

Učinak arbutina na oksidacijski stres i na primarna oštećenja DNA u štakora

Đelatić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:005540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Iva Đelatić

UČINAK ARBUTINA NA OKSIDACIJSKI STRES I PRIMARNA
OŠTEĆENJA DNA U ŠTAKORA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je izrađen dijelom na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a dijelom u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Benković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Benković na stručnom vođenju, mnogobrojnim savjetima, razumijevanju, konstruktivnim kritikama i iznimnom strpljenju te predanosti prema ovom radu.

Zahvaljujem svim suradnicima i zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na nesebičnoj i stručnoj pomoći te doprinosu u izradi ovog rada. Od srca hvala asistentu Vedranu Balti na nesebičnoj pomoći, stručnosti, mnogobrojnim savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama što su uljepšali godine mog studiranja te ih učinili nezaboravnima.

Hvala mojim roditeljima što su bili bezuvjetni oslonac i podrška tijekom cijelog studiranja. Neopisivo i beskrajno zahvaljujem svojoj mami na bezuvjetnoj ljubavi, motivaciji i vjeri u mene. Ovaj rad posvećujem upravo njoj.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

Učinak arbutina na oksidacijski stres i na primarna oštećenja DNA u štakora

Iva Đelatić

Rooseveltove trg 6, 10 000 Zagreb

Fenolni glikozid arbutin sekundarni je metabolit u mnogim biljkama, no također se može proizvesti kemijskom sintezom. Iznimno je učinkovit kod liječenja urinoinfekcija, te ima antioksidacijska, antiupalna, antitumorska i antibakterijska svojstva. Povećana prisutnost slobodnih kisikovih i dušikovih vrsta u organizmu dovodi do ozljeda stanica te pojave mnogih bolesti. Iz tog razloga provodi se niz istraživanja s ciljem pronalaženja tvari koje bi svojim djelovanjem mogle štititi stanice, organe i ljudski organizam u cijelosti. Cilj ovog istraživanja je ispitati učinak arbutina na stanice jetre, bubrega i mozga štakora soja Lewis oba spola tretiranih arbutinom u koncentraciji od 200 mg/kg per oralno tijekom 28 dana. Određivanjem aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze te koncentracije MDA odredit će učinak arbutina na pojavu oksidacijskog stresa. Za procjenu primarnih oštećenja DNA u stanicama koristit će se standardna izvedba komet testa u alkalnim uvjetima. Rezultati su pokazali kako arbutin ne utječe na intenzitet lipidne peroksidacije. Superoksid dismutaza pokazuje pad aktivnosti u bubregu ženke štakora, dok je katalazna aktivnost snižena kod stanica mozga, također kod ženki. Komet test je pokazao povišene vrijednosti DNA oštećenja u jetri, a snižene u mozgu štakora. No, generalno se može zaključiti kako arbutin nije toksično djelovao na stanice bubrega jetre i mozga štakora.

(71 stranica, 28 slika, 8 tablica, 138 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oksidacijski stres, ROS, lipidna peroksidacija, arbutin, primarna oštećenja, komet test

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

prof. dr. sc. Božena Mitić

prof. dr. sc. Zlatko Mihaljević

Rad prihvaćen: 30.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Graduation thesis

Effect of arbutin on oxidative stress and on primary DNA damages in rats

Iva Đelatić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Phenolic glycoside arbutin is a secondary metabolite in many plants and it can also be produced by chemical synthesis. It is extremely effective in the treatment of urinary infections and has antioxidative, anti-inflammatory, anti-tumor and antibacterial properties. Increased presence of free oxygen and nitrogen species in the organism leads to cell injuries and the appearance of many diseases. For this reason, many researches are being conducted, with a goal to find substances that could protect cells, organs and the human body in their entirety. The aim of this research is to examine the antioxidant effect of arbutin on liver, kidney and brain of rats (Lewis strain) of both sexes treated orally with arbutin at a concentration of 200 mg/kg for 28 days. Determination of catalase and superoxide dismutase activity and MDA concentration will determine if arbutin acts on oxidative stress. To assess primary DNA damage in cells, a standard comet test will be used in alkaline conditions. The results showed that arbutin does not affect the intensity of lipid peroxidation. Superoxide dismutase shows a fall in activity in the rat female kidney, while the catalytic activity is reduced to the brain cells, also in females. The comet test showed elevated values in the liver and lowered in the brain of the rat. However, it can generally be concluded that arbutin did not affect toxicity of the liver and brain kidney cells.

(71 pages, 28 figures, 8 tables, 138 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: oxidative stress, ROS, lipid peroxidation, arbutin, primary damages, comet test

Supervisor: dr. sc. Vesna Benković, PhD, Professor

Reviewers: dr. sc. Vesna Benković, PhD, Professor

dr. sc. Božena Mitić, PhD, Professor

dr. sc. Zlatko Mihaljević, PhD, Professor

Thesis accepted: 30.11.2017.

POPIS KRATICA

BSA - goveđi serumski albumin (od engl. *bovine serum albumin*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - etilen-diamin-tetraoctena kiselina (od engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

GR - glutation reduktaza

GSH-Px - glutation peroksidaza

LMP - tvar niskog tališta (od engl. *low melting point*)

MDA - malondialdehid

M1G - adukt nastao spajanjem MDA i DNA baze

MHC - kompleks tkivne podudarnosti (od engl. *major histocompatibility complex*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NMP - tvar normalnog tališta (od engl. *normal melting point*)

NOS - dušikov monoksid sintetaza (od engl. *nitric oxide synthase*)

OECD - Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (od engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*)

PBS - fosfatni pufer (od engl. *phosphate-buffered saline*)

PUFA - višestruko nezasićena masna kiselina (od engl. *Polyunsaturated fatty acids*)

RNS - reaktivne dušikove vrste (od engl. *reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (od engl. *reactive oxygen species*)

TBA - tiobarbituratna kiselina (od engl. *thiobarbituric acid*)

US EPA - Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (od engl. *United States Environmental Protection Agency*)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Arbutin.....	1
1.1.1. Izomeri arbutina i njihovo djelovanje	3
1.1.2. Biokonverzija arbutina u hidrokinon	4
1.1.3. Ekologija arbutina	6
1.2. Oksidacijski stres	7
1.2.1. Slobodni radikali u stanicima	7
1.3. Antioksidacijski sustav organizma	10
1.3.1. Enzimatski antioksidansi	10
1.3.1.1. Superoksid dismutaza (SOD)	11
1.3.1.2. Katalaza (CAT)	13
1.3.1.3. Popratni enzimi glutationa	14
1.4. Lipidna peroksidacija	15
1.5. Oštećenja DNA.....	18
1.5.1. Primarna oštećenja DNA	18
1.5.1.1. Oksidacijska oštećenja DNA.....	19
1.5.1.2. Određivanje primarnih oštećenja DNA komet testom	22
1.6. Cilj istraživanja.....	24
2. Materijali i metode	24
2.1. Priprema otopine arbutina	24
2.2. Pokusne životinje.....	24
2.3. Obrada i tretman životinja	25
2.4. Uzimanje uzoraka tkiva	26
2.5. Određivanje aktivnosti enzima i lipidne peroksidacije.....	26
2.5.1. Pripremanje uzoraka	26
2.5.2. Određivanje proteina metodom po Lowry-u.....	26
2.5.3. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije.....	28
2.5.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze	30
2.5.5. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	31
2.6. Komet test.....	32
2.7. Statističke metode.....	34
3. Rezultati	35

3.1. Učinak arbutina na intenzitet lipidne peroksidacije	35
3.2. Učinak arbutina na aktivnost katalaze	38
3.3. Učinak arbutina na aktivnost superoksid dismutaze.....	41
3.4. Utjecaj arbutina na primarna oštećenja DNA	44
3.4.1. Stanice bubrega	44
3.4.2. Stanice jetre.....	47
3.4.3. Stanice mozga	50
4. Rasprava.....	53
5. Zaključak	59
6. Literatura	60

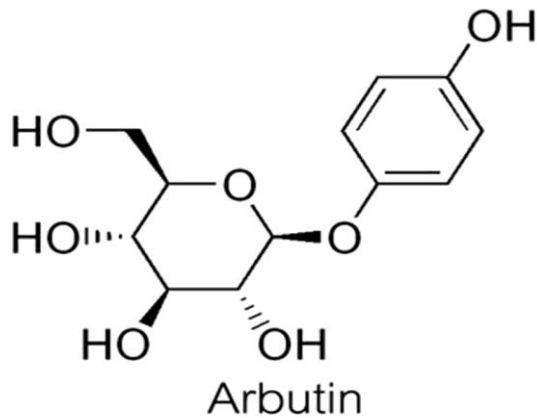
1. Uvod

Danas su u čovjekovom okolišu sve više prisutni visoko reaktivni spojevi koji uzrokuju oksidacijski stres u organizmu što za posljedicu ima oštećenje DNA i ugljikohidrata, peroksidaciju membranskih lipida, oksidaciju sulfhidrilne te drugih skupina na proteinima koja dovode do različitih bolesti (Poulson i sur., 1998). Iz tog razloga, danas se sve više provode istraživanja s ciljem pronalaska tvari s antioksidacijskim djelovanjem koje bi mogle štititi stanice, organe, te organizam u cijelosti.

90-tih godina najčešće proučavani antioksidansi prisutni u hrani bili su vitamini, karotenoidi i minerali (Scalbert i sur., 2005). Kasnije se uočava antioksidacijski kapacitet flavonoida i ostalih polifenola. Često ih se pronalazi u namirnicama kao što su povrće, voće, njihove prerađevine, žitarice, mahunarke te čokolada. Polifenoli mogu djelovati kao antioksidansi ili prooksidansi, što ponajprije ovisi o dozi primjene (Lambert i sur., 2005). Dokazano je da polifenoli pridonose u prevenciji nastanka kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, neurodegenerativnih bolesti te dijabetesa (Manach i sur., 2004). Polifenoli, da bi u organizmu ostvarili svoj učinak moraju biti metabolički aktivirani. Arbutin i njegov metabolit hidrokinon dobar su primjer promjene nativnih svojstava nakon metaboliziranja (Setchell i sur., 2002).

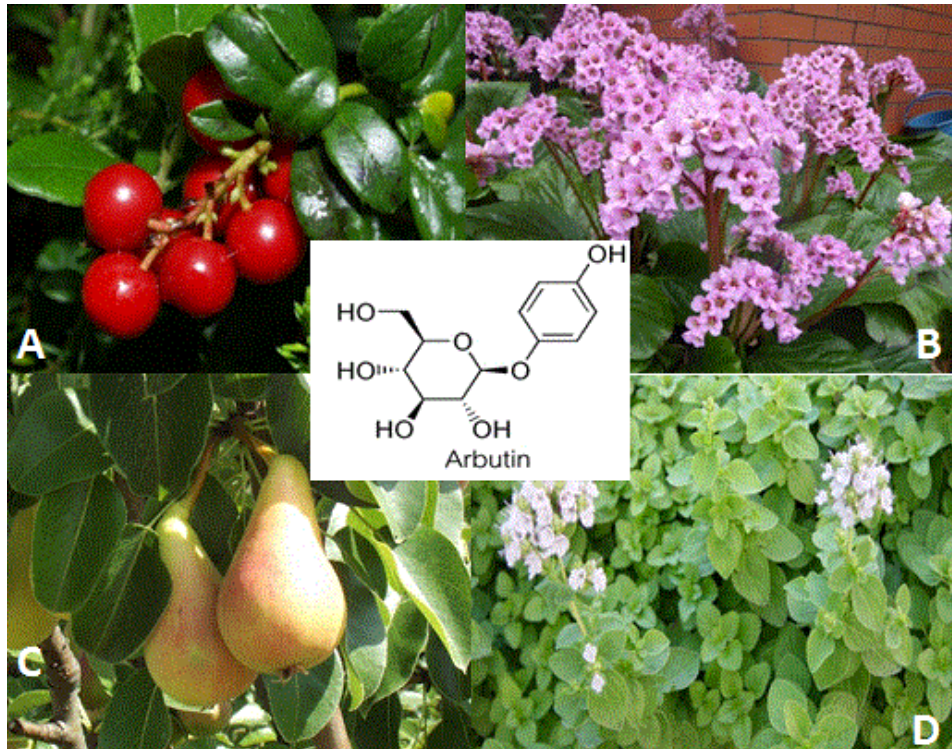
1.1. Arbutin

Arbutin (4-hidroksifenil-b-D-glukopiranozid) kemijskom građom spada u skupinu fenolnih glikozida (Lee i sur., 2012) (Slika 1). Tvori dva izomera, ovisno da li je nastao kemijskom sintezom ili metabolizmom biljaka. Pokazuje pozitivne antioksidacijske, antimikrobne i antikancerogene osobine, te time dobiva značajnu pažnju. Tome svjedoči više od 735 radova objavljenih u periodu od 1995.-2010. godine koji sadrže pojam „arbutin“ (Nycz i sur., 2010).



Slika 1. Strukturna formula arbutina
(Preuzeto sa: <https://www.complexi-light.com/alpha-arbutin/>)

Arbutin nastaje u biljkama kao rezultat sekundarnog metabolizma u obliku beta izomera. Prirodno je prisutan u biljkama porodica *Ericaceae*, *Lamiaceae*, *Rosaceae* i *Saxifragaceae* i dr. (Migas i Krauze-Baranowska, 2015) (Slika 2). U literaturi, list bergenije naveden je kao jedan od najbogatijih arbutinom, te je također na temelju spektrofotometrijskih ispitivanja zaključeno da je najzastupljeniji fenolni spoj u listu obične planike (627 mg/kg) (Oliveira i sur. 2011). Biljkama omogućuje esencijalne funkcije kao što su razmnožavanje i rast te pomaže u obrani od patogena i parazita (Baidez i sur., 2007). Također, arbutin ima antioksidacijska svojstva koja sprječavaju nastanak slobodnih radikala i umanjuju oksidacijski stres (Jurica, 2016). Inducira aktivnost enzima koji su važni za borbu protiv reaktivnih kisikovih vrsta (katalaza, dismutaza, glutation peroksidaza) (Tsao, 2010). U biljkama je prisutan u kombinaciji s metil-arbutinom, što je posebno karakteristično za porodicu *Ericaceae* (vriješovke) (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).



Slika 2. Predstavnice porodica (A) Ericaceae (*Arctostaphylos uva-ursi*), (B) Saxifragaceae (*Bergenia crassifolia*), (C) Rosaceae (*Pyrus* sp.) i (D) Lamiaceae (*Origanum majorana*) koje sadrže arbutin.

1.1.1. Izomeri arbutina i njihovo djelovanje

Arbutin ima dva stereoizomera, alfa i beta. Beta arbutin prirodno je sadržan u biljkama, dok se alfa izomer dobiva kemijskom sintezom (Nycz i sur., 2010). Alfa arbutin može se sintetizirati iz hidrokinona i acetobromglukoze pomoću enzima glukozid sintetaze. Funayama i sur. (1995) predlažu kako manipulacija u konfiguraciji anomernog ugljika u ugljikohidratu glikozida može promijeniti njegovu funkciju. Tako Sugimoto (2004) dokazuje da beta arbutin inhibira enzim tirozinazu kod melanoma u gljiva i miševa, dok alfa izomer ne djeluje na enzim kod gljiva, a inhibicija je 10 puta veća kod mišje tirozinaze. Arbutin utječe na melanogenezu tako da inhibira stvaranje ljudskih melanocita (HMV-II, od engl. *human malignant melanoma cell*), te postoji jasna korelacija između smanjenja sinteze melanina i inhibicije tirozinaze kod stanica tretiranih arbutinom (Sugimoto, 2004).

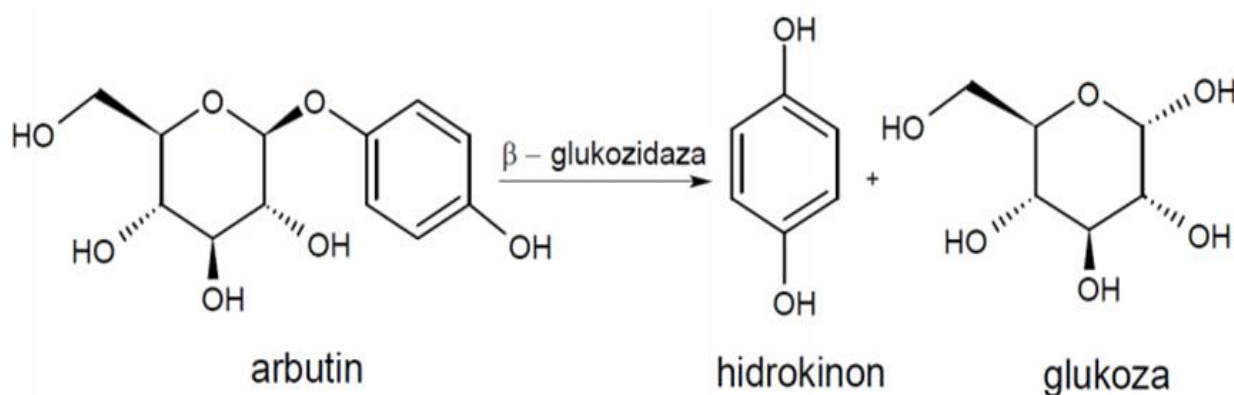
Dokazano je kako arbutin ima antiupalno, antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Također, djeluje antimikrobno protiv bakterija kao što su *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te antivirusno protiv Polio virusa (Xu i sur., 2015). Proizvodi koji sadrže arbutin dobro su poznati kao diuretici, lijekovi za tretiranje uroinfekcija, cistitisa i bubrežnih kamenaca (Nycz i sur., 2010).

Pripravci biljke medvjete (*Arctostaphylos uva-ursi*) najpoznatiji su prirodni lijekovi za suzbijanje infekcija urinarnog trakta upravo zbog visokog sadržaja arbutina. Konzumira se u obliku zdrobljenog lišća, praha ili vodenog ekstrakta u dozi od 400 mg do 840 mg arbutina po danu (Deisinger, 1996). Zhu i Gao (2008) govore kako je arbutin pogodan kao lijek za iskašljavanje i liječenje astme. Kao što je spomenuto, kompetitivnom inhibicijom blokira enzim tirozinazu i biosintezu melanina, zbog strukturalne sličnosti za tirozinom, supstratom tirozinaze (Zhu i Gao, 2008). Iz tog razloga koristi se u izbjeljivanju kože te liječenju dermatoloških bolesti (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Arbutin sprječava toksičnost koja je uzrokovana imunosupresivima, kao što je naprimjer ciklosporin. Antioksidacijski djeluje na staničnu membranu, te inhibira djelovanje fosfolipaze A2. No s druge strane, kod tretmana visokom koncentracijom arbutina uočen je porast lipidne peroksidacije (Khadir i sur., 2015). Također, Zhang i sur (2014) govore kako arbutin svojim antioksidacijskim djelovanjem smanjuje rizik od cerebrovaskularnih bolesti koje su danas vrlo česte, osobito kod starije populacije. Nadalje, Lee i sur. (2012) dokazali su da arbutin suprimira LPS-om inducirane upale, točnije smanjuje ekspresiju upalnih gena kao što je iNOS, te reducira generiranje upalnih citokina, uključujući IL-1 i TNF u aktiviranim stanicama mikroglije. Dodatno, koristi se kao stabilizator boja za fotografije, a spominje se i kao fenol djelotvoran protiv starenja, UV-B/UV-C zračenja te ublažavanja bolova, kao i za zacjeljivanje rana bez ožiljaka (Nycz i sur., 2010).

1.1.2. Biokonverzija arbutina u hidrokinon

Smatra se da arbutin u enterocitima resica tankog crijeva prelazi u svoj aktivni oblik hidrokinon pomoću djelovanja crijevnih bakterija i enzima beta glukozidaze koji sudjeluje u pretvorbi (Slika 3). Može se reći da je arbutin glukopiranozid hidrokinona. Dokazano je da bakterije crijevne mikroflore: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliflavus* i *Bacteroides distasonis* mogu biokonvertirati arbutin (Kang i sur., 2011), te da do pretvorbe dolazi unutar 24 sata (Blaut, 2006). Hidrokinon također inhibira sintezu melanina te se smatra boljim inhibitorom tirozinaze, no s druge strane pokazuje nefrotoksična, citotoksična i genotoksična svojstva, dok su prednosti arbutina nad njime veća stabilnost, ne izazivanje iritacije na koži te ne pojavljivanje nikakvih nuspojava nakon korištenja (Bang i sur., 2008). Dokazano je da i bakterije kože, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* mogu biokonvertirati arbutin u hidrokinon (Bang i sur., 2008).

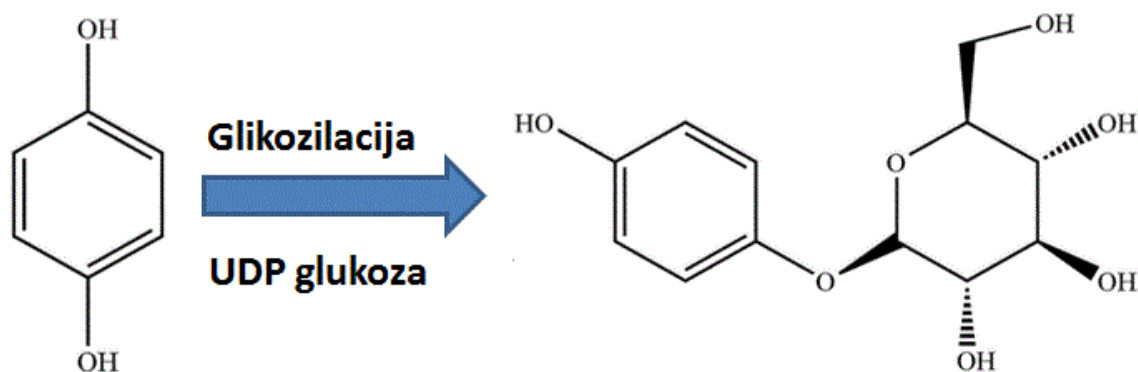
Oksidacijom hidrokinona nastaje p-benzokinon, spoj koji je pokazao kancerogeni učinak kod štakora te leukemogeni kod ljudi. Dokazano je da potiče nastanak benignih tumora jetre i bubrega u glodavaca (Roza i sur., 2003). No, osim negativnih svojstava hidrokinon je također poznat kao antioksidans i antimutagen, te pozitivno djeluje kao inhibitor lipidne peroksidacije i pokazuje antimikrobna svojstva (Souček i sur., 2000; Blaut i sur., 2006). Istraživanja su provedena i na ljudskim limfocitima u uvjetima *in vitro*, gdje kod tretmana hidrokinonom u različitim koncentracijama nije uočena strukturna promjena kromosoma (Pavlović i sur., 2009). Smatra se da bi zbog posjedovanja dvije hidroksilne skupine na benzenskom prstenu hidrokinon trebao imati veći antioksidacijski kapacitet od arbutina koji posjeduje samo jednu takvu skupinu (Takebayashi i sur., 2010).



Slika 3. Bioaktivacija arbutina u hidorkinon (preuzeto iz: Jurica, 2016).

Danas su mnoge biljke koje sadrže arbutin ugrožene, pa se istražuju mogućnosti biotransformacije egzogeno unesenog hidrokinona u beta arbutin. Biljka na kojoj je provedeno takvo istraživanje u *in vitro* uvjetima je *Origanum majorana* koja pripada porodici *Lamiaceae* (Skoula i Harborne, 2002). Aromatska je biljka, pokazuje antibakterijsku aktivnost, te se koristi u liječenju dišnih bolesti. Kao i većina biljaka iz porodice *Lamiaceae* prirodni je proizvođač arbutina (Lukas i sur., 2010). Dokazano je da biljke koje sadrže enzim glikoziltransferazu mogu biosintetski uz UDP glukozu aktivirati određene biokemijske putove pri čemu dolazi do konverzije, odnosno pretvaranja hidrokinona u arbutin (Skrzypczak-Pietraszek i sur., 2017) (Slika 4). Također, biokonverzija u alfa arbutin iz hidrokinona moguća je industrijski, pomoću mikroorganizama. Tako glukozidaza iz pekarskog kvasca (*S. cerevisie*) koristi hidrokinon kao supstrat a maltozu kao donor te dolazi do sinteze arbutina (Seo i sur., 2012).

Kittipongpatana i sur. (2007) govore kako je arbutin značajno skuplji (~ 200 puta) od hidrokinona te smatraju logičnim razvoj sustava postrojenja za stanične kulture koje mogu pretvoriti manje skup hidrokinon u arbutin. Takvi sustavi mogu koristiti poznate biljke koje su u mogućnosti proizvoditi arbutin ili sustave koji proizlaze iz biljaka koje ne mogu akumulirati arbutin, ali su sposobne za obavljanje procesa glikozilacije.



Slika 4. Biotransformacija hidrokinona u arbutin (Preuzeto i prilagođeno iz: Skrzypczak-Pietraszek i sur., 2017).

1.1.3. Ekologija arbutina

Ako se arbutin ispusti u okoliš, kroz različite vrste otpada, njegov tlak pare iznosi 2.3×10^{-12} mm Hg na 25°C što znači da će arbutin postojati samo u fazi čestica u atmosferi. Zbog kemijske strukture arbutin nije u stanju apsorbirati valne duljine veće od 290 nm, pa iz tog razloga nije osjetljiv na fotolizu. U tlu su njegove molekule vrlo dobro pokretljive, dok se u vodi arbutin neće apsorbirati na suspendirane tvari i sediment. Nije hlapljiv u vodi jer nema funkcionalne skupine koje hidroliziraju pod uvjetima okoliša (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/arbutin#section=Environmental-Fate-Exposure-Summary>).

Profesionalna izloženost arbutinu može se javiti putem udisanja i kožnog kontakta na radnim mjestima gdje se arbutin proizvodi ili koristi. Do sad prikupljeni podatci pokazuju da opća populacija može biti izložena arbutinu putem uzimanja određenih namirnica i dermalnim kontaktom s ovim spojem ili drugim potrošačkim proizvodima koji sadržavaju arbutin. (Deisinger, 1996).

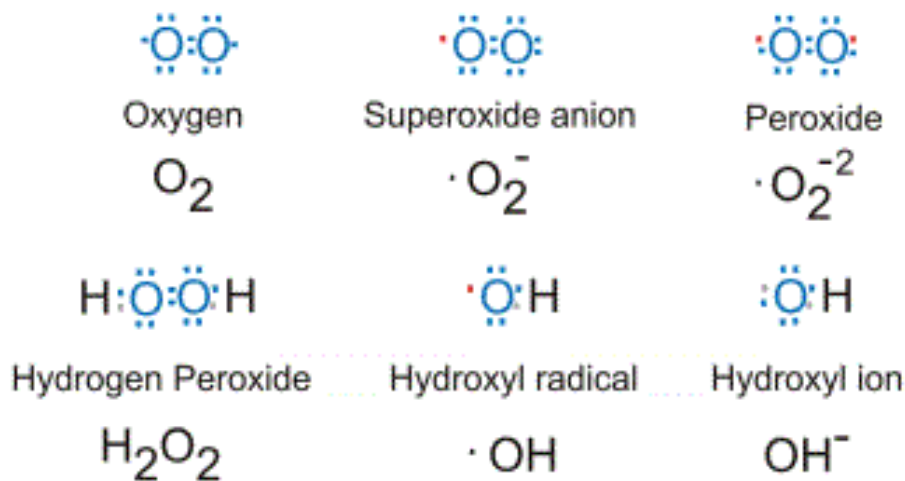
1.2. Oksidacijski stres

Aerobni metabolički procesi, kao respiracija u mitohondrijima te fotosinteza u kloroplastima dovode do nastanka molekula koje imaju nespareni elektron u različitim orbitalama vanjske ljuske te se kao takve nazivaju reaktivnim kisikovim spojevima (ROS) (Held, 2012). Stanje povećane koncentracije ROS-a može dovesti do oštećenja staničnih struktura, poremećaja u staničnom metabolizmu te njegovoj regulaciji (Lushchak, 2011). Dakle, oksidacijski stres može se definirati kao pomak ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije (Kohen i Nyska, 2002).

1.2.1. Slobodni radikali u stanici

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona koji su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost radikala. Njihov nastanak u stanici može biti endogene prirode kao što je upala, stres, ishemija, različite vrste infekcija, kancerogeneza te starenje. Također ROS se u organizmu može generirati djelovanjem: lijekova (ciklosporin, takrolimus), teških metala, opijata, različitih tipova zračenja te zagađenja (Apel i Hirt, 2004). ROS koji nastaju u organizmu su superoksid, vodikov peroksid, hidroksilni radikal, hidroksilni ion, te imaju mogućnost transformacije jedan u drugi (Lushchak, 2011) (Slika 5).

Razlog zbog kojeg je kisik podložan stvaranju slobodnih radikala krije se u njegovoj elektronskoj konfiguraciji. Iako u molekularnom obliku ima paran broj elektrona, ostaju mu dva nesparena elektrona koji se u orbitalama nalaze pod istim kvantnim brojem spina. Prilikom oksidacije kisikom nekog drugog atoma ili molekule oba nova elektrona koja se prenose bi trebala biti istog paralelnog spina, dok je uobičajeno da elektroni u orbitalama imaju antiparalelni spin. Stoga je kisik primoran na prijenos samo jednog elektrona, što direktno dovodi do nastanka superoksidnog aniona i srodnih radikala (Cadenas, 1989).



Slika 5. Reaktivni kisikovi spojevi. Crvena točka predstavlja nespareni elektron (preuzeto iz: Held, 2012)

Uz reaktivne kisikove spojeve u organizmu su prisutni i reaktivni dušikovi spojevi (RNS), od kojih je najčešći dušikov monoksid (NO). Stvara se u višim organizmima oksidacijom dušikovog atoma s krajeva L-arginina pomoću enzima NO sintetaze (NOS) (Dröge, 2002). Ovisno o mikrookolišu, može se pretvarati u druge reaktivne dušikove vrste, kao što su peroksi nitrit (ONOO⁻) te nitrozil (NO⁺). NO ima veliku ulogu u inhibiciji adhezije trombocita i održavanju vaskularnog tonusa vezanjem na gvanilat ciklazu. Aktivirani enzim pretvara GTP u cGMP te posljedično tome dolazi do modulacije funkcije protein kinaza, fosfodiesteraza, ionskih kanala te regulacije tonusa glatkih mišića. Također, superoksid i vodikov peroksid mogu aktivirati gvanilat ciklazu, neizravno tako što njihove mikromolarne koncentracije stimuliraju NOS (Schmidt i sur., 1993).

Relativno male količine ROS-a svakodnevno se stvaraju u organizmu. Najveća količina nastaje u mitohondrijskom respiracijskom lancu. Koenzim Q i kompleks III najvjerojatnije su glavna mjesta gdje elektroni „pobjegnu“ i dolaze u interakciju s molekularnim kisikom dajući superoksidni anion. Reakcija gdje se naveliko događa redukcija molekularnog kisika u superoksid je nastajanje ubisemikvinona iz ubikvinona. Nadalje, NADH-ubikvinon reduktaza i ubikvinon citokrom c reduktaza generatori su reaktivnih kisikovih vrsta (Dalton i sur., 1999). Drugi po redu najvažniji izvor ROS-a je lanac transporta elektrona u endoplazmatskom retikulumu i peroksisomima (Malhotra i Kaufman, 2007). Enzim ksantin oksidaza također generira superoksid konverzijom hipoksantina u ksantin pa zatim u mokraćnu kiselinu, ali u malim količinama (Dröge i sur., 2002). Nakupljanju ROS-a pridonosi i oksidacija dopamina, odnosno propadanje dopaminergičkih neurona, osobito kod Parkinsonove bolesti (Luo i Roth, 2000).

Fiziološka doza slobodnih radikala ima pozitivne uloge kao što su važnost u imunološkom odgovoru, proliferaciji stanica, metabolizmu prostaglandina, aktivaciji staničnih receptora, regulaciji vaskularnog tonusa, kontroli oksigenacije te utjecaju na eritropoezu. Produkcija ROS-a događa se i uz nefagocitnu NADPH oksidazu te ima ulogu u kaskadi stanične signalizacije u fibroblastima, endotelnim stanicama, miocitima, stanicama glatkih mišića te tiroidnom tkivu (Griendling i sur., 2000, Dröge, 2002). Također, ROS regulira produkciju hormona kao što su eritropoetin, VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*), IGF-II (od engl. *insulin like growth factor II*) (Dröge, 2002). Fagocitne stanice kao što su monociti, eozinofili, neutrofil i makrofazi proizvode veliku količinu superoksida i njegovih derivata kao dio mehanizma uništavanja mikroorganizma pomoću NADPH oksidaze u upalnom stanju organizma. Ta masovna produkcija antibakterijskog i antitumorskog ROS-a u upalnom stanju naziva se „oksidacijski prasak“ te igra važnu ulogu kao prva linija obrane protiv patogena. Također, aktivacijom NADPH oksidaze u makrofazima proizvodi se hipokloritna kiselina (HClO), jedna od jačih fizioloških oksidansa i antimikrobnih agenasa (Knight, 2000). No, u slučaju ako patogeni ipak probiju prvu liniju obrane i uđu u organizam, MHC stanice ih prezentiraju T limfocitima nakon čega slijedi njihova proliferacija. Upravo u toj aktivaciji ROS ima ključnu ulogu gdje pojačava signalnu kaskadu proliferacije, odnosno pojačava odgovor limfocita na malu količinu antigena (Yang i sur., 2013).

Ukoliko se ROS-a stvaraju u prekomjernim količinama, a njihovo uklanjanje nije dovoljno učinkovito može doći do oksidacije i oštećenja gotovo svake organske molekule. Oštećenje DNA uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji (McCord, 2000). Narušava se homeostaza iona, stanična signalizacija te genska transkripcija (Atashi i sur., 2015).

Pretjerana stimulacija NADPH oksidaze citokinima primijećena je kod mnogih patofizioloških stanja. Tako je HIV povezan s povećanom proizvodnjom ROS-a u mišićima, kortikalni neuroni kod Downovog sindroma eksponiraju tri puta više ROS-a nego zdravi pojedinci te je kod reumatoidnog artritisa primijećena smanjena koncentracija GSH. Također, zapaženo je da starenjem organizma transportni lanac elektrona pretjerano proizvodi radikale (Dröge, 2002).

1.3. Antioksidacijski sustav organizma

Antioksidansi su stabilne molekule koje imaju sposobnost doniranja elektrona slobodnom radikalu kako bi se on mogao neutralizirati prije nego dođe do oštećenja. Održavanje ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama organizma obuhvaća primarni, sekundarni i tercijarni stupanj zaštite. Primarni stupanj obuhvaća prevenciju od stvaranja ROS-a od strane proteina kao što su transferin, feritin, mioglobin, albumin, metalotionein koji vežu atom metala. Njih se svrstava u nespecifične visokomolekularne antioksidanse. U sekundarni stupanj zaštite ubrajaju se neenzimatski antioksidansi, tzv. „male molekule“ kao što su vitamin C i E, flavonoidi, karotenoidi i glutacion koje reagiraju sa slobodnim radikalima (Lushchak, 2011). S druge strane, dio sekundarne zaštite isto tako čine enzimski antioksidansi kao na primjer superoksid dismutaza (SOD), glutacion reduktaza (GR), glutacion peroksidaza (GSH-Px) te katalaza (CAT). Oni uklanjaju ROS izravno enzimskom katalizom. Tercijarni oblik zaštite obuhvaća popravak nastalih oštećenja ili uklanjanje oštećenih stanica i tkiva proteolitičkim enzimima kao što su glikozilaze i nukleaze (Foyer i Noctor, 2009).

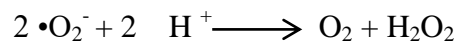
1.3.1. Enzimatski antioksidansi

Sustav antioksidacijskih enzima vrlo je dobro povezan i usklađen. 4 glavna enzima ovoga sustava su superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza i glutacion reduktaza (Lobo i sur., 2010). Osnovni cilj antioksidacijskih enzima je uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta te sprječavanje mogućih oksidacijskih oštećenja. McCord i Fridovich (1969) prvi puta spominju enzim superoksid dismutazu (SOD), te time naglašavaju važnost oksidacijskog stresa. Upravo je SOD prvi korak obrane nakon čega ostali enzimi imaju ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida (Lobo i sur., 2010).

1.3.1.1. Superoksid dismutaza (SOD)

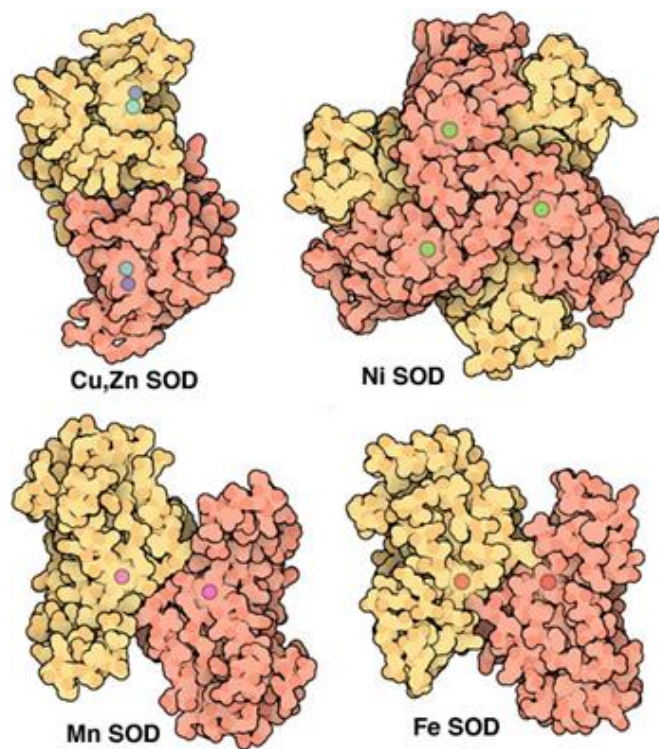
Metaloenzim superoksid dismutaza (SOD) katalizira reakciju dismutacije superoksidnih radikala, pri čemu se jedna molekula slobodnog radikala oksidira u kisik, a druga u vodikov peroksid, pa je stoga važan antioksidacijski čimbenik u obrani gotovo svih stanica izloženih aerobnom metabolizmu (Sheng i sur., 2014). SOD je protein koji kao kofaktor može sadržavati cink, mangan, bakar, nikal ili željezo. U fiziološkim uvjetima održava koncentraciju superoksidnog aniona na niskoj razini pa se smatra da SOD ima centralnu ulogu u obrani od oksidacijskog stresa (Sentman i sur., 2006).

Dismutaciju superoksida SOD-om možemo prikazati sljedećom jednadžbom kemijske reakcije:



Poznato je pet izoformi SOD od kojih su tri prisutna kod eukariota. Međusobno se razlikuju po metalnom ionu koji sadrže (Slika 6).

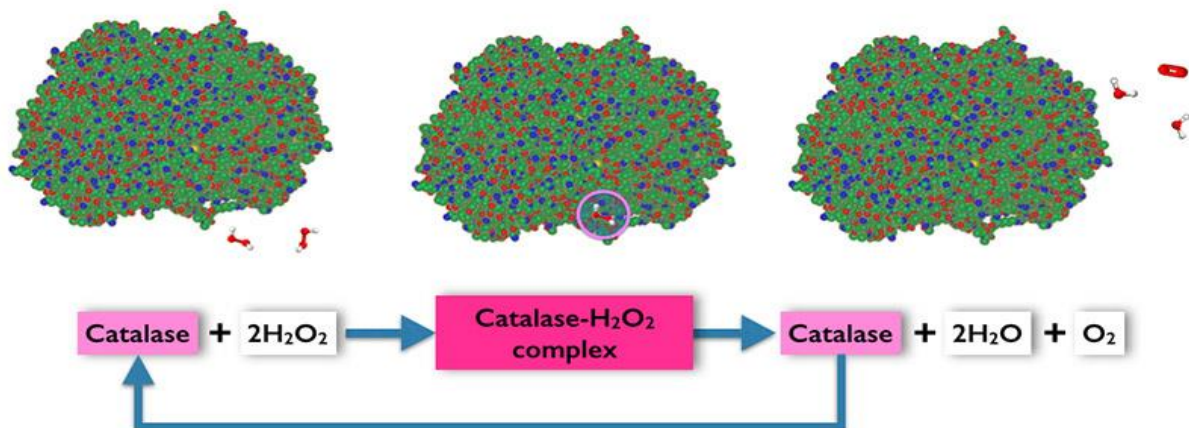
Bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD/SOD1) sadrži podjedinice građene od 153 aminokiselina koje sadrže navedene metale. Po građi je dimer te je smještena je u citoplazmi, lizosomima i jezgri i drugim kompartmentima (Indo i sur., 2015). Mangan superoksid dismutaza (MnSOD/SOD2) je heterodimer te se sastoji od podjedinice koja sadrži mangan u aktivnom središtu. Nalazi se u matriksu mitohondrija. SOD2 najveću razinu aktivnosti postiže u stanicama bubrežnog korteksa. Ekstracelularna superoksid dismutaza (ECSOD/SOD3) građena je od cink (Zn) i bakar (Cu) podjedinice te sadrži domenu s visokim afinitetom za heparin, što doprinosi njegovoj lokalizaciji u izvanstaničnim tekućinama kao što su plazma i limfa. Sva tri enzima imaju istu funkciju, a to je otklanjanje superoksidnog aniona (Quint i sur., 2006). Također, postoji izoforma koja u aktivnom mjestu sadrži željezo (FeSOD) te je poglavito nalazimo u kloroplastima i bakterijama, kao što je slučaj s još rjeđom nikal SOD (NiSOD) (Fukai i Ushio-Fukai, 2011; <http://pdb101.rcsb.org/motm/94>).



Slika 6. Izoforme superoksid dismutaze
(Preuzeto sa: <http://pdb101.rcsb.org/motm/94>)

1.3.1.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT) je tetramer te svaka podjedinica u aktivnom mjestu sadrži porfirinsku hem skupinu s atomom željeza koja omogućava enzimu da reagira s vodikovim peroksidom. CAT pronalazimo u svim organima, ali njene najveće koncentracije izmjerene su u stanicama jetre (Lobo i sur., 2010), dok srce, mozak i poprečno prugasti mišići sadrže samo male količine katalaze (Reid i sur., 1981). Smještena je u subcelularnim organelima peroksisomima (Mahmoud i Elnour, 2013). Osnovna uloga CAT je razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2) (Slika 7). Njezina aktivnost očituje se tek pri većem stvaranju vodikovog peroksida jer je za reakciju potreban simultani dolazak dvije molekule H_2O_2 u aktivno mjesto (Glorieux i Calderon, 2017). Glavnu ulogu u odstranjivanju malih količina ima glutathion peroksidaza (GSH-Px). To govori da je CAT isključivo odgovorna za razgradnju vodikovog peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa (Lobo i sur., 2010). Njena velika uloga je uklanjanje peroksida pri α -oksidaciji masnih kiselina u peroksisomima (Rhee i sur., 2005). Isto tako CAT u jetri zaustavlja aktivnost metaloproteinaze (MMP) i kancerogenezu (Weydert i Cullen, 2010).



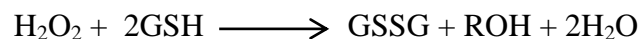
Slika 7. Prikaz osnovne uloge katalaze, razgradnja vodikovog peroksida
(Preuzeto sa: <http://www.citethisforme.com/topic-ideas/biology/Enzymes%20-%20Catalase-19841430>)

Katalaza oksidira vodikov peroksid nastao u peroksisomima, dok onaj iz mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma ili citosola, nastao kao produkt dismutacije superoksidnog iona pomoću SOD, uklanja GSH-Px. Aktivnost CAT vrlo je velika, što nam govori primjer da jedna molekula enzima reducira otprilike 6 milijuna molekula vodikovog peroksida do vode i kisika u jednoj minuti (Glorieux i Calderon, 2017).

1.3.1.3. Popratni enzimi glutationa

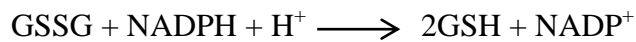
Glutation je po kemijskom sastavu tripeptid, točnije sastoji se od tri aminokiseline: glutamata, cisteina i glicina. U normalnim uvjetima glutation se nalazi više od 90% u reduciranom obliku (GSH), dok manje od 10% čini glutation u oksidiranom, odnosno disulfidnom obliku (GSSG). Oksidirani oblik glutationa u omjeru većem od reduciranog indikator je oksidacijskog stresa kojem je organizam izložen (Griffith, 1980). Glutation je jedan od najznačajnijih antioksidanasa prisutnih ne samo u ljudskom tijelu, već u svim biološkim organizmima izloženim oksidacijskom stresu i toksinima, kako životinjama, tako i biljkama te mikroorganizmima (Meister i Anderson, 1983). Njegova uloga je da štiti eritrocite od vodikovog peroksida koji nastaje kao otrovni nusprodukt mnogih metaboličkih reakcija. Također, ima važnu ulogu u staničnom disanju kod sisavaca i biljaka (Lobo i sur., 2010).

Reakcijom redukcije vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida u vodu i određeni alkohol dolazi do oksidacije tiolne skupine cisteina reduciranog glutationa te on kao takav prelazi u oksidirani oblik. Ova reakcija redukcije peroksida katalizirana je glutation peroksidazom (GSH-Px).



GSH-Px građena je kao tetramerni selenoprotein. U stanicama sisavaca postoje 4 glavne izoforme ovog enzima. Klasična GSH-Px karakteristična je za crvene krvne stanice, jetru, pluća i bubrege, dok plazma izomer možemo izolirati iz srca, epididimisa, posteljice i mišićnog tkiva. Gastrointestinalna i fosfolipidna peroksidaza također su prisutne u različitim tkivima. GSH-Px općenito ima veći afinitet prema vodikovom peroksidu od katalaze pa je učinkovitija u detoksifikaciji stanice posebno pri fiziološkim koncentracijama supstrata. Što se tiče unutarstaničnog smještaja, poglavito ju pronalazimo u mitohondrijima i citosolu. U novije vrijeme, u sisavaca opisana je fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza (PHGPx) koja inkorporira cistein umjesto selenocisteina. Takva peroksidaza ima esencijalnu ulogu kod raka dojke gdje ublažava oksidacijski stres nastao metabolizmom masnih kiselina (Margis i sur., 2008).

GSSG se može obnoviti u GSH oblik u prisutnosti glutation reduktaze (GR) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) iz pentoza fosfatnog puta (Wamelink i sur., 2008). Reducirani se glutation u daljnjim reakcijama koristi kao reducirajuća molekula koja pretvara potencijalno štetni vodikov peroksid u vodu. Ovaj je mehanizam posebno prisutan u eritrocitima gdje se hemoglobin održava u reduciranom stanju (Kozic i sur., 2002).



1.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija složena je lančana reakcija razgradnje (oksidacije) višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *Polyunsaturated fatty acids*) koje se nalaze u sastavu lipida svih bioloških membrana. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže samo jednu dvostruku vezu mnogo su otpornije na djelovanje ROS-a. Molekularni kisik ne može reagirati s PUFA jer je ta reakcija spinski zabranjena. Zbog toga je peroksidacija moguća samo ako se premosti spinska prepreka mehanizmom slobodnih radikala (Bulat i sur., 2008).

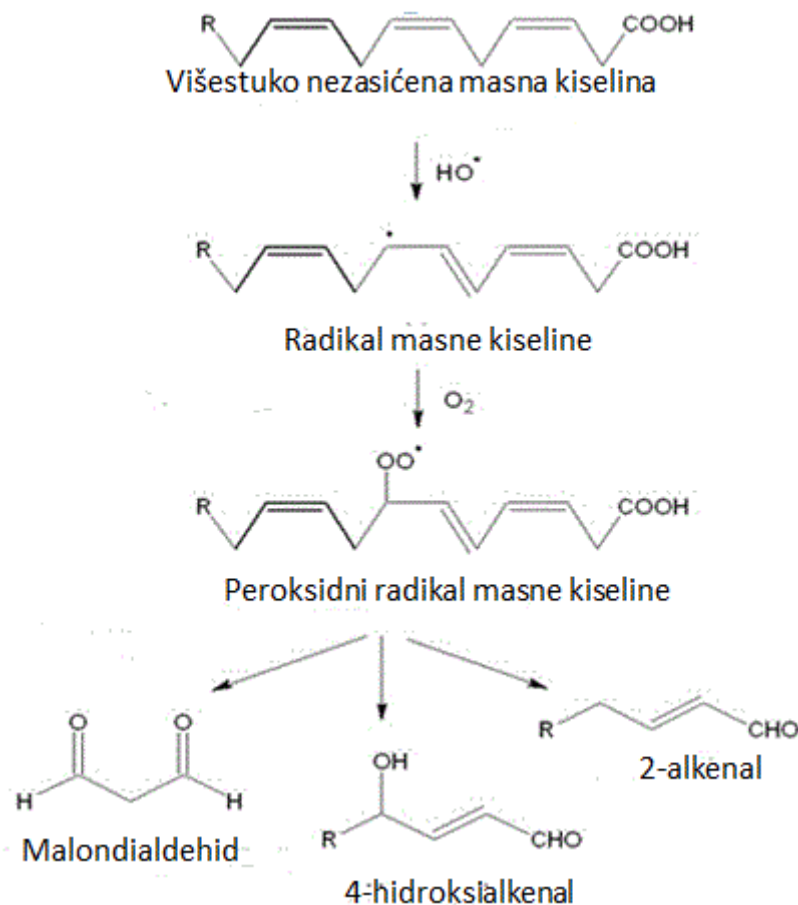
Reaktivni spojevi kisika i dušika glavni su uzročnici lipidne peroksidacije, najčešće je to hidroksilni radikal (OH[•]). Lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do opadanja membranskog potencijala, gubitka fluidnosti, povećanja permeabilnosti prema H⁺ i ostalim ionima te do rupture samih stanica, što je poveznica s različitim bolestima (Bulat i sur., 2008). Kod patofizioloških stanja hidrolitički enzimi otpušteni iz oštećenih lizosoma mogu razgraditi antioksidacijske metaloproteine, što smanjuje mogućnost obrane te ubrzava ulazak stanica u peroksidaciju (Niki, 2009).

Lipidna peroksidacija sastoji se od tri stupnja (Slika 8):

- Inicijacije - formiranje slobodnih radikala
- Propagacije - stvaranje lanaca slobodnih radikala
- Terminacije - stvaranje ne-radikalnih produkata

Početak peroksidacije u lipidnim sustavima odnosi se na napad visoko reaktivnog oksidansa ($\text{OH}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$, $\text{RO}\cdot$), koji ima sposobnost izdvajanja atoma vodika iz metilenske skupine ($-\text{CH}_2-$) višestruko nezasićene masne kiseline gdje posljedično nastaje alkilni (lipidni) radikal. Ovaj korak odvija se na α -metilen C atomu. Lipidnu peroksidaciju može inicirati svaki spoj koji ima sposobnost oduzimanja vodikovog atoma masnoj kiselini. Jedini radikal koji ima dovoljno energije za inicijaciju peroksidacije je hidroksilni ion, dok je superoksidni radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika zato što je negativno nabijen te nema sposobnost ulaska u unutrašnjost membrane. Dvostruke veze u masnim kiselinama oslabljuju C-H veze na susjednom C atomu, što olakšava premještanje vodika. Ugljikovi radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, tvoreći konjugirane diene (Marnett, 1999).

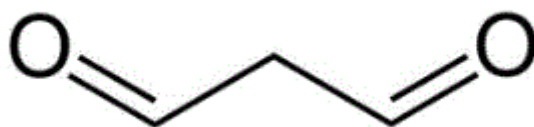
Oni se, u aerobnim uvjetima, mogu spajati s kisikom, te stvarati peroksilne radikale ($\text{LOO}\cdot$) koji imaju mogućnost daljnje eliminacije vodikovog iona iz druge višestruko nezasićene masne kiseline. Tako može doći do oblikovanja lipidnih hidroperoksida (uključujući cikličke peroksida) i reaktivnih ugljikovih radikala koji nastavljaju reakciju slobodno radikalnim mehanizmom. U tom slučaju govorimo o fazi propagacije. Tijekom nje peroksidni radikal koji je na sebe vezao vodik (LOOH) u prisutnosti željeza disocira do alkoksi ($\text{LO}\cdot$) i lipidno peroksidnih ($\text{LOO}\cdot$) radikala koji dovode do ponovne peroksidacije. U ovoj fazi hemski i nehemski vezano željezo katalizira daljnji proces (Ayala, 2014). Disocijacijom LOOH dolazi do nakupljanja kratkolančanih konačnih produkata peroksidacije, aldehida, ketona, ugljikovodika, te epoksida. Nastali aldehidi nazivaju se „drugi toksični glasnici“ primarnih slobodnih radikala. Oni mogu u određenim uvjetima nastaviti lančanu reakciju oštećenja, iako se nazivaju „završnim produktima“. Njihova reaktivnost niža je od reaktivnosti slobodnih radikala, no dovoljna da mogu naštetiti stanicama pa čak i uzrokovati staničnu smrt (Štefan i sur., 2007).



Slika 8. Lipidna peroksidacija

(preuzeto i prilagođeno sa: <https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/the-effect-of-plant-secondary-metabolites-on-lipid-peroxidation-and-eicosanoid-pathway>)

Malondialdehid (MDA) je pokazatelj peroksidacije iako se stvara u malim količinama. Njegova koncentracija u plazmi govori o oksidacijskom stresu u cijelom organizmu, dok koncentracija u pojedinim organima ukazuje na stanje u tom organu. Organski je spoj kemijske formule $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ (Slika 9). On u obliku enolatnog iona integrira s proteinima, pokazujući afinitet prema lizinskim ostacima, te gvaninu u DNA molekuli što može dovesti do mutagenih oštećenja. MDA se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze (Ayala, 2014).



Slika 9. Strukturna formula malondialdehida

(Preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.curezone.org/ig/i.asp?i=60579>)

Drugi po redu najviše istraživani je hidroksialkenal 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). U velikim količinama ima toksično djelovanje, inhibira stanični rast i modificira lipoproteine. Zbog prisutnosti dviju funkcionalnih skupina i jedne dvostruke veze jako su reaktivni te pokazuju afinitet prema amino skupinama u DNA bazama, proteinima, te fosfolipidima (Poli, 2008).

Izoprostani su još jedna toksična skupina produkata. Nastaju oksidacijom fosfolipida. Izomeri su prostaglandina, no glavna razlika je tome što izoprostani nastaju lokalno u membrani i mnogo su složeniji. Mogu sudjelovati u stvaranju hepatorenalnog sindroma, snažni su plućni i bubrežni vazokonstriktori, te održavaju oksidacijski stres u aterosklerozi (Patrignani i Tacconelli, 2005).

1.5. Oštećenja DNA

DNA je stabilna dvolančana molekula koja u normalnim staničnim uvjetima ne sadrži lomove i strukturne promjene. Prisutna je u kompleksu s histonima gdje čini kromatin, te se kao takva smatra molekulom visoke cjelovitosti. Upravo je ta cjelovitost važna za preživljavanje, funkciju i razvoj stanice. DNA ima ulogu trajne i jedinstvene kopije genoma stanice pa promjene njezine strukture imaju znatno veće posljedice nego promjene lipida, proteina ili RNA. Oštećenja nastala na DNA mogu zaustaviti replikaciju i transkripciju te rezultirati visokom učestalošću mutacija (Cooper i Hausman, 2010).

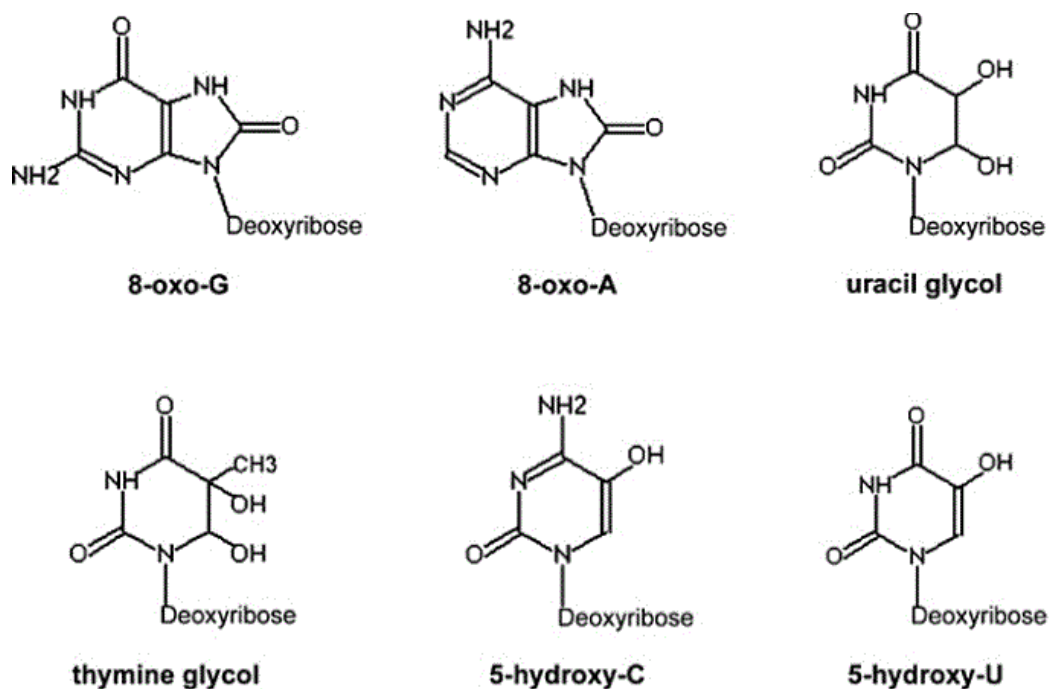
1.5.1. Primarna oštećenja DNA

Spontana primarna oštećenja DNA nastaju tijekom normalnih staničnih metaboličkih procesa dok primarna oštećenja induciranog tipa nastaju uslijed djelovanja različitih genotoksičnih supstanci, odnosno kemijskih i fizikalnih agenasa. U primarna spontana oštećenja ubrajaju se nesparene i krivo sparene baze, oksidacijska oštećenja, gubitak baza, tautomerizacija i deaminacija (Lindahl, 1993). Najčešća primarna oštećenja DNA su jednolančani lomovi. Nastaju kao posljedica normalnog staničnog metabolizma, genotoksičnih agenasa te procesa programirane stanične smrti (Barry i Eastman, 1993). Poliamini i histoni štite DNA obavijanjem i organiziranjem u kromatinske strukture, no ta zaštita često nije dovoljna pa nastaju oštećenja različitih tipova, od stvaranja alkalno-labilnih mjesta, oštećenja baza pa sve do jednolančanih i dvolančanih lomova DNA. (Lee i sur., 1995).

1.5.1.1. Oksidacijska oštećenja DNA

U homeostatskim uvjetima stanični metabolizam izvor je ROS-a. Transportni lanac elektrona može potencirati „curenje“ elektrona do kisika gdje se zatim formiraju superoksidi. ROS se također mogu generirati različitim tipovima zračenja. Nadalje, određene endogene kemikalije mogu poremetiti stanični metabolizam uz naknadnu proizvodnju elektrona koji se mogu prenijeti do molekularnog kisika proizvodeći superoksid (Cooke i sur., 2003). Bez obzira na njihovo podrijetlo, ROS može stupiti u interakciju s ionima metala i biomolekulama, kao što je DNA. Njihova oksidacija dovodi do modifikacije i potencijalno ozbiljnih posljedica za stanicu (Cadet i Davies, 2017).

Od reaktivnih kisikovih vrsta, hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$) reagira s DNA molekulom tako da se veže na dvostruku vezu dušikove baze i apstrahira vodikov atom metilne grupe baze i oba atoma u C-H vezi deoksiriboze. Adicija superoksida na C5-C6 dvostruku vezu pirimidinskog prstena vodi ka stvaranju alilnih radikala koji nastaju apstrakcijom H atoma (Cadet i sur., 2010). Upravo tim reakcijama redukcije i oksidacije, odnosno različitim mehanizmima spajanja purina i pirimidina s reaktivnim kisikovim vrstama nastaju različiti produkti oksidacije (Slika 10) (Cooke i sur., 2003). 8-hidroksideoksigvanozin (8-Oxo-G) jedan je od najčešćih produkata oksidacije DNA, pa se smatra markerom oksidacijskog stresa (Marnett, 2000). Shibutani i Grollman (1991.) demonstrirali su da 8-Oxo-G uzrokuje pogreške u kodiranju DNA polimeraze u uvjetima *in vitro*. Isto tako, uzrokuje transverzije gvanina u timin, koje često nalazimo kod onkogeni i tumor supresor gena. Većina tih modificiranih baza identificirana je u uvjetima *in vitro* u stanicama sisavaca koje su bile izložene slobodnim radikalima, te pokazuju svoja mutagena svojstva (Cooke i sur., 2003). Nadalje, Honda i sur. (2000) prijavljuju povećane razine 8-Oxo-G u urinu kod pacijenata s leukemijom. Zbog ROS-a također dolazi i do unakrsnog povezivanja između DNA i proteina, gdje se radikali baze adiraju na aromatsku aminokiselinu proteina (Stingele i sur., 2017).

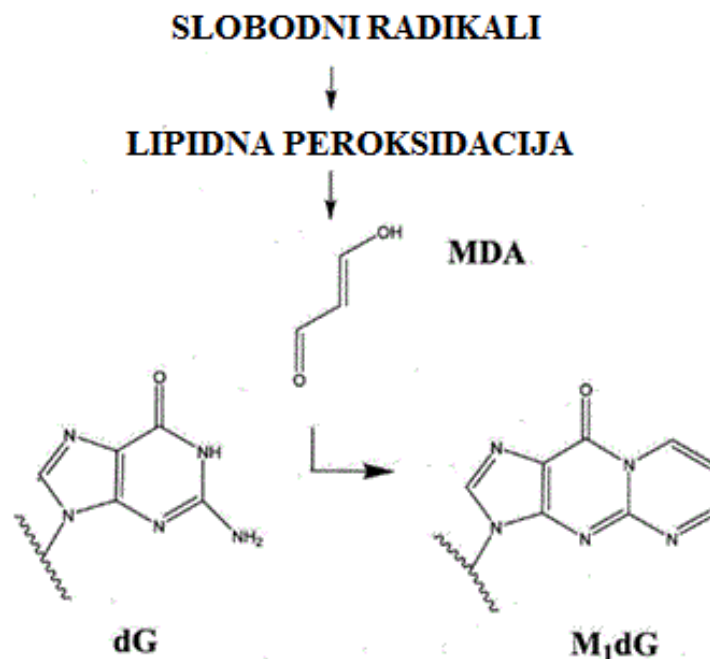


Slika 10. Produkti interakcije slobodnih radikala i DNA baza (Preuzeto iz: van Loon, 2010).

Produkti dobiveni reakcijom ROS-a i citozina mogu se deaminirati i dehidrirati. Citozin glikol se deaminira u uracil glikol, 5-hidroksicitozin te 5- hidroksiuracil. Navedeni spojevi prisutni su u citozinu koji je bio izložen zračenju što navodi na to da navedene komponente mogu biti prisutne u oštećenoj DNA (Smith i sur., 2015).

Reakcije hidroksilnog radikala s deoksiribozom dovode do modifikacija, odnosno do unutarmolekularne ciklizacije, gdje se radikal šećera s 5C pozicije adira na 8C poziciju purinskog prstena istog nukleotida. Takve cikličke strukture su identificirane kod ljudskih stanica koje su bile izložene ionizirajućem zračenju (Dupont i sur., 2013).

MDA, produkt lipidne oksidacije, također može reagirati s dušikovim bazama tvoreći adukte od kojih je najčešći pirimidopurinon M1G (Slika 11). Adukti kao takvi mogu međusobno stvarati dimere i trimere no ta polimerizacija veoma je spora pa oligomerni adukti nisu tako česti (Marnett, 1999).



Slika 11. Formacije MDA-DNA adukata

Preuzeto i prilagođeno sa: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/2/185>

Oksidacijska oštećenja DNA najčešće popravlja enzim glikozilaza koja uklanja oštećenu bazu (Ames i sur., 1993) te na taj način stvara apirimidinsko ili apurinsko (AP) mjesto u DNA. Kod sisavaca postoji 11 vrsta glikozilaza koje su podijeljene u 4 velike superporodice (D'Errico i sur., 2017). AP mjesta se zatim popravljaju djelovanjem AP-endonukleaze koja kida lanac uz AP mjesto, deoksiribozni ostatak se ukloni, a pukotinu tada može popuniti DNA-polimeraza (Cooper i Hausman, 2010).

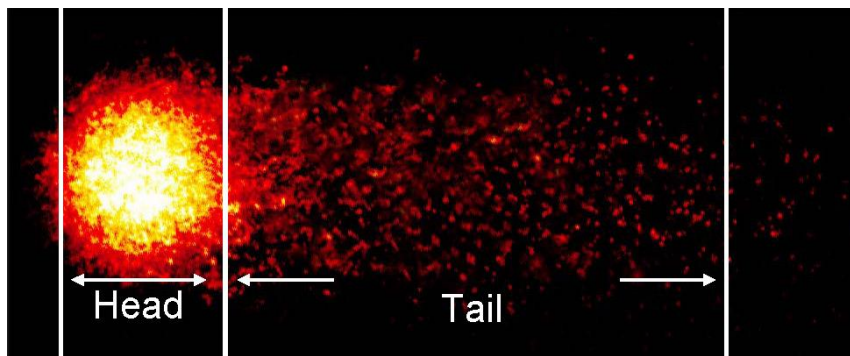
Popravlak 8-Oxo-G dobro je proučen jer se smatra da takva lezija ugrožava integritet genoma. Kada se 8-Oxo-G spari s citozinom postaje dobro poznat supstrat glikozilazi OGG1 (8-oksoguanin glikozilaza 1) (Cooke i sur., 2003).

Zaključeno je da do oksidacijskih oštećenja DNA i ostalih biomolekula dolazi zbog snižene aktivnosti antioksidacijskih enzima, te je konkretno takva korelacija zamijećena kod akutne limfoblastične leukemije (Schuch i sur., 2017).

1.5.1.2. Određivanje primarnih oštećenja DNA komet testom

Komet test ili mikroeletroforeza tehnika je za procjenu oštećenja i popravaka DNA molekule na razini svake pojedine stanice (Collins i sur., 1997). Komet test prvi su puta izveli Ostling i Johanson 1984. godine, u svrhu procjene oštećenja DNA, a 1988. godine Sigh i sur. prvi puta izvode ovu tehniku u alkalnim uvjetima (Olive i sur., 2006).

Ova metoda dobila je naziv po obliku jezgre koja je oštećena, te poprima oblik „kometa“ (Slika 12). Bazira se na svojstvu negativno nabijenih krajeva DNA koji su polomljeni, odnosno slobodni, pa kao takvi mogu putovati u električnom polju od jezgre prema anodi. Denaturirana stanična jezgra i polomljena DNA oblikuju „glavu“ i „rep“ kometa. Metoda se primjenjuje u toksikologiji, gdje je uobičajena u istraživanjima genotoksičnosti u uvjetima *in vivo* i *in vitro* (Sreelatha i sur., 2015).



Slika 12. Prikaz „glave i repa“ kometa

Preuzeto sa :http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/fileadmin/_migrated/RTE/RTEmagicC_CA_02.jpg.jpg

Osnovna ideja testa je jednostavna: stanice se u prvom koraku uklapaju u agarozni gel koji se prethodno izlije na brušeno predmetno stakalce. Gel formira matriks od ugljikovodičnih vlakana koja enkapsuliraju stanice te dolazi do fiksacije stanica na određenom mjestu. Osmotska neutralnost gela omogućava prodor otopina kroz gel i djelovanje na stanice, a sve bez promjene položaja stanica (Rojas i sur., 1999). Sljedeći korak je liza stanica, gdje se primjenjuje otopina visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata. EDTA destabilizira membrane tako što tvori helate s metalnim ionima vezanim uz membranske strukture. Detergenti djeluju na molekule lipida iz stanične membrane, izazivajući razaranje membrane i oslobađanje DNA.

Zatim se DNA denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu, ovisno o tome koja se vrsta oštećenja želi pratiti (Tice i sur., 2000). Metoda u neutralnom puferu pogodna je samo za detekciju dvostrukih lomova DNA, dok alkalni komet test detektira jednolančane (SSB) i dvolančane (DSB) lomove, alkalno labilna mjesta (ALS) koja su podložnija oštećenjima pa se u lužnatim uvjetima pretvaraju u lomove, te unakrsno povezivanje (cross-linking) s molekulom DNA ili proteinima. Alkalni komet test optimalan je za detekciju učinaka genotoksičnih tvari. Pufer, osim što denaturira DNA, također pospješuje uklanjanje soli, koje bi mogle neutralizirati negativne naboje fosfatnih skupina DNA te tako omesti pokretljivost DNA za vrijeme elektroforeze, koja je sljedeći korak u obje verzije (Fairbairn i sur., 1995). Tijekom elektroforeze negativno nabijeni fragmenti DNA pod utjecajem električnog polja putuju u agaroznom gelu prema anodi pozitivnog naboja. Brzina kretanja razlikuje se ovisno o dužini, odnosno molarnoj masi fragmenta. Duži fragmenti veće molarne mase putuju sporije od kraćih fragmenata manje molarne mase u istom vremenskom periodu, te se tako u gelu ulomci razdvajaju prema brzini kretanja (Plappert i sur., 1995) Ako je DNA neoštećena, ona će, zbog svoje velike molarne mase, ostati na mjestu te time formirati „glavu“. Za razliku od toga, oštećeni fragmenti putuju kroz električno polje i tako formiraju „rep“ kometa (Sreelatha i sur., 2015).

Nakon elektroforeze stanice se oboje fluorescencijskom bojom, najčešće je to etidij-bromid, propidij-jodid ili akridin oranž. Procjena lomova u DNA molekuli procjenjuje se na osnovi udjela DNA u „repu“ kometa i udjela DNA u „glavi kometa“. Pod epifluorescencijskim mikroskopom analizira se 50-100 kometa po uzorku (Sigh i sur. 1988). Pomoću računalnog programa za analizu slike istovremeno se mjeri više parametara za svaki pojedini komet. Tri osnovna parametra su dužina repa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost koju su fragmenti DNA prešli tijekom elektroforeze. Mjeri se od sredine glave kometa, a izražava se u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotni udio DNA koja je migrirala u rep, proporcionalan je broju lomova u DNA, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se izračunava pomoću računalnog programa kao umnožak dužine repa i intenziteta repa kometa (Olive i sur., 1990; Tice i sur., 2000).

1.6. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti djelovanje arbutina, primijenjenog u dozi od 200 mg/kg per oralno tijekom 28 dana, na enzime oksidacijskog stresa i primarna oštećenja DNA u bubregu, jetri i mozgu štakora soja Lewis. Njegove antioksidacijske/prooksidacijske ili genotoksične učinke procijenit ćemo pomoću sljedećih metoda: utvrđivanje intenziteta lipidne peroksidacije, određivanje aktivnosti enzima katalaze i superoksid dismutaze, te stupnja primarnih oštećenja DNA (alkalni komet test).

2. Materijali i metode

2.1. Priprema otopine arbutina

Otapanjem arbutina (98 %) proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka) u redestiliranoj vodi pripremljena je vodena otopina, na sobnoj temperaturi. Suspenzija je aplicirana pokusnim životinjama u dozi od 200 mg/kg.

2.2. Pokusne životinje

Eksperiment je proveden na štakorima oba spola soja Lewis starosti 60 ± 5 dana (Slika 13). Štakori su uzgojeni u Nastambi za uzgoj laboratorijskih životinja u Zavodu za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Hranjeni su standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP, 4 RF 1, Mucedola, Settimo Milanese, Milano, Italija), uz stalno dostupnu vodu *ad libitum*. Istraživanje je provedeno prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN55/13) i u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006.). Za provođenje pokusa na životinjama zatražena je suglasnost Etičkog povjerenstva (URBROJ: 251-58-10617-14-104).



Slika 13. Štakor soja Lewis
(Preuzeto sa: <http://www.hilltoplabs.com/public/f344.html>)

2.3. Obrada i tretman životinja

Životinje su slučajnim odabirom raspoređene u skupine koje čine po 4 životinje istog spola. Muški i ženski štakori tretirani su arbutinom (200 mg/kg u volumenu od 0,5 ml) tijekom 28 dana, dok je kontrolnim skupinama u istom periodu davan isti volumen redestilirane vode. Tretiranje životinja provedeno je sukladno s odredbom 407 OECD (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) i US EPA (engl. *United States Environmental Protection Agency*) preporukama o trajanju kratkoročnog toksikološkog tretiranja (OECD 407, 2008, Hayes WA, 2001). Kontrolne i tretirane skupine su tijekom trajanja istraživanja držane u istim uvjetima. Štakori su žrtvovani 24 sata nakon primjene zadnje doze radi uzimanja uzoraka organa (jetra, bubreg i mozak). Tijekom žrtvovanja sve su životinje bile anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar ketamin) (0,8 mL/kg) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar ksilazin) (0,6 mL/kg).

2.4. Uzimanje uzoraka tkiva

Životinjama su nakon žrtvovanja izvađeni jetra, bubreg i mozak. Skalpelom su izrezani komadi tkiva svakog organa mase oko 60 mg koji su korišteni u određivanju aktivnosti antioksidacijskih enzima i lipidne peroksidacije, te mase oko 10 mg za određivanje oksidacijskih oštećenja DNA komet testom.

2.5. Određivanje aktivnosti enzima i lipidne peroksidacije

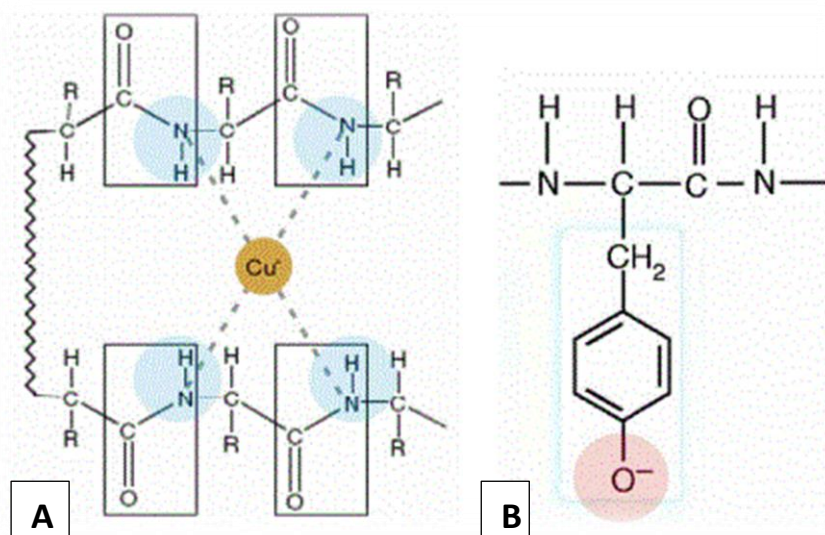
2.5.1. Pripremanje uzoraka

Uzorci organa odvagani su u Eppendorf epruvetu, pomiješani s fosfatnim puferom (10 x masa tkiva = μ L) te homogenizirani ultrazvučnom sondom snage 73 W (Bandelin, Sonoplus HD 70). Homogenizirani uzorci su centrifugirani na 15000 rpm (Eppendorf 5702). Supernatanti su izdvojeni u nove Eppendorf epruvete. Cijelo vrijeme obrade uzorci su držani na ledu kako se proteini ne bi denaturirali. Za svaki od uzoraka organa priređena su razrjeđenja: jetra i bubreg - 40x, te mozak - 10x. Kao takvi korišteni su za daljnji rad.

2.5.2. Određivanje proteina metodom po Lowry-u

Metoda po Lowry-u spada u skupinu indirektnih metoda određivanja koncentracije proteina, odnosno mjerenja apsorbancije otopine proteina pomoću spektrofotometra. U ovom istraživanju korišten je spektrofotometar Libra 22 (Biochrom). Pomoću baždarnog dijagrama dobiveni rezultati su zatim preračunati u količinu proteina. Baždarni dijagram je dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije otopine o koncentraciji ili količini molekula u otopini. Kada su u pitanju proteini, tada baždarni dijagram predstavlja dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije o količini ili koncentraciji proteina u otopini.

Ova metoda temelji se na reakciji između divalentnog iona bakra vezanog na amino skupine peptidne veze i fenolne skupine bočnog ogranka tirozina u proteinima sa Folin-Ciocalteu reagensom u lužnatim uvjetima. Folinov reagens sadrži fosfomolibden i fosfovolfram kiselinu koje reduciraju bakreni ion u molibden i volfram plavilo, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja (Slika 14). Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku i mjeri se spektrofotometrijski.



Slika 14. (A) Ion bakra s četiri dušikova atoma peptidne veze i (B) hidroksilna skupina aminokiseline tirozin u proteinu koji reagiraju s Folinovim reagensom. (Preuzeto sa: https://bib.irb.hr/datoteka/432061.PRAKTIKUM_2009.pdf)

Korištene otopine:

- Otopina A (2 g Na₂CO₃ + 100 ml 0,1M NaOH) 2%
- Otopina B (0,1 g NaK-tartarata + 10 ml dH₂O) 1%
- Otopina C (0,005 g CuSO₄ x 5H₂O + 10 ml dH₂O) 0,5%
- Otopina D sadrži 3 komponente u omjeru A: B:C = 48:1:1
- Otopina E sastoji se od Folin & Ciocalteu's phenol reagensa i destilirane vode u omjeru 2:1 (14 mL Folinovog reagensa + 7 mL dH₂O). Ova otopina pripremljena je se na kraju samog postupka, jer je Folin reagens fotosenzitivan te se bočica oblaže aluminijskom folijom.

Postupak

100 μL uzoraka (bubreg i jetra 40x, mozak 10x) pomiješano je s 2 mL otopine D te inkubirano tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodano je 200 μL otopine E, dobro promiješano na vortex-u te inkubirano sljedećih 30 minuta u tami na sobnoj temperaturi.

Kao standard korišten je albumin iz goveđeg seruma (od eng. *Bovine serum albumin*, BSA) u različitim koncentracijama (1,5; 1,25; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 i 0 mg/mL) (Tablica 1).

Po isteku inkubacije očitana je apsorbancija standardnog niza i uzoraka pri valnoj duljini od 600 nm.

Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:

$$c = ((A \text{ uzorka} - \text{bst. krivulje}) / \text{nagib pravca st. krivulje}) \times \text{razrjeđenje},$$

gdje je: c - koncentracija proteina, A - apsorbancija.

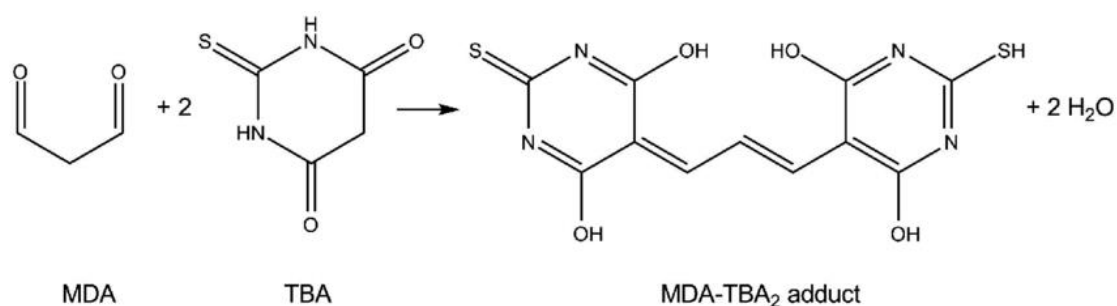
Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

Tablica 1. Niz razrjeđenja BSA u baždarnom dijagramu (standardni niz).

Standardni niz	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
γ (BSA) / mg mL ⁻¹	1,5	1,25	1	0,75	0,5	0,25	0,125	0

2.5.3. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Najčešće korištena metoda za mjerenje stupnja lipidne peroksidacije u biološkim uzorcima je metoda određivanja koncentracije malondialdehida (MDA) tiobarbituratnim testom (TBARS - *tiobarbituric acid reactive substances*). Princip ove metode temelji se na derivatizaciji MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA), pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA što dovodi do nastanka MDA - (TBA)₂ kompleksa (Slika 15). Reakcija se odvija pri niskom pH i visokoj temperaturi pri čemu nastaje ružičasti fluorescentni derivat MDA - (TBA)₂ čija se apsorbancija može izmjeriti spektrofotometrijski pri 532 nm.



Slika 15. Reakcija malondialdehida (MDA) s dvije molekule 2-tiobarbituratne kiseline (TBA) (Preuzeto iz: Weitner i sur., 2016)

Korištene otopine:

- Otopina A pripremljena je otapanjem 0,81 g SDS-a u 10 mL dH₂O.
- Otopina B pripremljena je miješanjem 20 mL 99,5% octene kiseline i 2,3 mL otopine HCl, w (HCl) = 37%. te nadopunjavanjem vodom do 50 mL. pH je podešen na 3,5 te nadopuno destiliranom vodom do 100 mL.
- Otopina C pripremljena je otapanjem 0,8 g TBA u 40 mL dH₂O, te dodavanjem 500 µL natrijeve lužine, c(NaOH) = 5 mol/dm³, te je na kraju volumen nadopunjen destiliranom vodom do 100mL
- Otopina D pripremljena je miješanjem 10mL otopine A, 75 mL otopine B i 75 mL otopine C

Postupak

U svaku prethodno označenu epruvetu dodano je 100 µL uzorka (nerazrijeđeni supernatant) i 1,6 mL otopine D. Epruvete su zatim inkubirane u vodenoj kupelji 60 minuta na temperaturi od 95 °C. Nakon inkubacije, epruvete su tijekom 10 minuta ohlađene na ledu te zatim centrifugirane na 5000 rpm/ 15 minuta pri 4 °C. Spektrofotometrom (UV-160 (Shimadzu)) izmjerena je apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 523 nm. Ukupna koncentracija MDA se izražava kao nmol MDA/ mg proteina, te se izračunava formulom:

$$c = (A \text{ uzorka} \times V \text{ reakcijske smjese}) / (\epsilon \times V \text{ uzorka} \times c \text{ proteina uzorka}),$$

gdje su: A - apsorbancija; V - volumen; ϵ - ekstinkcijski koeficijent; c - koncentracija.

2.5.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze

Postupak

Aktivnost katalaze određuje se mjerenjem količine potrošenog H_2O_2 spektrofotometrom. Otopina 10mM H_2O_2 pripremi se miješanjem 99,887 ml otopine PBS-a i 113 μL 30%-tne otopine H_2O_2 . Nakon pripreme otopine i postavljanja spektrofotometra (UV-160 Shimadzu) u jednu kivetu dodaje se slijepa proba koja sadrži 20 μL PBS-a i 980 μL 10mM H_2O_2 . U svaku sljedeću kivetu dodaje se 20 μL uzorka i 980 μL 10mM H_2O_2 , gdje vodikov peroksid ima ulogu supstrata. Kiveta se prekrije parafinom, brzo promućka inverzijom, te izmjeri smanjenje količine H_2O_2 , odnosno apsorbancija. Svaki uzorak se mjeri 60 sekundi pri valnoj duljini od 240 nm. Izmjerene vrijednosti morale su biti u intervalu od -0,0025 do -0,0500.

Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) prema formuli:

$$c = (A \text{ uzorka} / (\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 \times l)) \times \text{razrjeđenje},$$

gdje je: c - koncentracija, A - apsorbancija, ϵ - ekstinkcijski koeficijent, l - put koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm.

μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg proteina}$) odgovara jedinicama CAT-a po miligramu proteina (U CAT/mg proteina) u kojem je rezultat izražen.

2.5.5. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

Korištene otopine

- Miješanjem otopine citokroma c (29 mg citokroma c + 190 mL 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA) s otopinom ksantina (3 mg ksantina + 19,74 mL NaOH) u omjeru 10:1 pripravljena je otopina A. Ksantin se otapa u čaši pomoću magnetne mješalice uz lagano zagrijavanje pri $t = 30 - 40$ °C.
- Reakcijska otopina B pripravljena je miješanjem 100 μ L enzima ksantin-oksidge i 2400 μ L dH₂O. Tijekom cijelog postupka Eppendorf epruveta s otopinom je držana na ledu i zaštićena aluminijskom folijom.

Postupak

Boca se omota aluminijskom folijom, te se u nju doda prethodno pripravljena otopina citokroma i ksantina (otopina A). Potrebno je miješanje magnetskom mješalicom na sobnoj temperaturi.

U ovoj metodi koriste se dvije slijepa probe. Nakon što je spektrofotometar postavljen, pripremi se prva slijepa proba koja sadrži samo 1,45 mL reagensa A. Druga slijepa proba služi za namještanje aktivnosti ksantin oksidge te sadrži 1,45 mL otopine A, 25 μ L PBS-a i reakcijske otopine B onoliko koliko je potrebno da se aktivnost enzima podesi na 0,0250 U/min (20/25/30 μ L). Nakon namještanja aktivnosti, prva slijepa proba ostaje u spektrofotometru za daljnje mjerenje, dok se druga izvadi van, te se njeno mjesto stavi kiveta koja sadrži 1,45 mL reagensa A i određeni volumen uzorka koji je odgovarao volumenu podešenog enzima (20/25/30). Optimalan raspon apsorbancije mora biti od 0,0090 do 0,0180. Valjna duljina pri kojoj je izvršeno mjerenje iznosi 550 nm.

Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidge koja se računa prema formuli:

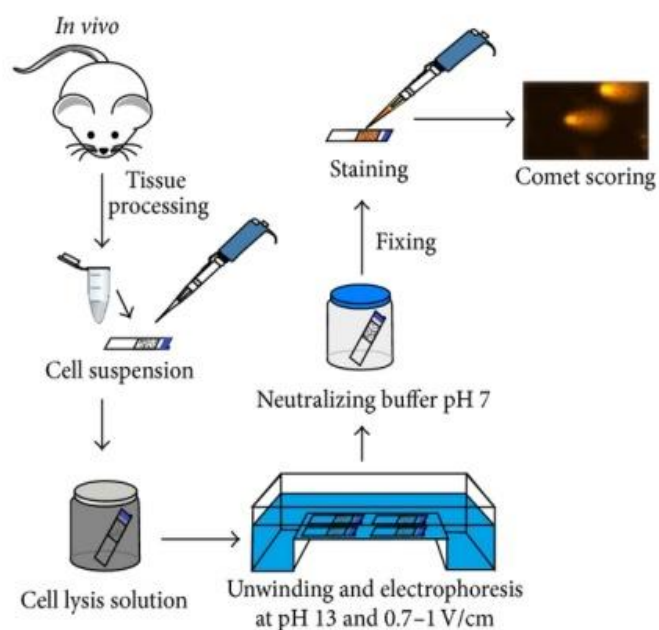
$$\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A \text{ uzorka} / \Delta A \text{ slijepa proba}) \times 100,$$

gdje je A - apsorbancija.

Enzimska aktivnost SOD računa se prema formuli: aktivnost SOD = $10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757) / 30,932)}$. Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

2.6. Komet test

Ovaj eksperiment bazira se na klasičnoj izvedbi komet testa u alkalnim uvjetima (Sigh i sur. 1988) stanicama jetre, bubrega i mozga. International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) preporučuje alkalni komet test kao optimalnu metodu za određivanje genotoksičnosti (Tice i sur., 2000), koji se sastoji od nekoliko koraka (Slika 16).



Slika 16. Koraci komet testa

(Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/269993727_fig1_Schematic-representation-of-comet-assay-protocol)

Priprema uzoraka

Tkivo ispitivanih organa mehanički se usitni u puferu za homogenizaciju [(0,075 M NaCl i 0,024 M Na₂EDTA, pH 7,5)] kako bi se dobila suspenzija stanica (10 µl).

Na brušeno predmetno stakalce nakapa se priređena 1%-tna agarozna normalnog tališta (NMP agarozna, od engl. *normal melting point*) Pasteurovom pipetom, te se prekrije pokrovnicom. Stakalce se ostavi na sobnoj temperaturi kako bi se gel polimerizirao. Nakon polimerizacije gel i pokrovnica se uklone, te se na osušeno stakalce mikropipetom nakapava 300 µL 0,6 %-tne NMP agaroze, pokrije pokrovnicom i stavi 10 minuta na led. Nakon polimerizacije, na stakalca sa slojem NMP agaroze nanosi se sljedeći sloj koji se sastoji od 100 µL 0,5% agaroze niskog tališta (LMP, od engl. *low melting point*) i 5 µL uzoraka organa. Stakalce se ponovno pokrije pokrovnicom. Nakon polimerizacije stajanjem na ledu 10 minuta, preparat se prekrije završnim slojem od 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze, te stavi hladiti još 10 minuta.

Liza staničnih struktura

Pufer za lizu [NaCl (Kemika), Na-laurilsarkozinat (Sigma-Aldrich, SAD), Tris-HCl (Sigma-Aldrich)], DMSO (Kemika), Tritona X-100 (Sigma-Aldrich)], pH vrijednosti 10, ulije se u posebne kadice te se u njih zatim poslože stakalca s uzorcima, kojima su prethodno skinute pokrovnice. Tako uronjene u pufer, stoje 60 minuta na temperaturi od 4°C.

Denaturacija

Denaturacija se provodi na sobnoj temperaturi. Nakon pripreme pufera za denaturaciju [NaOH (Kemika), Na₂EDTA (Sigma-Aldrich)] pH vrijednosti 13, uzorci su izvađeni iz pufera za lizu te uronjeni u prethodno navedeni na 20 minuta.

Elektroforeza

Nakon denaturacije, uzorci su premješteni u aparat za horizontalnu elektroforezu, koja se provodi pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, u vremenskom periodu od 20 minuta. Korišten je pufer koji se koristio i za denaturaciju [NaOH (Kemika), Na₂EDTA (Sigma-Aldrich)] (pH 13).

Neutralizacija

Po završetku elektroforeze, preparati se ispiru tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom puferu (0,4 M Tris-HCl) pH vrijednosti 7,5.

Bojenje preparata

Kada su preparati dobro isprani, bojaju se sa 100 µL fluorescentne boje etidij-bromida koncentracije 20 µg/ml (Sigma-Aldrich) u periodu od 10 minuta. Višak boje kratko se ispiru u Tris-HCl puferu pH vrijednosti 7,5. Preparati se prekriju pokrovnicom, te drže u mraku 15 minuta kako bi se boja stabilizirala prije analize.

Mikroskopska analiza preparata

Preparati su analizirani epifluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom od 515-560 nm. Mjerenja dužine repa, % DNA u repu i repnog momenta provedena su pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*, proizvođača *Perceptive Instruments Ltd*. Za svaki uzorak izmjerili smo po 50 do 100 kometa.

2.7. Statističke metode

Svi rezultati obrađeni su uz pomoć Excela deskriptivnom statistikom. Pomoću računalnog programa STATISTICA 13.1 (StatSoft, Tulsa, SAD) statističke značajnosti u analizi aktivnosti SOD i katalaze te koncentraciji MDA utvrđene su t-testom. Analiza rezultata komet testa izvršena je, uz primjenu analize varijance (ANOVA) s post hoc Scheffeovom modifikacijom. Za prag statističke značajnosti određen je $p < 0,05$.

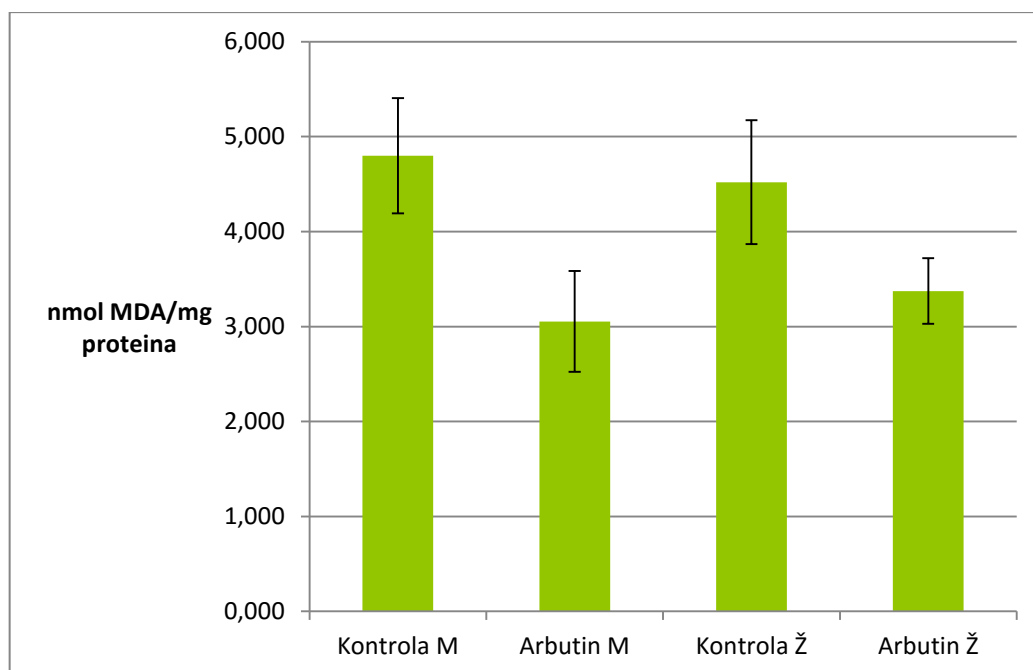
3. Rezultati

U ovom istraživanju procjenjivao se učinak arbutina (200 mg/kg) na enzime oksidacijskog stresa (SOD i CAT), lipidnu peroksidaciju te primarna DNA oštećenja u mozgu, bubregu i jetri štakora muškog i ženskog spola štakora soja Lewis tretiranih oralno tijekom 28 dana.

3.1. Učinak arbutina na intenzitet lipidne peroksidacije

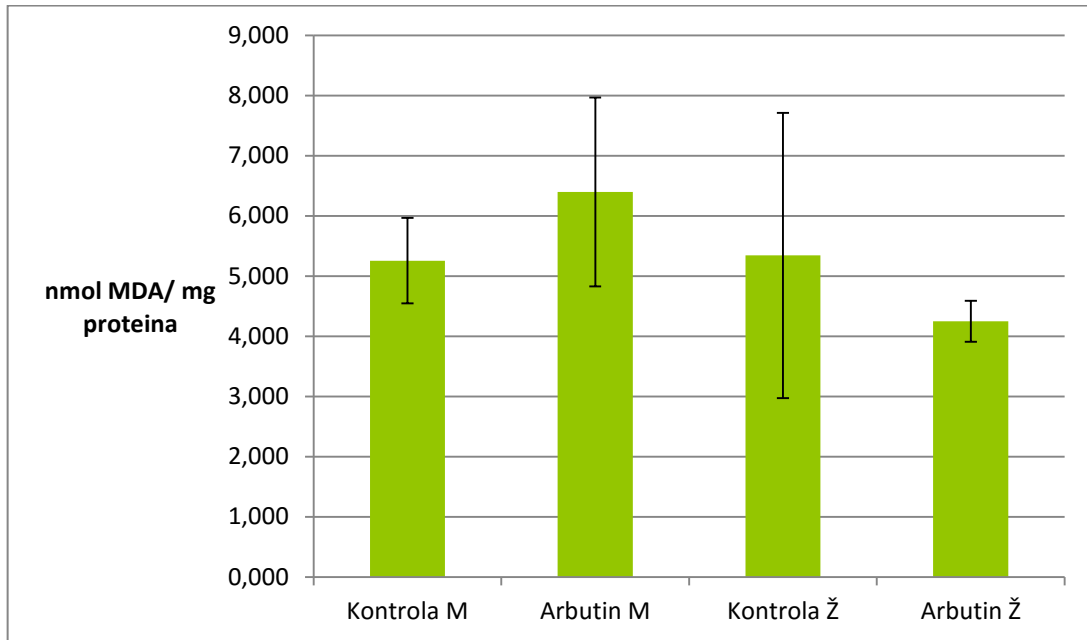
Stupanj lipidne peroksidacije u štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana određen je mjerenjem koncentracije MDA po mg proteina. Rezultati su obrađeni metodom deskriptivne statistike, gdje je izdvojena srednja vrijednost sa standardnom pogreškom te je prikazana grafički. Statistička značajnost izmjerenih vrijednosti testirana je t-testom, a nivo značajnosti postavljen je na $p < 0,05$.

Koncentracija MDA u bubregu štakora smanjena je kako u muških ($3,053 \pm 0,530$) tako i u ženskih ($3,374 \pm 0,345$) štakora tretiranih arbutinom u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (muški: $4,798 \pm 0,606$; ženski: $4,520 \pm 0,653$) (Slika 17). Uočene razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



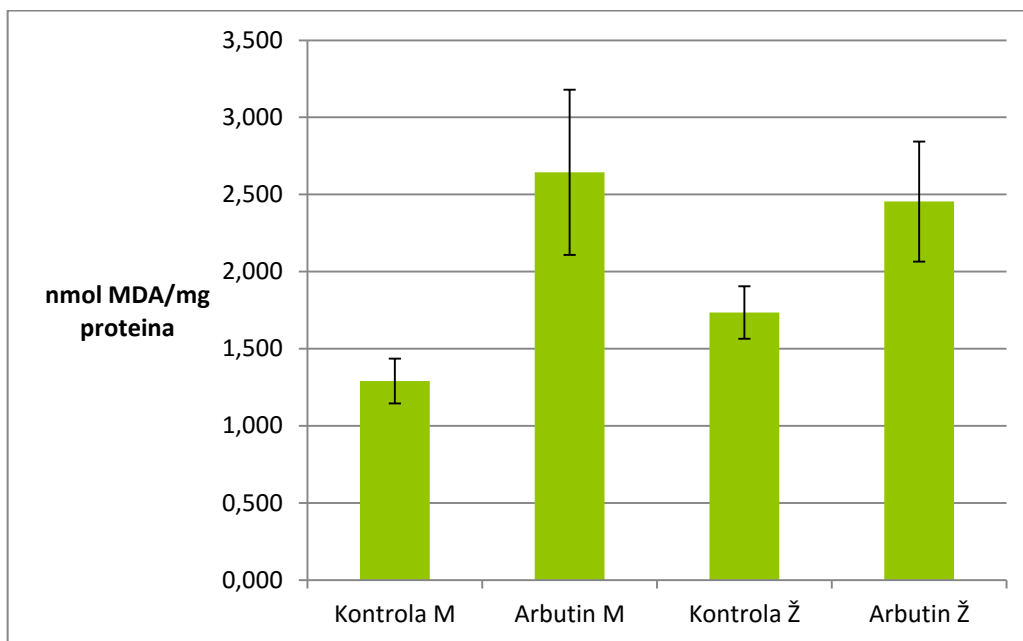
Slika 17. Koncentracija malondialdehida (nmol MDA/mg proteina) u uzorcima bubrega štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. M - mužjaci; Ž - ženke

Kod jetre mužjaka uočen je porast koncentracije MDA u tretiranoj skupini ($6,395 \pm 1,569$) s obzirom na kontrolnu ($5,256 \pm 0,708$), a kod ženki je obrnuta situacija gdje tretirana skupina ($4,248 \pm 0,340$) ima manju vrijednost od pripadajuće kontrolne skupine ($5,343 \pm 2,369$) (Slika 18). Uočene razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 18. Koncentracija malondialdehida (nmol MDA/mg proteina) u uzorcima jetre štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. M - mužjaci; Ž - ženke

Koncentracija MDA u mozgu mužjaka tretiranih arbutinom ($2,644 \pm 0,535$) viša je od vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ($1,290 \pm 0,145$). Slična situacija ponavlja se i kod ženki gdje je skupina tretirana arbutinom ($2,454 \pm 0,390$) također viša u odnosu na kontrolnu skupinu ($1,734 \pm 0,170$) (Slika 19). No, u oba spola razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).

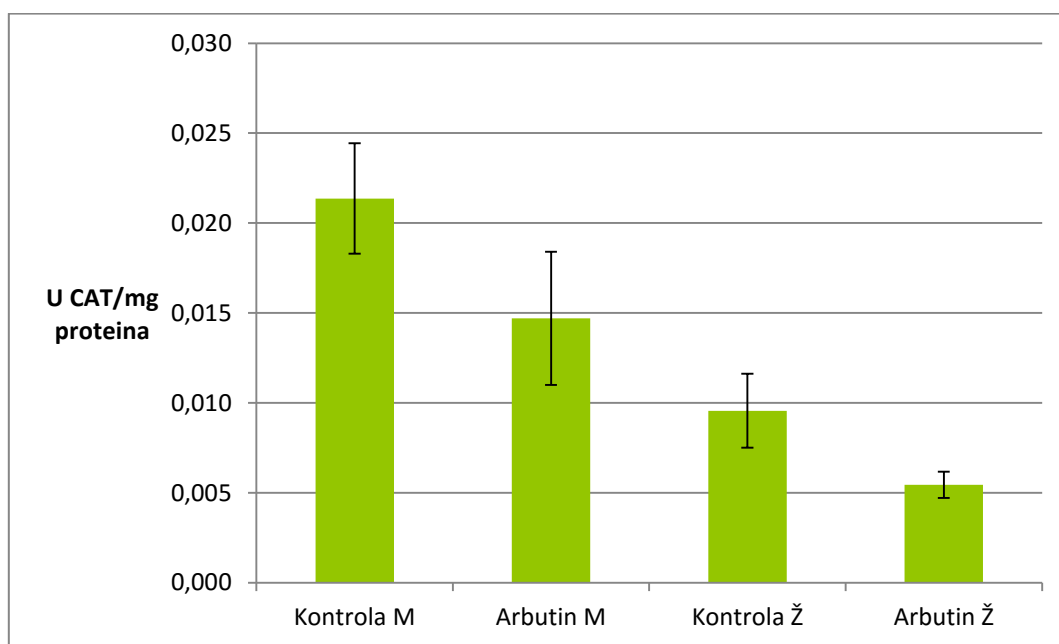


Slika 19. Koncentracija malondialdehida (nmol MDA/mg proteina) u uzorcima mozga štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. M - mužjaci; Ž - ženke

3.2. Učinak arbutina na aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze u bubregu, jetri i mozgu štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) per oralno 28 dana mjerena je spektrofotometrijski te izražena po mg proteina. Rezultati su obrađeni metodom deskriptivne statistike, gdje je izdvojena srednja vrijednost sa standardnom pogreškom te grafički prikazana. Statistička značajnost izmjerenih vrijednosti testirana je t-testom, a nivo značajnosti postavljen je na $p < 0,05$.

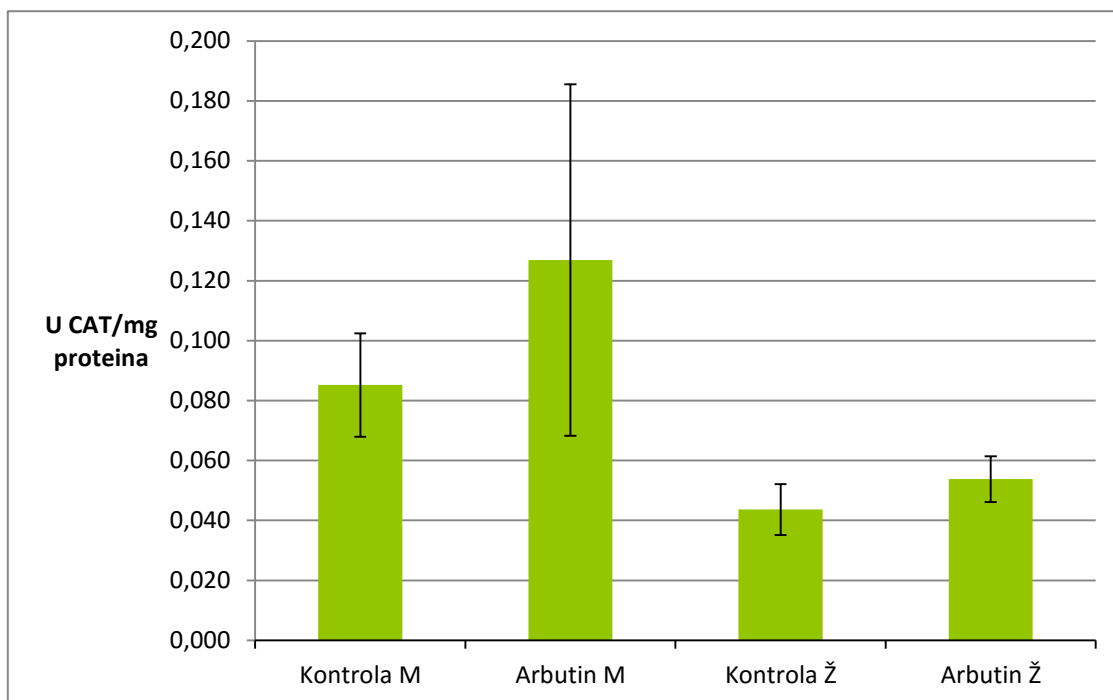
Aktivnost katalaze u bubregu štakora smanjena je kako u muških ($0,015 \pm 0,004$) tako i u ženskih ($0,005 \pm 0,001$) štakora tretiranih arbutinom (200 mg) oralno tijekom 28 dana u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (muški: $0,021 \pm 0,003$; ženski: $0,010 \pm 0,002$) (Slika 20). Uočene razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 20. Aktivnosti katalaze (U CAT/mg proteina) u bubregu štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana.

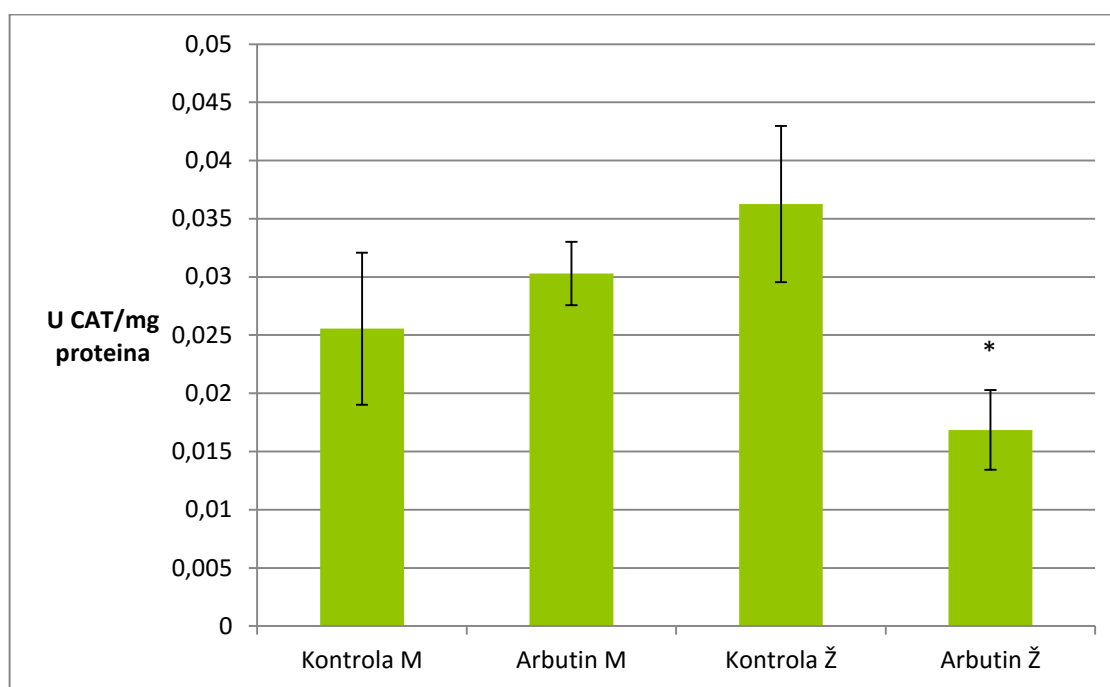
M - mužjaci; Ž - ženke

Kod jetre mužjaka tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana situacija je obrnuta s obzirom na onu u bubregu štakora. Aktivnost katalaze u mužjaka tretiranih arbutinom ($0,127 \pm 0,059$) viša je od vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ($0,085 \pm 0,017$). Slična situacija ponavlja se i kod ženki gdje je skupina tretirana arbutinom ($0,054 \pm 0,008$) također viša u odnosu na kontrolnu skupinu ($0,044 \pm 0,009$) (Slika 21). No, u oba spola razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 21. Aktivnosti katalaze (U CAT/mg proteina) u jetri štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana.
M - mužjaci; Ž - ženke

U mozgu štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana, uočena je razlika u aktivnosti katalaze s obzirom na spol. Kod mužjaka nije zamijećena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina, gdje je vrijednost tretirane skupine ($0,0300 \pm 0,003$) viša u odnosu na pripadajuću kontrolnu ($0,026 \pm 0,007$) skupinu. Nasuprot tome, kod ženki postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između pripadajuće kontrole i tretmana, te je tretirana skupina ($0,017 \pm 0,003$) značajno manja u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($0,036 \pm 0,007$) (Slika 22).



Slika 22. Aktivnosti katalaze (U CAT/mg proteina) u mozgu štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana.

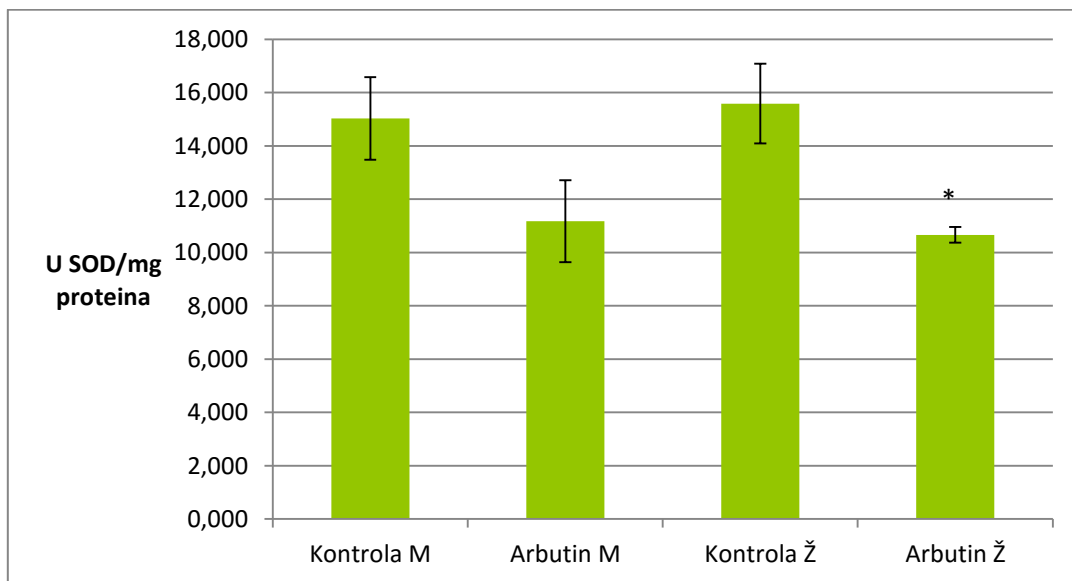
M - mužjaci; Ž - ženke

*statistički značajno u odnosu na kontrolu

3.3. Učinak arbutina na aktivnost superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze u bubregu, jetri i mozgu štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) per oralno 28 dana mjerena je spektrofotometrijski te izražena po mg proteina. Rezultati su obrađeni metodom deskriptivne statistike, gdje je izdvojena srednja vrijednost sa standardnom pogreškom te grafički prikazana. Statistička značajnost izmjerenih vrijednosti testirana je t-testom, a nivo značajnosti postavljen je na $p < 0,05$.

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD u tkivu bubrega u skupini ženki štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana pokazuju statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenu vrijednost ($10,660 \pm 0,295$) u odnosu na pripadajuću kontrolu skupinu ($15,586 \pm 1,497$). U skupini mužjaka štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) također je uočena smanjena ($11,169 \pm 1,537$) aktivnost SOD u tkivu bubrega u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($15,025 \pm 1,552$), međutim uočena razlika nije statistički značajna ($p < 0,05$) (Slika 23).

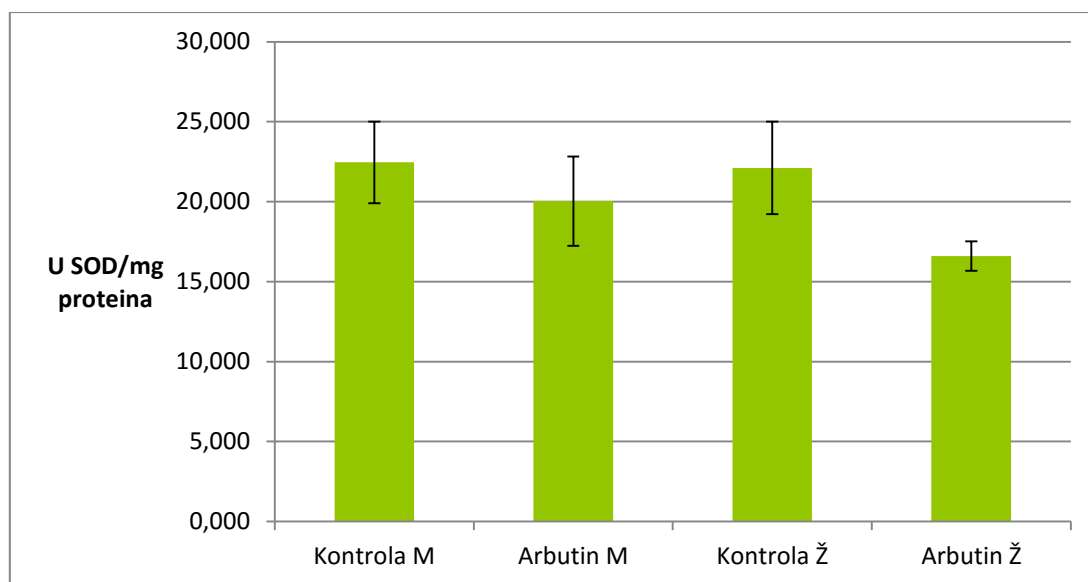


Slika 23. Aktivnosti superoksid dismutaze (U SOD/mg proteina) u bubregu štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana.

M - mužjaci; Ž - ženke

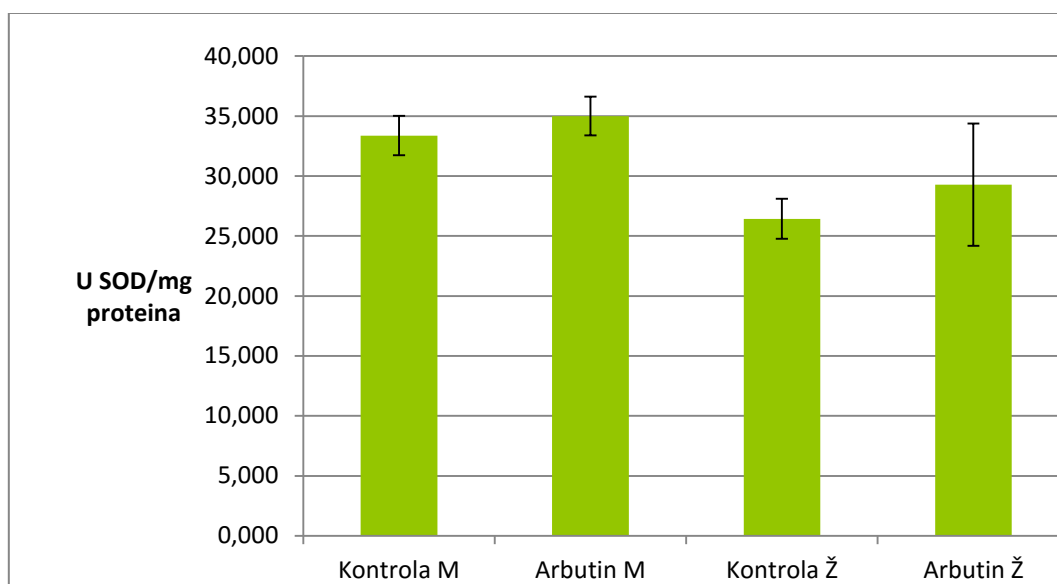
*statistički značajno u odnosu na kontrolu

Aktivnost SOD u jetri nakon tretmana arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana smanjena je kako u muških ($20,033 \pm 2,793$) tako i u ženskih ($16,593 \pm 0,919$) štakora tretiranih arbutinom u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (muški: $22,456 \pm 2,549$; ženski: $22,113 \pm 2,892$) (Slika 24). Uočene razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 24. Aktivnosti superoksid dismutaze (U SOD/mg proteina) u jetri štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana. M - mužjaci; Ž - ženke

U mozgu štakora situacija je nešto drugačija nego kod prethodna dva organa. Aktivnost SOD u mužjaka tretiranih arbutinom (200 mg/kg) oralno tijekom 28 dana viša je ($34,998 \pm 1,617$) od vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ($33,371 \pm 1,633$). Slična situacija je i kod ženki gdje je skupina tretirana arbutinom također viša ($29,274 \pm 5,090$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($26,433 \pm 1,658$) (Slika 25). No, u oba spola razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



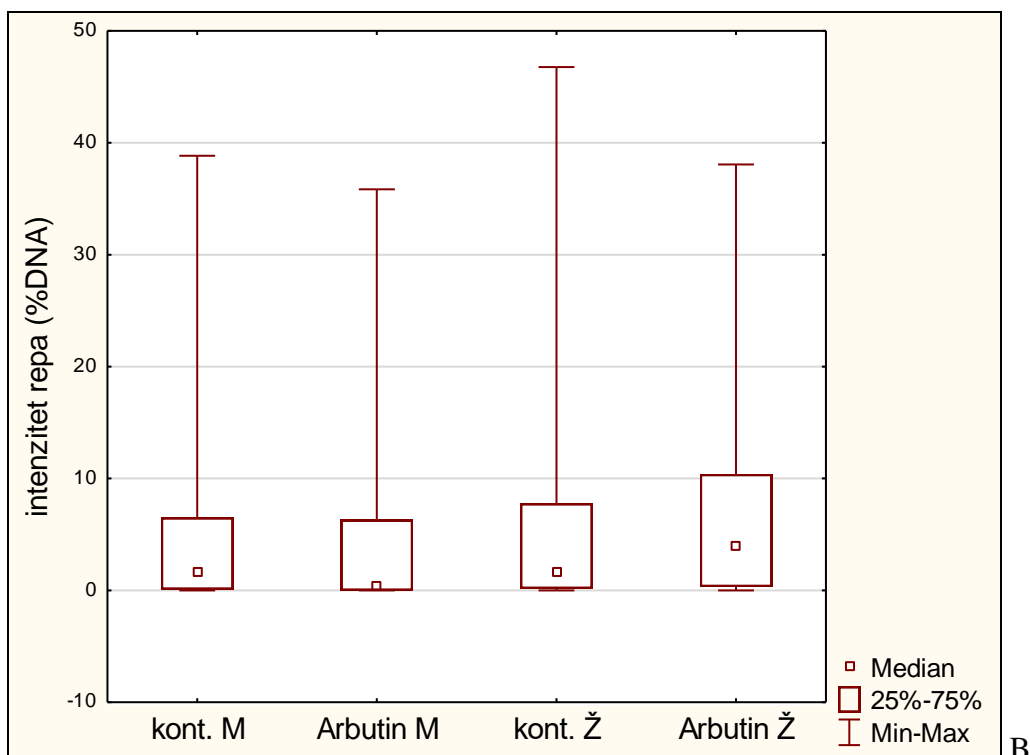
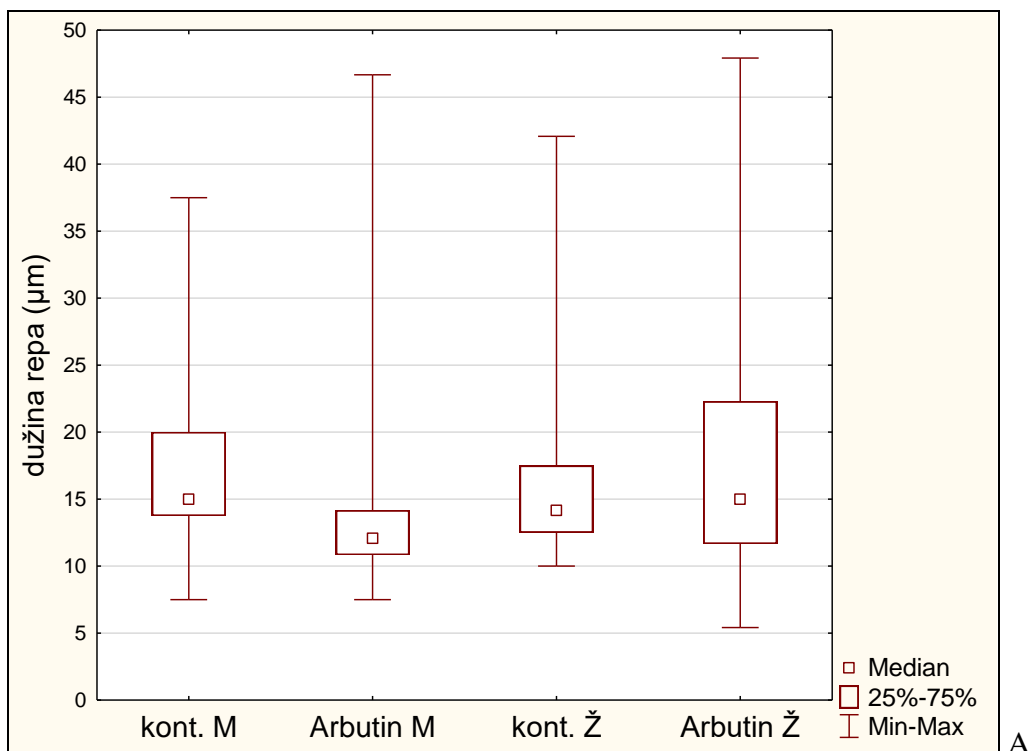
Slika 25. Aktivnosti superoksid dismutaze (U SOD/mg proteina) u mozgu štakora oba spola tretiranih arbutinom (200 mg) oralno tijekom 28 dana.
M - mužjaci; Ž - ženke

3.4. Utjecaj arbutina na primarna oštećenja DNA

Procijenjena su oštećenja DNA molekule komet testom nakon tretmana arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana u oba spola štakora soja Lewis. Izmjereni su parametri: dužina repa, intenzitet repa (% DNA u repu) i repni moment. Navedene parametre komet testa analizirali smo koristeći četiri parametra deskriptivne statistike kojima pripadaju: srednja vrijednost sa standardnom pogreškom, medijan, minimum i maksimum. Statistička značajnost ($p < 0,05$) vrijednosti triju parametara kometa između pokusnih skupina ispitana je pomoću analize varijance uz primjenu *post-hoc* Scheffé-ovog testa.

3.4.1. Stanice bubrega

Kod stanica bubrega mužjaka zapažena je statistički značajno snižena vrijednosti parametara dužina repa ($13,20 \pm 0,37$) u odnosu na pripadajuću kontrolu ($16,94 \pm 0,37$). S druge strane, vrijednosti dužine repa kod ženki ne pokazuju statistički značajnu razliku nakon tretmana u odnosu na kontrolu (tretman: $18,01 \pm 0,62$; kontrola: $16,01 \pm 0,40$) (Slika 26A). Parametar intenzitet repa u mužjaka ($3,90 \pm 0,44$) snižen je u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($5,34 \pm 0,58$), dok je kod ženki štakora vrijednost intenziteta repa veća ($6,95 \pm 0,56$) od pripadajuće kontrolne skupine ($5,36 \pm 0,56$) (Slika 26B). Uočene razlike nisu statistički značajne ($p < 0,05$). Statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$) parametara dužine i intenziteta (% DNA) repa između skupina prikazane su u Tablici 2.



Slika 26. Vrijednosti parametra dužine repa (A) i intenziteta repa (B) kometa izmjerene u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. Statističke značajnosti prikazane u tablici 2.

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji).

kont. M - kontrola mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; Arbutin M - arbutin mužjaci; Arbutin Ž - arbutin ženke; Min - minimum; Max - maksimum.

Tablica 2. Statistički značajne ($p < 0,05$) vrijednosti parametara dužine repa i % DNA u repu kometa izmjerene u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana i pripadajućih kontrolnih skupina (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

	BUBREG	DUŽINA REPA			
		Kontrola M	Arbutin M	Kontrola Ž	Arbutin Ž
% DNA	Kontrola M		0,000000	n.z.	n.z.
	Arbutin M	n.z.		0,000000	0,000000
	Kontrola Ž	n.z.	n.z.		n.z.
	Arbutin Ž	0,025934	0,000005	n.z.	

n.z. - nije značajno
M - mužjaci; Ž - ženke

Vrijednost parametra repni moment kod mužjaka tretiranih arbutinom snižena je ali ne statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. U ženki štakora koncentracija MDA je statistički značajno porasla nakon tretmana s obzirom na pripadajuću kontrolnu skupinu (Tablica 3).

Tablica 3. Vrijednosti parametra repnog momenta kometa izmjerene u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

SKUPINE	REPNI MOMENT			
	SV±SG	MED	MIN	MAX
Kontrola M	0,44±0,05	0,13	0,00	3,84
Arbutin M	0,30±0,04	0,03	0,00	3,44
Kontrola Ž	0,43±0,04	0,15	0,00	4
Arbutin Ž	0,64*±0,05	0,38	0,00	4,27

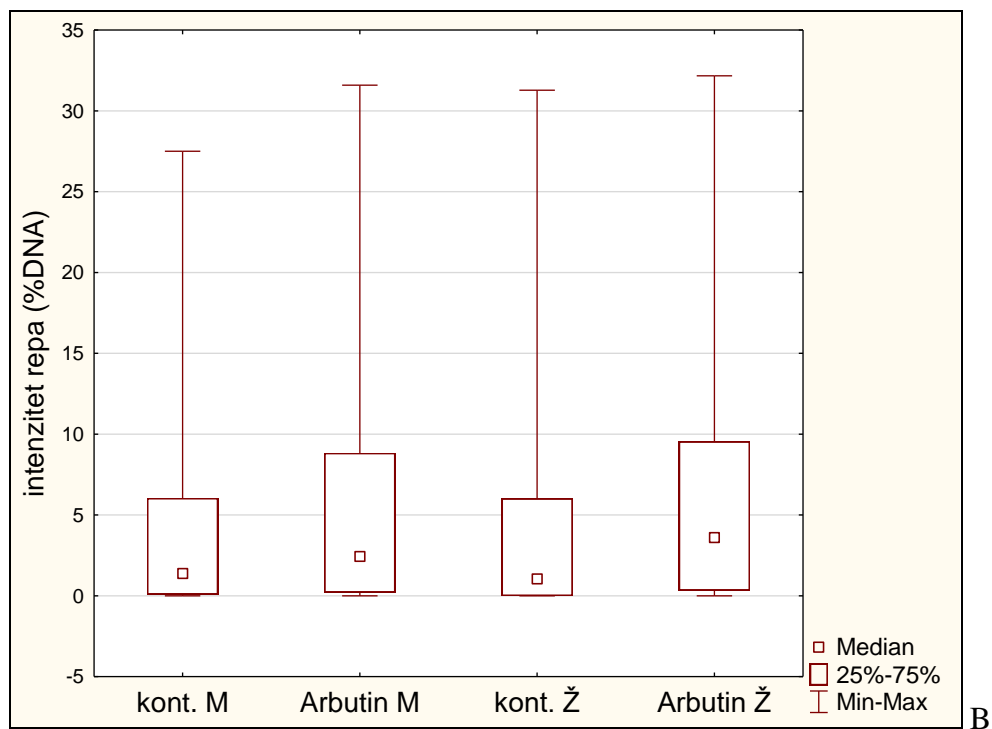
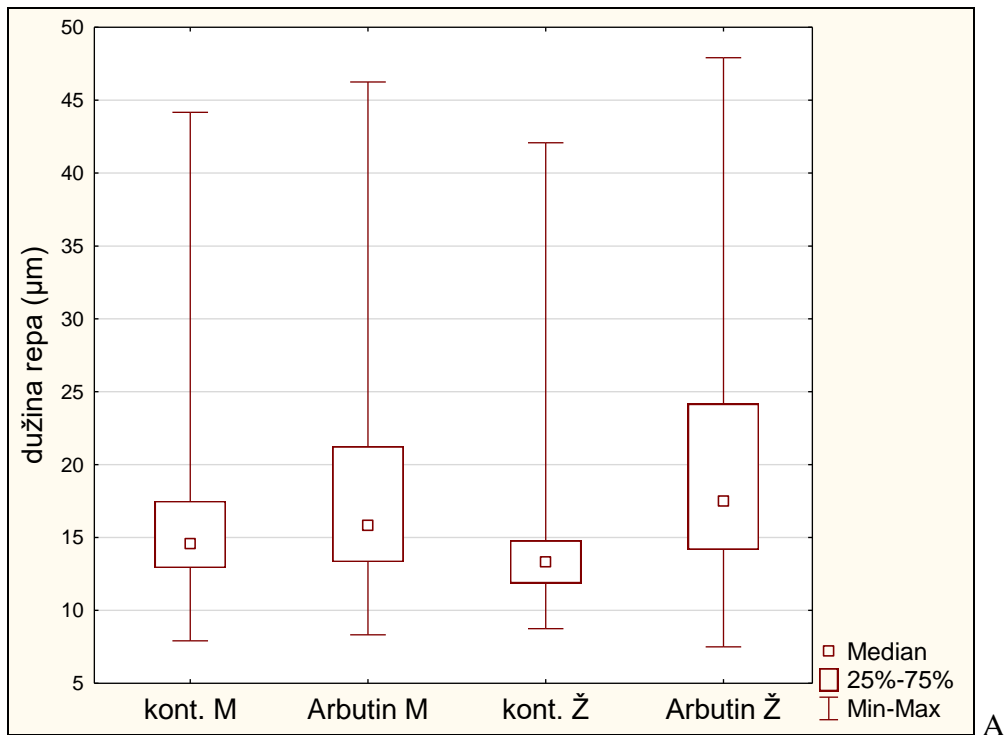
Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). SV±SG - srednja vrijednost±standardna pogreška; MED - medijan; MIN - minimum; MAX - maksimum

*Statistički značajno u odnosu na pripadajuću kontrolu (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$)

M - mužjaci; Ž - ženke

3.4.2. Stanice jetre

Kod stanica jetre ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) per oralno 28 dana vrijednosti parametara dužine repa ($20,04 \pm 0,57$) statistički je značajno povećana u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($17,70 \pm 0,47$). Vrijednosti parametara dužine repa u tretiranih mužjaka ($17,70 \pm 0,47$) povišena je u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($16,67 \pm 0,46$), ali bez statističkog značaja (Slika 27A). Vrijednosti parametra intenzitet repa u stanicama jetre mužjaka povećane su u tretiranoj skupini ($5,89 \pm 0,54$) u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($4,29 \pm 0,45$), ali bez statističke značajnosti. Isto tako, vrijednost intenziteta repa kod ženki štakora tretiranih arbutinom ($6,36 \pm 0,54$) je statistički značajno ($p < 0,05$) veća od vrijednosti pripadajuće kontrolne skupine ($5,89 \pm 0,54$), (Slika 27B). Sve statističke značajnosti ($p < 0,05$) parametra dužine repa i intenziteta repa (%DNA) između skupina prikazane su u Tablici 4.



Slika 27. Vrijednosti parametra dužine repa (A) i intenziteta repa (B) kometa izmjerene u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. Statističke značajnosti prikazane su u tablici 4. Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). kont. M - kontrola mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; Arbutin M - arbutin mužjaci; Arbutin Ž - arbutin ženke; Min - minimum; Max - maksimum.

Tablica 4. Statistički značajne ($p < 0,05$) vrijednosti parametara dužine repa i % DNA u repu kometa izmjerene u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana i u pripadajućih kontrolnih skupina (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

	JETRA	DUŽINA REPA			
		Kontrola M	Arbutin M	Kontrola Ž	Arbutin Ž
% DNA	Kontrola M		n.z.	0,034530	0,000006
	Arbutin M	n.z.		0,00056	0,009032
	Kontrola Ž	0,034530	0,000056		0,000000
	Arbutin Ž	0,000006	0,009032	0,000000	

n.z. - nije značajno
M - mužjaci; Ž - ženke

Nadalje, kod mužjaka vrijednost parametara repni moment povišena je u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu, ali bez statističkog značaja ($p < 0,05$). Statistički značajno povišena vrijednost parametra repni moment uočena je u ženki u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu (Tablica 5).

Tablica 5. Vrijednosti parametra repnog momenta kometa izmjerene u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

SKUPINE	REPNI MOMENT			
	SV±SG	MED	MIN	MAX
Kontrola M	0,37±0,04	0,1	0,00	2,89
Arbutin M	0,50±0,05	0,22	0,00	2,65
Kontrola Ž	0,50±0,05	0,22	0,00	2,65
Arbutin Ž	0,66*±0,06	0,3	0,00	3,97

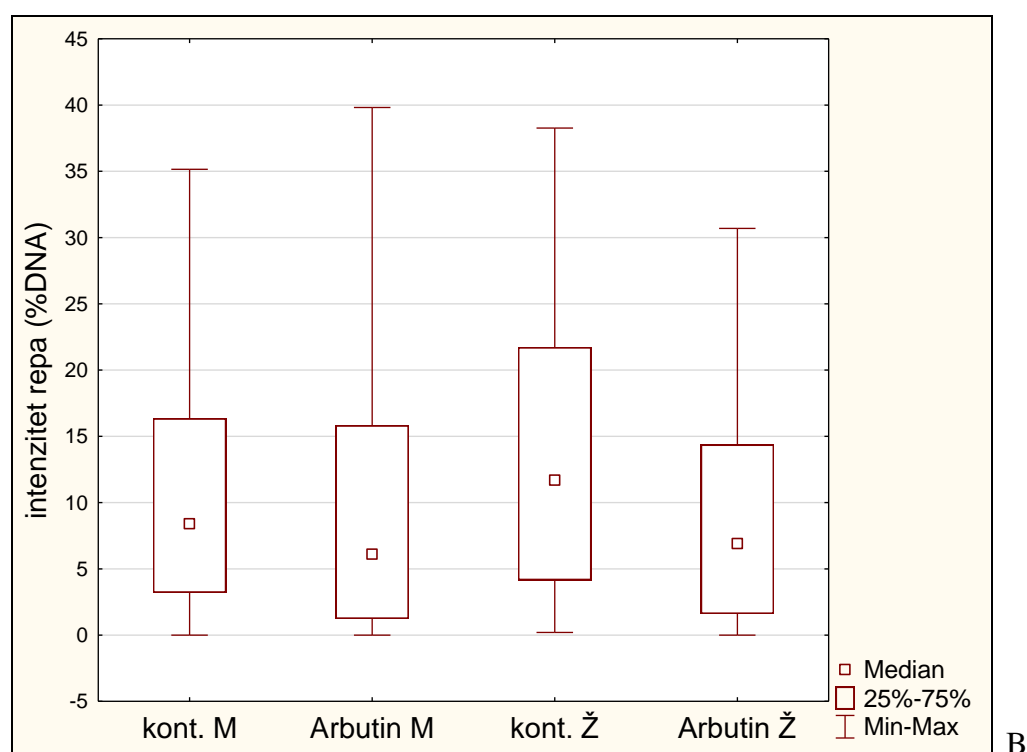
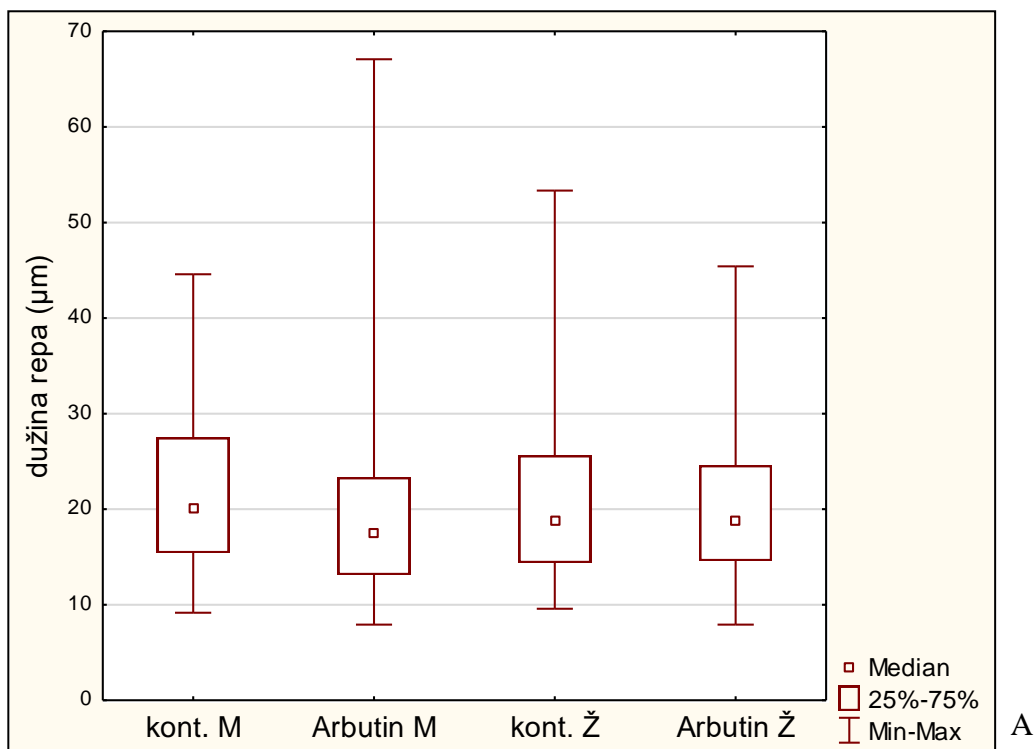
Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). SV±SG - srednja vrijednost±standardna pogreška; MED - medijan; MIN - minimum; MAX - maksimum

M - mužjaci, Ž - ženke

* Statistički značajno u odnosu na kontrolu

3.4.3. Stanice mozga

Kod stanica mozga mužjaka štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) per oralno 28 dana za parametar dužine repa uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$), gdje tretirana skupina ima manju vrijednost ($19,04 \pm 0,57$) od pripadajuće kontrolne skupine ($21,44 \pm 0,53$). Kod ženki je također dužina repa u tretiranoj skupini manja ($20,46 \pm 0,54$) nego u kontrolnoj ($20,75 \pm 0,58$), no ta razlika nije statistički značajna ($p < 0,05$) (Slika 28A). Kod parametra intenziteta repa uočeno je kako mužjaci i ženke tretirani arbutinom imaju statistički značajno niže vrijednosti (mužjaci: $9,71 \pm 0,70$; ženke: $8,94 \pm 0,58$) od svojih kontrolnih skupina (mužjaci: $10,32 \pm 0,61$; ženke: $13,32 \pm 0,70$) (Slika 28B). Sve statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$) parametara dužine repa i intenziteta repa (%DNA) prikazane su u Tablici 6.



Slika 28. Vrijednosti parametra dužine repa (A) i intenziteta repa (B) kometa izmjerene u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. Statističke značajnosti prikazane u tablici 6.

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). kont. M - kontrola mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; Arbutin M - arbutin mužjaci; Arbutin Ž - arbutin ženke; Min - minimum; Max - maksimum.

Tablica 6. Statistički značajne ($p < 0,05$) vrijednosti parametra dužine repa i %DNA u repu kometa izmjerene u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana i u pripadajućih kontrolnih skupina (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

	MOZAK	DUŽINA REPA			
		Kontrola M	Arbutin M	Kontrola Ž	Arbutin Ž
% DNA	Kontrola M		0,000195	n.z.	n.z.
	Arbutin M	0,008893		0,007253	0,005037
	Kontrola Ž	n.z.	0,000000		n.z.
	Arbutin Ž	n.z.	0,054661	0,020352	

n.z.- nije značajno
M - mužjaci, Ž - ženke

Statistička značajnost ($p < 0,05$) uočena je i kod repnog momenta gdje tretirane skupine oba spola imaju niže vrijednosti od pripadajućih kontrolnih skupina (Tablica 7).

Tablica 7. Vrijednosti parametra repnog momenta kometa izmjerene u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora soja Lewis tretiranih arbutinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

SKUPINE	REPNI MOMENT			
	SV±SG	MED	MIN	MAX
Kontrola M	0,97±0,06	0,74	0,00	3,52
Arbutin M	0,89*±0,08	0,60	0,00	9,92
Kontrola Ž	1,20±0,06	1,07	0,00	3,65
Arbutin Ž	0,82*±0,05	0,65	0,00	2,86

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). SV±SG-srednja vrijednost±standardna progresa; MED - medijan; MIN - minimum; MAX - maksimum

M - mužjaci, Ž - ženke

* Statistički značajno u odnosu na kontrolu

4. Rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi i procijeniti učinak arbutina primijenjenog u dozi od 200 mg/kg per oralno tijekom 28 dana na sustav antioksidacijskih enzima, stupanj intenziteta lipidne peroksidacije te primarna oštećenja na molekuli DNA. Budući da se arbutin metabolizira u jetri i izlučuje bubrezima te je utvrđen njegov učinak na stanice mikroglije u mozgu, ispitati smo njegovo djelovanje upravo na spomenutim organima.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je intenzitet lipidne peroksidacije, procijenjen pomoću određivanja koncentracije MDA, u bubregu štakora oba spola manji nakon tretmana. Dobiveni rezultati mogu se povezati s tvrdnjom da arbutin ima veliki utjecaj na stabilizaciju membrana što je dokazano u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Oliver i sur., 2001). Nadalje, arbutin se izlučuje upravo putem bubrega i mokraćnog mjehura u obliku hidrokinona konjugiranog sa sulfatnom ili glukuronskom kiselinom (Quintus i sur., 2005). Hidrokinon u ovome obliku nije toksičan za organizam, već služi kao antiseptik mukoznih membrana u bubrezima (European Medicines Agency, 2012). S druge strane, zbog velike prisutnosti PUFA u njihovim stanicama, bubrezi su osjetljivi na lipidnu oksidaciju uzrokovanu ROS-om, što posljedično vodi glomerulosklerozi te fibrozi i apoptozi tubularnih stanica (Small, 2012). Također, prema nekim autorima (English i sur., 1997; Hard i sur., 1997) bubrezi su vrlo osjetljivi na slobodni hidrokinon te je primijećeno da tretmanom u periodu od 103 tjedana dolazi do kronične nefropatije (DeCaprio, 1999). Takav oblik hidrokinona nastaje ako se višak unesenog arbutina u distalnom dijelu crijeva konvertira u svoj aglukon koji se zatim ne konjugira u jetri već ostaje u slobodnom obliku (Blaut i sur., 2006). Kao takav, hidrokinon je sklon autooksidaciji što dovodi do stvaranja slobodnih radikala. Njegovi metaboliti p-benzokinon i p-benzosemikinon imaju veliku ulogu nefrotoksičnosti hidrokinona (Corley i sur., 2000). S obzirom na ova saznanja, možemo pretpostaviti da bi tretman hidrokinonom imao za posljedicu povišenu razinu MDA, što nije ishod u našem istraživanju.

Nadalje, u jetri mužjaka uočen je porast vrijednosti koncentracije MDA nakon tretmana arbutinom, dok ženke pokazuju nižu vrijednost od pripadajuće kontrole. Što se tiče razlika s obzirom na spol, Julicher i sur. (1984) predlažu kako je tkivo jetre u mužjaka osjetljivije na formacije reaktivnih kisikovih vrsta te reaktivnih metabolita lijekova, što objašnjava naše rezultate. Može se reći da je jetra metaboličko središte organizma te su hepatička oštećenja metaboličkom aktivacijom reaktivnih vrsta vrlo česta. Porast koncentracije MDA možemo povezati s prevelikom koncentracijom arbutina, gdje je došlo do konverzije u hidrokinon. Wiliams i sur., (2007) govore o pozitivnom učinku hidrokinona kod mužjaka Fischer 344 štakora pri dozama 25-100 mg/kg gdje nije uočena hepatotoksičnost, već je naprotiv, hidrokinon pokazao antikancerogeni učinak. Prema European Medicines Agency (2012) doza preporučena u svrhu liječenja je 11 µg/kg, što je znatno manje od našeg tretmana u dozi od 200 mg/kg. Arbutin je pokazao hepatoprotektivnu ulogu prema lipidnim komponentama membrana, sprječavajući njihovu degradaciju (Oliver i sur., 2001).

Mozak štakora pokazuje rast koncentracije MDA u tretiranoj skupini oba spola, što nije slučaj kod prethodna dva organa. Lipidi staničnih membrana moždanog tkiva bogati su s PUFA, što uz povećanu količinu željeza (posebice u substanciji nigri) pogoduje nastanku lipidne peroksidacije (Aruoma, 1998), što je u skladu s povišenim vrijednostima koncentracije MDA koje smo opazili u stanicama mozga štakora oba spola. Nadalje, Khadir i sur. (2015) u svojem istraživanju na mužjacima Wistar štakora u uvjetima *in vivo* dokazuju kako arbutin u dozi od 50 mg/kg ima protektivnu ulogu na citotoksičnost induciranu ciklosporinom, ali duplo veća doza potiče lipidnu peroksidaciju te oksidacijski učinak, što je utvrđeno i našim rezultatima. Mahmoud i Elnour (2014), uočava povišenu razinu MDA kod raznih patoloških stanja, manjka antioksidanasa u tijelu te nakupljanja reaktivnih radikala. Također je primijećeno da primjena antioksidansa, kao što je vitamin C, naglo smanjuje razinu MDA (Mahmoud i Elnour, 2014). Možemo zaključiti da arbutin u primijenjenoj dozi ni u jednom organu nije pokazao statistički značajne promjene u koncentraciji MDA što ukazuje da korištena doza ne djeluje niti antioksidacijski niti prooksidacijski na staničnu membranu.

Učinak arbutina na nivo oksidacijskog stresa praćen je mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze i katalaze. Aktivnost superoksid dismutaze smanjena je u bubregu i jetri tretiranih štakora oba spola, dok je u stanicama mozga porasla. Što se tiče katalaze, u bubregu se razina aktivnosti enzima smanjila u oba spola, dok je u stanicama jetre povećana, također u oba spola. Nadalje, aktivnost katalaze u mozgu ženki štakora značajno je snižena. Oksidacijska oštećenja koja nastaju mogu biti rezultat prevelike proizvodnje i nakupljanja ROS-a u stanicama, ali i smanjene antioksidacijske aktivnosti enzima te smanjene koncentracije antioksidacijskih zaštitnih molekula kao što je GSH. Također fenolni antioksidansi se počinju ponašati kao prooksidansi u određenim uvjetima, koji omogućuju njihovu autooksidaciju, kao na primjer na visokom pH s visokom koncentracijom iona prijelaznog metala i prisutnom molekulom kisika (Hegerman i sur., 1998).

Kod mnogih bolesti zapažena je povišena koncentracija MDA te smanjena razina antioksidacijskih enzima. Hwang i sur. (2012) dokazali su kako se nakon tretmana arbutinom takvo stanje mijenja te razina SOD i katalaze raste, a koncentracija MDA opada (Choi i sur., 2009). S druge strane zapažena je povišena razina SOD i MDA kod GCD (od engl. *granular corneal dystrophy*), dok se katalazna aktivnost smanjuje. Takvo stanje objašnjava se na način da pri staničnom oštećenju dolazi do degradacije lizosoma procesom autofagije, što igra veliku ulogu u akumulaciji ROS-a te samoj patogenezi bolesti (Choi i sur., 2009). Rezultati ovog istraživanja mogu se dvojako protumačiti. Snižena razina enzima može također biti rezultat biotransformacije arbutina u hidrokinon koji dokazano smanjuje razine katalaze i superoksid dismutaze (Bahadar i sur., 2015). Naime hidrokinon može djelovati direktno na enzim inhibirajući ga ili potičući njegovu aktivaciju, ili može djelovati kao oksidans stimulirajući produkciju ROS-a, što su pokazali Raj i Nachiappan (2016). Snižene vrijednosti SOD u jetri i bubregu mogu se protumačiti kao organi prolaska već konvertiranog hidrokinona, dok s druge strane, na povišene razine enzima u mozgu djeluje arbutin svojim antioksidacijskim svojstvima. U prilog tome, prijašnja istraživanja govore o antiupalnom utjecaju i regulaciji NO sintetaze od strane arbutina na stanice mikroglije stimulirane LPS-om, te razne cerebrovaskularne bolesti (Lee i Kim, 2012). Zanimljivo je da se katalaza u stanicama mozga značajno smanjila, što nužno ne mora biti predznak oksidacijskog stresa zbog prisustva glutation peroksidaze koja ne dopušta nakupljanje H₂O₂ (Chen i sur., 1999).

Utjecaj arbutina na primarna oštećenja DNA određivan je komet testom. Bubrež pokazuje potpuno različite rezultate s obzirom na spol, gdje je kod ženki uočen viši stupanj primarnih oštećenja nego kod mužjaka, gdje su oštećenja manja s obzirom na kontrolnu skupinu. U stanicama jetre sva tri parametra pokazuju povišene vrijednosti u oba spola. Razliku u rezultatima između spolova, koja je kod nas uočena na stanicama bubrega, tumače Boatman i sur., (2000) tvrdnjom kako su ženke Fischer 344 štakora osjetljivije na nefrotoksičnost uzrokovanu hidrokinonom usporedno s mužjacima. Također, isti su autori uočili kako je nefrotoksičnost kod miševa manje izražena nego ona u štakora. Nadalje, ženke u jetri imaju veće mitohondrije s višim proteinskim sadržajem od mužjaka te samim time dolazi i do veće produkcije ROS-a koje dovode do oštećenja (Justo i sur., 2005).

Arbutin je potencijalni antioksidans, za kojeg nije zabilježeno da inducira DNA oštećenja *per se*. No, uzmemo li u obzir dosadašnja istraživanja koja upućuju na toksično djelovanje hidrokinona (Roza i sur., 2003, Khanal i sur., 2011), postoji mogućnost da su izmjerene povišene vrijednosti parametara komet testa upravo rezultat konverzije arbutina u hidrokinon i njegovom djelovanju. Hidrokinon nastaje djelovanjem enzima β -glukozidaze u jejunumu i ileumu tankog crijeva, portalnom venom odlazi u jetru gdje prolazi kroz enzimsku konjugaciju sa sulfatnom ili glukuronskom kiselinom te kao takav nije toksičan za organizam. Nadalje, nakon što se konjugira u jetri, hidrokinon se pomoću bubrega izlučuje urinom iz organizma u formi hidrokinon sulfata ili glukuronida (Quintus i sur., 2005). Arbutin je potencijalno opasan ako se probavi do debelog crijeva, te uz aktivnost crijevne mikroflore konvertira u slobodni hidrokinon i kao takav postaje toksičan (Blaut i sur., 2006). Dakle, možemo pretpostaviti da organi koji su „prolazne“ stanice na putu metaboliziranja hidrokinona pokazuju porast DNA oštećenja. Određene studije (Lindsey i sur., 2005; Luo i sur., 2008; McDonald i sur., 2001) govore o nekoliko mehanizama genotoksičnosti hidrokinona. Direktni mehanizmi uključuju formiranje DNA adukata i lomova, inhibiciju topoizomeraze II, unakrsno povezivanje DNA i proteina te indukciju oksidacijskog stresa. Općenito, najvažniji parametar u interpretaciji rezultata komet testa je intenzitet repa (Collins, 2004). Tako je jedino u stanicama jetre ženki štakora vrijednost intenziteta značajno povišena te u tom slučaju možemo govoriti o hepatotoksičnosti arbutina, odnosno hidrokinona, što ponovno povezujemo s velikom metaboličkom aktivnosti jetre gdje dolazi do nastanka hidrokinona. Također, intenzitet repa u svim organima pokazuje veće vrijednosti od dužine repa, što znači da su detektirani mali DNA fragmenti.

U uvjetima *in vitro* arbutin u dozi od 2.37 mg/ml ne izaziva posljedice na V79 stanicama hrčaka no nakon preinkubacije pomoću beta glukozidaze javljaju se mutacije (Deisinger i sur., 1996). Nadalje, pokazalo se da hidrokinon ne djeluje isto na različite sojeve štakora. Pri tretmanu hidrokinonom od 200 mg/kg kod Sprague-Dawley štakora nema naznaka nefrotoksičnosti (Topping i sur., 2007), dok je pri istoj dozi uočena toksičnost kod F-344 soja štakora, ali samo kod mužjaka gdje je zabilježena renalna tubularna degradacija te povećana urinarna ekskrecija enzima. F-344 ženke ne pokazuju nikakve promjene nakon tretmana (English i Deisinger, 2005).

Isto tako, metoda kojom se ispituje djelovanje arbutina, ima bitnu ulogu u ishodu rezultata. Tako naprimjer Takebayashi i sur. (2010) u svom istraživanju govori kako arbutin pokazuje slabo antioksidacijsko djelovanje na DPPH radikale, dok je njegova aktivnost jednaka antioksidacijskoj aktivnosti hidrokinona kada su u pitanju ABTS radikali (Tai i sur., 2016). Usporedno s hidrokinonom, ORAC metodom dokazalo se kako arbutin ima nižu momentalnu aktivnost od hidrokinona ali s dužim vremenskim periodom djelovanja (Takebayashi i sur., 2010). U eksperimentu gdje su volonteri oralno primali arbutin u dozi od 420 mg nisu zapažene nikakve mutacije ni genotoksične aktivnosti bez obzira na to što su u urinu nađeni slobodni hidrokinon te njegovi konjugati s glukuronskom i sulfatnom kiselinom (Tai i sur., 2016).

Kod mozga u oba spola arbutin nije izazvao oštećenja DNA gdje je pokazan njegov netoksični učinak. Potvrđena su prijašnja istraživanja koja govore o antiupalnom utjecaju i regulaciji NO sintetaze od strane arbutina na stanice mikroglije stimulirane LPS-om, te razne cerebrovaskularne bolesti (Lee i Kim, 2012). Nadalje, Topping i sur. (2007) govore kako profesionalna izloženost hidrokinonu ne utječe negativno na živčani sustav, no konzumiranjem velikih doza izaziva akutna oštećenja CNS, kloničke pokrete mišićnog tkiva, tremor gdje jačina oštećenja ovisi o dozi. No, stalne akutne stimulacije CNS-a ne rezultiraju kroničnom neurotoksičnošću (Topping i sur., 2007). Tsuzi (1956) dokazuje kako tretman hidrokinonom u dozi većoj od 200 mg/kg uzrokuje konvulzije na štakorima, a doze veće od 375 mg/kg mogu biti letalne. Naša primijenjena doza je niža te u ovom istraživanju nisu primijećeni neurološki ispadi. No, u preliminarnim istraživanjima testirali smo dozu od 400 mg/kg gdje je primijećen tremor, što je sukladno prijašnjim tvrdnjama.

Zbog mogućnosti kemijske sinteze arbutina sadrže ga mnogi komercijalno dostupni pripravci namijenjeni za liječenje infekcija mokraćnog sustava. Također, on je sekundarni metabolit mnogih biljaka pa se tako koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje raznih oboljenja i ozljeda. Terapijsko djelovanje pripravaka zasniva se na antibakterijskim svojstvima hidrokinona, farmakološki aktivnog metabolita arbutina. Različiti bakterijski sojevi ljudske crijevne flore imaju sposobnost deglikozilacije arbutina u različitoj mjeri u aglikon hidrokinon (Kang i sur., 2012, Blaut i sur., 2006). Jedan dio znanstvenih radova svjedoči o antimikrobnoj aktivnosti hidrokinona u vidu inhibicije rasta različitih gljivica i bakterija (Schindler i sur., 2002; Jurica, 2015). S druge strane, postoje i radovi koji govore o toksičnosti hidrokinona (Roza i sur., 2003, Khanal i sur., 2011). Arbutin se navodi kao dobar antioksidans, te tvar koja se koristi za sprječavanje mnogih bolesti, no također postoje izvori koji govore o njegovoj toksičnosti kada su u pitanju prevelike doze (Kang i sur., 2011, Khadir i sur., 2015).

Proizvode s arbutinom preporučeno je koristiti kroz kraće vrijeme, dok se ne dobije cjelovita slika o sigurnosti njegovog djelovanja na organizam kroz dulji vremenski period primjene. Također, treba paziti i na količinu unosa. Daljnja istraživanja trebaju biti fokusirana na procjenu njegove toksičnosti te mehanizam njegovog djelovanja na što više tipova stanica. Kada se potpuno razjasni njegov utjecaj na pojedine organe i organizam u cijelosti te ako se dokaže da je arbutin siguran za konzumaciju, možda se uspije smanjiti primjena antibiotika za liječenje uroinfekcija.

5. Zaključak

- Mjerenjem koncentracije MDA utvrđeno je da arbutin (200 mg/kg) primijenjen oralno tijekom 28 dana ne utječe na intenzitet lipidne peroksidacije u štakora.
- Aktivnost superoksid dismutaze u bubregu ženki štakora statistički je značajno smanjena u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu.
- Aktivnost katalaze u mozgu ženki štakora statistički je značajno smanjena u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu.
- Oštećenja DNA izmjerena komet testom nakon 28-dnevnog tretmana arbutinom u stanicama bubrega pokazuju različite rezultate s obzirom na spol. Mušjaci pokazuju snižene vrijednosti za sva tri parametra, dok je kod ženki uočen porast oštećenja, također za sve parametre.
- Oštećenja DNA izmjerena komet testom nakon 28-dnevnog tretmana arbutinom u stanicama jetre kod ženki štakora značajno su povišena kod sva tri parametra. Također, uočena je statistički značajno povišena vrijednost intenziteta repa.
- Oštećenja DNA izmjerena komet testom nakon 28-dnevnog tretmana arbutinom u stanicama mozga pokazuje snižene vrijednosti za sva tri parametra u oba spola, gdje je intenzitet repa pokazao statistički značajnu promjenu.
- Primijenjena doza od 200 mg/kg generalno nije uzrokovala značajan toksični učinak na stanice bubrega, jetre i mozga štakora.

6. Literatura

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; 90: 7915-7922.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004; 55: 373-399.

Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *American Oil Chemists' Society*. 1998; 75: 199-212.

Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells and Development*. 2015; 24: 1150-1163.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

Bahadar H, Maqbool F, Mostafalou S, Baeri M, Gholami M, Ghafour-Boroujerdi E, Abdollahi M. The molecular mechanisms of liver and islets of Langerhans toxicity by benzene and its metabolite hydroquinone in vivo and *in vitro*. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2015; 25: 628-636.

Báidez AG, Gómez P, Del Río JA, Ortuño A. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 3373-3377.

Bang SH, Han SJ, Kim DH. Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2008; 7: 189-193.

Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993; 300: 440-450.

Blaut M, Braune A, Wunderlich S, Sauer P, Schneider H, Glatt H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 2006; 44: 1940-1947.

Boatman RJ, English JC, Perry LG, Fiorica LA. Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: identification and quantitation of sulfhydryl-bound forms. *Chemical Research in Toxicology*. 2000; 13: 853-860.

Bulat P, Potkonjak B, Đujić I. Lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in erythrocytes of workers occupationally exposed to aluminium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2008; 59: 81-87.

- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. 1989; 58: 79-110.
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 49: 9-21.
- Cadet J, Davies KJ. Oxidative DNA damage & repair: an introduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 107: 2-12.
- Chen L, Hong JY, So E, Hussin AH, Cheng WF, Yang CS. Decrease of hepatic catalase level by treatment with diallyl sulfide and garlic homogenates in rats and mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 1999; 13: 127-134.
- Choi SI, Kim KS, Kim BY, Ahn SY, Cho HJ, Lee HK, Kim EK. Decreased catalase expression and increased susceptibility to oxidative stress in primary cultured corneal fibroblasts from patients with granular corneal dystrophy type II. *The American Journal of Pathology*. 2009; 175: 248-261.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26: 249-261.
- Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1997; 375: 183-193.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 2003; 17: 1195-1214.
- Cooper GM, Hausman RE. *The cell: a molecular approach*. Palgrave-Macmillans Global Academic Publishing. 2010; 713-715.
- Corley RA, English JC, Hill TS, Fiorica LA, Morgott DA. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for hydroquinone. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000; 165: 163-174.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999; 39: 67-101.
- DeCaprio AP. The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. 1999; 29: 283-330.
- Deisinger PJ. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 1996; 47: 31-46.
- D'Errico M, Parlanti E, Pascucci B, Fortini P, Baccarini S, Simonelli V, Dogliotti E. Single nucleotide polymorphisms in DNA glycosylases: From function to disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 107: 278-291.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002; 82: 47-95.

Dupont C, Patel C, Ravanat JL, Dumont E. Addressing the competitive formation of tandem DNA lesions by a nucleobase peroxy radical: a DFT-D screening. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2013; 11: 3038-3045.

English JC, Perry LG, Vlaovic M, Moyer C, O'Donoghue JL. Measurement of cell proliferation in the kidneys of Fischer 344 and Sprague-Dawley rats after gavage administration of hydroquinone. *Toxicological Sciences*. 1994; 23: 397-406.

English JC, Deisinger PJ. Metabolism and desposition of hydroquinone in Fischer rats after oral or dermal administration. *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43: 483-493.

European Medicines Agency. Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. Comitee on Herbal Medicinal Products. 2012; 44: 1-34.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1995; 339: 37-59.

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011; 15: 1583-1606.

Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, Nishino T, Shin T, Murao S. Effects of α - and β -arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1995; 59: 143-144.

Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 11: 861-905.

Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*. 2017; 398: 1095-1108.

Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20: 2175-2183.

Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*. 1980; 106: 207-212.

Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Reichel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46: 1887-1892.

Hard GC, Whysner J, English JC, Zang E, Williams GM. Relationship of hydroquinone-associated rat renal tumors with spontaneous chronic progressive nephropathy. *Toxicologic Pathology*. 1997; 25: 132-143.

Held P. An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. BioTek Instruments Inc., Application Guide. 2012; 1-2.

Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leukemia research*. 2000; 24: 461-468.

Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho YS, Ha H. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes*. 2012; 61: 728-738.

Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto KI, Tamura M, Nagano Y, Minamiyama Y. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2015; 56: 1-7.

Julicher RH, Sterrenberg L, Haenen GR, Bast A, Noordhoek J. Sex differences in the cellular defence system against free radicals from oxygen or drug metabolites in rat. *Archives of Toxicology*. 1984; 56: 83-86.

Jurica K. Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci, doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu. 2016; 132-140.

Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermudez J, Gianotti M. Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2005; 289: 372-378.

Kang MJ, Ha HW, Kim HG, Lee DH, Kong MJ, Ahn YT, Jeong TC. Role of metabolism by intestinal bacteria in arbutin-induced toxicity *in vitro*. *Archives of Pharmacal Research*. 2011; 34: 687-693.

Khadir F, Pouramir M, Joorsaraee SG, Feizi F, Sorkhi H, Yousefi F. The effect of arbutin on lipid peroxidation and antioxidant capacity in the serum of cyclosporine-treated rats. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2015; 6: 196.

Khanal T, Kim HG, Hwang YP, Kong MJ, Kang MJ, Yeo HK, Kim DH, Jeong TC, Jeong HG. Role of metabolism by the human intestinal microflora in arbutin-induced cytotoxicity in HepG2 cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 413(2), 318-324.

Kittipongpatana N, Chaiwan A, Pusod U, Kittipongpatana OS. High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separation and Quantitative Analysis of Arbutin in Plant Tissue Cultures. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 2007; 6: 65-74.

Knight JA. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2000; 30: 145-158.

Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002; 30: 620-650.

- Kozić A, Popović M, Ivetić V, Pilića V. Activates of glutathione peroxidase, glutathione and glutathione reductase in healthy and diabetes (insulin dependent) patients. *Praxis Medica*. 2002; 30: 13-20.
- Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81: 284–291.
- Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflammation Research*. 2012; 61: 817-825.
- Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*. 1995; 81: 1013-1020.
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362: 709-715.
- Lindsey RH, Bender RP, Osheroff N. Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II α : 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. *Chemical Research in Toxicology*. 2005; 18: 761-770.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010; 4: 118.
- Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J. Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*. 2010; 121: 185-190.
- Luo L, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L. Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2008; 173: 1-8.
- Luo Y, Roth GS. The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2000; 2: 449-460.
- Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 2011; 101: 13-30.
- Mahmoud RH, Elnour WA. Comparative evaluation of the efficacy of ginger and orlistat on obesity management, pancreatic lipase and liver peroxisomal catalase enzyme in male albino rats. *European Review Medical Pharmacological Sciences*. 2013; 17(1): 75-83.
- Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007; 9(12): 2277-2294.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79: 727-747.

- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal*. 2008; 275: 3959-3970.
- Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999; 424: 83-95.
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 361-370.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. 2000; 108: 652-659.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 1969; 244: 6049-6055.
- McDonald T, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT. Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia*. 2001; 15: 10-20.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983; 52: 711-760.
- Migas P, Krauze-Baranowska M. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*. 2015; 13: 35-40.
- Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 47: 469-484.
- Nycz JE, Malecki G, Morag M, Nowak G, Ponikiewski L, Kusz J, Switlicka A. Arbutin: Isolation, X-ray structure and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 2010; 980: 13-17.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation research*. 1990; 122: 86-94.
- Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocol*. 2006; 1: 23-29.
- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2011; 50: 73-85.
- Oliver AE, Hinch DK, Tsvetkova NM, Vigh L, Crowe JH. The effect of arbutin on membrane integrity during drying is mediated by stabilization of the lamellar phase in the presence of nonbilayer-forming lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2001; 111: 37-57.
- Ostling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced dna damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 123: 291-298.

Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. *Biomarkers*. 2005; 10: 24-29.

Pavlović RD, Lakušić B, Došlov-Kokoruš Z, Kovačević N. Arbutin content and antioxidant activity of some *Ericaceae* species. *Pharmazie*. 2009; 64: 656–659.

Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner TM. DNA-damage detection in man after radiation exposure--the comet assay--its possible application for human biomonitoring. *Stem cells*. 1995; 13: 215-222.

Poli G, Schaur RJ, Siems WA, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal research reviews*. 2008; 28: 569-631.

Poulson HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Journal of Cancer Prevention*. 1998; 7: 9-16.

Quint P, Reutzel R, Mikulski R, McKenna R, Silverman DN. Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 40: 453-458.

Quintus J, Kovar KA, Link P, Hamacher H. Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. *Planta Medica* 2005; 71: 147-152.

Raj A, Nachiappan V. Exposure to benzene metabolites causes oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2016; 109: 841-854.

Reid TJ, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossmann MG. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981; 78: 4767-4771.

Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005; 7: 619-626.

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999; 722: 225-254.

Roza L, De Vogel N, Van Delft JHM. Lack of clastogenic effects in cultured human lymphocytes treated with hydroquinone. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; 41: 1299-1305.

Scalbert, A., Johnson, IT., & Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81: 215-217.

Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, von Nieciecki A, Wittig J, Krämer N, Glöckl I, Veit M. Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uva-ursi* extract as film-coated tablets. *Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 42: 920-927.

Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1993; 1178: 153-175.

Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029>

Sentman ML, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper-and zinc-containing superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 6904-6909.

Seo H, Jung JH, Lee JE, Jeon EJ, Kim W, Park CS. Biotechnological production of arbutins (α - and β -arbutins), skin-lightening agents, and their derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 95: 1417-1425.

Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol: a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of Nutrition*. 2002; 132: 3577-3584.

Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews*. 2014; 114: 3854-3918.

Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991; 349: 431-434.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175: 184-191.

Skoula M, Harborne JB. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. *Oregano: the genera Origanum and Lippia*. 2002; 67-108.

Skrzypczak-Pietraszek E, Kwiecień I, Gołdyn A, Pietraszek J. HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture. *Phytochemistry Letters*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.01.009>

Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*. 2012; 17: 311-321.

Smith RW, Monroe C, Bolnick DA. Detection of Cytosine methylation in ancient DNA from five native american populations using bisulfite sequencing. *PloS one*. 2015; 10: 125-344.

Souček P, Ivan G, Pavel S. Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation. *Chemico-Biological Interactions*. 2000; 126: 45-61.

Sreelatha G, Muraleedharan A, Chand P, Rajkumar RP, Sathidevi PS. An improved automatic detection of true comets for DNA damage analysis. *Procedia Computer Science*. 2015; 46: 135-142.

Stingele J, Bellelli R, Boulton SJ. Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017; 18: 563-573.

Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. Inhibitory effects of α -arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 27: 510-514.

Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation-causes and consequences. *Medicina*. 2007; 43: 84-93.

Tai A, Ohno A, Ito H. Isolation and Characterization of the 2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) Radical Cation-Scavenging Reaction Products of Arbutin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016; 64: 7285-7290.

Takebayashi J, Ishii R, Chen J, Matsumoto T, Ishimi Y, Tai A. Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radical Research*. 2010; 44: 473-478.

Tan RS, Bajo LM. Modulation of *Tinospora rumphii* and Zinc Salt on DNA Damage in Quinoline-Induced Genotoxicity and Hepatotoxicity in Male Albino Mice. *Advances in Toxicology*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/201762>

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000; 35: 206-221.

Topping DC, Bernard LG, O'Donoghue JL, English JC. Hydroquinone: acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 70-78.

Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12): 1231-1246.

Tsuzi K. A study on convulsion caused by phenol compounds. *Medical Journal*. 1956; 9: 152-164.

van Loon B, Markkanen E, Hübscher U. Oxygen as a friend and enemy: how to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair*. 2010; 9: 604-616.

Wamelink MMC, Struys EA, Jakobs C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2008; 31: 703-717.

Weitner T, Inić S, Jablan J, Gabričević M, Domijan AM. Spectrophotometric Determination of Malondialdehyde in Urine Suitable for Epidemiological Studies. *Croatica Chemica Acta*. 2016; 89: 133-139.

Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*. 2010; 5: 51.

Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM, Duan JD. Inhibition by dietary hydroquinone of acetylaminofluorene induction of initiation of rat liver carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 1620-1625.

Xu WH, Liang Q, Zhang YJ, Zhao P. Naturally occurring arbutin derivatives and their bioactivities. *Chemistry & Biodiversity*. 2015; 12: 54-81.

Yang K, Fang JL, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1998; 422: 285-295.

Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*. 2013; 32: 249-270.

Zhang Y, Zhao J, Jiang S. The Effect of Arbutin on Mice Brain Cells after Ischemia-reperfusion Injury. *Medicinal Plant*. 2014; 5: 21.

Zhu W, Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2008; 13: 20-24.

Web stranice:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/arbutin#section=Environmental-Fate-Exposure-Summary>

<http://pdb101.rcsb.org/motm/94>

https://bib.irb.hr/datoteka/432061.PRAKTIKUM_2009.pdf

<https://www.complexi-light.com/alpha-arbutin/>

<http://www.citethisforme.com/topic-ideas/biology/Enzymes%20-%20Catalase-19841430>

<http://www.curezone.org/ig/i.asp?i=60579>

<http://www.hilltoplabs.com/public/f344.html>

https://www.researchgate.net/figure/269993727_fig1_Schematic-representation-of-comet-assay-protocol

<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/2/185>

<https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/the-effect-of-plant-secondary-metabolites-on-lipid-peroxidation-and-eicosanoid-pathway>

http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/fileadmin/_migrated/RTE/RTEmagicC_CA_02.jpg.jpg

ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Ime i prezime: Iva Đelatić
Datum rođenja: 18.8.1992.
Adresa: Splitska 38, 47000 Karlovac
e-mail: iva.delatic@gmail.com
Kontakt broj: 091/7913948

Obrazovanje

- 2015.-2017.** Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Smjer: Diplomski studij eksperimentalne biologije
Modul: Fiziologija i imunobiologija
- 2014.-2015.** Sveučilište u Osijeku
Filozofski fakultet
Pedagoškopsihološka-didaktičkometodička izobrazba
- 2011.-2015.** Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije
- 2007.-2011.** Opća gimnazija Karlovac

Iskustvo u struci

Laboratorijske vježbe:
Klinički bolnički centar Rebro (odjel za molekularnu dijagnostiku i transplantaciju)
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice (odjel za onkologiju)
Institut Ruđer Bošković
Laboratorijska praksa:
Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Studentski poslovi

New yorker (Prilaz V. Holjevca 12, 47000 Karlovac, Hrvatska)
Udruga Milosrđe- Centar za beskućnike (Hrvatske bratske zajednice 2, 47000 Karlovac, Hrvatska)
Zoo city d.o.o. (Prilaz V. Holjevca 12, 47 000 Karlovac, Hrvatska)

Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski Strani jezici: engleski i njemački

Vrlo sam komunikativna, pozitivna, snalažljiva te spremna na rješavanje zadanih zadataka. Ambiciozna sam te voljna učiti i napredovati na intelektualnoj i profesionalnoj razini. Ne odustajem lako, te ću davati 100% sebe u problematiku posla. Volim rad i komunikaciju s ljudima.

Digitalna kompetencija

Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi - Internet(e-mail, google+, društvene mreže)