Učinak ekstrakta listova obične planike (Arbutus unedo L.), arbutina i hidrokinona na stanice PK-15 i HepG2 u uvjetima in vitro

Tkalčec, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:298753

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ines Tkalčec

UČINAK EKSTRAKTA LISTOVA OBIČNE PLANIKE (*ARBUTUS UNEDO* L.), ARBUTINA I HIDROKINONA NA STANICE PK-15 I HEPG2 U UVJETIMA *IN VITRO*

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen dijelom u 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 magistre edukacije biologije i kemije.

Zahvale

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

Zahvaljujem svim suradnicima i zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu na nesebičnoj pomoći, savjetima te strpljenju pri izradi ovog rada. Posebna hvala tehničarki Mariji Potočić i dr. sc. Anici Horvat Knežević na pomoći s eksperimentalnim dijelom rada i na ugodnoj atmosferi.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su uljepšali moje studentske dan i uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno. „Život bez prijatelja je ništa“ (Ciceron). Andrijana, Leona, Kristina, Marina i Željka.

Najviša hvala mojim roditeljima, koji su mi omogućili studiranje te bili bezuvjetna potpora tijekom svih ovih godina školovanja. Posebna hvala bratu Dejanu, koji je uvijek vjerovao u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

UČINAK EKSTRAKTA LISTOVA OBIČNE PLANIKE (*ARBUTUS UNEDO* L.), ARBUTINA I HIDROKINONA NA STANICE PK-15 I HEPG2 U UVJETIMA *IN VITRO*

Ines Tkalčec
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) zimzelena je grmolika biljka iz porodice vrijesova, koja se zahvaljujući antimikrobnim i antioksidacijskim svojstvima svih svojih dijelova koristi kao sastojak tradicionalnih ljekovitih pripravaka. Najvažniji biološki aktivni spojevi koje nalazimo u listu obične planike su polifenoli, od kojih je najzastupljeniji arbutin. Utvrđen je antioksidativni učinak arbutina te njegova antikancerogena i protuupalna aktivnost. Biološki učinci arbutina dolaze od njegova metabolita hidrokinona. Ovo istraživanje provedeno je s ciljem procjene učinka toksičnosti vodenog ektrakta listova obične planike i arbutina u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinona u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL na stanice PK-15 i HepG2 u *in vitro* uvjetima. Test vijabilnosti stanica pokazao je da hidrokinon izaziva inhibiciju proliferacije stanica, dok vodeni ekstrakt listova obične planike i arbutina nisu pokazali negativan učinak. Pri većim koncentracijama hidrokinon oštećuje molekule DNA. Rezultati testa bojenja EtBr/AO ukazuju da stanice tretirane hidrokinonom ulaze u apaptozu i nekrozu u većoj mjeri od onih tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutinom. Na temelju navedenih rezultata možemo zaključiti da ekstrakt listova obične planike i arbutin imaju niski toksični potencijal, dok hidrokinon u većim koncentracijama oštećuje stanice.

(60 stranice, 15 slika, 6 tablica, 103 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: obična planika, *in vitro*, MTS test, alkalni komet test; genotoksičnost, EtBr/AO test
Voditelj: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković
doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić
izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad je prihvaćen: 08.01.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

EFFECT OF WILD STRAWBERRY TREE (*ARBUTUS UNEDO* L.) LEAF EXTRACT, ARBUTIN AND HYDROQUINONE ON PK-15 AND HEPG2 CELLS *IN VITRO*

Ines Tkalčec
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Strawberry tree (*Arbutus unedo* L) is an evergreen wild shrub or a small tree in *Ericacae* family, which is widely used as an ingredient in the traditional medicine due to its antimicrobial and antioxidant properties. The most important biologically active compounds found in the leaf of the strawberry tree are polyphenols, among which the most common is arbutin. Its antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties have been confirmed. The effects of arbutin derive from hydroquinone, its metabolite. The aim of this study was to estimate the impact that the toxicity of the strawberry-tree leaf aqueous extract and arbutin in doses of 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL and 0,0114 mg/mL, and of hydroquinone in doses of 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL and 0,008 mg/mL, has on PK-15 and HepG2 cells under *in vitro* condition. Hydroquinone has induced cell proliferation inhibition, while the aqueous extract of the strawberry-tree leaf and arbutin have not shown the negative effects measured by cell viability test. Higher concentrations of hydroquinone have damaged the structure of the cells' DNA moleculesThe results of the EtBr/AO staining test have shown that cells treated with hydroquinone entered into apoptosis and necrosis to a greater extent than those treated with the strawberry-tree leaf aqueous extract and arbutin. Based on these latter results, it can be concluded that the extract of the strawberry-tree leaf aqueous extract and arbutin have low genotoxic potential, while higher concentrations of hydroquinone damage the cells.

(60 pages, 15 figures, 6 tables, 103 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in the Central Biological Library.
Key words: strawberry tree, MTS assay, comet assay, genotoxicity, *in vitro*, EtBr/AO test
Supervisor: Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof
Reviewers: Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof
Dr. Mirela Sertić Perić.
Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Substitute: Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 08.01.2018.

POPIS KRATICA

DMSO – dimetil sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

EDTA – etilen-diamin-tetraoctene kiseline

EMEM – Eagle's Minimum Essential Medium

EtBr/AO – etidijev bromid i akridin oranž

HepG2 – epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma

MTS – test vijabilnosti stanica

PK-15 – epitelne stanice bubrega svinje

RPMI-1640 – hranjivi medij instituta Roswell Park Memorial

TM – repni moment (od engl. tail moment)

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

TL – dužina repa kometa od (engl. tail lenght)

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Obična planika 1
1.2. Učinci obične planike na zdravlje 3
1.3. Kemijski sastav obične planike 5
1.3.1. Polifenoli i flavonoidi 6
1.3.2. Arbutin 7
1.3.3. Hidrokinon 9
1.5. Cilj istraživanja 11
2. MATERIJALI I METODE 12
2.1. Priprava standardnih otopina 12
2.1.1. Biljni materijal i priprema vodenog ekstrakta listova obične planike 12
2.1.2. Priprema otopine ekstrakta listova obične planike, arbutina i hidrokinona 12
2.2. Kultura stanica 12
2.2.1. Presađivanje stanica 14
2.2.2. Tretiranje stanica 14
2.2.2.1. Vijabilnost stanica (MTS test) 14
2.2.2.2. Metoda bojanja EtBr/AO i Komet test 15
2.2.3. Priprema stanica za analizu 15
2.3. Test vijabilnosti stanica (MTS test) 15
2.4. Preživljavanje stanica procijenjeno primjenom fluorescencijskog testa bojenja s etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO) 17
2.5. Alkalni komet test 18
2.6. Statističke metode 21
3. REZULTATI 22
3.1. Test vijabilnosti stanica (MTS test) 22
3.1.1. Vijabilnost PK-15 stanice 22
3.1.2. Vijabilnost HepG2 stanice 23
3.2. Preživljavanje stanica procijenjeno primjenom fluorescencijskog testa bojenja s etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO) 24
3.2.1. PK-15 stanice 24
3.2.2. HepG2 stanice 26
3.3. Alkalni komet test 28

3.3.1. Primarna oštećenja DNA na stanicama PK-15 izmjerena alkalnim komet testom. 28
3.3.2. Primarna oštećenja DNA na stanicama HepG2 izmjerena alkalnim komet testom 34
3.3.3. Statističke značajnosti vrijednosti parametara komet testa na stanicama PK-15 i HepG2 40
4. RASPRAVA 46
5. ZAKLJUČAK 50
6. LITERATURA 51
7. ŽIVOTOPIS 59

1. UVOD

U narodnoj medicini već se stoljećima koriste biljke i biljni pripravci za liječenje bolesti ili očuvanje zdravlja ljudi. Veliki broj istraživanja učinaka biljaka provodi se s ciljem pronalaženja pripravaka koji bi mogli štititi stanice, organe, te organizam u cijelosti od štetnih učinaka sve prisutnijih u čovjekovom okolišu. Dokazano je da polifenoli prisutni u voću, povrću, žitarice i drugim biljkama posjeduju čitav niz učinaka u prevenciji i terapiji bolesti kao što su: kardiovaskularne bolesti, osteoporoza, neurodegenerativne bolesti, dijabetes i dr.

1.1. Obična planika

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je vazdazelena grmolika biljka iz porodice vrijesova koja uobičajeno doseže 1,5−3 metra visine, iako nije neobično da biljka dosegne visinu i do 12 metara. Rasprostranjena je duž Mediterana i Atlantske obale Europe, a u Hrvatskoj je nalazimo duž obale Jadranskog mora: od Istre do Južnog Primorja te po otocima i poluotocima Jadranskog mora poput Dugog otoka, Mljeta, Korčule, Brača, Elafitskih otoka i poluotoka Pelješca (Šilić, 2005; Maleš i sur., 2006). Rasprostranjenost planike u Hrvatskoj nije do kraja istražena (Maleš i sur., 2006; 2013; Vidrih i sur., 2013). Obična planika nije osobito zahtjevna prema sastavu tla, ali najbolje se uzgaja na vapnenačkim kamenjarima i pukotinama stijena, te su za razvoj pogodnija kisela tla, a izrazito povoljno podnosi i sušne uvjete.

Poznata i korištena od davnina diljem regije, za običnu se planiku u hrvatskom govornom području udomaćilo više narodnih naziva kao što su: maginja, magunja, prpak, planika, jagodica, rast, planičac, metličasta planika, manjiga, obična planika (Nikolić, 2014).

Obična planika izrazito je specifična biljka, koja posjeduje dugu fazu cvjetanja i formiranja ploda. Jedina je biljka koja na stablu u isto vrijeme ima i cvijet i plodove (Slika 1). Njezin dvospolni cvijet cvate od listopada do veljače, kada dozrijevaju i prošlogodišnji plodovi (Nikolić, 2014). Drugim riječima, potrebna je čak godina dana kako bi došlo do potpunog formiranja i sazrijevanja ploda. Glavne karakteristike biljke njezini su ružičasto-bijeli zvonoliki cvjetovi mednog mirisa skupljeni u grozdaste cvatove te okrugli žuto-crveni plodovi, mesnate i sočne bobe hrapave površine prosječne veličine oko 2 centimetra.



Slika 1. Cvat i plod obične planike (preuzeto s http://www.hobbyfarms.com/what-is-a-strawberry-tree/)

Glavne dijelove biljke, plod i list, mediteransko je stanovništvo do danas zadržalo u upotrebi. Plod se najčešće koristi za proizvodnju marmelada, džemova i alkoholnih pića, što je često i dodatan izvor prihoda stanovnicima ruralnih područja Sredozemlja (Soufleros i sur., 2005; Cornara i sur., 2009; Lim, 2012). List se koristi u tradicionalnoj medicini za izradu pripravaka protiv različitih upala, nadutosti, dijabetesa, arterioskleroze, hipertenzije, pa i u borbi protiv gastrointestinalnih, urinarnih i bubrežnih bolesti. Čaj od lista obične planike koristi se kod šećerne bolesti, tegoba prostate i mokraćnih putova, te reumatizma (Miguel i sur., 2014).

1.2. Učinci obične planike na zdravlje

Zbog velike količine različitih bioaktivnih spojeva, poput eteričnih ulja, vitamina, tokoferola, antocijanida, fenola i flavonoida, obična planika ima niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Učinci su u uskoj vezi s njihovim antioksidacijskim i antimikrobnim djelovanjem (Tavares i sur., 2010). Osim antioksidacijskog djelovanja fenolni spojevi imaju i druge osobine, poput protuupalnog, vazodilatacijskog i antitrombotskog učinka, koji doprinosi smanjenju visokog krvnog tlaka i smanjenju prianjanja trombocita uz stjenke (Kivçak i Mert, 2001; El Haouari i sur., 2007; Oliveira i sur., 2011a). Fenolni spojevi imaju i antimutagen i antiproliferativan, odnosno antikancerogen učinak (El Haouari i sur., 2007; Tavares i sur., 2010; Oliveira i sur., 2011a; Oliveira i sur., 2011b; Abuhamdah i sur., 2013). Potpomažući staničnu obranu i aktivaciju enzimskih sustava za detoksikaciju, bioaktivne tvari smanjuju upalne procese te inhibiraju rast i razvoj tumorskih procesa (Padanilam, 2013). Obična planika pokazuje i antidijabetski učinak: smanjuje koncentraciju glukoze u krvi s obzirom na to da ekstrakt lista obične planike poboljšava učinak inzulina i iskorištenje glukoze u stanicama (Bnouham i sur., 2010).

Povoljni učinci obične planike odavno su prepoznati, pa ne iznenađuje da su za liječenje tegoba u tradicionalnoj medicini svoju primjenu našli različiti dijelovi biljke (list, plod, kora, korijen) (Oliveira i sur., 2011a) (Tablica 1). Pripravci korijena i kore u narodnoj se medicini koriste kod gastrointestinalnih poremećaja (za uklanjanje trbušnih tegoba i kao pomoć kod proljeva), kardiovaskularnih poremećaja te kod uroloških i dermatoloških problema. (Ziyyat i Boussairi, 1998; Novais i sur., 2004). Dosadašnja istraživanja ukazala su i na antimikrobna svojstva ekstrakta korijena obične planike u vidu inhibicije rasta *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (Dib i sur., 2013; Miguel i sur., 2014).

Plod i ekstrakt lista obične planike posebno su korisni u liječenju uroloških i gastrointestinalnih problema zbog svog diuretskog, uroantiseptičnog i laksativnog učinka (Ziyyat i Boussairi, 1998; El-Hilaly i sur., 2003; Pallauf i sur., 2008; Cornara i sur., 2009; Oliveira i sur., 2011a). Iako je primjena sirovih plodova pokazala pozitivno djelovanje kod gastritisa i bubrežnih bolova, oni se rijetko koriste neprerađeni jer konzumirani u većim količinama mogu dovesti do ošamućenosti nalik stanju pijanstva. Iz ploda i cvijeta izolirano je eterično ulje, kojem se pripisuje antibakterijsko djelovanje (Kahriman i sur., 2010), a utjecaj meda obične planike, iako još uvijek predmetom brojnih istraživanja, pokazuje kako antioksidativna tako i antiradikalna svojstva zahvaljujući brojnim polifenolima koje nalazimo

u njegovu sastavu (Tuberoso i sur., 2010; 2013). Antioksidacijsko svojstvo ploda i lista obične planike značajnije je od onog zelenog čaja ili borovnice (Tavares i sur., 2010).

Budući da list obične planike smanjuje zgrušavanje krvi ili uopće nakupljanje trombocita uz vazodilatacijski učinak (El Haouari i sur., 2007; Lim, 2012), vrlo se često koristi za regulaciju visokog krvnog tlaka i kod kardiovaskularnih bolesti. Ekstrakt listova obične planike pokazao je antibakterijska i antimikrobna svojstva zbog čega bi se mogao primjenjivati kod liječenja asimptomatskih urinarnih infekcija. Zahvaljujući antioksidacijskom kapacitetu, primjenu može pronaći i u kliničkoj upotrebi kao preventivni ili terapijski agens u bolestima izazvanim oksidacijskim stresom (Afkir i sur., 2008, Mariotto i sur., 2008, Oliveira i sur., 2011a, Amel, 2013).

Glavni je cilj provedenih istraživanja povećati korištenje plodova i/ili derivata obične planike u ljudskoj prehrani zbog njezinih svojstava korisnih ljudskom zdravlju (Miguel i sur., 2014).

Tablica 1. Primjena različitih dijelova obične planike u narodnoj medicini (preuzeto od Oliveira i sur. 2011a).

Dio biljke	**Medicinska upotreba**	**Literatura**
List	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji, bolesti bubrega, visoki krvni tlak bolesti srca, dijabetes, hemeroidi, diuretsko i protuupalno i antidijarioično djelovanje	Ziyyat i sur., 1997 Kivçak i sur., 2001b El-Hilaly i sur., 2003 Cornara i sur., 2009 Leonti i sur., 2009
Plod	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi dermatološki problemi, bolesti bubrega, kardiovaskularna primjena	El-Hilaly i sur., 2003 Leonti i sur., 2009 Cornara i sur., 2009
Kora	Gastrointestinalni poremećaji, urološki i dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji	Ziyyat i sur., 1997
Korijen	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji, visoki krvni tlak, bolesti srca, dijabetes, diuretsko, protuupalno i antidijarioično djelovanje	Kivçak i sur., 2001b Novais i sur., 2004 Marioto i sur., 2008 Afkir i sur., 2008

1.3. Kemijski sastav obične planike

Učinak obične planike, odnosno njezinih dijelova, nepobitno ovisi o njezinu kemijskom sastavu. Od bioaktivnih spojeva u planici je utvrđeno postojanje vitamina, fenola, organskih kiselina i terpenoida. Utvrđeno je da zreli plodovi obične planike sadrže velike količine šećera (od 42 % do 52 % suhe mase) i minerala, pogotovo kalija i kalcija. U tek nešto manjim koncentracijama nalazimo i eterična ulja te važne antioksidanse kao što su vitamini i fenolni spojevi te galna kiselina.

S druge strane u listu obične planike nalaze se spojevi kao što su masne kiseline, terpenoidi, neki vitamini, esencijalna ulje i fenolni spojevi, poput tanina, glikozida i flavonoida.

Dib i sur. (2010b) su utvrdili prisutnost masnih kiselina u listu koje su ekstrahirane s razrijeđenim petroleterom, a uzorak je potom prošao hidroksidnu saponifikaciju. Najviše je bilo palmitinske kiseline 38,5 %, oleinske 10,6 %, linolenske 9,3 %, a pronađene su još i linoleinska 5,5 %, laurinska 5,2 %, miristinska 2,6 %, stearinska 2,5 % , pentadekanoična 2,4 %, trideciklična 2,3 %, behenična 1,9 %, margarinska 1,6 %, te arahidinska 1,2 % kiselina. Od terpenoida su određeni α-amirin acetat, betulinska kiselina i lupeol, a od vitamina α-tokoferol. Zanimljivo je da sadržaj α-tokoferola varira ovisno o vremenu prikupljanja lista, pa ga je najviše određeno u uzorku prikupljenom u ožujku (0,01328 %) (Gaspar i sur., 1997; Kivçak i sur., 2001b; Oliveira i sur., 2011a).

U nesaponificiranom dijelu lista određena je visoka razina alifatskih spojeva (32,1 %), ugljikovodičnih monoterpena (30,7 %), i oksigeniranih seskviterpena (18,5 %). Kemijski sastav ove nesaponificirane frakcije lista je (Z)-β-ocimen 22,4 %, elemol 18,5 % , dodecil-acetat 10,5 %, tetradekanol 7,9 %, (E)-anil 2-metil butirat 6,5 %, dodekanal 3,8 %, heksadekanal 3,5 %, limonen 3,2 %, α-pinen 2,6 %, sabinen 2,5 %, heptadekan 2,4 %, undekan 2,1 %, pentadekan 1,9 %. Ovi spojevi izolirani iz lista obične planike u njegovom nesaponificiranom dijelu mogli bi biti odgovorni za njegovo antimikrobno djelovanje i to bi općenito moglo biti pripisano monoterpenoidima (Matasyoh i sur., 2007; Dib i sur., 2010b).

Iz lista obične planike izoliran je niz fenolih spojeva poput tanina, flavonoida (katehin galat, miricetin, rutin, afzelin, juglanin, avikularin), fenolnih glikozida (kvercitrin, izokvercitrin, hiperozid) te iridoidnih glukozida (Carcache-Blanco i sur., 2006; Maleš i sur., 2006). Najzastupljeniji fenolni spojevi u listu su arbutin (62,7 mg/100 g lista), katehin (54,6 mg/100 g lista) i etil galat (44,00 mg/100 g lista) (Fiorentino i sur., 2007; Oliveira i sur., 2011a; Miguel i sur., 2014). Međutim arbutin prilikom bioaktivacije u ljudskom organizmu prelazi u

hidrokinon, koji ima mutagene osobine, pa treba voditi računa da se ne unosi u organizam u većim količinama (Blaut i sur., 2006).

Tanini su polifenilni spojevi antioksidacijskih svojstava zahvaljujući hidroksilnim grupama koje imaju. Osim antioksidacijskih svojstava pokazuju jaku antibakterijsku, antiulceroznu, protuupalnu, antimutagenu i apoptotsku aktivnost te su zbog svega toga potencijalno zanimljivi i u tretmanu tumora (Nomura i sur., 2005; Larrosa i sur., 2006; Souza i sur., 2007; Huang i sur., 2010).

1.3.1. Polifenoli i flavonoidi

Fenolni spojevi imaju u svojoj strukturi jedan aromatski prstena ili više njih, na koje je povezana jedna hidroksilna grupa ili više njih. Poznato je preko 8000 strukturnih varijanti ovih spojeva, a općenito ih dijelimo na fenolne kiseline i analoge: tanini, flavonoidi, stilbeni, kurkumonoidi, kumarini, lignani, kinoni i ostali, ovisno o broju aromatskih prstenova i funkcionalnih povezujućih struktura (Fresco i sur., 2006; Huang i sur., 2010). Glavni oblik u biljnom svijetu upravo su fenolne kiseline, koje se bilo u slobodnom bilo u konjugiranom obliku pojavljuju kao amidi ili pak kao esteri.

Polifenolni spojevi u biljkama nastaju kao rezultat sekundarnog metabolizma biljaka i omogućuju im odvijanje esencijalnih funkcija poput rasta i razmnožavanja, ali im služe i kao obrambeni mehanizam protiv patogena, parazita i ptica grabljivaca te pridonose boji biljke (Baidez i sur., 2007). Njihov je učinak na staničnoj razini i indukcija enzimskih sustava važnih za endogenu borbu s reaktivnim metabolitima kisika (glutation peroksidaza, katalaza, dismutaza) ili inhibicija njihove ekspresije (ksantin oksidaza) (Tsao, 2010).

Bioaktivnost fenolnih spojeva, između ostalog, odgovorna je za njihovo kemopreventivno djelovanje, dakle antioksidacijski učinak (antikancerogeno, antimutageno i protuupalno), koji ovisi o njihovoj strukturi, odnosno o broju i pozicijama hidroksilnih skupina i njihovoj glikozilaciji ili eventualno o ostalim zamjenskim grupama na samom fenolnom prstenu (Heim i sur., 2002; Cai i sur., 2006; Huang i sur., 2010).

Uz različite izolirane polifenole važna skupina biljnih bioaktivnih spojeva velike strukturne heterogenosti su i flavonoidi (Huang i sur., 2010). Uloga i aktivnost flavonoida, kao i kod polifenola, ovisna je o njihovoj kemijskoj strukturi. Uglavnom se pojavljuju u obliku difenilpropana (C6-C3-C6), a nešto rjeđe i kao aglikoni i kao derivati glikozida. Flavonoidi se

u suštini dijele u nekoliko glavnih skupina: flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, antocijanini koji uključuju i antocijanidine (Miguel i sur., 2014).
Iako i fenoli djeluju antioksidativno, veliki antioksidativni kapacitet imaju i flavonoidi, čime se objašnjava ne samo njihova antimikrobna i antiviralna aktivnost već i antikancerogena te hematoprotektivna uloga (Kazazić, 2004). U biljaka flavonoidi imaju zaštitni učinak štiteći ih od patogena i UV zračenja.

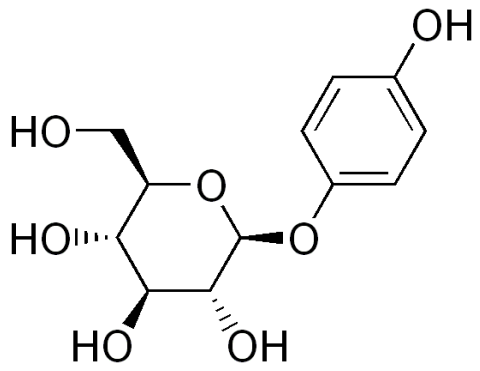
1.3.2. Arbutin

Arbutin (hidrokinon-β-D-glukopiranozid) je prirodni spoj koji se nalazi u raznim biljnim vrstama različitih vrsta kao što su Ericaceae (*Arctostphylos spp*.), Betulaceae (*Betula alba*) i Rosaceae (*Pyrus communis* L.) (Petkou i sur., 2002). Riječ je o derivatu hidrokinona, 4-hidroksifenil–*β*-glukopiranozidu, koji možemo pronaći u kori, listu i plodu vrsta kao što su obična planika i medvjetka (*Arctostaphylos uva-ursi* L.), a predstavlja jedan od najvažnijih fenolnih spojeva koje sadrže. Biljke prvenstveno sintetiziraju arbutin u obrani protiv infekcija i pri stresnim uvjetima kao što su iznimno visoke ili niske temperature (Lukas i sur., 2010).
Arbutin je spoj koji ima antimikrobna svojstva i pomaže biljci u borbi s bakterijama. Nakon konzumacije arbutin se apsorbira preko nosača glukoze *β*-glukozidazu u debelom crijevu, gdje se pod utjecajem crijevne bakterijske flore metabolizira u aktivne tvari glukuronide i sulfatne konjugate koji se izlučuju u urinu (Schindler i sur., 2002). U studijama rađenim u *in vivo* uvjetima s ekstraktom lista borovnice pokazano je da pri konzumaciji jedne doze arbutina standardiziranog na 800 miligrama po dozi u uzorku urina konzumenta tjedan dana nakon uzimanja doze nije primijećen rast bakterija (Schindler i sur., 2002). Istraživanje je provedeno na šesnaest muških i ženskih ispitanika. Unutar tjedan dana ispitanici su nasumično uzimali tretman A sastavljen od dvije tablete FCT (filmom obložene tablete) od kojih svaka sadrži 472.5 mg BLDE-a, što je ekvivalentno 105 mg arbutina, odnosno tretman B sastavljen od 100 ml AS (vodeni ekstrakt) koji sadrži 945.0 mg BLDE-a (suhi ekstrakt lišća borovnice), što je ekvivalentno 210 mg arbutina. Uzorak urina ispitanika uzet je prije samog početka istraživanja te nakon 4, 8, 12, 24 i 36 sati nakon uzimanja tretmana.
S druge strane u intestinalnoj se mikroflori nalaze bakterije *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacteroides distasonis* i *Bifidobacterium adolescentis*, koje mogu metabolizirati arbutin do hidrokinona, koji pak ima hepatotoksični, nefrotoksični, mutagen i

kancerogeni učinak (Peters i sur., 1997). Unutar 24 sata u crijevnim resicama cijeli arbutin prijeđe u hidrokinon i to se najefikasnije događa u alkalnom mediju (Blaut i sur., 2006). Smatra se da arbutin uz β-glukozidazu već u biljkama prelazi u aktivniji oblik hidrokinon (Hildebrand i sur., 1969).

U *in vitro* studijama potvrđen je antioksidativan učinak arbutina, s kojim je povezana i njegova antikancerogena i protuupalna aktivnost protiv različitih toksičnih agensa (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).

Nositelji antioksidativnih svojstava arbutina i hidrokinona hidroksilne su skupine u njihovoj kemijskoj građi (Slika 2). Iako hidrokinon ima 2 hidroksilne skupine podložne oksidaciji, zbog čega se smatra jačim antioksidansom nego arbutin, u istraživanjima u uvjetima *in vitro* na eritrocitima i fibroblasima antioksidativni kapacitet arbutina pokazao je dugotrajniji antioksidativni učinak (Kivcak i sur., 2009).



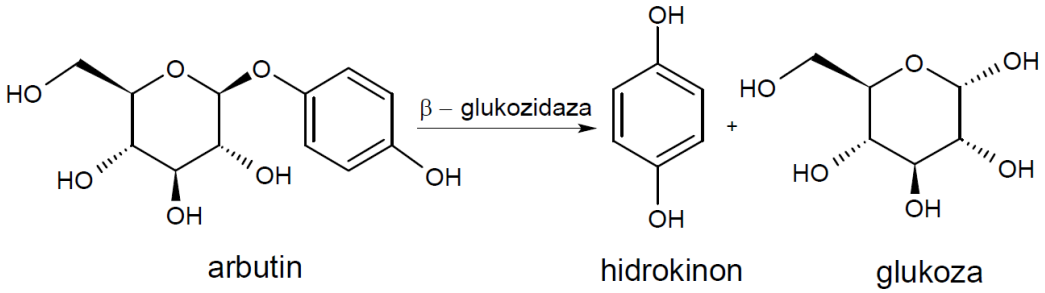
Slika 2. Kemijska struktura arbutina (preuzeto od https://www.complexi-light.com/alpha-arbutin/)

Biljni proizvodi koji sadrže arbutin uglavnom se koriste kao diuretici ili za tretiranje infekcija urinarnog trakta i bubrežnih kamenaca. Nakon konzumacije arbutin se absorbira preko nosača glukoze u debelom crijevu. Tu se uz pomoć intestinalne flore metabolizira u glukuronide i sulfatne konjugate koji se najviše izlučuju u urinu (Schindler i sur. 2002). Inhibicija proliferacije patogena fenolnim spojevima kao što je arbutin pripisuje se njihovu oksidativnom potencijalu (Nycz i sur., 2010). Arbutin je zbog niske citotoksičnosti pronašao mjesto u kozmetici, gdje se koristi u proizvodima za izbljeđivanje kože kao pomoćna terapija

kod hiperpigmentacije (Hu i Zhou, 2009). Ovisno o dozi arbutin pokazuje inhibicijski učinak na aktivnost tirozinaze u B16 i HMV melanomskih stanica (Sugimoto i sur., 2003).

1.3.3. Hidrokinon

Hidrokinon je aromatski organski spoj koji nastaje razgradnjom arbutina pod djelovanjem enzima β-glukozidaze u ljudskom organizmu u enterocitima crijevnih resica probavnog sustava (Blaut i sur., 2006) (Slika 3). Osim u prirodi hidrokinon se proizvodi i u komercijalne svrhe u fotokemijskim postupcima kao antioksidans za masti i ulja, u proizvodnji boja i motornih goriva te kao polimerizacijski inhibitor i izbjeljivač kože u kozmetici (Blaut i sur., 2006).



Slika 3. Bioaktivacija arbutina u hidrokinon (preuzeto od Hildebrand i sur., 1969).

Upravo je hidrokinon aktivni spoj koji ostvaruje antimikrobni učinak u genitourinarnom traktu čiji alkalni medij ostvaruje potpuni učinak (Jahodár i sur., 1985; Schindler i sur., 2002). Budući da oksidacijom hidrokinona nastaje p-benzokinon, koji je klasificiran kao kancerogen za glodavce i kao leukemogen za ljude (IARC 1987), u istraživanjima kronične toksičnosti kod glodavaca dokazano je da hidrokinon posjeduje kancerogene osobine te potiče nastanak benignih tumora jetre i bubrega kao i mononuklearne leukemije (NTP, 1989; Shibata i sur., 1991; Whysner i sur., 1995; Roza i sur., 2003). Negativni učinci hidrokinona na ljudsko zdravlje počinju nakon njegove autooksidacije ili enzimima pomognute aktivacije.
S druge pak strane dokazano je da je hidrokinon vrlo učinkovit inhibitor lipidne peroksidacije, što ukazuje i na njegove antioksidacijske, a time i antimutagena, odnosno antikancerogena

svojstva (Soucek i sur., 2000; Roza i sur., 2003). Hidrokinon se prije smatrao najučinkovitijim inhibitorom melanogeneze zahvaljujući mogućnosti da interferira s radom tirozinaze, enzimom koji je primarno uključen u rane stadije melanogeneze (Palumbo i sur., 1991). Novija istraživanja dokazala su da hidrokinon zapravo slabo inhibira humanu tirozinazu te da je njegov konačni citotoksični učinak izraženiji od same inhibicije (Palumbo i sur., 1991). Upravo je zato on u EU-u zabranjen u kozmetičkim proizvodima, ali se i dalje može pronaći u ljekarnama u SAD-u. Hidrokinon se također pokazao toksičnim za različite organe, pogotovo bubrege. Kod ljudi u većim količinama može izazvati tinitus, vrtoglavice, glavobolje, mučnine, povraćanje, edem unutarnjih organa, cijanozu, konvulzije, delirij i kolaps (EPA Air Toxics, 2000).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak vodenog ekstrakta listova obične planike (*Arbutus unedo* L.) i arbutina u dozama od 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinona u dozama od 0,28 mg/mL, 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL na stanice PK-15 i HepG2 u uvjetima *in vitro* određivanjem: vijabilnosti tretiranih stanica pomoću MTS testa, udjela živih i mrtvih stanica metodom bojenja etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO) te stupnja oštećenja molekule DNA primjenom komet testa.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprava standardnih otopina

2.1.1. Biljni materijal i priprema vodenog ekstrakta listova obične planike

Za potrebe istraživanja korišten je unaprijed priređeni liofilizirani vodeni ekstrakt listova obične planike. Vodeni ekstrakt priređen je od listova obične planike prikupljenih u Malom Lošinju na otoku Lošinju po principu slučajnosti s većeg broja stabala i grmova. Uzorci listova osušeni su u jednom sloju u tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi te usitnjeni u prah u laboratorijskom mlinu. Tri grama praha otopljeno je u 80 mL vode te inkubirano 60 minuta na 50 °C uz povremeno miješanje. Nakon toga otopina je centrifugirana 15 minuta na 4000 okretaja. Supernatant je liofiliziran na -50 °C tijekom 48 sati.

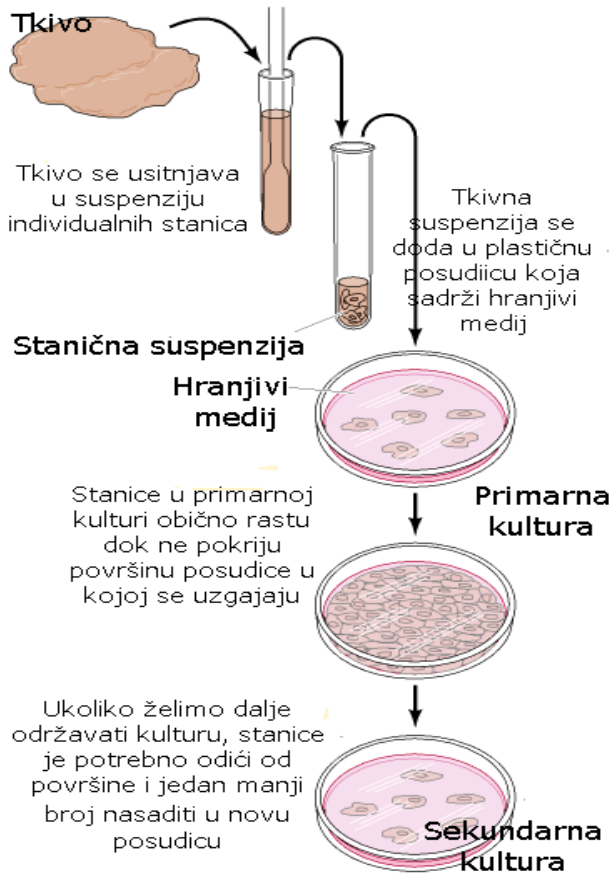
2.1.2. Priprema otopine ekstrakta listova obične planike, arbutina i hidrokinona

U pripremi otopina korišten je liofilizirani vodeni ekstrakt listova obične planike, 98 % -tni arbutin i 99 % -tni hidrokinon proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka) i odgovarajuće medije. Vodeni ekstrakt listova obične planike i arbutina korišteni su u koncentracijama 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL, a hidrokinon u koncentracijama 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL.

2.2. Kultura stanica

Epitelne stanice bubrega svinje (PK–15) i stanične linije hepatocelularnog karcinoma (HepG2) uzgojene su na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Oba tipa stanica adheriraju na podlogu (www.lgcstandards-atcc.org). Oba tipa stanica uzgojena su u Petrijevoj zdjelici za uzgoj staničnih kultura s odgovarajućim volumenom kompletnog hranjivog medija (6 - 8 mL) (Slika 4). Stanice PK–15 u standardnim i sterilnim uvjetima u RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen,

Kanada), a HepG2 stanice u EMEN (Sigma – Aldrich) hranjivom mediju. Tijekom istraživanja stanice su držane u komori za uzgoj staničnih kultura na 37 ^{o}C pri 95 % vlažnosti zraka u atmosferi s 5,0 %-tnim CO_2 (Heraeus Hera Cell 240 inkubator, Langenselbold, Njemačka). Kompletni mediji sadrže L-glutamin (Lonza Group Ltd, Švicarska) kojem su dodani 7 mM glukoza (Kemika), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich Co., USA), 0,6 mM piruvat (Fluka, Švicarska), 10 % fetalnog goveđeg seruma (inaktiviran toplinom; FBS, engl. fetal bovine serum) (South American Origin, Biosera, USA) i 1 % 100x koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, 25 µg/mL amfotericina B) (Lonza Group Ltd, Švicarska). Stanice su kultivirane do 80 – 90 % konfluentnosti, što je kontrolirano invertnim mikroskopom (Diavert, Leitz, Njemačka). Nakon postizanja tražene konfluentnosti, stanice su presađene ili tretirane određenim agensima.



Slika 4. Uspostavljanje kulture animalnih stanica (preuzeto od http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor293.htm)

2.2.1. Presađivanje stanica

Kompletni hranjivi medij iznad adherentnih stanica ukloni se vakuum-sisaljkom. Kako bi se uklonili ostaci seruma koji sadrži α1-antitripsin, koji bi mogao inhibirati djelovanje tripsina, stanice se isperu fiziološkom otopinom. U sljedećem koraku fiziološka se otopina ukloni vakuum-sisaljkom i doda se 3 mL 0,25 % -tne otopine Tripsin - EDTA (Sigma-Aldrich Co., USA) kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon 5 – 15 minuta inkubacije na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO2 na stanice se doda 6 – 8 mL kompletnog medija koji zaustavlja djelovanje tripsina te se stanice resuspendiraju pipetom. Stanična se suspenzija prenese u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira (Eppendorf 5702) 5 minuta na 1200 okretaja pri sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni pipetom, a talog stanica resuspendira u 1 mL kompletnog medija. Najprije se odredi broj stanica u suspenziji, a onda se određeni volumen suspenzije stanica nasadi u novu bocu za uzgoj staničnih kultura, u koju je prethodno stavljen određeni volumen kompletnog RPMI medija. Ukoliko se stanice broje, razrjeđuju se dodatkom medija i rasađuju u odgovarajuće boce tako da bude 2 x 10^5 stanica/cm^2. Boca se nakon presađivanja spremi u inkubator na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

Prilikom kultivacije stanice su presađivane dva puta tjedno.

2.2.2. Tretiranje stanica

2.2.2.1. Vijabilnost stanica (MTS test)

Stanice se nasade na mikrotitarske pločice sa 96 jažica u određenom broju (2×10^4) i volumenu (100 μL). Inkubiraju se 24 sata na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO2 nakon čega se tretiraju s vodenog ekstraksta listova obične planike i arbutina u dozama od: 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,0114 mg/mL te s 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL; 0,008 mg/mL hidrokinona tijekom 24 sata. Kontrolna skupina držana je u istim uvjetima.

2.2.2.2. Metoda bojanja EtBr/AO i Komet test

Stanice se nasade na mikrotitarske pločice sa 12 jažica u određenom broju (2×10^5) i volumenu (1 mL). Inkubiraju se 24 sata na 37 °C pri 95% vlažnosti zraka i 5% CO2, nakon čega se tretiraju s vodenog ekstrakta listova obične planike i arbutina u dozama od: 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,0114 mg/mL te s 0,28 mg/mL, 0,14 mg/mL; 0,008 mg/mL hidrokinona tijekom 24 sata. Kontrolna skupina držana je u istim uvjetima.

2.2.3. Priprema stanica za analizu

Stanice se pripreme se na sljedeći način: iz jažica se izlije medij, a stanice se isperu fiziološkom otopinom. Dizanje stanica vrši se 0,5 % tripsinom tijekom 15 minuta. Nakon toga tripsin se inaktivira dodavanjem medija sa 10 % FCS (engl. Foetal bowine serum). Stanice se od medija odvoje centrifugiranjem na 1000 RPM pri temperaturi od 37 °C u trajanju od 5 minuta. Talog stanica resuspendira se u 100 μL medija. Ovako pripremljene stanice korištene su za metodu bojanja Et/Br i AO, te komet test.

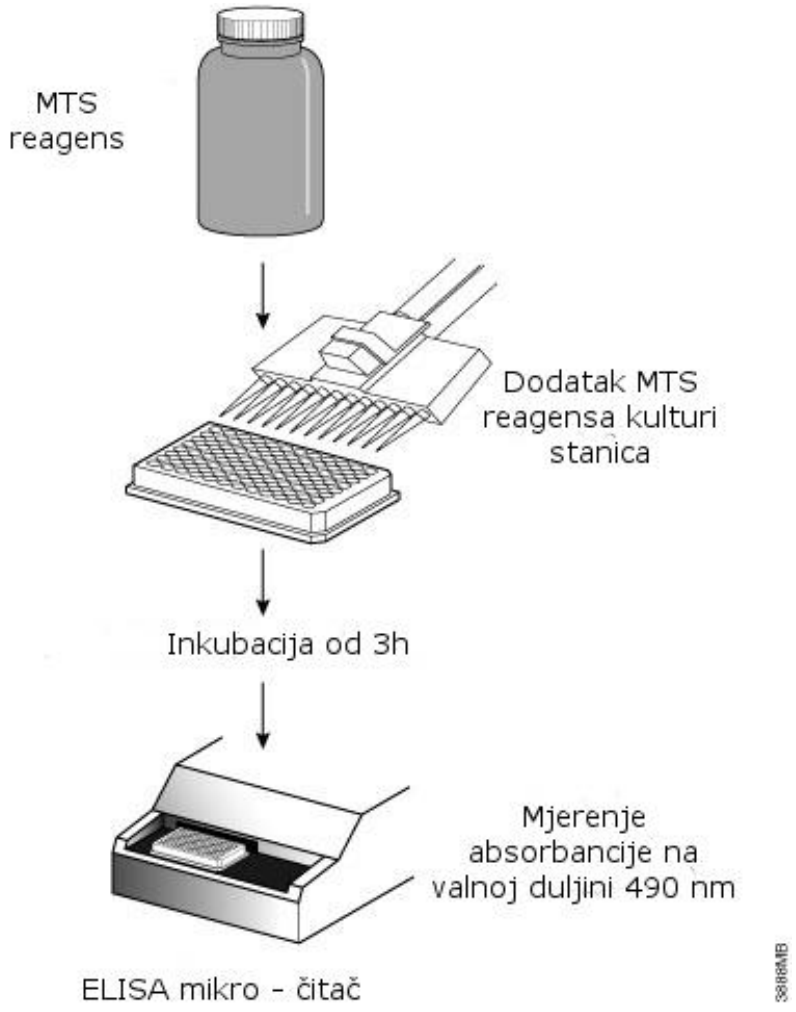
2.3. Test vijabilnosti stanica (MTS test)

MTS test kolorimetrijska je metoda za utvrđivanje vijabilnosti stanica. Tom metodom možemo mjeriti proliferaciju, odnosno aktivaciju stanica te citotoksičnost tvari koje istražujemo (Malich i sur., 1997). MTS tetrazolium komponenta, poznata kao Owensov reagens, [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolium, sol; MTS(a)] u stanicama se kemijski reducira u obojeni, u mediju topivi, formazan. Test mjeri aktivnost enzima dehidrogenaze, koji reducira (cijepa tetrazolni prsten) žuti, topivi MTS (dimetiltiazol difenil tetrazolium bromid) u ljubičasti, netopivi formazan. Enzim dehidrogenaza prisutan je samo u živim, metabolički aktivnim stanicama. Dakle stvaranje formazana proporcionalno je broju živih stanica. Intenzitet stvorene boje, tj. apsorbancija nastalog obojenja mjera je mitohondrijske aktivnosti, odnosno vijabilnosti stanica.

Po završetku tretmana stanica u svaku se jažicu bez prisustva svjetla dodaje 20 µL MTS reagensa (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Wisconsin, USA) bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom tri sata na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO2 (Slika 5). Slijepa je proba kompletni hranjivi medij određenog tipa stanica. Apsorbancije se očitaju na ELISA mikro–čitaču (Bio-Rad, Model 550 mikro–čitač) s odgovarajućim filtrom valne duljine od 490 nm.
Vijabilnost se izražava prema formuli:

$$\%\ vijabilnosti\ = \frac{srednja\ vrijednost\ Apsorbancije\ uzorka\ x\ 100}{srednja\ vrijednost\ Apsorbancije\ kontrole}$$

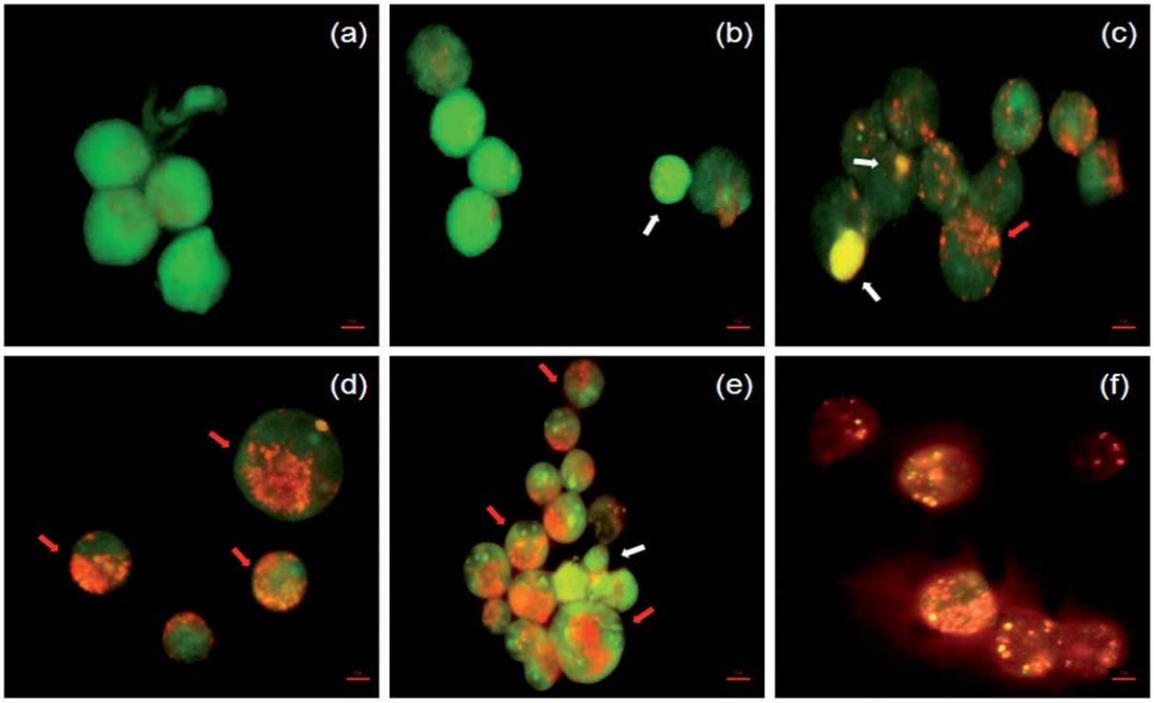
Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica ± standardna pogreška.



Slika 5. Shematski prikaz protokola (preuzeto s http://www.promega.com/).

2.4. Preživljavanje stanica procijenjeno primjenom fluorescencijskog testa bojenja s etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO)

Za određivanje udjela apaptoze i nekrote, odnosno udjela živih i mrtvih stanica u istraživanju je korišten fluorescencijski test bojenja s etidijevim bromidom i akridin oranžem u uvjetima *in vitro*. Metoda se zasniva na različitom afinitetu vezanja etidijevog bromida (EtBr) i akridin oranža (AO) živih i mrtvih stanica (Dukeu i Cohenu, 1992). Akridin oranž boji samo žive stanice s funkcionalnom membranom i fluorescira zeleno, dok etidij bromid ulazi u stanice s oštećenim membranama, veže se za njihovu DNA te fluorescira crveno. Stanice u apoptozi po izgledu i stupnju obojenosti razlikuju se od živih i mrtvih stanica. U ranim fazama apoptoze jezgra je fragmentirana i obojena zeleno, za razliku od kasnijih faza kada prevladava narančasto crvena obojenost uz jasno vidljivu fragmentaciju (Slika 6).

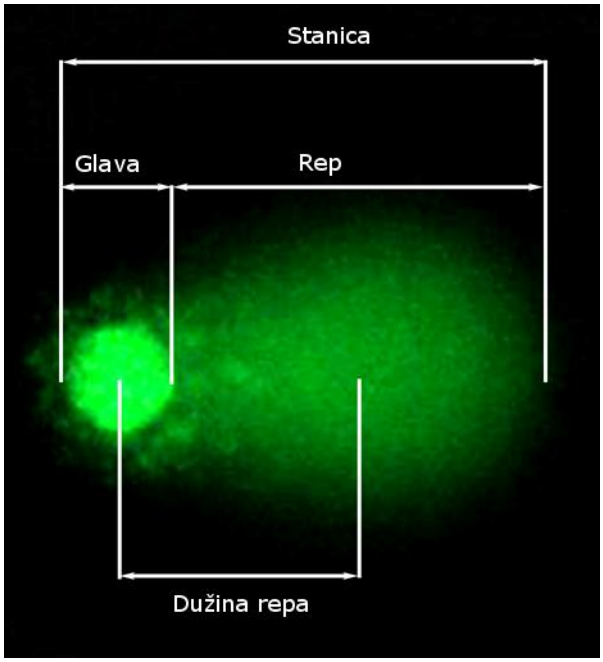


Slika 6. Žive (a, b, c), stanice u ranoj (d) i kasnoj (e) apaptozi, te mrtve (f) stanice nakon bojanja AO/EtBr gledane pod fluorecencijskim mikroskopom (preuzeto Vankatesan i sur. 2012)

Nakon tretmana medij se izlije, a stanice dignu i resuspendiraju u 100 µL odgovarajućeg hraljivog medija. Na sredinu predmetnog staklaca stavi se mikropipetom 10 µL suspenzije stanica u hranjivom mediju. Prije samog mikroskopiranja u tamnoj komori drugom mikropipetom stavi se 5 µL boje [50 µg/µL EtBr i 50 µg/µL AO (1.1 v/v)]. Uzorak se pokrije pokrovnicom i odmah se pristupi mikroskopiranju na fluorescencijskom mikroskopu (Carl Zeiss Jena). Mjerenje se provodi u duplikatu (2x100 stanica), a broje se žive i mrtve stanice te stanice u apoptozi.

2.5. Alkalni komet test

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu (SCGE – od engl. single cell gel electrophoresis assay) tehnika je koja se primjenjuje u toksikologiji, gdje je uobičajena metoda istraživanja genotoksičnosti u uvjetima *in vivo* i *in vitro*, a služi za detekciju oštećenja DNA molekule uzrokovanih različitim kemijskim i fizikalnim agensima. Osim toga pomoću komet testa moguće je praćenje popravka stanične DNA te detekcija stanica u apoptozi kao i nekrotičnih stanica (Sreelatha i sur., 2015). Test se zasniva na uklapanju stanice u mikrogel agaroze. Pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta dolazi do liziranja citoplazme i membranske strukture u stanici te se oslobađa ukupna DNA koja se zatim denaturira u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava elektroforezi. Tijekom elektroforeze mali fragmenti DNA nastali jednočlanim ili dvolančanim lomovima putuju kroz pore gela prema anodi. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel. Zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. Nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom vidljivi su kao "kometi". Tri su osnovna parametra koja se mjere testom: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment (Slika 7). Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost koju su fragmenti DNA prešli tijekom elektroforeze. Mjeri se od sredine glave kometa, a izražava se u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotni udio DNA koja je migrirala u rep, proporcionalan je broju lomova u DNA (Tice i sur., 2000), a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni se moment izračunava pomoću računalnog programa kao umnožak dužine repa i intenziteta repa kometa.



Slika 7. Tipično oštećenje DNA u alkalnom komet testu (preuzeto sa https://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-3-well)

U istraživanju je primijenjena standardna izvedba komet testa u alkalnim uvjetima (Singh i sur. 1988.) prilagođena radu sa stanicama.

Za izradu uzoraka pripremljene su svježe otopine 1 % -tne i 0,6 % -tne agaroze normalnog tališta (NMP – engl. *Normal Melting Point*) (Sigma), te 0,5 % -tne LMP (LMP – engl. *Low Melting Point*) (Sigma). Na brušeno predmetno stakalce nakapa se 1 % -tna NMP agaroza i pokrije pokrovnicom, koja se ostavi na sobnoj temperaturi. Nakon polimerizacije gel i pokrovnica uklone se sa stakalca, a mikropipetom se na osušeno staklo nakapa 300 µL 0,6 % -tne NMP agaroze. Stakalce se pokrije pokrovnicom i ostavi na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije skida se pokrovnica i stavlja novi sloj od 100 µL 0,5 % -tne LMP agaroze pomiješane s 10 µL uzorka stanica. Poslije 10 minuta polimeriziranja na ledu, sloj se prekriva sa 100 µL 0,5 % -tne LMP agaroze koja je opet držana na ledu 10 minuta.

Liza staničnih struktura

Neposredno prije upotrebe pripremljen je pufer pH vrijednosti 10 iz matične otopine za lizu [NaCl (Kemika), Na-laurilsarkozinat (Sigma-Aldrich, SAD), Tris-HCl (Sigma-Aldrich)], DMSO (Kemika), Tritona X-100 (Sigma-Aldrich)]. Preparatom se ukloni pokrovnica i urone se u navedeni pufer za lizu na vremenski period od 15 minuta pri temperaturi od 4 °C.

Elektroforeza

Nakon lize preparati su prebačeni u kadicu za horizontalnu elektroforezu. Elektroforeza se provodi u alkalnom puferu za denaturaciju s pH 13 [NaOH (Kemika), Na_2EDTA (Sigma-Aldrich)], pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V te u vremenskom trajanju od 20 minuta.

Neutralizacija

Nakon elektroforeze preparate je potrebno neutralizirati. Neutralizacija se provodi pomoću pufera (0,4 M Tris-HCl) pH-vrijednosti 7,5. Preparati se isperu uzastopno tri puta po 5 minuta.

Dehidracija

Preparati se nakon neutralizacije prenesu u alkohol na dehidraciju od 7 minuta. Nakon toga se izvade iz alkohola i ostave sušiti do drugog dana.

Bojanje preparata

Za bojanje preparata koristi se 100 µL fluorescentne boje etidij bromid koncentracije 20 µg/mL (Sigma-Aldrich) u trajanju od 10 minuta. Preparati se pokriju pokrovnicom, a u svrhu stabilizacije boje prije početka analize držale se u mraku najmanje 15 minuta.

Analiza preparata

Za preparat je korišten epifluorescencijski mikroskop (Olympus, Japan). U svakom preparatu izmjereno je 200 kometa i određena su tri najvažnija parametra (dužina repa, % DNA u repu, repni moment) pomoću programa za analizu slike (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK).

2.6. Statističke metode

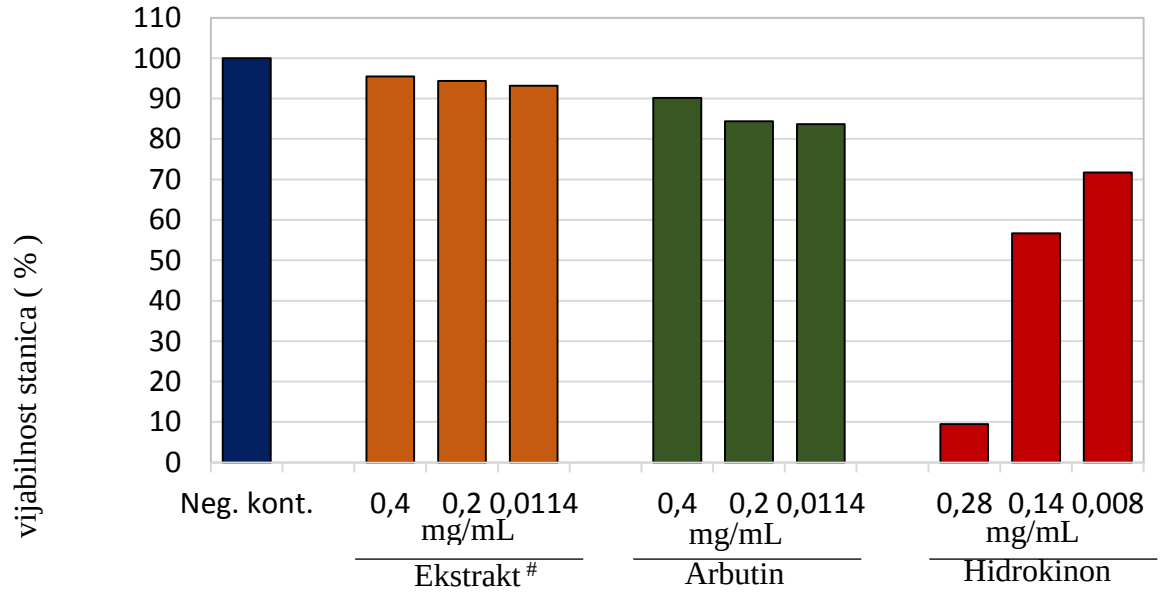
Rezultati svih metoda obrađeni su uz pomoć Excela deskriptivnom statistikom. Pomoću računalnog programa STATISTICA 13.1 (StatSoft, Tulsa, SAD) statističke značajnosti u određivanju preživljenja stanica etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO) testirane su χ^2-testom. Analiza rezultata komet testa izvršena je uz primjenu analize varijance (ANOVA) sa *post-hoc* Scheffeovom modifikacijom. Za prag statističke značajnosti za sve metode određen je $p \leq 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Test vijabilnosti stanica (MTS test)

3.1.1. Vijabilnost PK-15 stanice

Rezultati MTS testa nakon obrade uzorka dobiveni su mjerenjem apsorbancije na ELISA mikročitaču s odgovarajućim filtrom (490 nm) (Slika 8). Stanice PK-15 tretirane hidrokinom pokazuju smanjenu vijabilnost u odnosu na negativnu kontrolu. U tretmanu hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL pokazuju vijabilnost od samo 9,49 % . U dozama od 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL hidrokinon ne uzrokuju vijabilnost stanica manju od 50 % . Najmanja razlika u vijabilnosti stanica između negativne kontrole i tretmana primjećena je u stanicama tretiranim vodenim ekstraktom listova obične planike. Također možemo primijetiti da su dobiveni rezultati ekstrakta listova obične planike i arbutina u svim testiranim koncentracijama slični.



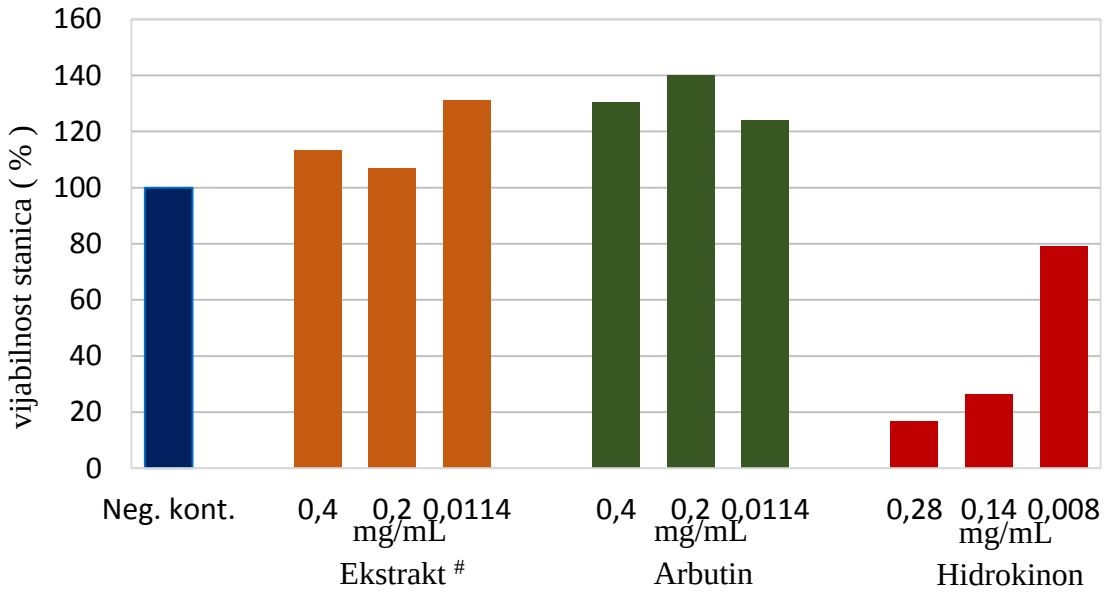
Slika 8. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike[#], arbutina te hidrokinona na vijabilnost PK-15 stanica u uvjetima *in vitro* tijekom 24-satnog tretmana.

Uzorci stanice obrađeni su u triplikatu. Vijabilnost je procijenjena MTS testom, a postotak vijabilnosti prikazan u odnosu na kontrolu (100%).

Neg. kont. – negativna kontrola

3.1.2. Vijabilnost HepG2 stanice

Na Slici 9 prikazani su rezultati MTS testa 24 sata nakon obrade HepG2 stanica vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutina u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinona u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14mg/mL i 0,008 mg/mL uzoraka mjerenja apsorbancije na ELISA mikročitaču s odgovarajućim filtrom (490 nm). Stanice HepG2 obrađene hidrokinonom pokazuju smanjenu vijabilnost u odnosu na stanice tretirane vodenim ekstraktom listova obične planike, arbutinom te negativnom kontrolom. Najmanja razlika u odnosu na negativnu kontrolu primjećuje se u skupinama tretiranim arbutinom u dozi od 0,2 mg/mL (140,12 %). Hidrokinon u dozi od 0,28 mg/mL smanjuje vijabilnost HepG2 stanica za 16,60 % u odnosu na negativnu kontrolu, dok hidrokinon u dozi od 0,14 mg/mL smanjuje vijabilnost stanica HepG2 za 26,48 % . Također možemo primijetiti da su rezultati vodenog ekstrakta listova obične planike i arbutina slični, tj. da je došlo do povećanja vijabilnosti u odnosu na kontrolu.



Slika 9. Učinak vodenog ~~ektrakta listova~~ obične~~ planike~~[#]~~,~~ arbutina te~~ hidrokinona~~ na vijabilnost HepG2 stanica u uvjetima *in vitro* tijekom 24-satnog tretmana.

Uzorci stanice obrađeni su u triplikatu. Vijabilnost je procijenjena MTS testom, a postotak vijabilnosti prikazan u odnosu na kontrolu (100%).

Neg. kont. – negativna kontrola

3.2. Preživljavanje stanica procijenjeno primjenom fluorescencijskog testa bojenja s etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO)

Nakon završenog 24-satnog tretmana u uvjetima *in vitro* s hidrokinonom, arbutinom i vodenim ekstraktom listova obične planike primjenom fluorescencijskog testa bojenja s etidijevim bromidom i akridin oranžem (EtBr/AO) ispitano je preživljavanje PK-15 i HepG2 sranica u svim tretiranim uzorcima te negativnoj kontroli.

3.2.1. PK-15 stanice

Dobiveni rezultati pokazuju da preživljavanje PK-15 stanica pada pri niskim koncentracijama uzoraka testiranih arbutinom, a kod uzoraka tretiranim hidrokinom padom koncentracije raste broj živih stanica. Jedino u uzorcima tretiranim vodenim ekstraktom listova obične planike nema jasnog koncentracijski ovisnog povećanja u broju apoptoza, točnije kod tretmana 0,0114 mg/mL utvrđen je isti broj apoptoza kao i kod tretmana s 0,4 mg/mL.U skupini tretiranoj hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL nisu zabilježene žive stanice (Tablica 2). Općenito, u pogledu tipa stanične smrti apoptoza dominira nad nekrozom gotovo u svim testiranim uzorcima osim hidrokinona u dozi od 0,28 mg/mL. Svi testirani uzorci imaju manji broj mrtvih stanica, apoptoza i nekroza u odnosu na uzorak tretiran hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL.

Statistička značajnost rezultata ispitana je pomoću χ^2-testa. Utvrđeno je sljedeće: u uzorcima tretiranim hidrokinonom u dozi od 0,14 mg/mL postoji statistički značajan ($p = 0,00001$), dok uzorci tretirani vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutinom ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.

Tablica 2. Rezultati fluorescencijskog testa (bojenje etidijevim bromidom i akridin oranžem) na PK-15 stanicama tretiranim s vodenim ekstraktom listova obične planike[#], arbutinom i hidrokinonom u uvjetima *in vitro.*

GRUPE	ŽIVE STANICE (%)	MRTVE STANICE (%)		
		RANA APOPTOZA	KASNA APAPTOZA	NEKROZA
Neg. kont.	97,5	1,0	0,5	1
Ekstrakt[#] (0,4 mg/μL)	99,5	0,5	0,0	0,0
Ekstrakt[#] (0,2 mg/μL)	96,5	0,0	1,5	2,0
Ekstrakt[#] (0,0114 mg/μL)	99,0	0,5	0,0	0,5
Arbutin (0,4 mg/μL)	99,0	1,0	0,5	1,0
Arbutin (0,2 mg/μL)	97,5	1,5	0,5	1,5
Arbutin (0,0114 mg/μL)	96,5	1,5	0,5	0,5
Hidrokinon (0,28 mg/μL)	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Hidrokinon (0,14 mg/μL)	85,0	7,5	6,0	1,5
Hidrokinon (0,008 mg/μL)	95,5	2,0	1,5	2,0

Mikroskopske analize provedene su na fluorescencijskom mikroskopu pod povećanjem 400x. U svakom pojedinačnom uzorku izbrojeno je 200 stanica. * Statistički značajno (χ^2-test, $p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu.

Neg. kont. – negativna kontrola

3.2.2. HepG2 stanice

Tablica 3 pokazuje da preživljavanje HepG2 stanica raste pri niskim koncentracijama kod skupina tretiranim hidrokinom i arbutinom, a kod uzoraka tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike najveći broj živih stanica primijećen je pri srednjoj koncentraciji (0,2 mg/mL). Zanimljivo je da je preživljavanje u uzorcima vodenog ekstrakta listova obične planike i arbutina bilo čak i više od kontrole. U svim testiranim uzorcima nije zamijećena koncentracijski ovisna smrtnost stanica, dok u pogledu tipa stanične smrti apoptoza dominira nad nekrozom.

Sve testirani uzorci imaju manji broj mrtvih stanica, apoptoza i nekroza u odnosu na uzorak tretiran hidrokinonom koncentracije 0,28 mg/mL.

Statistička značajnost rezultata ispitana je pomoću χ^2-testa. Utvrđeno je sljedeće: u uzorcima tretiranim hidrokinonom u svim dozama (0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL) postoji statistički povećan broj mrtvih stanica, apoptoza i nekroza u odnosu na negativnu kontrolu. Uzorci tretirani vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutinom ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu.

Tablica 3. Rezultati fluorescencijskog testa (bojenje etidijevim bromidom i akridin oranžem) na HepG2 stanicama tretiranim s vodenim ekstraktom listova obične planike[#], arbutinom i hidrokinonom u uvjetima *in vitro.*

GRUPE	ŽIVE STANICE (%)	MRTVE STANICE (%)		
		RANA APOPTOZA	KASNA APOPTOZA	NEKROZA
Neg. kont.	96,5	2,0	0,0	1,5
Ekstrakt[#] (0,4 mg/μL)	94,5	2,5	1,0	2,0
Ekstrakt[#] (0,2 mg/μL)	98,0	1,5	0,0	0,5
Ekstrakt[#] (0,0114 mg/μL)	92,0	5,0	1,0	2,0
Arbutin (0,4 mg/μL)	94,0	4,0	0,5	1,5
Arbutin (0,2 mg/μL)	91,5	4,0	1,5	3,0
Arbutin (0,0114 mg/μL)	98,0	0,5	0,5	1,0
Hidrokinon (0,28 mg/μL)	62,0	12,5*	20,5*	5,0*
Hidrokinon (0,14 mg/μL)	89,5	6,0*	1,5*	3,0*
Hidrokinon (0,008 mg/μL)	86,5	10,0*	2,0*	1,5*

Mikroskopske analize provedene su na fluorescencijskom mikroskopu pod povećanjem 400x. U svakom pojedinačnom uzorku izbrojeno je 200 stanica. * Statistički značajno (χ^2-test, $p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu.
Neg. kont. – negativna kontrola

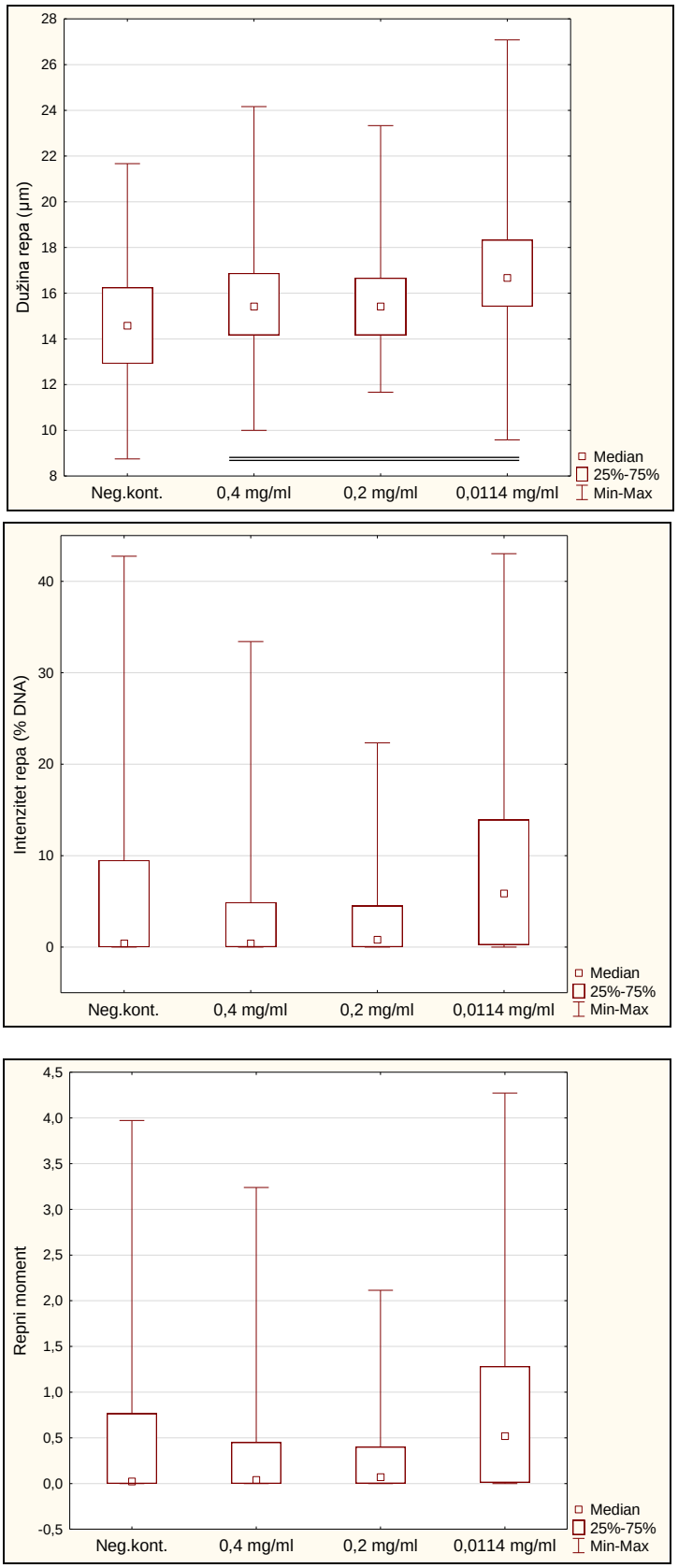
3.3. Alkalni komet test

Primjenom alkalnog komet testa izmjereni su parametri: dužina repa (μm), intenzitet repa (%) i repni moment kako bi se procijenio genotoksični učinak ekstrakta listova obične planike, arbutina i hidrokinona na stanice PK-15 i HepG2. Navedeni parametri komet testa analizirani su pomoću parametra deskriptivne statistike kojima pripadaju: srednja vrijednost sa standardnom pogreškom, medijan, minimum i maksimum. Statistička značajnost (P<0,05) vrijednosti triju parametara kometa između pokusnih grupa ispitana je pomoću analize varijance uz primjenu *post-hoc* Scheffé-ovog testa.

3.3.1. Primarna oštećenja DNA na stanicama PK-15 izmjerena alkalnim komet testom

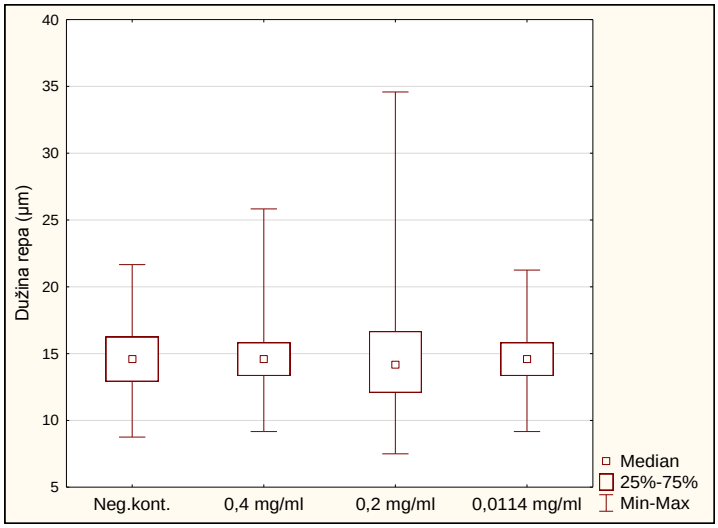
Analizirana su primarna oštećenja DNA u PK-15 nakon 24 sata izlaganja tretmanu vodnog ekstrakta listova obične planike i arbutina u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinona u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL.

U skupinama tretiranim vodenim ekstraktom listova obične planike izmjerene vrijednosti (srednja vrijednost±standardna pogreška) parametara dužina repa pokazuje povišenu (15,61±0,16 za 0,4 mg/mL; 15,40±0,13 za 0,2 mg/mL), ali ne i statistički značajnu (P<0,05) vrijednost u odnosu na kontrolu (14,84±0,18), dok stanice tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike u dozi od 0,0114 mg/mL (17,06±0,19) pokazuje statistički značajno povišenu vrijednost (Slika 10a, Tablica 4). Vrijednosti parametara intenzitet repa stanica tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike u dozi od 0,4 mg/mL (3,61±0,43) i 0,2 mg/mL (1,890±0,21) pokazuju smanjenu, a u dozi od 0,0114 mg/mL (8,75±0,70) povišenu ali ne i statistički značajnu vrijednost (P<0,05) u odnosu na kontrolu (6,92±0,78) (Slika 10b, Tablica 5). Vrijednost parametra repni moment stanica tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike smanjene su za doze 0,4 mg/mL (0,32 ±0,04) i 0,2 mg/mL (0,25±0,03) ali smanjenje nije statistički značajno, dok stanice tretirane dozom 0,0114 mg/mL (0,82±0,07) pokazuju statistički značajno povišene vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu (0,60±0,07) (Slika 10c, Tablica 6).

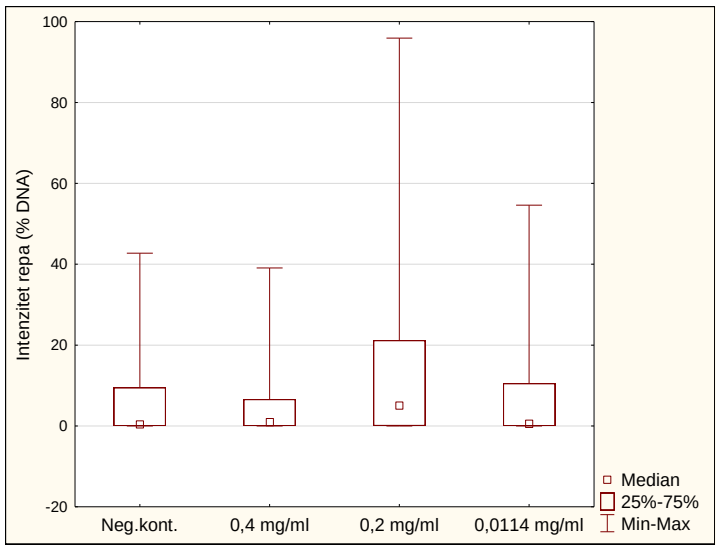


Slika 10. Vrijednosti parametara komet testa (dužina repa, intenzitet repa, repni moment) u stanicama PK-15 nakon tretmana vodenim ekstraktom listova obične planike u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL. Neg.kont. – negativna kontrola

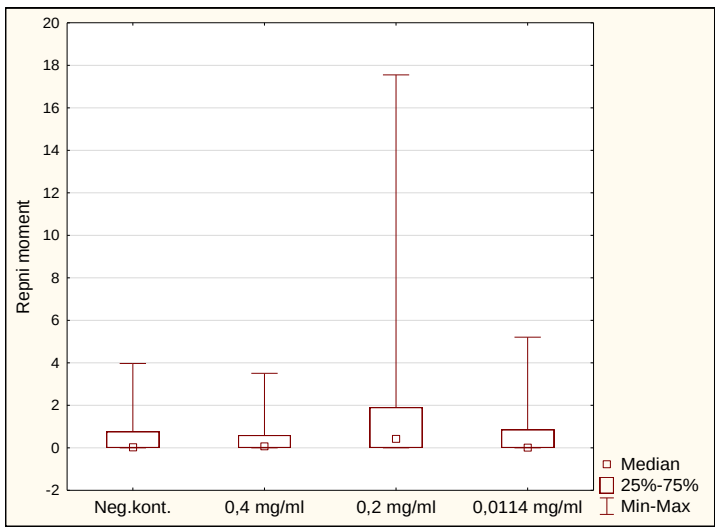
Nadalje zamijećena je niža ali statistički neznačajna (P<0,05) vrijednost (srednja vrijednost±standardna pogreška) parametra dužina repa za sve koncentracijame arbutina (14,79 ±0,18 za 0,4 mg/mL; 14,55±0,26 za 0,2 mg/mL i 14,61±0,13 za 0,0114 mg/mL) u odnosu na kontrolu (14,84 ± 0,18) (Slika 11a, Tablica 4). Vrijednost parametra intenzitet repa stanica tretiranih arbutinom u dozi od 0,2 mg/ml (12,12±0,86) značajno je povišena u odnosu na kontrolu (6,92±0,78), dok u dozama od 0,4 mg/mL (5,56±0,62) i 0,0114 mg/mL (4,98±0,52) povećanje nije statistički značajno. (Slika 11b, Tablica 5). Vrijednosti parametra repni moment slijedi isti princip kao i vrijednosti parametra intenziteta repa. Stanice tretirane dozom 0,4 mg/mL (0,30 ±0,04) i 0,0114 mg/mL (0,40±0,04) pokazuju snižene vrijednosti u odnosu na kontrolnu (0,60±0,07), dok stanice tretirane arbutinom u dozi od 0,2 mg/mL (1,06±0,08) pokazuje statistički značajno povišenu vrijednost (P<0,05) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,60±0,07) (Slika 11c, Tablica 6).



A



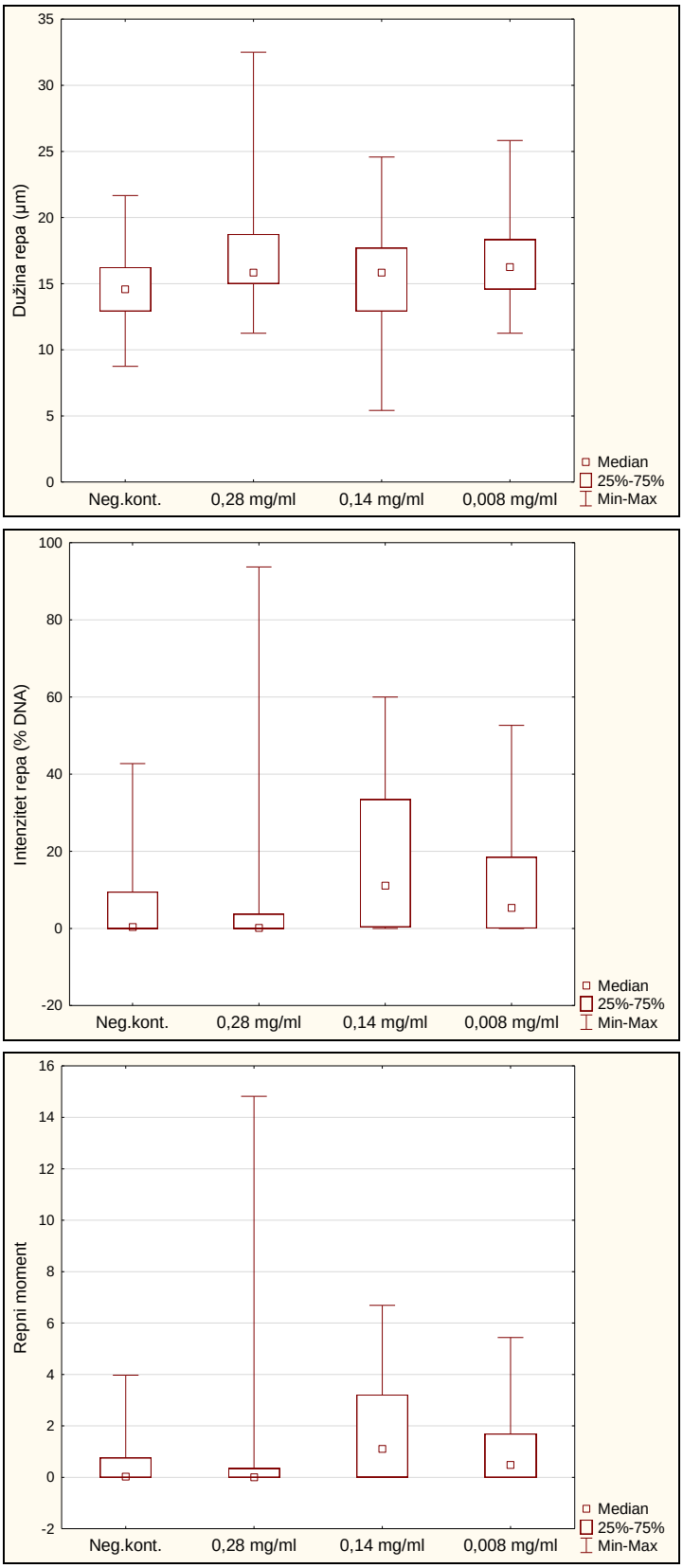
B



C

Slika 11. Vrijednosti parametara komet testa (dužina repa, intenzitet repa, repni moment) u stanicama PK-15 nakon tretmana nakon tretmana arbutna u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL. Neg.kont. – negativna kontrola

U PK-15 stanicama tretiranim hidrokinom zamijećene su statistički značajno (P<0,05) povišene vrijednosti parametra dužina repa komet testa za koncentracije 0,28 mg/mL (16,93 ±0,22) i 0,008 mg/mL (16,75±0,20 za) u odnosu na kontrolu (14,84±0,18), dok povećanje nije statistički značajno (P<0,05) kod srednje doze 0,14 mg/mL (15,48±0,26) za) (Slika 12a, Tablica 4). Vrijednosti parametra intenzitet repa skupine tretirane hidrokinonom u dozi od 0,14 mg/mL (14,64±1,16) pokazuje statistički značajno povišenje u odnosu na kontrolu (6,92±0,78), dok stanice tretirane u dozi od 0,28 mg/mL (2,91±0,37) i 0,008 mg/mL (5,10±0,60) pokazuju smanjenu ali ne i statistički značajnu vrijednost u odnosu na kontrolu (6,92±0,78) (Slika 12b, Tablica 5). Vrijednost parametra repni moment stanica tretiranih hidrokinonom u dozi od 0,14 mg/mL (1,37±0,11) značajno je povišeno u odnosu na kontrolu (0,60±0,07), dok u dozama od 0,28 mg/ml (0,25±0,03) i 0,008 mg/mL (0,437±0,05) sniženje nije statistički značajno. (Slika 12c, Tablica 6).

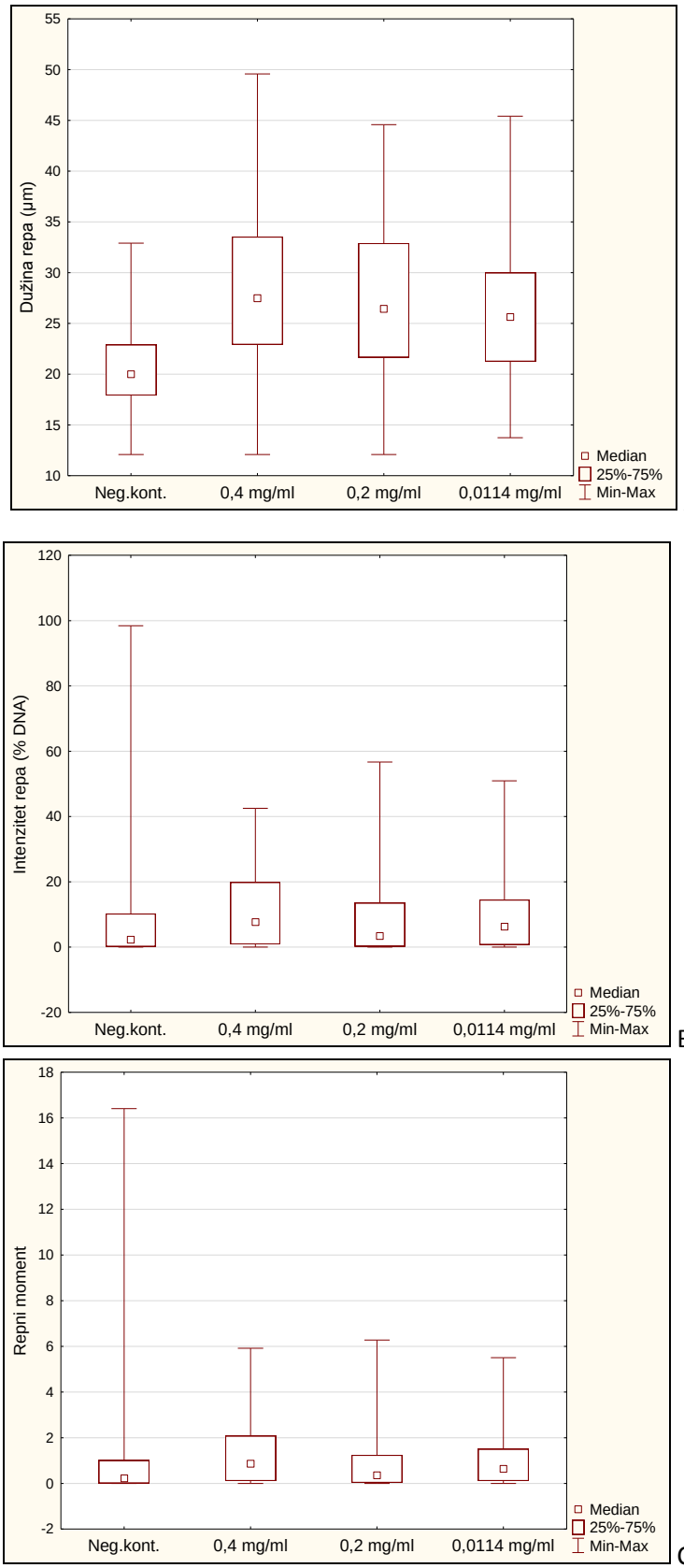


Slika 12. Vrijednosti parametara komet testa (dužina repa, intenzitet repa, repni moment) u stanicama PK-15 nakon tretmana hidrokinonom u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL. Neg.kont. – negativna kontrola

3.3.2. Primarna oštećenja DNA na stanicama HepG2 izmjerena alkalnim komet testom

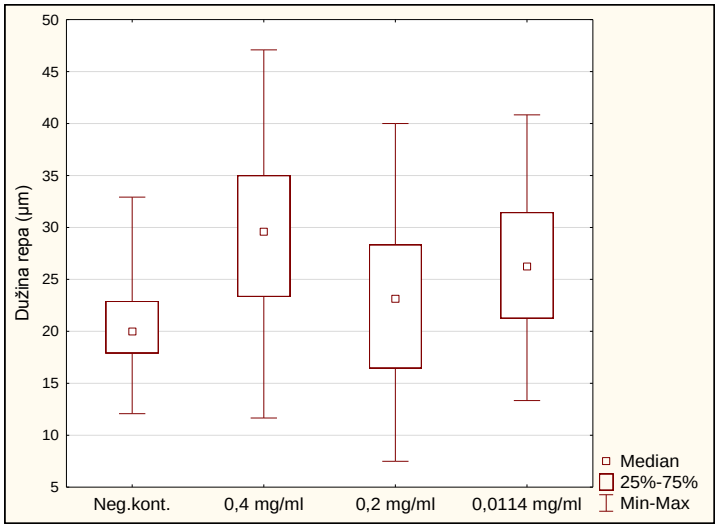
Analizirana su primarna oštećenja DNA u HepG2 stanicama nakon 24 satnog tretmana vodnim ekstraktom listova obične planike i arbutinom u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinonom u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL.

U stanicama HepG2 tretiranim vodenim ekstraktom listova obične planike izmjerene vrijednosti (srednja vrijednost±standardna pogreška) parametra dužina repa u svim testiranim koncentracijama (28,57 ±0,54 za 0,4 mg/mL; 27,07±0,48 za 0,2 mg/mL; 26,04±0,43 za 0,0114 mg/mL) su statistički značajno povećane u odnosu na kontrolnu skupinu (20,61 ± 0,28) (Slika 13a, Tablica 4). Vrijednosti parametra intenzitet repa u sve tri koncentracije pokazuje povišenu (11,99±0,86 za 0,4 mg/mL; 8,77±0,86 za 0,2 mg/mL i 9,36±0,74 za 0,0114 mg/mL), ali ne i statistički značajnu (P<0,05) vrijednost u odnosu na kontrolu (7,70±0,83) (Slika 13b, Tablica 5). Vrijednost parametra repni moment stanica tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike u dozi od 0,4 mg/ml (1,29±0,09) značajno je povišena u odnosu na kontrolu (0,76±0,10), dok u dozama od 0,2 mg/mL (0,91±0,08) i 0,0114 mg/mL (0,98±0,07) povećanje nije statistički značajno. (Slika 13c, Tablica 6).

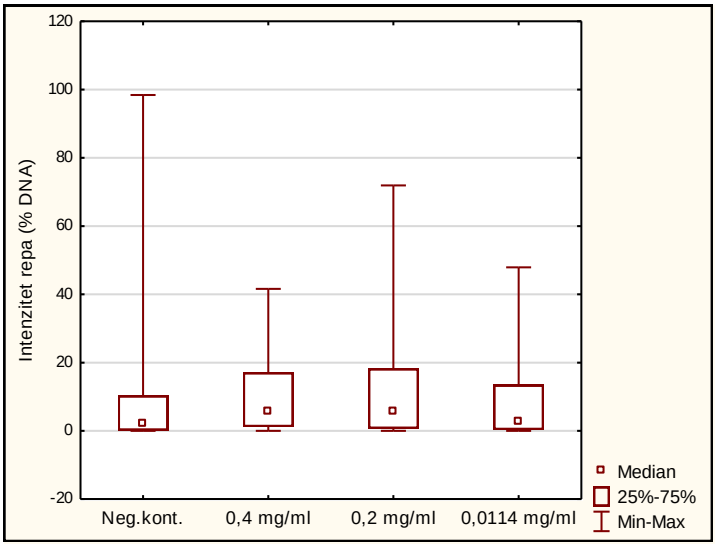


Slika 13. Vrijednosti parametara komet testa (dužina repa, intenzitet repa, repni moment) u stanicama HepG2 nakon tretmana vodenim ekstraktom listova obične planike u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL. Neg.kont. – negativna kontrola

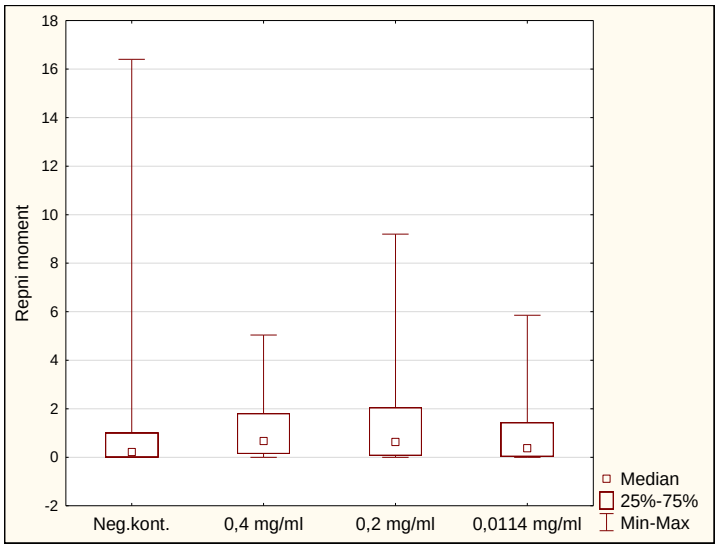
Vrijednosti parametra dužine repa uzoraka tretiranih arbutinom (29,58±0,51 za 0,4 mg/mL; 22,63±0,51 za 0,2 mg/mL i 26,54±0,45 za 0,0114 mg/mL) pokazuje povišenu vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu (20,61 ± 0,28) (Slika 14a, Tablica 4), ali samo su vrijednosti koncentracija 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL od statističke značajnosti. Vrijednosti parametra intenzitet repa (11,14±0,88 za 0,4 mg/mL; 11,16±0,51 za 0,2 mg/mL i 8,69±0,82 za 0,0114 mg/mL) u sve tri koncentracije pokazuje povišenu, ali ne i statistički značajnu (P<0,05) vrijednost u odnosu na kontrolu (7,70±0,83) (Slika 13b, Tablica 5). Vrijednost parametra repni moment za sve tri koncentracije (1,23±0,09 za 0,4 mg/mL; 1,20±0,62 za 0,2 mg/mL i 0,88±0,08 za 0,0114 mg/mL) pokazuju povišenu vrijednosti u odnosu na kontrolu (0,76±0,10) ali bez statističke značajnosti (Slika 14c, Tablica 6).



A



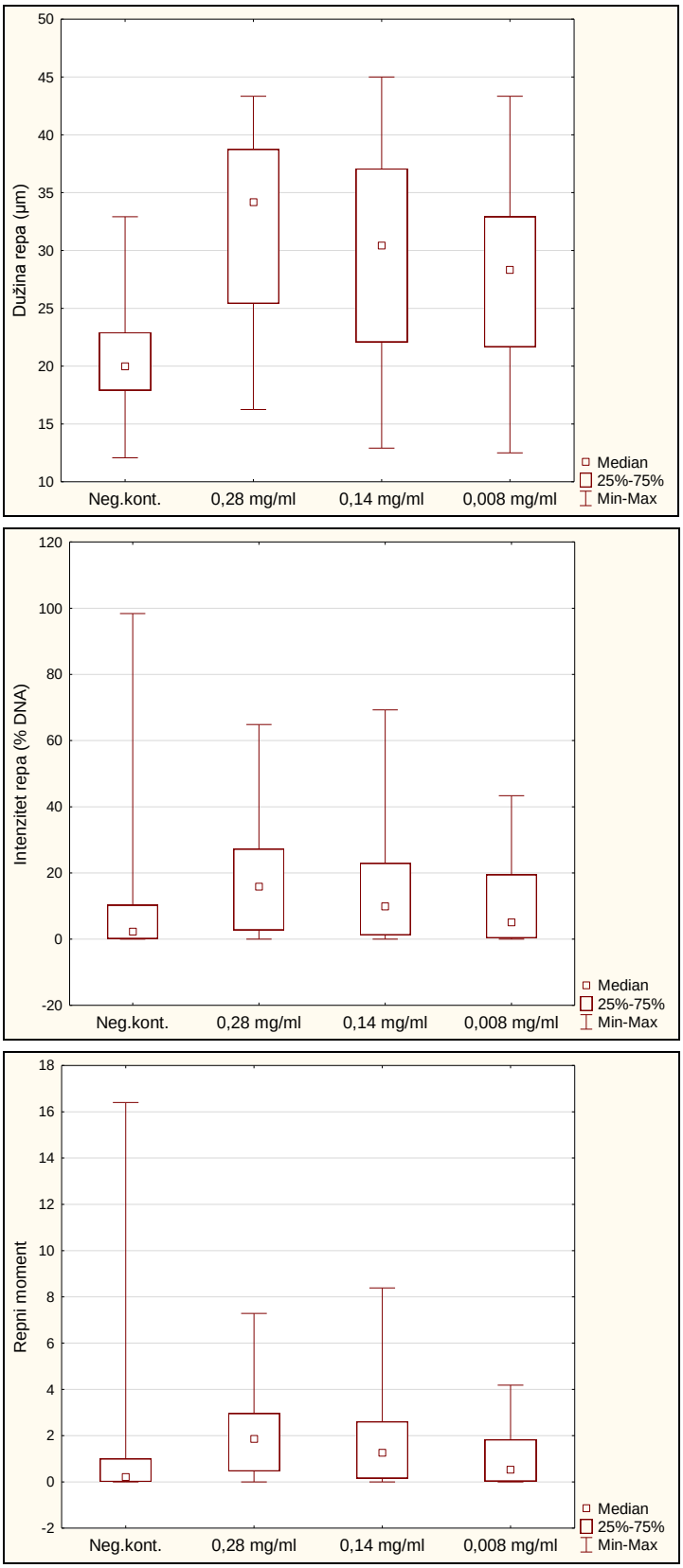
B



C

Slika 14. Vrijednosti parametara komet testa (dužina repa, intenzitet repa, repni moment) u stanicama HepG2 nakon tretmana arbutinom u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL. Neg.kont. – negativna kontrola

Vrijednosti (srednja vrijednost±standardna pogreška) parametra dužina repa izmjerene u stanicama HepG2 tretiranim hidrokinonom (32,41±0,52 za 0,28 mg/mL; 29,75±0,63 za 0,14 mg/mL i 27,50±0,53 za 0,008 mg/mL) su statistički značajno povećane u odnosu na kontrolnu skupinu (20,61 ± 0,28) (Slika 15a, Tablica 4). Vrijednost parametra intenzitet repa stanica tretiranih hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL (16,81±1,03) i 0,008 mg/mL (10,29±0,85) značajno je povišena u odnosu na kontrolu (7,70±0,83), dok u dozama od 0,14 mg/mL (14,84±1,11) povećanje nije statistički značajno (Slika 15b, Tablica 5). Statistički značajno povećanje vrijednost parametra repni moment odnosu na kontrolu (0,76±0,10) postoji samo kod skupina tretiranih hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL (1,86±0,11) i 0,14 mg/mL (1,76±0,13), dok kod skupine tretiranih hidrokinonom u dozi od 0,008 mg/mL (1,07±0,08) postoji povišenje vrijednosti, ali ono nije od statističke značajnosti (Slika 15c, Tablica 6).



Slika 15. Vrijednosti parametara komet testa (dužina repa, intenzitet repa, repni moment) u stanicama HepG2 nakon tretmana hidrokinonom u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL. Neg.kont. – negativna kontrola

3.3.3. Statističke značajnosti vrijednosti parametara komet testa na stanicama PK-15 i HepG2

Iz podataka prikazanih u Tablici 4 vidljivo je da nakon 24-satnog tretmana postoje razlike u osjetljivosti na tretmane vodenim ekstraktom listova obične planike, arbutina i hidrokinona kod PK-15 i HepG2 stanica za parametar dužine repa kometa. Vrijednosti parametra dužine repa HepG2 stanica za sve vrijednosti osim arbutina koncentracije 0,2 mg/mL statistički su značajne u odnosu na kontrolu, dok za PK-15 stanice statistička značajnost postoji samo kod hidrokinona i najniže koncentracije vodenog ekstrakta lista obične planike.

Tablica 4. Statističke značajnosti parametra dužina repa u stanicama PK-15 i HepG2 tretiranim vodenim ekstraktom listova obične planike[#] i arbutinom u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinonom u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL tijekom 24 sata u uvjetima *in vitro* (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffe-ov test, $p < 0,05$).

			PK-15 stanice									
				EKSTRAKT[#]			ARBUTIN			HIDROKINON		
		Dužina repa	kontr.	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,0114 mg/mL	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,0114 mg/mL	0,28 mg/mL	0,14 mg/mL	0,008 mg/mL
		kontr.		n.z	n.z	0,000000	n.z	n.z	n.z	0,000000	n.z	0,000002
HepG2 stanice	EKSTRAKT[#]	0,4 mg/mL	0,000000		n.z	0,007728	n.z	0,008939	n.z	0,018457	n.z	n.z
		0,2 mg/mL	0,000000	n.z		0,000997	n.z	0,046753	n.z	0,002842	n.z	0,045801
		0,0114 mg/mL	0,000000	n.z	n.z		0,000000	0,000000	0,000000	n.z	0,000011	n.z
	ARBUTIN	0,4 mg/mL	0,000000	n.z	n.z	0,030609		n.z	n.z	0,000000	n.z	0,000001
		0,2 mg/mL	n.z.	0,000000	0,000000	0,000191	0,000000		n.z	0,000000	n.z	0,000000
		0,0114 mg/mL	0,000000	n.z	n.z	n.z	n.z	0,000009		0,000000	n.z	0,000000
	HIDROKINON	0,28 mg/mL	0,000000	0,011877	0,000006	0,000000	n.z	0,000000	0,000000		0,000044	n.z
		0,114 mg/mL	0,000000	n.z	n.z	n.z	n.z	0,000000	n.z	n.z		0,001913
		0,008 mg/mL	0,000000	n.z	n.z	n.z	n.z	0,000000	n.z	0,000025	n.z	

n.z – nema statističke značajnosti

Raspodjela vrijednosti % DNA u repu kometa razlikuje se u osjetljivosti na tretmane vodenim ekstraktom listova obične planike, arbutina i hidrokinona kod PK-15 i HepG2 stanica. Kod PK-15 stanica postoji statistički značajnih razlika između sva tri tretmana, dok kod HepG2 stanica postoji statistički značajna razlika samo kod skupina tretiranih hidrokinonom koncentracija 0,28 mg/mL i 0,14 mg/mL (Tablica 5).

Tablica 5. Statističke značajnosti parametra intenzitet repa PK-15 i HepG2 stanica tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike[#] i arbutinom u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinonom u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL tijekom 24 sata u uvjetima in vitro (analiza varijance uz post-hoc Scheffe-ov test, $p < 0,05$).

			PK-15 stanice								
			EKSTRAKT[#]			ARBUTIN			HIDROKINON		
		Intenzitet repa	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,0114 mg/mL	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,0114 mg/mL	0,28 mg/mL	0,14 mg/mL	0,008 mg/mL
			n.z	n.z	n.z	n.z	0,047570	n.z	n.z	0,000000	n.z
HepG2 stanice	EKSTRAKT[#]	0,4 mg/mL	n.z		n.z	0,000259	n.z	0,000042	n.z	n.z	0,000000	0,000462
		0,2 mg/mL	n.z	n.z		0,000227	n.z	0,000037	n.z	n.z	0,000000	0,000406
		0,0114 mg/mL	n.z	n.z	n.z		n.z	n.z	n.z	0,000012	n.z	n.z
	ARBUTIN	0,4 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z		0,026522	n.z	n.z	0,000000	n.z
		0,2 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z		n.z	0,000001	n.z	n.z
		0,0114 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z		n.z	0,000000	n.z
	HIDROKINON	0,28 mg/mL	0,000000	n.z	0,000019	0,020359	n.z	n.z	0,000034		0,000000	0,000024
		0,114 mg/mL	0,000593	n.z	0,021743	n.z	n.z	n.z	0,030816	n.z		n.z
		0,008 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	0,003869	n.z	

n.z – nema statističke značajnosti

Nadalje, vrijednosti repnog momenta za testirane stanice slijede isti obrazac kao i vrijednosti intenzitet repa kometa. Nakon 24-satnog tretmana kod PK-15 stanica postoji statistički značajna razlika između svih testiranih koncentracija, dok kod HepG2 stanica statistički značajna razlika postoji samo u odnosu prema skupinama tretiranim hidrokinom koncentracije 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL (Tablica 6).

Tablica 6. Statističke značajnosti parametra repni moment PK-15 i HepG2 stanica tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike[#] i arbutinom u dozama od 0,4 mg/mL; 0,2 mg/mL i 0,0114 mg/mL te hidrokinonom u dozama od 0,28 mg/mL; 0,14 mg/mL i 0,008 mg/mL tijekom 24 sata u uvjetima in vitro (analiza varijance uz post-hoc Scheffe-ov test, $p < 0,05$).

			PK-15 stanice								
			EKSTRAKT[#]			ARBUTIN			HIDROKINON		
		Repni moment	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,0114 mg/mL	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,0114 mg/mL	0,28 mg/mL	0,14 mg/mL	0,008 mg/mL
			n.z	n.z	n.z	n.z	0,013992	n.z	n.z	0,000000	n.z
HepG2 stanice	EKSTRAKT[#]	0,4 mg/mL	0,016823		n.z	0,000720	n.z	0,000000	n.z	n.z	0,000000	0,000036
		0,2 mg/mL	n.z	n.z		0,000077	n.z	0,000000	n.z	n.z	0,000000	0,000003
		0,0114 mg/mL	n.z	n.z	n.z		n.z	n.z	n.z	0,000208	0,000729	n.z
	ARBUTIN	0,4 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z		0,000440	n.z	n.z	0,000000	0,019388
		0,2 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z		0,000440	0,000000	n.z	n.z
		0,0114 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z		n.z	0,000000	n.z
	HIDROKINON	0,28 mg/mL	0,000000	n.z	0,000000	0,000065	0,24124	0,005075	0,000000		0,000000	0,000008
		0,114 mg/mL	0,00000	n.z	0,000484	0,034447	n.z	n.z	0,0000483	n.z		0,008779
		0,008 mg/mL	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	n.z	0,000096	0,043427	

n.z – nemastatističke značajnosti

4. RASPRAVA

U ovom smo istraživanju koristili epitelne stanice bubrega svinje (PK-15) i epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma (HepG2) kako bi istražili učinak vodenog ekstrakta listova obične planike, arbutina i hidrokinona. Istraživanje je provedeno na stanicama PK-15 i HepG2 obzirom da su bubreg i jetra ograni najizloženiji djelovanju hidrokinona. Hidrokinon prolazi kroz opsežne transformacije u jetri, odakle potencijalno još toksičniji produkti odlaze u bubrege te se izlučuju mokraćom (English i sur., 1994).

MTS test pokazao je da vijabilnost PK-15 stanica tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutinom smanjena u odnosu na kontrolu ali bez statističke značajnosti. Dok je primjena hidrokinona na stanice izazvala značajno smanjenje vijabilonosti stanica, ali statistički značajno samo kod najviše koncetracije hidrokinona (0,28 mg/mL) gdje je postotak vijabilnih stanica bila ispod 10 % (Slika 8). MTS test za HepG2 stanice obrađene istim tretmanom kao i PK-15 stanice pokazao je veću vijabilnost stanica kod tretmana vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutinom u odnosu na kontrolu, ali ne i za tretman hidrokinom (Slika 9). Također, kao i kod PK-15 stanica i kod HepG2 stanica pri najvišoj koncetraciji hidrokinona (0,28 mg/mL) pokazuju značajno smanjenje vijabilnosti stanica (14,06 %). Ovi rezultati slažu se s drugim istraživanjima provedenim s hidrokinonom (Peng i sur., 2013). Nakon 24 satnog izlaganja hidrokinon izaziva značajna oštećenja A549 (epitelne stanice alveolarnog adenokarcinoma ljudskih pluća) stanica pri koncentracijama od 10, 20 i 40 μM (Peng i sur., 2013). Stanice embrija sirijskih hrčaka (SHE) tretirane 30 μM hidrokinonom kroz 48 sati pokazale su 61,2% manju proliferaciju u odnosu na negativnu kontrolu (Tsutsui i sur., 1997). Potvrđeno je kako hidrokinon može izazvati DNA adukte i oštećenja oštećenja kod humanog HL-60, makrofaga mišjeg koštane srži, ljudske koštane srži, limfocita i HepG2 stanica (Tietze 1969; Levay i sur., 1991; 1993; Hiraku i Kawanishi 1996; Andreoli i sur., 1999).

Primjenom fluorescencijskog testa bojenja potvrdili smo ranija zapažanja drugih autora o toksičnosti hidrokinona na staničnoj razini (Terasaka i sur., 2005). Hidrokinon je u dozi od 0,28 mg/mL uzrokovao 100 % smrtnost stanica (Tablica 3). Tretmani vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutina te niže koncentracije hidrokinona ne pokazuju značajan utjecaj na staničnu smrt. Izmjerene vrijednosti primjenom fluorescencijskog testa bojenja kod

HepG2 stanica također potvrđuju toksičnost hidrokinona, ali u manjoj mjeri nego kod PK-15 stanica. Rezultati o citotoksičnom učinku hidrokinona i njegovom potencijalu za izazivanje apoptoze potvrđeni su i u ranijim istraživanjima na limfocitima (Hiraku i Kawanishi, 1996), neutrofilnim i eozinofilnim granulocitima te drugim vrstama stanica u uvjetima *in vitro*, primjerice HL-60 stanice humane leukemije. Yang i sur. (2011) utvrdili su da hidrokinon preko kaspaze 9/3 inducira apoptozu kod neutrofila i eozinofila. Metoda fluorescencijskog testa bojenja ima svoja ograničenja, žbog čega možemo odrediti samo morfološka obilježja stanične smrti, ali ne i odrediti precizne mehanizme na koji način hidrokinon izaziva apoptozu i nekrozu, odnosno dovodi do stanične smrti kod PK-15 i HepG2 stanice Rezultati EtBr/AO HepG2 stanica dobiveni tretmanom sa vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutina u svim dozama preklapaju se sa vrijednostima izmjerenim kod PK-15 stanica. Pri koncentraciji koja odgovara maksimalnom dopuštenom dnevnom unosu arbutina, vodeni ekstrakt listova obične planike je pokazao vrlo niski potencijal za izazivanje stanične smrti (European Medicines Agency, 2012).

Hidrokinon ima visok potencijal za izazivanje stanične smrti, posebice putem apoptoze jer izaziva primarna oštećenja DNA, koja se mogu detektirati komet testom. U stanicama PK-15 izmjerene su statistički značajne povišene vrijednosti parametra dužina repa kod skupina tretiranih hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL i 0,008 mg/mL te niže ali ne statistički značajne vrijednosti parametra repni moment u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12). Izmjereni parametri dužina repa u stanicama HepG2 primjenom hidrokinona u svim dozama značajno su povišene u odnosu na kontrolnu skupinu, a vrijednosti parametara repni moment povišene su samo kod skupina tretiranih hidrokinonom u dozi od 0,28 mg/mL i 0,14 mg/mL (Slika 15). Uzevši u obzir da se parametar intenzitet repa odnosi na snižene vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu, možemo reći da je do oštećenja DNA došlo na više mjesta u molekuli te su fragmenti kratki, brzo putuju kroz gel te stoga imamo više vrijednosti parametra dužina repa. Hidrokinon prilikom ekskrecije dolazi u bubrege i izlučuje se mokraćom kao hidrokinon sulfat ili glukuronid (European Medicines Agency, 2012) te da su bubrezi vrlo osjetljivi na utjecaj hidrokinona (English i sur., 1994; Hard i sur., 1997; Peters i sur., 1997), možemo pretpostaviti da je upravo hidrokinon nastao iz arbutina koji je prisutan u primijenjenom ekstraktu listova obične planike djelovao na blago oštećenje DNA u stanicama bubrega. Ukratko, uzevši u obzir poznate činjenice o mehanizmu djelovanja hidrokinona, možemo zaključiti da pri visokim koncentracijama koje su testirane u okviru ove studije hidrokinon u DNA limfocita izaziva veliki broj adukata i dovodi do stvaranja unutar- i

međulančanih veza, odnosno veza između DNA i proteina (engl. *cross-linking*) koje onemogućuju normalnu denaturaciju DNA u uvjetima u kojima se provode alkalna elektroforeza tijekom izvođenja komet testa. Dokaz za to su izrazito povećane dužine repa, koje smo izmjerili u uzorcima tretiranim hidrokinonom. Dostupna literatura kao važne mehanizme djelovanja hidrokinona na razini DNA navodi još inhibiciju enzima topoizomeraze II (Frantz i sur., 1996, Fung i sur., 2004, Lindsey i sur., 2005) te izazivanje oksidacijskog stresa (Luo i sur., 2008), što za posljedicu ima stvaranje značajne količine lomova u DNA.

Komet testom izmjeren je učinak tretmana ekstraktom listova obične planike na stanice PK-15 i HepG2. Za parametar dužina repa PK-15 stanica vrijednosti su povišene bez statističke značajnosti, a za parametar repni moment vrijednosti su smanjene također bez značajnosti (Slika 10). U stanicama HepG2 statistički značajne vrijednosti oštećenja DNA ukazuje parametar dužina repa za sve tri doze tretmana (Slika 13). Mnoga istraživanja upućuju na to da polifenolni spojevi mogu djelovati i prooksidativno i antioksidativno na staničnoj i DNA razini (Rusak i sur., 2010). Polifenoli mogu oštetiti DNA stvaranjem reaktivnih metabolita, umetanjem u DNA, nepovoljnim djelovanjem na DNA topoizomeraze i utjecajem na enzime koji održavaju integritet DNA (Noel i sur., 2006). Možemo pretpostaviti da je došlo do narušavanja ravnoteže između oksidativnog potencijala i antioksidativnih svojstava bioaktivnih spojeva koji se nalaze u vodenom ekstraktu listova obične planike. Moguće je i da su interakcije između sastojaka, kao i njihov individualni utjecaj na stanične obrambene mehanizme mogli utjecati na razinu oksidativnog oštećenja, što se i odrazilo na razine izmjerenih oštećenja DNA.

Utjecaj arbutina izmjeren alkalnim komet testom (parametar dužina repa) za PK-15 stanice neznačajno je snižen u odnosu na kontrolnu skupinu, dok kod HepG2 stanica izaziva značajna oštećena DNA (Slika 11, Slika 14). Arbutin je najbrojniji fenolni spoj detektiran u ekstraktu listova obične planike. Ako uzmemo u obzir istraživanja koja ukazuju na hepatotoksičnost hidrokinona (McGregor, 2007) nastalog u jetri iz arbutina, moguće je da je upravo hidrokinon razlog oštećenja DNA u stanicama HepG2. Lee i Kim (2012) također su uočili antioksidacijske učinke arbutina na modelu mišjih BV2 stanica mikroglije. Seyfizadeh i sur. (2012) utvrdili su antioksidacijske učinke arbutina na Hep-G2 (stanične linije hepatocelularnog karcinoma) stanicama pri koncentracijama 100 i 150 μM (koje su niže od korištenih u našem pokusu). Pri koncentraciji koja odgovara maksimalnom dopuštenom

dnevnom unosu arbutina, ekstrakt je pokazao vrlo niski potencijal za izazivanje primarnih oštećenja DNA.

Također važno je napomenuti da hidrokinon izaziva veću toksičnost kod HepG2 nego kod PK-15 stanica, odnosno primarna oštećenja stanica za sva tri parametra (dužina repa, intenzitet repa i repni moment) su značajnija. Postoje jasne razlike utjecaja hidrokinona na određeni tip stanica, što upućuje na selektivnu citotoksičnost hidrokinona (Peng i sur., 2013). Slična toksičnost kao kod PK-15 stanica primijećena je već uporabom HL60, Jurkat i U937 stanica (Kim i sur., 2009; Peng i sur., 2013). Međutim stanične linije kao što su HeLa, RAW i CHO K5 pokazuju mnogo veću otpornost na hidrokinon, slično kao i HepG2 stanice (Galván i sur., 2008).

Rezultati dobiveni testiranjem u uvjetima *in vitro* potvrđuju genotoksični rizik od izlaganja višim koncentracijama hidrokinona, ali u koncentraciji od 11 μg/kg, koja bi ujedno odgovarala količini hidrokinona stvorenoj metabolizmom maksimalne dnevno dopuštene koncentracije arbutina (420 mg), relativno je nizak (De Arriba i sur., 2013).

Dakle fokus daljnjih istraživanja trebao bi biti na procjeni potencijalnih citotoksičnih oštećenja pri većem broju različitih koncentracija kako bi se dobila cijela slika o mogućoj toksičnosti lista obične planike.

5. ZAKLJUČAK

- Izmjerene vrijednosti MTS testa u uvjetima *in vitro* upućuju na inhibicijski učinak hidrokinona pri najvišoj dozi (0,28 mg/mL) na vijabilnosti PK-15 i HepG2 stanica. Vodeni ekstrakt listova obične planike i arbutin u svim primjenjenim dozama ne utječu na vijabilnost PK-15 i HepG2 stanica.
- Rezultati dobiveni metodom bojenja EtBr/AO ukazuju da hidrokinon pri dozi od 0,28 mg/mL izaziva apaptozu i nekrozu kod stanica HepG2 te dovodi do stanične smrti, a pri istoj dozi sve su PK-15 stanice mrtve. Vodeni ekstrakt listova obične planike i arbutina pokazali su niski potencijal u izazivanju apaptozu i nekrozu stanica, tj. stanične smrti.
- Hidrokinon pokazuje statistički značajno povećanje primarnih oštećenja DNA na stanicama HepG2 za parametre komet testa (intenzitet repa i repni momenta). što ukazuje genotoksičan potencijal.
- Primarna oštećenja DNA za parametre komet testa (intenzitet repa i repni momenta) ukazuju na nisko genotoksično djelovanje hidrokinona na stanice PK-15.
- Pomoću vrijednosti parametra repni moment komet (intenzitet repa i repni momenta) testa zaključujemo da hidrokinom u većoj mjeri izaziva primarna oštećenja DNA na stanicama HepG2 u odnosu na PK-15 stanice.
- Primarna oštećenja DNA za parametre komet testa (intenzitet repa i repni moment) izmjerena u PK-15 i HepG2 stanicama nakon 24-satnog tretmana vodenim ekstraktom listova obične planike i arbutinom u uvjetima *in vitro* ne pokazuju statistički značajna odstupanja od kontrole, što ukazuje na nisku genotoksičnost navedenih tretmana.
- Vodeni ekstrakt listova obične planike i arbutin u primjenjenim dozama na pokazuju značajnu cititoksičnost i genotoksičnost

6. LITERATURA

Abuhamdah S, Abuhamdah R, Al-Olimat S, Paul C (2013) Phytochemical investigations and antibacterial activity of selected medicinal plants from Jordan. European J Med Plants 3: 394-404.

Afkir S, Nguelefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyyat A (2008) *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. J Ethnopharmacol 116: 288-295.

Andreoli C, Rossi S, Leopardi P, Crebelli R (1999) DNA damage by hydroquinoneinhumanwhitebloodcells:analysisbyalkaline single-cell gel electrophoresis. Mutat Res 438: 37-45.

Amel B (2013) Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. J Pharmacogn Phyther 5: 12-20.

Baidez AG, Gomez P, Rio JA Del, Ortuno A (2007) Dysfunctionality of the xylem in Olea europaea L. plants associated with the infection process by Verticillium dahliae Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. J Agric Food Chem 55: 3373-3377.

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.

Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyyat A, Aziz M, Legssyer A, Mekhfi H (2010) Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. Hum Exp Toxicol 29: 865-871.

Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Sci 78: 2872-2888.

Carcache-Blanco EJ, Cuendet M, Park EJ, Su BN, Rivero-Cruz JF, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Douglas KA (2006) Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. Nat Prod Res 20: 327-334.

Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti MG (2009) Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). J Ethnopharmacol 125: 16-30.

De Arriba SG, Naser B, Nolte KU (20013) Risk assessment of free hidroquinone derived from Arctostaphylos Uva-ursi folium herbal preparations. Int J Toxicol 32: 442-456.

Dib MA, Allali H, Tabti B (2010a) Identification of phenolic compounds and antimicrobial activity of roots of *Arbutus unedo* L. Asian J Chem 22: 4045–4053.

Dib MA, Paolini J, Bendahou M, Varesi L, Allali H, Desjobert JM, Boufeldja T, Costa J (2010b) Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and *in vitro* antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. Nat Prod Commun 5: 1085–1090.

Dib MEA, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N, Tabti B (2013) Antimicrobial activity and phytochemical screening of Arbutus unedo L. J Saudi Chem Soc 17: 381-385.

Duke RC, Cohen JJ (1992) Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. Annual Review of Immunology 10: 267-293.

El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B (2003) Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). J Ethnopharmacol 86: 149-158.

El Haouari M, López JJ, Mekhfi H, Rosado J, Salido GM (2007) Antiaggregant effects of Arbutus unedo extracts in human platelets. J Ethnopharmacol 113: 325-31.

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.

EPA Air Toxics (2000) EPA Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants. CAS 123: 31-39.

European Medicines Agency (2012) Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. Com Herb Med Prod 44: 1–34.

Fiorentino A, Castaldi S, D'Abrosca B, Natale A, Carfora A, Messere A, Monaco P (2007) Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. Biochem Syst Ecol 35: 809–811.

Frantz CE, Chen H, Eastmond DA (1996) Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. Environ Health Perspect 104 Suppl: 1319-1323.

Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. Med Res Rev 26: 747-766.

Fung J, Hoffmann MJ, Kim DD, Snyder R (2004) Inhibition of topoisomerase II in 32D.3(G) cells by hydroquinone is associated with cell death. J Appl Toxicol 24: 183-188.

Galvan N, Lim S, Zmugg S, Smith MT, Zhang L (2008) Depletion of WRN enhances DNA

damage in HeLa cells exposed to the benzene metabolite, hydroquinone. Mutat Res 649: 54-61.

Gaspar EMSM, das Neves HJC, Noronha JP (1997) Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of *Arbutus unedo* fruits. J High Resolut Chromatogr 20: 417-420.

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.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 13: 572-584.

Hildebrand DC, Powell CC, Schroth MN (1969) Fire blight resistance in Pyrus: localization of arbutin and beta-glucosidase. Phytopathology 59: 1534-1539.

Hiraku Y, Kawanishi S (1996) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. Cancer Res 56: 5172-5178.

Hu ZM, Zhou Q (2009) Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. Journal of Dermatological Science 55: 179-184.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2010) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutr Cancer 62: 1-20.

IARC (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl 7: 1-440.

Jahodár L, Jílek P, Páktová M, Dvoráková V (1985) Antimicrobial effect of arbutin and an extract of the leaves of Arctostaphylos uva-ursi in vitro. Ceská a Slovenská farmacie 34: 174-178.

Kahriman N, Albay CG, Dogan N, Usta A, Karaoglu SA, Yayli N (2010) Volatile constituents and antimicrobial activities from flower and fruit of *Arbutus unedo* L. Asian Journ Chem 22(8): 6437-6422.

Kazazić SP. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 55: 279-290.

Kim YJ, Woo HD, Kim BM, Lee YJ, Kang SJ, Cho YH (2009) Risk assessment of hydroquinone: differential responses of cell growth and lethality correlated to hydroquinone concentration. J Toxicol Environ Health A. 72:1272-8.

Kivçak B, Mert T, Ertabaklar H, Balcioğlu IC, Ozensoy Töz S (2009) *In vitro* activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. Turkiye Parazitol Derg 33:

114–115.

Kivçak B, Mert T (2001) Quantitative determination of alpha-tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. Fitoterapia 72: 656-61.

Kivçak B, Mert T, Denizci A (2001a) Antimicrobial activity of *Arbutus unedo* L. FABAD J Pharm Sci 26: 125–128.

Kivçak B, Mert T, Demirci B, Baser KHC (2001b) Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*. Chem Nat Compd 37: 445-446.

Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2006) The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. J Nutr Biochem 17: 611-625.

Lee HJ, Kim KW (2012) Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. Inflamm Res 61: 817-825.

Leonti M, Casu L, Sanna F, Bonsignore L (2009) A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited? J Ethnopharmacol 121: 255-267.

Levay G, Pongracz K, Bodell WJ (1991) Detection of DNA adducts in HL-60 cells treated with hydroquinone and p-benzoquinone by 32P-postlabeling. Carcinogenesis 12: 1181-1186.

Levay G, Ross D, Bodell WJ (1993) Peroxidase activation of hydroquinone results in the formation of DNA adducts in HL-60 cells, mouse bone marrow macrophages and human bone marrow. Carcinogenesis 14: 2329-2334.

Lim TK (2012) Arbutus unedo. Edible Med Non-Medicinal Plants 2: 444-451.

Lindsey RH, Bender RP, Osheroff N (2005) Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. Chem Res Toxicol 18: 761-770.

Luo L, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L (2008) Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. Chem Biol Interact 173: 1-8.

Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J (2010) Arbutin in marjoram and oregano. Food Chemistry. 121: 185-190.

Maleš Z, Plazibat M, Vundać VB, Zuntar I (2006) Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). Acta Pharm 56: 245-250.

Maleš Ž, Šarić D, Bojić M (2013) Quantitative determination of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves of *Arbutus unedo* L. using thin layer chromatography. J Anal Methods Chem 2013: 8-9.

Malich G, Markovic B, Winder G (1997) The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. Toxicology 124: 179-192.

Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, de Prati Carcereri A, Darra E, Vicenzi S, Cucinotta G, Caminiti R, Suzuki H, Cuzzocrea S (2008) Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. Pharmacol Res 57: 110-124.

Matasyoh JC, Kiplimo JJ, Karubiu NM, Hailstorks TP (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphoratus*. Food Chem 101: 1183–1187.

McGregor D (2007) Hydroquinone: An Evaluation of the Human Risks from its Carcinogenic and Mutagenic Properties. Critical Reviews in Toxicology 37: 887-914.

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD (2014) *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. Molecules 19: 15799-823.

Migas P, Krauze-Baranowska M (2015) The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. Phytochem. Lett. 962: 1-6.

Noel S, Kasinathan M, Rath SK (2006) Evaluation of apigenin using *in vitro* cytochalasin blocked micronucleus assay. Toxicol In Vitro 20: 1168–1172.

Nomura M, Tsukada H, Ichimatsu D, Ito H, Yoshida T, Miyamoto KI (2005) Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation by tannins. Phytochemistry 66: 2038-2046.

Nikolić T (2014) Department of Botany, Faculty of Science Zagreb. Flora Cratica Database Dostupno na: http://hirc.botanic.hr/fcd.

Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C (2004) Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). J Ethnopharmacol 93: 183-195.

NTP (1989) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Hydroquinone (CAS No. 123-31-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 366: 1-248.

Nycz JE, Malecki G, Morag M, Nowak G, Ponikiewski L, Kusz J, Switlicka A. (2010) Arbutin: Isolation, X-ray structure and computional studies. Journal of Molecular Structure 980: 13-17.

Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA (2011a) *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. J Food Nutr Res 50: 73-85.

Oliveira I, Baptista P, Malheiro R, Casal S, Bento A, Pereira JA (2011b) Influence of

strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. Food Res Int 44: 1401-1407.

Padanilam BJ (2013) Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. Am J Physiol Renal Physiol 284: F608-F620.

Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, del Castillo MD, Cano MP, de Pascual-Teresa S (2008) Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. J Food Compos Anal 21: 273-281.

Palumbo A, d'Ischia M, Misuraca G, Prota G (1991) Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. Biochim et Biophy Acta 173 (1): 85-90.

Peng C, Dionne A, Faye L, Jongwha L, Qing X, Martin L.F, J.C Ng (2013) Genotoxiciy of hidroquinone in A549 cells. Cell Biol Toxicol 29: 213-227.

Peters MM, Jones TW, Monks TJ, Lau SS (1997) Cytotoxicity and cell-proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl)hydroquinone. Carcinogenesis 18: 2393-2401.

Petkou D, Diamantidis G, Vasilakakis M (2002) Arbutin oxidation by pear (*Pyrus communis* L.) peroxidases. Plant Science 162: 115-119.

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.

Rusak G, Piantanida I, Masić L, Kapuralin K, Durgo K, Kopjar N (2010) Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. Chem Biol Interact 188: 181–189.

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 920-927.

Seyfizadeh N, Mahjoub S, Zabihi E, Moghadamnia A, Pouramir M, Mir H, Khosravifarsani M, Elahimanesh F (2012) Cytoprotective effects of arbutin against tert-butyl hydroperoxid induced toxicity in hep-G2 cell line. World Appl Sci J 19: 163-167.

Shibata MA, Hirose M, Tanaka H, Asakawa E, Shirai T, Ito N (1991) Induction of renal cell tumors in rats and mice, and enhancement of hepatocellular tumor development in mice after long-term hydroquinone treatment. Jpn J Cancer Res 82: 1211-1219.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175: 184–191.

Soucek P, Ivan G, Pavel S (2000) Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation. Chem Biol Interact 126: 45-61.

Soufleros EH, Mygdalia SA, Natskoulis P (2005) Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate "Koumaro" by aromatic and mineral composition. J Food Compos Anal 18: 699-716.

Souza SMC, Aquino LCM, Milach AC, Bandeira MAM, Nobre MEP, Viana GSB (2007) Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae) in rodents. Phytother Res 21: 220-225.

Sreelatha G, Muraleedharan A, Sathidevi P.S, Chand P, Rajkumar R.P (2015) Quantification of DNA damage by the analysis of silver stained comet assay images, IRBM 36: 5, 306.

Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T (2003) Syntheses of arbutin-alpha-glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of alpha-arbutin and arbutin on human tyrosinase. Chem Pharm Bull (Tokyo) 51: 798-801

Šilić Č (2005) Atlas dendroflore (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Matica Hrvatska Čitluk, Bosna i Hercegovina.

Tavares L, Fortalezas S, Carrilho C, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN (2010) Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. J Berry Res 1: 3-12.

Terasaka H, Morshed SR, Hashimoto K, Sakagami H, Fujisawa S (2005) Hydroquinone-induced apoptosis in HL-60 cells. Anticancer Res 25: 161–170.

Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem 27: 502-522.

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

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

Tsutsuia T, Hayastia N, Maizumia H, Huffb J, Barrettb JC (1997) Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. Mutation Research 373: 113-123.

Tuberoso CIG, Bifulco E, Caboni P, Cottiglia F, Cabras P, Floris I (2010) Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. J Agric Food Chem 58: 384-389.

Tuberoso CIG, Boban M, Bifulco E, Budimir D, Pirisi FM (2013) Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. Food Chem 140: 686-691.

Vidrih R, Hribar J, Prgomet Ž, Ulrih NP (2013) The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo L* .) fruits. Croat J Food Sci Technol 5: 29-33.

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

Yang EJ, Lee JS, Yun CY, Kim IS (2011) The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. Toxicol in Vitro 25:131-137.

Ziyyat A, Boussairi EH (1998) Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. Phyther Res 12: 110-113.

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J Ethnopharmacol 58: 45–54.

URL 1 http://www.hobbyfarms.com/what-is-a-strawberry-tree

URL 2 https://www.complexi-light.com/alpha-arbutin

URL 3 http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor293.htm

URL 4 http://www.promega.com

URL 5 https://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-3-well

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime / Prezime	**Ines Tkalčec**
Adresa	Banjščina 348, Varaždin breg, 42204 Turčin
Telefonski broj	+385 99 432 7333
E-mail	ines.tkalece@hotmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	19. rujna 1993.
Spol	Ženski

Obrazovanje i osposobljavanje

2012. – 2018.	Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije; smjer: nastavnički, Prirodoslovno-matematički fakultet Horvatovac 102A, 10000 Zagreb
2008. – 2012.	Prva gimnazija Varaždin Ul. Petra Preradovića 14, 42000, Varaždin
2000. – 2008.	III. osnovna škola Varaždin Trg Ivana Perkovca 35, 42000, Varaždin

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik **hrvatski jezik**

Drugi jezik(ci)

Samoprocjena	**Razumijevanje**				**Govor**				**Pisanje**	
Europska razina (*)	Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija			
Engleski jezik	C1	Iskusni korisnik	C1	Iskusni korisnik	B2	Samostalni korisnik	B2	Samostalni korisnik	B2	Samostalni korisnik
Španjolski jezik	B1	Samostalni korisnik	B1	Samostalni korisnik	A2	Temeljni korisnik	A2	Temeljni korisnik	A2	Temeljni korisnik

Društvene vještine i kompetencije	Sklonost timskom i suradničkom radu i učenju, dobre komunikacijske i prezentacijske vještine stečene prilikom izvođenja nastave te rada s djecom i mladima. Sudjelovanje u organizaciji i vođenju Noći biologije te Smotre Sveučilišta u Zagrebu predstavljajući Kemijski odsjek. Prisustvovanje na Trećem simpoziju studenata bioloških usmjerenja. Vođenje demonstratura na kolegiju Praktikum anorganske kemije za studente Integriranog studija biologije i kemije. Sudjelovanje na e-školi kemije za nastavnike održane u Varaždinu, 2017.
Računalne vještine i kompetencije	Vrlo dobra računalna pismenost. Aktivno korištenje operacijskih sustava, Microsoft Office™ paketa te alata za obradu slike i videa (Adobe Photoshop, GIMP, Movie Maker, avidemux).

Dodatne informacije

Projekti	Sudjelovanje u projektu i objavljen rad u Hrvatskoj znanstvenoj biografiji (*Reakcije niklovih(II) i kobaltovih(II) soli s derivatima iminodiacetamida*).
Konferencije	Sudjelovanje i predstavljanje Fakulteta na Europskom simpoziju biologa *Symbios* (Symposium of Biology Students in Europe) održanog u Portugalu. Sudjelovanje u organizaciji Symbiose (europski simpozij studenata biologije) koji će se održati u Zagrebu 2018. godine.