

Učinci ekstrakata češnjaka (*Allium sativum*) na rast normalnih stanica i njihova antioksidativna aktivnost

Ljubanović, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:442084>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske
dijagnostike**

Iva Ljubanović

**UČINCI EKSTRAKATA ČEŠNJAKA
(*ALLIUM SATIVUM*) NA RAST
NORMALNIH STANICA I NJIHOVA
ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST**

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske
dijagnostike**

Iva Ljubanović

**UČINCI EKSTRAKATA ČEŠNJAKA
(*ALLIUM SATIVUM*) NA RAST
NORMALNIH STANICA I NJIHOVA
ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST**

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Katedri za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc.dr.sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima 27 listova, 1 tablicu i 5 slika.

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Katarini Mišković Špoljarić na pomoći, sugestijama i uloženom trudu tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Također zahvaljujem i bacc.med.lab.diagn. Ivani Jelavić na iskazanoj potpori i korisnim savjetima tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Velika hvala mojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.

Sadržaj:

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Češnjak i njegovo fiziološko djelovanje | 1 |
| 1.1.1. Aktivni spojevi češnjaka | 1 |
| 1.1.2. Utjecaj spojeva češnjaka na organizam | 2 |
| 1.2. Kultura stanica i uzgoj..... | 3 |
| 1.2.1. Kultura stanica | 3 |
| 1.2.2. <i>In vitro</i> uzgoj stanica | 4 |
| 1.3. Oksidativni stres..... | 5 |
| 1.3.1. Slobodni radikali..... | 5 |
| 1.3.2. Antioksidansi..... | 5 |
| 1.3.3. Utjecaj slobodnih radikala i antioksidanasa na organizam | 6 |
| 1.4. Metode određivanja citotoksičnosti i antioksidativnosti..... | 6 |
| 1.4.1. Testovi citotoksičnosti | 6 |
| 1.4.2. Određivanje antioksidativnog statusa pomoću DPPH | 7 |
| 2. HIPOTEZA | 8 |
| 3. CILJ | 9 |
| 4. MATERIJALI I METODE | 10 |
| 4.1. Ustroj studije..... | 10 |
| 4.2. Materijali..... | 10 |
| 4.2.1. Stanične linije..... | 10 |
| 4.2.2. Ispitivani spojevi..... | 10 |
| 4.2.3. Kemikalije | 11 |
| 4.3. Metode | 11 |
| 4.3.1. Uzgoj i brojanje stanica <i>in vitro</i> | 11 |
| 4.3.2. Određivanje citotoksičnosti MTT testom | 13 |
| 4.3.3. Određivanje antioksidacijskog statusa-DPPH metoda..... | 14 |
| 4.4. Statističke metode | 14 |
| 5. REZULTATI | 15 |
| 6. RASPRAVA | 18 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 7. ZAKLJUČAK..... | 20 |
| 8. SAŽETAK..... | 21 |
| 9. SUMMARY..... | 22 |
| 10. LITERATURA | 23 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 27 |

Popis kratica:

DADS - dialil disulfid

DAS - dialil sulfid

DATS - dialil trisulfid

DPPH - 2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2.5-difeniltetrazolium bromid

RNS - slobodni dušikovi radikali (eng. reactive nitrogen species)

ROS - slobodni kisikovi radikali (engl. reactive oxygene species)

SAC - S-alilcistein

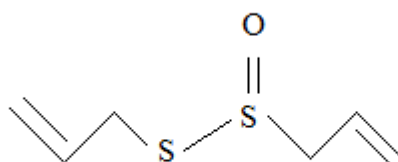
SAMC - S-alil merkaptocistein

1. UVOD

1.1. Češnjak i njegovo fiziološko djelovanje

1.1.1. Aktivni spojevi češnjaka

Još od doba starog Egipta češnjak (*Allium sativum*) je poznat po svojim ljekovitim svojstvima. Koristio se kao lijek za mnoga patološka stanja. Stari su Egipćani vjerovali kako češnjak liječi sve, od hemoroida do ugriza zmija (1). Biljka je to koja, smatra se, potječe iz središnje Azije (2). Međutim, glas o terapeutskim svojstvima češnjaka brzo se proširio pa je tako vrlo brzo našao svoje mjesto u alternativnoj medicini zemalja diljem Europe, a i šire. Svoje mjesto kao alternativni lijek ima i danas, a sve je više istraživanja koja pokušavaju ustanoviti kako mehanizme djelovanja, tako i otkriti koji su to aktivni sastojci koji češnjak čine jednom od najljekovitijih biljaka. Češnjak se uvelike ističe među drugim biljkama po svojim svojstvima. Raznim istraživanjima češnjaka otkriveno je da češnjak sadrži više od 2000 biološki aktivnih tvari čime postaje superiorniji i od nekih mu srodnih biljaka kao što je primjerice luk (1, 3). Kemijski, češnjak sadrži 65% vode, 28% ugljikohidrata, 1.8% proteina, 2.3% spojeva sumpora, 1.5% vlakana te 0.15% lipida (4). Ostale tvari koje može sadržavati u manjim količinama, ali ne i manje važne su vitamini i minerali. Bitno je spomenuti vitamin C, vitamine B kompleksa (B1, B2, B3), provitamin A te kalij, magnezij i kalcij kao predstavnike minerala (1). Također, češnjak može sadržavati elemente željeza, kobalta, nikla, i selenija u tragovima (1).



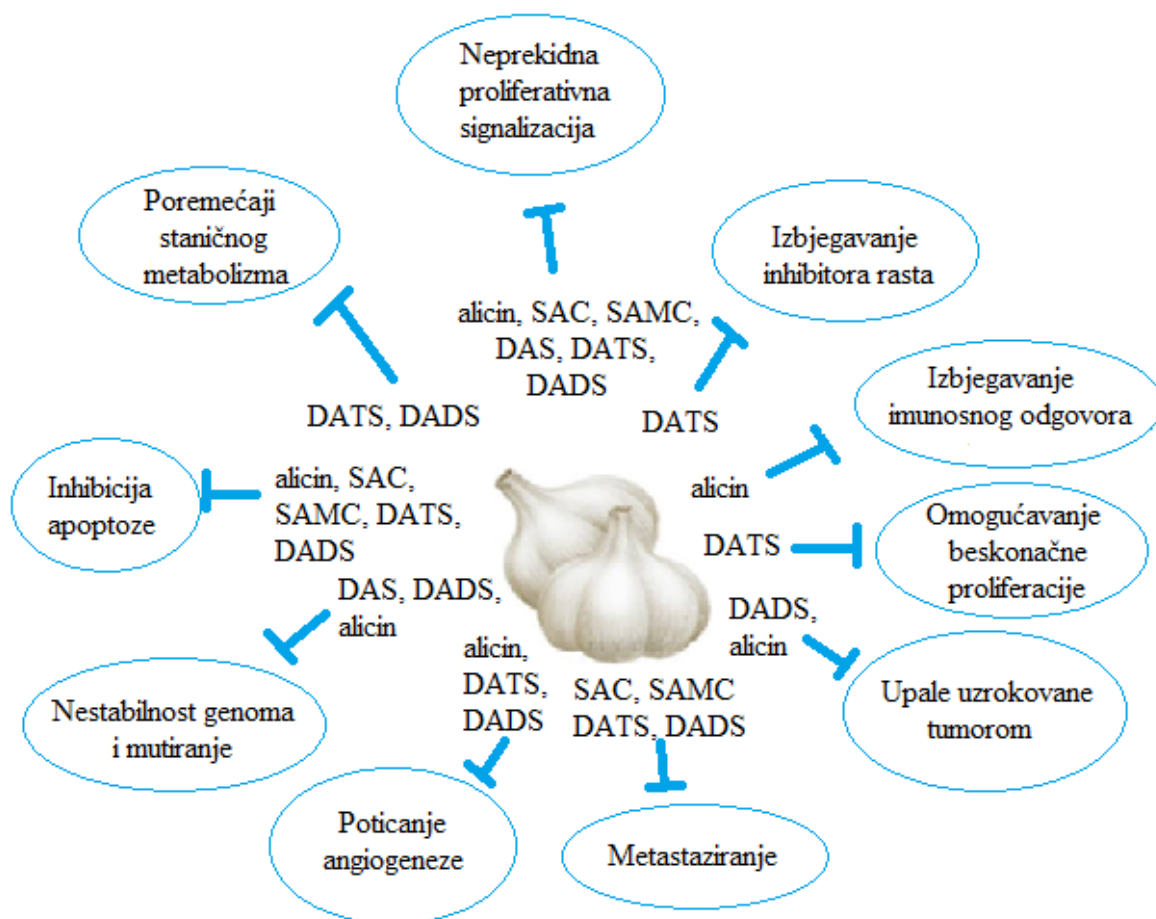
Slika 1. Kemijska struktura alicina

Spojevi sumpora najznačajniji su za biološku aktivnost češnjaka (4, 5, 6). Vrlo su reaktivni i nestabilni pa iz njih vrlo lako nastaju novi spojevi koji zajedničkim djelovanjem imaju još povoljniji utjecaj na organizam. Posebice se ističe alin koji se oslobađa iz iscijeđenih glavica češnjaka te se djelovanjem enzima alinaze i kondenzacijom hidrolizira u alicin (7). Tip i koncentracija dobivenog spoja sumpora uvelike ovise o postupku pripravljanja ekstrakta (4). Tako ekstrakcijom češnjaka pomoću etanola na temperaturi nižoj od 0 °C stupnjeva dobivamo alin, dok ekstrakcijom etanolom i vodom na 25 °C nastaje alicin (Slika 1) (1).

1.1.2. Utjecaj spojeva češnjaka na organizam

Zbog svoje izrazite reaktivnosti i nestabilnosti, alin i alicin vrlo brzo nestaju u organizmu te zbog toga nemaju značajnije fiziološko djelovanje. Međutim, prekursori su hlapljivih derivata kao što su dialil sulfid (DAS) i dialil trisulfid (DATS) te sumpornih spojeva topljivih u vodi u kojima pripadaju S-alilcistein (SAC) i S-alilmerkaptocistein (SAMC) (8). Upravo ti novonastali spojevi zaslužni su za povoljne učinke češnjaka na organizam, ne samo u smislu liječenja već i u smislu prevencije određenih bolesti. Osim sumpornih spojeva češnjak je bogat i drugim bioaktivnim spojevima kao što su flavonoidi, saponini, arginini i dr. (2,8,9). U narodu češnjak se često smatra odličnim izborom i za prevenciju sveprisutne gripe. Brojna istraživanja i radovi svjedoče dokazanom terapijskom učinku češnjaka na ljudsko zdravlje. Otkriveno je da češnjak smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti inhibirajući agregaciju trombocita i snižavajući razine kolesterola u krvi, a samim time i krvni tlak (9). Svojim antikancerogenim, antitrombotskim, antidijabetičkim i antioksidativnim djelovanjem češnjak ima značajnu ulogu u prevenciji kroničnih bolesti. Djelujući na metabolizam lijekova, sprječava nefrotoksičnost kod bubrenih bolesnika liječenih cisplatinom, a pozitivan učinak na jetru ima uvijek sprječavajući progresiju fibroze (6,10). Poznato je i učinkovito djelovanje češnjaka protiv rasta, razvoja i razmnožavanja bakterija, virusa, gljiva i parazita. Zahvaljujući sumpornim spojevima, češnjak ima antioksidativno djelovanje kao i sposobnost poticanja apoptoze. Upravo su ta svojstva najznačajnija u borbi protiv tumorskih stanica (11). Češnjak djeluje protiv raznih karcinoma uključujući karcinome dojke, maternice, prostate, a najznačajnije je djelovanje protiv karcinoma probavnog sustava (7,12). Ipak, neki fiziološki učinci češnjaka kao što su djelovanje na metabolizam lijekova i sprječavanje zgrušavanja krvi

kod nekih pacijenata s već postojećim sličnim problemima mogu biti smrtonosni (13). Budući da postoji mogućnost da češnjak uzrokuje smetnje pri razvoju hipokampusa i kognitivnih sposobnosti, potrebno je nastaviti s istraživanjima o utjecaju na trudnice, dojilje te djecu mlađu od 10 godina (13).



Slika 2. Fiziološki učinak sumpornih spojeva. (preuzeto (14) i prilagođeno)

1.2. Kultura stanica i uzgoj

1.2.1. Kultura stanica

Razvoju današnje medicine uvelike je pridonijela mogućnost provođenja istraživanja na staničnim kulturama. Na taj je način moguće uzgajati, umnožavati i proučavati stanice pod

kontroliranim uvjetima koje se nalaze *in vitro*, dakle izvan organizma iz kojeg potječu. Stanične kulture dijelimo na suspenzijske, koje rastu slobodno u tekućem mediju i adherentne koje prijanjaju za stjenku posudice za kultivaciju. Svaka kultivacija stanica započinje izoliranjem pojedinačnih stanica iz izvornog tkiva mehaničkim putem ili pomoću enzima te njihovim nasađivanjem na hranjivi medij. 1955. Harry Eagle prvi je opisao točno definiran medij koji omogućuje rast animalnih stanica što je označavalo veliku prekretnicu na ovom području (15). Ustanovio je da medij pogodan za rast stanica treba sadržavati, osim soli i glukoze, aminokiseline, vitamine te serum kao izvor faktora rasta. Faktori rasta iznimno su bitni u staničnoj signalizaciji pa time i pri poticanju proliferacije, regulaciji rasta i diferencijaciji stanica. Osim pogodnog medija i njegove količine za uspješan rast stanica nužno je osigurati odgovarajući pH, sterilnost, odgovarajuće posude za uzgoj, optimalnu temperaturu i koncentraciju CO₂ i naravno, kvalitetno izdvojene stanice. Optimalna temperatura od 37°C i 5%-tna koncentracija ugljikovog dioksida održavaju se pomoću inkubatora dok se kontrola pH vrši vizualno provjerom boje medija. Promjena boje medija indikator je promjene pH što zahtijeva zamjenu trenutnog medija novim. Nerijetka je pojava zagađenje stanične kulture pa je u svrhu prevencije rad sa staničnim kulturama nužno obavljati u kabinetima i u sterilnim uvjetima. Kako bi se osigurala sterilnost, osoblje je dužno nositi zaštitnu opremu kao što su rukavice, kuta, kapa i maska za lice, a pribor za rad, ukoliko se ne koristi sterilan jednokratni plastični pribor, mora biti steriliziran autoklaviranjem.

1.2.2. *In vitro* uzgoj stanica

In vitro tehnikom uzgoja moguće je kultivirati razne stanične linije. Čak i u optimalnim uvjetima, stanični ciklus (vrijeme jedne stanične diobe) animalnih stanica koje najaktivnije rastu u kulturi traje 20 sati (15). Većina normalnih, nemutiranih stanica dijele se dok ne prekriju podlogu na kojoj rastu u jednom sloju te kao posljedicu skraćenja telomera svakom diobom imaju ograničen broj dioba. Nasuprot tome, tumorske stanice i embrionalne matične stanice zbog aktivnosti telomeraze mogu se dijeliti neograničen broj puta i rastu u nekoliko slojeva. Takve stanice nazivamo permanentnim ili besmrtnim staničnim linijama. Embrionalne matične stanice odličan su izbor za uzgoj zbog mogućnosti diferencijacije u bilo koji tip stanica odraslog organizma dok su fibroblasti i tumorske stanice često korišteni zbog brzine rasta. Stanice koje nastanu proliferacijom izvornih stanica izoliranih iz tkiva nazivamo

primarnom staničnom kulturom. Porastom broja stanica moguće ih je resuspendirati i nasaditi na novi medij kojim dobivamo sekundarnu staničnu kulturu (16).

1.3. Oksidativni stres

1.3.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali definirani su kao kemijske vrste koje posjeduju nesporeni elektron (17). Postoje slobodni kisikovi (engl. reactive oxygene species, ROS) i slobodni dušikovi radikali (engl. reactive nitrogen species, RNS). Zahvaljujući posjedovanju dva nesporena elektrona u vanjskoj ljusci kisika, usporeno je direktno povezivanje kisika s organskim spojevima što omogućava oksidaciju goriva u respiracijskom lancu. Na taj način nastaju slobodni kisikovi radikali s jednim nesporenim elektronom. Takvi spojevi zbog svoje izrazite nestabilnosti i reaktivnosti lako reagiraju s anorganskim ili organskim spojevima. Karakteriziraju ih kaskadne reakcije kojima iz jednog slobodnog kisikovog radikala stvara drugi. Nekoliko organela unutar stanice u mogućnosti je proizvoditi slobodne radikale, uključujući peroksisome, endoplazmatski retikulum, lizosome, endosome i jezgru (18). Unutrašnji izvori nastanka slobodnih radikala su enzimski sustavi, autooksidacija i respiracijski lanac, dok su vanjski mogući izvori ionizirajuće zračenje ili dim cigareta. Neki od značajnijih reaktivnih kisikovih vrsta su superoksidni radikal kojemu je glavni izvor respiracijski lanac zatim vodikov peroksid značajan kao preteča hidroksilnog radikala koji je najreaktivniji radikal (19).

1.3.2. Antioksidansi

Kako bi se zaštitio od mogućih štetnih utjecaja slobodnih radikala, organizam posjeduje obrambene mehanizme kojima se bori protiv njih. Antioksidansom se smatra spoj, koji prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, znatno odgađa ili sprječava oksidaciju te tvari (19). Nekoliko je načina kojima antioksidansi djeluju. Poneki sprječavaju nastanak samih slobodnih radikala blokadom samog enzima potrebnog za njihov nastanak ili vezanjem slobodnih iona te takve antioksidanse nazivamo preventivnima. Druga skupina

uklanja već nastale slobodne radikale i nazivaju se čistačima dok treći, enzimi popravka, popravljaju već nastala oštećenja. Češnjak kao antioksidans ima potencijal reducirati slobodne radikale (19). Njegova antioksidativna svojstva rezultat su prisutnih sumpornih spojeva. S-alilmerkaptocistein, jedan od vodotopljivih sumpornih derivata češnjaka, ima antioksidativna i protuupalna svojstva te ima bitnu ulogu u zaštiti stanica od apoptoze (6).

1.3.3. Utjecaj slobodnih radikala i antioksidanasa na organizam

U normalnom, zdravom organizmu, slobodni kisikovi radikali nužni su za izvršenje nekih fizioloških funkcija. Nastaju tijekom anaerobnog metabolizma, a troše se za proizvodnju energije, sintezu hormona štitnjače, sudjeluju u procesu fagocitoze, a značajnu ulogu imaju i u prijenosu signala i održavanju vaskularnog tonusa. Međutim, postoji stanje u kojem dolazi do neravnoteže slobodnih radikala i antioksidanasa u korist slobodnih radikala. Dakle, povećana je oksidacija pri čemu nastaje prekomjerna količina slobodnih radikala. Tako se stanje naziva oksidativni stres, a uzrok je brojnih patoloških promjena u organizmu. Oksidativni stres ima bitnu ulogu u nastanku raznih stanja i bolesti kao što su starenje, upala, dijabetes, rak i neurodegenerativne bolesti (17). Posljedice su to prijeloma strukture DNA, povećanja unutarstaničnog slobodnog kalcija, oštećenja membranskih ionskih transportera i proteina te peroksidacije lipida. Nedavna istraživanja provedena na seoskoj populaciji pokazala su da je već u predijabetičkom stanju značajno snižena koncentracija slobodnog glutationa, antioksidansa, čime je dokazan oksidativni stres (21). Već navedena promjene uzrokuju apoptozu prvotno zdravih stanica i na taj način ugrožavaju organizam.

1.4. Metode određivanja citotoksičnosti i antioksidativnosti

1.4.1. Testovi citotoksičnosti

Testovi citotoksičnosti omogućavaju procjenu broja živućih stanica. Bitno je to ispitati, ne samo kako bi se kontrolirala sama proliferacija stanica u kulturi koja se uzgaja, već i ukoliko je riječ o ispitivanju djelovanja nekog spoja na staničnu liniju. Test citotoksičnosti može služiti kao potvrda toksičnosti odnosno netoksičnosti spoja za stanice. Citotoksičnost možemo

mjeriti na nekoliko načina: određivanjem markera proteaza, detektiranjem adenozin trifosfata te redukcijom resazurina ili tetrazolijuma. Test redukcije tetrazolijumom (MTT test) kolorimetrijski je test. Metabolički aktivne stanice s funkcionalnim mitohondrijima proizvode mitohondrijsku sukcinat-dehidrogenazu koja uzrokuje redukciju žuto obojenog tetrazolijuma u ljubičasto obojeni formazan. Intenzitet promjene boje mjeri se spektrofotometrijski s maksimumom apsorpcije na 570nm. Jačina izmjerenog signala proporcionalna je vijabilnosti stanica. Prije samog mjerenja tetrazolijum je potrebno inkubirati sa stanicama određeno vrijeme.

1.4.2. Određivanje antioksidativnog statusa pomoću DPPH

DPPH metoda određivanja antioksidativnosti pripada metodama s tzv. SET mehanizmom djelovanja pri čemu molekula antioksidansa reducira drugu molekulu otpuštanjem elektrona. DPPH stabilni je slobodni radikal organskog dušika, maksimalne apsorpcijske vrijednosti 515-528nm. Otopljen u etanolu ili metanolu DPPH poprima tamno ljubičastu boju. Djelovanjem antioksidansa, DPPH se reducira što je praćeno gubitkom boje DPPH i sniženjem apsorpcije koja se tada mjeri na 515nm. Dakle, što je veće antioksidativno djelovanje nekog spoja, otopina DPPH će biti bljeđa. Iako DPPH metoda određivanja antioksidacijskog statusa brza i jednostavna, treba pripaziti na utjecaj pH sredine i ionizacijski potencijal (22).

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da ekstrakti češnjaka ne djeluju inhibitorno na rast normalnih staničnih linija i da pokazuju antioksidativni učinak. Biološka aktivnost, tj. antioksidativni kapacitet ekstrakata ovisi o načinu proizvodnje češnjaka.

3. CILJ

1. Ispitati učinak pet ekstrakata češnjaka na rast normalnih staničnih linija *in vitro* i odrediti njihov antioksidativni kapacitet.
2. Utvrditi utječe li razlika u načinu proizvodnje češnjaka na ukupnu aktivnost ispitivanih uzoraka.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

- Pokusno (eksperimentalno) istraživanje

4.2. Materijali

4.2.1. Stanične linije

Biološko djelovanje ekstrakata češnjaka ispitano je na normalnim, adherentnim staničnim linijama; jednoj humanoj i jednoj psećoj.

Korištene stanične linije:

- MDCK-1 - zdrave epitelne stanice bubrega psa, pasaža 24, zbog osjetljivosti na viruse pogodne su za istraživanje virusa i razvoj cjepiva
- BJ - zdravi fibroblasti humanog podrijetla izolirani iz prepucija muškog novorođenčeta, telomeraza negativna stanična linija s dugom sposobnošću dijeljenja u pasaži 34

4.2.2. Ispitivani spojevi

Vodeni ekstrakti češnjaka pripremljeni su primjenom ultrazvučne tehnologije na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku. U istraživanju je korišteno pet ekstrakata češnjaka od čega su dva dobivena iz češnjaka kupljena komercijalno (u trgovini), dva su uzorka dobivena iz organski (iz OPG-a) proizvedenog češnjaka dok je jedan uzorak dobiven iz češnjaka uzgojenog na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Iz početnih koncentrata češnjaka od 100 mg/mL napravljena su radna razrjeđenja s destiliranom vodom koja su dodana na stanice do finalne koncentracije od 5, 4, 3 i 2 mg/mL.

Tablica 1. Izvori ispitivanih uzoraka

| Broj ekstrakta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------|--------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| Izvor češnjaka | Biouzgoj OSIJEK | Biouzgoj BARANJA | Poljoprivredni fakultet OS | Komercijalna kupnja | Komercijalna kupnja |

4.2.3. Kemikalije

- Dulbecco modificirani Eagle-ov medij (DMEM), Roswell Park Memorial Institute
- Fetalni goveđi serum (FBS), 0,25 % tripsin EDTA, antibiotik-antimikotik 100x; GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija)
- Tripansko plavilo, 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT), L-glutamin, Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD)
- Dimetil sulfoksid (DMSO); Acros organics (New Jersey, SAD)
- Fosfatni pufer (eng. Phosphate Buffered Saline, PBS) pripremljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7.4
- Metanol; Merck (Njemačka)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); Fluka (Njemačka)
- Trolox; Sigma (Njemačka)

4.3. Metode

4.3.1. Uzgoj i brojanje stanica *in vitro*

Uzgoj: Adherentne stanične linije uzgajaju se u strogo kontroliranim i sterilnim uvjetima. Za nasadivanje stanica koriste se T-bočice (BD, Falcon, Njemačka) površine 25 cm² prilagođene uzgoju stanica koje adheriraju na podlogu. Prije same kultivacije sve se kemikalije, koje dolaze u kontakt sa stanicama, temperiraju na sobnu temperaturu. Kao hrana za uzgajane adherentne stanice koristi se 5mL DMEM medija koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS-a), 2mM L-glutamina te 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika kako bi se spriječilo moguće zagađenje stanične kulture. Međutim, ukoliko stanice ne želimo samo održavati već ih iskoristiti za pokus, tada se koristi DMEM bez antibiotika/antimikotika zbog moguće interferencije pri mjerenju testnih spojeva. Nakon nasadivanja, kultivacija stanica odvija se u inkubatoru (IGO 150CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) pri temperaturi od 37°C i atmosferi od 5% CO₂ zasićenoj vlagom. Napredak kultivacije svakodnevno se provjerava pomoću invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Ukoliko je kultivacija uspješna, stanice je moguće presađivati svaka 3 dana.

Presadivanje: Ukoliko je potrebno presaditi i nastaviti uzgajati staničnu liniju, prethodno umnožene stanice potrebno je odvojiti od iskorištenog medija te ih odvojiti od stjenke bočice. Postojeći, iskorišteni medij, odstrani se nakon čega je stanice potrebno isprati s 2-5mL PBS-a kako bi se otklonio i ostatak zaostalog medija. Nakon ovog postupka u bočici ostanu samo stanice polijepljene za dno bočice koje se odvajaju djelovanjem tripsina. Tripsin se zajedno sa stanicama inkubira u već spomenutom inkubatoru 4-6 min. na 37°C. Naknadnim dodatkom svježeg medija tripsin je inaktiviran, a moguće preostale polijepljene stanice dodatno se resuspendiraju propuhivanjem kroz pipetu. Dio te suspenzije ostavlja se u bočici, a dio prenese u drugu čistu bočicu. U obje se bočice doda svježi medij za održavanje te se stanice nastave kultivirati.

Pohrana: Ukoliko stanice želimo pohraniti na duže vrijeme, potrebno im je dodati medij za zamrzavanje koji sadrži DMSO, koji je pri sobnoj temperaturi toksičan za stanice. Stanice se pohranjuju u tekućem dušiku na temperaturi od -196°C.

Brojanje: Broj stanica u kulturi određuje se pomoću Bürker-Türkove komorice. Za određivanje broja stanica koristi se 50 µL stanične suspenzije prethodno pomiješane sa 100 µL tripan plavila, boje koja omogućuje vizualizaciju i razlikovanje živih od mrtvih stanica. Mrtve stanice imaju oštećenu i nefunkcionalnu staničnu membranu pa boja prolazi kroz nju i

oboja stanicu. Suspenzija boje i stanica nanosi se u komoricu te se stanice broje pomoću invertnog mikroskopa. Stanice se broje u 4 kvadranta te se nakon brojanja broj stanica računa po sljedećoj formuli:

$$\frac{N}{4} * 3 = X * 10^4 \text{ stanica / cm}^3$$

Pri čemu je: N – broj stanica, 4 – broj polja u komorici, 3 – faktor razrjeđenja

4.3.2. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

Proliferativni učinak ekstrakata češnjaka ispitan je primjenom MTT testa. Adherentne stanične linije nasadene su na mikrotitarske pločice u koncentraciji 2×10^4 st/mL. Tako nasadene stanične linije tretirane su ekstraktima češnjaka u finalnim koncentracijama od 5, 4, 3 i 2 mg/mL te inkubirali u CO₂ inkubatoru 72 sata. Nakon inkubacije odvojen je medij od stanica te su iste tretirane s 40μL MTT-ja (1x) pripremljenog s PBS-om. Tako tretirane stanice također su inkubirane u CO₂ inkubatoru tijekom 4 sata. Budući da MTT testom redukcijom tetrazolijuma nastaju ljubičasti kristali formazana u citoplazmi stanica, potrebno je dodati organsko otapalo, u ovom slučaju dimetil sulfoksid (DMSO), kako bi se nastali kristali otopili. Kako bi se ubrzalo otapanje kristala formazana mikrotitarske pločice stavljene su na tresilicu tijekom 20 minuta. Rezultati su očitani spektrofotometrijski pomoću čitača mikropločica (iMark, BioRad, SAD) na valnoj duljini od 595nm. Osim tretiranih stanica, mikrotitarske pločice su sadržavale jažice s netretiranim, kontrolnim stanicama, kontrolne stanice proliferacije (OD) te jažice ispunjene MTT-jem čime je bilo moguće izmjeriti apsorbancu MTT-ja i mikrotitarske pločice (background=MTT+DMSO) te ju oduzeti od ukupne kako bi se dobili što vjerodostojniji rezultati.

Formula za računanje preživljenja stanica:

$$\text{preživljenje}[\%] = \frac{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{background}}} \times 100$$

4.3.3. Određivanje antioksidacijskog statusa- DPPH metoda

Antioksidativna aktivnost odredit će se primjenom DPPH (2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat) metode koja se zasniva na redukciji stabilnog radikala DPPH[•] koji u prisutnosti elektron donora (antioksidansa) mijenja boju iz ljubičaste u žutu. Mjerenje DPPH aktivnosti ekstrakta češnjaka napravljeno je prema modificiranom protokolu Dr. Prieta prilagođenom za određivanje pomoću čitača mikrotitarskih pločica u ukupnom volumenu uzorka od 200 μl . Kao pozitivna kontrola koristio se antioksidans Trolox. Nakon vaganja, DPPH i Trolox (svaki zasebno) otopljeni su u 100%-tnom metanolu, dok su ekstrakti pripremljeni u vodi i pomiješani u omjeru 1:1 s metanolom. U svaku jažicu dodano je 100 μl čistog metanola, 100 μl određenog radnog razrjeđenja ekstrakta te Troloxa do finalnih koncentracija od 5,4,3,2,1,0.1 i 0,01 mg/ml uključujući i DPPH. Tako pripremljeni uzorci zamotani su u foliju kako bi se spriječilo isparavanje i gubitak volumena uzorka te su inkubirani u mraku tijekom 30 minuta na 37°C (23). Apsorbancija je očitana pomoću spektrofotometrijskog automatskog čitača mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 490 nm.

4.4. Statističke metode

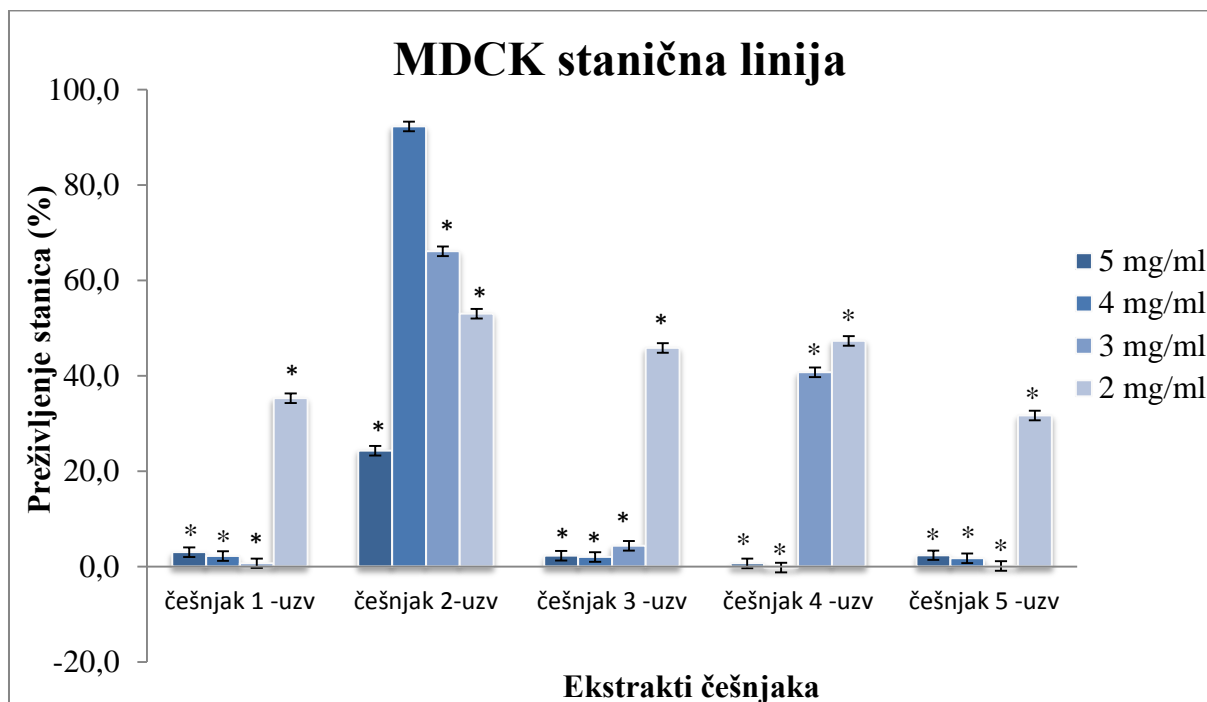
Rezultati su obrađeni u programu Statistica 13.1. Podaci su analizirani primjenom deskriptivne statistike za određivanje normalnosti razdiobe podataka i neparametrijskim Kolmogorov-Smirnov testom za usporedbu dvije nezavisne grupe podataka uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija tri nezavisna ponavljanja ($\bar{A} \pm SD$).

5. REZULTATI

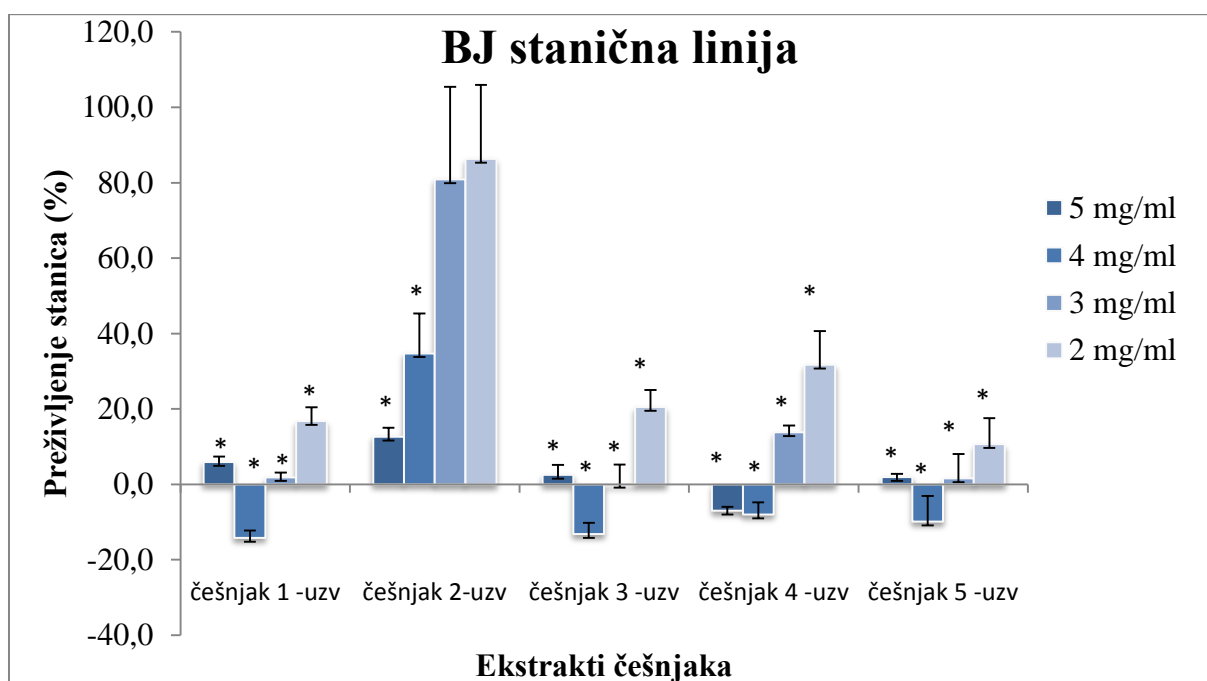
Citotoksično djelovanje pet ekstrakata češnjaka ispitano je na dvije stanične linije (MDCK i BJ). Dobiveni rezultati prikazani su za svaku staničnu liniju na Slikama 3 a) i 3 b). Svaki od ekstrakata češnjaka primijenjen je na stanicama u četiri koncentracije; 5, 4, 3, i 2 mg/mL. Rezultati su prikaz postotka rasta ispitivanih staničnih linija u usporedbi s kontrolom.

Uzorak češnjaka broj 2 pri koncentraciji od 4 mg/mL pokazao se kao najpogodniji za preživljenje MDCK stanica. Vrlo sličan postotak preživljenja pokazuju stanice tretirane ekstraktima češnjaka 1, 3 i 5 pri koncentracijama od 5 i 4 mg/mL dok su najveće citotoksično djelovanje na MDCK staničnu liniju pokazali ekstrakt češnjaka broj 4 pri koncentraciji od 4 mg/mL te ekstrakt češnjaka broj 5 pri koncentraciji od 3 mg/mL (Slika 3 a).

BJ stanična linija pokazuje sličan postotak preživljenja nakon tretmana uzorkom češnjaka broj 2 pri koncentraciji od 4 mg/ml i uzorkom češnjaka broj 4 pri koncentraciji od 2 mg/mL. Najmanji citotoksičan učinak na BJ staničnu liniju ima ekstrakt češnjaka broj 2 pri koncentracijama od 3 i 2 mg/mL dok najveći negativan učinak na preživljenje stanica pokazuju koncentracije od 4 mg/mL 1. i 3. ekstrakta češnjaka (Slika 3 b).



3. a)

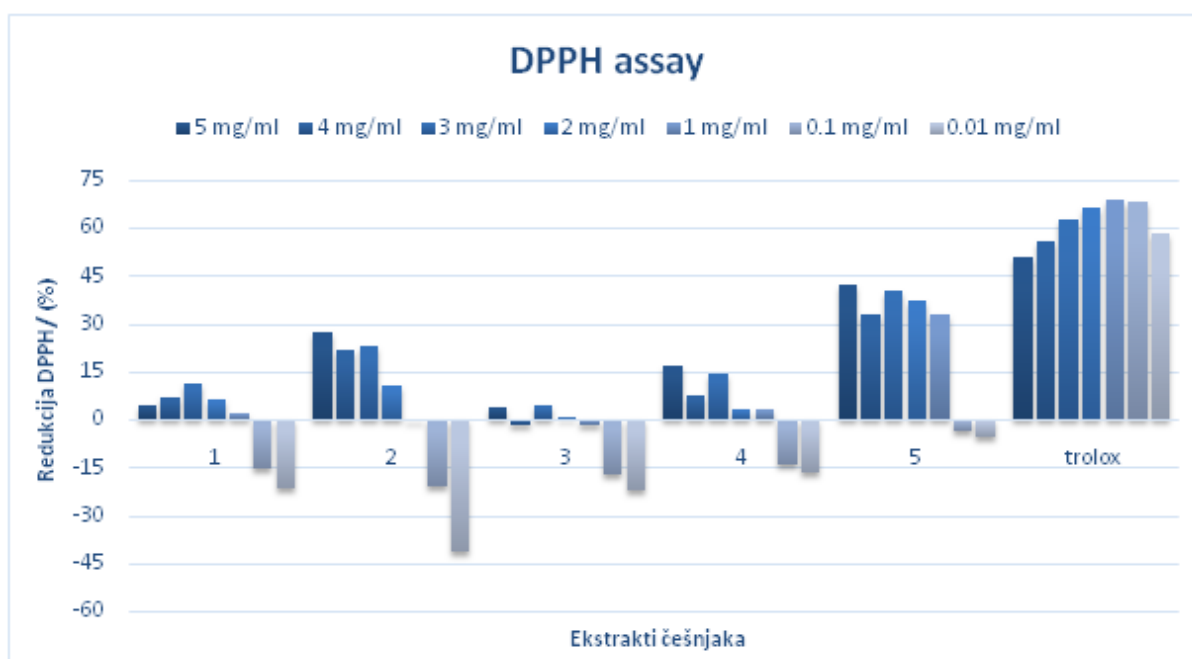


3. b)

Slika 3. Utjecaj ekstrakata češnjaka na rast MDCK i BJ stanične linije. Rezultati prikazuju učinkovitost ekstrakata češnjaka (1-5) na rast a) MDCK i b) BJ staničnih linija.

Preživljenje je određeno pomoću MTT testa u trajanju od 72 sata nakon djelovanja ekstrakata u koncentracijskom nizu 2-5 mg/ml. Ispitivanje je napravljeno u tri nezavisna ponavljanja u triplikatu.

Rezultati mjerenja antioksidativnog statusa prikazuju nemogućnost redukcije DPPH[•] radikala kod primjene ekstrakata češnjaka niskih koncentracija od 0.1 i 0.01 mg/ml. Najveću antioksidacijsku aktivnost pri koncentracijama od 5, 4, 3, 2, i 1 mg/mL pokazuju rezultati testiranja 5. ekstrakta češnjaka koji pokazuju antioksidativni kapacitet 32-45%. Najmanju sposobnost vezanja radikala ima ekstrakt češnjaka broj 3. Ekstrakt broj 1 najveću antioksidativnu aktivnost ima oko 12% pri koncentraciji od 3 mg/ml, dok nešto višu aktivnost ima ekstrakt broj 4 (15-18%). Ekstrakt broj 2 pokazuje antioksidativni kapacitet nešto niži od 30% pri 1 mg/ml. Trolox kao pozitivna kontrola pri ispitivanim koncentracijama pokazuje antioksidativnu aktivnost od 48% do 68%.



Slika 4. Antioksidativna aktivnost ekstrakta češnjaka. Prikazana je srednja vrijednost dva nezavisna mjerenja uz Trolox kao pozitivnu kontrolu.

6. RASPRAVA

Češnjak je biljka koja se od davnina koristi kao lijek u alternativnoj medicini mnogih kultura diljem svijeta (1). Svoje pozitivno djelovanje na ljudski organizam češnjak duguje više od dvije tisuće biološki aktivnih tvari među kojima se posebice ističu sumporni spojevi češnjaka. Naime, spojevi sumpora kao što su DAS, DADS, DATS, SAC i SAMC zaslužni su što je češnjak prepoznat i kao potencijalni izvor lijekova za suvremenu medicinu (8). Fiziološko djelovanje češnjaka je mnogostruko: od inhibicije agregacije trombocita, preko antimikrobnog, pa sve do antitumorskog djelovanja. Ipak, najznačajniji učinak češnjaka je onaj antioksidacijski koji, smatra se, kao posljedicom rezultira antitumorskim djelovanjem (11). Upravo zato, razna istraživanja temelje se na ispitivanjima citotoksičnosti i antioksidativne aktivnosti češnjaka. Osim dokazivanja i otkrivanja pozitivnog djelovanja češnjaka na organizam, ciljevi istraživanja su otkriti i moguće štetne učinke.

Temeljem dobivenih rezultata provedenog istraživanja uočava se kako ispitivani ekstrakti češnjaka nemaju jednako citotoksično djelovanje na obje stanične linije. Jedan od mogućih razloga je porijeklo staničnih linija: jedna humana (BJ) i druga pseća (MDCK). Također, iz rezultata je vidljivo kako je preživljenje stanica uvelike ovisilo i o pojedinom ekstraktu. Najbolji postotak preživljenja uočljiv je kod obje stanične linije tretirane ekstraktom češnjaka broj 2 (biološki uzgojen češnjak u Baranji). Osim testa citotoksičnosti proveden je i test određivanja antioksidacijskog statusa pomoću DPPH. Rezultati tog testa jasno pokazuju nezadovoljavajuću razinu antioksidativnosti. Takve snižene rezultate, međutim, možemo smatrati posljedicom prilagodbe metode za mjerenje na mikrotitarskim pločicama što jasno pokazuje i sniženi antioksidacijski kapacitet Troloxa kao pozitivne kontrole koji bi pri uobičajenom mjerenju trebao imati 100%-tnu antioksidacijsku aktivnost. Ipak, na grafu se može primijetiti povećana antioksidacijska aktivnost 5. (komercijalno dobivenog) ekstrakta češnjaka u odnosu na ostala četiri ispitivana ekstrakta.

MTT testom moguće je osim citotoksičnosti spoja na stanične linije ispitati i citotoksičnost na bakterije. Upravo takvo jedno istraživanje proveli su Bag i Chattopadhyay testirajući učinak

nekoliko esencijalnih ulja različitih biljaka i začina, uključujući i češnjaka, na rast bakterija. Međutim, u provedenom pokusu češnjak nije imao značajno toksično djelovanje na bakterije u usporedbi s drugim ispitivanim biljkama (korijander i kim) (24).

Poznato je kako slobodni radikali i druge reaktivne vrste nastale u živućim stanicama imaju bitnu ulogu u nastanku i razvoju raznih bolesti. Slobodni radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju i tako uzrokovati mutacije i karcinogenezu. Iako danas postoje sintetski antioksidansi, M. El-Hamidi i M. Safinaz El-Shami odlučili su ispitati svojstva češnjaka kao poznatog prirodnog antioksidansa. Koristili su uzorke češnjaka u obliku ekstrakata i praha te ih otapali u različitim otapalima. Antioksidativnost su također mjerili DPPH metodom. Rezultati su pokazali da su ekstrakti češnjaka vrlo dobri prirodni antioksidansi posebice oni otopljeni u vodi i metanolu te da se povećanjem koncentracije povećava i antioksidacijski kapacitet. Rezultati su također potvrdili da su i ekstrakti i prah češnjaka bitni inhibitori lipidne peroksidacije koja je posljedica njihova dugoročna djelovanja i stabilnosti (25).

Osim već navedenog, istraživanje Lia i sur. dokazalo je kako su ekstrakti češnjaka otopljeni u vodi i metanolu vrlo dobri antioksidansi. Provjerena je i razlika u antioksidacijskom kapacitetu prije i nakon kuhanja te je utvrđeno da nema značajne razlike antioksidativnosti uzoraka te da su za antioksidativnu aktivnost najvažniji sumporni spojevi češnjaka i fenoli koji kuhanjem budu uništeni u zanemarivim vrijednostima (26).

Također, stariji ekstrakti češnjaka zbog svojih stabilnih, u vodi topljivih, sumpornih spojeva pokazuju nešto veću moć antiglikacije i vezanja slobodnih radikala od svježije dobivenih ekstrakata. Iako pri usporedbi s Troloxom i svježim ekstrakti pokazuju antioksidacijska svojstva, stariji ekstrakti češnjaka pokazali su se kao značajniji i produktivniji (27).

Češnjak i njegova terapijska svojstva potencijalan su izvor lijekova suvremene medicine. Zato je on sve češći predmet brojnih istraživanja. Bitno je ispitati i otkriti sva njegova svojstva i spojeve te učinak na ljudski organizam. Kako bi se povećala upotreba češnjaka kao potencijalnog lijeka, potrebno je ustanoviti njegov optimalan utjecaj na organizam, ali i upoznati moguće nepovoljne učinke. Upravo zato, potrebno je provoditi daljnja istraživanja ove visoko-potencijalne biljke.

7. ZAKLJUČAK

- Rezultat djelovanja ekstrakta češnjaka na preživljenje stanica ovisan je o staničnoj liniji na koju se primjenjuje.
- Najpovoljniji učinak na preživljenje stanica bez obzira na koncentraciju ima ekstrakt češnjaka broj 2.
- Stanična linija BJ osjetljivija je na citotoksično djelovanje ekstrakta češnjaka od MDCK stanične linije, posebice pri koncentraciji od 4 mg/mL.
- Niti jedan ekstrakt češnjaka ne pokazuje zadovoljavajuću antioksidativnu aktivnost pri ispitivanim koncentracijama.
- Najveće antioksidativno djelovanje ima 5. (komercijalno dobiven) ekstrakt češnjaka.
- Razlika u načinu proizvodnje češnjaka utječe na njegov antioksidativni kapacitet.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Cilj rada bio je ispitati antioksidativni kapacitet i djelovanje 5 ekstrakata češnjaka na rast normalnih staničnih linija te provjeriti utječe li razlika u načinu proizvodnje na ukupnu aktivnost češnjaka.

Nacrt studije: Pokusno (eksperimentalno) istraživanje

Materijali i metode: Ekstrakti češnjaka pripremljeni su primjenom ultrazvučne tehnologije. Dva uzorka dobivena su komercijalno, dva uzorka dobivena su organski, a jedan je uzgojen na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Korištene su dvije normalne stanične linije (MDCK i BJ) kultivirane u CO₂ inkubatoru (5% CO₂, 37° C). Proliferativni učinak ekstrakta češnjaka ispitan je primjenom MTT testa dok je antioksidativna aktivnost određena primjenom DPPH metode. Obje su metode kolorimetrijske, a rezultati su očitani spektrofotometrijski. Primijenjen je protokol prilagođen za određivanje u mikrotitarskoj ploči.

Rezultati: Ekstrakt češnjaka broj 2 ima najpozitivniji učinak na preživljenje obje stanične linije. Neki ekstrakti češnjaka pri koncentraciji od 4 mg/ml djeluju citotoksično na BJ staničnu liniju. Ekstrakti češnjaka ne pokazuju dostatan antioksidativni kapacitet pri ispitivanim koncentracijama od 0.01 mg/ml do 5 mg/ml.

Zaključak: Citotoksično djelovanje ekstrakta češnjaka ovisno je staničnoj liniji. Iako svi ekstrakti pokazuju antioksidativna svojstva, antioksidativni kapacitet ekstrakta ovisi o načinu proizvodnje češnjaka.

Ključne riječi: češnjak, antioksidativnost, kultura stanica, citotoksičnost

Effects of garlic extracts (*Allium sativum*) on normal cells growth and their antioxidative activity

9.SUMMARY

Objectives: The aim was to test the antioxidant capacity and the influence of five extracts of garlic on the growth of normal cell lines and to check if the differences in manufacturing affect antioxidant activity in total.

Study design: Experimental study

Materials and methods: Extracts of garlic have been prepared by ultrasound technology. Two samples were bought in a store, two samples were grown organically and one is grown at the Faculty of agriculture in Osijek. There are two normal cell lines that were used (MDCK and BJ) and were cultivated in the CO₂ incubator (5% of CO₂, 37°C). Proliferative effect of garlic extracts was tested by applying MTT test while an antioxidant activity was detected by dint of DPPH method. The both methods were colorimetric and the results were detected by spectrofotometric reader. A modified protocol for a microplate was applied.

Results: The second extract of garlic has the most positive effect on surviving of both cell lines. Some of the extracts have cytotoxic influence to the BJ cell line, especially at the concentration of 4 mg/mL. Extracts of garlic do not show sufficient antioxidative capacity at tested concentration from 0.01 mg/mL to 5 mg/mL.

Conclusion: Cytotoxic effects of extracts of garlic depend on the kind of cell line. Even though all of the extracts have shown antioxidative activity, antioxidative capacity of garlic extract depends on the way garlic was produced.

Keywords: garlic, antioxidant activity, cell culture, cytotoxicity

10. LITERATURA

1. Majewski M. *Allium sativum*: Facts and myths regarding human health. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2014;65:1-8.
2. Butt MS, Naz A, Sultan MT, Qayyum MM. Anti-oncogenic perspectives of spices/herbs: a comprehensive review. *Excli J.* 2013;12:1043-65.
3. Abdul Qadir M, Shahzadi SK, Bashir A, Munir A, Shahzad S. Evaluation of phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial activities of some common herbs. *Int J Anal Chem.* 2017. doi:10.1155/2017/3475738. PubMed Central PMCID: PMC5337800.
4. Knowles LM, Milner JA. Allyl sulfides modify cell growth. *Drug Metabol Drug Interact.* 2000;17:81-107.
5. Hall A, Troupin A, Londono-Renteria B, Colpitts TM. Garlic organosulfur compounds reduce inflammation and oxidative stress during Dengue virus infection. Hagedorn C, ed. *Viruses.* 2017;9(7):159. doi:10.3390/v9070159. PubMed Central PMCID: PMC5537651.
6. Zhu X, Jiang X, Li A, Zhao Z, Li S. S-Allylmercaptocysteine Attenuates Cisplatin Induced Nephrotoxicity through Suppression of Apoptosis, Oxidative Stress, and Inflammation. *Nutrients.* 2017;9(2):166. doi:10.3390/nu9020166. PubMed Central PMCID: PMC5331597.
7. Nicastro HL, Ross SA, Milner JA. Garlic and onions: their cancer prevention properties. *Cancer Prev Res (Phila).* 2015; 8:181-9.
8. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr.* 2006; 136: 716-725.

9. Zeng Y, Li Y, Yang J, Pu X, Du J, Yang Xi sur. Therapeutic role of functional components in alliums for preventive chronic disease in human being. *Evid Based Complement Alternat Med. Ecam.* 2017; 2017:9402849. doi:10.1155/2017/9402849. PubMed Central PMCID: PMC5316450.
10. Zhang F, Jin H, Wu L, Shao J, Zhu X, Chen A i sur. Diallyl trisulfide suppresses oxidative stress-induced activation of hepatic stellate cells through production of hydrogen sulfide. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:1406726. doi:10.1155/2017/1406726. PubMed Central PMCID: PMC5337887.
11. Chandra-Kuntal K, Lee J, Singh SV. Critical role for reactive oxygen species in apoptosis induction and cell migration in inhibition by diallyl trisulfide, a cancer chemopreventive component of garlic. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 138:69-79.
12. Antony ML, Singh SV. Molecular mechanisms and targets of cancer chemoprevention by garlic- derived bioactive compound diallyl sulfide. *Indian J Exp Biol.* 2011; 49:805-16.
13. Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed.* 2014; 4:1-14.
14. ©2008-2017 ResearchGate GmbH. Research Gate. Dostupno na adresi: https://www.researchgate.net/profile/Marc_Diederich/publication/305398349/figure/fig2/AS:385821900328960@1468998517035/fig-2-Overview-of-anticancer-potential-of-OSCs-targeting-cancer-hallmarks-based-on.png. Datum pristupa: 29.8.2017.
15. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 4. izd. Medicinska naklada Zagreb. 2004. 29-33.

16. Phelan K, May KM. Basics techniques in mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cell Biol.* 2015. 66:1.1.1-22.
17. Lefaki M, Papaevgeniou N, Chondrogianni N. Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol.* 2017. 13:452-458.
18. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B i sur. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal.* 2014. 21:66-85.
19. Čvorišec D, Čepelak I, ur. Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada: Zagreb. 2009.
20. Hayat S, Cheng Z, Ahmad H, Ali M, Chen X, Wang M. Garlic, from remedy to stimulant: evaluation of antifungal potential reveals diversity in phytoalexin allicin content among garlic cultivars; allicin containing aqueous garlic extracts trigger antioxidants in cucumber. *Front Plant Sci.* 2016. 7:1235.
21. Maschirow L, Khalaf K, Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes--Biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening. *Clin Biochem.* 2015. 48: 581-5.
22. Banjari I. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti. 2017. Dostupno na adresi: http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Antioksidansi_u_hrani/Predavanja%20Banjari_2017/5_Metode%20odredjivanja%20antioksidacijske%20aktivnosti_2017.pdf. Datum pristupa: 6.9.2017.

23. Prieto JM. Preparation of DPPH radical, and antioxidant scavenging assay. 2012.
24. Bag A, Chattopadhyay RR. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. PLoS One. 2015. 1; 10(7): e0131321. Doi: 10.1371/journal.pone.0131321. PubMed Central PMCID: PMC4488432.
25. El-Hamidi M, Safinaz El-Shami M. Scavenging activity of different garlic extracts and garlic powder and their antioxidant effect on heated sunflower oil. Am J Food Technol. 2015. 10 (4): 135-146.
26. Liu C, Yang C, Yao Y, Huang W, Sun W, Ma Y. Determination of antioxidant activity in garlic (*Allium sativum*) extract subjected to boiling process in vitro. J Food Nutri Research. 2014. 2 (7): 383-7.
27. Elostá A, Slevin M, Rahman K, Ahmed N. Aged garlic has more potent antiglycation and antioxidant properties compared to fresh garlic extract in vitro. Sci Rep. 2017. 7: 39613. doi:10.1038/srep39613. PubMed Central PMCID: PMC5209668.

11. ŽIVOTOPIS

Iva Ljubanović rođena je 10. listopada 1995. godine u Virovitici. Od 2010. do 2014. pohađala je Gimnaziju Petra Preradovića u Virovitici. 2014. god. upisuje sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.