Utjecaj hidrokinona na aktivnost antioksidacijskih enzima i oštećenje DNA u bubregu, jetri i mozgu štakora

Popović, Vanja

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:344866

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Vanja Popović

UTJECAJ HIDROKINONA NA AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA I OŠTEĆENJA DNA U BUBREGU, JETRI I MOZGU ŠTAKORA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je 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.

Zahvale

Ovom prilikom se najiskrenije zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Benković na ukazanom povjerenju, stručnom vođenju, mnogobrojnim savjetima i razumijevanju 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 za izradu ovog rada.

Posebno hvala asistentu Vedranu Balti na svim konstruktivnim savjetima, odgovorima i nesebičnoj pomoći oko eksperimentalnog dijela rada. Također, bez pomoći tehničara Marije Potočić i Hrvoja Jedvaj moj rad u laboratoriju bio bi mnogo manje ugodan- hvala na svakoj pomoći i veseloj atmosferi.

Također, željela bi se zahvaliti svim mojim prijateljima i rodbini iz moje Slavonije ali i Zagreba, bez čije bi podrške, razumijevanja i savjeta ovo putovanje bilo neizvedivo.

Veliko hvala i mom dragom bratu s kojim dijelim ovu radoznalosti i ljubav prema nepoznatom. U čijem društvu sam mogla pobjeći od svih briga, i na kojeg sam se uvijek mogla osloniti u najtežim trenucima.

Hvala i mom tati koji mi je usadio ljubav prema životu i svemu što me okružuje. Znam da bi bio ponosan da si ovdje...

Posljednje, ali u srcu prvo, veliko hvala mojoj mami kojoj i posvećujem ovaj rad i bez koje ne bi bila ono što sam sada. Hvala ti na svoj neizmjernoj ljubavi, žrtvi koju si podnijela i vjeri u mene tijekom svih ovih godina studija ali i ranije. Neka ovo bude dokaz i tvog uspjeha.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

UTJECAJ HIDROKINONA NA AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA I OŠTEĆENJA DNA U BUBREGU, JETRI I MOZGU ŠTAKORA

Vanja Popović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Hidrokinon je spoj koji nastaje bioaktivacijom arbutina, točnije razgradnjom arbutina pod djelovanjem enzima β-glukozidaze i alkalnih uvjeta u ljudskom organizmu. Hidrokinon je pokazao kancerogene osobine u istraživanjima kronične toksičnosti kod glodavaca gdje je dokazano da potiče nastanak benignih tumora jetre i bubrega kao i mononuklearne leukemije. Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak hidrokinona na nivo oksidativnog stresa spektrofotometrijskim mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze, kao i određivanjem stupnja lipidne peroksidacije mjerenjem koncentracije malondialdehida, te mogući genotoksični učinak primjenom standardne izvedbe komet testa u alkalnim uvjetima. Istraživanje je izvršeno na stanicama bubrega, jetre i mozga štakora soja Lewis oba spola tretiranih hidrokinonom u koncentraciji od 200 mg/kg tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati upućuju da hidrokinon blago povećava stupanj lipidne peroksidacije, ali ne utječe na aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze i superoksid dismutaze. Hidrokinon pokazuje statistički značajno povećanje primarnih oštećenja DNA na stanicama bubrega mužjaka štakora za parametre intenziteta repa i repnog momenta. Na stanicama jetre ženki štakora zabilježeno je statistički značajno povećanje oštećenja DNA za sva tri parametra komet testa. No budući da su izmjerene razine oštećenja ispod 10%, hidrokinon pokazuje nizak genotokičan potencijal. Temeljem rezultata može se zaključiti da dozvoljena dnevna doza hidrokinona nije toksična za stanice bubrega, jetre i mozga.

(65 stranica, 30 slika, 4 tablice, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oksidativni stres, hidrokinon, lipidna peroksidacija, antioksidacijski enzimi, komet test, genotoksičnost

Voditelj: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

Ocjenitelji: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

dr. sc. Renata Matonički Kepčija, izvanredni profesor

dr. sc. Antun Alegro, izvanredni profesor

Rad prihvaćen: 02.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Graduation thesis

EFFECT OF HYDROQUINONE ON ANTIOXIDATIVE ENZYMES ACTIVITY AND DNA DAMAGE IN RAT KIDNEY, LIVER AND BRAIN

Vanja Popović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Hydroquinone is pharmacologically active metabolite of arbutin, is released from arbutin by the action of enzyme β-glucosidase and alkali conditions in human organism. Hydroquinone has shown carcinogenic properties in chronic toxicity studies in rodents where it has been shown that hydroquinone stimulate benign liver and kidney tumors as well as mononuclear leukemia. The purpose of this study is to determine the effect of hydroquinone on the oxidative stress level by spectrophotometric measurements of superoxide dismutase and catalase activity, as well as the determination of lipid peroxidation by measuring the concentration of malondialdehyde and the possible genotoxic effect using a standard comet assay in alkaline conditions. This research was carried out on kidney, liver and brain of Lewis breed rats of both gender treated with hydroquinone in concentration of 200 mg/kg during 28 days. The results indicate that hydroquinone slightly increases a level of lipid peroxidation but does not affect the activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. Hydroquinone shows a statistically relevant increase of primary DNA damage in male rats kidney cells for parameters the tail intensity and tail moment. There was a statistically relevant increase in DNA damage for all three parameters of the comet assay on female rats liver cells. But since they measured levels of damage do not exceed 10% DNA in comet tail, hydroquinone shows low genotoxic potential. Based on the indicated results it can be concluded that the permitted daily dose of hydroquinone is not toxic to the cells of the kidneys, liver and brain.

(65 pages, 30 figures, 4 tables, 96 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: oxidative stress, hydroquinone, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, comet assay, genotoxicity

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

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

dr. sc. Renata Matoničkі Kepčija, PhD Associate Professor

dr. sc. Antun Alegro, PhD Associate Professor

Thesis accepted: 02.11.2017.

POPIS KRATICA

ALS - alkalno labilna mjesta (od engl. *alkali-labile sites*)

ATP - adenozin-trifosfat (od eng. *adenosine triphosphate*)

AP - apurinsko ili apirimidinsko

CAT- katalaza (od eng. *catalase)*

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

DSB - dvolančani lomovi (od engl. *double-strand break*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (od *ethylenediaminetetraacetic acid*)

G-6-PDH - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (od eng. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)

GSH - reducirani glutation (od eng. *reduced glutathione*)

GSHx - glutation peroksidaza (od eng. *glutathione peroxidase*)

GSSG - oksidirani glutation (od eng. *glutathione disulfide*)

HIF 1 - hipoksijom inducirani faktor 1 (od eng. *hypoxia-inducible factor 1*)

HNE - hidroksinonenal (od eng. *hydroxynonenal*)

LDL - lipoprotein male gustoće (od eng. *low density lipoprotein*)

MDA- malondialdehid (od eng. *malondialdehyde*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (od eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF-κB - transkripcijski faktor kappa B (od eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NO - dušikov oksid (od eng. *nitric oxide*)

PUFA- polinezasićene masne kiseline (od eng. *polyunsaturated fatty acid)*

Rac1 – (od eng. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)*

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

RNA - ribonukleinska kiselina (od eng. *ribonucleic acid*)

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

SOD- superoksid dismutaza (od eng. *superoxide dismutase)*

SSB - jednolančani lomovi (od engl. *single-strand break*)

TM - repni moment (od engl. *tail moment*)

TI - postotak DNA u repu (od engl. *tail intensity*)

TL - dužina repa kometa (od engl. *tail lenght*)

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

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES 1

1.2. FIZIOLOŠKA ULOGA REAKTIVNIH VRSTA 6

1.2.1. Reaktivne vrste kao medijatori fiziološkog odgovora 6

1.2.2. Uloga reaktivnih vrsta u imunološkom sustavu 7

1.3. PATOFIZIOLOŠKA ULOGA REAKTIVNIH VRSTA 8

1.3.1. Lipidna peroksidacija 9

1.3.2. Oksidativno oštećenje proteina 11

1.3.3. Oksidativno oštećenje DNA 12

1.4. ANTIOKSIDANSI 14

1.4.1. Enzimski antioksidacijski sustav 14

1.4.1.1. Superoksid dismutaza - SOD 16

1.4.1.2. Katalaza CAT 17

1.4.1.3. Sustav glutationa 18

1.5. HIDROKINON (1,4-benzendiol) 19

1.5.1. Toksikokinetika hidrokinona 22

1.5.2. Genotoksično i antimikrobno djelovanje hidrokinona 24

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 25

3. MATERIJALI I METODE 25

3.1 POKUSNE ŽIVOTINJE 25

3.1.1. Tretman životinja 25

3.2 HIDROKINON 26

3.3. UZIMANJE UZORAKA ORGANA 26

3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA METODOM PO LOWRY-U 26

3.5. ODREĐIVANJE STUPNJA LIPIDNE PEROKSIDACIJE 27

3.6. MJERENJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID- DISMUTAZE 29

3.7. MJERENJE AKTIVNOSTI KATALAZE 30

3.8. KOMET TEST 31

3.9. STATISTIKA 33

4. REZULTATI 34

4.1. KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA 34

4.2. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE 37

4.3. AKTIVNOST KATALAZE 40

4.4. STUPANJ PRIMARNIH OŠTEĆENJA DNA 43

4.4.1. Oštećenje DNA u stanicama bubrega nakon izlaganja hidrokinonu 43

4.4.2. Oštećenje DNA u stanicama jetre nakon izlaganja hidrokinonu 45

4.4.3. Oštećenje DNA u stanicama mozga nakon izlaganja hidrokinonu 47

5. RASPRAVA 50

6. ZAKLJUČAK 54

7. LITERATURA 55

8. ŽIVOTOPIS 64

1. UVOD

U vrijeme pojave prvih živih bića, Zemljina atmosfera je bila siromašna kisikom i prva bića su bila anaerobna. Evolucijom, razvojem fotosintetskih organizama, povećavao se sadržaj kisika u atmosferi, a živi organizmi su počeli razvijati antioksidacijski obrambeni sustav kako bi se zaštitili od toksičnosti kisika. Kisik ima dvostruku funkciju u organizmu: neophodan je za život, stvaranje kemijske energije ATP-a, ali je ujedno i izvor potencijalno štetnih čestica – slobodnih radikala (Valentine i sur., 1995).

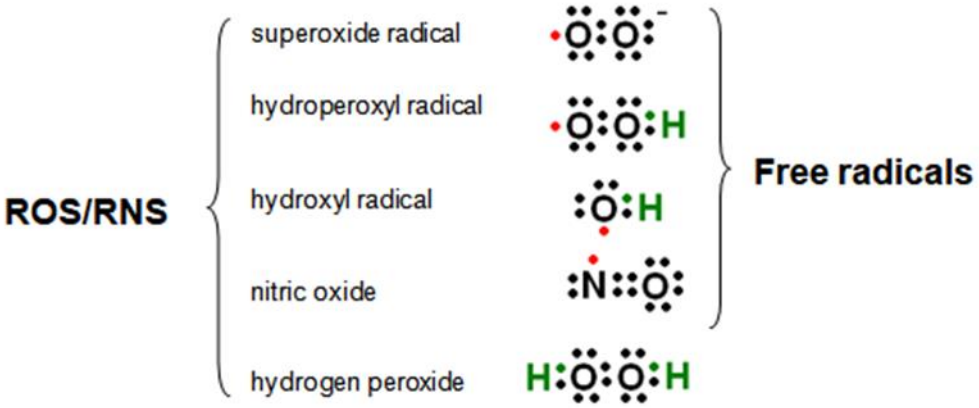
Samo prisustvo slobodnih radikala u organizmu otkriveno je prije nešto manje od 50 godina. Ubrzo nakon toga Harman (1956) pretpostavio je da kisikovi radikali nastaju kao nus produkti enzimskih reakcija *in vivo.* Opisao ih je kao Pandorinu kutiju zla koja dovodi do staničnih oštećenja, mutageneze, raka te na posljetku do samog degenerativnog procesa biološkog starenja (Harman, 1956). Znanost o oksidativnom stresu ušla je u novu eru nakon što su McCord i Fridovich (1969) otkrili enzim superoksid dismutazu (SOD), te na taj način potvrdili važnost slobodnih radikala u biologiji.

Biokemija reaktivnih kisikovih vrsta je područje sa velikom mogućnošću praktične primjene. Molekularni kisik je esencijalan za život, no isto tako nastanak kisikovih i drugih radikala je uobičajen proces u aerobnim stanicama koje metaboliziraju kisik. Međutim, prekomjerna produkcija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) tijekom dužeg perioda uzrokuje patološke promjene u organizmu (Cadenas, 1989).

1.1. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti stanice odnosno njenih enzima da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica. Drugim riječima, oksidativni stres može se definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidativnog sustava (Lobo i sur., 2010).

Slobodni radikali mogu biti definirani kao atomi, ioni ili molekule koji sadrže ne spareni elektron u atomskoj orbitali (Slika 1). Mogu imati ulogu oksidansa ili reducensa, u zavisnosti doniraju li elektron ili ga primaju. Slobodni radikali napadaju bitne stanične makromolekule vodeći do oštećenja stanice (Franco i sur., 2013).



Slika 1. Prikaz najčešćih reaktivnih vrsta povezanih sa oksidativnim stresom.
(preuzeto sa: https://www.slideshare.net/guest371c9f/free-radicals 20.07.2017.)

Glavne mete slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta su prije svega lipidi, nukleinske kiseline i aminokiseline (Franco i sur., 2013; Lobo i sur., 2010). Aminokiseline najpodložnije oksidaciji su triptofan, tirozin, histidin i cistein (Dröge, 2002). Oksidacijom proteini gube svoju funkciju, oštećenje DNA može dovesti do mutacija, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su konačni produkti reaktivni aldehidi (Ayala, 2014).

Slobodni radikali nastaju endogeno, normalnim esencijalnim metaboličkim procesima kao što je oksidacijska fosforilacija, prijenosom elektrona u sustavu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu ili oksidacijom masnih kiselina. Također, njihovo nastajanje mogu katalizirati i brojni enzimi kao što su ksantin-oksidaza, NADPH-oksidaza, mijeloperoksidaza i dušik oksid-sintetaza (Valentine i sur., 1995).

Egzogeno nastaju zagađenjem zraka, prekomjernim izlaganjem suncu, stresu, radijaciji, cigaretnom dimu itd. (Lobo i sur., 2010).

Slobodni radikali mogu nastati i tijekom enzimske oksidacije i autooksidacije različitih kemijskih spojeva poput hidrokinona, kateholamina, oksihemoglobina, pri čemu često uz prisustvo prijelaznih metala dolazi do redukcije molekularnog kisika i nastajanja superoksidnog aniona (Valentine i sur., 1995).

Razlog zbog kojeg je kisik podložan stvaranju slobodnih radikala krije se u njegovoj kemijskoj strukturi, tj. u njegovoj elektronskoj konfiguraciji. Iako molekularni kisik 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 prinuđen na jednoelektronsku redukciju tj, jednoelektronski prijenos elektrona, što direktno dovodi do nastanka superoksidnog aniona i srodnih radikala (Cadenas, 1989).

- Singletni kisik $O_2(a^1\Delta_g)$

Od molekularnog kisika razlikuje se samo po spinu ne sparenih elektrona koji je 0, odnosno elektroni su u antiparalelnom odnosu, što ga čini mnogo reaktivnijim jedinjenjem, predstavlja ekscitirano stanje kisika. Njegova sinteza u biosustavima povezuje se sa imunološkim odgovorom, odnosno sa fagocitozom, u biljakama nastaje u procesu fotosinteze. Negativni aspekti vidljivi su pri lipidnoj peroksidaciji i bolestima povezanim sa oksidativnim stresom, kao što je ateroskleroza. Prisustvo singletnog kisika možemo dokazati u otopinama spektrofotoskopskim metodama, infracrvenom emisijom od 1268 nm (Cadenas, 1989; Halliwell i sur., 1990).

- Superoksidni anion $O_2^{\bullet-}$

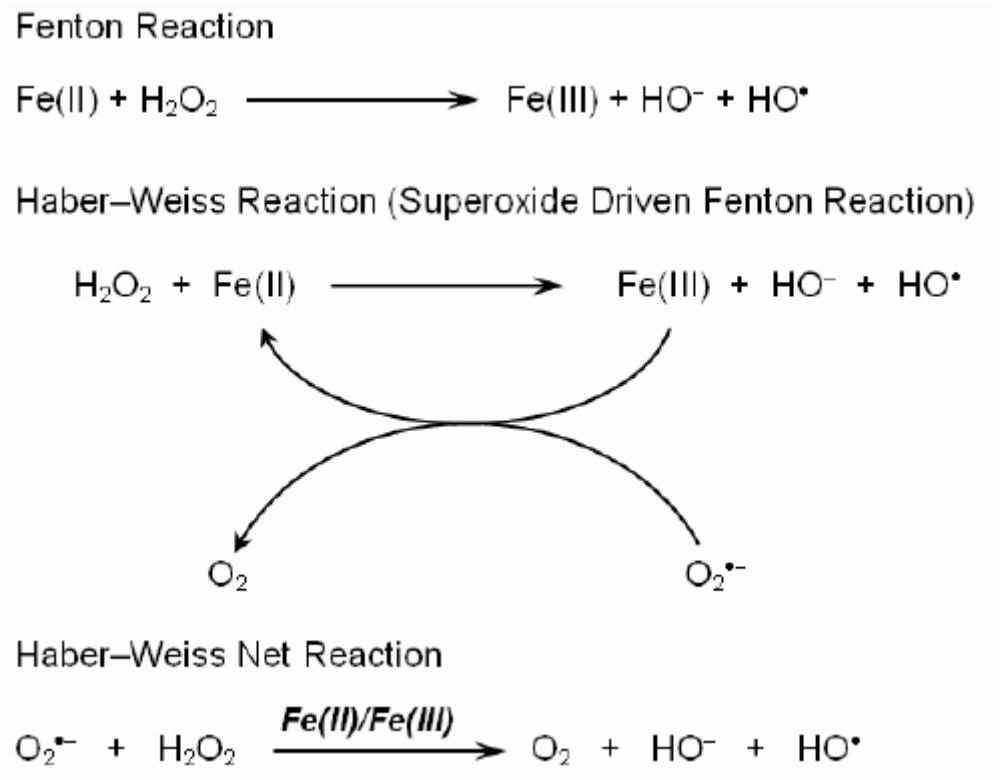
Uobičajeni produkt redukcije molekularnog kisika, te najčešći prekursor H_2O_2. U biološkim sustavima ipak čini samo 5% ukupne redukcije kisika. Najvećim djelom nastaje u mitohondrijskom respiratornom lancu (Cadenas, 1989). Prijenos elektrona sa ubikinona na kompleks III, te sa kompleksa I na ubikinon najčešće dovodi do jednoelekronske redukcije i nastanka superoksidnog aniona. Enzimski put nastanka uključuje NADPH-oksidazu i ksantin-oksidazu (Dröge, 2002; Haliwell i sur., 1990). Ima sposobnost oslobađanja Fe^{2+} iz feritina i Fe-S proteina. Prekursor je metal-katalizirajuće formiranog hidroksilnog radikala (Lobo i sur., 2010).

- Vodikov peroksid H_2O_2

Vodikov peroksid nije radikal jer nema nesparenih elektrona ali je oksidans jer ima sposobnost prihvaćanja elektrona, prilikom čega nastaje vrlo toksičan hidroksilni radikal (Halliwell i sur., 1990). Topljiv je u lipidima, što mu omogućuje difuziju kroz stanične membrane. Nastaje dismutacijom superoksidnog aniona, ili direktnom redukcijom molekularnog kisika (Lobo i sur., 2010). U prisutnosti iona željeza i bakra daje reaktivne hidroksilne radikale, dok u prisutnosti Cl^- iona daje hipokloritnu kiselinu (HOCl), čije nastajanje katalizira enzim mijeloperoksidaza (Štefan i sur., 2007).

- Hidroksilni radikal ·OH

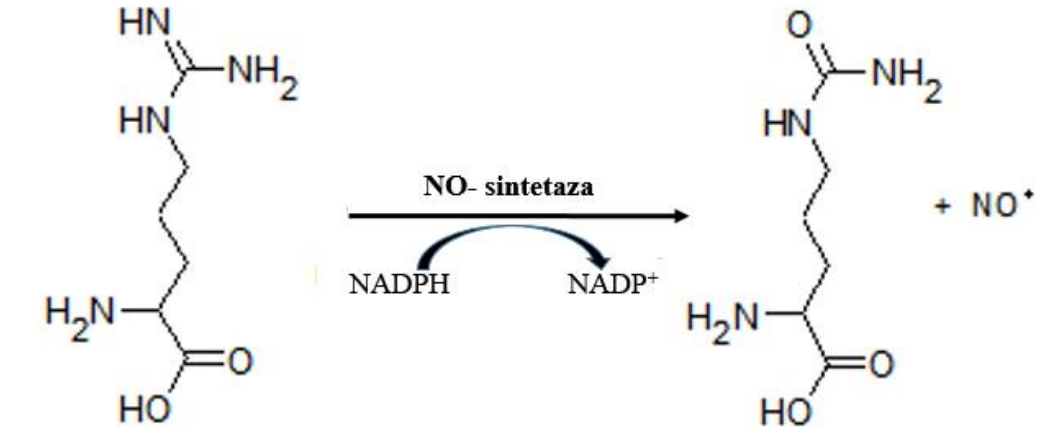
Hidroksilni radikal je mala molekula, vrlo pokretna, topljiva u vodi i kemijski najreaktivniji radikal kisika (Ayala i sur., 2014). U stanju tri-elektronske redukcije, nastaje u Fentonovoj i Haber-Weissovoj reakciji (Slika 2), te raspadom peroksinitrita. U Fentonovoj reakciji dvovalentni ion željeza (Fe^{2+}) reagira s vodikovim peroksidom prelazeći u trovalentni ion željeza (Fe^{3+}), vodikov peroksid se raspada na hidroksilni ion i hidroksilni radikal. Dok u Haber-Weissovoj reakciji dolazi do interakcije superoksidnog aniona i vodikovog peroksida, prilikom čega uz hidroksilni ion i radikal nastaje i molekularni kisik (Ayala i sur., 2014). Dokazano je da napada većinu staničnih komponenti (Lobo i sur., 2010), povezuje se sa neurodegeneracijom, kardiovaskularnim oboljenjima i rakom (Ayala i sur., 2014).



Slika 2. Fentonova i Haber-Weissova reakcija- nastanak hidroksilnog radikala. (preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/279937336_fig2_Fig-2-Basic-free-radical-mechanisms-for-the-Fenton-and-Haber-Weiss-reaction-43-66 23.07.2017.)

- Reaktivne dušikove vrste

Dušikov oksid je uz superoksidni anion najvažniji radikal u organizmu. Sinteza dušikovog oksida (NO) povezuje se sa evolucijski višim organizmima. Sintezu katalizira jedna od tri izoforme enzima dušik-oksid sintetaza (NOS) oksidacijom L-arginina (Slika 3). NO u zavisnosti od mikrookoline može biti pretvoren u mnoge druge reaktivne dušikove vrste, kao što su: nitrozonijum kation (NO^+), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitroksil anion (NO^-) i nitroksil radikal (Paul i Ekambarm, 2011).



Slika 3. Sinteza dušikovog oksida iz L-arginina uz pomoć dušik-oksid sintetaze.
(preuzeto i prilagođeno sa:
https://www.google.hr/search?q=iNOS&rlz=1C1AVNE_enHR707HR707&source=lnms&
28.07.2017.)

Dušikov oksid u organizmu ima brojne korisne učinke: smanjuje adheziju i agregaciju trombocita, regulira tonus crijeva, pospješuje apsorpciju Ca^{2+}, regulira tonus glatkih i poprečnoprugastih mišića, regulira tonus krvnih žila, ima mikrobicidno djelovanje (Dröge, 2002). U živčanom sustavu djeluje kao neurotransmiter u područjima mozga zaduženim za osjećaj gladi i sna, kao i u putovima boli. Utiče na dugotrajnu osnovu pamćenja i učenja (Paul i Ekambaram, 2011).

1.2. FIZIOLOŠKA ULOGA REAKTIVNIH VRSTA

Slobodni radikali u organizmu obično su prisutni u vrlo niskoj koncentraciji 10^{-5} do 10^{-9} mola, ali imaju važnu fiziološku funkciju (Dröge, 2002). Tijekom respiratornog lanca u mitohondrijima produkcija ROS-a je neželjen, ali normalan produkt metabolizma. Pri reguliranim koncentracijama, dušikov oksid, superoksidni anion i druge reaktivne kisikove vrste imaju bitnu ulogu regulatornih medijatora u procesu stanične signalizacije. Također imaju ulogu samih signalnih molekula u brojnim fiziološkim procesima kao što su: regulacija vaskularnog tonusa, kontrola oksigenacije (Dröge, 2002) i produkcija eritropoetina (Fandrey i sur., 1994).

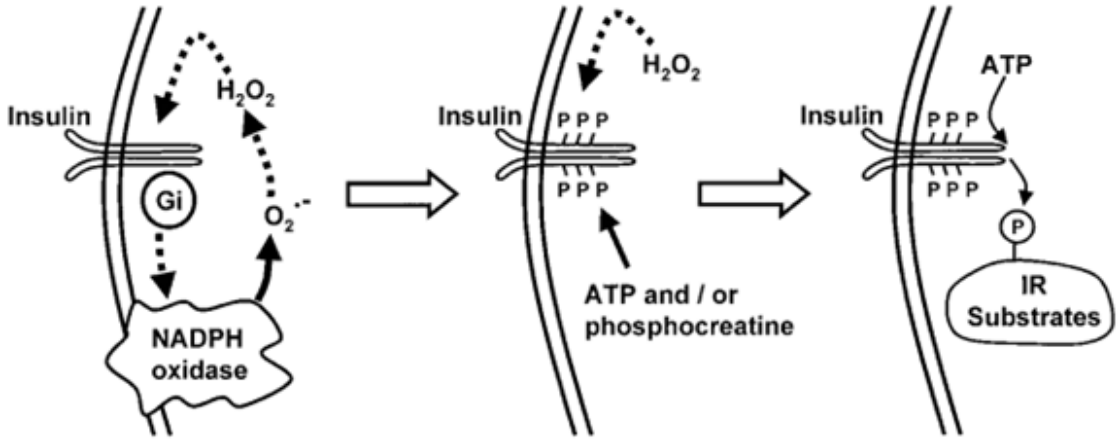
1.2.1. Reaktivne vrste kao medijatori fiziološkog odgovora

Mnogobrojne fiziološke funkcije regulirane su redoks-osjetljivim signalnim putevima. (Dröge, 2002). Primijećeno je da je produkcija eritropoetina pod utjecajem ROS-a. Stanice bubrega i jetre proizvode eritropoetin pod utjecajem HIF 1 transkribcijskog faktora za mnogobrojne gene pod utjecajem hipoksije. Promjene koncentracije kisika tj. novonastala hipoksija opaža se praćenjem promjena ROS-a. Zapaženo je da je ekspresija mRNA eritropoetina u staničnoj liniji jetre bitno smanjena u prisutnosti vodikovog peroksida. Nadalje, tretman egzogenom katalazom bitno povećava produkciju eritropoetina (Sena i sur., 2012).

Nadalje, adhezijske receptorske molekule koje se pojačano eksprimiraju u prvom koraku upalne reakcije ali su također uključene u procese embriogeneze, staničnog rasta i zacjeljivanja ozljeda, stimulirane su ROS-om (Dröge, 2002).

Vodikov peroksid ima bitnu ulogu za vrijeme jodinacije hormona štitnjače, omogućuje oksidaciju jodidnih iona koji se tek tada može vezati sa tirozinom unutar molekule tireoglobulina (Guyton i Hall, 2012).

Također, vodikov peroksid uključen je u aktivaciju inzulinske protein-tirozin kinaze te samim tim u fiziološki bitne procese prijenosa glukoze i metabolizma ugljikohidrata i lipida, sinteze proteina itd. Uočeno je da pri većim koncentracijama od onih fizioloških, vodikov peroksid može potaknuti autofosforilaciju tirozinskih ostataka u odsustvu inzulina (Slika 4) (Hayes i Lockwood, 1987).



Slika 4. Prekomjerna produkcija ROS-a i vodikovog peroksida dovodi do aktivacije inzulinskog receptora bez prisustva inzulina. (preuzeto od: Dröge, 2002)

1.2.2. Uloga reaktivnih vrsta u imunološkom sustavu

Nezanemariva je uloga reaktivnih vrsta u imunološkom sustavu pri odbrani od patogena. Nakon fagocitoze mikroorganizmi mogu biti ubijeni mehanizmom ovisnim o kisiku prilikom kojeg dolazi do tzv. respiracijskog praksa. Nastaje superoksidni anion te vodikov peroksid. U primarnim azurofilnim zrncima neutrofila nalaze se enzimi NADPH-oksidaza i mijeloperoksidaza koja uz niski pH, te spregnuta sa halogenim elementima i vodikovim peroksidom, čini moćan antimikrobni sustav (Andreis i sur., 2010). Ubijanje unutarstaničnih patogena moguće je uz pomoć inducibilne NO-sintetaze (iNOS). Mehanizam kojim dušikov oksid djeluje sastoji se od razgradnje Fe-S prostetičkih skupina enzima za prijenos elektrona te stvaranju vrlo toksičnih peroksinitritnih radikala ($ONOO^-$) (Andreis i sur., 2010).

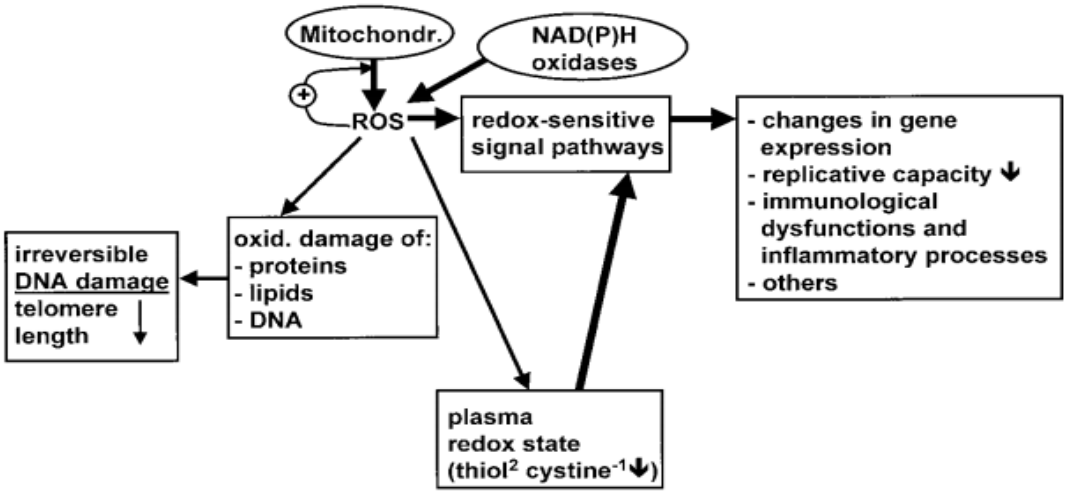
Zanimljiva je uloga reaktivnih kisikovih spojeva u aktivaciji transkripcijskog faktora NF_KB koji dalje promjenom genske ekspresije potiče daljnju produkciju ROS-a, citokina ili odlazak stanice u apoptozu (Pillai i sur., 2004).

Također dokazano je da u određenim koncentracijama superoksidni anion i vodikov peroksid dovode do povećane produkcije interleukina 2, ključnog citokina u sazrijevanju i aktivaciji T-stanica (Hehner i sur., 2000).

1.3. PATOFIZIOLOŠKA ULOGA REAKTIVNIH VRSTA

Reakcije slobodnih radikala s vremenom dovode do akumulacije progresivnih oštećenja u organizmu. Takve promijene normalne su za svaku jedinku, no do problema dolazi kada utjecaj slobodnih radikala bude potaknut genetskim i okolišnim čimbenicima (Lobo i sur., 2010; Sies, 1985).

Oksidativno oštećenje utječe na strukturu i funkciju brojnih biomolekula, što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa (Slika 5). Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja (Atashi sur., 2015).



Slika 5. Učinak oksidativnog stresa na biomolekule u organizmu. (preuzeto od: Dröge, 2002)

Povećana i neregulirana produkcija slobodnih radikala povezuje se sa nizom patoloških stanja kao što su: rak, diabetes mellitus, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, reumatski artristis, ishemijsko-reperfuzijska oštećenja i druge bolesti (Sies, 1985). Smatra se da je oksidativni stres jedan od glavnih uzroka svih inflamantornih bolesti (Lobo i sur., 2010). Slobodni radikali povezuju se i sa procesom starenja, pri kojem je dokazana smanjena aktivnost regulatornih procesa i antioksidacijskih enzima (Dröge, 2002).

1.3.1. Lipidna peroksidacija

Lančana reakcija lipidne peroksidacije odvija se na višestruko nezasićenim masnim kiselinama, i to najčešće onima koje su u sastavu fosfolipidnog dvosloja stanične membrane. Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomu ugljika u blizini dvostruke veze, te tako premještanje vodika čine lakšim. Istraživanja u *in vitro* uvjetima pokazala su da dokozaheksaenska kiselina ima pet puta veću sposobnost oksidacije od linolne kiseline (Ayala i sur., 2014; Štefan i sur., 2007).

Pojava intenzivne lipidne peroksidacije na staničnim membranama može dovesti do opadanja vrijednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema ionima, gubitka fluidnosti te na kraju i do pucanja stanice i izlijevanja njenog sadržaja (Lobo i sur., 2010). Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal, iako i drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije (Štefan i sur., 2007).

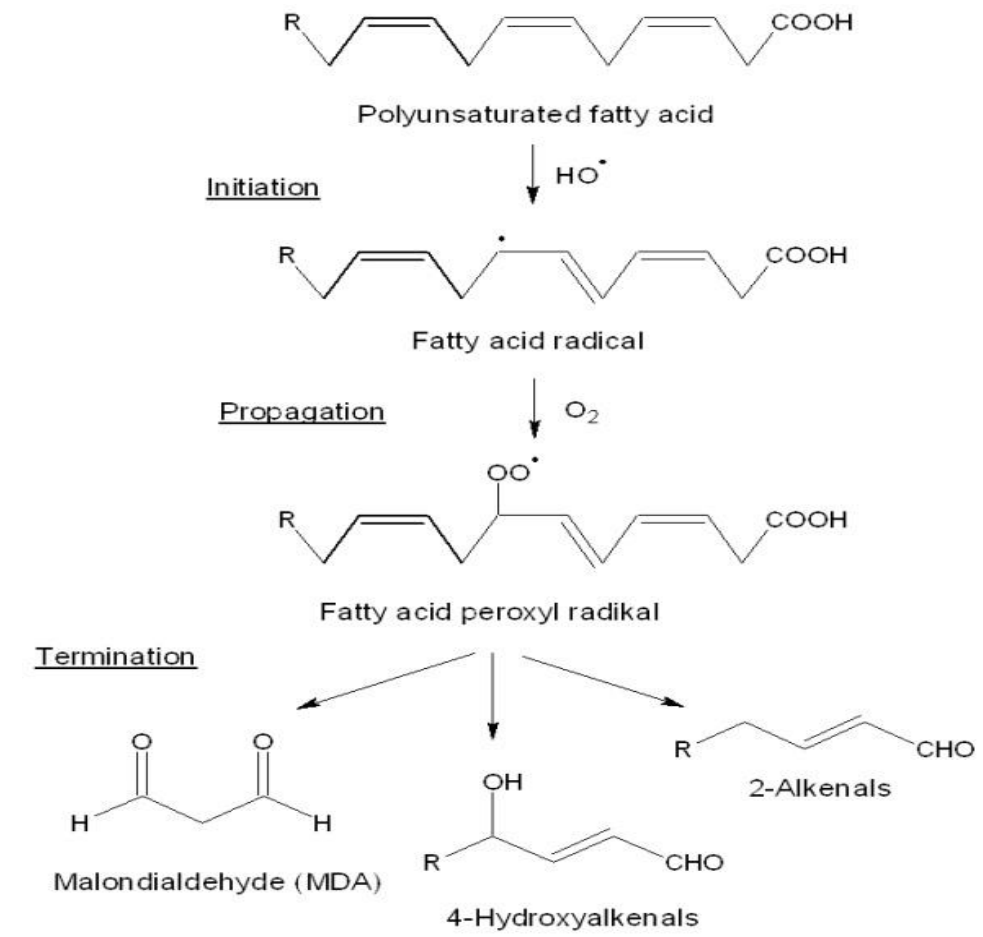
Proces lipidne peroksidacije sastoji se od tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija započinje procesom oksidacije lipida u kojoj visoko reaktivni oksidans oduzima atom vodika višestruko nezasićenoj masnoj kiselini pri čemu nastaje alkilni, odnosno lipidni radikal. Ovaj proces se odvija na vodiku smještenom na α-metilen ugljiku (Dukić i sur., 2012; Porter, 1984). Ukoliko nema prisutnih antioksidanasa dolazi do faze propagacije i nastanka lančane reakcije lipidne peroksidacije. U reakciji sudjeluju i ioni željeza. Nakon što je peroksidacija započela, željezo potiče daljnji proces. Lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s Fe^{2+} i Fe^{3+} ionima, pri čemu nastaju lipidni peroksilni radikali i alkoksi radikali. Što uzrokuje granjane lančane reakcije procesa lipidne peroksidacije (Aikens i Dix, 1991). Krajnji produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi: malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) te izomeri prostaglandina (izoprostani) (Slika 6).

Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti slobodnih radikala, ali ipak dovoljna da im omogući reagiranje s molekulama u okolini što može dovesti do oštećenja stanice te voditi u staničnu smrt. Za razliku od slobodnih radikala, reaktivni aldehidi imaju relativno dug period preživljavanja, stoga se mogu kretati daleko od početnog mjesta nastanka i napadati različite biomolekule, bile one intracelularno ili ekstracelularno (Esterbauer i sur., 1991).

Hidroksinonenal je produkt peroksidacije ω-6 PUFA-e (linoleinske i arahidonske), u većim količinama ima izrazito toksično djelovanje, sposoban je modificirati lipoproteine, inhibira stanični rast te potiče razvoj ateroskleroze (Leonarduzzi i sur., 2005).

Malondialdehid u fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji ulazi u interakciju s proteinima, pokazujući izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom

ostatku. DNA je također ciljno mjesto mjesto napada MDA, točnije gvaninska baza, što može dovesti do mutagenih oštećenja i kancerogeneze. U organizmu MDA se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze. (Ayala i sur., 2014; Štefan i sur., 2007). Nekoliko istraživanja potvrdilo je da se MDA može ponašati i kao signalna molekula potičući oslobađanje inzulina iz langerhansovih otočića pod utjecajem povišenih koncentracija glukoze (Garzia-Ruiz i sur., 2002; Wang i sur., 2014). Dugi niz godina koncentracija MDA koristi se kao biomarker stupnja oštećenja omega-3 i omega-6 masnih kiselina uslijed lipidne peroksidacije (Ayala i sur., 2014).



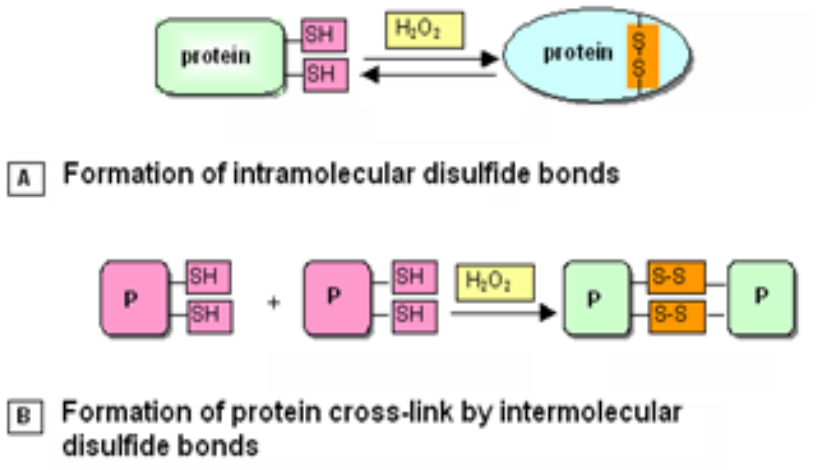
Slika 6. Faze lipidne peroksidacije i nastank reaktivnih aldehida.
(preuzeto od: Dukić i sur., 2012)

Povećana lipidna peroksidacija povećava rizik za razvoj ateroskleroze i drugih oboljenja kao što su dijabetes mellitus, tumori, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Catala, 2007; Lobo i sur., 2010; Reed, 2011). Mogući uzrok povezanost između povećane konzumacije ne zasićenih masnih kiselina i visoke stope smrtnosti od leukemije i drugih malignih oboljenja upravo je lipidna peroksidacija (Lobo i sur., 2010).

Jednom oksidirani LDL povećava svoju supstratnu sposobnost za sfingomijelinazu (Štefanić i sur., 2007). Makrofazi posjeduju specifične receptore kojima mogu prepoznati kemijski modificirani LDL, što dalje dovodi do ulaska LDL-a i kolesterola u stanicu te nastanka pjenušavih stanica. Ta istraživanja pokazuju molekularnu vezu između LDL-a i kolesterola, koja može dovesti do razvoja ateroskleroze (Nilsson i sur., 1992).

1.3.2. Oksidativno oštećenje proteina

Proteini mogu biti oksidativno modificirani na tri načina: promjenom specifične aminokiseline, peptidnim cijepanjem te formiranjem intramolekularnih disulfidnih mostova i unakrsnih veza među proteinima (Slika 7). Proteini koji sadrže aminokiseline metionin, cistein, arginin i histidin su najugroženiji od strane reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva (Freeman i sur., 1982).



Slika 7. Prikaz oksidativne modifikacije proteina.
(preuzeto sa: http://slideplayer.com/slide/10175562/ 30.7.2017.)

Karbonilacija predstavlja najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina. Riječ je o biokemijskoj promjeni proteina kojom se uvode karbonilne grupe (C=O) u proteine. Uvođenje karbonilnih grupa u proteine nastaje kao posljedica izloženosti oksidativnom stresu. Fizikalno-kemijske promjene koje nastaju kod karboniliranih aminokiselina uzrokuju gubitak identiteta aminokiselinskog bočnog lanca, a to su opasnije jer je riječ o ireverzibilnom procesu (Nystrom, 2005).

Oksidativno oštećenje proteinskih produkata tako može utjecati na aktivnost samih enzima, staničnih receptora i signalnih molekula te membranskih transportera. Također, promjene nastale na proteinima uslijed oksidativnog stresa povećavaju osjetljivost proteina na enzimsku proteolizu, na taj način narušavajući integritet same stanice te uzrokujući starenje i apoptozu (Lobo i sur., 2010).

1.3.3. Oksidativno oštećenje DNA

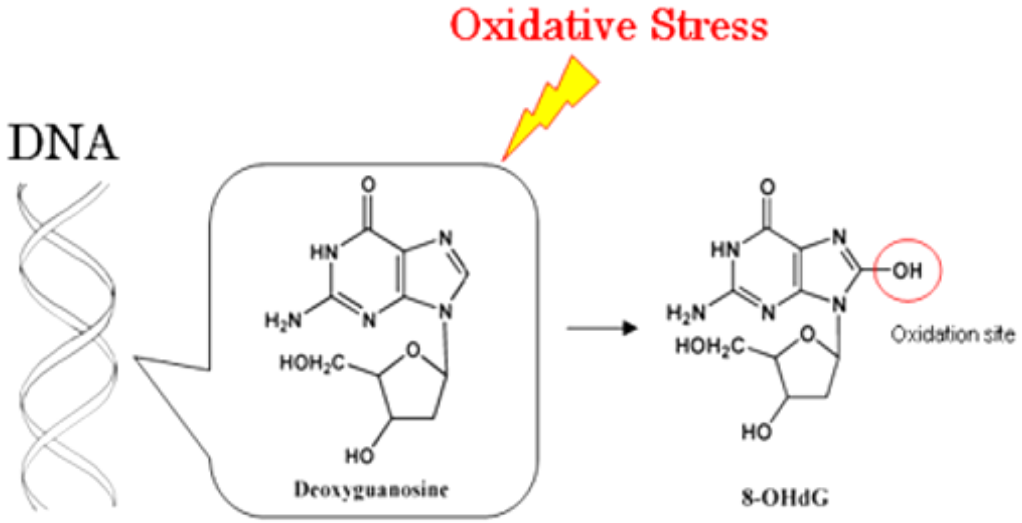
Unatoč postojanju brojnih antiokidacijskih obrambenih sustava zbog njihove nesavršenosti ipak dolazi do oštećenja DNA. Procjenjuje se da broj „oksidacijskih pogodaka“ u DNA po jednoj ljudskoj stanici i tijekom jednog dana iznosi 10 000 (Ames i sur., 1993).

Budući da DNA ima ulogu jedinstvene i trajne kopije staničnog genoma, promjene njezine strukture imaju znatno veće posljedice nego promjene drugih staničnih komponenti poput lipida, proteina ili RNA. Oštećenja nastala na DNA mogu blokirati replikaciju i transkripciju, također mogu rezultirati visokom učestalošću mutacija (Cooper i Hausman, 2010).

Reaktivne vrste uzrokuju oštećenja DNA dovodeći do jednolančanih i dvolančanih lomova lanaca, modifikacije baza i nastanka protein-DNA interakcija, što posljedično može dovesti do mutacije, transformacije te naposljetku kancerogeneze. Radikali, među kojima najviše hidroksilni, najčešće napadaju dvostruku vezu pirimidinskih baza prilikom čega dolazi do izbacivanja vodika sa dijela molekule orijentirane prema šećeru i daljnje lančane reakcije (Lobo i sur., 2010).

Procijenjeno je da je mitohondrijska DNA deset puta više izložena oksidativnim oštećenjima od jezgrine DNA. Dokazano je da se mitohondrijska oštećenja DNA akumuliraju povećanjem godina života i mogu imati važnu ulogu u staničnom starenju. Trebalo bi također napomenuti da je popravak DNA mnogo manje učinkovit u mitohondrijskoj nego u jezgrinoj

DNA, djelomično zbog manjka enzima za popravak i histonske zaštite, a djelomično zbog okidacijske fosforilacije (Ames i sur., 1993). Marker oksidativnog oštećenja DNA, te istovremeno vrlo mutageni spoj je 8-hidroksi-deoksigvanozin (Slika 8) koji nastaje modifikacijom purinskih baza (Hattori i sur., 1997).



Slika 8. Prikaz oksidativnog oštećenja DNA- nastanak 8-hidroksi-deoksigvanozina.
(preuzeto sa: http://en.ori-japan.com/aboutfpp/about-fpp/ 01.08.2017.)

Nakon što do oštećenja već dođe daljnje umnažanje takve DNA i mutacije sprečavaju mehanizmi zaduženi za popravak DNA (Cooper i Hausman, 2010). Oksidativno oštećena DNA najčešće se popravlja djelovanjem glikozilaza koje uklanjaju oštećenu bazu (Ames i sur., 1993) te na taj način ostavljaju apirimidinsko ili apurinsko (AP) mjesto u DNA. Takva se mjesta 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).

Dvolančane lomove najteže je popraviti jer je narušen kontinuitet oba lanca te DNA-polimeraza nema kalup na osnovu kojeg bi sintetizirala komplamentaran lanac. Umjesto toga dvolančani lomovi popravljaju se rekombinacijskim popravkom. Mehanizam se zasniva na replikaciji sa homolognim sljedovima DNA, što je moguće jedino tijekom replikacije dok su sestrinske kromatide sljubljene. Alternativni način je spajanje pocijepanih krajeva DNA, ali taj način je najmanje efikasan jer dovodi do učestalih pogrešaka (Cooper i Hausman, 2010).

1.4. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi se široko primjenjuju kao sastojci u dijetetskim proizvodima. Pored primjene u medicini, antioksidansi imaju primjenu u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Stotinama godina je poznata antioksidacijska sposobnost određenih začinskih biljaka. Korišteni su kao dodaci za poboljšanje okusa ali također i za očuvanje ispravnosti. Postoji veliki broj prirodnih antioksidanata, a najvažniji među njima su vitamini: α-tokoferol- vitamin E i askorbinska kiselina- vitamin C (Ćetković i sur. 2007). Vitamini su bitni jer ih naše tijelo ne može proizvesti nego ih moramo priskrbiti prehranom (Lobo i sur., 2010).

Antioksidans je molekula dovoljno stabilna da donira elektron slobodnom radikalu te na taj način ga neutralizira prije nego dođe do oštećenja. Ostali mehanizmi djelovanja uključuju keliranje prijelaznih metala i regulaciju genske ekspresije (Lobo i sur., 2010).

Razlikujemo primarnu i sekundarnu antioksidacijsku zaštitu. Primarna uključuje antioksidacijske enzime te manje molekule kao što su vitamini, urična kiselina, koenzim Q i GSH (Cadenas, 1989). U kasnu sekundarnu zaštitu spadaju proteolitički enzimi, kao i sustav DNA popravka kao što su glikozilaze i nukleaze. Sekundarna antioksidacijska zaštita je potrebna jer usprkos opsežnoj primarnoj zaštiti i mnoštvu enzima do oštećenja ipak dolazi, kako samih enzima i proteina tako i ostalih staničnih dijelova. Oksidativno modificirane proteine prepoznaju i uklanjaju ATP i Ca^{2+} neovisne proteaze (Cadenas, 1989).

1.4.1. Enzimski antioksidacijski sustav

Reaktivne vrste koje se oslobađaju u svakodnevnim metaboličkim procesima uklanjaju se mrežom međusobno vrlo dobro reguliranih i usklađenih antioksidacijskih enzima kako bi se postigao osnovni cilj obrane od mogućih oksidativnih oštećenja. Superoksid dismutaza predstavlja prvi korak obrane nakon čega drugi enzimi uklanjaju vodikov peroksid (Lobo i sur. 2010; Zarić i sur., 2011).

Promijenjena funkcija antioksidacijskih enzima povezuje se sa brojnim kliničkim poremećajima (Tablica 1), što nam pruža uvid u važnost normalnog funkcioniranja antioksidacijskog sustava za održavanje homeostaze organizma (Štefan i sur., 2007).

Tablica 1. Patološka stanja u kojima je promijenjena aktivnost antioksidacijskih enzima

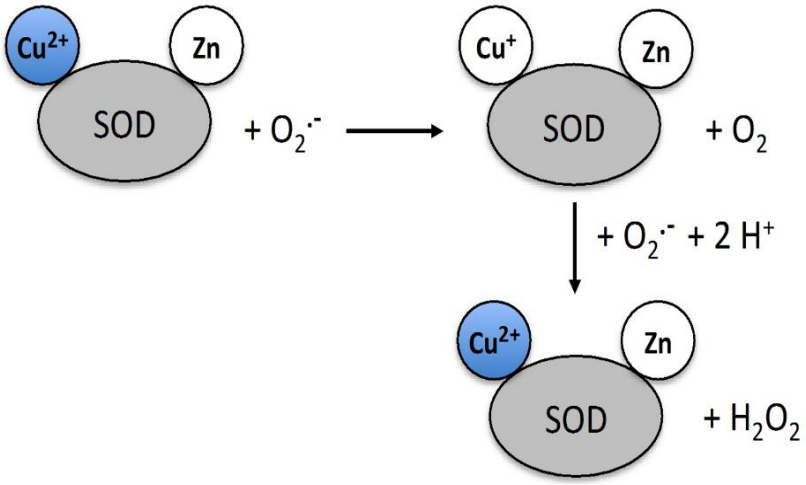
Vrsta poremećaja	Ključni enzim
preosjetljivost na lijekove	GPx, SOD
preosjetljivost na određene namirnice	GPx
leukemija, tumori bubrega, jetre, crijeva, dojke i kože	CAT, GPx, SOD
ishemija	SOD
ateroskleroza	SOD
Helicobacter pylori	SOD
hepatitis	GPx
gripa	CAT, GPx, SOD
kronična granulomatozna bolest	CAT
Downov sindrom	SOD
dijabetes	CAT, SOD
Alzheimerova bolest	SOD
amiotrofna lateralna skleroza	SOD
Huntingtonova bolest	SOD
Parkinsonova bolest	GPx
očna mrena	CAT, SOD

SOD – superoksid dismutaza; CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza

(preuzeto od: Štefan i sur., 2007)

1.4.1.1. Superoksid dismutaza - SOD

Pripada visoko konzerviranim enzimima i čini prvu liniju obrane enzimskog zaštitnog sustava jer katalizira uklanjanje superoksidnog radikala, prvog produkta jednovalentne redukcije molekularnog kisika. SOD je smještena u gotovo svim aerobnim stanicama i izvanstaničnoj tekućini. Enzim katalizira dismutaciju superoksidnog aniona na molekulu kisika pri čemu se jedna molekula aniona oksidira, dok se druga reducira u vodikov peroksid (Slika 9) (Holovska i sur., 2008; Franco i sur, 2013).



Slika 9. Prikaz katalitičke aktivnosti Cu/Zn- SOD.
(preuzeto od: Franco i sur., 2013)

SOD relativno je mali enzim, građen od svega 153 aminokiseline. Prisutna je u tri izoforme koje se međusobno razlikuju prema vrsti metalnog iona koji sadrže u svom aktivnom centru (Lobo i sur. 2010).

Izoenzim Cu/Zn-SOD se nalazi u citosolu, kloroplastima i peroksisomima. Po građi je dimer, a u aktivnom središtu sadrži ione Cu ili Zn (Lobo i sur. 2010). Razlikujemo i ekstracelularnu Cu/Zn-SOD koja je građena od četiri podjedinice i štiti izvanstanični prostor od štetnog djelovanja superoksidnog aniona. Mn-SOD se nalazi u matriksu mitohondrija i peroksisomima, a svaka od četiri podjedinice tetramera sadrži jedan atom Mn. Fe-SOD poglavito pronalazimo u kloroplastima (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

Kod sisavaca i većeg djela hordata podjela je nešto drukčija. SOD1 (dimer, Cu/Zn) lokalizirana je u citoplazmi, SOD2 (tetramer, Cu/Zn) u mitohondrijima dok je SOD3 (tetramer, Mn) izvanstanična (Lobo i sur., 2010). Ovakvom raspodjelom izoenzima unutar stanice i izvan nje omogućeno je brzo i djelotvorno uklanjanje superoksidnog radikala na mjestu njegova nastanka. Aktivnost SOD je regulirana obimom njene biosinteze koja je osjetljiva na obim tkivne oksigenacije (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

Zanimljivo je otkriće povezanosti mutacije gena koji kodiraju za SOD sa pojavom amiotrofične lateralne skleroze (ALS). SOD regulira aktivnost NADPH-oksidaze (NOx) stupanjem u kompleks sa Rac1 GTP-azom, te uz prisustvo povišene koncentracije vodikovog peroksida dovodi do inaktivacije NADPH-oksidaze. Kod mutirane SOD vezanje za Rac1 ne dovodi do inaktivacije NOx te dolazi do prekomjerne produkcije superoksidnog aniona (Franc i sur., 2013).

1.4.1.2. Katalaza CAT

Katalaza je uobičajeni enzim pronađen u gotovo svim živim organizmima koji su izloženi kisiku, njena je uloga da katalizira raspad vodikovog peroksida na vodu i kisik (Glorieux i Calderon, 2017)

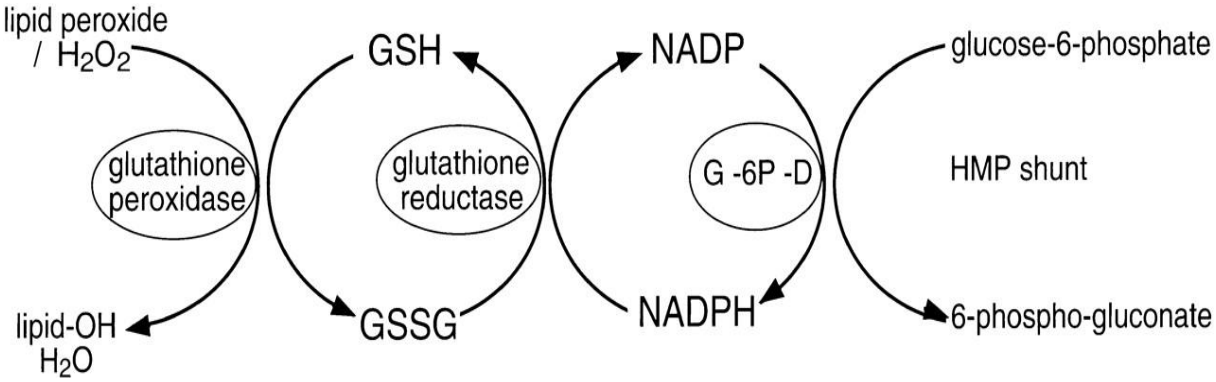
$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Katalazu pronalazimo u svim organima, ali njene najveće koncentracije izmjerene su u stanicama jetre (Lobo i sur., 2010), dok mozak, srce i poprečno prugasti mišići sadrže samo male količine katalaze (Murphy i sur., 1981). Najveće koncentracije katalaze nalazimo u peroksisomima stanica, dok zanemarive količine nalazimo u endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima i kloroplastima kod biljaka. Molekularna masa katalaze je 240,000, a sastoji se od četiri podjedinice, sadrži porfirinski hem sa Fe^{3+} ionom u aktivnom mjestu. Svaka podjedinica veže jednu molekulu NADPH (Murphy i sur., 1981).

Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama vodikovog peroksida jer je za reakciju potreban simultani dolazak dvije molekule H_2O_2 u aktivno mjesto. Kažemo da katalaza ima visoku katalitičku učinkovitost, ali izrazito nizak afinitet prema supstratu. Iz svega navedenog možemo zaključiti da će njena aktivnost biti pojačana u uvjetima oksidativnog stresa (Glorieux i Calderon, 2017; Willekens i sur., 1995).

1.4.1.3. Sustav glutationa

Sustav glutationa uključuje enzime glutation peroksidazu (Gpx) i glutation reduktazu (GR) te tripeptid glutation, zajedničkim međudjelovanjem formiraju jak antioksidacijski sustav (Slika 10). Pronađen je kod životinja, biljaka i mikroorganizama. Najveća koncentracija enzima pronađena je u jetri, gdje imaju ulogu i u detoksikacijskom metabolizmu (Meister i Anderson 1983).



Slika 10. Mehanizam djelovanja glutationskog sustava.
(preuzeto od: Rahman i MacNee, 1999)

Glutation peroksidaza GPx katalizira redukciju vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida u prisutnosti reduciranog oblika glutationa GSH koji služi kao donor vodika. Prisutna je u citosolu stanice kao i u mitohondrijima, te uz katalazu značajno doprinosi uklanjanju H_2O_2 (Kozić i sur., 2002). Postoji najmanje 4 izoenzima kod životinja, koji se razlikuju po smještaju unutar stanice, te afinitetu prema supstratu. GPx u svom aktivnom centru sadrži atome selena (Se) kao kofaktore (Lobo i sur., 2010).

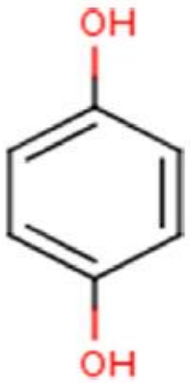
Enzim glutation reduktaza (GR) koristi NADPH kako bi reducirala oksidirani oblik glutationa (GSSG) u njegov reducirani oblik (GSH) (Rahman i MacNee, 1999). Glavni izvor NADPH molekule sa reducirajućim djelovanjem je put pentoza fosfata (Wamelink i sur., 2008). Reducirani se glutation u daljnjim reakcijama 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 (Kozić i sur., 2002)

Glutation (GSH; L-y-glutamil-L-cisteinil-glicin), tripeptid koji sadrži reduciranu tiolnu SH skupinu, pripada neenzimatskom antioksidacijskom sustavu, te ima mogućnost reverzibilne oksidacije i redukcije. U stanicama se održava u reduciranom obliku uz pomoć enzima glutation reduktaze (Rahman i MacNee, 1999). Sintetizira se u stanicama, nije ga potrebno unositi u organizam (Lobo i sur., 2010). Nadalje, GSH je kofaktor glutation peroksidaze (Rahman i MacNee 1999). Omjer GSH/GSSG u stanicama jedan je od bitnijih indikatora oksidacijskog stresa (Kozić i sur., 2002).

1.5. HIDROKINON (1,4-benzendiol)

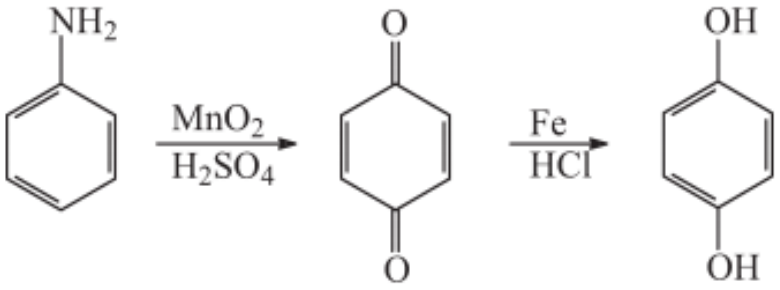
Posljednjih godina sintetički antioksidansi kao što su butilirani hidroksitoluen i butilirani hidroksianisol pokazali su potencijalno štetne učinke na ljudsko zdravlje, te se novija istraživanja usmjeravaju na pronalazak prirodnih spojeva sa antioksidacijskom aktivnošću kakve možemo pronaći u brojnim biljnim vrstama (Lobo i sur., 2010).

Hidrokinon (Slika 11) je po kemijskoj strukturi fenol, aromatski organski spoj, koji se u prirodi pojavljuje u biljkama, također se proizvodi i u komercijalne svrhe, najčešće se pojavljuje u obliku bijelih kristalića (Blaut i sur., 2006; English i Deisinger, 2004).



Slika 11. Kemijska struktura hidrokinona. (preuzeto od: Shayne, 2005)

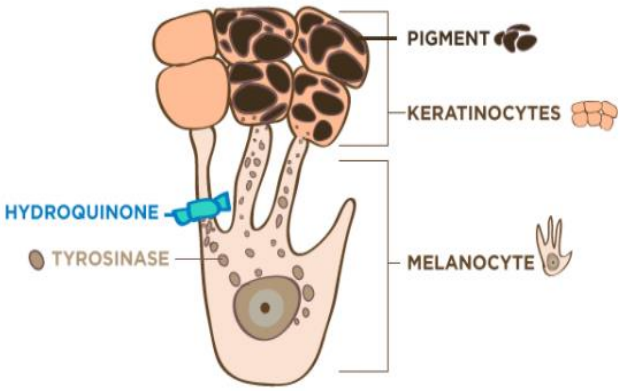
Klasičnom metodom pripreme nastaje oksidacijom anilina uz manganov dioksid i H_2SO_4 te redukcijom nastalog međuprodukta s Fe/HCl (Slika 12). Pri toj sintezi nastaje velika količina opasnog otpada jer proizvodnjom jednog mola hidrokinona nastaje ekvivalentna količina amonijeva sulfata i željezova oksida. Noviji način sinteze koji je prihvatljivi za okoliš temelji se na direktnoj proizvodnji hidrokinona iz fenola i vodikova peroksida uz upotrebu katalizatora iz skupine titanovih silikata TS-1 (Jukić i sur., 2004).



Slika 12. Sinteza hidrokinona iz anilina. (preuzeto od: Jukić i sur., 2004)

U biljkama se najčešće pojavljuje u svojoj glikozilinaroj formi hidrokinon-β-D-glukopiranozid ili poznatije- arbutin, gdje ima protektivnu ulogu protiv brojnih patogena. Za baktericidnu ulogu odgovoran je sam hidrokinon (Blaut i sur., 2006). Biljke u kojima ga najčešće pronalazimo a karakteristične su za naše područje su kruška, borovnica i brusnica. Najveće koncentracije najčešće pronalazimo u listovima i kori biljke (English i sur., 1994). U prirodi ne opstaje dugo, nije podložan biokoncentriranju u ribi i drugim morskim organizmima (Shayine, 2005). Dokazano je da na svakodnevnoj bazi, prilikom ispijanja samo jedne šalice kave, probavom jedne kriške pšeničnog kruha ili zdjelice pšenične zobi, u organizam unosimo oko 214 μg arbutina ili hidrokinona (Nordlund i sur., 2006).

Upotrebljava se za razvijanje fotografija, u proizvodnji antioksidanata i antiozonata, stabilizator je u bojama i lakovima, motornim uljima i benzinu (Nortlund i sur., 2006; Shayne, 2005). Nekada se primjenjivao kao konzervans za očuvanje hrane (Fingler, 1994). Svoju je primjenu pronašao i u kozmetičkoj industriji te medicini gdje se koristi kao preparat za depigmentaciju manjih predjela hiperpigmentirane kože te kod drugih dermatoloških oboljenja (Palumbo i sur., 1990; DeCaprio, 1999). Još 30-ih godina prošlog stoljeća došlo se do zapažanja da krzno crnih mačaka tretirano hidrokinonom gubi svoj pigment i postaje sivo. Hidrokinon naime inhibicijski djeluje na enzim tirozinazu koji je zadužen za sintezu melanina iz dopaminskog tj. fenilalaninskog prekursora (Slika 13). No djelovanje je reverzibilno, nakon prestanka tretmana ponovno dolazi do aktivacije enzima i sinteze melanina (Chawla i sur., 2008).



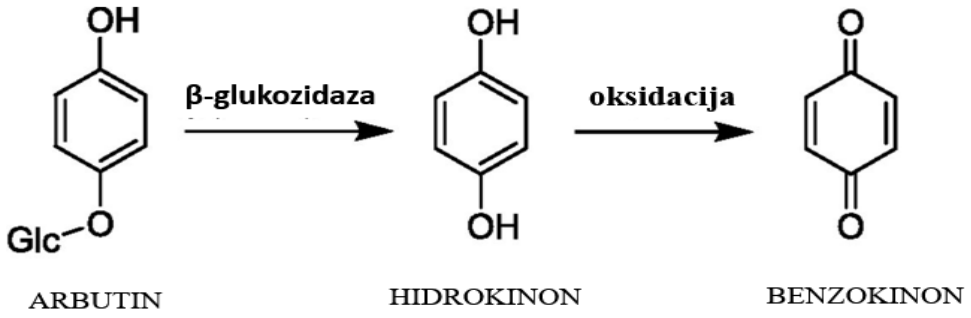
Slika 13. Prikaz inhibitornog djelovanje hidrokinona na tirozinazu unutar melanocita. (preuzeto sa: https://www.futurederm.com/5-little-known-facts-every-hydroquinone-user-needs-to-know-immediately/ 20.08.2017.)

No druga istraživanja pokazala su drugačiji mehanizam djelovanja hidrokinona na melanocite, gdje dolazi do inhibicije replikacije DNA i transkripcije RNA što narušava sam metabolizam i funkcioniranje stanice (Peney i sur., 1984). Hidrokinon također uzrokuje degradaciju stanične i jezgrine membrane dovodeći do izlijevanja sadržaja i nekroze melanocita (Jimbow i sur., 1974).

Izloženost kože hidrokinonu u prevelikim koncentracijama može izazvati različite poremećaje kože (Matsumoto i sur., 2016). Problem kod prekomjerne upotrebe hidrokinona na koži je što može izazvati kontaktni dermatitis te rjeđe ohronozu, rezultirajući hiperpigmentacijom na tretiranom području koju je poslije teško izliječiti (Dahiya i Romano, 2006). Također je zabilježeno da hidrokinon ima sposobnost aktivacije Langerhansovih stanica u koži, potičući na taj način upalni proces (Note i sur., 1995). Zabrinjavajući je i stupanj njegove apsorpcije putem kože te dospijeće u krvotok gdje može ispoljiti svoj potencijalno genotoksičan i štetan učinak. Zbog svega navedenog, upotreba hidrokinona u kozmetičkim proizvodima zabranjena je ili posebno regulirana u mnogim zemljama Europe i SAD-a (Matsumoto i sur., 2016). Dugotrajna izloženost zraku u kojem je prisutan hidrokinon dovodi do zamućenja rožnice, preosjetljivosti oka na svjetlost te smetnji vida (Ramirez i sur., 2013).

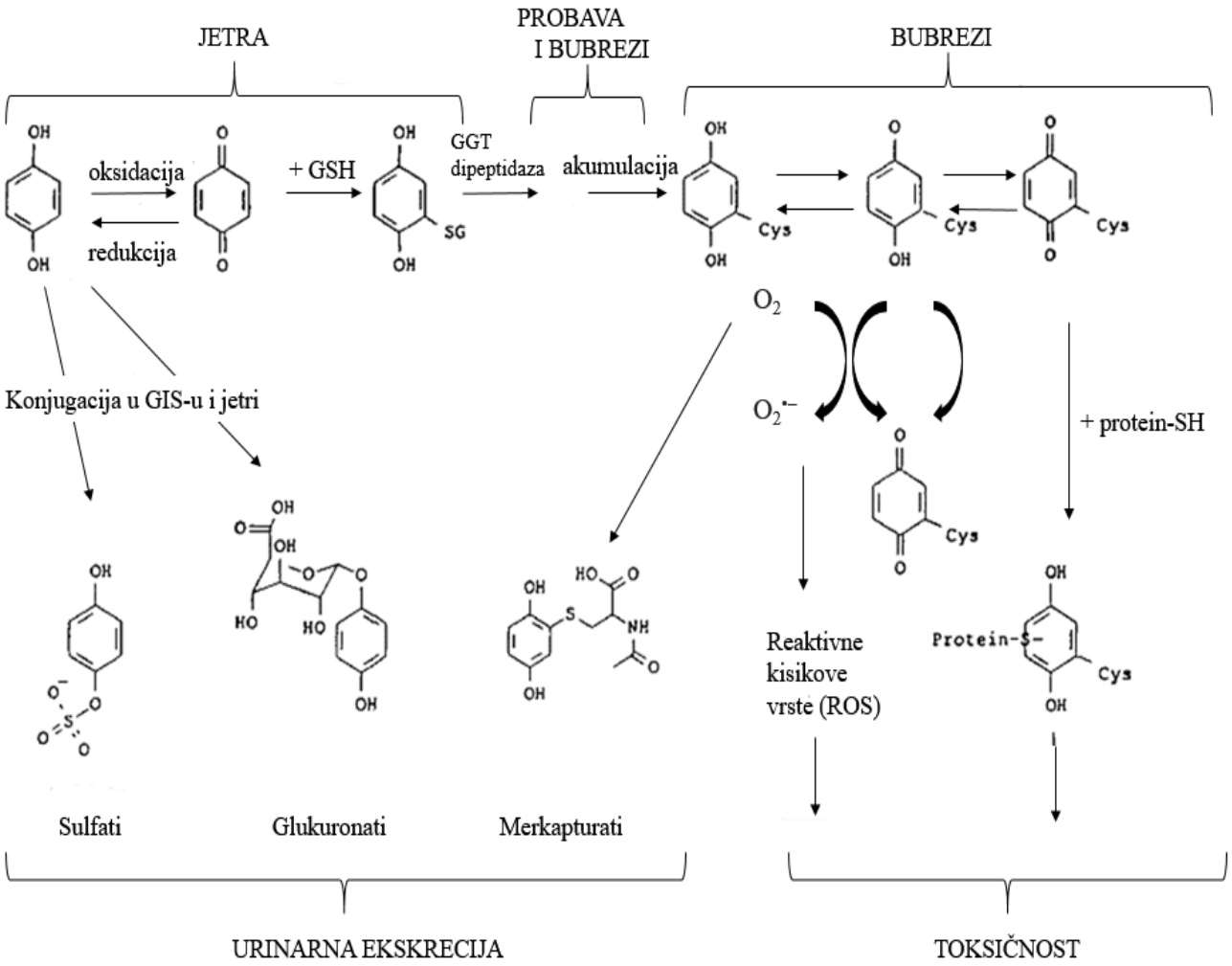
1.5.1. Toksikokinetika hidrokinona

Hidrokinon je spoj koji nastaje bioaktivacijom arbutina. Preciznije, razgradnjom arbutina djelovanjem enzima β-glukozidaze (Slika 14), odvajanjem ugljikohidratne skupine sa fenola potpomognuto alkalnim uvjetima i gastroinestinalnim bakterijama. U ljudskom organizmu za tri bakterijske vrste je potvrđena sposobnost konverzije arbutina u hidrokinon *B. distasonis, B. adolescentis* i *E. casseliflavus* (Blaut i sur., 2006).



Slika 14. Prikaz nastanka hidrokinona bioaktivacijom arbutina, te njegove oksidacije u benzokinon. (preuzeto i prilagođeno sa: http://pharmrev.aspetjournals.org/content/68/4/1026 20.08.2017.)

Brzo i opsežno se apsorbira u gastroinestinalnom sustavu i moguće koži, te se dalje širi tkivima. Nakon oralne primjene metabolizira se konjugacijom u glukuronoidne i sulfatne estere te se izlučuje mokraćom (English i Deisinger, 2004; English i sur., 1994; Shaynem 2005). Manje poznatim metaboličkim putem hidrokinon se u jetri transformira u konjugate glutationa izazivajući tako oksidativni stres. Sekundarnom trasformacijom konjugata hidrokinona u urinarnom traktu nastaje N-acetil-S-(2,5-dihidroksifenil) cistein (Slika 15) za kojeg je dokazano da uzrokuje nekrozu proksimalnih kanalića bubrega (English i sur., 1994).



Slika 15. Predloženi putevi biotransfomacije hidrokinona
(preuzeto i prilagođeno od: English i sur., 1994)

Akutna oralna LD50 toksičnost kreće se od 70 mg/kg za mačke pa do 550 mg/kg za zamorce. Učinci izlaganja akutnim visokim dozama hidrokinona kod životinja primarno se očituju na središnjem živčanom sustavu (DeCaprio, 1999). Letalne doze (za čovjeka 5-10 g) izazivaju hiperosjetljivost, tremor, povraćanje, nesvjesticu, otkazivanje bubrega i jetre te naposljetku smrt (Shayne, 2005).

1.5.2. Genotoksično i antimikrobno djelovanje hidrokinona

Istraživanje kronične toksičnosti kod glodavaca pokazalo je da hidrokinon izaziva kancerogenezu te je uvršten u kancerogene spojeve za štakore (DeCaprio, 1999; Roza i sur., 2003; Whysner i sur., 1995). U dvogodišnjoj studiji na štakorima povezan je sa pojavom adenoma u bubrezima te sa epitelnom degeneracijom tubula kod mužjaka. Oštećenje je praćeno povećanom proliferacijom stanica, ali najvjerojatnije kao regenerativni odgovor na nefrotoksičnost (English i sur., 1994). Također, istraživanja provedena na ljudskim limfocitima pokazala su genotoksični učinak hidrokinona i povećan broj mikronukleusa u stanicama (Andreoli i sur., 1999; Robertson i sur., 1991).

Bitan mehanizam genotoksičnog djelovanja hidrokinona je inhibicija enzima topoizomeraze II (Fung i sur., 2004). Hidrokinon onemogućava normalnu mitozu stanice narušavajući normalnu funkciju proteina uključenih u formiranje mikrotubula i diobenog vretena (Blaut i sur., 2006).

S druge strane istraživanje koje je proveo Matsumoto (2014) na transgeničnim Muta^{TM} miševima pokazalo je da hidrokinon nije mutageni spoj, te da nije zaslužan za indukciju kancerogeneze. Iz čega je zaključeno da ranija istraživanja o bubrežnim tumorima provedena na štakorima nisu značajna za ljude.

Također, u *in vitro* uvjetima ljudski limfociti koji su tretirani toksičnim i subtokičnim koncentracijama hidrokinona, nakon određenog vremenskog intervala djelovanja nisu pokazali nikakve strukturne promjene kromosoma (Pavlović i sur., 2009; Roza i sur., 2003). Također, istraživanja koja su se bavila antioksidacijskim potencijalom hidrokinona pokazala su njegovu sposobnost inhibiranja lipidne peroksidacije, a samim tim i oštećenja DNA (Roza i sur., 2003).

Brojna istraživanja dokazala su antimikrobno djelovanje hidrokinona u vidu inhibicije rasta različitih bakterijskih i gljivičnih kultura. Dokazan snažan antimikrobni učinak za *E. faecalis* i *K. pneumoniae*, dok je snažan antifungalni učinak dokazan u metanolnoj otopini za kliničke sojeve *C. albicans* i *C. parapsilosis* (Jurica, 2015; Schindler i sur., 2002).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak hidrokinona na aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze i katalaze, te stupanj lipidne peroskidacije u organima (jetra, bubreg, mozak) štakora tretiranih *peroralno* hidrokinom (200 mg/kg) tijekom 28 dana. Također će se istražiti potencijalni genotoksični učinak u istim organima te utvrditi eventualnu povezanost oštećenja DNA i oksidativnog stresa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 POKUSNE ŽIVOTINJE

Istraživanje je provedeno na muškim i ženskim štakorima soja Lewis starosti 60±5 dana uzgojenim na uzgajalištu Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su okoćene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja. Hranjene su standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP, 4 RF 1, Mucedola, Settimo Milanese, Milano, Italija), uz stalno dostupnu vodu *ad libitum*. Za provođenje pokusa na životinjama dobivena je suglasnost Etičkog povjerenstva PMF-a (URBROJ: 251-58-10617- 14-104). Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006.) i prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, NN 55/13.

3.1.1. Tretman životinja

Životinje su slučajnim odabirom raspoređene u skupine od po 4 životinje istog spola. Životinje su jednom dnevno tretirane hidrokinonom (200 mg/kg) u razdoblju od 28 dana. Kontrolne skupine za svaki spol zasebno su tretirane istim volumenom redestilirane vode. Tretiranje je izvršeno oralno, gastralnom kanilom. Kontrolne i tretirane skupine su tijekom trajanja istraživanja držane u istim uvjetima. Tretiranje pokusnih 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). Štakori su žrtvovani 24 sata nakon primjene zadnje doze radi izdvajanja organa (bubreg, jetra i mozak).

Tijekom žrtvovanja sve su životinje bile adekvatno 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).

3.2 HIDROKINON

Korišten je 99 %-tni hidrokinon proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka). Vodena otopina pripremljena je otapanjem hidrokinona u redestiliranoj vodi. Spoj je oralno apliciran štakorima u dozi od 200 mg/kg.

Akutna oralna toksičnost hidrokinona LD_{50} za štakore iznosi između 298-390 mg/kg dnevno, a koncentracija od 400 mg/kg dnevno je u preliminarnom pokusu ukazala na toksično djelovanje hidrokinona na CNS štakora u obliku tremora i konvulzija (Jurica, 2013). Iz tog je razloga kroz cijelo istraživanje primijenjena polovina doze hidrokinona (200 mg/kg).

3.3. UZIMANJE UZORAKA ORGANA

Svaki od navedenih organa žrtvovanih životinja je obilježen, nakon čega je u Eppendorf epruvetu od 2ml izdvojen komadić tkiva u rasponu mase od 55-65 mg u koju je dodan pufer za homogenizaciju [(0,075 M NaCl i 0,024 M Na_2EDTA, pH 7,5] prethodno ohlađen na 4 °C. Homogenizacija je izvršena ultrazvučnom sondom snage 73 W, uz stalno hlađenje uzorka na ledu.

3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA METODOM PO LOWRY-U

Metoda određivanja proteina po Lowry-u (1951) jedna od najpreciznijih metoda za određivanje koncentracije proteina, pripada skupini takozvanih indirektnih metoda. Mjerenjem apsorbancije otopine pomoću sprektrofotometra Libra S22 (Biochrom) dobivaju se vrijednosti koje se uz pomoć baždarnog dijagrama preračunavaju u koncentraciju (Waterborg, 1989).

Ova metoda kombinira Biuretsku reakciju i oksidaciju aromatskih bočnih ogranaka tirozina, triptofana i cisteina. Naime, lužnati uvijeti dovode do vezanja dvovalentnih iona bakra na amino skupine peptidne veze, prilikom čega dolazi do redukcije iona bakra te nastanka kompleksa Cu-protein. Dodatkom Folinovog reagensa koji sadrži fosfomolidben i fosfovolframsku kiselinu dolazi do njihove redukcije u molidben i volfram plavo koji vidimo

kao obojenje otopine (Waterborg, 1989).

Otopine koje su korištene:

Otopina A (2 g Na_2CO_3 + 100 ml 0,1M NaOH) 2%

Otopina B (0,1 g NaK-tartarata + 10 ml dH_2O) 1%

Otopina C (0,005 g $CuSO_4$ x $5H_2O$ + 10 ml dH_2O) 0,5%

Otopinu E pripravljena je mješanjem Folin-Ciocalteuova reagensa sa destiliranom vodom u omjeru 2:1 (14 ml Folinovog reagensa + 7 ml dH_2O). Bočica sa reagensom obložena je aluminijskom folijom zbog fotoosjetljivosti reagensa.

Metodom po Lowry-u određena je koncentracija proteina u homogenatima bubrega i jetre razrijeđenja 40x te u homogenatu mozga razrijeđenja 10x. U epruvete je dodano po 100 µL razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D , te su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodano 200 µL otopine E, nakon čega su epreuvete snažno vorteksirane i inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi. Otopina D pripravljena je mješanjem otopina A, B i C u omjeru 48:1:1. Kao standard upotrijebljen je albumin iz goveđeg seruma (engl. Bovine serum albumin, BSA) u različitim koncentracijama od 1,5 mg/mL prema manjim koncentracijama (1,5; 1,25, 1; 0,75; 0,5 ; 0,25; 0,125 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA određen je nagib pravca. Koncentracija proteina mjerena je na 600 nm na spektrofotometru i izražena kao mg/mL. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:

c = ((A uzorka - bst. krivulje) / nagib pravca st. krivulje)) x razrijeđenje

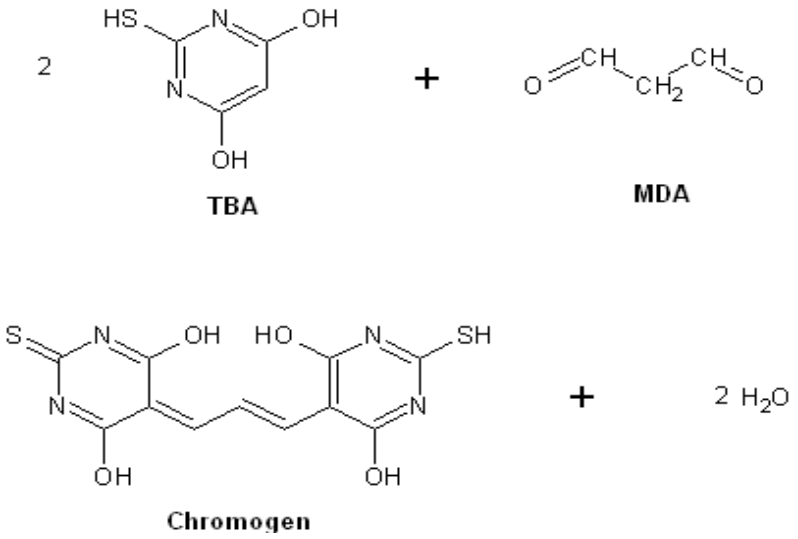
Pri čemu je:

A - apsorbancija uzorka

c – koncentracija

3.5. ODREĐIVANJE STUPNJA LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Stupanj lipidne peroksidacije određen je tiobarbituratnim testom mjerenjem koncentracije konačnog produkta lipidne peroksidacije- malondialdehida (MDA) spektrofotometrijski pri 532 nm. Metoda se temelji na derivatizaciji MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)2 kompleks. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi pri čemu nastaje crveni fluorescentni derivat MDA-(TBA)2 čija koncentracija se može izmjeriti spektrofotometrijski (Slika 16).



Slika 16. Mehanizam reakcije MDA sa TBA na kojem počiva princip određivanja koncentracije MDA. (Preuzeto sa: https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/automation-of-methods-for-determination-of-lipid-peroxidation 28. 08. 2017.)

Otopine koje su korištene:

Otopina A: 0,81 g SDS-a + 10 ml dH_2O

Otopina B: 20 ml 99.5% CH_3COOH + 2,31 ml 37% HCl (pH 3,5) + 77,69 ml dH_2O

Otopina C: 0,8 g TBA + 40 ml dH_2O + 500 µl NaOH + 59.5 ml dH_2O

Otopina D: 10 ml otopine A + 75 ml otopine B + 75 ml otopine C

Nakon pripeme otopina u eppendorf epruvetu dodano je 100 µL homogeniziranog i centrifugiranog supernatanta uzorka i 1,6 mL otopine D. Plastični stalak sa epruvetama je zatim stavljen u vodenu kupelj i inkubiran pri temperaturi od 95 °C, 60 minuta. Nakon toga uzorci su naglo ohlađeni na ledu prilikom čega su se nastale flokule slegnule na dno. Supernatant koji je dobiven centrifugiranjem na 5000 rpm/15 min, je odvojen i izmjeren je apsorbancija pri 532 nm na spektrofotometru Libra S22 (Biochrom). Ukupna koncentraciju MDA izražena je u nmol MDA po mg proteina, a izračunata je prema sljedećoj formuli:

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

Pri čemu je:

A - apsorbancija uzorka

c - koncentracija

V - volumen

ε - ekstincijski koeficijent (0,156 mM^{-1} cm^{-1})

3.6. MJERENJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID- DISMUTAZE

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

Otopine koje su korištene:

Otopina A priređena je mješanjem otopine citokroma c (29 mg citokroma c + 190 ml 50 mM PBS s 0, 1 mM EDTA) sa otopinom ksantina (3 mg ksantina + 19,74 ml NaOH) u omjeru 10:1. Ksantin je otopljen u čaši pomoću magnetne mješalice uz lagano zagrijavanje pri temperaturi od 30 do 40 °C.

Otopina B priređena je mješanjem 100 µl enzima ksantin-oksidaze i 2400 µl dH_2O. Tijekom cijelog postupka Eppendorf epruveta sa otopinom je držana na ledu omotana aluminijskom folijom radi zaštite od svjetla.

U ovoj metodi korštene su dvije slijepe probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A, apsorbancija u spektrofotometru UV-160 (Shimadzu) mjerena je na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U kivetu je dodano redom: 25 µL PBS-a, 1,45 mL otopine A i 15-30 µL otopine B. Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja mjerena je promjenu apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti podešena oko 0, 025 U/min. Nakon podešavanja aktivnosti enzima redom je dodavan određeni volumen uzorka (umjesto PBS-a u slijepoj probi) koji je odgovarao volumenu podešenog enzima.

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

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

Enzimska aktivnost SOD računa se prema formuli:

$$\text{aktivnost SOD} = 10^{((\%\text{inhibicije} + 12{,}757) / 30{,}932)}$$

Pri čemu je:

A - apsorbancija

Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

3.7. MJERENJE AKTIVNOSTI KATALAZE

Aktivnost katalaze određena je spektrofotometrijski, mjerenjem količine potrošenog H_2O_2. Pripremljena je otopinu 10 mM H_2O_2 mješanjem 99,887 ml otopine PBS-a i 113 µl 30%-tne otopine H_2O_2. U kivetu je dodano 980 µL10 mM H_2O_2,a do ukupnog volumena od 1 mL nadopunjeno je uzorkom (odgovarajućeg razrijeđenja).

Kinetika (sniženje apsorbancije kao rezultat enzimske razgradnje vodikovog peroksida) je mjerena na spekrofotometru UV-160 (Shimadzu) na 240 nm tijekom jedne minute. Razrijeđenja uzoraka je podešeno tako da dobivene vrijednosti apsorbancije budu u intervalu od -0,0025 do 0,0500. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H_2O_2 prema formuli:

$$c = (A\ uzorka\ /\ (\varepsilon\ H_2O_2\ x\ l))\ x\ razrijeđenje$$

Pri čemu je:

A - apsorbancija uzorka;

c - koncentracija;

ε - ekstincijski koeficijent (39, 4 $mM^{-1}\ cm^{-1}$)

l - predstavlja put koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm.

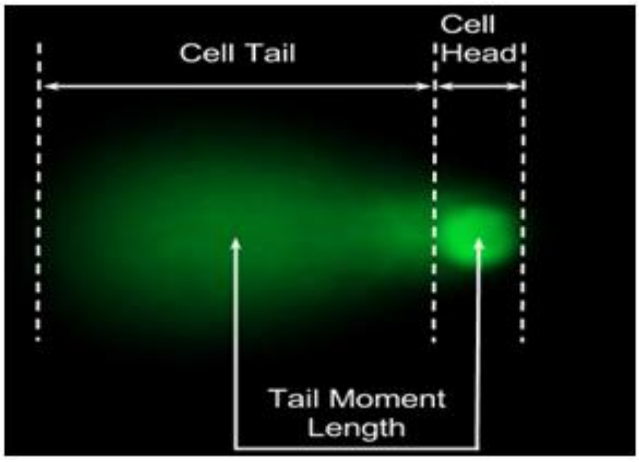
Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara µmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

3.8. KOMET TEST

Oštećenja DNA su osjetljivi markeri koji ukazuju na genotoksični potencijal pojedinih tvari. Najčešća tehnika u detektiranju lomova DNA je upravo horizontalna gel elektroforeza (komet test).

Tehnika omogućuje vizualizaciju oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama, a za provođenje testa mogu se koristiti sve stanice s jezgrom. Tipovi oštećenja molekule DNA koji se mogu mjeriti pomoću ove tehnike su: jednolančani (SSB) i dvolančani (DSB) lomovi DNA, mjesta osjetljiva na lužine: alkalno-labilna mjesta; apurinska i apirimidinska mjesta (Collins i sur., 2008). Pri alkalnim uvjetima u kojima je vrijednost pH 12,6 ili više, apurinska i apirimidinska mjesta se brzo prevode u jednolančane lomove, dok je pri pH=13 još više pospješeno izražavanje AP mjesta u obliku jednolančanih lomova (Tice i sur., 2000).

Duljina migriranja DNA u električnom polju označava količinu oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel, pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. DNA i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao "kometi" (Slika 18) (Tice i sur., 2000). Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA, a obično se mjeri od sredine ili ruba glave kometa i izražava u μm. Intenzitet repa označava postotak DNA koji je migrirao u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu (Collins i sur., 2008).



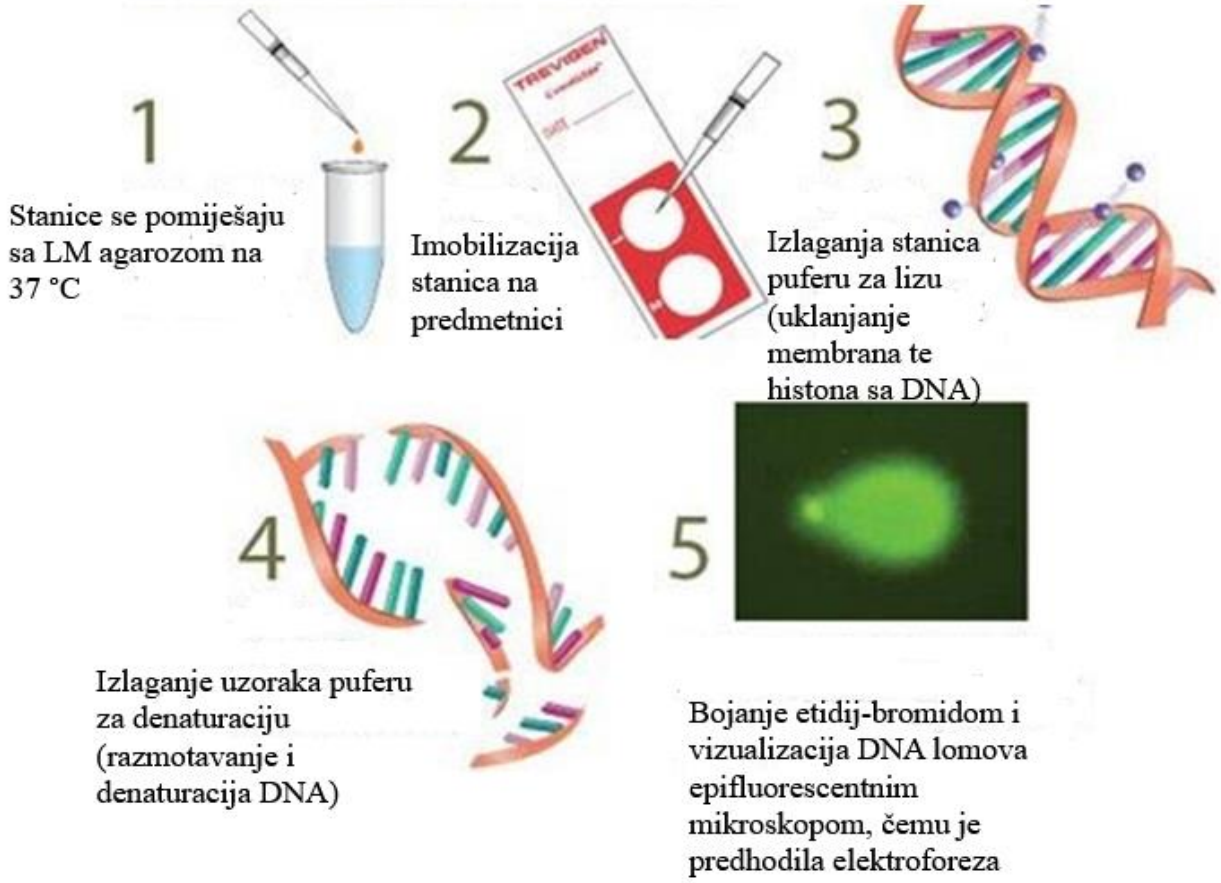
Slika 18. Prikaz izgleda „komete“ i najbitnijih parametara koji se mjere programom.
(preuzeto sa: http://blog.biotek.com/2016/01/ 29.8.2017.)

U procjeni oštećenja DNA korišten je alkalni komet test. Stakalca su pripremljena na slijedeći način: prije samog „uklapanja“ stanica pripremljena je 1% agaroza koja je mikropipetom nakapavna na brušena predmetna stakalca koja su zatim pokrivena pokrovnicom. Nakon polimerizacije pokrovnice su skinute te je nakapana 0,6 % agaroza. Stakalca sa agarozom su ponovno pokrivena pokrovnicom i ostavljena da se polimeriziraju tijekom 10 minuta na hladnoj podlozi (ledene ploče). Ovakav gel služi kao podloga na koju će se nanijeti uzorak. Nakon polimerizacije i skidanja pokrovnica, nakapan je sloj gela koji se sastojao od 100 μL 0,5 %-tne agaroze pomiješane s uzorkom (10 μl).

Za izradu preparata korišteno je 10 μL suspenzije stanica jetre, mozga i bubrega. Nakon polimerizacije preparati su uronjeni u otopinu za lizu tijekom dva sata. Pufer za lizu vrijednosti pH 10 pripremljen je neposredno prije upotrebe iz matične otopine za lizu [NaCl (Kemika), Na-laurilsarkozin (Sigma-Aldrich, SAD), Tris-HCl (Sigma-Aldrich)], uz dodatak 10 %-tne otopine DMSO (Kemika) i detergenta Tritona X-100 (Sigma-Aldrich).

Nakon lize, preparati su prebačeni u pufer za denaturaciju. Denaturacija za alkalni komet test provedena je u puferu s pH 13 [NaOH (Kemika) i Na_2EDTA (Sigma-Aldrich)] tijekom 10 minuta. Nakon denaturacije, preparati su prenijeti u kadicu za horizontalnu elektroforezu koja je provedena pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, te je trajala 20 minuta.

Nakon elektroforeze, preparati su isprani tris puferom (pH 7) u tri navrata. Nakon čega su dehidrirani uranjanjem u apsolutni etanolni alkohol (96%) tijekom sedam minuta te osušeni na sobnoj temperaturi. Preparati su zatim pohranjeni na tamnom i hladnom mjestu do analize. Kako bi analizirali komete preparati su obojani s 100 μL etidij bromida (20 μg/mL) (Sigma-Aldrich). Analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa (Olympus, Japan). Mikroskop je preko kamere visoke rezolucije povezan s računalom (Slika 17). Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK). Analizirano je 50 kometa po preparatu (200 kometa po skupini) pri čemu su određeni parametri: dužina repa kometa izražena u mikrometrima (TL), % DNA u repu (TI) te repni moment (TM).



Slika 17. Pojednostavljen prikaz principa djelovanja komet testa.
(Preuzeto i prilagođeno sa: http://www.amsbio.com/comet-assays.aspx 29.8.2017.)

3.9. STATISTIKA

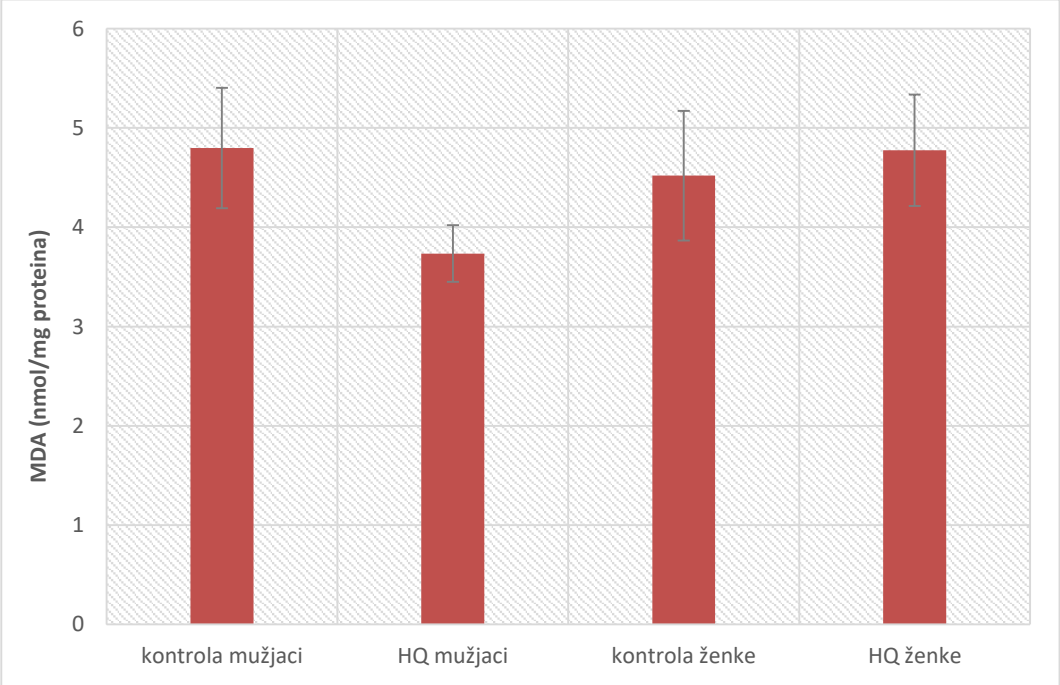
Analiza rezultata izvršena je pomoću računalnog programa STATISTICA 13.1 (StatSoft, Tulsa, SAD). Za obradu rezultata korištena je deskriptivna statistika. Statističke značajnosti u analizi aktivnosti SOD i katalaze te koncentracije MDA utvrđene su t-testom. Rezultati komet testa analizirani su uz primjenu analize varijance (ANOVA) sa post hoc Scheffeovom modifikacijom. Za prag statističke značajnosti određen je $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA

Stupanj lipidne peroksidacije određen je mjerenjem koncentracije malondialdehida (MDA) u homogeniziranim uzorcima jetre, bubrega i mozga šakora oba spola tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) i odgovarajućih kontrolnih skupina.

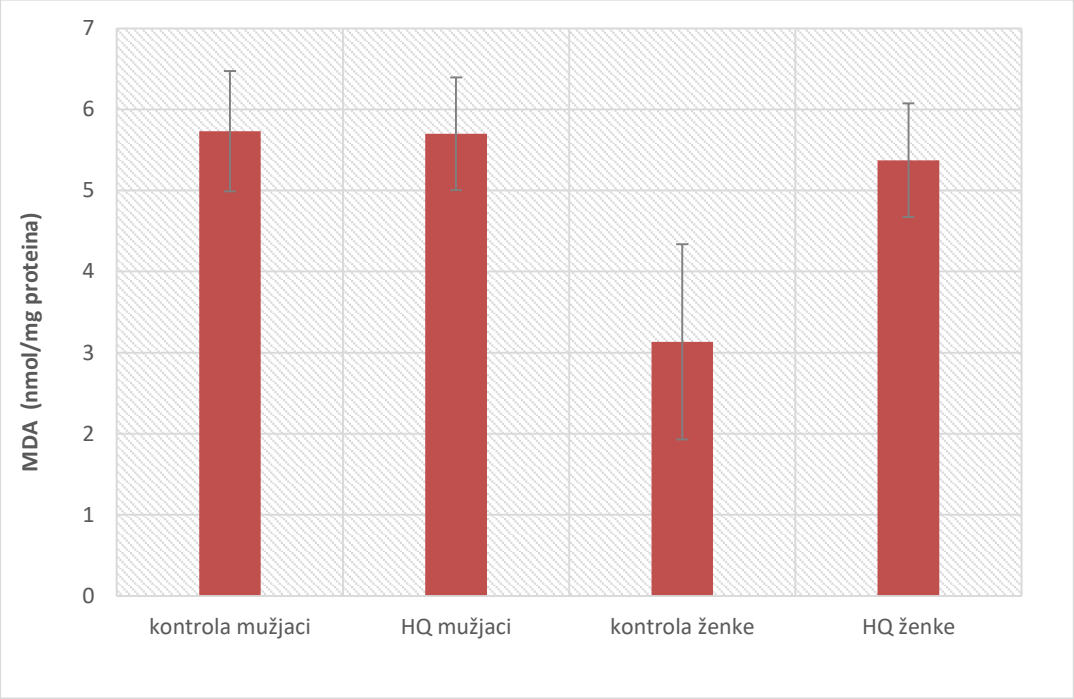
Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorku bubrega ukazuju da srednje vrijednosti koncentracije MDA kako kod mužjaka tako i kod ženki štakora tretiranih hidrokinonom nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. U mužjaka je uočena blago smanjena srednja vrijednost MDA (3,73 ± 0,28) u odnosu na kontrolu (4,80 ± 0,60) dok je kod ženki srednja vrijednost MDA bila blago povećana (4,78 ± 0,56) u odnosu na kontrolu (4,52 ± 0,65) (Slika 19).



Slika 19. Koncentracija malondialdehida (MDA) (srednja vrijednost ± SD) u uzorcima bubrega štakora soja Lewis oralno tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ - hidrokinon

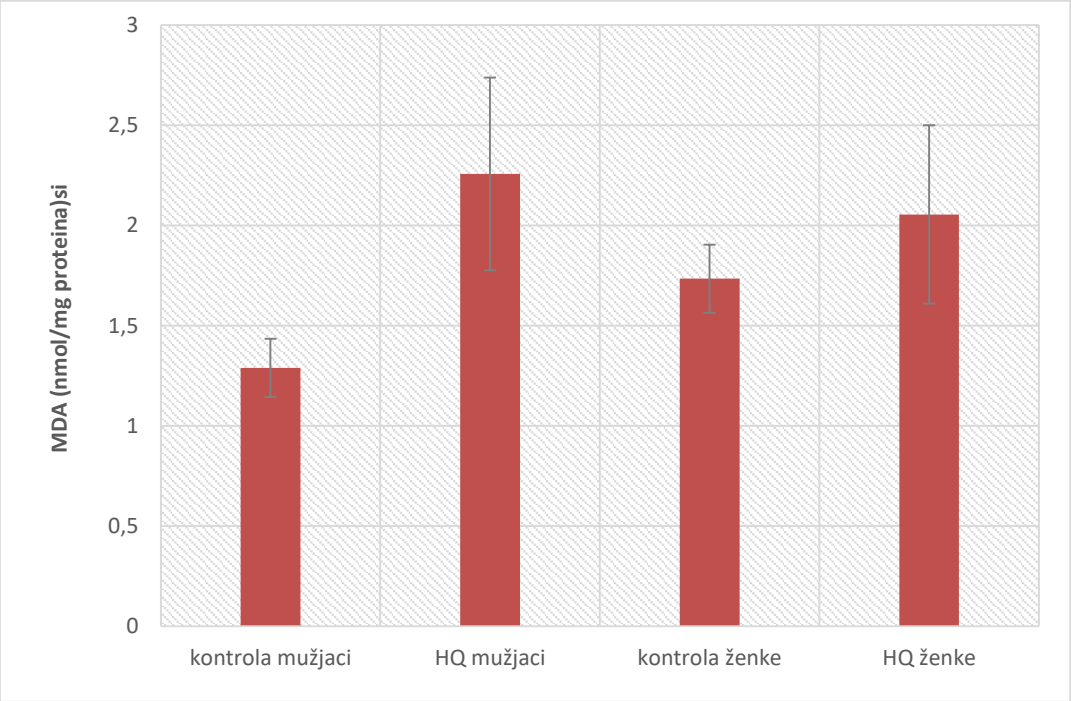
Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorku jetre ukazuju da srednje vrijednosti koncentracije MDA kako kod mužjaka tako i kod ženki štakora tretiranih hidrokinonom nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. U mužjaka je uočena lagano smanjena srednja vrijednost MDA (5,69 ± 0,69) u odnosu na kontrolu (5,73 ± 0,74) dok je kod ženki srednja vrijednost MDA bila povećana (5,37 ± 0,70) u odnosu na kontrolu (3,13 ± 1,20) (Slika 20).



Slika 20. Koncentracija malondialdehida (MDA) (srednja vrijednost ± SD) u uzorcima jetre štakora soja Lewis oralno tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ - hidrokinon

U uzorku mozga izmjerene srednje vrijednosti koncentracije MDA u mužjaka je pokazuju povećanu srednja vrijednost MDA (2,26 ± 0,48) u odnosu na kontrolu (1,29 ± 0,14), isto povećanje srednje vrijednosti MDA uočeno je i kod ženki (2,05 ± 0,44) u odnosu na kontrolnu skupinu (1,73 ± 0,16). Međutim, uočene razlike ne ukazuju na statistički značajno različite ($P < 0,05$) vrijednosti u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. (Slika 21).

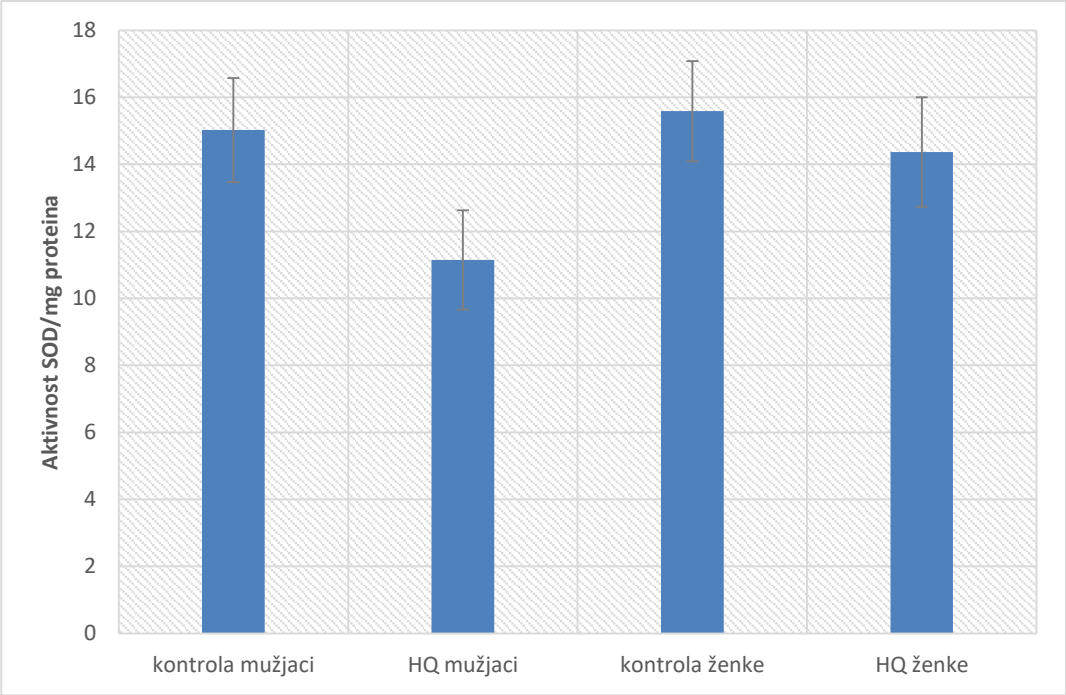


Slika 21. Koncentracija malondialdehida (MDA) (srednja vrijednost ± SD) u uzorcima jetre štakora soja Lewis oralno tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ – hidrokinon

4.2. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE

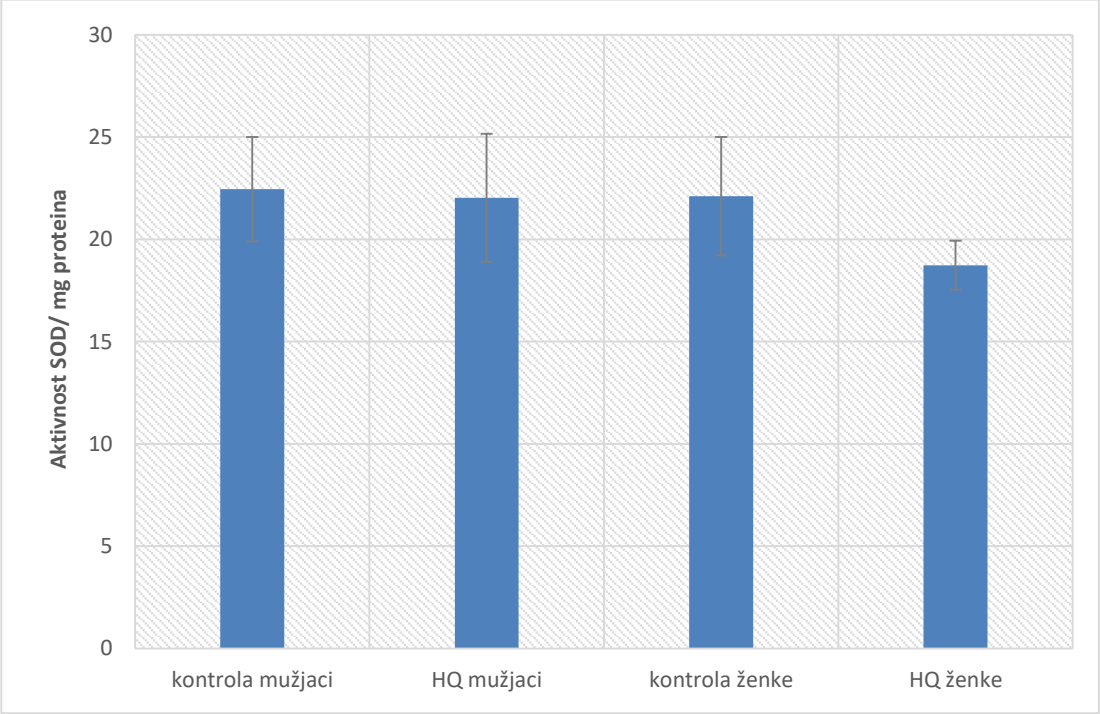
Rezultati mjerenja aktivnosti SOD u uzorku bubrega ukazuju na smanjenu aktivnost SOD (11,15 ± 1,48) u mužjaka u odnosu na kontrolu (15,02 ± 1,55). Lagano smanjenje aktivnosti SOD zabilježeno je i kod ženki štakora (14,36 ± 1,63) u odnosu na kontrolu (15,59 ± 1,49). Srednje vrijednosti aktivnosti SOD kako kod mužjaka tako i kod ženki štakora tretiranih hidrokinonom nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (Slika 22).



Slika 22. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) (srednja vrijednost ± SD) u uzorku bubrega štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ – hidrokinon

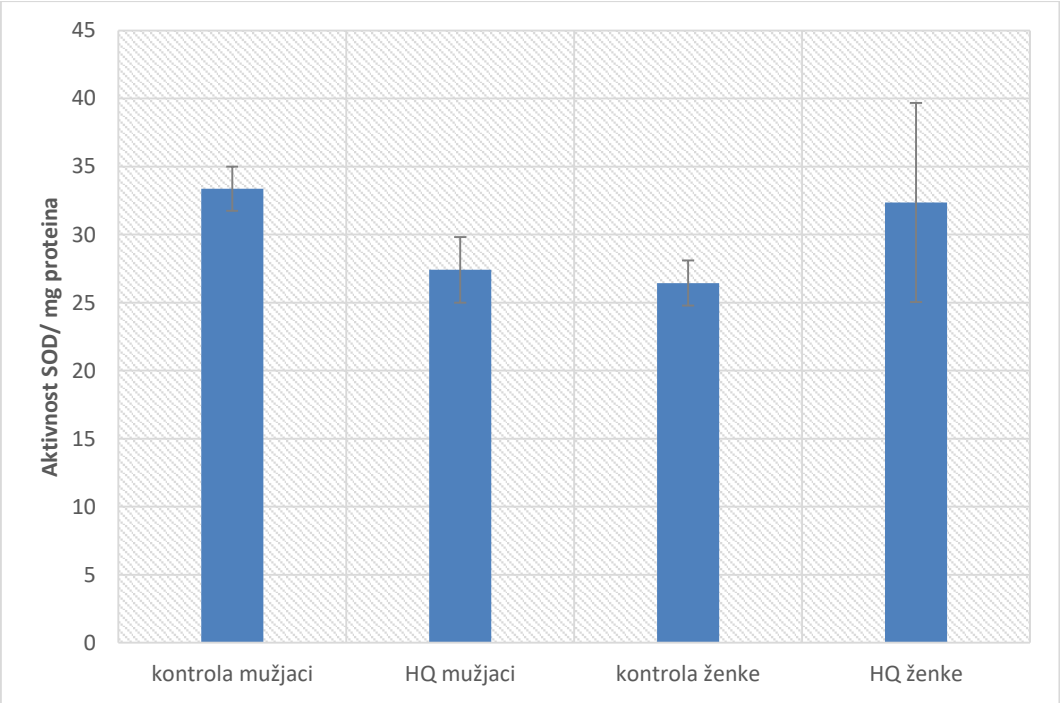
Također, rezultati mjerenja aktivnosti SOD u uzorku jetre ukazuju da srednje vrijednosti aktivnosti SOD i kod mužjaka i kod ženki štakora tretiranih hidrokinonom nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. U mužjaka je uočena neznatno smanjena aktivnost SOD (22,04 ± 3,12) u odnosu na kontrolnu skupinu (22,46 ± 2,54). Nešto veće smanjenje aktivnosti SOD zabilježeno je i kod ženki štakora (18,73 ± 1,19) u odnosu na kontrolu (22,11 ± 2,89) (Slika 23).



Slika 23. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) (srednja vrijednost ± SD) u uzorku jetre štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ – hidrokinon

U mužjaka tretiranih štakora je uočena smanjena aktivnost SOD u uzorku mozga (27,41 ± 2,40) u odnosu na kontrolu (33,37 ± 1,63), dok je kod ženki uočena povećana aktivnost SOD (32,36 ± 7,31) u odnosu na kontrolu (26,43 ± 1,65) (Slika 24). Nije uočena statistički značajna razlika ($P < 0,05$) srednje vrijednosti aktivnosti SOD kod mužjaka i ženki štakora tretiranih hidrokinonom u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine.

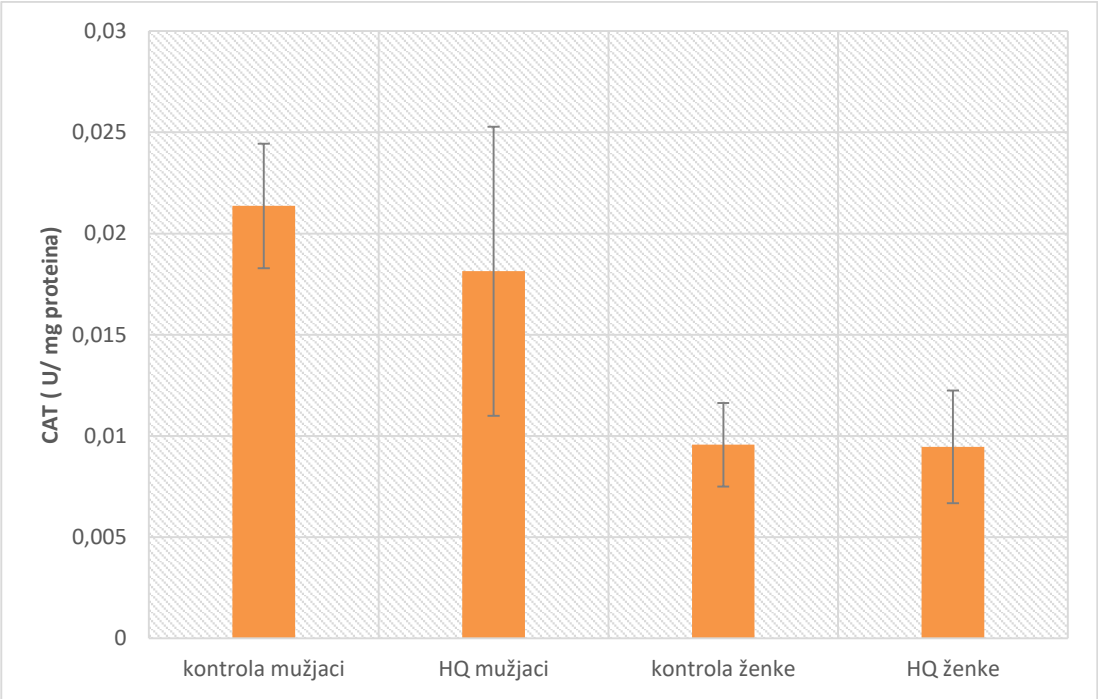


Slika 24. Aktivnost superoksid dismutaze (srednja vrijednost ± SD) u uzorku mozga štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ – hidrokinon

4.3. AKTIVNOST KATALAZE

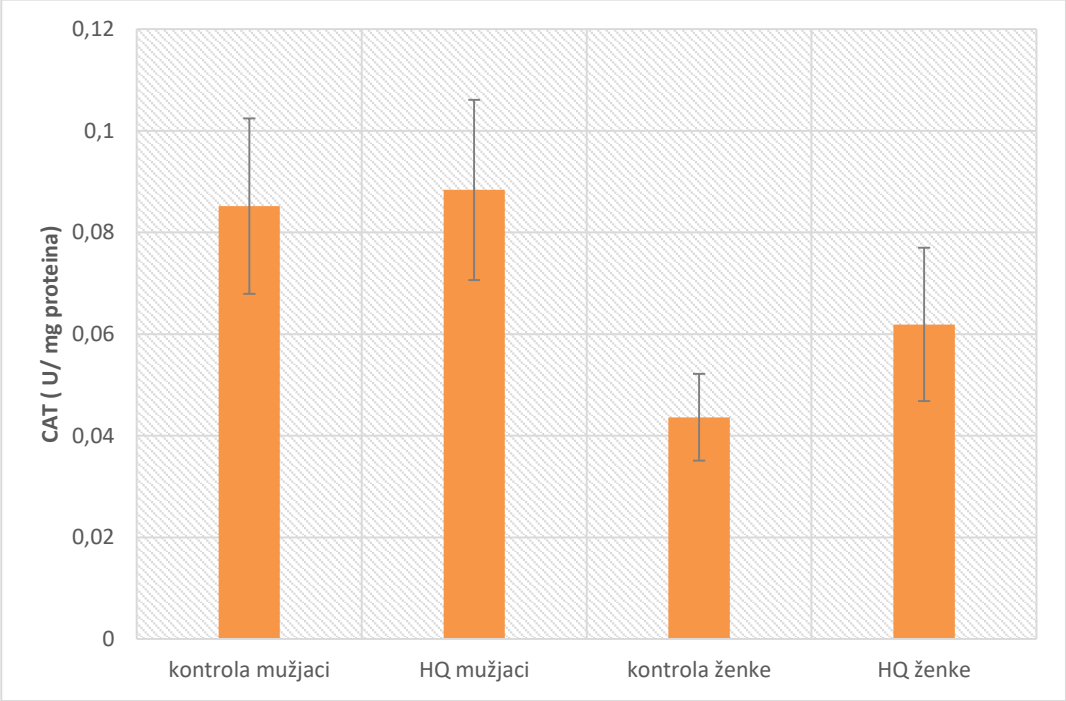
Rezultati određivanja aktivnosti katalaze u uzorku bubrega mužjaka i ženki tretiranih hidrokinonom ne pokazuju statistički značajnu ($P < 0,05$) razliku u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Kod mužjaka je uočena lagano smanjena aktivnost katalaze (0,018 ± 0,007) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,021 ± 0,003), dok ženke pokazuju jedva zamjetno smanjene aktvnosti katalaze (0,009 ± 0,002) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,010 ± 0,002) (Slika 25).



Slika 25. Aktivnost katalaze (CAT) (srednja vrijednost ± SD) u uzorku bubrega štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ - hidrokinon

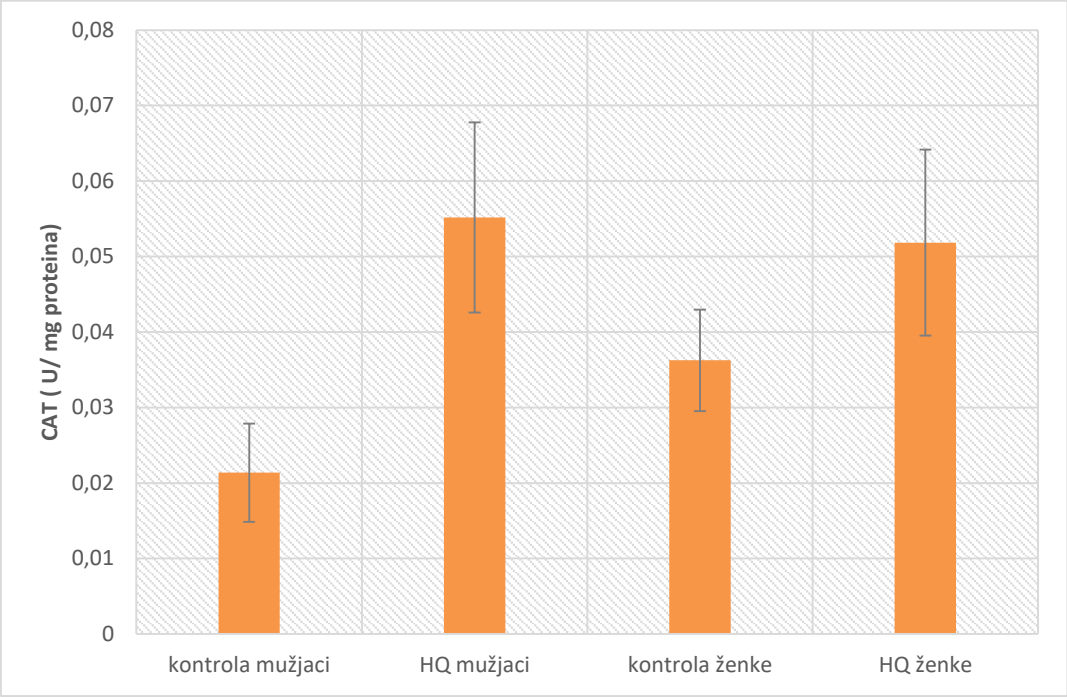
Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze u uzorku jetre ukazuju da srednje vrijednosti aktivnosti katalaze kako kod mužjaka tako i kod ženki štakora tretiranih hidrokinonom nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. U mužjaka je uočena lagano povećana aktivnost katalaze (0,088 ± 0,01) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,085 ± 0,017). Povećana aktivnost katalaze zabilježeno je i kod ženki štakora (0,061 ± 0,015) u odnosu na kontrolu (0,043 ± 0,008) (Slika 26).



Slika 26. Aktivnost katalaze (CAT) (srednja vrijednost ± SD) u uzorku jetre štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ – hidrokinon

Također, u uzorku mozga izmjerene srednje vrijednosti aktivnosti katalaze kod mužjaka i ženki štakora tretiranih hidrokinonom, također ne ukazuju na statistički značajno različite ($P < 0,05$) vrijednosti u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. U mužjaka tretiranih štakora je uočena povećana aktivnost katalaze (0,055 ± 0,01) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,021 ± 0,006). Kod ženki je također uočena povećana aktivost katalaze (0,012 ± 0,012) u odnosu na kontrolu (0,006 ± 0,006) (Slika 27).



Slika 27. Aktivnost katalaze (CAT) (srednja vrijednost ± SD) u uzorku mozga štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

HQ - hidrokinon

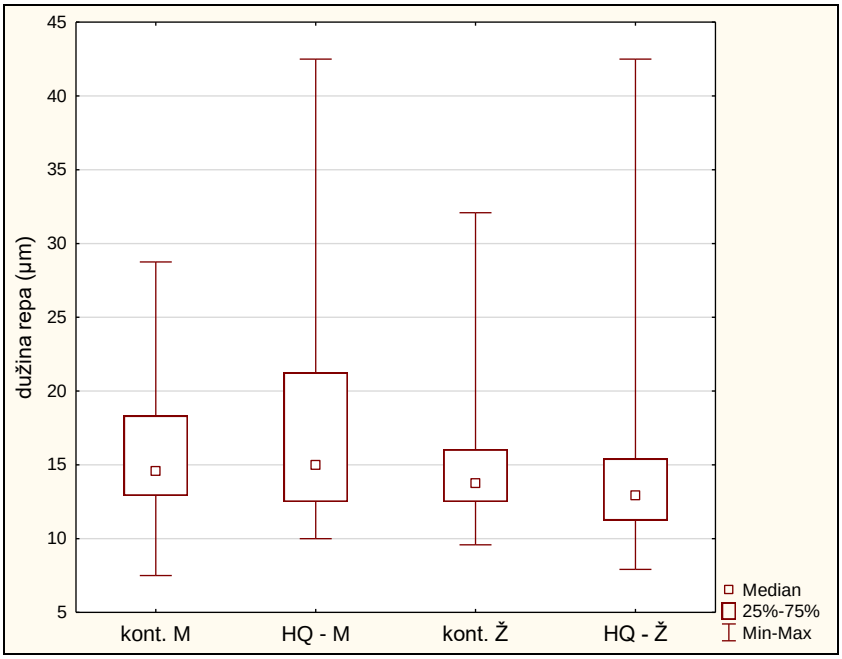
4.4. STUPANJ PRIMARNIH OŠTEĆENJA DNA

Promatrana su oštećenja DNA u stanicama bubrega, jetre i mozga štakora nakon izlaganja hidrokinonu (200 mg/kg) u periodu od 28 dana. Tri parametra kometa (dužina repa - TL; intezitet repa - TI; repni moment - TM) analizirana su pomoću deskriptivne statistike. Dobivene su srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom, minimalne i maksimalne vrijednosti te medijan. Svi izmjereni parametri su statistički obrađeni uz primjenu analize varijance (ANOVA) sa post hoc Scheffeovom modifikacijom a nivo značajnosti postavljen je na nivo $P<0,05$.

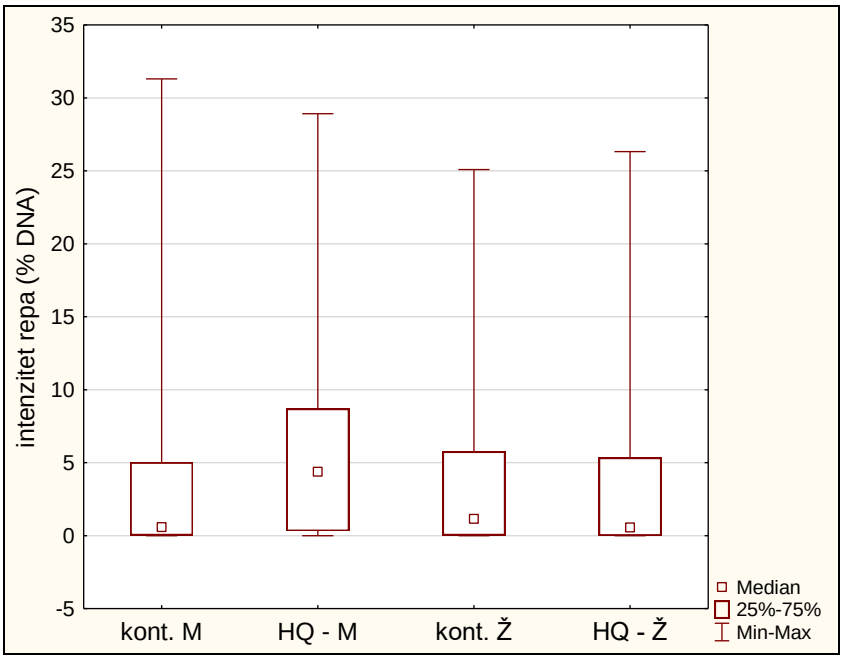
4.4.1. Oštećenje DNA u stanicama bubrega nakon izlaganja hidrokinonu

U stanicama bubrega skupine mužjaka tretiranih hidrokinonom parametar TL (17,56 ± 0,51) pokazuje povišenu ali ne i statistički značajnu vrijednost u odnosu na kontrolu (16,02 ± 0,31) (Slika 28, A). Dok su vrijednosti parametara TI u repu (5,99 ± 0,47) statistički značajno povišene ($P < 0, 05$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 28, B). Vrijednosti parametara TM (0,55 ± 0,05) statistički su značajno ($P < 0,05$) povišene u odnosu na kontrolnu skupinu (0,29 ± 0,03) (Tablica 2).

U stanicama bubrega skupine ženki tretiranih hidrokinonom parametar TL (14,15 ± 0,31) sa druge strane, pokazuje smanjenu ali ne i statistički značajnu vrijednost u odnosu na kontrolu (14,89 ± 0,28) (Slika 28, A). Također, vrijednosti parametara TI u repu (3,69 ± 0,40) pokazuju smanjenu ali ne i statistički značajno različitu vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu (3,91± 0,40) (Slika 28, B). Vrijednosti parametara TM (0,28 ± 0,03) smanjene su u odnosu na kontrolnu skupinu (0,30 ± 0,03), također bez statistički značajne razlike (Tablica 2).



A



B

Slika 28. Vrijednosti dužine repa (A) i intenziteta repa (B) komet testa izmjerene na stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. 25%-75% - raspon; Min-Max – minimalna i maksimalna vrijednost; kont. M - kontrola mužjaci; HQ-M - hidrokinon mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; HQ-Ž - hidrokinon ženke

Tablica 2. Vrijednosti parametra repnog momenta komet testa na stanicama bubrega kod hidrokinonom (200 mg/kg) tretiranih i kontrolnih skupina štakora.

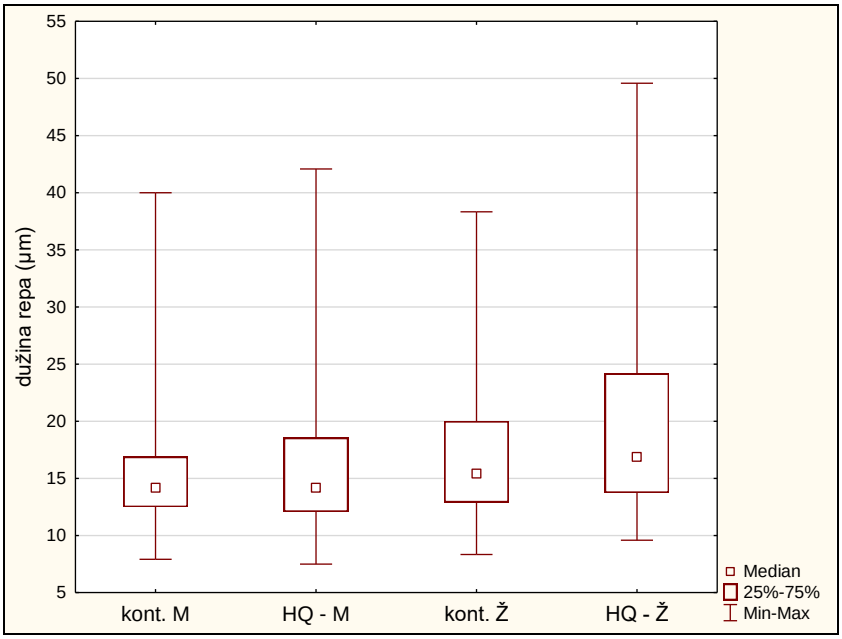
REPNI MOMENT					
	Srednja vrijednost	Standardna pogreška	Median	Min	Max
kont. M	0,29	0,03	0,05	0,00	2,53
HQ- M	0,54*	0,05	0,38	0,00	3,00
kont. Ž	0,30	0,03	0,10	0,00	2,11
HQ- Ž	0,28	0,03	0,03	0,00	1,92

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji).
kont. M- kontrola mužjaci; HQ-M - hidrokinon mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; HQ-Ž - hidrokinon ženke;
Min- minimum; Max - maksimum
* Statistički značajno u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($P < 0,05$)

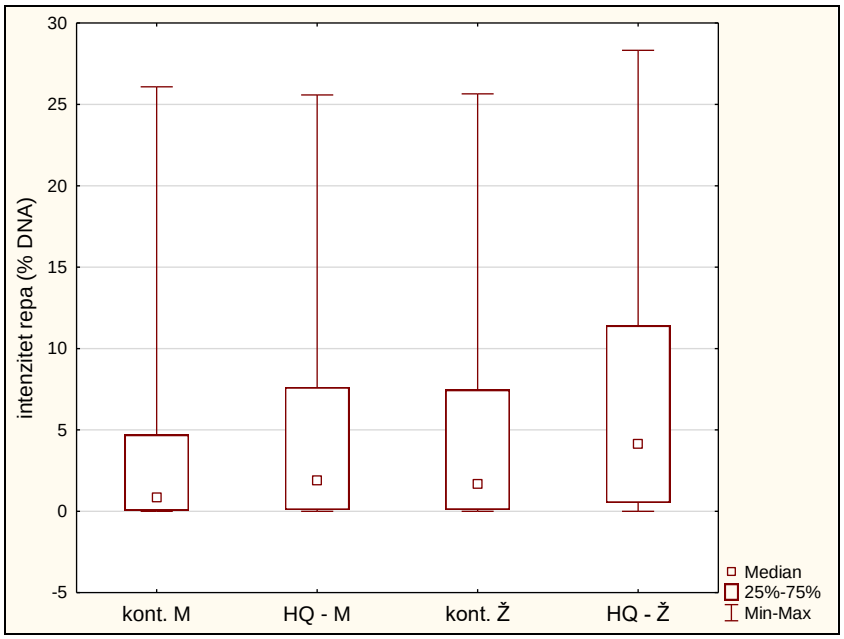
4.4.2. Oštećenje DNA u stanicama jetre nakon izlaganja hidrokinonu

U stanicama jetre skupine mužjaka tretiranih hidrokinonom parametar TL (16,33 ± 0,46) pokazuje povišenu ali ne i statistički značajnu vrijednost u odnosu na kontrolu (15,84 ± 0,39) (Slika 29, A). Također, vrijednosti parametara TI u repu (4,69 ± 0,42) pokazuje povišenu vrijednost bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (3,49 ± 0,39) (Slika 29, B). Vrijednosti parametara TM (0,40 ± 0,04), kao i predhodna dva parametra pokazuje povišenu ali ne statistički značajnu vrijednost u odnosu na kontrolu (0,29 ± 0,03) (Tablica 3).

Parametar TL (19,92 ± 0,56) u stanicama jetre skupine ženki tretiranih hidrokinonom pokazuje povišenu i statistički značajnu ($P < 0,05$) vrijednost u odnosu na kontrolu (17,02 ± 0,41) (Slika 29, A). Također, vrijednosti parametara TI u repu (7,00 ± 0,53) pokazuju statistički značajno povišenu ($P < 0,05$) vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu (5,02 ± 0,48) (Slika 29, B). Vrijednosti parametara TM (0,60 ± 0,05) povišene su u odnosu na kontrolnu skupinu (0,42 ± 0,04), također sa statistički značajnom razlikom ($P < 0,05$) (Tablica 3).



A



B

Slika 29. Vrijednosti dužine repa (A) i intenziteta repa (B) komet testa izmjerene na stanicama jetre mužjaka i ženki štakora tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. 25%-75% - raspon; Min-Max – minimalna i maksimalna vrijednost;
kont. M - kontrola mužjaci; HQ-M - hidrokinon mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; HQ-Ž - hidrokinon ženke

Tablica 3. Vrijednosti parametra repnog momenta komet testa na stanicama bubrega kod hidrokinonom (200 mg/kg) tretiranih i kontrolnih skupina štakora.

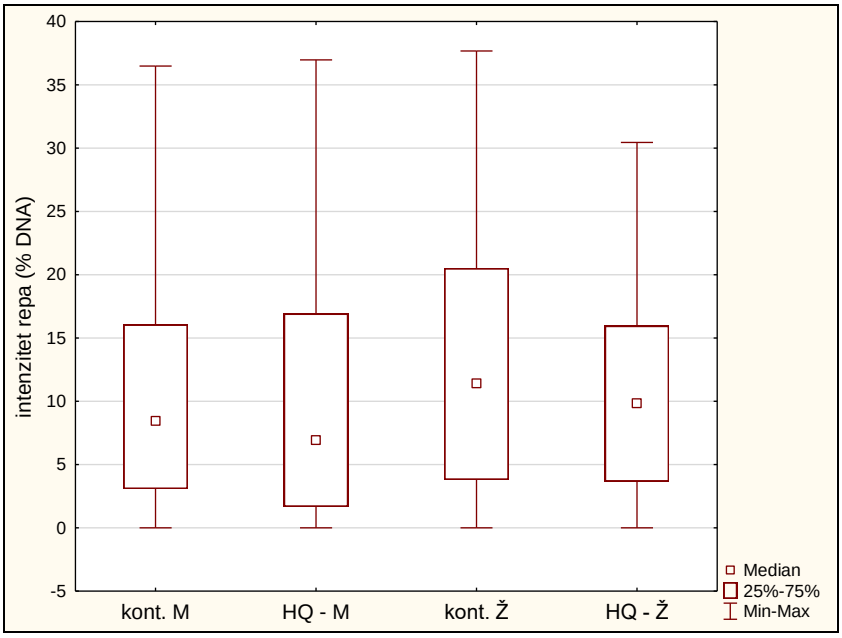
REPNI MOMENT					
	Srednja vrijednost	Standardna pogreška	Median	Min	Max
kont. M	0,29	0,03	0,06	0,00	2,57
HQ- M	0,40	0,04	0,17	0,00	2,71
kont. Ž	0,42	0,04	0,15	0,00	2,33
HQ- Ž	0,60 *	0,05	0,37	0,00	2,50

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji).
kont. M- kontrola mužjaci; HQ-M - hidrokinon mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; HQ-Ž - hidrokinon ženke
Min – minimum; Max – maksimum
* Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)

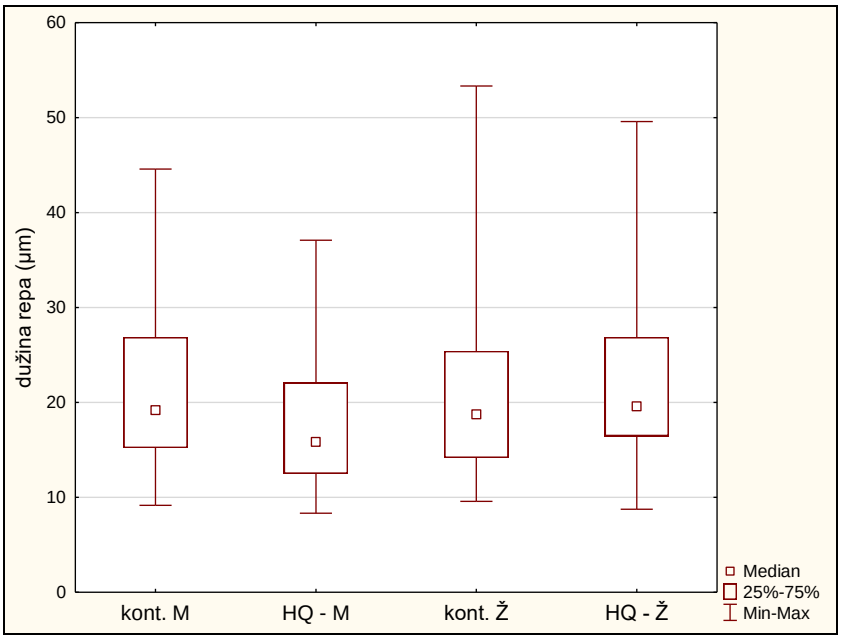
4.4.3. Oštećenje DNA u stanicama mozga nakon izlaganja hidrokinonu

U stanicama mozga skupine mužjaka tretiranih hidrokinonom parametar TL (17,80 ± 0,74) pokazuje statistički značajno smanjenu ($P < 0,05$) vrijednost u odnosu na kontrolu (21,15 ± 0,52) (Slika 30, A). Dok su vrijednosti parametara TI u repu (10,03 ± 0,67) smanjene ali ne i statistički značajne u odnosu na kontrolnu skupinu (10,10 ± 0,67) (Slika 30, B). Vrijednosti parametara TM (0,90 ± 0,06) smanjene su u odnosu na kontrolnu skupinu (0,93 ± 0,05), također bez statistički značajne razlike (Tablica 4).

Parametar TL (21,71 ± 0,52) u stanicama jetre skupine ženki tretiranih hidrokinonom pokazuje povišenu ali ne i statistički značajnu vrijednost u odnosu na kontrolu (20,65 ± 0,58) (Slika 30, A). Dok vrijednosti parametara TI u repu (10,59 ± 0,55) pokazuju smanjenu ali ne i statistički značajno različitu vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu (12,84 ± 0,70) (Slika 30, B). Vrijednosti parametara TM (1,03 ± 0,05) smanjene su u odnosu na kontrolnu skupinu (1,17 ± 0,06), također bez statistički značajne razlike (Tablica 4).



A



B

Slika 30. Vrijednosti dužine repa (A), intenziteta repa (B) komet testa izmjerene na stanicama mozga mužjaka i ženki štakora tretiranih hidrokinonom (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 kometa po svakoj pokusnoj životinji). Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. 25%-75% - raspon; Min-Max – minimalna i maksimalna vrijednost; kont. M - kontrola mužjaci; HQ-M - hidrokinon mužjaci; kont. Ž - kontrola ženke; HQ-Ž - hidrokinon ženke

Tablica 4. Vrijednosti parametra repnog momenta komet testa na stanicama mozga kod hidrokinonom (200 mg/kg) tretiranih i kontrolnih skupina štakora.

REPNI MOMENT					
	Srednja vrijednost	Standardna pogreška	Median	Min	Max
kont. M	0,93	0,05	0,74	0,00	3,44
HQ- M	0,90	0,06	0,65	0,00	3,22
kont. Ž	1,17	0,06	1,03	0,00	4,99
HQ- Ž	1,03	0,05	0,97	0,00	3,28

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

5. RASPRAVA

Hidrokinon se već preko 40 godina koristi kao kozmetički preparat pri posvjetljivanju kože,te je njegova uporaba sve učestalija (Nordlund i sur., 2006; Topping i sur., 2007). Također poznato je da je tijekom liječenja urinoinfekcija kod žena upravo hidrokinon odgovoran za antimikrobno djelovanje u urinarnom traktu (Schindler i sur., 2002). No, sa druge strane brojna istraživanja su pokazala njegovu genototoksičnost i nefrotoksičnot, kao i visoki kancerogeni potencijal njegovog metabolita benzokinona (Andreoli i sur., 1999; English i sur., 1994; Roza i sur., 2003). Stoga ne čudi pojava zabrinutosti u sigurnost njegovog korištenja.

Hidrokinon prolazi kroz opsežne transformacije u jetri, odakle potencijalno još toksičniji produkti odlaze u bubrege te se izlučuju mokraćom (English i sur., 1994). Upravo zbog toga što su navedeni organi najizloženiji djelovanju hidrokinona, te zbog kontradiktornih ranijih literaturnih navoda, ovaj eksperiment smo i proveli na organima jetre, bubrega i mozga sa ciljem procjene potencijalnog prooksidacijskog i genotoksičnog djelovanja hidrokinona.

Djelovanje hidrokinona na stupanj lipidne peroksidacije na tkivo bubrega i jetre polučilo je dvojake rezultate s obzirom na spol štakora (kod mužjaka je uočeno lagano smanjenje koncentracije MDA, dok je kod ženki uočena povećana koncentracija MDA), ali niti jedan od navedenih organa nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne skupine. Ipak, s obzirom na prijašnja istraživanja na staničnoj kulturi *Saccharomyces cerevisiae* koje su proveli Raj i Nachiappan (2016) da se zaključiti da hidrokinon u određenim uvjetima može povećati stupanj lipidne peroksidacije.

Rezultati istraživanja na tkivu mozga također nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne skupine, ali je zabilježeno značajno povećanje koncentracije MDA u tretiranim skupinama oba spola u odnosu na kontrolu. Mozak koristi petinu ukupnog kisika cijelog organizma, a vrlo je osjetljiv na citotoksično djelovanje ROS-a (Ames i sur., 1993). Stanice mozga većinu energije stvaraju u respiratornom lancu unutar mitohondrija, a pri tome se oslobađaju superoksidni anion i vodikov peroksid. U tkivu mozga smanjena je aktivnost SOD, katalaze i GSH pa se $\cdot O2^-$ i H_2O_2 ne mogu brzo katalizirati kao što je to moguće u drugim tkivima i organima (Pellegrini-Giampietro, 1994). Lipidi staničnih membrana tkiva mozga bogati su s PUFA, što uz povećanu količinu željeza (posebice u globusu palidusu i substanciji nigri) pogoduje nastanku lipidne peroksidacije (Aruoma, 1998). To je u skladu sa povišenim vrijednostima koncentracije MDA u stanicama mozga koje su utvrđene. Također iz navedenog se može zaključiti da izmjerene vrijednosti aktivnosti enzima oksidativnog stresa nisu bile dovoljno visoke da ponište djelovanje hidrokinona i njegovih metabolita.

Učinak hidrokinona na nivo oksidativnog stresa praćen je i mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaze i katalaze. Mjerenja koja su dobivena pokazala su kontradiktorne rezultate, ali također bez statistički značajne razlike za oba enzima. Naime, superoksid dismutaza imala je smanjenu aktivnost u tkivu bubrega, jetre i mozga štakora oba spola nakon tretmana hidrokinonom. Dok je katalaza pokazala povećanu aktivnost nakon tretmana hidrokinonom u jetri i mozgu oba spola štakora u odnosu na kontrolne skupine. Što se može dvojako tumačiti različitim ciljevima djelovanja hidrokinona u organizmu. Naime hidrokinon može djelovati direktno na enzim inhibirajući ga (Rao i Snyder, 1995) ili potičući njegovu aktivaciju, ili može djelovati kao oksidans stimulirajući produkciju ROS-a, što su pokazali Raj i Nachiappan (2016).

Oksidativna 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 metala sa promjenjivom valencijom i prisutnom molekulom kisika (Hagerman i sur., 1998), što se sve treba uzeti u obzir prilikom provedbe eksperimenta i tumačenja rezultata.

Zanimljivo je istraživanje koje povezuje mišićnu (tjelesnu aktivnost) sa stupnjem produkcije ROS-a. Naime dokazana je veća produkcija ROS-a u mitohondrijima kod štakora sa smanjenom tjelesnom aktivnosti ili nakon imobilizacije. Što se uzročno može povezati sa protonskim gradijentom koji je ovisan o dostupnosti ADP-a čija je koncentracija tada smanjena (Kondo i sur., 1991). Uslijed brzog metabolizma i oksidacije u jetri, vrlo je bitan i put unosa hidrokinona u organizam. Nakon enzimski posredovane aktivacije citokromom P-450, prostaglandin H sintetazom i mijeloperoksidazom ili autooksidacije, hidrokinon može djelovati toksično (Blaut i sur., 2006).

Uloga slobodnih radikala u kancerogenezi usko je povezana sa oksidativnim oštećenjem DNA (mutacije, delecije, amplifikacije, aktivacija protonkogena, supresija antionkogena) i stvaranjem DNA produkta, 8-okso-2'-deoksiguanozina, koji je veoma mutagen (Hattori i sur., 1997).

Rezultati istraživanja primarnih oštećenja DNA na stanicama bubrega pokazali su da su izmjerene razine oštećenja za parametre % DNA u repu (TI) kao i repnog momenta (TM), nakon izlaganja hidrokinonu statistički značajno povišene kod mužjaka štakora. Uočeno je u skladu sa ranijim zapažanjima istraživača koja kažu da su na utjecaj hidrokinona dosta osjetljivi

bubrezi (English i sur., 1994, Hard i sur., 1997). Dokazano je da hidrokinon potiče nastanak benignih tumora bubrega i jetre, kao i nastanak mononuklearne leukemije, zbog čega je klasificiran kao leukemogen za ljude (Roza i sur., 2003; Whysner i sur., 1995). Kako nema statistički značajne razlike ni u jednom od parametara za skupinu ženki i kontrolnu skupinu, rezultati upućuju na razlike u osjetljivosti stanica bubrega s obzirom na spol.

Stupanj primarnih oštećenja DNA u stanicama jetre pokazao je da su ženke nešto osjetljivije od mužjaka, naime samo skupina ženki je pokazala statistički značajno povišene vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu, za sva tri parametra izmjerena komet testom (TL, TI, i TM). Takvo zapažanje u skladu je sa otkrićem Justo-a i suradnika (2005) da ženke štakora u hepatocitima imaju veće mitohondrije sa većim sadržajem proteina u odnosu na mužjake, samim tim dolazi i do veće produkcije ROS-a koje dovode do oštećenja. Također, oštećenja DNA koja su izmjerena u stanicama jetre su očekivana s obzirom na mehanizam djelovanja hidrokinona i na njegov metabolizam u jetri (DeCaprio, 1999). Bez obzira na navedene razlike između spolova i statističku značajnost, sve komet testom izmjerene razine oštećenja su povišene kod tretiranih skupina u odnosu na kontrolne skupine, što upućuje na potencijalnu genotoksičnost hidrokinona na tkivo jetre.

Nakon primjene hidrokinona u trajanju od 28 dana stanice mozga pokazale su različitu raspodjelu oštećenja DNA, te su rezultati pokazali određeno odstupanje od druga dva organa (bubreg i jetra). Naime za parametar TL komet testa mužjaci pokazuju statistički značajno smanjenje oštećenja DNA, dok ženke pokazuju povećanje vrijednosti, ali bez statističke značajnosti s obzirom na kontrolnu skupinu. Parametri TI i repni moment TM nisu pokazali statistički značajnu razliku s obzirom na kontrolne skupine kod oba spola. Opaženo odstupanje može se tumačiti sposobnošću velikih koncentracija hidrokinona, koje su korištene u ovom eksperimentu, da u molekuli DNA stvaraju veliki broj adukata, unutar i međulančanih veza, odnosno veza između DNA i proteina (Fung i sur., 2004). Što otežava pravilno provođenje komet testa, odnosno onemogućava normalnu denaturaciju DNA u uvjetima u kojima je izvođen komet test, dosljedno dovodeći do lažno nižih vrijednosti svih parametara komet testa. Iz čega se dalje mogu donijeti pogrešni zaključci o utjecaju spoja na stupanj primarnih oštećenja DNA.

Ljudi su svakodnevno izloženi hidrokinonu, u najvećoj mjeri kroz hranu i piće koje unose u organizam. Trebamo uzeti u obzir pretpostavku da je tijekom godina izlaganju tijelo steklo znatan kapacitet za detoksifikaciju hidrokinona u manje štetne komponente, što može

objasniti zašto u *in vitro* istraživanjima opažamo znatno štetnije posljedice u odnosu na *in vivo* istraživanja.

Ovim istraživanjem dokazano je da hidrokinon primijenjen u visokoj koncentraciji od 200 mg/kg pokazuje samo djelomičan prooksidacijski potencijal pri stimulaciji reakcije lipidne peroksidacije. Nadalje, nije zabilježen značajan utjecaj na aktivnost enzima oksidativnog stresa superoksid dismutaze i katalze. Uzevši u obzir poznate činjenice o mehanizmu djelovanja hidrokinona i odsutnost statistički značajne razlike između tretiranih i kontrolnih skupina štakora oba spola može se zaključiti da hidrokinon u navedenoj koncentraciji ne pogoduje nastanku oksidativnog stresa u organizmu. Nadalje, takav zaključak može se projicirati na sigurnost unosa dozvoljene dnevne doze hidrokinona od 11μg/kg iz čaja i drugih pripravaka prilikom liječenja urinoinfekcija (European Medicines Agency, 2012). Što je također u skladu sa istraživanjem koje su proveli Kankeaw i Masong (2015) u kojem je zabilježeno da derivati hidrokinona, kao što je 2- (cinamil) hidrokinon ne pogoduje nastanku oksidativnog stresa.

No dokazan je statistički značajno genotoksičan učinak hidrokinona na tkivo bubrega mužjaka štakora, te na tkivo jetre ženki štakora. No kako parametar koji pokazuje postotak DNA u repu (TI) ne prelazi 10 % u navedenim organima, zabilježeni genotoksični učinak ipak nije zabrinjavajući (Collins, 2004).

Daljnja istraživanja trebala bi biti usmjerena na ispitivanje različitih koncentracija hidrokinona, te na istraživanje njegovih drugih metabolita, kao što je benzokinon, čime bi se stekla cjelovitija slika o sigurnosti njegove primjene. Također, daljna istraživanja trebala bi obuhvatiti i druge pokazatelje oksidativnog stresa, kao što su na primjer koncentracija uree i kreatinina u plazmi za bubrege te jetreni enzimi, čime bi se učinak hidrokinona na oštećenja organa još preciznije utvrdio.

6. ZAKLJUČAK

- Izmjerene vrijednosti koncentracije MDA u organima bubrega, jetre i mozga štakora upućuju na mogući stimulacijski učinak hidrokinona primjenjenog u dozi od 200 mg/kg na proces lipidne peroksidacije.

- Izmjerena aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze i katalaze upućuje na to da hidrokinon u koncentraciji od 200 mg/kg statistički značajno ne doprinosi nastanku oksidativnog stresa u bubregu, jetri i mozgu štakora oba spola.

- Hidrokinon pokazuje statistički značajno povećanje primarnih oštećenja DNA na stanicama bubrega mužjaka štakora za parametre intenziteta repa i repnog momenta. Na stanicama jetre ženki štakora zabilježeno je statistički značajno povećanje oštećenja DNA za sva tri parametra komet testa. No budući da su izmjerene razine oštećenja ispod 10% DNA u repu kometa u stanicama bubrega i jetre, i s obzirom na nedostatak statističke značajnosti na stanicama mozga zaključuje se da hidrokinon pokazuje nizak genotokičan potencijal.

- S obzirom na visoke doze hidrokinona koje su istraživane proizlazi da doza koju preporučuje Europska agencija za lijekove ne djeluje prooksidacijski i genotoksično na tkivo bubrega, jetre i mozga, te da su uravnotežena primjena i unos hidrokinona sigurni za uporabu.

7. LITERATURA

Aikens J, Dix TA (1991) Perhydroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. J Biol Chem 266: 15091-1598.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 90(17): 7915-7922.

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović ŠV, Marušić M, Tardi M, Višnjić D (2010) Imunologija, 7. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb 167-168.

Andreoli C, Rossi S, Leopardi P, Crebelli R (1999) DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. Mutat Res 438: 37–45.

Aruoma OI (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem Society 75: 199-212.

Atashi (2015) The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. Stem Cells Dev 24(10): 1150–1163.

Ayala A, Munoz M, Arguelles S (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014: 1-31.

Blaut M, Braune A, Wunderlich S, Sauer P, Schneider H, Glatt H (2006) Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. Food Chem Toxicol 44: 1940–1947.

Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. Annu Rev Blochem 58:79-110.

Catala A (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Chem Phys Lip 157 (1): 1-11.

Chawla S, deLong MA, Visscher MO, Wickett RR, Manga, Boissy RE (2008) Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. Brit J Dermatol 159: 1267–1274.

Collins AR (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol 26: 249-26.

Cooper GM, Hausman, RE (2010) The cell: a molecular approach. Palgrave-Macmillans Global Academic Publishing p. 713.

Ćetković GS, Čanadanović-Brunet JM, Djilas SM, Tumbas V, Markov SL, Cvetković DD (2007) Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of Satureja montana L. subsp. kitaibelii extracts. Int J Mol Sci 8: 1013-1027.

Dahiya A, Romano JF Cosmeceuticals (2006) A review of their use for aging and photoaged skin. Cosmetic Dermatol 19: 479-484.

DeCaprio AP (1999) The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. Crit Rev Toxicol 29 (3): 283–330.

Dröge W (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev 82: 47–95.

Dukić NM, Simin N, Svirčev E, Orčić D, Beare I, Lesjak M, Božin B (2012) The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway. Lipid peroxidation 9:193-210. (preuzeto sa http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation 6.9.2017)

English JC and Deisinger PJ (2004) Metabolism and disposition of hydroquinone in Fischer 344 rats after oral or dermal administration. Food Chem Toxicol 43 (2005) 483–493.

English JC, Perry LG, Vlaovic M, Moyer C, O'Donoghue JL (1994) Measurement of Cell Proliferation in the Kidneys of Fischer 344 and Sprague-Dawley Rats after Gavage Administration of Hydroquinone. Fundam Appl Toxicol 23: 397-406.

Esterbauer H, Schaur FJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxinonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 11: 81-128.

European Medicines Agency (2012) Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. *Comitee on Herbal Medicinal Products*, *44*(January), 1–34. (preuzeto sa: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2011/07/WC500108750.pdf 14.09.2017)

Fandrey J, Frede S, Jelkmann W (1994) Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. Biochem J 303: 507–510.

Fingler S (1994): Hydroquinone. New Edition, Arh hig rada ioksikol 47: 77-81.

Franco MC, Dennys CN, Rossi FH, Estevez AG (2013) Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. InTech, DOI: 10.5772/56488. (preuzeto sa: https://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/superoxide-dismutase-and-oxidative-stress-in-amyotrophic-lateral-sclerosis)

Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Lab Invest 47: 412-26.

Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid Redox Signal 15;15(6): 1583-606.

Garcıa-Ruiz I, de la Torre P, D´ıaz T (2002) Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1 gene expression in cultured hepatic stellate cells. J Biol Pharm Chem 277(34) 30551–30558.

Glorieux C, Calderon P (2017) Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. Biol Chem 26;398(10):1095-1108

Guyton AC, Hall JE (2012) Medicinska fiziologija, Medicinska naklada Zagreb p. 908.

Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Reichel TL (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. J Agric Food Chem 46: 1887–1892.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Methods Enzymol 186: 1-85.

Hard GC, Whysner J, English JC, Zang E, Williams GM (1997) Relationship of hydroquinone-associated rat renal tumors with spontaneous chronic progressive nephropathy. Toxicol Pathol 25: 132–143.

Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 11: 298–300.

Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Ushida K, Nikaido O, Osawa T (1997) 8 Hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. J Invest Dermatol 89: 10405-9.

Hayes GR and Lockwood DH (1987) Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci *USA* 84: 8115–8119.

Hehner SP, Breitkreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz Ml, Dröge W (2000) Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. J Immunol 165: 4319–4328.

Holovska K, Lenartova V, Javorski P (2002) Characterization of superoxide dismutase in the rumen bacterium Streptococcus bovis. Vet Med Czech 2: 38-44.

Jimbow K, Obata H, Pathak MA, Fitzpatrick TB (1974) Mechanism of depigmentation by hydroquinone. J Invest Dermatol 62: 436-449.

Jukić M, Đaković S, Filipović- Kovačević Ž, Vorkapić- Furač J (2004) "Zelena" kemija otvara put Čistim ekoloŠki prihvatljivim kemijskim procesima. Kem Ind 53 (5): 217–224.

Jurica K, Gobin I, Kremer D,Čepo VD, Juršić-Grubešić R, Karačonji BI, Kosalec I (2017) Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. Journal of Herbal Medicine 8: 17-23.

Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M (2005) Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 289: 372–378.

Kankeaw U and Masong E (2015) The Antioxidant Activity from Hydroquinone Derivatives by the Synthesis of *Cinnamomium Verum J.Presl* Bark's Extracted. Int J Chem Eng Appl 6(2): 91-95.

Kondo H, Miura M, Itokawa Y (1991) Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. Acta Physiol Scand 142: 527–528.

Kozić A, Popović M, Ivetić V, Pilija V (2002) Activates of glutation peroxidase gluthation and glutation reductase in healthy and diabetes (insuline dependet) patiens. Praxis Medica 30 (1-2) 13-20.

Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G (2005) 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. Mol Nutr Food Res 49(11): 1044-9.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews 4: 118-128.

Lowry OH, Rosebrough N J, Farr A L, Randall RJ (1951) Protein measurment with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.

Matsumoto M, Masumori S, Hirata-Koizumi M, Honma M, Yokoyama K, Hirose A (2014) Evaluation of in vivo mutagenicity of hydroquinone in Muta™ mice. Mutat. Res/Genet Toxicol Environ Mutagen 775-776: 94-98.

Matsumoto M, Todo H, Akiyama T, Hirata-Koizumi M, Sugibayashi K, Ikarashi Y, Ono A, Hirose A, Yokoyama K (2016) Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone. Regulatory Toxicology and Pharmacology 81: 128-135.

McCord JM And Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244: 6049–6055.

Meister A, Anderson A (1983) Glutathione. Annu Rev Biochem 52: 711-60.

Murthy MR, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann MG (1981). Structure of beef liver catalase. J Mol Biol 152 (2): 465–499.

Nihro Y, Furukawa H, Sogawa W, Wang TC, Miyataka H, Matsumoto H, Miki T, Satoh T (1994) Syntesis and anti.lipid peroxidation activity of hydroquinone monoalkyl ehers. Chem Pharm Bull 42(3) 576-579.

Nilsson J, Regnostrom J, Frostegard J, Stiko A (1992) Lipid oxidation and atherosclerosis. Herz 17(5): 263-269.

Nortlund JJ, Grimes PE, Ortonnes JP (2006) The safety of hydroquinone. J Eur Acad Dermatol Venereol 20: 781–787.

Noto G, Pravata G, Arico M (1995) Melanogenesis and hydroquinone. Acta Dermatovenerologica 4: 9-12.

Nystrom T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO J 24: 1311-1317.

Palumbo A, d Ischia M, Misuraca G, Prota G (1991) Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. Biochim Biophys Acta 23;1073(1):85-90.

Paul V, Ekambarad P (2011) Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. Indian J Med Res 133(5): 471–478.

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

Penney KB, Smith CJ, Allen JC (1984) Depigmentig action of hydroquinone depends on disruption of fundamental cell processec. J Invest Dermatol 82: 308-310.

Pillai S, Oresajo C, Hayiward J (2004) Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of nflammation-induced matrix degradation – a review. Int J Cosmet Sci 27: 17–34.

Porter N (1984) Chemistry of lipid peroxidation. Methods Enzymol 105: 273-283.

Ramirez C, Pham K, Franco EFM, Chwa M, Limb A, Kupperman DB, Kenney MC (2013) Hydroquinone induces oxidative and mitochondrial damage to human retinal Mu¨ ller cells (MIO-M1). NeuroTox 39: 102–108.

Rahman I, MacNee (1999) Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. (preuzeto sa: http://ajplung.physiology.org/ 17.08.2017.)

Raj A and Nachiappan V (2016) Exposure to benzene metabolites causes oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae. Antonie van Leeuwenhoek 109(6): 841-54.

Rao NR and Snyder R (1995) Oxidative modifications produced in HL-60 cells on exposure to benzene metabolites. J Appl Toxicol 15(5): 403-409.

Reed TT (2011) Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Rad. Biol. Med. 51 (7): 1302-1319.

Robertson ML, Eastmond DA, Smith MT (1991) Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. Mutat Res 249: 201–209.

Roza L, de Vogel N, van Delft JHM (2003) Lack of clastogenic effects in cultured human lymphocytes treated with hydroquinone. Food Chem Toxicol 41: 1299–1305.

Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, von Nieciecki A,Wittig J, Krähmer N, Glöckl I, Veit M (2002) Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of Arctostaphylos uvae ursi extract as film-coated tablets. J Clin Pharmacol 42: 920-927.

Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Mol Cell 48(2): 158-167.

Shayne C (2005) Hydroquinone. Encyclopedia of Toxicolog 2: 979-982.

Sies, H (1985) Oxidative srtess: Introductory remarks. U: Oxidative stress. (Sies, H., ured.) Academic Press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Mont Real, Sydney, Tokyo, 1-7.

Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović D (2007) Lipid peroxidation-causes and consequences. Medicina 43: 84-93.

Tice RR., Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki Y F (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 35 (3): 206-221.

Topping DC, Bernard LG, O'Donoghue JL, English JC (2007) Hydroquinone: Acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. Food Chem Toxicol 45: 70–78.

Valentine JS, Foote CS, Greenberg A, Liebman JF (1995) Active oxigen in biochemistry. Springer Science and Business media, LLC 2: 1-2, 313-335.

Wamelink MM, Struys EA, Jakobs C (2008) The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. J Inherit Metab Dis 31(6):703-17.

Wang X, Lei XG, and Wang J (2014) Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. Mol Cell Endocrinol 382(1): 8–16.

Waterborg JH (1989) The Lowry Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook 2: 7-9.

Whysner J, Verna L, English JC, Williams GM (1995) Analysis of studies related to tumorigenicity induced by hydroquinone. Regul Toxicol Pharmacol 21: 158–176.

Willekens H, Inze D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. Mol Breed 1: 207-228.

Zarić M, Mitrović M, Nikolić I, Popović S, Đurđević P, Baskić D, Zelen I (2011) Activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in plasma and lysates of chronic lymphocytic leukemia patients. Med čas 45(2): 9-16.

Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (2013) Narodne novine Republike Hrvatske broj 55. (Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_05_55_1129.html)

http://blog.biotek.com/2016/01/

http://www.amsbio.com/comet-assays.aspx

https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/automation-of-methods-for-determination-of-lipid-peroxidation

http://pharmrev.aspetjournals.org/content/68/4/1026

https://www.futurederm.com/5-little-known-facts-every-hydroquinone-user-needs-to-know-immediately/

http://en.ori-japan.com/aboutfpp/about-fpp/

http://slideplayer.com/slide/10175562/

https://www.google.hr/search?q=iNOS&rlz=1C1AVNE_enHR707HR707&source=lnms&

https://www.researchgate.net/figure/279937336_fig2_Fig-2-Basic-free-radical-mechanisms-for-the-Fenton-and-Haber-Weiss-reaction-43-66

https://www.slideshare.net/guest371c9f/free-radicals

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Vanja Popović

Adresa: Katarine Zrinske 10, 32 000 Vukovar

Datum rođenja: 02.09.1992.

Mjesto rođenja: Vukovar

Kontakt e-mail: v.popovic.pmf@gmail.com

Kontakt telefon: 095 906 4378

Obrazovanje:

2015.-2017. Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb,

Smjer: Eksperimentalna biologija

Modul: Fiziologija i Imunobiologija.

2011.- 2015. Sveučilište J. J. Strossmayera- Odjel za biologiju, Osijek

2007.- 2011. Opća Gimnazija Vukovar

Radno iskustvo:

Laboratorijske vježbe:

-Klinički bolnički centar Rebro (odjel za molekularnu dijagnostiku i transplantaciju)

-Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice (odjel za onkologiju)

-Hrvatski veterinarski institut

-Institut Ruđer Bošković

Laboratorijska praksa:

-Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu, tema oksidativni stres

Studentski poslovi:

-Članica studentske udruge eSTUDENT- organizacija i održavanje predavanje iz područja znanosti i kulture

-Hotel „Lafodia“ otok Lopud, Dubrovnik- sobarica

-„Kiosk plus d.o.o.“ - prodavačica

-„Zvona Catering Zagreb“- konobarenje i pomoćni poslovi

-„Vupik d.o.o.“- sezonski poslovi u poljoprivredi

Osobne i komunikacijske vještine

-Materinski jezik: hrvatski, srpski -Strani jezici: engleski B2, njemački A2

-Kreativnost, inicijativnost te dobre komunikacijske i prezentacijske vještine, sposobnost rada u timu. Ambiciozna sam te voljna učiti i napredovati na intelektualnoj i profesionalnoj razini.

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

-Vozačka B kategorije

Ostale aktivnosti:

-Prisustvovanje na Trećem simpoziju studenata bioloških usmjerenja - 27.5.2017.

-Prisustvovanje na predavanju Roberta Triversa „Recent advances in human evolutionary genetics“ - 11.11.2016.

-Bivša članica Sekcije za alge udruge ZOA u Osijeku - 2014. god.

-Dugogodišnji član folklornog ansambla Kulturno-umjetničkog društva Vaso Đurđević.

-Rad na projektu popularizacije biologije Biolog-i-ja 2014. god.

„A scientist in his laboratory is not a mere technician, he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.“

Marie Curie