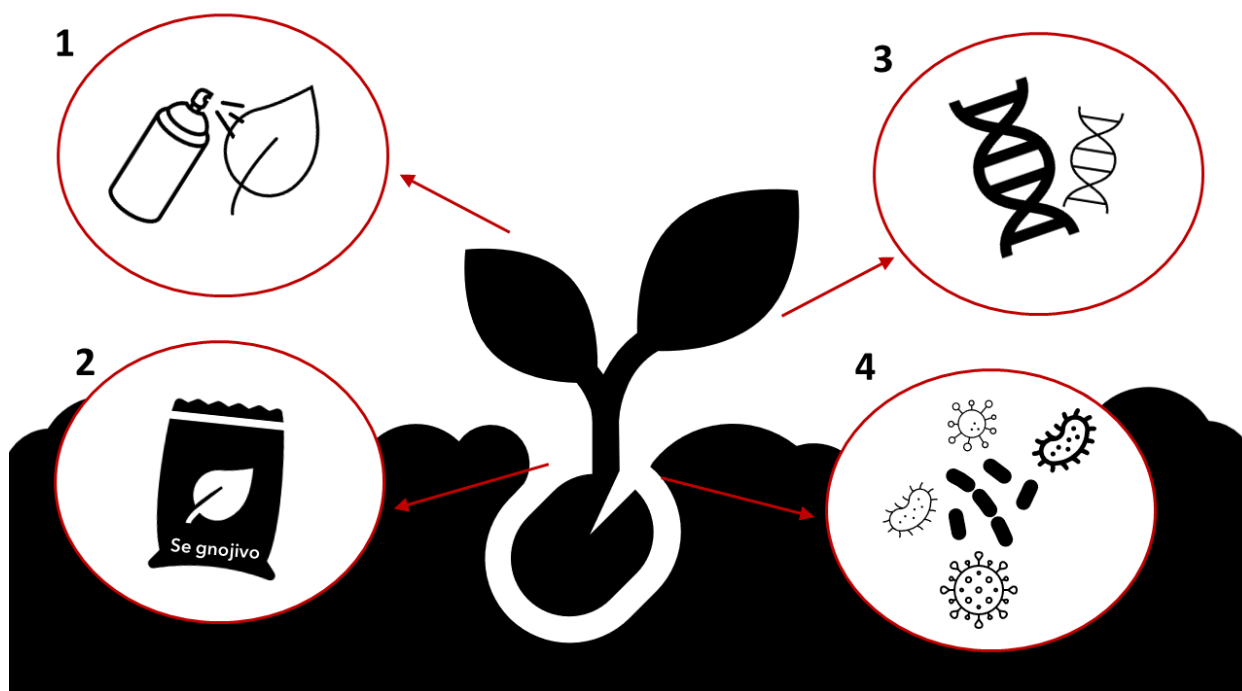
Pretjeranim unosom Se koncentracije Se u krvi mogu prijeći 100 µg/dL što može dovesti do trovanja selenom odnosno selenoze. Simptomi trovanja selenom uključuju gubitak kose, bijele mrlje na noktima, zadržavanje po češnjaku koji je posljedica stvaranja hlapljivog DMSe, gastrointestinalne poremećaje, umor, nervozu, hipotenziju, tahikardiju i neurološka oštećenja

(Kurokawa i Berry, 2013; Kieliszek, 2019). Pojavnost trovanja je rijetka, osim u područjima s vrlo visokom koncentracijom Se u tlu. Izrazito teški slučajevi selenoze mogu rezultirati cirozom jetre i smrću. Elementarni Se i metalni selenidi su relativno slabo toksični zbog njihove niske biorasploživosti, dok selenati i seleniti mogu biti vrlo toksični. Organski spojevi Se poput SeCys, SeMet i metiliranih spojeva Se su toksični u visokim dozama (Kurokawa i Berry, 2013).

#### **1.1.4. Biofortifikacija biljaka selenom**

Optimalna koncentracija Se u žitaricama za ljudsku prehranu je iznad 100 µg/kg. Razine Se u tlu variraju od 100 µg/kg pa do 2000 µg/kg, a prosječna koncentracija iznosi oko 200 µg/kg. Dodatak Se tlu se pokazao nužnim u područjima koja su iznimno siromašna selenom (Wang i sur., 2016).

Biofortifikacija je brz, učinkovit i održivi način smanjenja deficijencije nutrijenata. Biljni i životinjski proizvodi smatraju se biofortificirani selenom kada je povećan sadržaj Se u jestivim dijelovima biljke ili životinjskog proizvoda (Danso i sur., 2023). Postoji nekoliko načina biofortifikacije biljaka, a shematski su prikazani na Slici 3.



**Slika 3.** Načini biofortifikacije biljaka selenom. 1. Folijarna aplikacija; 2. Aplikacija u tlo; 3. Genetska biofortifikacija; 4. Mikrobima potpomognuta biofortifikacija (napravljeno u programu Microsoft Office Powerpoint)

Zbog svoje jednostavnosti i poželjnih ishoda, folijarna aplikacija najpopularnija je metoda biofortifikacije biljaka. Ovim je načinom manja opasnost kontaminacije okoliša te je sveukupno potrebna manja količina Se. Tehnika obuhvaća prskanje listova otopinom koja sadrži Se nakon čega ulazi u biljku kroz kutikulu lista. Budući da fizikalno-kemijski status tla i mikrobiološki procesi u ovom slučaju imaju znatno manji učinak na apsorpciju, moguće je postići visoku stopu apsorpcije Se (Danso i sur., 2023). Folijarnom aplikacijom Se u obliku selenita i selenata značajno utječe na koncentraciju Se u zrnima pšenice i riže. (Lidon i sur., 2018). U istraživanjima na zelenoj salati, folijarnom aplikacijom Se u koncentracijama do 40  $\mu\text{M}$  značajno se povećala koncentracija Se u listovima (Pannico i sur., 2019).

Sljedeća tehnika biofortifikacije je aplikacija Se u tlo povećavajući tako ukupnu količinu biodostupnog Se. Može se aplicirati u obliku soli, otopine Se ili u obliku gnojiva koje sadrži Se. Fizikalno-kemijski status tla, kao i mikrobna aktivnost utječu na efikasnost biofortifikacije (Danso i sur., 2023). Osim na razinu Se, njegova aplikacija u tlo ima povoljne učinke na razne fiziološke procese biljke. Istraživanje na radiću je pokazalo da je selenat najučinkovitiji u povećavanju sadržaja selena, bez štetnog učinka na prinos biomase (da Silva i sur., 2020).



Aplikacija Se u tlo se pokazala učinkovitijim u povećanju sadržaja Se u korijenu, listu i ostalim dijelovima biljke u usporedbi sa folijarnom aplikacijom (Danso i sur., 2023). Ekstrakti zimske pšenice biofortificirane aplikacijom Se u tlo imali su povećan sadržaj Se kao i pojačanu antioksidativnu aktivnost (Islam i sur., 2020)

Navedeni načini biofortifikacije biljaka nisu uvijek uspješni, a razlog tomu mogu biti iznenadna kiša u slučaju folijarne aplikacije te nepovoljna fizikalno-kemijska i mikrobiološka svojstva kod aplikacije u tlo. Dodatni način biofortifikacije biljaka je mikroorganizmima potpomognuta biofortifikacija. (Danso i sur., 2023). Bakterije iz redova poput *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* sposobne su transformirati Se metilacijom i oksidacijsko-redukcijskim reakcijama. Pokazano je da različite bakterije povećavaju koncentraciju Se u indijskoj gorušici koja raste na seleniferom tlu (Yasin i sur., 2014). Slični rezultati pokazani su i na drugim biljnim vrstama te na gljivama. Osim toga, kvasci i drugi mikrobi važni su za sintezu organskih spojeva selena poput SeCys i SeMet. Selen u obliku SeMet čini čak 90% ukupne koncentracije Se u stanicama kvasaca (Danso i sur., 2023).

Genetskim inženjeringom se također može utjecati na sposobnost biljke da akumulira Se. Razni kromosomski lokusi povezani su s povećanom akumulacijom Se u mnogih biljnih vrsta (Danso i sur., 2023). Međutim, zbog strogih ograničenja u mnogim državama genetski inženjering još uvijek nije prepoznat kao oblik biofortifikacije biljaka.

Smatra se da konvencionalno oplemenjivanje biljaka može biti održivi i dugoročni pristup biofortifikacije biljaka selenom. Ipak, u usporedbi s genetskom biofortifikacijom, oplemenjivanje biljaka sporija je i manje precizna metoda (Danso i sur., 2023). Dobivanje željenih genotipskih varijacija ovom metodom može biti zahtjevno ako se koristi u stvaranju novih tipova biljaka s poboljšanim svojstvima, pa tako i u svrhu bolje apsorpcije Se te njegove translokacije u jestive dijelove biljke.

Novija istraživanja pokazuju da bi biofortifikacija selenom u nano obliku mogla biti učinkovita metoda za obogaćivanje biljaka selenom te povećanje njihovog antioksidativnog sadržaja što bi u konačnici rezultiralo pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje.

## 1.2. Nanočestice selena (SeNPs)

Nanočestice su karakterizirane promjerom između 1 i 100 nm, a mogu imati i samo jednu dimenziju u navedenom rasponu veličina (Khan i sur., 2019). Moguće ih je podijeliti u različite skupine ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama kao što su oblik, veličina, kemijski sastav itd. Različite skupine nanočestica uključuju fullerene, metalne nanočestice, keramičke nanočestice, polimerne nanočestice itd. Karakteriziraju ih jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva zbog svojih malih proporcija i velike ukupne površine. Osim toga, njihova površina može biti funkcionalizirana raznim bioaktivnim molekulama, metalnim ionima, surfaktantima i polimerima što dodatno utječe na njihova svojstva i biološku aktivnost (Khan i sur., 2019). Nanotehnologija ima svoju primjenu i u biomedicini i to u dijagnostičkim instrumentima, preciznim medicinskim proizvodima, farmaceutskim proizvodima i biomedicinskim implantantima (Haleem i sur., 2023). Iznimno toksična terapija poput kemoterapije danas može biti primjenjena uz bolji sigurnosni profil koristeći nanotehnologiju (Haleem i sur., 2023).

Smatra se da nanočestice selena (SeNPs) imaju visoku bioraspoloživost i smanjenu toksičnost u usporedbi s drugim anorganskim i organskim oblicima Se. Zbog toga se intenzivno istražuju kao potencijalni suplement u prehrani. Također je pokazana njihova kemoprotektivna, protutumorska, protuupalna i antimikrobna aktivnost (Hosnedlova i sur., 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

SeNPs relativno su noviji oblik Se i njihova primjena u biomedicini se intenzivno istražuje. Karakterizira ih smanjena toksičnost, veća terapijska širina i pretpostavljena poboljšana bioraspodjelivost u odnosu na anorganske oblike, kao i mogućnost funkcionalizacije površine. Biofortifikacija biljaka nanočesticama selena se istražuje u svrhu obogaćivanja biljaka selenom i posljedične optimizacije unosa Se prehranom. Biljke biofortificirane selenom također karakterizira povećana sinteza antioksidativnih fitokemikalija čija konzumacija može imati pozitivne učinke na ljudsko zdravlje.

Cilj ovog rada je istražiti učinkovitost biofortifikacije rukole i špinata različitim oblicima nanoselena na antioksidativnu aktivnost i biokompatibilnost njihovih ekstrakata.

Specifični ciljevi su:

- Istražiti utjecaj biofortifikacije selenom na antiradikalni i ukupni redukcijski učinak ekstrakata rukole i špinata određen kemijskim metodama
- Istražiti utjecaj biofortifikacije selenom na biokompatibilnost i antioksidativni potencijal ekstrakata rukole i špinata na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2)

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije i pribor

- Lađice
- Etanol (Kemika d.d.)
- Aluminijska folija
- Filter papir
- HepG2 stanična linija (ATCC, SAD)
- EMEM medij (Sigma, SAD)
- Fetalni goveđi serum (Capricorn scientific GmbH, Njemačka)
- Antibiotik/antimikotik (Sigma-Aldrich, SAD)
- Neesencijalne aminokiseline (Capricorn scientific GmbH, Njemačka)
- L-Glutamin (Sigma-Aldrich, SAD)
- Tripsin (Sigma-Aldrich, SAD)
- EDTA (Lonza AG, Švicarska)
- Tert-butyl-hidroperoksid (tBOOH) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Otopina pufera PBS (Lonza AG, Švicarska)
- 0,2 µm filter Chromafil CA-20/25 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka)
- MTT reagens (Carbosynth Limited, UK)
- DMSO (Kemika d.d.)
- Trolox (Acros organics BV, Belgija)
- Ultra-čista voda (MiliQ-H<sub>2</sub>O)
- Folin-Ciocalteu fenol reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev karbonat bezvodni (Lach-Ner, Češka)
- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol - ABTS (Sigma-Aldrich, SAD)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Erlenmeyerove tikvice
- Eppendorf epruvete
- Odmjerne tikvice

- Staklene čaše
- Plastične boce
- Žlice, stakleni štapići, špatule
- Lijevci
- Pipete
- Multikanalna pipeta RaininPipet-Lite XLS (Mettler Toledo, SAD)
- Falcon kivete 50ml
- Prozirna mikrotitarska ploča s 96 jažica i ravnim dnom (SARSTEDT AG & Co. KG, Njemačka)
- Eppendorf kivete (2 mL)
- Galna kiselina (Sigma, cat no. 48630)

### **3.1.2. Radni instrumenti i oprema**

- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Švicarska)
- Vortex miješalica, VTX-3000L Mixer Uzusio (LMS, Japan)
- Čitač mikrotitarskih ploča, Victor X3 (Perkin Elmer, SAD)
- Rotavapor R200 (Büchi, Švicarska)
- Stanični inkubator HeraCell VIOS 160i (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Hemocitometar (Neubauer, Njemačka)
- Laminar NSC Advantage (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- *Shaker* (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Vodena kupelj (GFL, Njemačka)
- Zamrzivač (Beko, Turska)
- Liofilizator Alpha 1-4 LOC-1 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema suhih ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih nanočesticama selena (SeNPs)**

Rukola i špinat bili su biofortificirani nanočesticama selena i selenatom njihovom aplikacijom u hidroponski sutav. SeNPs korištene u ovome istraživanju bile su funkcionalizirane huminskom kiselinom, polivinilpirolidonon ili polisorbatom 20. Kontrolni uzorci špinata i rukole nisu bili biofortificirani.

Priprema suhih ekstrakata rukole i špinata sastoji se od dva dijela: ekstrakcije i sušenja. Ekstrakcija se provodila u vodenoj kupelji zagrijanoj na 40°C. Grubo usitnjeni biljni materijal se samelje u uređaju za mljevenje biljnog tkiva, nakon čega se važe 300 mg uzorka. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL se prebaci uzorak te doda 60% etanol u omjeru 1:60 u odnosu na odvagani uzorak. Erlenmeyerova tikvica čvrsto se zatvori aluminijskom folijom i postavi u vodenu kupelj na držaće te se ostavi ekstrahirati 1 h uz vrtnju od 100 rpm. Nakon jednog sata, dobiveni ekstrakt filtrira se preko običnog filter papira u tikvicu za uparavanje volumena 100 mL. Ekstrakt se uparava na rotavaporu dok se volumen ekstrakta ne smanji na 11 mL. Dobiveni ekstrakt stavi se zamrzavati preko noći. Sljedeći dan se ekstrakt suši liofilizacijom tijekom 24 h. Osušeni ekstrakt se sastruže iz tikvice u tariranu posudicu, izvaže i spremi na - 20 °C. Ukupno je pripremljeno 10 ekstrakata koji su korišteni u daljnjem istraživanju: ekstrakt rukole biofortificirane SeNPs funkcionaliziranih polivinilpirolidonom (RPVP), ekstrakt rukole biofortificirane SeNPs funkcionaliziranih polisorbatom (RPS), ekstrakt rukole biofortificirane SeNPs funkcionaliziranih huminskom kiselinom (RHA), ekstrakt rukole biofortificirane selenatom (RSE) i ekstrakt rukole koja nije biofortificirana Se (RC) te ekstrakt špinata biofortificiranog SeNPs funkcionaliziranih polivinilpirolidonom (ŠPVP), ekstrakt špinata biofortificiran SeNPs funkcionaliziranih polisorbatom (ŠPS), ekstrakt špinata biofortificiran SeNPs funkcionaliziranih huminskom kiselinom (ŠHA), ekstrakt špinata biofortificiran selenatom (ŠSE) i ekstrakt špinata koji nije biofortificiran Se (ŠC).

### **3.2.2. Određivanje antiradikalnog učinka TEAC metodom**

TEAC (eng. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) testom ispituje se antioksidativni kapacitet uzorka tako što se mjeri sposobnost uzorka da reducira i na taj način smanji apsorbanciju

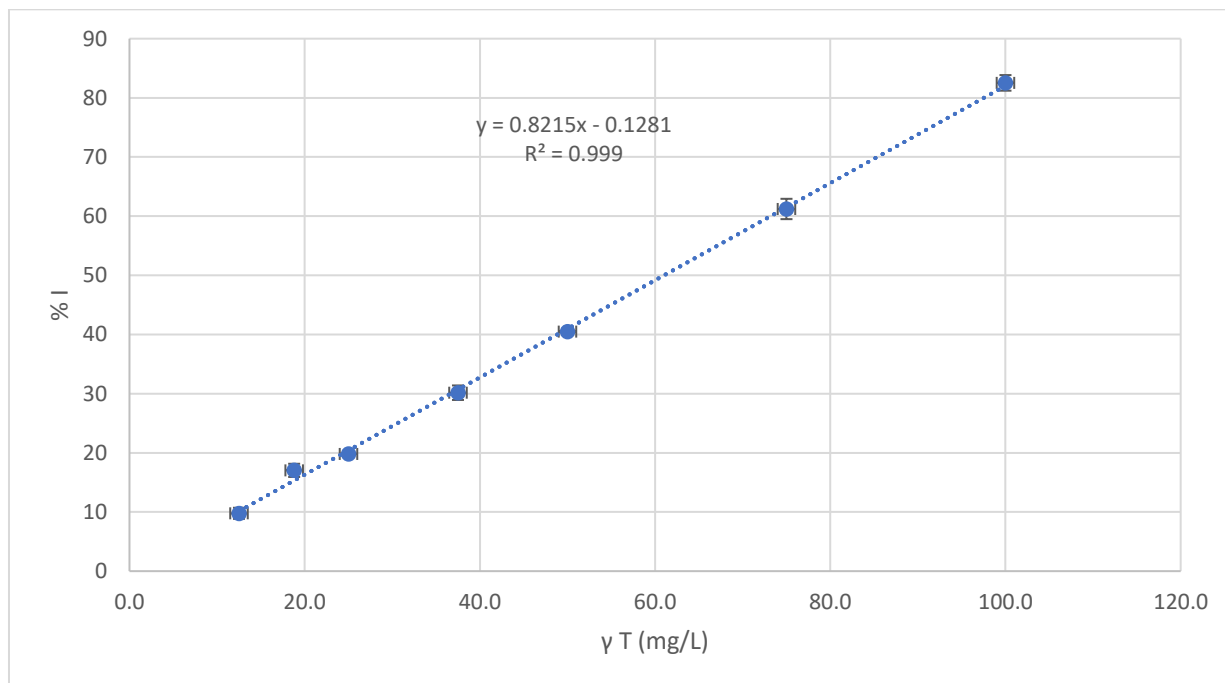
ABTS<sup>+</sup> radikala. Ovaj kation karakterizira maksimum apsorpcije pri 734 nm te se pri toj valnoj duljini mjeri i smanjenje apsorpcije reakcijske otopine (Re i sur., 1999). Gašenje plavo-zelene boje reakcijske otopine ovisi o duljini reakcije, intrinzičnoj antioksidativnoj aktivnosti i koncentraciji uzorka. Što je smanjenje apsorpcije jače, to je veći antioksidativni kapacitet uzorka. ABTS<sup>+</sup> radikal dobiva se reakcijom kalijeva persulfata i ABTS-a (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)), a dobiveni rezultati kvantificira se prema baždarnoj krivulji dobivenoj analizom standardne otopine Troloxa i izražavaju se ekvivalentima Troloxa po masi uzorka (mg/100g). Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametil-kroman-2-karboksilna kiselina) je vodotopljivi derivat vitamina E. Ova metoda ima određene prednosti naspram ostalih antioksidativnih testova. ABTS<sup>+</sup> radikal topljiv je u vodenim i u organskim otapalima te je stoga prigodan za mjerenje antioksidativne aktivnosti i u hidrofilnim i lipofilnim otopinama. Osim toga, na ABTS<sup>+</sup> kation ne utječe ionska jakost spojeva pa je ova metoda primjenjiva kroz veliki raspon pH (Re i sur., 1999). Ovom metodom može se mjeriti antioksidativni kapacitet čistih supstanci, tjelesnih tekućina i biljnog materijala.

Prije početka ispitivanja potrebno je pripremiti otopine reagensa:

- Stock otopina Trolox-a koncentracije 1 mg/mL priprema se vaganjem 5 mg Trolox-a u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni se 96% etanolom do oznake.
- ABTS otopina (7 mM) priprema se otapanjem 10 mg ABTS-a u obliku tablete u 2,604 mL vode.
- Otopina kalijevog persulfata (1,63 mM) priprema se vaganjem 6,62 mg kalijevog persulfata (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) u odmjernu tikvicu od 10 mL, doda se 5 mL ultra čiste vode, promješa i otopi te nakon toga dopuni do oznake.
- Otopina ABTS<sup>+</sup> radikal kationa priprema se miješanjem jednakih dijelova pripremljene ABTS otopine (7 mM) i pripremljene otopine kalijevog persulfata (1,63 mM). Takva otopina pohrani se na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla na 12-16 sati kako bi se nastali ABTS<sup>+</sup> kation stabilizirao. Nakon toga, pripremljena otopina se razrijeđuje 20x tako da je apsorpcija dobivene otopine pri 750 nm približno 0,7.
- Ekstrakti za ispitivanje pripremljeni su tako što su otopljeni u ultra čistoj vodi dok nije postignuta koncentracija 5 mg/mL. Ekstrakti su otopljeni u epruveti od 5 mL. Nakon toga, dobivena otopina ekstrakata filtrirana je kroz 0,2 µm filter.

Baždarni dijagram (Slika 4.) izradi se mjerenjem pada apsorpcije dodavanjem poznatih koncentracija Troloxa (3-100 mg/l) pripremljenoj otopini ABTS<sup>+</sup> kationa. Pomoću baždarnog

dijagrama dobiveni rezultati u obliku postotka inhibicije (%I) mogu se izraziti u mg/L ekvivalenta Troloxa (TE), a potom preračunati u ekvivalente Troloxa po masi uzorka.



**Slika 4.** Baždarni dijagram ovisnosti postotka inhibicije (%I) o masenoj koncentraciji Troloxa (mg/L)

U jažice mikrotitarske pločice se dodaje 20 μL uzorka. Slijepa proba se priprema dodavanjem 20 μL vode u mikrotitarsku pločicu dok se prilikom pripreme baždarnog dijagrama dodavalo 20 μL otopine Troloxa poznatih koncentracija. Nakon toga se dodaje 200 μL otopine ABTS<sup>+</sup> te se mikrotitarska pločica postavlja u čitač mikrotitarskih ploča. Pločica se miješa tijekom 60 s, inkubira 90 s na 30°C te se očitava apsorbancija na 750 nm.

Postotak inhibicije (%I) ABTS<sup>+</sup> radikala se računa prema jednadžbi:

$$\%I = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

u kojoj %I označava postotak inhibicije ABTS<sup>+</sup> radikala, A<sub>0</sub> označava apsorbanciju slijepa probe, a A<sub>1</sub> apsorbanciju uzorka. Korištenjem baždarne krivulje rezultat se izražava u ekvivalentima Troloxa po masi uzorka (mg/100g).



### 3.2.3. Određivanje ukupnog antioksidacijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

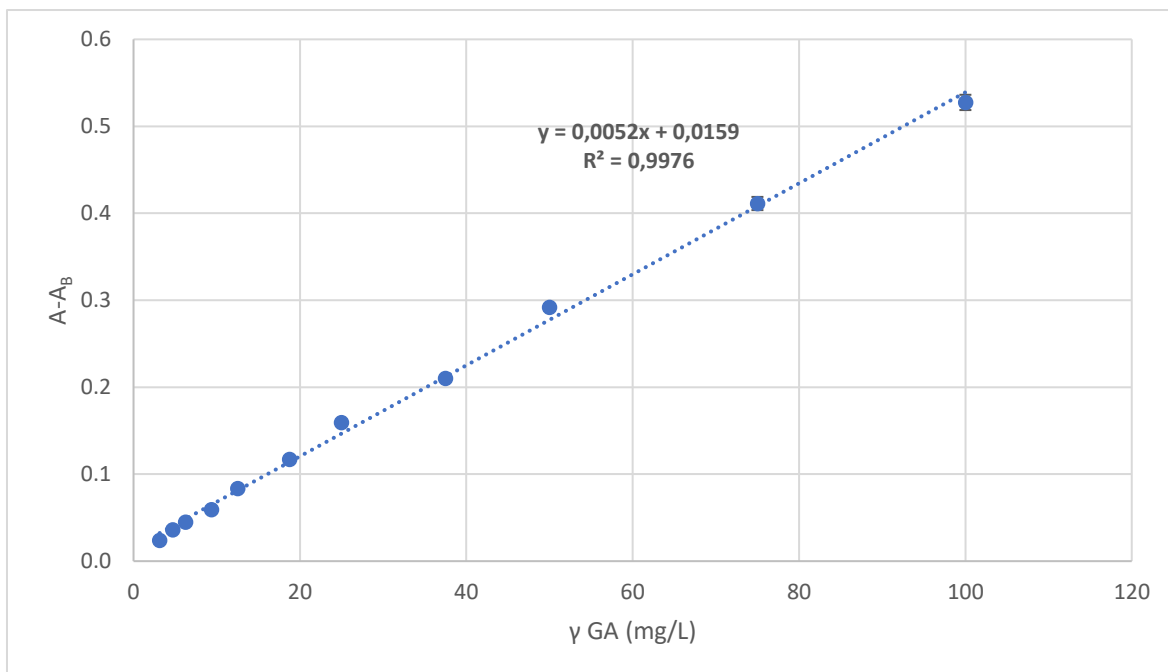
Folin-Ciocalteu (FC) je metoda kojom se može kvantificirati ukupan antioksidativni potencijal nekog prehrambenog ili biološkog uzorka. Ona se temelji na reakciji antioksidansa i FC reagensa prilikom koje dolazi do promjene boje reakcijske otopine iz žute u plavu. Navedena reakcija odvija se u lužnatom okolišu ( $\text{pH} \approx 10$ ), a nastajanje plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 750-765 nm (Pérez i sur., 2023).

Reakcija uključuje prijenos elektrona s reducirajućih spojeva na reagens koji sadrži komplekse fosfomolibdata i fosfovolframata (Ainsworth i Gillespie, 2007). FC reagens može biti reduciran od niza antioksidansa poput fenolnih spojeva, limunske kiseline, reduktivnih šećera, aromatskih amina te se reakcija ne smatra specifičnom (Ainsworth i Gillespie, 2007). Do inhibitorne interferencije može doći zbog oksidacije zrakom nakon zalučivanja otopine te se zbog toga reakcijska otopina zalučuje u posljednjem koraku dodavanjem otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Prije početka ispitivanja potrebno je pripremiti otopine reagensa:

- 700 mM otopina  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  priprema se otapanjem 3,71 g bezvodnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u destiliranoj vodi. Otopina se prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuni vodom do oznake
- 10% otopina FC reagensa priprema se miješanjem 500  $\mu\text{L}$  FC reagensa sa 4500  $\mu\text{L}$  destilirane vode.
- Ekstrakti za ispitivanje pripremljeni su tako što su otopljeni u ultra čistoj vodi dok nije postignuta koncentracija 5 mg/mL. Ekstrakti su otopljeni u epruveti od 5 mL. Nakon toga, dobivena otopina ekstrakata filtrirana je kroz 0,2  $\mu\text{m}$  filter.

Kako bi se dobiveni rezultati mogli izraziti kao ekvivalenti galne kiseline po masi uzorka potrebno je napraviti baždarni dijagram (Slika 5.) otopina standarda poznatih koncentracija (3-100 mg/L).

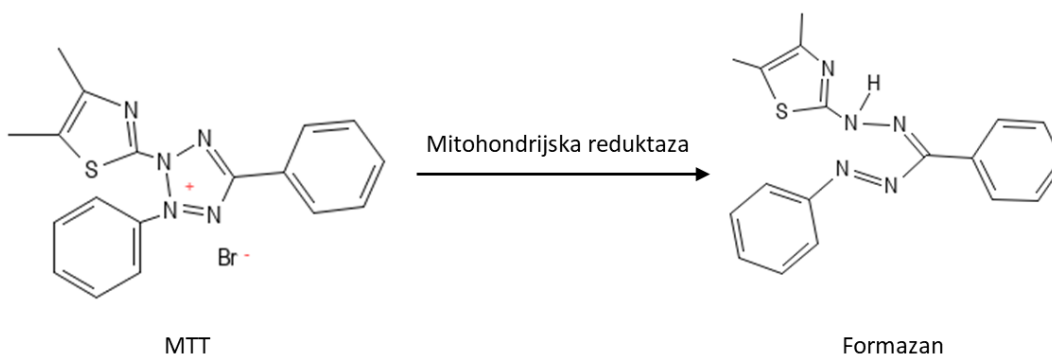


**Slika 5.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije ( $A-A_B$ ) o masenoj koncentraciji galne kiseline ( $\gamma$  GA) mjereno pri 750 nm. A - označava apsorbanciju mjenog uzorka;  $A_B$  - apsorbancija slijepe probe.

U jažice mikrotitarske pločice s 96 jažica doda se 20  $\mu$ L uzorka, otopine standarda ili slijepe probe. Nakon toga se dodaje 50  $\mu$ L 10% FC reagensa te se pločica postavlja u čitač mikrotitarskih ploča i mješa 60 s te inkubira 210 s na 37°C. Nakon toga dodaje se 160  $\mu$ L 700 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te se mješa 60 sekundi te inkubira 30 min na 37°C. Očitava se apsorbancija na 750 nm. Dobiveni rezultati apsorbancija oduzimaju se od apsorbancije slijepe probe nakog čega se preko baždarnog dijagrama rezultati izraze u ekvivalentima galne kiseline po masi uzorka.

### 3.2.4. Određivanje biokompatibilnosti na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2)

MTT test je kolorimetrijski test kojim se mjeri metabolička aktivnost stanica, a daje informaciju o vijabilnosti stanica. Ovaj test se temelji na sposobnosti živih i metabolički aktivnih stanica da reduciraju tetrazolijevu soli. Metabolički aktivne stanice sadržavaju NAD(P)H ovisne oksidoredukcijske enzime koji reduciraju žutu tetrazolijevu sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevbromid odnosno MTT u ljubičasti formazan. Nastali kristali formazana netopljivi su te su otopljeni koristeći solubilizacijsku otopinu (u ovom ispitivanju korišten je DMSO). Nastala ljubičasta otopina kvantificira se mjerenjem apsorbancije na 500-600 nm koristeći spektrofotometar. Što je otopina tamnije obojena to je veći broj živih, odnosno metabolički aktivnih stanica. Dehidrogenaze u mitohondrijima živih stanica najvećim su dijelom odgovorne za redukciju MTT-a, međutim također su uključeni i enzimi u drugim organelama poput endoplazmatskog retikuluma. Mehanizam reakcije prikazan je na Slici 6. Ovo ispitivanje jedno je od najčešće korištenih testova za ispitivanje vijabilnosti i proliferacije stanica.



**Slika 6.** Mehanizam reakcije u MTT testu (napravljeno u programu PubChem Sketcher V2.4)

Kako bi se odredila biokompatibilnost ekstrakata napravljen je MTT test na ljudskoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Stanice su uzgajane u EMEM mediju suplementiranim s fetalnim goveđim serumom (10%), kombinacijom antibiotik/antimikotik (1%), neesencijalnim aminokiselinama (1%) i L-Glutaminom (4mM). Stanice su uzgajane u plastičnim bocama (*flask*-ovima) za staničnu kulturu u inkubatoru na 37°C i uz koncentraciju CO<sub>2</sub> od 5%.

Kako bi nasadili stanice na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica bilo je potrebno odvojiti stanice od podloge. Za to je korištena otopina tripsin EDTA nakon čega su stanice brojane na hemocitometru te sadene u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica u koncentraciji od 20 000 stanica po jažici. Nakon što su stanice ostavljene da rastu 48 sati, provedeno je ispitivanje biokompatibilnosti. Ekstrakti su otopljeni u ultra čistoj vodi u koncentraciji od 5 mg/mL u epruveti od 5 mL. Nakon toga, dobivena otopina ekstrakata sterilno je filtrirana kroz 0,2 µm filter.

Stanicama je dodano 90 µL svježeg EMEM medija, te 10 µL pripremljene otopine ekstrakta (tretman). Konačna koncentracija ekstrakata u jažicama je bila 0.5 mg/mL. Negativnoj kontroli dodano je 10 µL ultračiste vode, a pozitivnoj kontroli 10 µL tert-butyl-hidroperoksid (tBOOH) u koncentraciji od 500 µM. Pozitivna i negativna kontrola ispitivane su u osmeroplikatu dok je tretman ekstraktima napravljen u četveroplikatu. Stanice su tretirane tijekom 24 sata. Nakon toga su isprane sa otopinom pufera PBS (1%) te je dodano 30 µL MTT reagensa (0,5 mg/mL). Nakon inkubacije od 3h, dodano je 180 µL dimetilsulfoksida (DMSO) te je mikrotitarska pločica sa jažicama u kojima su stanice postavljena na *shaker* 45 minuta. Nakon toga mjerena je apsorbancija na mikrotitarskim pločicama na 530 nm na čitaču mikrotitarskih pločica, a podaci su izraženi kao postotak vijabilnosti prema negativnoj kontroli.

### **3.2.5. Određivanje antioksidativnog učinka na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2)**

U svrhu ispitivanja antioksidativnog učinka ekstrakata na staničnom modelu, napravljen je MTT test izmjenjenog protokola s obzirom na onaj kod ispitivanja biokompatibilnosti. U ovom slučaju stanice se predtretiraju ekstraktima, nakon čega se dodaje oksidans tBOOH. Na taj način se ispituje direktna antioksidativna sposobnost ekstrakata da zaštite stanice od oksidativnog učinka.

Stanicama je dodano 90 µL svježeg EMEM medija, a potom su predtretirane s 10 µL pripremljene otopine ekstrakta. Konačna koncentracija ekstrakata u jažicama je bila 0.5 mg/mL. Negativnoj i pozitivnoj kontroli dodano je 10 µL ultračiste vode. Stanice su inkubirane tijekom 24h nakon čega su tretirane s 15 µL tBOOH u konačnoj koncentraciji od 100 µM. Pozitivna kontrola je također tretirana s 15 µL tBOOH, dok je u negativnu kontrolu dodano 15 µL otopine pufera PBS. Stanice su potom vraćene u inkubator na 5 sati nakon čega su uklonjeni

tretmani te su stanice jednom isprane s otopinom pufera PBS (1%). Dodano je 30  $\mu$ L MTT reagensa (0,5 mg/mL) te su stanice inkubirane 3 sata. Sljedeće je dodano 180  $\mu$ L dimetilsulfoksida (DMSO) te je pločica postavljena na *shaker* 45 minuta. Nakon toga je izmjerena apsorbancija na 530 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica. Rezultati su izraženi kao postotak vijabilnosti prema negativnoj kontroli.

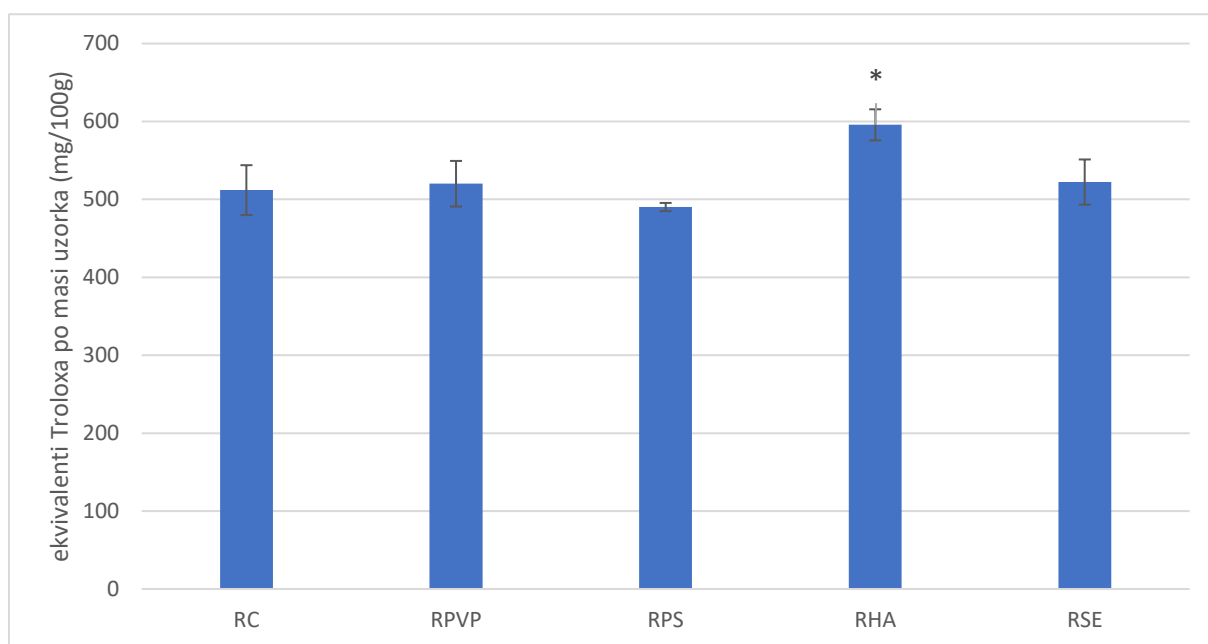
### **3.2.6. Statistička obrada podataka**

U svrhu statističke obrade podataka korišteni su računalni programi Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, USA) i GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Analiza podataka uključivala je jednosmjernu analizu varijance (ANOVA) uz *post-hoc* Turkey test višestruke uporedbe. Razlike između skupina smatrale su se statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

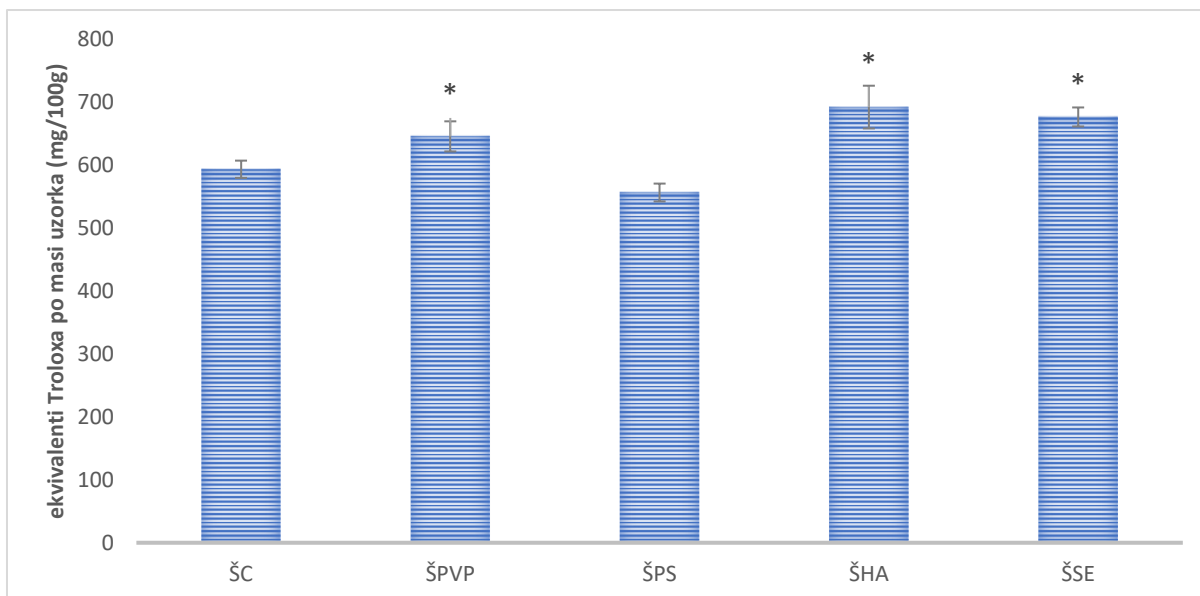
### 4.1. Antiradikalni učinak određen TEAC metodom

TEAC metodom istražen je antiradikalni učinak ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih SeNPs i selenatom. Površina različitih tipova SeNPs je stabilizirana različitim omotačima što može utjecati na sposobnost biljke da apsorbira i transportira navedene nanočestice. Promjena u količini određenih antioksidansa je jedan od mogućih fizioloških odgovora SeNPs ili selenata. Rezultati antiradikalnog učinka ekstrakata rukole su prikazani na Slici 7. Vrijednosti ekvivalenata Troloxa po masi uzorka su se kretali između  $490,18 \pm 5,27$  mg/100g i  $595,70 \pm 19,95$  mg/100g. Vidljivo je da je RHA imao najveću aktivnost ( $595,70 \pm 19,95$  mg/100g) i jedini je ekstrakt koji je bio statistički značajno veći od negativne kontrole. Huminska kiselina je organska kiselina koja se prirodna nalazi u tlu. Biljke imaju visok afinitet apsorpcije huminske kiseline budući da ima pozitivan učinak na njihov rast i razvoj (Ampong i sur., 2022). Ostali površinski stabilizatori nisu prirodno prisutni u tlu te je moguće pretpostaviti da je biljka imala veću stopu apsorpcije HA-SeNPs i posljedično izraženiji fiziološki odgovor u vidu sinteze antioksidativnih fitokemikalija. Rezultati vezani za špinat su prikazani na Slici 8. Vrijednost ekvivalenata Troloxa su bili između  $556,62 \pm 14,14$  mg/100g i  $692,39 \pm 33,95$  mg/100g suhog uzorka. Ovdje je također vidljivo da je ŠHA imao najveći antiradikalni učinak ( $692,39 \pm 33,95$  mg/100g). Međutim, ŠPVP i ŠSE su također imali statistički značajno veće vrijednosti s obzirom na negativnu kontrolu. Jasno je i da u slučaju špinata kemijski oblik Se utječe na antioksidacijski potencijal, s tim da se špinat pokazao manje selektivnim za različite oblike Se u usporedbi s rukolom. Islam i sur. (2020.) su pokazali na zimskoj pšenici da biofortifikacija selenom može poboljšati antioksidacijska svojstva, a ovim ispitivanjem isto je pokazano za rukolu i špinat.



**Slika 7.** Antiradikalni učinak ekstrakata rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,05$ ). (RC–kontrolni ekstrakt rukole koja nije biofortificirana; RPVP-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; RPS-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbatom; RHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; RSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)



**Slika 8.** Antiradikalni učinak ekstrakata špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se.

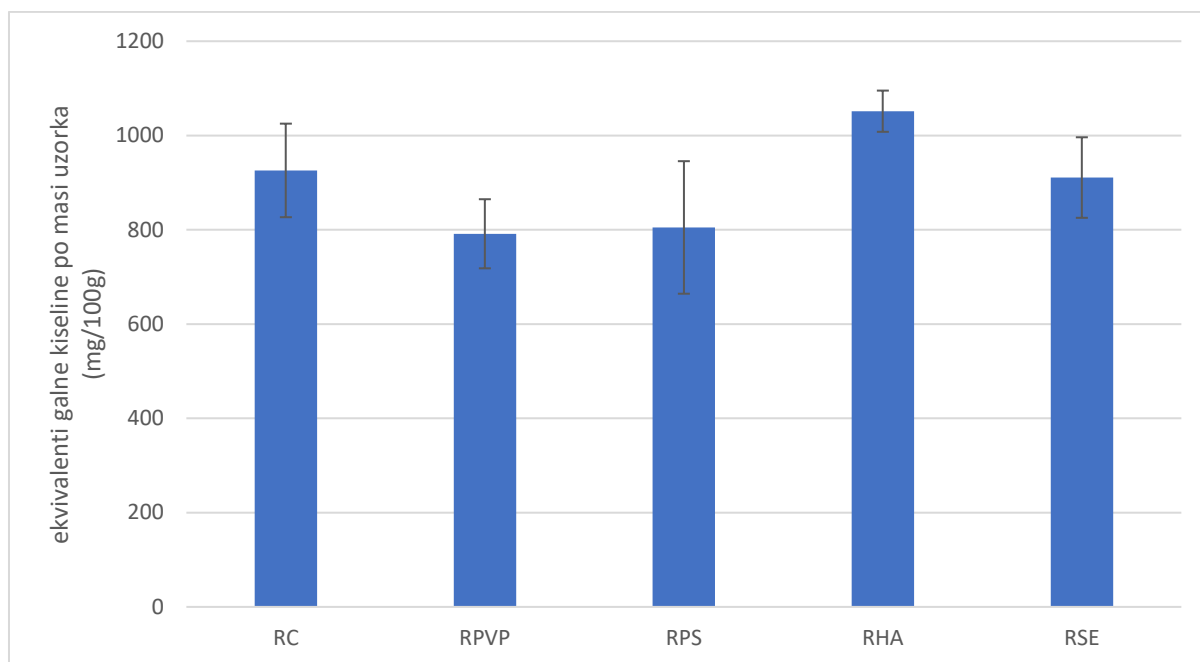
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,05$ ). (ŠC–kontrolni ekstrakt špinata koji nije biofortificiran; ŠPVP-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; ŠPS-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbitatom; ŠHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; ŠSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)

## 4.2. Ukupni reduktivni potencijal određen Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu (FC) metodom određuje se ukupni reduktivni potencijal nekog uzorka, a metoda se zasniva na prijenosu elektrona s reducirajućih spojeva na FC reagens. FC i TEAC metode mogu se smatrati komplementarnima budući da daju sličnu informaciju o antioksidacijskim svojstvima uzorka. Rezultati za rukolu su prikazani na Slici 9. Vrijednosti ukupnog reduktivnog potencijala su se kretale između  $791,52 \pm 73,29$  mg/100g i  $1051,52 \pm 43,73$  mg/100g suhog uzorka. RHA je imao najveću aktivnost ( $1051,52 \pm 43,73$  mg/100g), međutim nijedan biofortificirani ekstrakt nije imao statistički značajno različitu aktivnost od negativne kontrole. Kod špinata (Slika 10.) je također najveća vrijednost izmjerena u slučaju ŠHA ( $1011,70 \pm 81,39$  mg/100g suhog uzorka) i statistički je značajno veća od negativne

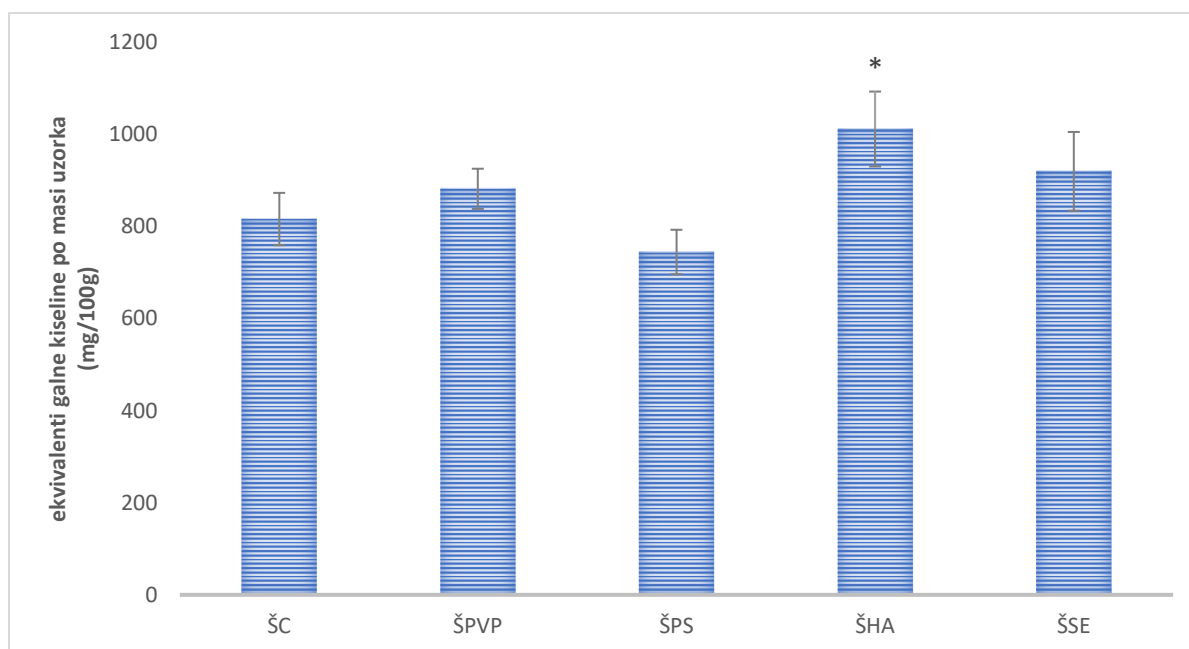


kontrolne. Ekstrakti biljaka biofortificirani ostalim oblicima Se nisu se pokazali statistički značajno različitim od negativne kontrole. Vrijednosti su se kretale od  $744,65 \pm 48,32$  mg/100g do  $1011,70 \pm 81,39$  mg/100g suhog uzorka. Kao i kod prethodne metode, korištenjem FC metode se pokazalo da je biofortifikacija s nanočesticama funkcionaliziranih huminskom kiselinom imala najveći učinak na mjereni parametar.



**Slika 9.** Ukupni reduktivni potencijal ekstrakata rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,05$ ). (RC–kontrolni ekstrakt rukole koja nije biofortificirana; RPVP-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; RPS-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbitom; RHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; RSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)



**Slika 10.** Ukupni reduktivni potencijal ekstrakata špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se.

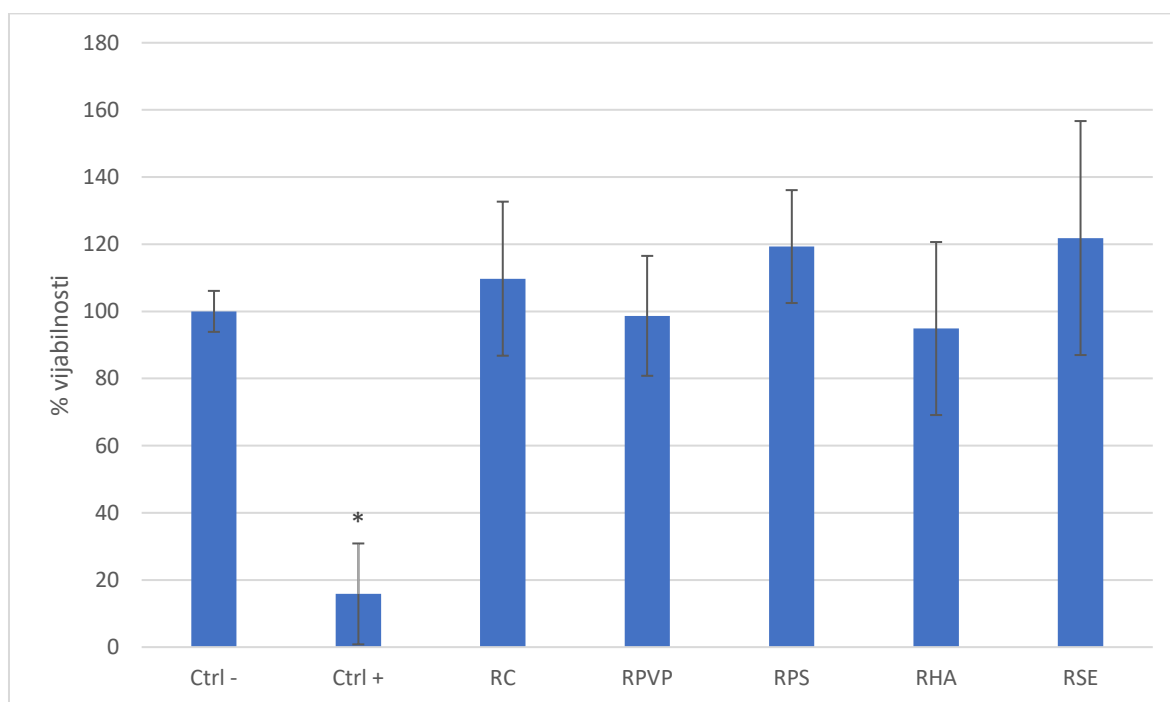
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,05$ ). (ŠC–kontrolni ekstrakt špinata koji nije biofortificiran; ŠPVP-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama seleno funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; ŠPS-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama seleno funkcionaliziranih polisorbitom; ŠHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama seleno funkcionaliziranih huminskom kiselinom; ŠSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)

#### 4.3. Biokompatibilnost određena na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2)

MTT testom određivana je biokompatibilnost ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih s različitim kemijskim oblicima Se. Rezultati su izraženi u postotku vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu koja je određena kao 100%. Rezultati ekstrakata rukole su prikazani na Slici 11. Vijabilnost se kretala u intervalu od  $94,88\% \pm 25,76\%$  do  $121,84\% \pm 34,84\%$ . Nije pokazana statistički značajna razlika između tretiranih stanica i negativne kontrole što ukazuje na visoku biokompatibilnost testiranih ekstrakata.

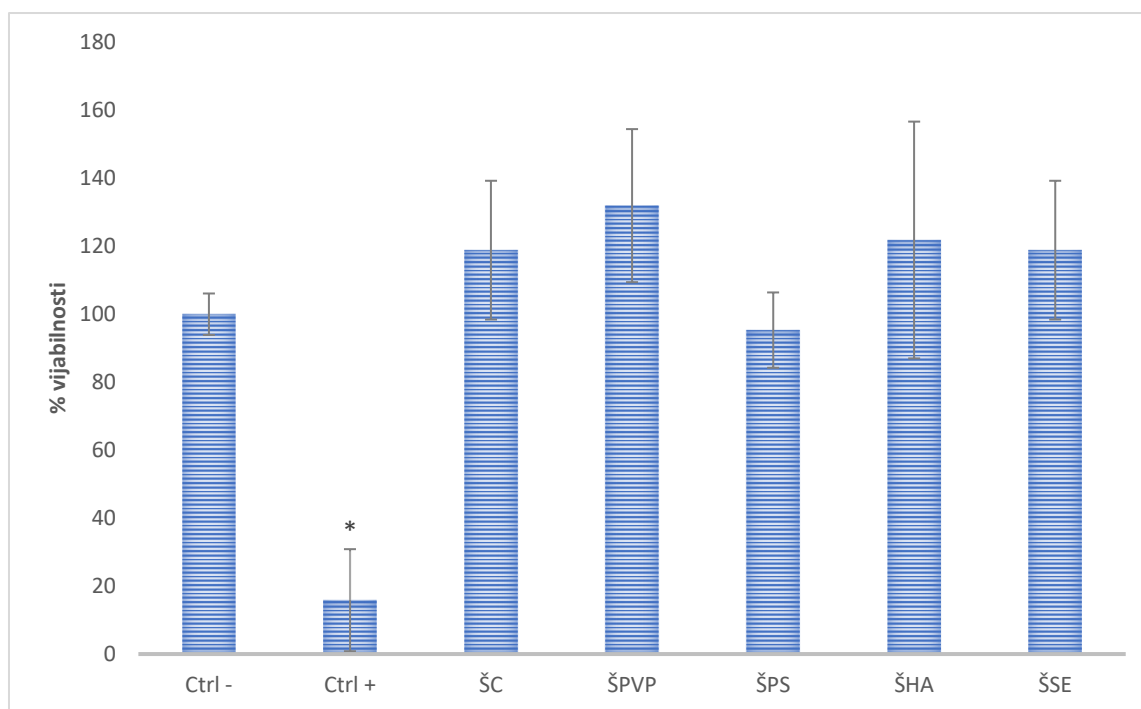
Rezultati vijabilnosti stanica nakon tretmana ekstraktima špinata su prikazani na Slici 12. Vrijednosti su se kretale od  $95,32\% \pm 11,08\%$  do  $131,95\% \pm 22,52\%$ . Kao i kod rukole, nijedan

tretman nije bio statistički značajno različit od negativne kontrole. Može se zaključiti da tretman ekstraktima nije doveo do citotoksičnog odgovora te da su primijenjeni ekstrakti biokompatibilni s HepG2 stanicama. Pokazana biokompatibilnost ekstrakata špinata i rukole u ovome radu u skladu je s rezultatima biokompatibilnosti ekstrakata špinata (Simon i sur., 2023) i rukole (Ramazzina i sur., 2022) pronađenim u literaturi.



**Slika 11.** Vijabilnost HepG2 stanica tretiranih ekstraktima rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu ( $p < 0,05$ ). (Ctrl- - netretirana negativna kontrola; Ctrl+ stanice tretirane s  $500 \mu\text{M}$  tBOOH; RC–kontrolni ekstrakt rukole koja nije biofortificirana; RPVP-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; RPS-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbitatom; RHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; RSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)



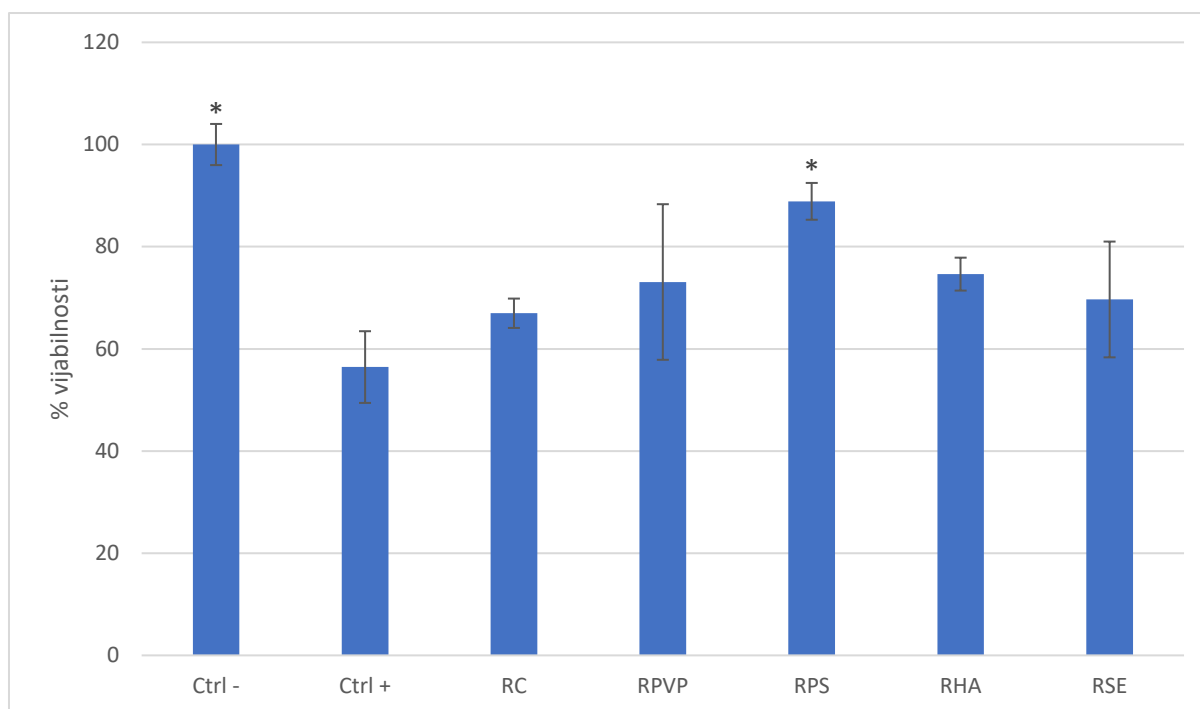
**Slika 12.** Vijabilnost HepG2 stanica tretiranih ekstraktima špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu ( $p < 0,05$ ). (Ctrl- - netretirana negativna kontrola; Ctrl+ stanice tretirane s 500  $\mu\text{M}$  tBOOH; ŠC–kontrolni ekstrakt špinata koji nije biofortificiran; ŠPVP-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; ŠPS-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbitatom; ŠHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; ŠSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)

#### 4.4. Antioksidativni učinak određen na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2)

U ovom ispitivanju MTT testom mjerena je vijabilnost stanica nakon predtretmana ekstraktima rukole i špinata te tretmana prooksidansom tBOOH. Pretpostavka je da ekstrakti mogu zaštititi stanice od negativnog učinka citotoksičnog agensa. Važno je primjetiti da su moguća dva mehanizma kojom ekstrakti mogu zaštititi stanice od djelovanja prooksidansa. Prvo, dodatkom tBOOH u medij s ekstraktima može doći do njegovog direktnog gašenja od strane antioksidanasa iz ekstrakata. Nadalje, budući da se stanice inkubiraju s ekstraktima tijekom 24 h, razumno je za pretpostaviti da dolazi do internalizacije određenih antioksidanasa u stanice i posljedično modulacije ekspresije gena uključenih u antioksidativnu obranu stanice. Dakle,

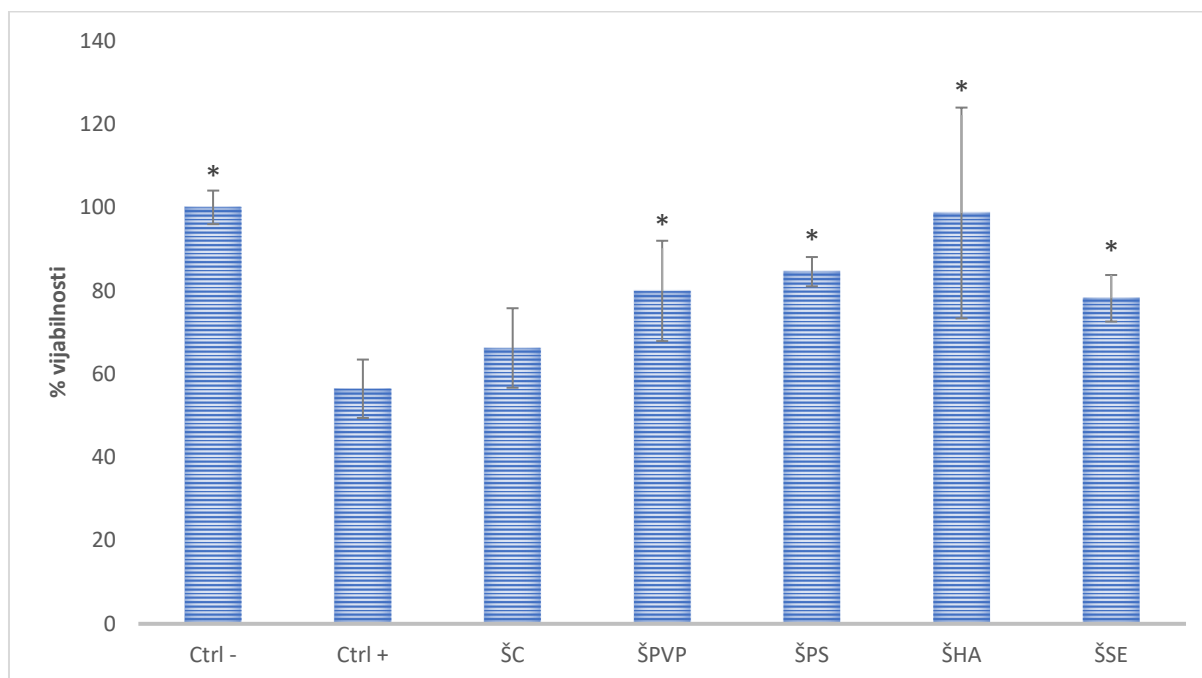
moгуće je da je osim direktnog gašenja radikala, za protektivni učinak odgovoran i stanični odgovor na predtretman ekstraktima. Rezultati za ekstrakte rukole su prikazani na Slici 13. Vrijednosti postotka vijabilnosti stanica uzoraka rukole nalazili su se između  $66,97\% \pm 2,87\%$  i  $88,88\% \pm 3,60\%$  u odnosu na negativnu kontrolu. Generalno gledajući, stanice predtretirane ekstraktima su imale veće vrijednosti postotka vijabilnosti od pozitivne kontrole. RPS se pokazao statistički značajno različitim u odnosu na pozitivnu kontrolu što ukazuje na pojačan antioksidativni odnosno protektivni učinak na stanice. Moгуće je da je ovaj tip nančestica selena imao jak utjecaj na sintezu antioksidativnih spojeva koji su potom pozitivno djelovali u zaštiti stanica od oksidacije.



**Slika 13.** Vijabilnost HepG2 stanica predtretiranih ekstraktima rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se i tretiranih sa 100  $\mu$ M tBOOH.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $p < 0,05$ ). (Ctrl- - netretirana negativna kontrola; Ctrl+ - stanice tretirane sa 100  $\mu$ M tBOOH; RC – kontrolni ekstrakt rukole koja nije biofortificirana; RPVP-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; RPS-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbitatom; RHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; RSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)

Kod špinata (Slika 14.) se vijabilnost stanica kretala između 66,23%  $\pm$  9,54% i 98,65%  $\pm$  25,31%. Stanice predtretirane ekstraktima biljaka biofortificiranih svim tipovima nanočestica selena su imale statistički značajno veću vijabilnost od pozitivne kontrole. Najveća vrijednost je primijećena u slučaju ŠHA. Kod ŠSE je također pokazana statistički značajna povećana vijabilnost u odnosu na pozitivnu kontrolu. Vidljivo je da je biofortifikacija špinata svim oblicima selena rezultiralo protektivnom ulogom na HepG2 stanice, dok je kod rukole isto vidljivo samo u slučaju RPS.



**Slika 14.** Vijabilnost HepG2 stanica predtretiranih ekstraktima špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se i tretiranih sa 100  $\mu\text{M}$  tBOOH. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Zvijezdica (\*) iznad stupca označava statistički značajnu razliku u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $p < 0,05$ ). (Ctrl- - netretirana negativna kontrola; Ctrl+ - stanice teretirane s 100  $\mu\text{M}$  tBOOH; ŠC–kontrolni ekstrakt špinata koji nije biofortificiran; ŠPVP-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama selena funkcionaliziranih polivinilpirolidonom; ŠPS-ekstrakt špinata biofortificiranog nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbatom; ŠHA-ekstrakt rukole biofortificirane nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom; ŠSE- ekstrakt rukole biofortificirane selenatom)

## 5. ZAKLJUČCI

- Biofortifikacija špinata i rukole nanočesticama selena ima značajan pozitivan učinak na antioksidativni potencijal njihovih ekstrakata, ovisno o karakteristikama primijenjenih SeNPs i vrsti biljke.
- Najveći antiradikalni učinak i redukcijski potencijal su pokazali ekstrakti rukole i špinata biofortificirani nanočesticama selena stabiliziranih huminskom kiselinom.
- Špinat je imao izraženiji odgovor na biofortifikaciju različitim oblicima selena u pogledu antiradikalnog učinka u usporedbi s rukolom.
- Biofortifikacija špinata i rukole nanočesticama selena nije imala negativan učinak na biokompatibilnost njihovih ekstrakata sa HepG2 staničnim linijama. Neovisno o obliku primijenjenog Se, dobiveni ekstrakti bili su biokompatibilni.
- Ekstrakti rukole i špinata su zaštitili HepG2 stanice od citotoksičnog učinka prooksidansa. Kod rukole je najveću protektivnu aktivnost imao ekstrakt biljaka biofortificiran nanočesticama selena stabiliziranim polisorbatom. Kod špinata je najveća aktivnost pokazana za ekstrakt biljaka biofortificiranih nanočesticama selena stabiliziranim huminskom kiselinom. Ekstrakti špinata biofortificirani svim oblicima Se korištenim u ovom istraživanju su pokazali protektivnu ulogu na HepG2 stanice.
- Nanočestice selena mogu biti korisne u biofortifikaciji biljaka sa selenom u slučaju da je površina nanočestica funkcionalizirana pogodnim molekulama poput huminske kiseline ili polisorbata. Takve nanočestice pokazale su se kao pogodan alternativni oblik selena za biofortifikaciju (u usporedbi sa selenatom, koji se najčešće primjenjuje u praksi).



## 6. POPIS KRATICA, TABLICA I SLIKA

### Popis kratica:

6PG - 6-fosfoglukonat

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

DI1 - Jodotironin dejodinaza 1

DI2 - Jodotironin dejodinaza 2

DI3 - Jodotironin dejodinaza 3

DMDSe - dimetildiselenid

DMSe - dimetilselenid

DMSO - dimetilsulfoksid

EDTA - etilendiamintetraacetat

FC - Folin-Ciocalteu

G6P - glukoza-6-fosfat

G6PD - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza

Gpx1 - Glutation peroksidaza 1

Gpx2 - Glutation peroksidaza 2

Gpx3 - Glutation peroksidaza 3

Gpx4 - Glutation peroksidaza 4

Gpx5 - Glutation peroksidaza 6

GR- glutation reduktaza

GSH - glutation

HA - huminska kiselina

MeSeCys - metilselenocistein

MsrB, SelR - Metionin-R-sulfoksid reduktaza

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid

NADP - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

PS - polisorbat

PVP - polivinilpirolidon

Se - selen

SeCys - selenocistein

SelH - Selenoprotein H

SelI - Selenoprotein I

SelK - selenoprotein K

SelM - Selenoprotein M  
SelN - Selenoprotein N  
SelO - Selenoprotein O  
SelP - Selenoprotein P  
SelS - Selenoprotein S  
SelT - Selenoprotein T  
SelV - Selenoprotein V  
SelW - Selenoprotein W  
SeMet - selenometionin  
SeNPs - selenove nanočestice  
Sep 15 - 15kDa selenoprotein  
SMT - selenocistein metiltransferaza  
SPS2 - Selenofosfat sintetaza 2  
T3 - trijodtironin  
T4 - tiroksin  
tBOOH - tert-butil-hidroperoksid  
TE - ekvivalent Trolox-a  
TEAC- Trolox equivalent antioxidant capacity  
TR1 - Tioredoksin reduktaza 1  
TR2 - Tioredoksin reduktaza 2  
TR3 - Tioredoksin reduktaza 3

**Popis tablica:**

Tablica 1. Porodice humanih selenoproteina i njihove funkcije

**Popis slika:**

Slika 1. Strukture selenovih aminokiselina

Slika 2. Mehanizam djelovanja glutacion peroksidaza

Slika 3. Načini biofortifikacije biljaka selenom

Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti postotka inhibicije (%I) o masenoj koncentraciji Troloxa (mg/L)

Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A-AB) o masenoj koncentraciji galne kiseline ( $\gamma$  GA) mjereno pri 750 nm

Slika 6. Mehanizam reakcije u MTT testu

Slika 7. Antiradikalni učinak ekstrakata rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se

Slika 8. Antiradikalni učinak ekstrakata špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se

Slika 9. Ukupni reduktivni potencijal ekstrakata rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se

Slika 10. Ukupni reduktivni potencijal ekstrakata špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se

Slika 11. Vijabilnost HepG2 stanica tretiranih ekstraktima rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se

Slika 12. Vijabilnost HepG2 stanica tretiranih ekstraktima špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se

Slika 13. Vijabilnost HepG2 stanica predtretiranih ekstraktima rukole biofortificirane različitim kemijskim oblicima Se i tretiranih sa 100  $\mu\text{M}$  tBOOH

Slika 14. Vijabilnost HepG2 stanica predtretiranih ekstraktima špinata biofortificiranog različitim kemijskim oblicima Se i tretiranih sa 100  $\mu\text{M}$  tBOOH.

## 7. LITERATURA

Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2007, 2, 875–877.

Ampong K, Thilakaranthna MS, Gorim LY. Understanding the Role of Humic Acids on Crop Performance and Soil Health. *Frontiers in Agronomy*, 4, 2022.

Barceloux DG. Selenium. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 1999, 37, 145-172.

da Silva DF, Cipriano PE, de Souza RR, Siueia M, Faquin V, de Souza Silva ML, Guilherme LRG. Biofortification with selenium and implications in the absorption of macronutrients in *Raphanus sativus* L. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 86.

Danso OP, Asante-Badu B, Zhang Z, Song J, Wang Z, Yin X, Zhu, R. Selenium Biofortification: Strategies, Progress and Challenges. *Agriculture (Switzerland)*, 2023, 13.

Fordyce F. Selenium geochemistry and health. *Ambio*, 2007, 36, 94-97.

Fordyce FM. Selenium deficiency and toxicity in the environment. *Essentials of Medical Geology: Revised Edition*. Springer Netherlands, 2013, 375–416.

Galić L, Galić V, Ivezić V, Zebec V, Jović J, Đikić M, Filipović A, Manojlović M, Almås ÅR, Lončarić Z. Modelling Leverage of Different Soil Properties on Selenium Water-Solubility in Soils of Southeast Europe. *Agronomy* 13, 2023.

Guignardi Z, Schiavon M. Biochemistry of Plant Selenium Uptake and Metabolism. U: Selenium in plants. Molecular, Physiological, Ecological and Evolutionary Aspects. Pilon-Smits EAH, Winkel LHE, Lin ZQ, urednici, Springer, 2017, str. 21–34.

Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman, R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*, 2023, 7, 70-77.

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. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13, 2107-2128.

Islam MZ, Park BJ, Kang HM, Lee YT. Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. *Food Chemistry*, 2020, 309.

Jones GD, Winkel LHE. Multi-scale Factors and Processes Controlling Selenium Distributions in Soils. U: Selenium in plants. Molecular, Physiological, Ecological and Evolutionary Aspects. Pilon-Smits EAH, Winkel LHE, Lin ZQ, urednici, Springer, 2017, str. 3–20.

Kaur N, Sharma S, Kaur S, Nayyar H. Selenium in agriculture: A nutrient or contaminant for crops? *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2014, 60, 1593-1624.

Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 2019, 12, 908-931.

Kieliszek M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules*, 2019, 24.

Kieliszek M, Błazejak S. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 2013, 29, 713-718.

Kurokawa S, Berry MJ. Selenium. Role of the essential metalloid in health. *Metal Ions in Life Sciences*, 2013, 13, 499–534.

Lidon FC, Oliveira K, Riberio MM, Pelica J, Pataco I, Ramalho JC, Leitão AE, Almeida AS, Campos PS, Ribeiro-Barros AI, Pais I, Silva M, Pessoa M, Reboredo FH. Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. *Journal of Cereal Science*, 2018, 81, 22–29.

Liu D, Li H, Wang Y, Ying Z, Bian Z, Zhu W, Liu W, Yang L, Jiang D. How exogenous selenium affects anthocyanin accumulation and biosynthesis-related gene expression in purple lettuce. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2017, 26(2), 717-722.

Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 2013, 18, 3292-3311.

Pannico A, El-Nakhel C, Kyriacou M, Giordano M, Stazi S, De Pascale S, Roupheal Y. Combating Micronutrient Deficiency and Enhancing Food Functional Quality Through Selenium Fortification of Select Lettuce Genotypes Grown in a Closed Soilless System. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10.

Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake

in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71, 17543-17553.

Ramazina I, Lolli V, Lacey K, Tappi S, Rocculi P, Rinaldi M. Fresh-Cut *Eruca Sativa* Treated with Plasma Activated Water (PAW): Evaluation of Antioxidant Capacity, Polyphenolic Profile and Redox Status in Caco2 Cells. *Nutrients* 14, 2022.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26, 1231–1237.

Schiavon M, Dall'Acqua S, Mietto A, Pilon-Smits E, Sambo P, Masi A, Malagoli M. Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 10542–10554.

Simon A, Mazhar S, Khokhlova E, Leeuwendaal N, Phipps C, Daeton J, Rea L, Colom J. Solarplast®—An Enzymatically Treated Spinach Extract. *Plants*, 2023, 12.

Skrypnik L, Novikova A, Tokupova E. Improvement of phenolic compounds, essential oil content and antioxidant properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) depending on type and concentration of selenium application. *Plants*, 2019, 8(11).

Wang Q, Zhang J, Zhao B, Xin X, Deng X, Zhang H. Influence of Long-Term Fertilization on Selenium Accumulation in Soil and Uptake by Crops. *Pedosphere*, 2016, 26, 120–129.

Yasin M, El Mehdawi AF, El Mehdawi A, Jahn C, Anwar A, Turner M, Faisal M, Pilon-Smits EA. Seleniferous soils as a source for production of selenium-enriched foods and potential of bacteria to enhance plant selenium uptake. *Plant and Soil*, 2014, 386, 385–394.

Zhu Z, Zhang Y, Liu J, Chen Y, Zhang X. Exploring the effects of selenium treatment on the nutritional quality of tomato fruit. *Food Chem*, 2018, 252, 9–15.



## 8. SAŽETAK

Selen je esencijalan mikronutrijent čiji je nedovoljan unos zabilježen u Hrvatskoj, ali i u ostatku svijeta. Biljke apsorbiraju selen iz tla te su odgovorne za njegovu primarnu akumulaciju u hranidbenom lancu. Zbog toga je biofortifikacija biljaka selenom koristan način za osiguravanje optimalnog unosa selena u populaciji. Selen u obliku nanočestica je noviji oblik selena za koji se pretpostavlja da ima poboljšanu bioraspoloživost i manju toksičnost u odnosu na anorganske i organske oblike selena. Biofortifikacija selenom može dovesti do optimalnog sadržaja selena u biljkama za ljudsku prehranu te povećan sadržaj antioksidansa, budući da može utjecati na biosintezu fenolnih spojeva i ostalih sekundarnih metabolita u biljaka.

U ovom radu istražena je antioksidativna aktivnost ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih različitim kemijskim oblicima selena. Najveći antiradikalni i redukcijski potencijal je pokazan za ekstrakte rukole i špinata biofortificiranih s nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom. Svi ekstrakti su se pokazali biokompatibilnima na HepG2 stanicama. Dokazan je i protektivni antioksidativni učinak ekstrakata protiv prooksidansa. On je ovisio o kemijskom obliku selena primjenjenom za biofortifikaciju. U slučaju rukole najjači učinak je pokazan za ekstrakt biljaka biofortificiranih nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbatom, dok je kod špinata najjači učinak primjećen za ekstrakt biljaka biofortificiranih nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom.

Biofortifikacija je imala utjecaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata te je ovisila o primjenjenom kemijskom obliku selena. Nanočestice su se pokazale kao moguća alternativa selenatu budući da su utjecale na poboljšanje antioksidativnih svojstava rukole i špinata što posljedično može imati blagotvoran utjecaj na zdravlje.

## SUMMARY

Selenium is an essential micronutrient and its insufficient intake has been recorded in Croatia and other parts of the world. Plants absorb selenium from the soil and are responsible for its primary accumulation in the food chain. For this reason, biofortification of plants with selenium is a useful way to ensure optimal intake of selenium in the population. Selenium nanoparticles are relatively novel form of selenium with hypothesized improved bioavailability and reduced toxicity compared to inorganic and organic forms of selenium. Biofortification with selenium can lead to optimal selenium content in plants for human consumption and increased antioxidant content, since it can affect the biosynthesis of phenolic compounds and other secondary metabolites in plants.

In this paper, the antioxidant activity of arugula and spinach extracts biofortified with different chemical forms of selenium was investigated. The highest anti-radical and reductive potential was shown for arugula and spinach extracts biofortified with selenium nanoparticles functionalized with humic acid. All extracts were shown to be biocompatible with HepG2 cells. The protective antioxidant effect of the extract against pro-oxidants has also been proven. It was dependent on the chemical form of selenium used for biofortification. In the case of arugula, the greatest effect was shown for the extract of plants biofortified with selenium nanoparticles functionalized with polysorbate, while in spinach the greatest effect was seen for the extract of plants biofortified with selenium nanoparticles functionalized with humic acid.

Biofortification had an impact on the antioxidative activity of the extracts and it was dependent on the applied chemical form of Se. Nanoparticles can be considered as a potential alternative to selenate in biofortification, since they significantly affected the antioxidant properties of arugula and spinach, which can consequently have a beneficial effect on human health.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Studij: Farmacija

Zavod za prehranu i dijetoterapiju

Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

### *Antioksidativna aktivnost ekstrakata špinata i rukole biofortificiranih nanočesticama selena*

*Jakov Mlinar*

#### SAŽETAK

Selen je esencijalan mikronutrijent čiji je nedovoljan unos zabilježen u Hrvatskoj, ali i u ostatku svijeta. Biljke apsorbiraju selen iz tla te su odgovorne za njegovu primarnu akumulaciju u hranidbenom lancu. Zbog toga je biofortifikacija biljaka selenom koristan način za osiguravanje optimalnog unosa selena u populaciji. Selen u obliku nanočestica je noviji oblik selena za koji se pretpostavlja da ima poboljšanu bioraspodivnost i manju toksičnost u odnosu na anorganske i organske oblike selena. Biofortifikacija selenom može dovesti do optimalnog sadržaja selena u biljkama za ljudsku prehranu te povećan sadržaj antioksidansa, budući da može utjecati na biosintezu fenolnih spojeva i ostalih sekundarnih metabolita u biljaka.

U ovom radu istražena je antioksidativna aktivnost ekstrakata rukole i špinata biofortificiranih različitim kemijskim oblicima selena. Najveći antiradikalni i redukcijski potencijal je pokazan za ekstrakte rukole i špinata biofortificiranih s nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom. Svi ekstrakti su se pokazali biokompatibilnima na HepG2 stanicama. Dokazan je i protektivni antioksidativni učinak ekstrakata protiv prooksidansa. On je ovisio o kemijskom obliku selena primjenjenom za biofortifikaciju. U slučaju rukole najjači učinak je pokazan za ekstrakt biljaka biofortificiranih nanočesticama selena funkcionaliziranih polisorbitom, dok je kod špinata najjači učinak primjećen za ekstrakt biljaka biofortificiranih nanočesticama selena funkcionaliziranih huminskom kiselinom.

Biofortifikacija je imala utjecaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata te je ovisila o primjenjenom kemijskom obliku selena. Nanočestice su se pokazale kao moguća alternativa selenatu budući da su utjecale na poboljšanje antioksidativnih svojstava rukole i špinata što posljedično može imati blagotvoran utjecaj na zdravlje.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 14 grafičkih prikaza, 1 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanočestice selena, biofortifikacija, antioksidativna aktivnost, biokompatibilnost, špinat, rukola

Mentor: **Dr. sc. Emerik Galić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Emerik Galić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of nutrition and diet therapy

Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

### *Antioxidant activity of spinach and arugula extracts biofortified with selenium nanoparticles*

*Jakov Mlinar*

#### **SUMMARY**

Selenium is an essential micronutrient and its insufficient intake has been recorded in Croatia and other parts of the world. Plants absorb selenium from the soil and are responsible for its primary accumulation in the food chain. For this reason, biofortification of plants with selenium is a useful way to ensure optimal intake of selenium in the population. Selenium nanoparticles are relatively novel form of selenium with hypothesized improved bioavailability and reduced toxicity compared to inorganic and organic forms of selenium. Biofortification with selenium can lead to optimal selenium content in plants for human consumption and increased antioxidant content, since it can affect the biosynthesis of phenolic compounds and other secondary metabolites in plants.

In this paper, the antioxidant activity of arugula and spinach extracts biofortified with different chemical forms of selenium was investigated. The highest anti-radical and reductive potential was shown for arugula and spinach extracts biofortified with selenium nanoparticles functionalized with humic acid. All extracts were shown to be biocompatible with HepG2 cells. The protective antioxidant effect of the extract against pro-oxidants has also been proven. It was dependent on the chemical form of selenium used for biofortification. In the case of arugula, the greatest effect was shown for the extract of plants biofortified with selenium nanoparticles functionalized with polysorbate, while in spinach the greatest effect was seen for the extract of plants biofortified with selenium nanoparticles functionalized with humic acid.

Biofortification had an impact on the antioxidative activity of the extracts and it was dependent on the applied chemical form of Se. Nanoparticles can be considered as a potential alternative to selenate in biofortification, since they significantly affected the antioxidant properties of arugula and spinach, which can consequently have a beneficial effect on human health.

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

Thesis includes: 46 pages, 14 figures, 1 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Selenium nanoparticles, biofortification, antioxidant activity, biocompatibility, spinach, arugula

Mentor: **Emerik Galić, Ph.D. Assistant**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Emerik Galić, Ph.D. Assistant**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

**Laura Nižić Nodilo, Ph.D. Assistant**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024.