

# Procjena radioprotektivnog učinka arbutina na ljudske leukocite u uvjetima in vitro

---

Marčina, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:696971>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Nives Marčina

**Procjena radioprotektivnog učinka arbutina na ljudske leukocite u uvjetima *in vitro***

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Vesne Benković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

## **Zahvale**

*Veliko hvala...*

*... najboljoj mentorici, prof. dr. sc. Vesni Benković na ukazanom povjerenju, strpljenju i razumijevanju, te na svemu što me naučila tijekom naše suradnje, ali i na nadasve ugodnim i informativnim druženjima.*

*... dr. sc. Anici Horvat-Knežević, na brizi, iznimno ugodnom radnom iskustvu i svim savjetima i konstruktivnim kritikama.*

*... svim zaposlenicima Jedinice za mutagenezu pri Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, ugodniju atmosferu u laboratoriju teško se gdje nalazi, a i toliko strpljenje i volju da nas nauče metodama koje su njima rutina.*

*... Dunji, jer je Dunja i jer je moja druga polovica u svemu.*

*.... mojoj obitelji - mami, tati, sestri i naročito baki. Iako još uvijek ne znaju što točno studiram, uvijek su tu za mene i bez njih ne bi bilo ni mene na ovom faksu.*

*... Zvoni, jer me ako treba i bičem goni kada ja izgubim elan i jer je uvijek tu za mene.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Procjena radioprotektivnog učinka arbutina na ljudske leukocite u uvjetima *in vitro*

Nives Marčina

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Arbutin je jednostavni fenolni glukozid koji je biosintetiziran u brojnim biljnim vrstama, a pokazuje brojna povoljna svojstva kao što su antibakterijsko djelovanje, sprječavanje hiperpigmentacije kože, protuupalno i antioksidativno djelovanje. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti radioprotektivni učinak arbutina na ljudske leukocite primjenom arbutina u četiri različite doze (11,4 µg/mL, 57 µg/mL, 200 µg/mL i 400 µg/mL) kao predtretman tijekom jednog sata prije izlaganja ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy. Za usporedbu djelotvornosti radioprotekcije korišten je amifostin u dozi 250 µg/mL koji se uobičajeno koristi prilikom terapije zračenjem, a učinci su ispitivani metodom alkalnog komet testa. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da arbutin nema značajan citotoksični učinak na ljudske leukocite, ali uzrokuje više oštećenja nego amifostin. Doza od 11,4 µg/mL arbutina pokazala je najbolji, iako ne statistički značajan, radioprotektivni učinak, dok je doza od 200 µg/mL u kombinaciji sa zračenjem uzrokovala statistički značajno veća oštećenja u usporedbi sa svim ostalim tretmanima. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da arbutin pokazuje potencijal za radioprotekciju, ali bi se trebao ispitati učinak manjih doza, kao i dublje istražiti mehanizme interakcije arbutina i zračenja.

(33 stranice, 9 slika, 4 tablice, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: arbutin, ionizirajuće zračenje, radioprotektivni učinak, alkalni komet test, amifostin

Voditelj: prof. dr. sc. Vesna Benković

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Vesna Benković

izv. prof. dr.sc. Renata Matoničkin Kepčija

izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zamjena: doc. dr. sc. Duje Lisičić

Rad prihvaćen: 28. 11. 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Radioprotective effect assesment of arbutin in human leukocytes *in vitro*

Nives Marčina

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Arbutin is a simple phenolic glucoside which is biosynthesised in many plant species. It shows a range of beneficial properties such as antibacterial activity, reduction of skin hyperpigmentation, anti-inflammatory and antioxidant properties. The goal of this study was to assess the radioprotective effect of arbutin in human leukocytes by applying four different doses (11,4 µg/mL, 57 µg/mL, 200 µg/mL i 400 µg/mL) as one hour pretreatment before exposure to 2 Gy ionising radiation. To compare the efficacy of radioprotection 250 µg/mL amifostine was used because it is commonly applied as a radioprotector during radiation therapy. The effects were assessed using alkaline comet assay method. The results of the study showed that arbutin does not exhibit a significant cytotoxic effect toward human leukocytes, but it causes more damage than amifostine. Dose of 11,4 µg/mL arbutin showed the best, although not statistically significant radioprotective effect while the 200 µg/mL dose caused statistically significant higher damage than any other treatment. In conclusion, while arbutin showed radioprotective potential in this study, more research should be done using lower doses of arbutin and the mechanisms of interaction of arbutin with radiation should be more thoroughly investigated.

(33 pages, 9 figures, 4 tables, 44 references, original in:Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: arbutin, ionising radiation, radioprotective effect, alkaline comet assay, amifostine

Supervisor: Dr. Vesna Benković, Prof.

Rewievers: Dr. Vesna Benković, Prof.

Dr. Renata Matoničkin Kepčija, Assoc. Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Substitute: Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 28. 11. 2019.

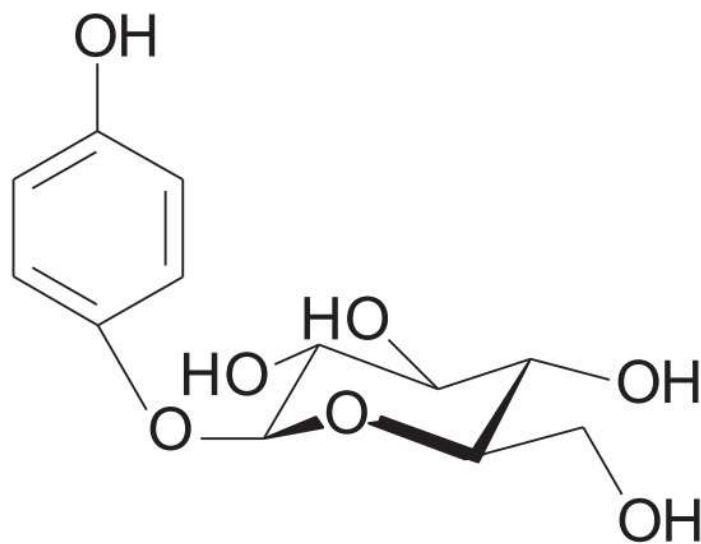
# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Arbutin – svojstva i biološki učinci</b> .....	1
<b>1.2. Biološki učinci ionizirajućeg zračenja</b> .....	3
<b>1.3. Radioprotektori</b> .....	5
<b>1.4. Metode detekcije oštećenja DNA</b> .....	7
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	7
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	8
<b>3.1. Prikupljanje uzoraka krvi</b> .....	8
<b>3.2. Tretman uzoraka krvi</b> .....	8
<b>3.3. Zračenje</b> .....	10
<b>3.4. Alkalni komet test</b> .....	10
<b>3.5. Statističke metode</b> .....	13
<b>4. REZULTATI</b> .....	14
<b>4.1. Dužina repa kometa</b> .....	14
<b>4.2. Intenzitet repa kometa</b> .....	14
<b>4.3. Repni moment kometa</b> .....	15
<b>4.4 Broj kometa dugog repa</b> .....	21
<b>5. RASPRAVA</b> .....	23
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	26
<b>7. LITERATURA</b> .....	27
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	32

## 1. UVOD

### 1.1. Arbutin – svojstva i biološki učinci

Arbutin je jednostavni fenolni glukozid kemijske formule  $C_{12}H_{16}O_7$  i molarne mase 272,25 g/mol (Slika 1), koji je biosintetiziran u brojnim biljnim porodicama – najčešće u porodicama Ericaceae i Saxifragaceae, ali ga se može pronaći i kod porodica Asteraceae, Rosaceae, Lamiaceae i Apiaceae. Neke od svakodnevnih namirnica koje sadrže arbutin su vrste roda *Origanum*, breskve, proizvodi od žitarica, kava i čaj. U biljkama se može pronaći u slobodnom obliku, kao eter ili u obliku estera. Ekstrakt lista *Arctostaphylos uva ursi* L. (Ericaceae), koji sadrži arbutin, stoljećima se koristi u tradicionalnoj fitoterapiji, a i danas je prepoznat kao biljni lijek (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Osim ekstrakcijom iz biljaka, arbutin se može dobiti i sintezom u bakterijama u *in vitro* kulturama te u kulturama biljnih stanica i tkiva, ali se u kulture mora dodati hidrokinon kao prekursor za enzimatsku sintezu arbutina (Kwiecień i sur., 2013; Liu i sur., 2013; Piekoszewska i sur., 2010). Preporučeni dnevni unos arbutina je 400-800 mg, podijeljeno u dvije do tri doze (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).



**Slika 1.** Kemijska struktura arbutina. (preuzeto iz: Schindler i sur., 2002)

Postoje dva moguća mehanizma apsorpcije arbutina unesenog prehranom – prvi je da se arbutin hidrolizom prevodi u hidrokinon (aglikon arbutina) posredstvom enzima  $\beta$ -glukozidaze iz bakterija crijevne mikroflore te se zatim apsorbira, a drugi je da se nepromijenjen



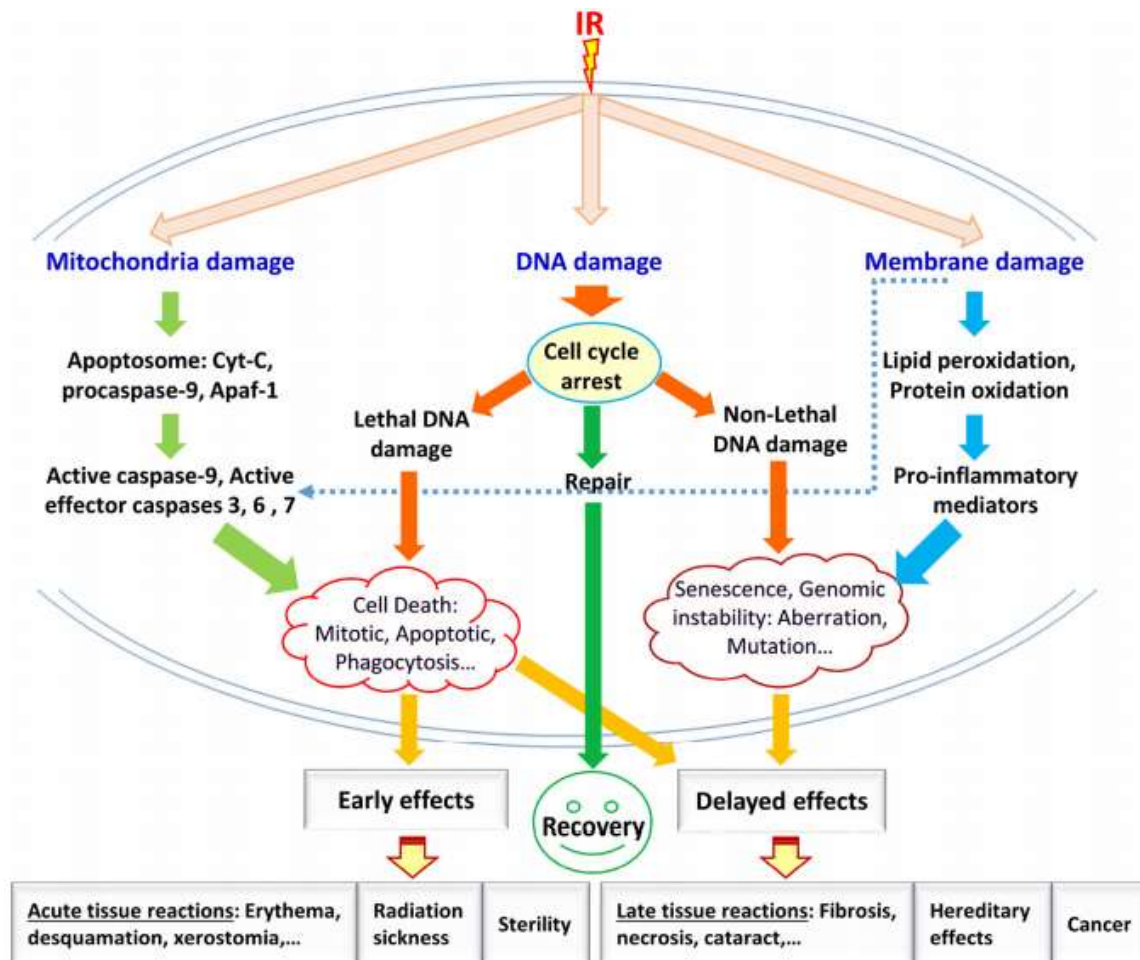
apsorbira aktivnim prijenosom posredstvom glukočnih transpontera na epitelu crijeva. U drugom slučaju, arbutin se nakon apsorpcije metabolizira u hidrokinon, ponovno posredstvom enzima  $\beta$ -glukozidaze. Daljnji metabolizam hidrokinona odvija se u jetri, gdje nastaju njegovi glukuronidni ili sulfatni konjugati, koji se zatim izlučuju u urinu (Quintus i sur., 2005; Schindler i sur., 2002).

Arbutin pokazuje brojna povoljna svojstva za organizam, a koristi se u liječenju infekcija mokraćnog sustava, u sprječavanju hiperpigmentacije kože, a pokazuje i antioksidativna i protuupalna svojstva, kao i antitumorsku aktivnost (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Primjena arbutina u liječenju infekcija mokraćnog sustava rezultat je njegove antibakterijske aktivnosti, za koju je većinom odgovoran njegov metabolit hidrokinon. Hidrokinon se, međutim, može povezati i s određenim štetnim učincima poput hepatotoksičnosti i genotoksičnosti te se stoga treba strogo pridržavati maksimalne dnevne doze, a preporučeno trajanje tretmana je oko dva tjedna (Garcia de Arriba i sur., 2013; Jurica i sur., 2017; Bahadar i sur., 2015). Kod sprječavanja hiperpigmentacije, povoljan učinak arbutina očituje se u inhibiciji sinteze melanina, a arbutin i njegovi derivati pokazali su se sigurnima u ovoj vrsti tretmana te se često koriste u raznim kozmetičkim proizvodima (Hu i sur., 2009; Lim i sur., 2009). Arbutin i njegovi derivati, kao i svi fenolni spojevi, pokazuju antioksidativnu aktivnost, a istraživanja su pokazala da je arbutin superiorniji antioksidans u odnosu na svoj metabolit hidrokinon, koji se smatra aktivnim oblikom arbutina, jer pokazuje jaču i dugotrajniju antioksidativnu aktivnost (Adisa i sur., 2011; Pavlovic i sur., 2011; 2009; Takebayashi i sur., 2011). Za protuupalnu aktivnost arbutina odgovorna je inhibicija produkcije dušikovog oksida putem NO-sintaze, kao i inhibicija djelovanja pro-upalnih citokina (Lee i Kim, 2012). *In vitro* istraživanja ukazuju i na antitumorsku aktivnost arbutina koja se očituje u smanjenju proliferacije tumorskih staničnih linija (Li i sur., 2010).

Prilikom tretmana fenolnim spojevima, posebno pri dizajniranju dodataka prehrani, ali i prilikom samog dizajna eksperimenata s fenolnim spojevima, koncentracije koje se koriste moraju biti dobro promišljene. Korištene koncentracije trebale bi odgovarati procijenjenim koncentracijama koje se mogu unijeti u organizam prirodno putem prehrane, što obično odgovara niskim, mikromolarnim koncentracijama, odnosno dozama izraženima u  $\mu\text{g/mL}$ . Razlog tome je što je učinak fenolnih spojeva na stanice izrazito ovisan o dozi, te ima tendenciju biti povoljan pri nižim dozama, a kod visokih doza može biti i štetan, odnosno genotoksičan. Zbog svega navedenoga, pri dizajnu eksperimenata koji istražuju učinak fenolnih spojeva najbolje je koristiti više doza u rasponu od niskih do visokih (Azqueta i Collins, 2016).

## 1.2. Biološki učinci ionizirajućeg zračenja

Ionizirajuće zračenje dobilo je naziv po tome što ima dovoljnu energiju za ionizaciju atoma i stvaranje nabijenih čestica u medijima kroz koje prolazi. Kada su medij ljudske stanice i tkiva, učinak ionizirajućeg zračenja ovisi o mnogim faktorima (npr. vrsta zračenja, doza, vrsta tkiva), a oštećenja staničnih struktura (DNA, mitohondriji, stanična membrana) nastala prolaskom ionizirajućeg zračenja često rezultiraju smrću pogođenih stanica (Baskar i sur., 2012; Mishra i sur., 2018). Patološki procesi koji se odvijaju u stanicama izloženim ionizirajućem zračenju mogu se s obzirom na vrijeme podijeliti na akutne (rane) i kasne učinke. Akutni učinci počinju odmah nakon izlaganja zračenju, a najviše su izraženi u stanicama koje se brzo dijele (npr. koža, epitel crijeva). Zračenje i slobodni radikali koji nastaju zbog zračenja oštećuju vitalne komponente stanice kao što su DNA, proteini, lipidi, itd. Šteta nastala u molekuli DNA dovodi do smrti stanica u prvoj ili prvih nekoliko dioba nakon izlaganja zračenju (mitotička smrt) ili do smrti stanica apoptozom. Kasni učinci javljaju se mjesecima ili godinama nakon izlaganja ionizirajućem zračenju, najčešće u tkivima u kojima se stanice sporije dijele (npr. masno tkivo, mozak, bubrezi, jetra) (Slika 2). Simptomi variraju od blagih do teških, samoograničavajućih ili progresivnih, te se mogu razvijati postepeno ili se iznenada pojaviti. Oštećenja nastaju kompleksnim mehanizmima, a uključuju fibrozu, nekrozu, atrofiju, vaskularna oštećenja te karcinogenezu (Stone i sur., 2003).



**Slika 2.** Učinci ionizirajućeg zračenja na stanice. (preuzeto iz: Mishra i sur., 2018)

Oštećenja DNA nakon izlaganja ionizirajućem zračenju mogu nastati zbog direktnih ili zbog indirektnih učinaka zračenja. Direktna oštećenja inducirana su samim prolaskom zračenja kroz tkiva i kontaktom s DNA, a uključuju jednolančane lomove, dvolančane lomove, oštećenja baza, inter- i intralančano križno povezivanje, lokalna višestruko oštećena mjesta te križno povezivanje DNA i proteina. Broj i težina nastalih oštećenja raste s povećanjem doze i ovisi o energiji zračenja. Indirektna oštećenja posljedica su nastanka slobodnih radikala induciranog ionizirajućim zračenjem i njihove interakcije s DNA, najčešće reaktivnih vrsta kisika koje nastaju radiolizom vode (Averbeck i sur., 2006). Osim samog oštećenja DNA, ostali mehanizmi koji utječu na smrt stanica nakon izlaganja ionizirajućem zračenju su prijenos signala stresa iz jezgre citoplazmom do mitohondrija, odgovor mitohondrija na signale iz jezgre te mitohondrijska indukcija apoptoze. Uz to, odgovor drugih stanica na upalni odgovor posredovan citokinima nakon smrti stanica rezultira i drugim valom smrti stanica (Greenberger, 2009).

Evolucijski je razvijeno više mehanizama popravka DNA koji služe za očuvanje genetskog integriteta i preživljenje stanica. Većina mehanizama radi bez pogreške i obnavlja izvornu sekvencu DNA, međutim neki su skloni greškama što dovodi do mutacija. Mehanizmi koji su uključeni u popravak oštećenja nastalih djelovanjem ionizirajućeg zračenja su direktni popravak, odnosno izravno obrtanje nastalog oštećenja, popravak oštećenja nastalih replikacijom pomoću *mismatch repair* sustava (popravak krivo sparenih baza), popravak izrezivanjem baza za oksidirane baze i jednolančane lomove, popravak izrezivanjem nukleotida za oštećenja nukleotida, homologna rekombinacija za dvolančane lomove u S/G2 fazi staničnog ciklusa te nehomologno sparivanje krajeva za popravak dvolančanih lomova neovisno o staničnom ciklusu (Averback i sur., 2006).

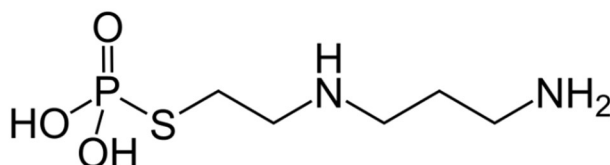
Dvolančani lomovi i lokalna višestruko oštećena mjesta najletalnije su lezije, a njihova prostorna distribucija nakon izlaganja ionizirajućem zračenju, odnosno njihovo nakupljanje na putanji zračenja, omogućava upotrebu zračenja u terapiji tumora. Ovakvo nakupljanje oštećenja smanjuje efikasnost mehanizama popravka i omogućuje ciljano djelovanje na tumorske stanice (Lomax i sur., 2013). Danas se najčešće koristi frakcionirana radioterapija, u kojoj se ukupna potrebna doza ionizirajućeg zračenja raspodijeli u više doza od najčešće po 2 Gy. Time se smanjuje štetan učinak zračenja na normalna tkiva koja okružuju tumor te se postiže bolja lokalna kontrola tumora u usporedbi s korištenjem jedne ili nekoliko velikih doza (Stone i sur., 2003).

### **1.3. Radioprotektori**

Agensi koji štite stanice i tkiva od štetnih učinaka ionizirajućeg zračenja nazivaju se radioprotektorima. Potraga za spojevima koji imaju radioprotektivni učinak započela je prije više od 50 godina u SAD-u, a izrazito je važna u radioterapiji radi zaštite normalnih tkiva koja su izložena zračenju (Nair i sur., 2001). Ostala svojstva koja bi radioprotektori trebali imati su mogućnost primjene prije izlaganja zračenju i specifičnost u djelovanju na biokemijske puteve uključene u odgovor na zračenje, a njihova upotreba ovisi o vremenu unosa, specifičnosti unosa u tkiva koja se trebaju zaštititi te o dolasku na unutarstanična mjesta od interesa. Postoji nekoliko mehanizama na koje radioprotektori mogu utjecati – blokiranje oštećenja jezgrine DNA i sprječavanje komunikacije jezgre s mitohondrijem, stabilizacija mitohondrija i smanjenje stanične smrti uzrokovane citokinima. Ipak, radioprotektori se moraju oprezno birati

s obzirom na svoje dugoročne učinke na stanice te se mora procijeniti sigurnost i najbolji način njihove upotrebe (Greenberger, 2009).

Radioprotektori se mogu podijeliti u više kategorija: sulfhidrilni spojevi, antioksidansi, inhibitori ACE (*angiotensin converting enzyme*), citoprotektivni agensi, metaloelementi, imunomodulatori, lipopolisaharidi i prostaglandini, biljni ekstrakti i izolirani spojevi, DNA vežući ligandi te ostali spojevi. Mehanizmi djelovanja radioprotektora uključuju čišćenje slobodnih radikala, donaciju vodikovih atoma, inhibiciju proteaza, redukciju toksičnosti kemoterapeutskih spojeva, stimulaciju imunološkog sustava, popravak DNA, antioksidativni učinak i sl. (Nair i sur., 2001). Mnogi biljni spojevi posjeduju antioksidativna svojstva, što ih čini dobrim kandidatima za korištenje u radioprotekciji. Antioksidativni spojevi ostvaruju radioprotektivni učinak čišćenjem slobodnih radikala, čime se onemogućuje njihova interakcija s DNA i drugim biološki važnim molekulama i smanjuje oksidativni stres u stanicama, a mogu povoljno utjecati i na popravak oštećene DNA. Dva su moguća mehanizma za postizanje ovog učinka. Prvi mehanizam je prijenos vodikovog atoma, gdje radioprotektor (antioksidans) donira vodikov atom na slobodni radikal kisika i time ga neutralizira. Drugi je mehanizam prijenos jednog elektrona, gdje radioprotektor prenosi jedan elektron na slobodni radikal (koji ne mora nužno biti reaktivna vrsta kisika) čime se također postiže neutralizacija radikala (Mishra i sur., 2018). Neki od poznatijih spojeva koji se mogu koristiti kao radioprotektori su melatonin, vitamini A, C i E, cistein i glutation (Nair i sur., 2001). Problem sintetskih spojeva koji bi mogli imati radioprotektivna svojstva je u tome što su vrlo često toksični i time nisu pogodni za upotrebu. Veliko otkriće u ovom polju bila je sinteza amifostina (Slika 2), sulfhidrilnog spoja s citoprotektivnim učinkom kemijske formule  $C_5H_{15}N_2O_3PS$  i molarne mase 214,224 g/mol, koji se danas koristi kao adjuvans u radioterapiji. Neke od njegovih prednosti su diferencijalna apsorpcija u normalnim i malignim stanicama te postizanje selektivne protekcije normalnih stanica, sigurnost i praktičnost primjene budući da je topiv u vodi. Maksimalna jednokratna doza amifostina je  $740 \text{ mg/m}^2$  tjelesne površine kada se primjenjuje kroz period od 15 minuta, a mora se primjenjivati neposredno prije radioterapije zbog toga što mu je poluživot u krvnoj plazmi samo 10 minuta (Nair i sur., 2001).



**Slika 3.** Kemijska struktura amifostina. (preuzeto s: <https://www.wikiwand.com/sh/Amifostin>)

## 1.4. Metode detekcije oštećenja DNA

*In vitro* metode za ispitivanje genotoksičnih i citotoksičnih učinaka različitih spojeva na stanicama sisavaca, pa tako i ljudskim stanicama, uključuju mikronukleus test, test izmjene sestrinskih kromatida, komet test i test kromosomskih aberacija, uz mnoge druge metode (imunološke metode, PCR testovi, FISH, itd.). Spomenute metode često se koriste zbog svoje jednostavnosti i dobre mogućnosti detekcije i kvantifikacije oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama, a komet test i mikronukleus test mogu poslužiti i za detekciju apoptoze i nekroze u stanicama. Mogu se izvoditi na različitim vrstama stanica, od staničnih linija u kulturi do stanica iz uzoraka tkiva ili periferne krvi. Mikronukleus test se razlikuje od ostalih metoda po tome što se može izvoditi i *in vivo*. Sve se spomenute metode često koriste na ljudskim limfocitima ili leukocitima iz periferne krvi za procjenu genotoksičnih učinaka raznih spojeva na ljudski organizam te u svrhu biomonitoringa izloženosti ljudi ispitivanim spojevima (Araldi i sur., 2015; Ouedraogo i sur., 2012).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati koja od četiri doze arbutina (11,4 µg/mL, 57 µg/mL, 200 µg/mL i 400 µg/mL), primijenjena kao predtretman tijekom jednog sata prije izlaganja ljudskih leukocita ionizirajućem zračenju terapijske doze od 2 Gy, pokazuje najbolji radioprotektivni učinak na ljudske leukocite. Učinak arbutina uspoređen je s učinkom amifostina (250 µg/mL), koji se redovno koristi kao radioprotektor u terapiji zračenjem. Radioprotektivni učinak procijenjen je upotrebom komet testa u alkalnim uvjetima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Prikupljanje uzoraka krvi**

Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice te od strane etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada gdje je proveden dio istraživanja. Za potrebe istraživanja prikupljeni su uzorci krvi trojice zdravih, muških dobrovoljaca dobi 20-30 godina koji su nepušači te su dali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Od svakog dobrovoljca prikupljeno je 50 mL venske krvi u heparinizirane vacutainere volumena 10 mL na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada.

#### **3.2. Tretman uzoraka krvi**

Prikupljeni uzorci krvi razdijeljeni su u po 12 hepariniziranih vacutainera volumena 5 mL po dobrovoljcu. U svaki vacutainer preneseno je u sterilnim uvjetima po 4,3 mL krvi. Vacutaineri su podijeljeni u dva seta – 6 vacutainera koji su ozračeni i 6 koji nisu. Uzorci krvi tretirani su prema shemi prikazanoj u Tablici 1. Tretman uzoraka provodio se u sterilnim uvjetima tako da se u vacutainere dodavalo 100  $\mu$ L unaprijed pripremljenih razrjeđenja arbutina pripremljenih tako da konačne doze arbutina u vacutainerima budu 11,4  $\mu$ g/mL, 57  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL i 400  $\mu$ g/mL. Najniža korištena koncentracija (11,4  $\mu$ g/mL) odgovara maksimalnom dozvoljenom dnevnom unosu arbutina u organizam odrasle osobe mase 70 kg, a za koncentraciju 200  $\mu$ g/mL pokazano je da ne pokazuje pojavu mikronukleusa u ljudskim limfocitima periferne krvi (European Medicines Agency, 2012). Koncentracija 400  $\mu$ g/mL odabrana je kako bi se potvrdilo da arbutin ne pokazuje značajne citotoksične učinke (Jurica i sur., 2018), a koncentracija 57  $\mu$ g/mL odabrana je kao potencijalna radioprotektivna doza. Netretirani uzorci služili su kao negativna kontrola. Po jedan uzorak u svakom setu tretiran je sa 100  $\mu$ L amifostina pripremljenog tako da konačna doza u vacutaineru bude 250  $\mu$ g/mL, kako bi se usporedilo djelovanje amifostina, koji se uobičajeno koristi kao radioprotektor u terapiji zračenjem, s djelovanjem arbutina. Tretirani uzorci inkubirani su 1 h na 37 °C prije izlaganja zračenju. Tijekom pripreme preparata, netretirani i neozračeni uzorci krvi (negativne kontrole)

tretirani su sa 100  $\mu\text{M}$  vodikovim peroksidom tijekom 10 minuta, te su ti preparati služili kao pozitivna kontrola metode.

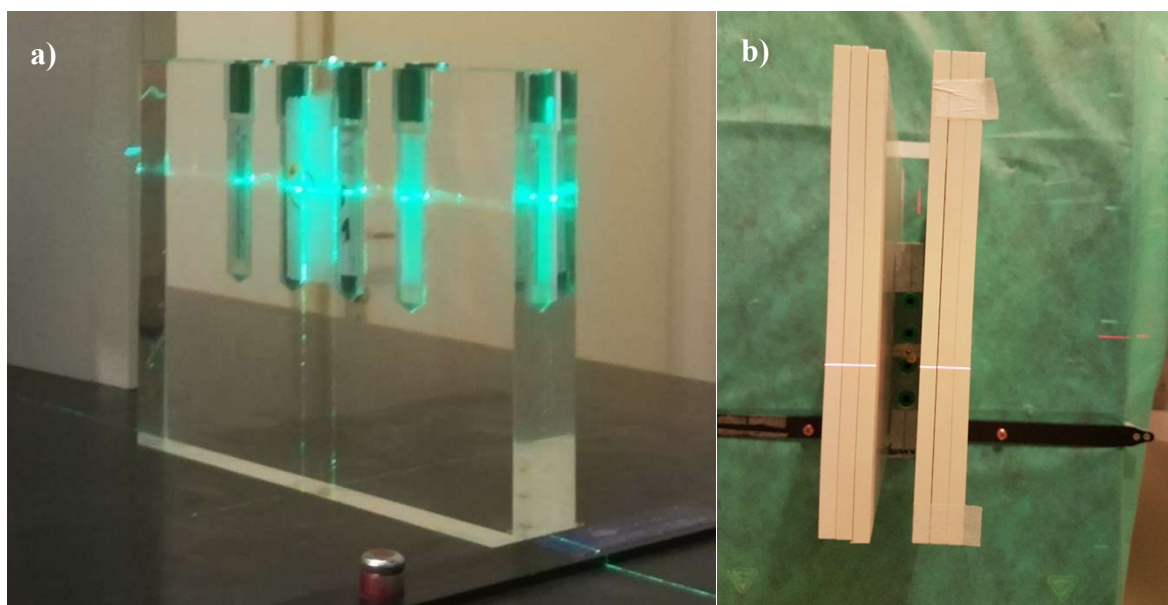
**Tablica 1.** Shema tretmana uzoraka krvi.

	DONOR 1		DONOR 2		DONOR 3	
	Broj uzorka	Tretman	Broj uzorka	Tretman	Broj uzorka	Tretman
NEOZRAČENO	1	-	13	-	25	-
	2	11,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	14	11,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	26	11,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	3	57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	15	57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	27	57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	4	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	16	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	28	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	5	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	17	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	29	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	6	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amifostin	18	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amifostin	30	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amifostin
OZRAČENO	7	-	19	-	31	-
	8	11,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	20	11,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	32	11,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	9	57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	21	57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	33	57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	10	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	22	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	34	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	11	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	23	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin	35	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arbutin
	12	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amifostin	24	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amifostin	36	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amifostin



### 3.3. Zračenje

Uzorci su u kontroliranim uvjetima na 37 °C preneseni na Kliniku za tumore te su tamo prebačeni u poseban spremnik od pleksiglasa (fantom, Slika 3a) u koji stanu četiri vacutainera. Prije samog zračenja oko fantoma su postavljene ploče od polistirena debljine 1 cm (Slika 3b). Uzorci su zračeni na linearnom akceleratoru Oncor (Siemens) s fotonima normalnog akceleratoruskog potencijala 6 mV. Prvo je napravljena CT simulacija uz napon cijevi 120 kV i debljinu slojeva 1,5 mm. Za izračun doze korišten je u program za planiranje XIO 4.7 (CMS inc., St. Louis, SAD) upotrebom algoritma superpozicije uz udaljenost točaka 1,5 mm u sva tri smjera. Izračunate srednje vrijednosti doze su 1,999 Gy za epruvetu 1, 1,997 Gy za epruvetu 2, 2,002 Gy za epruvetu 3 i 2,004 Gy za epruvetu 4 u fantomu. Ove vrijednosti predstavljaju računsku grešku pri izračunu doze, dok greška u isporuci doze iznosi oko 1 %. Korištena doza od 2 Gy je standardna doza koja se koristi u frakcioniranoj terapiji zračenjem.



**Slika 4.** Eksperimentalni postav za zračenje uzoraka na linearnom akceleratoru Oncor (Siemens): a) uzorci u posebnom spremniku od pleksiglasa (fantomu), b) fantom s postavljenim pločama od polistirena prije samog zračenja.

### 3.4. Alkalni komet test

Komet test, odnosno tehnika pojedinačnih stanica u gelu metoda je kojom je moguće mjeriti oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama. Metoda se izvodi tako što se stanice stave u

agarozni gel na predmetnom stakalcu, nakon čega se liziraju čime se oslobađa DNA od ostalih staničnih komponenti (stanična membrana, citoplazma i jezgrina ovojnica). DNA se zatim denaturira i provede se elektroforeza. Temelj mjerenja oštećenja DNA leži u tome da manji fragmenti DNA koji nastaju uslijed oštećenja putuju dalje u gelu od neoštećene DNA. Karakteristične slike jezgara u gelu koje se dobiju kao rezultat imaju glavu u kojoj je neoštećena DNA i rep u kojem se nalaze fragmenti DNA (Slika 4), čime podsjećaju na komete, po čemu je metoda dobila ustaljeno ime (Fairbairn i sur., 1995). Za vizualizaciju “kometa“ koriste se fluorescentne boje koje se vežu na DNA (npr. etidij-bromid, DAPI, akridin oranž) i fluorescencijski mikroskop. Postoji više izvedbi komet testa kojima je moguće detektirati različite vrste lomova DNA, a alkalni komet test najčešće se koristi za detekciju jednolančanih lomova. Zahvaljujući svojoj osjetljivosti i mogućnosti kvantitativnih mjerenja, komet test je metoda koja se uobičajeno koristi u testovima genotoksičnosti, biomonitoringu i sličnim testovima (Collins, 2004).



**Slika 5.** Izgled leukocita pod epifluorescencijskim mikroskopom nakon izvedbe komet testa i bojenja etidij-bromidom, povećanje 400x.

U ovom istraživanju primijenjena je standardna izvedba komet testa u alkalnim uvjetima na leukocitima koju su razvili Singh i suradnici (1988).

Predmetna stakalca pripremljena su prije samog pokusa tako da je na njih nanoseno 300  $\mu$ L 1% agaroze normalnog tališta (NMP – *normal melting point*; prvi gel) te su pokrivena pokrovnicom i ostavljena 10 minuta na ledu kako bi gel polimerizirao. Nakon polimerizacije

gela, pokrovnice su oprezno skinute, a stakalca su stavljena na grijaću ploču kako bi se gel osušio.

30 minuta nakon zračenja, pristupilo se izradi preparata.

Preparati su pripremljeni tako što je na predmetna stakalca s prvim gelom (1% NMP agaroz) prvo nanoseno 300  $\mu$ L 0,6 % agaroze niskog tališta (LMP – *low melting point*; donji gel) koji je prekriven pokrovnicom i ostavljen 10 minuta na ledu kako bi polimerizirao. 8  $\mu$ L uzorka krvi pomiješano je sa 100  $\mu$ L 0,5% agaroze niskog tališta te nanoseno na donji gel, pokriveno pokrovnicom i ostavljeno 10 minuta na ledu radi polimerizacije. Nakon polimerizacije, pokrovnice su skinute i nanoseno je još 100  $\mu$ L 0,5% agaroze niskog tališta (gornji gel), preparat je pokriven pokrovnicom i ostavljen 10 minuta na ledu. Kao pozitivna kontrola metode korišteni su preparati napravljeni od kontrolnih neozračenih uzoraka (bez tretmana arbutinom ili amifostinom) koji su tretirani 100  $\mu$ M vodikovim peroksidom 10 minuta na ledu umjesto nanošenja gornjeg gela. Od svakog uzorka krvi napravljena su po dva preparata.

Nakon polimerizacije zadnjeg (gornjeg) gela, pokrovnice su oprezno skinute s preparata te su preparati preneseni u pufer za lizu stanica, pH=10 (NaCl, Na-laurilsarkozinat, Tris-HCl; 10% DMSO, 1% Triton X-100), u kojem su inkubirani 1 sat na 4 °C.

Nakon lize stanica, preparati su prebačeni u hladni pufer za denaturaciju, pH=13 (NaOH, Na<sub>2</sub>EDTA) u kadu za horizontalnu elektroforezu, te se su u puferu inkubirani 20 minuta. Kada je denaturacija završena, provedena je elektroforeza 20 minuta na 25 V u istom puferu.

Po završetku elektroforeze, preparati su neutralizirani s Tris-HCl, pH=7,5 tri puta po 5 minuta.

Preparati su pregledavani na epifluorescencijskom mikroskopu. 10 minuta prije analize obojani su sa 100  $\mu$ L etidij bromida. Nakon bojenja, kratko su isprani s Tris-HCl. Po svakom stakalcu analizirano je 100 jezgara. Uporabom računalnog sustava za analizu slike Comet assay II (Perceptive Instruments Ltd.) izmjereni su parametri: dužina repa kometa, intenzitet repa kometa (% DNA u repu) i repni moment.

### 3.5. Statističke metode

Promatrani parametri (dužina repa kometa, intenzitet repa kometa, repni moment) analizirani su pomoću deskriptivne statistike u programu Microsoft Office Excel. Dobivene su srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom (SE), medijani te minimalna i maksimalna vrijednost za svaki parametar. Daljnja statistička obrada rezultata izvodila se pomoću računalnog programa STATISTICA 9.0 (StatSoft, Tulsa, SAD) uz primjenu Break Down Anova analize varijance s post hoc Scheffeovom modifikacijom. Kao prag statističke značajnosti određen je  $p < 0,05$ . Za svaku skupinu određen je i broj kometa dugog repa na način da je određen 95-i percentil dužine repa kometa ozračene i neozračene negativne kontrole te su u programu Microsoft Office Excel u svakoj odgovarajućoj skupini prebrojani kometi koji su jednaki ili prelaze tu vrijednost.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Dužina repa kometa

Među neozračenim uzorcima, najviša vrijednosti parametra dužine repa kometa ( $\mu\text{m} \pm \text{SE}$ ) izmjerena je u pozitivnoj kontroli ( $23,70 \pm 0,23$ ), a najniža u tretmanu amifostin  $250 \mu\text{g/mL}$  ( $21,42 \pm 0,19$ ). Vrijednosti u ostalim skupinama bile su:  $22,58 \pm 0,17$  za negativnu kontrolu,  $22,52 \pm 0,22$  za tretman arbutin  $11,4 \mu\text{g/mL}$ ,  $23,58 \pm 0,18$  za tretman arbutin  $57 \mu\text{g/mL}$ ,  $22,83 \pm 0,19$  za tretman arbutin  $200 \mu\text{g/mL}$  i  $23,35 \pm 0,22$  za tretman arbutin  $400 \mu\text{g/mL}$ . Tretman amifostinom u dozi od  $250 \mu\text{g/mL}$  pokazuje statistički značajno ( $p < 0,05$ ) nižu vrijednost ( $21,42 \pm 0,19$ ) u odnosu na ostale skupine, osim u odnosu na negativnu kontrolu ( $22,58 \pm 0,17$ ) i tretman arbutinom doze  $11,4 \mu\text{g/mL}$  ( $22,52 \pm 0,22$ ). Vrijednosti ostalih skupina uzoraka ne pokazuju statistički značajne razlike (Tablica 2, Slika 6).

Izmjerena vrijednost dužine repa kometa ( $\mu\text{m} \pm \text{SE}$ ) kod ozračenih uzoraka najviša je kod tretmana arbutin  $200 \mu\text{g/mL}$  ( $32,11 \pm 0,31$ ), a najniža kod tretmana arbutin  $11,4 \mu\text{g/mL}$  ( $29,92 \pm 0,25$ ). Vrijednosti dužine repa kometa u ostalim skupinama iznose:  $31,20 \pm 0,26$  za negativnu kontrolu,  $30,31 \pm 0,32$  za tretman arbutinom doze  $57 \mu\text{g/mL}$ ,  $30,16 \pm 0,31 \mu\text{m}$  za tretman arbutinom doze  $400 \mu\text{g/mL}$  te  $29,97 \pm 0,25 \mu\text{m}$  za tretman amifostinom doze  $250 \mu\text{g/mL}$ . Tretman arbutinom doze  $200 \mu\text{g/mL}$  ( $32,11 \pm 0,31$ ) pokazuje statistički značajno višu vrijednost ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale skupine, osim u odnosu na negativnu kontrolu ( $31,20 \pm 0,26$ ). Svi ostali tretmani pokazuju nižu, ali ne i statistički značajnu, vrijednost u odnosu na negativnu kontrolu (Tablica 3, Slika 6).

### 4.2. Intenzitet repa kometa

Među neozračenim uzorcima, najniža izmjerena vrijednost parametra intenziteta repa kometa ( $\% \text{DNA} \pm \text{SE}$ ) je u negativnoj kontroli ( $3,02 \pm 0,18$ ), a najviša u pozitivnoj kontroli ( $3,97 \pm 0,21$ ). Niti jedna skupina uzoraka ne pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na bilo koju drugu skupinu, iako svi tretmani pokazuju nešto više vrijednosti u odnosu na negativnu kontrolu. Vrijednosti parametra intenziteta repa kometa u tretiranim skupinama iznose redom:  $3,04 \pm 0,19$  za tretman amifostinom doze  $250 \mu\text{g/mL}$ ,  $3,30 \pm 0,19$  za tretman

arbutinom doze 200  $\mu\text{g/mL}$ ,  $3,43 \pm 0,20$  za tretman arbutinom doze 57  $\mu\text{g/mL}$ ,  $3,60 \pm 0,23$  % za tretman arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$  i  $3,82 \pm 0,23$  za tretman arbutinom doze 400  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 2, Slika 7).

Najniža izmjerena vrijednost intenziteta repa kometa ( $\%DNA \pm SE$ ) u ozračenim uzorcima je kod tretmana arbutin 11,4  $\mu\text{g/mL}$  ( $8,00 \pm 0,28$ ), dok je najviša izmjerena vrijednost kod tretmana arbutin 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $8,61 \pm 0,32$ ). Vrijednosti izmjerene u ostalim skupinama iznose:  $8,07 \pm 0,28$  za negativnu kontrolu,  $8,17 \pm 0,30$  za tretman amifostinom doze 250  $\mu\text{g/mL}$ ,  $8,29 \pm 0,31$  za tretman arbutinom doze 57  $\mu\text{g/mL}$  te  $8,41 \pm 0,32$  za tretman arbutinom doze 400  $\mu\text{g/mL}$ . Nema statistički značajnih razlika među skupinama (Tablica 3, Slika 7).

### 4.3. Repni moment kometa

Najniže izmjerene vrijednosti parametra repnog momenta kometa ( $SV \pm SE$ ) među neozračenim uzorcima iznose  $0,26 \pm 0,02$  u negativnoj kontroli i kod tretmana amifostin 250  $\mu\text{g/mL}$ , a najviša izmjerena vrijednost je  $0,37 \pm 0,02$  u pozitivnoj kontroli. Ne postoje statistički značajne razlike među skupinama, iako svi tretmani, osim tretmana amifostinom, pokazuju malo više vrijednosti u odnosu na negativnu kontrolu. Vrijednosti repnog momenta kometa u ostalim skupinama bile su:  $0,28 \pm 0,02$  za tretman arbutinom doze 200  $\mu\text{g/mL}$ ,  $0,30 \pm 0,02$  za tretman arbutinom doze 57  $\mu\text{g/mL}$ ,  $0,32 \pm 0,02$  za tretman arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$  te  $0,35 \pm 0,02$  za tretman arbutinom doze 400  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 2, Slika 8).

Među ozračenim uzorcima, najniža vrijednost repnog momenta kometa ( $SV \pm SE$ ) izmjerena je kod tretmana arbutin 11,4  $\mu\text{g/mL}$  ( $0,86 \pm 0,03$ ), a najviše vrijednosti kod tretmana arbutin 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $0,95 \pm 0,03$ ) i arbutin 400  $\mu\text{g/mL}$  ( $0,95 \pm 0,04$ ). U ostalim skupinama izmjerene su sljedeće vrijednosti:  $0,88 \pm 0,03$  za tretman amifostinom doze 250  $\mu\text{g/mL}$ ,  $0,89 \pm 0,03$  za negativnu kontrolu i  $0,91 \pm 0,03$  za tretman arbutinom doze 57  $\mu\text{g/mL}$ . Nema statistički značajnih razlika među skupinama, a jedino tretmani arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$  ( $0,86 \pm 0,03$ ) i amifostinom doze 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $0,88 \pm 0,03$ ) pokazuju niže vrijednosti u odnosu na negativnu kontrolu ( $0,89 \pm 0,03$ ) (Tablica 3, Slika 8).

**Tablica 2.** Primarna oštećenja DNA u neozračenim ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4 µg/mL, 57 µg/mL, 200 µg/mL i 400 µg/mL) i amifostinom (250 µg/mL), izražena parametrima dužina repa (µm), intenzitet repa (% DNA) i repni moment.

	NEOZRAČENO								
	DUŽINA REPA (µm)			INTENZITET REPA (% DNA)			REPNI MOMENT		
	SV ± SE	Med	Min-maks	SV ± SE	Med	Min-maks	SV ± SE	Med	Min-maks
<b>Pozitivna kontrola</b>	23,70 ± 0,23	23,75	11,67-49,17	3,97 ± 0,21	1,77	0,00-35,29	0,37 ± 0,02	0,19	0,00-6,34
<b>Negativna kontrola</b>	22,58 ± 0,17	22,50	12,5-44,17	3,02 ± 0,18	0,92	0,00-29,99	0,26 ± 0,02	0,09	0,00-2,51
<b>Arbutin 11,4 µg</b>	22,52 ± 0,22	22,08	14,17-47,08	3,60 ± 0,23	1,01	0,00-39,44	0,32 ± 0,02	0,11	0,00-4,55
<b>Arbutin 57 µg</b>	23,58 ± 0,18	23,33	14,17-42,08	3,43 ± 0,20	1,33	0,00-31,87	0,30 ± 0,02	0,14	0,00-2,70
<b>Arbutin 200 µg</b>	22,83 ± 0,19	22,50	14,17-42,92	3,30 ± 0,19	1,17	0,00-38,56	0,28 ± 0,02	0,11	0,00-3,63
<b>Arbutin 400 µg</b>	23,35 ± 0,22	22,92	11,25-44,58	3,82 ± 0,23	0,13	0,00-42,96	0,35 ± 0,02	0,13	0,00-3,74
<b>Amifostin 250 µg</b>	21,42 ± 0,19 <sup>a,b,c,d</sup>	21,04	12,92-45,42	3,04 ± 0,19	0,82	0,00-30,39	0,26 ± 0,02	0,08	0,00-4,13

Mjerenja su provedena na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru).

SV – srednja vrijednost; SE – standardna pogreška; Med – medijan; Min-maks – minimalna i maksimalna vrijednost

Pozitivna kontrola – tretman s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tijekom 10 min; Negativna kontrola – bez tretmana

a – statistički značajno različito u odnosu na pozitivnu kontrolu; b – statistički značajno različito u odnosu na arbutin 57 µg/mL; c – statistički značajno različito u odnosu na arbutin 200 µg/mL; d – statistički značajno različito u odnosu na arbutin 400 µg/mL

**Tablica 3.** Primarna oštećenja DNA u neozračenim ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4 µg/mL; 57 µg/mL; 200 µg/mL i 400 µg/mL) i amifostinom (250 µg/mL) te izlaganja ionizirajućem zračenju doze 2 Gy, izražena parametrima dužina repa (µm), intenzitet repa (% DNA) i repni moment.

	OZRAČENO								
	DUŽINA REPA (TL)			INTENZITET REPA (TI)			REPNI MOMENT (TM)		
	SV ± SE	Med	Min-maks	SV ± SE	Med	Min-maks	SV ± SE	Med	Min-maks
<b>Negativna kontrola</b>	31,20 ± 0,26	31,25	14,17-47,50	8,07 ± 0,28	6,70	0,00-39,49	0,89 ± 0,03	0,79	0,00-4,03
<b>Arbutin 11,4 µg</b>	29,92 ± 0,25	29,58	12,50-48,75	8,00 ± 0,28	6,05	0,00-32,49	0,86 ± 0,03	0,69	0,00-3,63
<b>Arbutin 57 µg</b>	30,31 ± 0,32	29,17	12,50-48,75	8,29 ± 0,31	6,36	0,00-37,32	0,91 ± 0,03	0,71	0,00-5,07
<b>Arbutin 200 µg</b>	32,11 ± 0,31 <sup>a,b,c,d</sup>	32,08	13,33-48,75	8,61 ± 0,32	6,86	0,00-42,52	0,95 ± 0,03	0,76	0,00-5,19
<b>Arbutin 400 µg</b>	30,16 ± 0,31	29,17	13,33-49,58	8,41 ± 0,32	6,12	0,00-41,46	0,95 ± 0,04	0,67	0,00-4,82
<b>Amifostin 250 µg</b>	29,97 ± 0,25	29,58	13,33-49,58	8,17 ± 0,30	6,19	0,00-43,56	0,88 ± 0,03	0,72	0,00-4,88

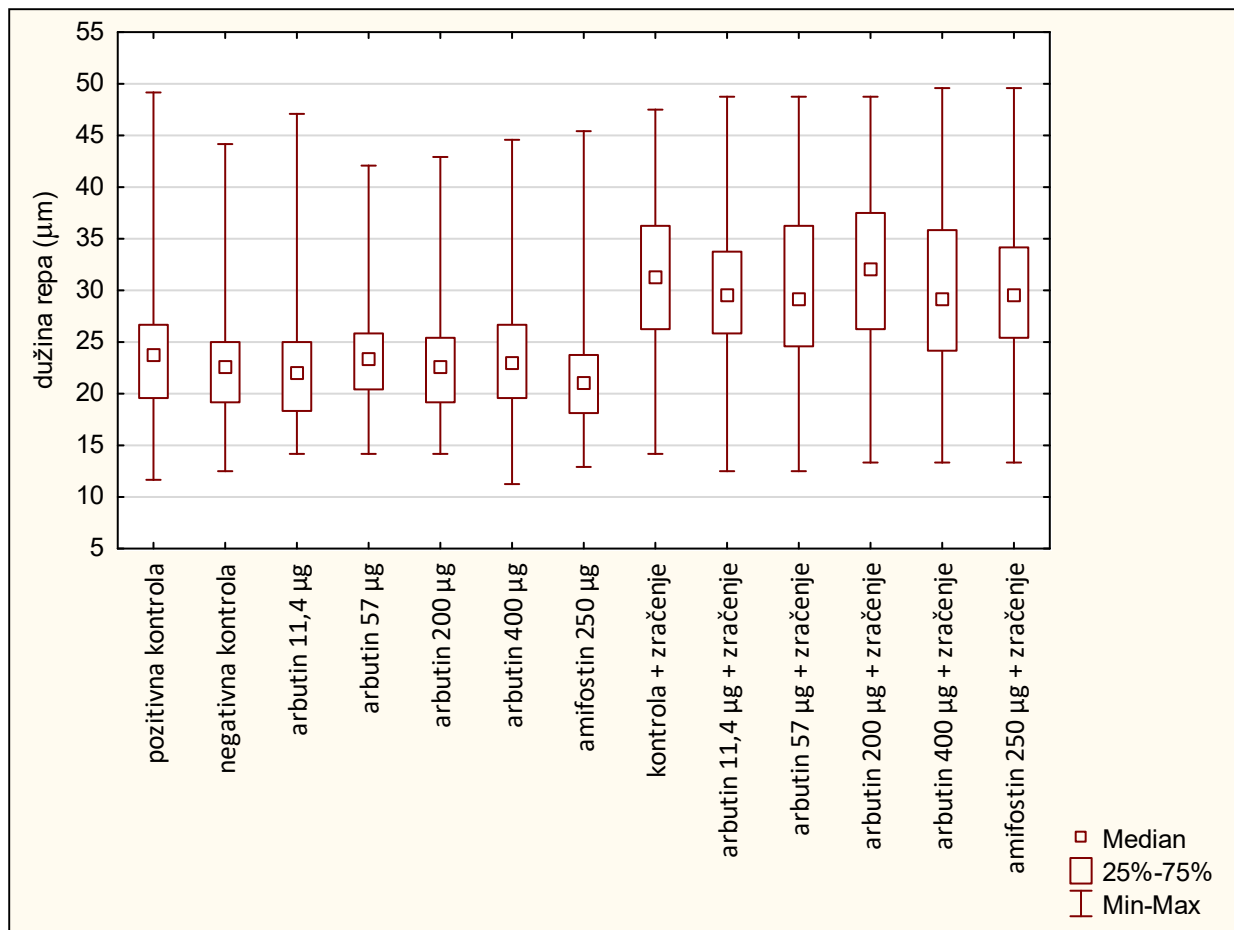
Mjerenja su provedena na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru).

SV – srednja vrijednost; SE – standardna pogreška; Med – medijan; Min-maks – minimalna i maksimalna vrijednost

Negativna kontrola – bez tretmana

a – statistički značajno različito u odnosu na arbutin 11,4 µg/mL; b – statistički značajno različito u odnosu na arbutin 57 µg/mL; c – statistički značajno različito u odnosu na arbutin 400 µg/mL; d – statistički značajno različito u odnosu na amifostin 250 µg/mL



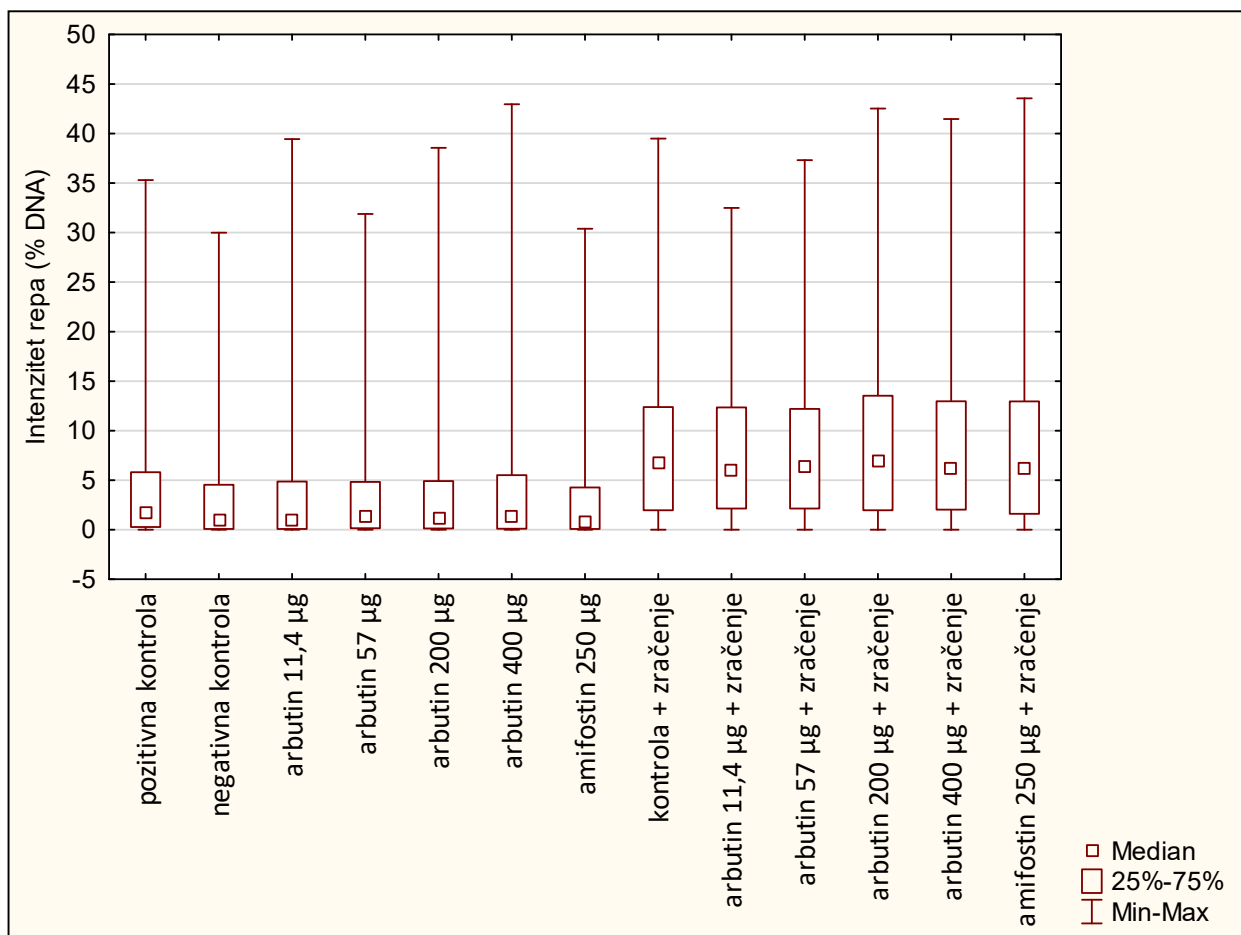


**Slika 6.** Vrijednosti dužine repa kometa izmjerene na ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4 µg/mL; 57 µg/mL; 200 µg/mL i 400 µg/mL) i amifostinom (250 µg/mL) te izlaganja ionizirajućem zračenju doze 2 Gy.

Mjerenja su provedena na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru). Prikazani su rezultati deskriptivne statistike.

Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost

Pozitivna kontrola – tretman s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tijekom 10 min; Negativna kontrola – bez tretmana

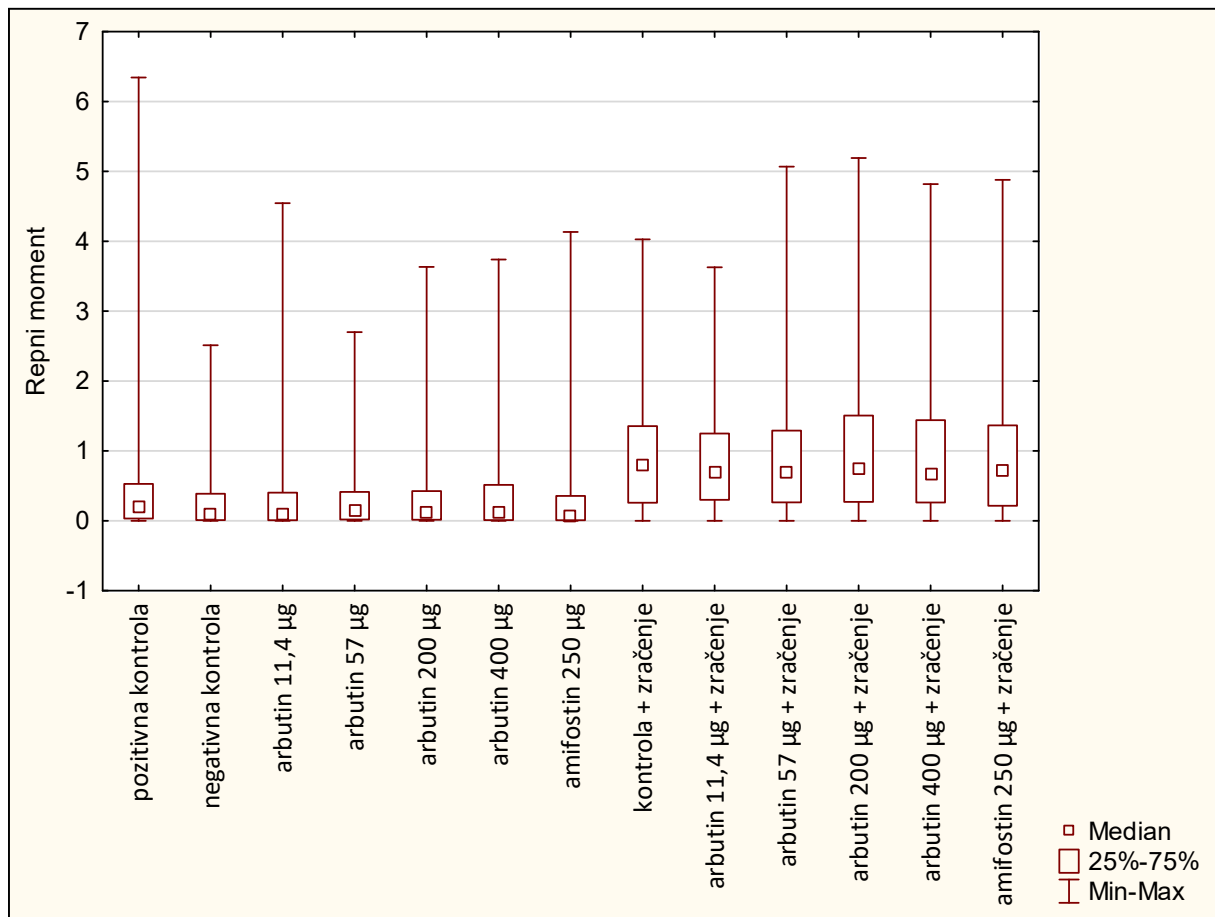


**Slika 7.** Vrijednosti intenziteta repa kometa izmjerene na ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4 µg/mL; 57 µg/mL; 200 µg/mL i 400 µg/mL) i amifostinom (250 µg/mL) te izlaganja ionizirajućem zračenju doze 2 Gy.

Mjerenja su provedena na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru). Prikazani su rezultati deskriptivne statistike.

Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost

Pozitivna kontrola – tretman s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tijekom 10 min; Negativna kontrola – bez tretmana



**Slika 8.** Vrijednosti repnog momenta kometa izmjerene na ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4 µg/mL; 57 µg/mL; 200 µg/mL i 400 µg/mL) i amifostinom (250 µg/mL) te izlaganja ionizirajućem zračenju doze 2 Gy.

Mjerenja su provedena na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru). Prikazani su rezultati deskriptivne statistike.

Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost

Pozitivna kontrola – tretman s H<sub>2</sub>O<sub>s</sub> tijekom 10 min; Negativna kontrola – bez tretmana

#### 4.4 Broj kometa dugog repa

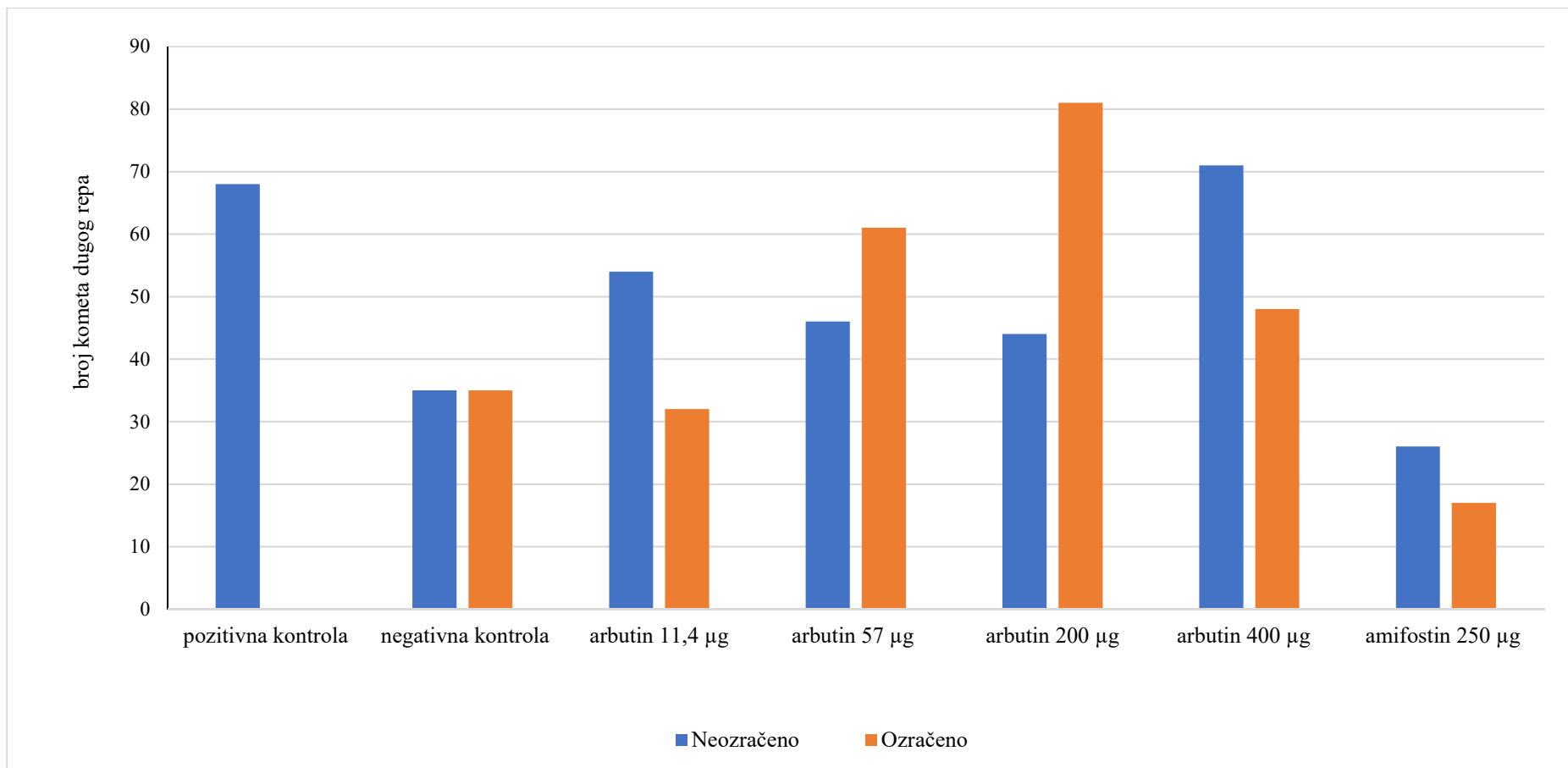
Među neozračenim uzorcima, najmanji broj kometa dugog repa izmjeren je kod tretmana amifostin 250  $\mu\text{g/mL}$  (26), a najveći kod tretmana arbutin 400  $\mu\text{g/mL}$  (71). vrijednosti u ostalim skupinama iznose: 68 za pozitivnu kontrolu, 35 za negativnu kontrolu, 54 za tretman arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$ , 46 za tretman arbutinom doze 57  $\mu\text{g/mL}$  i 44 za tretman arbutinom doze 200  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 4, Slika 8). Svi tretmani arbutinom pokazuju veći broj kometa dugog repa u odnosu na negativnu kontrolu.

Broj kometa dugog repa u ozračenim uzorcima najveći je kod tretmana arbutin 200  $\mu\text{g/mL}$  (81), a najmanji kod tretmana amifostin 250  $\mu\text{g/mL}$  (17). Ostale vrijednosti bile su: 35 za negativnu kontrolu, 32 za tretman arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$ , 61 za tretman arbutinom doze 57  $\mu\text{g/mL}$  te 48 za tretman arbutinom doze 400  $\mu\text{g/mL}$ . Od tretmana arbutinom, jedino tretman dozom 11,4  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje manji broj kometa dugog repa u odnosu na negativnu kontrolu (Tablica 4, Slika 8).

**Tablica 4.** Broj kometa dugog repa izmjeren na ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4  $\mu\text{g/mL}$ ; 57  $\mu\text{g/mL}$ ; 200  $\mu\text{g/mL}$  i 400  $\mu\text{g/mL}$ ) i amifostinom (250  $\mu\text{g/mL}$ ) te izlaganja ionizirajućem zračenju doze 2 Gy

NEOZRAČENO		OZRAČENO	
Skupina	Broj LTN	Skupina	Broj LTN
Pozitivna kontrola	68		
Negativna kontrola	35	Negativna kontrola	35
Arbutin 11,4 $\mu\text{g/mL}$	54	Arbutin 11,4 $\mu\text{g/mL}$	32
Arbutin 57 $\mu\text{g/mL}$	46	Arbutin 57 $\mu\text{g/mL}$	61
Arbutin 200 $\mu\text{g/mL}$	44	Arbutin 200 $\mu\text{g/mL}$	81
Arbutin 400 $\mu\text{g/mL}$	71	Arbutin 400 $\mu\text{g/mL}$	48
Amifostin 250 $\mu\text{g/mL}$	26	Amifostin 250 $\mu\text{g/mL}$	17

Mjerenje je provedeno na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru).  
Pozitivna kontrola – tretman s  $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 10 min; Negativna kontrola – bez tretmana



**Slika 9.** Broj kometa dugog repa izmjeren na ljudskim leukocitima nakon tretmana arbutinom (11,4 µg/mL; 57 µg/mL; 200 µg/mL i 400 µg/mL) i amifostinom (250 µg/mL) te izlaganja ionizirajućem zračenju doze 2 Gy.

Mjerenje je provedeno na ukupno 600 pojedinačnih kometa (200 po svakom donoru).  
 Pozitivna kontrola – tretman s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tijekom 10 min; Negativna kontrola – bez tretmana

## 5. RASPRAVA

Arbutin se smatra sigurnim za korištenje pri preporučenom dnevnom unosu, a ograničenje maksimalne doze i vremena upotrebe proizlaze iz toga što se arbutin metabolizira u hidrokinon koji je u nekim istraživanjima pokazao hepatotoksične, nefrotoksične i limfotoksične učinke (Migas i Krauze-Baranowska, 2015; Jurica i sur., 2017; Tkalčec, 2018). Jurica i sur. (2018) u svom su istraživanju sigurnosti ekstrakta lista obične planike i arbutina na ljudskim perifernim limfocitima potvrdili da arbutin ne pokazuje značajnu citotoksičnost i ne uzrokuje primarna oštećenja DNA pri dozama koje odgovaraju maksimalnom dnevnom unosu. Također su ukazali i na dobra antioksidativna svojstva ekstrakta lista obične planike, koji sadrži i arbutin.

Rezultati ovog istraživanja sukladni su dosadašnjim, arbutin ni ovdje nije pokazao potencijal za uzrokovanje oštećenja DNA u uzorcima koji nisu tretirani zračenjem. Iako su vrijednosti intenziteta repa i repnog momenta nešto više pri svim tretmanima, ni jedan uzorak nije pokazao statistički značajno veće vrijednosti u odnosu na negativnu kontrolu. Tretman arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$  pokazao je nižu vrijednost dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu i niže vrijednosti svih parametara u odnosu na ostale tretmane arbutinom, što može ukazivati na potencijalni citoprotektivni učinak arbutina. Broj kometa dugog repa veći je u odnosu na negativnu kontrolu kod svih tretmana arbutinom, ali je ova vrijednost najniža pri tretmanu arbutinom doze 200  $\mu\text{g/mL}$ . Ovi rezultati potvrđuju da je odgovor stanica na tretman ovisan o dozi, kao što je dosad pokazano za većinu fenolnih spojeva (Azqueta i Collins, 2016), te da se povećanjem doze arbutina povećava njegov genotoksični učinak, iako je u ovom slučaju taj učinak zanemariv pri svim dozama. Amifostin pri korištenoj dozi također ne pokazuje genotoksični učinak, štoviše, dužina repa kometa pri tretmanu amifostinom statistički je značajno manja u odnosu na sve ostale skupine, a vrijednosti ostalih parametara niže u odnosu na tretmane arbutinom dok je u odnosu na negativnu kontrolu vrijednost intenziteta repa kometa viša, a vrijednost repnog momenta jednaka. Broj kometa dugog repa jedino je pri tretmanu amifostinom niži u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati tretmana amifostinom sukladni su s dosadašnjim procjenama sigurnosti korištenja amifostina u radioterapiji (Nair i sur., 2001), a u ovom je istraživanju pokazao manji genotoksični učinak u odnosu na arbutin.

Biljni spojevi koji pokazuju antioksidativni učinak dobri su kandidati za istraživanje radioprotektivnog učinka najviše zbog mogućnosti čišćenja slobodnih radikala nastalih

utjecajem ionizirajućeg zračenja (Nair i sur., 2001). U posljednje se vrijeme velik broj biljnih, najčešće fenolnih, spojeva poput cimetine kiseline, kvinične i klorigenične kiseline, kurkumina i sezamola ispituje za potencijalni radioprotektivni učinak. Među navedenima, svi u uvjetima *in vitro* na ljudskim limfocitima pokazuju značajnu radioprotekciju u odnosu na netretirane kontrole, što čini fenolne biljne spojeve obećavajućima za korištenje u radioprotekciji. Međutim, točni mehanizmi djelovanja i efektivne doze ostavljaju još mjesta za daljnja istraživanja (Cinkilic i sur., 2013; Cinkilic i sur., 2014; Parsad i sur., 2005; Srinivasan i sur., 2006).

Arbutin je dosad istraživao u mnogim kontekstima, s obzirom da je važan konstituent ekstrakta lista biljke *Arctostaphylos uva ursi* L. koji se tradicionalno koristi u liječenju infekcija mokraćnog sustava, a vrlo je čest sastojak i raznih kozmetičkih proizvoda koji služe za izbjeljivanje kože (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Do sada je *in vitro* pokazan potencijalni citoprotektivni učinak arbutina pri tretmanu HepG2 staničnih kultura tert-butil hidroperoksidom koji izaziva oksidativni stres u stanicama (Seyfizadeh i sur., 2012). U štakora tretiranih ciklosporinom, arbutin je pokazao protektivni učinak pri tretmanu dozom od 50 mg/kg, ali je pri većoj dozi (100 mg/kg) i sam uzrokovao oksidativni stres i lipidnu peroksidaciju u serumu tretiranih štakora (Khadir i sur., 2015). Također, pokazao je potencijalni protektivni učinak protiv oštećenja ljudskih dermalnih fibroblasta induciranim UVA i UVB zračenjem, ali u kombinaciji s urosoličnom kiselinom (Chen i sur., 2009).

S obzirom na dosadašnja istraživanja i pokazan citoprotektivni učinak arbutina, otvara se pitanje može li arbutin pružiti zaštitu stanicama tretiranim ionizirajućim zračenjem koje se primjenjuje u terapiji tumora. Li-Hua i sur. (2014) pokazali su da arbutin smanjuje apoptozu induciranu X-zračenjem u staničnoj kulturi ljudskog limfoma U937 predtretiranoj arbutinom doze 50-500  $\mu$ M tijekom jednog sata prije izlaganja zračenju, što ukazuje na njegov potencijalni radioprotektivni učinak. Nadi i sur. (2016) pokazali su radioprotektivni potencijal arbutina, primijenjenog kao predtretman tijekom dva sata prije izlaganja miševa gama zračenju u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg, na stanice koštane srži primjenom mikronukleus testa. Nadi i sur. (2019) također su pokazali radioprotektivni učinak arbutina procjenom jetrenih enzima u serumu miševa tretiranih terapijskim X-zračenjem, predtretiranih arbutinom doze 50, 100 i 200 mg/kg tijekom dva sata prije izlaganja zračenju. Međutim, nema dosadašnjih istraživanja radioprotektivnog učinka arbutina na ljudskim limfocitima ili leukocitima korištenjem *in vitro* metoda procjene genotoksičnosti.

U ovom istraživanju, arbutin je pokazao učinak na ozračene stanice usporediv s tretmanom amifostinom doze 250  $\mu\text{g/mL}$ , osim u slučaju tretmana arbutinom doze 200  $\mu\text{g/mL}$ , koji je pokazao statistički značajno višu vrijednost dužine repa kometa u odnosu na sve ostale tretmane, ali ne i u odnosu na negativnu kontrolu, iako je i tu vrijednost viša. Uzrok tome mogla bi biti nepovoljna interakcija visoke doze arbutina s ionizirajućem zračenjem, iako tretman arbutinom doze 400  $\mu\text{g/mL}$  nije pokazao ovakvo odstupanje. Iako među ostalim skupinama nema statistički značajnih razlika, tretman arbutinom doze 11,4  $\mu\text{g/mL}$  jedini je od svih tretmana, uključujući i tretman amifostinom, pokazao niže vrijednosti svih triju parametara, uključujući i broj kometa dugog repa u odnosu na negativnu kontrolu. Ostali tretmani arbutinom pokazuju više vrijednosti svih parametara u odnosu na negativnu kontrolu, osim tretmana arbutinom doze 400  $\mu\text{g/mL}$  za parametar dužine repa kometa. Tretman amifostinom pokazao je višu vrijednost parametra intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu, dok su vrijednosti svih ostalih parametara niže.

Tretman arbutinom u najnižoj dozi od 11,4  $\mu\text{g/mL}$  u ovom istraživanju pokazuje potencijal za radioprotektivni učinak, iako ne statistički značajan. S obzirom da su u drugim sličnim istraživanjima radioprotektivnih učinaka fenolnih spojeva (Cinkilic i sur., 2013; Cinkilic i sur., 2014; Parsad i sur., 2005; Sinivasan i sur., 2006) najveće korištene doze 10  $\mu\text{g/mL}$  spoja, u daljnjim istraživanjima mogle bi se istražiti manje doze arbutina od najmanje doze u ovom istraživanju. Također, trebali bi se dublje istražiti mehanizmi radioprotektivnog učinka i interakcija viših doza arbutina s ionizirajućim zračenjem, kao i koristiti još neke od *in vitro* metoda za procjenu radioprotektivnog učinka arbutina na ljudske leukocite i limfocite.



## 6. ZAKLJUČAK

- Arbutin nije pokazao značajna oštećenja DNA u ljudskim leukocitima pri korištenim dozama (11,4 µg/mL, 57 µg/mL, 200 µg/mL i 400 µg/mL).
- U odnosu na tretman amifostinom (250 µg/mL), svi izmjereni parametri pokazali su više vrijednosti kod neozračenih uzoraka, dok je dužina repa kometa statistički značajno različit parametar.
- Arbutin niti u jednoj od korištenih doza (11,4 µg/mL, 57 µg/mL, 200 µg/mL i 400 µg/mL) ne pruža statistički značajno efikasnu zaštitu ljudskih leukocita od ionizirajućeg zračenja doze 2 Gy, a tretman arbutinom u dozi od 200 µg/mL statistički je značajno povećao vrijednost parametra dužine repa kometa u odnosu na sve ostale tretmane, osim u odnosu na negativnu kontrolu.
- Tretman arbutinom u dozi od 11,4 µg/mL pokazao je najniže vrijednosti svih parametara u odnosu na ostale tretmane, uključujući i tretman amifostinom (250 µg/mL), što otvara mogućnost daljnjih istraživanja radioprotektivnog učinka arbutina u nižim dozama.

## 7. LITERATURA

- Adisa, R.A., Khan, A.A., Oladosu, I., Ajaz, A., Choudhary, M.I., Olorunsogo, O., Rahman, A.Ur. (2011): Purification and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Cnestis ferruginea* (De Candolle): investigation of antioxidant property. *Research Journal of Phytochemistry* 5, 177-189
- Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P.L., Nozima, H.B.N., Tiemi Ito, E., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R. (2015): Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 72, 74-82
- Averbeck, D., Testard, I., Boucher, D. (2006): Changing views on ionising radiation-induced cellular effects. *International Journal of Low Radiation* 3 (2/3), 117-134
- Azqueta, A., Collins, A. (2016): Polyphenols and DNA Damage: A Mixed Blessing. *Nutrients* 8 (785), 1-21
- Bahadar, H., Maqbool, F., Mostafalou, S., Baeri, M., Gholami, M., Ghafour-Boroujerdi, E., Abdollahi, M. (2015): The molecular mechanisms of liver and islets of Langerhans toxicity by benzene and its metabolite hydroquinone *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology Mechanisms and Methods* 25 (8), 628-636
- Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R., Yeoh, K.W. (2012): Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences* 9 (3), 193-199
- Chen, K.C., Chang, H.H., Ko, W.S., Wu, C.L., Chiu, W.T., Hsieh, C.L., Peng, R.Y. (2009): UV-induced damages eliminated by arbutin and ursolic acid in cell model of human dermal fibroblast WS-1 cells. *Egyptian Dermatology Online Journal* 5 (1:5)
- Cinkilic, N., Tüzün, E., Çetintaş, S.K., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Çavaş, T., Tunç, S., Özkan, L., Bilaloğlu, R. (2014): Radio-protective effect of cinnamic acid, a phenolic phytochemical, on genomic instability induced by X-rays in human blood lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 770, 72-79
- Cinkilic, N., Cetintas, S.K., Zorlu, T., Vatan, O., Yilmaz, D., Cavas, T., Tunc, S., Ozkan, L., Bilaloglu, R. (2013): Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic

- acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. Food and Chemical Toxicology 53, 359-363
- Collins, A.R. (2004): The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. Molecular Biotechnology 26, 249-261
- European Medicines Agency (2012): Assessment report on *Arcostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. Committee on Herbal Medicinal Products 44, 1-34
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 339, 37-59
- Garcia de Arriba, S., Naser, B., Nolte, K.U. (2013): Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* folium herbal preparations. International Journal of Toxicology 32, 442-453
- Greenberger, J.S. (2009): Radioprotection. In Vivo 23, 323-336
- Hu, Z.M., Zhou, Q., Lei, T.C., Ding, S.F., Xu, S.Z. (2009) Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: biosafety as skin whitening agents. Journal of Dermatological Science 55, 179-184
- Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Mikolić, A., Milojković-Opsenica, D., Benković, V., Kopjar, N. (2018): In vitro safety assessment of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin in human peripheral blood lymphocytes. Cytotechnology 70, 1261-1278
- Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Benković, V., Kopjar, N. (2017): In vitro assessment of the cytotoxic, DNA damaging, and cytogenetic effects of hydroquinone in human peripheral blood lymphocytes. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 68, 322-335
- Khadir, F., Pouramir, M., Joorsaraee S.G., Feizi, F., Sorkhi, H., Yousefi, F. (2015): The effect of arbutin on lipid peroxidation and antioxidant capacity in the serum of cyclosporine-treated rats. Caspian Journal of Internal Medicine 6 (4), 196-200
- Kwiecień, I., Szopa, A., Madej, K., Ekiert, H. (2013): Arbutin production via biotransformation of hydroquinone in *in vitro* cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. Acta Biochimica Polonica 60, 865-870
- Lee, H.J., Kim, K.W. (2012): Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. Inflammation Research 61, 817-825

- Li, H., Jeong, Y.M., Kim, S.Y., Kim, M.K., Kim, D.S. (2010): Arbutin inhibits TCCSUP human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p21. *Pharmazie* 66, 306-309
- Li-Hua, W., Peng, L., Qing-Li Z., Jin-Lan, P., Yu-Fei, J., Makoto, K., Takashi, K. (2014): Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 19 (11), 1654-1663
- Lim, Y.J., Lee, E.H., Kang, T.H., Ha, S.K., Oh, M.S., Kim, S.M., Yoon, T.J., Kang, C., Park, J. H., Kim, S.Y. (2009): Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of a-melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Archives of Pharmacal Research* 32, 367-373
- Liu, C.Q., Deng, L., Zhang, P., Zhang, S.R., Liu, L., Xu, T., Wang, F., Tan, T.W. (2013): Screening of high  $\alpha$ -arbutin producing strains and production of  $\alpha$ -arbutin by fermentation. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 29, 1391-1398
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P. (2013): Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* 25 (10), 578-585
- Migas, P., Krauze-Baranowska, M. (2015): The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters* 962, 1-6
- Mishra, K.N., Moftah, B.A., Alsbeih, G.A. (2018): Appraisal of mechanisms of radioprotection and therapeutic approaches of radiation countermeasures. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 106, 610-617
- Nadi, S., Elahi, M., Moradi, S., Banaei, A., Ataei, G., Abedi-Firouzjah, R. (2019): Radioprotective Effect of Arbutin in Megavoltage Therapeutic X-irradiated Mice using Liver Enzymes Assessment. *Journal of Biomedical Physics and Engineering* 9 (5), 533-540
- Nadi; S., Monfared, A.S., Mozdarani, H., Mahmodzade, A., Pouramir, M. (2016): Effects of Arbutin on Radiation-Induced Micronuclei in Mice Bone Marrow Cells and Its Definite Dose Reduction Factor. *Iran Journal of Medical Sciences* 41 (3), 180-185
- Nair, C.K.K., Parida, D.K., Nomura, T. (2001): Radioprotectors in Radiotherapy. *Journal of Radiation Research* 42, 21-37
- Ouedraogo, M., Baudoux, T., Stévigny, C., Nortier, J., Colet, J.M., Efferth, T., Qu, F., Zhou, J., Chan, K., Shaw, D., Pelkonen, O., Duez, P. (2012): Review of current and “omics”

- methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *Journal of Ethnopharmacology* 140 (3), 492-512
- Pavlović, R.D., Branković, S., Kovačević, N., Kitić, D., Veljković, S. (2011): Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece. *Phytotherapy Research* 25, 249-254.
- Pavlović, R.D., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z., Kovačević, N. (2009) Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* 64, 656-659
- Piekoszewska, A., Ekiert, H., Zubek, S. (2010): Arbutin production in *Ruta graveolens* L. and *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 32, 223-229
- Prasad, N.R., Menon, V.P., Vasudev, V., Pugalendi, K.V. (2005): Radioprotective effect of sesamol on  $\gamma$ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidants levels in cultured human lymphocytes. *Toxicology* 209 (3), 225-235
- Quintus, J. Kovar, K.A., Link, P., Hamacher, H. (2005): Urinary Excretion of Arbutin Metabolites after Oral Administration of Bearberry Leaf Extracts. *Planta Medica* 71, 147-152
- 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 and Aqueous Solution in Healthy Humans. *Journal of Clinical Pharmacology* 42, 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 Applied Sciences Journal* 19 (2), 163-167
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988): A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191
- Srinivasan, M., Prasad, N.R., Menon, V.P. (2006): Protective effect of curcumin on  $\gamma$ -radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 611 (1-2), 96-103

Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., McBride, W.H. (2003): Effects of radiation on normal tissue : consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* 4, 529-536

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

Tkalčec, I. (2018): Učinak ekstrakta listova obične planike (*Arbutus unedo* L.), arbutina i hidrokinona na stanice PK-15 i HepG2 u uvjetima *in vitro*. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu

SLIKE S INTERNETA:

<https://www.wikiwand.com/sh/Amifostin> (zadnji posjet: 27.10.2019.)

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Nives Marčina  
e-mail: nmarcina@stud.biol.pmf.hr

### Obrazovanje

2017.–2019. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb  
2014. – 2017. Preddiplomski studij Znanosti o okolišu Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Zagreb  
2010.– 2014. Gimnazija Vladimira Nazora, Zadar

### Radno iskustvo

Ak. godina 2019./20. Demonstrator na kolegijima Laboratorijske životinje u znanosti,  
Fiziološki mehanizmi u toksikologiji i Toksikologija okoliša  
Ak. Godina 2018./19. Demonstrator na kolegijima Fiziološki mehanizmi u toksikologiji i  
Toksikologija okoliša  
Ak. godina 2016./17. Demonstrator na kolegiju Osnove biologije  
Srpanj – listopad 2019. Zoološki vrt grada Zagreba

- održavanje nastambe za uzgoj malih sisavaca, planiranje i izvođenje pokusa vezanih za istraživanje probave dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovii*)

### Dodatne aktivnosti (sudjelovanja na projektima, simpozijima, certifikati i prakse)

Lipanj 2019. Izrada diplomskog rada pri Institutu za medicinska istraživanja,  
Jedinica za mutagenezu

- korištenje metoda za procjenu genotoksičnih utjecaja na ljudskim limfocitima (indukcija mikronukleusa, strukturne aberacije kromosoma, mikrogelektroforeza – komet test)

Travanj 2019. Aktivno sudjelovanje na Dvanaestom simpoziju Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja  
(Tema: *Primary DNA damage in peripheral blood and kidney cells of Swiss albino mice after Isoflurane anesthesia and whole body  $\gamma$ -radiation exposure*)

Travanj 2019./2018./2017. Aktivno sudjelovanje na manifestaciji "Noć biologije"  
Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

- osmišljavanje, organizacija i održavanje edukativnih radionica za sve uzraste

Listopad 2018.–veljača2019. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama Laboratory Animal Science Course (60 sati)

- certifikat za A kategoriju (FELASA 2 ekvivalent)

Lipanj 2018. Aktivno sudjelovanje na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja– SiSB4  
(Tema: *Istraživanje primjene hladnog atmosferskog plazmenog mlaza u dezinfekciji drvenih umjetnina kontaminiranih gljivama*)

Ožujak – lipanj 2018. Laboratorijska praksa pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu  
Zavod za animalnu fiziologiju

- rad sa staničnim kulturama, sudjelovanje u raznim *in vitro* i *in vivo* pokusima

2017. – danas Sudjelovanje na projektu PlasmaArt

- razvoj nove metode uzgoja gljivica *Serpulalacrymans* i *Coniophoraputeanana* simuliranim drvenim umjetninama, uzgoj na hranjivim podlogama, tretman hladnim atmosferskim plazmenim mlazom, analiza i usporedba rezultata

Studeni 2017. Radionica „Invazivni rakovi i račja kuga“, održana 13.11.2017. u Dječjoj knjižnici Marina Držića, u sklopu projekta „Kako će klimatske promjene utjecati na širenje račje kuge? – Prilagodba smjernica za zaštitu zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova u kontekstu klimatskih promjena“, neposredno sufinanciranog od strane Fonda za zaštitu okoliša i energetska učinkovitost

- voditeljica projekta doc. dr. sc. Ana Bielen, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Lipanj 2017. Aktivno sudjelovanje na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja– SiSB3 (Tema : Predstavljanje projekta „Kako će klimatske promjene utjecati na širenje račje kuge?“)

### Kongresna priopćenja

Benković, V., Modrić, Ž., Horvat Knežević, A., **Marčina, N.**, Borojević, N., Oršolić, N., Kopjar, N., Milić, M. (2019): Primary DNA damage in peripheral blood and kidney cells of Swiss albino mice after Isoflurane anesthesia and whole body  $\gamma$ -radiation exposure. Zbornik radova Dvanaestog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, 127-133

### Poznavanje jezika

Materinski jezik: Hrvatski

Strani jezici:

jezik	slušanje	čitanje	govorna interakcija	govorna produkcija	pisanje
Engleski	B2	B2	B2	B2	B2
Talijanski	A1	A1	A1	A1	A1

### Komunikacijske i društvene vještine

- razvijene komunikacijske i prezentacijske vještine stečene kroz obrazovanje te prilikom vođenja raznih radionica i izvođenja demonstratura
- sklonost timskom radu i suradnji s ljudima te učenju novih znanja i vještina

### Ostale vještine

- dobra računalna pismenost te vladanje alatima Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)