

Utjecaj arbutina na inhibiciju bakterijske adhezije i promjenu antioksidacijskog potencijala

Puljić, Dominika

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:284435>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2019.

Dominika Puljić

1148/USH

**UTJECAJ ARBUTINANA
INHIBICIJU BAKTERIJSKE
ADHEZIJE I PROMJENU
ANTIOKSIDACIJSKOG
POTENCIJALA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ksenije Durgo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Ane Huđek, mag.ing.biotechn.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ARBUTINA NA INHIBICIJU BAKTERIJSKE ADHEZIJE I PROMJENU ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA

Dominika Puljić, 1148/USH

Sažetak: Arbutin, biološki aktivan spoj prisutan u mnogim biljkama, ima široku primjenu zbog svojih antibakterijskih, antioksidacijskih, protuupalnih i antitumorskih svojstava, ali svoju najveću primjenu ima u liječenju infekcija mokraćnog sustava kao sastavni dio ekstrakta biljnih pripravaka. U ovom se radu proučavao i uspoređivao citotoksični učinak arbutina na bakterijama *Escherichia coli* i *Lactobacillus plantarum* te utjecaj arbutina na njihovu adheziju za humane epitelne stanice gastrointestinalnog trakta u *in vitro* sustavu. Prethodno adheziji, napravljeni su testovi citotoksičnosti Neutral red metodom i testovi potencijalnog antioksidacijskog djelovanja arbutina DCHF-DA metodom na tumorskim epitelnim stanicama jezika (CAL 27), kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) i jetre (HepG2). Dobiveni podaci ukazuju na veći antimikrobni karakter arbutina na Gram-pozitivnu bakteriju (*L. plantarum*) u odnosu na Gram-negativnu bakteriju (*E. coli*) te na svojstvo arbutina da uzrokuje promjenu adhezije bakterijskih stanica za epitelne stanice probavnog sustava. Antioksidacijska aktivnost arbutina te stimulacija proliferacije humanih stanica ovisi o koncentraciji arbutina i vrsti tretiranih stanica.

Ključne riječi: arbutin, antioksidacijski potencijal, adhezija bakterija, citotoksičnost, humane stanične linije

Rad sadrži: 50 stranica, 12 slika, 13 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Durgo

Pomoć pri izradi: Ana Huđek, mag.ing.biotechn., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Višnja Bačun-Družina
2. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
3. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo
4. Prof.dr.sc. Draženka Komes (zamjena)

Datum obrane: 16. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ARBUTIN EFFECT ON INHIBITION OF BACTERIAL ADHESION AND ANTIOXIDATIVE POTENTIAL CHANGE

Dominika Puljić, 1148/USH

Abstract: Arbutin, a biologically active compound widely distributed among plants, has wide application for its antibacterial, antioxidative, anti-inflammatory and anticancer properties, but its greatest use is in the treatment of urinary tract infections as an integral part of the herbal extracts. In this thesis the cytotoxicity effect of arbutin on bacteria *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* was studied. Furthermore, the influence of arbutin on adhesion of mentioned bacteria to human epithelial gastrointestinal tract cells in the *in vitro* system was studied. Before the adhesion tests, cytotoxicity tests using Neutral red method were carried out together with the tests of potential antioxidant activity of the arbutin using DCHF-DA method on tumor epithelial cells of tongue (CAL 27), colorectal adenocarcinoma (Caco-2) and of liver (Hep G2). The obtained data indicate a higher antimicrobial character of the arbutin on Gram-positive bacteria (*L. plantarum*) compared to the Gram-negative bacterium (*E. coli*) and also its ability to cause changes in the adhesion of bacterial cells to the epithelial cells of the digestive system. Antioxidant activity of arbutin and stimulation of human cell proliferation depend on the concentration of arbutin and the type of treated cells.

Keywords: *arbutin, antioxidant activity, toxicity, bacterial adhesion, human cell lines*

Thesis contains: 50 pages, 12 figures, 13 tables, 38 references,

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Ksenija Durgo, Full professor*

Technical support and assistance: *mag. ing. Ana Hudek, assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Višnja Bačun-Družina*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
4. PhD. *Draženka Komes*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 16. srpnja 2019.

1. UVOD	1
2. TEORETSKI DIO	2
2.1. BIOLOŠKI AKTIVAN SPOJ – ARBUTIN	2
2.1.1. Kemijska struktura arbutina i njegova prisutnost u biljnom svijetu.....	2
2.1.2. Metabolizam arbutina.....	3
2.1.3. Stabilnost arbutina u ljekovitim pripravcima	5
2.1.4. Upotreba arbutina i njegovih derivata u liječenju infekcija mokraćnog sustava u ljudi (IMS)	6
2.1.5. Hidrokinon - aktivni metabolit arbutina.....	7
2.1.6. Upotreba arbutina u liječenju hiperpigmentacije kože.....	8
2.1.7. Antioksidacijska svojstva arbutina.....	8
2.1.8. Protuupalna i antitumorska svojstva arbutina	9
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	11
2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	11
2.3. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES	12
2.4. <i>IN VITRO</i> TESTOVI.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. MATERIJAL.....	15
3.1.1. Uzgoj i priprema radnih mikroorganizama	15
3.1.2. Priprema i uzgoj humanih staničnih linija.....	15
3.1.3. Priprema radnih koncentracija arbutina	16
3.1.4. Priprema otopina za eksperimente	16
3.1.5. Pribor.....	18
3.1.6. Aparature	18
3.1.7. Kemikalije	19
3.1.8. Hranjive podloge i fosfatni pufer	20
3.2. METODE RADA	22
3.2.1. Izrada krivulje rasta bakterijskih kultura.....	22
3.2.2. Ispitivanje toksičnosti arbutina na bakterijske kulture.....	22
3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti arbutina na humanim staničnim linijama.....	23
3.3.4. Ispitivanje prooksidativnog/antioksidativnog učinka arbutina DCFH-DA metodom....	23
3.3.5. Utjecaj arbutina na promjenu adhezije bakterija za humane stanice.....	24
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26

4.1. CITOTOKSIČNOST ARBUTINA IZ MEDVJETKE NA BAKTERIJE <i>E. coli</i> i <i>L. plantarum</i>	27
4.2. CITOTOKSIČNOST ARBUTINA NA HUMANE STANICE.....	31
4.2.1. Citotoksičnost arbutina na tumorske epitelne stanice jezika CAL 27.....	31
4.2.2. Citotoksičnost arbutina na tumorske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma Caco-2	32
4.2.3. Citotoksičnost arbutina na tumorske epitelne stanice jetre Hep G2.....	34
4.3. PROOKSIDATIVNI/ANTIOKSIDATIVNI UČINAK ARBUTINA NA HUMANE STANICE	35
4.3.1. Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina na tumorske epitelne stanice jezika CAL 27	36
4.3.2. Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina na tumorske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma Caco-2 stanice.....	37
4.3.3. Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina na Hep G2 stanice.....	39
4.4. UTJECAJ ARBUTINA NA ADHEZIJU BAKTERIJSKIH STANICA NA TUMORSKE EPITELNE STANICE JEZIKA (CAL 27) I CRIJEVA (Caco-2)	40
4.4.1. Utjecaj arbutina na adheziju <i>E. coli</i> na tumorske epitelne stanice jezika (CAL 27) i crijeva (Caco-2).....	40
4.4.2. Utjecaj arbutina na adheziju <i>L. plantarum</i> na tumorske epitelne stanice jezika (CAL 27) i crijeva (Caco-2).....	42
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA.....	46

1. UVOD

Arbutin, biološki aktivan spoj, ima široku primjenu zbog svojih antibakterijskih, antioksidacijskih, protuupalnih i antitumorskih svojstava, ali svoju najveću primjenu ima u liječenju infekcija mokraćnog sustava (IMS) kao sastavni dio ekstrakta biljnih pripravaka. Europska agencija za lijekove navodi da je 400-800 mg/dan arbutina koji se primjenjuje u 2-3 doze učinkovito u liječenju infekcija mokraćnog sustava uz to da je antibakterijski učinak vjerojatno posljedica i drugih komponentibiljnog ekstrakta. Također preporuča vrijeme upotrebe unutar 2 tjedna (Migas i Krauze- Baranowska, 2014). Afshar i sur. (2018) su u svom istraživanju stavili naglasak na nepotrebno korištenje antibiotika za male IMS zbog mogućih nuspojava i razvoja rezistencije bakterija te umjesto antibiotika, u tom slučaju, preporučuju korištenje ekstrakata biljaka koje sadrže arbutin kao glavni farmakološki aktivni sastojak.

Međutim, ostaju pitanja kakvo je djelovanje arbutina na stanice probavnog sustava nakon konzumacije; kako on utječe na bakterije koje se prirodno nalaze u organizmu te koja je njegova uloga u adheziji ispitivanih predstavnika normalne mikroflore čovjeka za humane epitelne stanice. Odgovori na ova pitanja od iznimne su važnosti zbog sve većeg razvoja svijesti potrošača o sigurnosti i kvaliteti hrane koju danas konzumiraju.

Radna hipoteza ovog rada je da arbutin ne smanjuje preživljenje ispitivanih bakterija i humanih epitelnih stanica, da smanjuje vezanje bakterija za humane epitelne stanice te da ispoljava antioksidacijsko djelovanje kad se nađe u kontaktu sa stanicama gastrointestinalnog trakta.

Cilj rada bio je utvrditi da li arbutin djeluje citotoksično na predstavnike normalne mikrobiote čovjeka i epitelne stanice gastrointestinalnog trakta, tumorske epitelne stanice jezika CAL 27, tumorske epitelne stanice raka debelog crijeva Caco-2 te tumorske epitelne stanice jetre HepG2. Također, istražit će se utjecaj na indukciju slobodnih radikala u spomenutim stanicama i potencijalno antioksidacijsko djelovanje te utjecaj arbutina na adheziju bakterijskih stanica za CAL 27 i Caco-2. U tu svrhu, u radu će se provesti testovi citotoksičnosti na bakterijama i Neutral red metoda kao test citotoksičnosti na epitelnim stanicama, DCFH-DA metoda za određivanje prooksidativnog učinka te test adhezije odabranih bakterija za CAL 27 i Caco-2 stanice.

2. TEORETSKI DIO

2.1. BIOLOŠKI AKTIVAN SPOJ – ARBUTIN

2.1.1. Kemijska struktura arbutina i njegova prisutnost u biljnom svijetu

Arbutin je derivat hidrokinona, a prema kemijskom sastavu predstavlja 4-hidroksifenil- β -glukopiranozid ili β -arbutin (slika 1). Ovaj jednostavni fenol glukozid je biosintetiziran uglavnom unutar biljnih vrsta *Ericaceae* i *Saxifragaceae*. Arbutin se također susreće u vrstama *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Lamiaceae* i *Apiaceae*. Možemo ga naći i u vrstama roda *Origanum*, kruškama, pšeničnim proizvodima, kavi i čaju (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Prirodno prisutni derivati arbutina su izolirani iz više od 100 različitih biljnih vrsta (Xu i sur., 2015), ali danas se sve više biljni ekstrakti zamjenjuju s kemijski i biotehnološki sintetiziranim arbutinom i njegovim derivatima (Migas i Krauze-Baranowska, 2014).

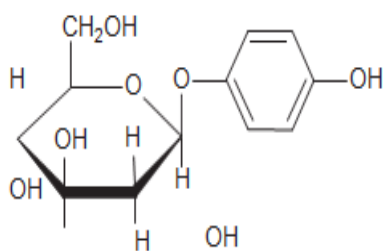
Ekstrakti koji sadrže arbutin iz listova *Arctostaphylos uva ursi* iz porodice *Ericaceae*, poznatije kao medvjетка se koriste u fitoterapiji stoljećima jer pokazuju jak antibakterijski, protuupalni, antioksidacijski i diuretički učinak (Vučić i sur., 2013). Medvjетка je zimzelena višegodišnja biljka koja se može naći na bogatom tlu na području Sjeverne Amerike, Europe i Azije. Ima drvenaste stabljike koje dosežu 1,5–1,8 m. Listovi su joj mali, kožasti i sjajni, cvjetovi bijeli do ružičasti u obliku zvona iz kojih se onda razvijaju žarko crveni plodovi nalik bobicama s tvrdim sjemenkama (Geetha i sur., 2011).

Iako je arbutin glavni farmakološki aktivan sastojak ekstrakta lišća medvjette, eksperimentalna istraživanja su pokazala da je za farmakološko djelovanje odgovoran cijeli ekstrakt lišća medvjette (Garcia de Ariba i sur., 2013). Prisutni spojevi u medvjetti uključuju polifenole (galotanine, derivate elagitanina, korilagina, katehina i antocijanidina), fenolne kiseline (galna kiselina, p-kumarinska), flavonoide (hiperozid i kvercetin), triterpene (ursolna kiselina i uvaol) te piceoside i iridoidneglukozide (Edwards i sur., 2015). Vitamin A, željezo, mangan, selen i silicij su također prisutni u medvjetti (Geetha i sur., 2011). Ljekovite tvari iz lišća ove biljke se uglavnom koriste za liječenje bolesti bubrega i mokraćnog sustava te za vanjsku uporabu primjerice za liječenje posjekotina (Geetha i sur., 2011).

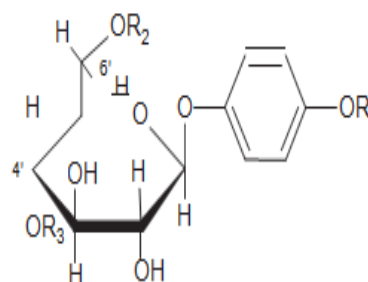
Arbutinu biljkama služi kao obrana od zaraznih bolesti koje uzrokuje *Erwinia amylovora*. Enzimi β -glukozidaze prisutni na biljkama razgrađuju arbutin do hidrokinona koji ima baktericidno svojstvo (Blaut i sur., 2006). U biljkama se arbutin može naći u slobodnom, eterskom ili esterskom obliku (slika 2). Medvjетка sadrži arbutin, metil

arbutin i arbutin s galoil derivatima (O-galoilarbutin, 2-O-galoil arbutin, 6-O-galoil arbutin) (Migas i Krauze- Baranowska,2014).

a)



b)



Slika 1. Struktura arbutina (a) i prikaz pozicije supstiuenata u kemijskoj strukturi arbutina (b)

Količina arbutina u biljnom materijalu je promjenjiva pa tako način sušenja i vegetacijsko razdoblje biljke mogu imati velik utjecaj na sadržaj arbutina. Na primjer, najveća količina arbutina je pronađena u mladim, potpuno razvijenim, zelenim listovima biljke *Bergeniacrassifolia* sušenim na 80–100°C (Migas i Krauze -Baranowska, 2014). Sadržaj arbutina u sušenim listovima medvjete se kreće od 5-15%.

2.1.2. Metabolizam arbutina

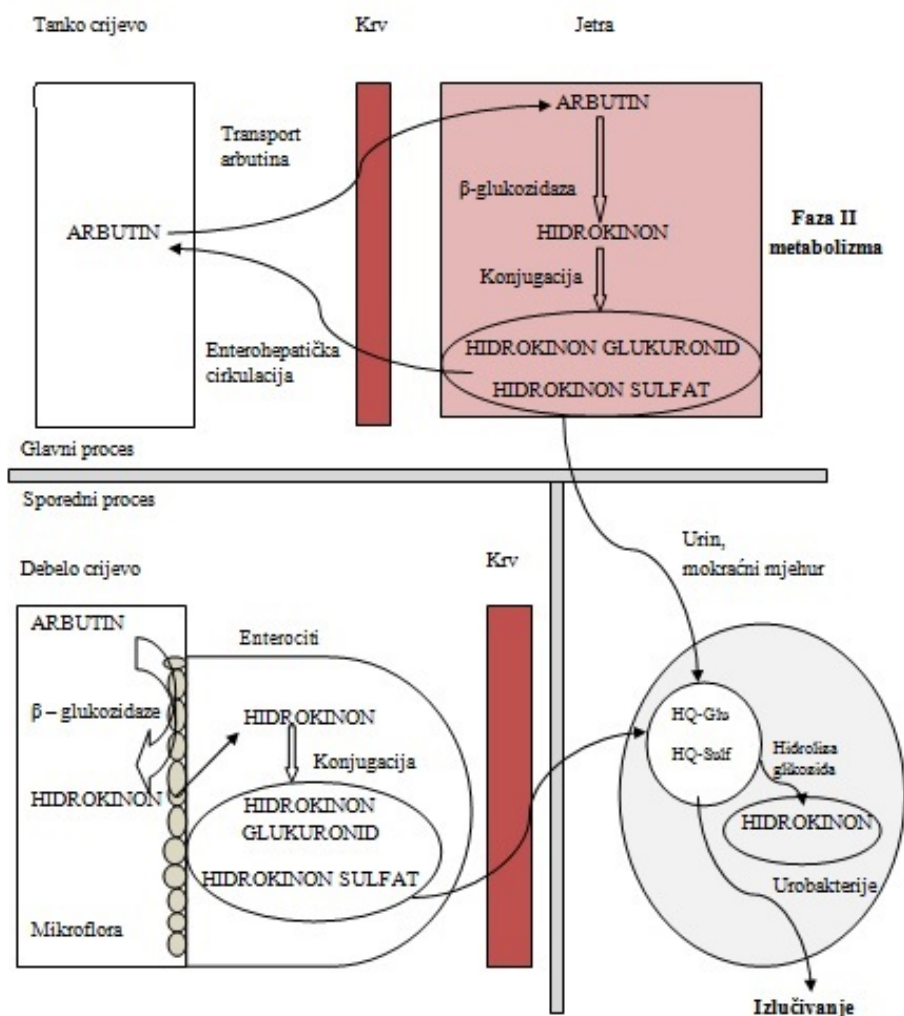
Nakon oralne primjene, nemodificirani arbutin dopijeva u tanko crijevo (Migas i Krauze- Baranowska,2014). Razlog tome je što se arbutin nehidrolizira u kiselim uvjetima želuca. Eksperimentalni *invitro* podaci, kao i istraživanja *in vivo* provedena na štakorima i miševima pokazuju da se arbutin u tankom crijevu apsorbira preko Na⁺/glukoza nosača. Na isti način se apsorbira i kod ljudi (Garcia de Arriba i sur., 2013). Iako bakterije ljudskog crijeva- *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliusavus*, *Bacteroides distasonis*, i *Bifidobacterium adoloscentismogudeglikozilirati*arbutin, u homogenatima sluznice tankog crijeva i u citosolnim frakcijama sluznice debelog crijeva hidrokinon je prisutan u znatno nižim koncentracijama, nego u fekalnim smjesama (Migas i Krauze -Baranowska, 2014).

Blauti sur. (2006) navode kako sluznica debelog crijeva sadrži enzime koji mogu aktivirati hidrokinon, kao što je citokrom P450 2E1 i prostaglandin H sintetaza (ciklooksigenaza, COX) te značajne razine enzima za konjugaciju hidrokinona sa sulfatnom i glukuronskom kiselinom odnosno različite UDP-glukuronoziltransferaze i sulfottransferaze. COX-2 može biti visoko induciran u sluznici debelog crijeva upravo u stanjima upale. Na

aktiviranje enzima kao i na učinkovitost konjugiranja mogu utjecati mnogobrojni supstrati prisutni u debelom crijevu.

Garcia de Arriba i sur. (2013) također navode slabi utjecaj crijevnih bakterija na hidrolizu arbutina, a pogotovo u tankom crijevu gdje je manji broj bakterija u odnosu na debelo crijevo. Arbutin, zapravo, u gotovo nepromjenjenom obliku dopijeva do jetre gdje se razgrađuje β -glukozidazom u hidrokinon i glukozu, nakon čega slijedi konjugacija hidrokinona s glukuronskom kiselinom ili sulfatom. Zatim nastali hidrokinonski konjugat i određena količina slobodnog hidrokinona eliminira urinom (slika 2; Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Enzim β -glukozidaza nije prirodno prisutan u stanicama sisavaca, ali je prisutan u mikroorganizmima koji se javljaju u gastrointestinalnom traktu (GI) ili u urinarnom traktu prilikom infekcije. Postoji izravna ovisnost antimikrobnog učinka arbutina o razini enzimske aktivnosti mikroorganizama. Najveća ekstracelularna enzimska aktivnost β -glukozidaze je pronađena u rodovima *Streptococcus faecalis* (100%), *Klebsiella* (95%) i *Enterobacter* (72%), a najniža u bakteriji *E. coli* (11,6%) (EMA, 2017).

Poznato je da se otprilike 65-75% peroralno primijenjenog arbutina izlučuje u mokraći kao hidrokinon glukuronid ili hidrokinon sulfat unutar 24 h, ali nije poznato, gdje, u kojem obliku i kako se ostatak arbutina (25–35%) dalje metabolizira i apsorbira u ljudskom gastrointestinalnom traktu (Blaut i sur., 2006). Zdravim urinom se eliminira mala količina slobodnog hidrokinona dok se ta količina povećava tijekom IMS-a, kao posljedica djelovanja uropatogenih bakterija. Naime, uropatogene bakterije uzrokuju alkalizaciju urina, što je korisno kod primjene ekstrakta koji sadrži arbutin budući da alkalni pH omogućava hidrolizu konjugata hidrokinonada slobodnog hidrokinona (Migas i Krauze-Baranowska, 2014).



Slika 2. Shematski prikaz farmakokinetičkog profila za arbutin i hidrokinon (preuzeto i prilagođeno prema Garcia de Arriba i sur., 2013)

2.1.3. Stabilnost arbutina u ljekovitim pripravcima

Arbutin je relativno stabilan u ekstraktima etanola. Otporan je na svjetlost i nizak pH te je stoga stabilan u kozmetičkim proizvodima u rasponu pH 4-8. U vodenim ekstraktima, arbutin se može podvrgnuti djelomičnoj hidrolizi do hidrokinona koji se može oksidirati u benzokinon koji ima širi spektar antibakterijske aktivnosti te se koristi za vanjsku uporabu (Migas i Krauze- Baranowska, 2014). Arbutin je topiv pri sobnoj temperaturi u vodi, acetonu, metanolu, DMF-u (N,N-dimetilformamidu), NMP-u (N-metil-2-pirolidonu), DMAc-u (N,N-dimetilacetamidu), DMSO-u (dimetilsulfoksidu) i THF-u (tetrahidrofuranu) (Kajiwara i sur., 2018).

2.1.4. Upotreba arbutina i njegovih derivata u liječenju infekcija mokraćnog sustava u ljudi (IMS)

Prema Europskoj agenciji za lijekove (engl. *European Medicine Agency*, EMA) biljke koje sadrže arbutin se često koriste u liječenju infekcija mokraćnog sustava (Migas i Krauze-Baranowska, 2014).

Problem infekcije mokraćnog sustava obuhvaća sve dobne skupine te infekcijom može biti zahvaćen bilo koji dio mokraćnog sustava čovjeka koji je u normalnim uvjetima sterilan, zaštićen od štetnih mikroorganizama stalnim protokom mokraće, izlučenim protubakterijskim čimbenicima i baktericidnom aktivnošću efektorskih imunih stanica. Kada se infekcija javi u normalnom mokraćnom sustavu naziva se primarnom (nekomplikiranom). Infekcija u mokraćnom sustavu s anatomskom abnormalnosti označava sekundarnu (komplikiranu) infekciju (Pastuović i sur., 2008). Infekcija najčešće nastaje ascendentnim putem i najčešće je uzrokovana bakterijama koje su dio fiziološke crijevne mikrobiote (Andrašević i sur., 2009). Većinu akutnih, nekomplikiranih infekcija mokraćnih puteva uzrokuju bakterijske kulture *E.coli* (80%) ili *Staphylococcus saprophyticus* (10-15%). Bakterijski rodovi *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Proteus* te enterokoki nerijetko uzrokuju komplicirane IMS, cistitis i pijelonefritis. Međunarodne studije ukazuju da uropatogeni bakterijski sojevi kao *Candida* spp. i *Enterococcus* spp. sve više uzrokuju infekcije mokraćnog sustava (Ronald, 2002). Gram-pozitivni bakterijski uzročnici rjeđe uzrokuju IMS (Andrašević i sur., 2019).

U liječenju nekomplikiranih infekcija mokraćnog sustava se najviše koriste vodeni i etanolno-vodeni ekstrakti biljnih materijala koji sadrže arbutin. Njihovo antibakterijsko djelovanje potječe od hidrokinona koji je aglikon arbutina. Hidrokinon ima adstringentna, dezinfekcijska i antioksidativna svojstva. Još prihvaćenije načelo liječenja IMS-a je na temelju zakiseljavanja urina gdje široko korištena L-askorbinska kiselina i druga sredstva za zakiseljavanje urina povećavaju količinu dušičnog oksida (NO) u urinu i na taj način sprječavaju rast patogenih bakterija. U tom slučaju liječenje IMS-a pomoću ekstrakata koji sadrže arbutin nema smisla budući da je lužnati pH potreban za proces deglikozilacije i proizvodnju hidrokinona koji ima antibakterijsko djelovanje.

Temeljem EMA smjernica, 400-800 mg / dan arbutina koji se primjenjuje u 2-3 doze je učinkovito u liječenju IMS-a. Ove količine arbutina odgovaraju infuziji pripremljenoj od 5 do 10 g lišća medvjetke. Infuzija je učinkovita uglavnom protiv *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *S.aureus*. Antibakterijski učinak je vjerojatno pojačan drugim komponentama biljnog ekstrakta koje smanjuju adheziju bakterija na epitelne stanice, povećavaju sljepljivanje bakterija, ublažavaju iritaciju i smanjuju upalu. Upotreba ekstrakta

koji sadrži arbutin u kombinaciji s kemoterapijskim agensima učinkovitija je i manje toksična u liječenju IMS-a od liječenja samo s kemoterapeuticima (Migas i Krauze- Baranowska, 2014). Afshar i sur. (2018) su u svom istraživanju stavili naglasak na nepotrebno korištenje antibiotika za male IMS zbog mogućih nuspojava i razvoja rezistencije bakterija. Umjesto antibiotika, u tom slučaju, preporučuju korištenje ekstrakta medvjette.

2.1.5. Hidrokinon - aktivni metabolit arbutina

Korištenje ekstrakata koji sadrže arbutin, osim korisnog antibakterijskog učinka, može imati i određene negativne nuspojave. Hidrokinon je hepatotoksičan i može dovesti do razvoja leukemije *de novo*. Također uzrokuje DNA i kromosomska oštećenja, inhibira topoizomerazu II i mijenja hematopoezu i klonsku selekciju. Utvrđeno je da intestinalne bakterije u neposrednoj blizini sluznice debelog crijeva mogu hidrolizom arbutina pojačati rizik mutagene aktivnosti hidrokinona. Međutim, aktivnost tvari ovisi o dozi. Preporučene doze pripravaka koji sadrže arbutin sadrže vrlo malu količinu hidrokinona koja je ispod praga toksikološke zabrinutosti (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Tako NOEL (engl. *No Observed Effect Level*) vrijednost za hidrokinon iznosi 25 mg kg^{-1} tjelesne mase po danu što je 9 puta veća koncentracija od one koja se dobije nakon što se popije dnevno preporučena doza (420 mg arbutina) ekstrakta lista medvjette (Garcia de Arriba i sur., 2013).

Budući da su mnogi proizvodi izvori hidrokinona ili arbutina i time mogu pojačati njihove nuspojave, ekstrakti medvjette su odobreni za uporabu samo u liječenju, ali ne i u prevenciji IMS-a unutar 2 tjedna kao preporučenim vremenom uporabe. Iz istog se razloga onda ekstrakti koji sadrže arbutin uglavnom koriste kao sastojci biljnih smjesa, jer se smanjuje efektivna doza i nuspojave arbutina (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Blaut i sur. (2006) navode kako su prijavljene količine slobodnog hidrokinona u hrani i piću ispod $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ dok količina arbutina (derivata hidrokinona) u nekim namirnicama (npr. kruška) doseže i 71 mg kg^{-1} . Za razliku od *in vitro* istraživanja, većina *in vivo* istraživanja nije pokazala kancerogeni ni toksični učinak te se smatra kako hidrokinon ne predstavlja rizik za razvoj tumora u čovjeka zbog brze detoksikacije organizma i niske izloženosti istome (Migas i Krauze-Baranowska, 2014).

2.1.6. Upotreba arbutina u liječenju hiperpigmentacije kože

Promjena boje kože je uzrokovana raznolikom proizvodnjom melanina. Melanin je odgovoran za apsorpciju i zaštitu kože od štetnog UVA i UVB zračenja. Biosinteza melanina uglavnom ovisi o aktivnosti tirozinaze i UV zračenju. UV-zračenje stimulira prekomjernu proizvodnju melanina i uzrokuje promjenu boje i mrlje na koži. Tirozinaza sudjeluje u pretvorbi tirozina u L-DOPA, oksidaciji L-DOPA u dopakvinoni daljnjoj transformaciji dopakvinona do konačnog proizvoda-melanina. Prema tome, UV-filtteri i inhibitori tirozinaze su najčešće korišteni sastojci u proizvodima koji se koriste u liječenju hiperpigmentacije.

Arbutin i hidrokinon se koriste u liječenju hiperpigmentacije kože jermogu inhibirati biosintezu melanina. Aktivnost arbutina se djelomično podudara s aktivnošću hidrokinona budući da mikroflora kože hidrolizira arbutin do hidrokinona. Prednost arbutina u odnosu na hidrokinon je što djelotvorne doze arbutina ne uzrokuju nuspojave i što nemaju mutagena i kancerogena svojstva (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). SCCS (engl. *The Scientific Committee on Consumer Safety*) smatra da je uporaba β -arbutina u kozmetičkim proizvodima sigurna za potrošače u koncentraciji do 7% pod uvjetom da koncentracije hidrokinona budu manje od 1 ppm (SCCS i Degen, 2015). Arbutin se u kozmetičkim proizvodima ne koristi samo za posvjetljivanje kože, nego i za sprječavanje starenja kože i kožnih bolesti zbog svojih antioksidacijskih svojstava (Takebayashi i sur., 2010).

Aktivnost arbutina i njegovih derivata u liječenju hiperpigmentacije kože je povezana s veličinom čestica, prostornom strukturom i elektrostatskim potencijalom oko benzenskog prstena. *In vitro* istraživanja ukazuju da deoksiarbutin jače inhibira tirozinazu od arbutina i hidrokinona i da je to posljedica postupne oksidacije arbutina (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Također je otkriveno da arbutin može sinergistički inhibirati aktivnost tirozinaze s aloesinom (protuupalnim lijekom). Njihov je kotretman na UV-induciranu pigmentaciju u ljudskoj koži *in vivo* (100 mg g⁻¹ svakog od spojeva) proizveo aditivni učinak. Supresija pigmentacije je iznosila 63,3% u odnosu na 34% pri upotrebi samo aloesinai 43,5% pri upotrebi samo arbutina. Arbutin inhibira i UV-induciranu aktivaciju nuklearnog faktora kappaB u ljudskim keratinocitima (EMA, 2017).

2.1.7. Antioksidacijska svojstva arbutina

Arbutin i njegovi derivati, kao i drugi fenoli, pokazuje antioksidacijska svojstva. Brojna istraživanja ističu da arbutin ima usporediva ili čak superiornija antioksidacijska svojstva od hidrokinona. Arbutin pokazuje jaču antioksidacijsku aktivnost prema ABTS (2,2-

azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikal (ABTS•+) i slabiju antioksidacijsku aktivnost prema DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal (DPPH•). Štoviše, antioksidacijsko djelovanje arbutina je dugotrajnije u usporedbi shidrokinonom. Brojna *in vitro* istraživanja su pokazala da se arbutin može koristiti i kao citoprotektivno sredstvo protiv toksičnih tvari poput tert-butilhidroperoksida (t-BHP). Zaštitni učinak je također potvrđen na eritrocitima i fibroblastima (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Arbutin može smanjiti koncentraciju radikala generiranih pomoću neutrofilaekstracelularno i to bez utjecaja na formiranje intracelularnih radikala bitnih za regulatorne i baktericidne funkcije (Pečivova i sur., 2014).

2.1.8. Protuupalna i antitumorska svojstva arbutina

Protuupalni učinak arbutina se očituje kroz smanjenu proizvodnju ciklooksigenaze 2 (COX-2) i dušikova oksida (NO) u BV-2 mikroglia staničnim linijama glodavaca stimuliranim lipopolisaharidima gdje je taj učinak pripisan inhibiciji proupalnih citokina IL-1b, TNF-a i MCP-1. Također je zabilježena smanjena adhezija stanica i formiranje adhezijskih molekula u stanicama stimuliranim lipopolisaharidima u prisutnosti arbutina.

Protuupalna svojstva arbutina su potvrđena u ispitivanjima *in vivo* na štakorima i *invitro* testovima pomoću tumorskih staničnih linija želuca. Arbutin ima zaštitni učinak na sluznicu želuca jer smanjuje područje čira i upale. Protuupalna svojstva se očituju kroz inhibiciju lipidneperoksidacije, modulaciju razine proupalnih citokina poput TNF-a, interleukina-6 i interleukina-10 (Migas i Krauze-Baranowska, 2014). Blagotvorni učinak arbutina odnosno svojstvo arbutina da inhibira upalu i napredovanje upale očituje se i smanjenjem aktivnosti fosfolipaze D, mijeloperoksidaze i elastaze te prigušivanjem superoksida i reaktivnih kisikovih vrsta (EMA, 2017). Nađeno je da arbutin potencira antiinflamatorne učinke indometacina i kortikosteroida smanjenjem stvorenih radikala u humanim neutrofilima u *in vitro* uvjetima (Pečivova i sur., 2014).

Ispitivanja *in vitro* ukazuju i na antitumorsko djelovanje arbutina. Nađeno je da spoj inhibira kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom (ERK) koja igra ključnu ulogu u staničnoj proliferaciji te da povećava ekspresiju inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu (p21) koji inhibiraju rast stanica (Migas i Krauze-Baranowska, 2014).

2.2. AUTOHTONA MIKROFLORA GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA

Dominantni mikroorganizmi u gastrointestinalnom (GI) traktu dojenčadi su bakterije mliječne kiseline i koliformne bakterije poput *E.coli*. Prestankom dojenja se mikroflora čovjeka drastično mijenja i otada pretežno prevladavaju anaerobne bakterije. Autohtonu mikrofloru čine izrazito stabilne kolonije mikroorganizama koje nisu slučajno raspoređene unutar GI- trakta. Tako usna šupljina odraslog čovjeka u prosjeku sadržava oko 200 različitih vrsta bakterija (10^9 bakterija mL^{-1} sline; Berg, 1996), tanko i debelo crijevo više od 1000 različitih vrsta bakterija (10^{14} bakterija) (Jeong i sur., 2012), a želudac i gornje dvije trećine tankog crijeva (duodenum i jejunum) sadrže mali broj mikroorganizama zbog niskog pH i brze peristaltike crijeva (10^3 - 10^4 bakterija mL^{-1} gastrointestinalnog sadržaja). Glavne mikrobne vrste u gornjem tankom crijevu su laktobacili i streptokoki koji su otporni na kiseline te zato mogu preživjeti prolaz kroz želudac za razliku od većine mikroorganizama iz hrane (Berg, 1996).

Domaćin "tolerira" autohtonu crijevnu floru i homeostaza se održava pomoću 1) fizičke barijere odnosno sluzi i antibakterijskih molekula koje odvajaju autohtone bakterije od površine epitela; 2) specifičnih svojstava crijevne mikroflore koja im omogućava izmjenu upalnog odgovora; 3) posebne karakteristike epitelnih stanica, kao što je smanjena ekspresija Toll-u sličnog receptora 4 (TLR4) na epitelu površine crijeva čime se smanjuje učinak bakterijskih podražaja i izbjegava upala koja bi bila štetna za domaćina (Jenkins i sur., 2017).

Autohtona mikroflora GI-trakta ima velik utjecaj na anatomske, fiziološke i imunološke razvoj domaćina. Ona stimulira imunološki sustav domaćina da brže reagira na patogene i kroz bakterijski antagonizam, inhibira kolonizaciju patogena u GI-traktu. Autohtone gastrointestinalne bakterije su također mogući patogeni i mogu se translocirati preko mukozne membrane te uzrokovati sistemsku infekciju u imunološki oslabljenim domaćinima (Berg, 1996). Također, autohtona crijevna mikroflora sudjeluje i u metabolizmu ksenobiotika. Preko metabolizma može aktivirati ili inaktivirati ksenobiotike. Tako intestinalne bakterije kao što su *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* i *Enterococcus* mogu deglikozilirati arbutin, prisutan u mnogim namirnicama u hidrokinaon. Budući da broj i vrsta mikroorganizama unutar crijevne mikroflore uvelike variraju, kao i enzimske aktivnosti tako se razlikuje i sam metabolizam ksenobiotika od osobe do osobe (Jeong i sur., 2012).

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum se ubraja u bakterije mliječne kiseline. To je nespороgenа, anaerobna, fermentirajuća, Gram-pozitivna bakterija koja je sastavni dio normalne mikroflore GI trakta. *L. plantarum* posjeduje gene čijom ekspresijom nastaju enzimi koji kataliziraju reakcije fermentacije različitih šećera i formiranja većine aminokiselina. Zbog velikog broja površinskih S proteina *L. plantarum* ima mogućnost adhezije na različite površine. To je probiotička bakterija koja povoljno utječe na zdravlje čovjeka na način da smanjuje gastrointestinalne infekcije, upale i rizične bolesti crijeva te poboljšava imunološki sustav. Smatra se kako vezanje *L. plantarum* na epitelne stanice posredovano D-manoznim receptorima prisutnim na površini stanice smanjuje vezanje patogenih bakterija uključujući i bakterijsku kulturu *E.coli* (de Vries i sur., 2006). Posljedično tome, smanjenje broja laktobacila povećava rizik od infekcija mokraćnog sustava jer ono omogućava veću kolonizaciju uropatogena (Busetto i sur., 2014).

2.2.2. *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* pripada porodici *Enterobacteriaceae*, a najpoznatija vrsta iz tog roda je *Escherichia coli*, Gram-negativna, fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija koja ne formira spore. Posjeduje flagele koje joj omogućuju kretanje, a ekstraintestinalni sojevi formiraju kapsulu, sluzavu opnu na citoplazmatskoj membrani bakterija koja joj omogućava kolonizaciju i zaštitu od nepovoljnih okolišnih uvjeta. Preživljava na temperaturama od 0-45 °C, a optimalna temperatura za rast je 37 °C, dok je optimalan pH 4,3 (Fotadar, 2005). Također, bakterija *E. coli* fermentira glukozu, reducira nitrate na nitrite te je oksidaza-negativna i katalaza-pozitivna (Jenkins i sur., 2017).

Prirodno se nalazi u probavnom sustavu čovjeka i životinja te je neophodna za normalno funkcioniranje organizma. U probavnom traktu čovjeka, sudjeluje u probavi na način da razgrađuje bjelančevine i proizvodi vitamine B12 i K, te antagonistički djeluje na patogene bakterije (Kaper i sur., 2004).

Virulenciju uropatogene *E.coli* (UPEC) određuje kapsula, adhezini, hemolizini, siderofore i endotoksin. Kapsularni polisaharidi štite *E. coli* od fagocitoze i lize posredovane komplementom. Prijanjanje bakterija na uroepitelne stanice je prvi korak u uspostavljanju infekcije. Adhezini su smješteni na specijalnim izdancima fimbrijama ili pilima. Fimbrije su vlasaste organele izgrađene od bjelančevina. U UPEC se najčešće nalaze fimbrije tipa 1 te P i Drfimbrije. Fimbrije tipa 1 vežu se na glikoproteine koji se nalaze na površini uroepitelnih

stanica. Fimbrije tipa P drugi su po značenju čimbenici virulencije koje se specifično vežu za epitel mokraćnog sustava. Time je onemogućeno mehaničko odstranjivanje UPEC mlazom urina. Infekcija je teža ako je uzrokovana sojem koji posjeduje P fimbrije, dulje traje, češće se ponavlja i zahtijeva dulje antimikrobno liječenje. Neki sojevi *E. coli* izlučuju alfa i beta hemolizin koji omogućuje bakterijama pribavljanje željeza lizom eritrocita. Sustavom siderofora bakterije pospješuju svoj rast i dalju invaziju uroepitelnih i subepitelnih stanica. Virulencija UPEC se očituje i kroz pirogena i toksična svojstva endotoksina koja dolaze do izražaja u sepsi i pijelonefritisu (Pastuović i sur., 2008).

2.3. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

Dok je potrošnja kisika ključna za disanje i energetski metabolizam u aerobnim organizmima, reaktivnevrste kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni anioni ($O_2 \bullet^-$) i hidroksilni radikali su opasni po život. Relativno male količine ROS-ova setrajno proizvode u svim aerobnim organizmima i oni su produkti normalnog staničnog metabolizma, a njihov glavni izvor je molekularni kisik koji nastaje u lancu transporta elektrona. ROS se može proizvesti i izlaganjem UV svjetlu ili različitim kemijskim oksidansima i zagađivačima. ROS-ovi su izrazito reaktivni kemijski oblici budući da se nespareni elektroni nastoje spojiti tvoreći stabilne elektronske veze te da bi postigli ravnotežu, narušavaju stabilnost drugih molekula u okolini i pokreću lančanu reakciju. Kada je proizvodnja ROS-ova veća od sustava antioksidativne zaštite, oksidativni stres postaje neizbježan odnosno dolazi do oksidacije različitih biomolekula uključujući nukleinske kiseline, lipide, ugljikohidrate i proteine. To narušava normalnu fiziologiju stanice i dovodi do oštećenja stanica. Svi organi su osjetljivi na oksidativni stres, međutim, budući da je glavni dio jetre sastavljen od hepatocita koji su vrlo aktivni u metabolizmu ksenobiotika, jetra je osjetljivija na oksidativni stres i glavna je meta toksičnih tvari. Starenje, kardiovaskularne bolesti, rak, neurodegenerativni poremećaji (npr. Alzheimerova bolest), dijabetes i oštećenje jetre su povezani s povišenim razinama ROS-ova.

Prema tome, zbog njihove velike reaktivnosti važno je držati pod kontrolom nastajanje slobodnih radikala. Evolucija je nasreću osigurala aerobne organizme s dobro uravnoteženim mehanizmima za suzbijanje oksidativnog stresa induciranog ROS-ovima. Djelotvorni preventivni mehanizmi su osigurani antioksidansima koji sprečavaju pokretanje i širenje oksidacijske lančane reakcije. Antioksidativna sredstva mogu smanjiti toksičnost stanica

induciranu slobodnim radikalima, a jedan od takvih sredstava je upravo arbutin (Seyfizadeh i sur., 2012).

2.4. *IN VITRO* TESTOVI

Pojam "*in vitro* test" se koristi u pokusima za istraživanje učinka spojeva ili ekstrakata koji ne uključuju živo tkivo životinja (*ex vivo* testovi), cijelu životinju ili ljude u kliničkim ispitivanjima (*in vivo* testovi) (Houghton i sur., 2007). *In vitro* ispitivanje (na latinskom: „u staklu“) znači da se ispitivanje provodi izvan živog organizma i da uglavnom uključuje izolirana tkiva, organe ili stanice (ECHA, 2018).

In vitro testovi su prvenstveno razvijeni zbog etičkih i financijskih razloga kako bi se smanjila, odnosno po mogućnosti zamijenila upotreba životinjskih modela u medicinskim istraživanjima. *In vitro* testovi na bakterijama, kvascima te stanicama sisavaca služe kao preliminarna istraživanja za određivanje genotoksičnosti i detekciju toksičnosti koja može dovesti do razvoja tumora. Rezultati na staničnim modelima koji pokazuju naznaku kancerogenosti, mogu biti dovoljan dokaz za prestanak daljnjeg istraživanja potencijalne kemikalije. Stanični modeli u toksikološkim istraživanjima su najkorisniji za otkrivanje toksičnih spojeva i za usporedbu različitih spojeva unutar skupina analoga (Timbrell, 2002).

Osim određivanja genotoksičnosti *in vitro* testovi se koriste za istraživanje potencijalnog antibakterijskog i antifungalnog djelovanja nekih ekstrakata i spojeva, za otkrivanje novih sredstava protiv raka te za pronalazak spojeva koji se mogu upotrijebiti kao antivirusna sredstva, osobito onih za HIV. Najveći broj *in vitro* testova se primjenjuje u istraživanju spojeva santikancerogenim svojstvima. Najčešći način na koji se to radi je testiranje citotoksičnosti pomoću jedne ili više staničnih linija sisavaca. Stopa množenja i rasta stanične linije se mjeri indirektno određenim indikatorom rasta, npr. formacijom boje, a brzina proliferacije stanične linije raka se mjeri u prisutnosti i odsutnosti ispitivane tvari nakon određenog vremena.

Glavni cilj mnogih *in vitro* testova je identificirati spojeve odgovorne za biološku aktivnost ekstrakta bilo ona pozitivna ili negativna. Rijetkost je da jedan spoj bude odgovoran za opaženu aktivnost i ne smije se pretpostaviti da najaktivniji spoj čini najveći dio biološke aktivnosti ekstrakta. Važno je odrediti koncentraciju svakog spoja i povezati je s doza-odgovor karakteristikama u test sustavu. Također je važno da najaktivniji spoj u ekstraktu bude količinski dovoljan za aktivnost u nekom lijeku ili pripravku. Ovakav pristup čini osnovu otkrića mnogih važnih lijekova i važan je za standardiziranje ekstrakta.

Unatoč brojnim prednostima bitno je znati da *in vitro* aktivnost nekog spoja ipak nije jamstvo *in vivo* učinka. Prvi razlog je nepraktičnost ekstrapolacije aktivne doze u *invitro* uvjetima na relevantnu, potrebnu dozu za ljudsku odraslu osobu. Također faktori kao što su adsorpcija i metabolizam značajno utječu na odstupanja između *in vitro* i *in vivo* aktivnosti (Houghton i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzgoj i priprema radnih mikroorganizama

Mikroorganizmi korišteni u ovom radu su bakterijski sojevi navedeni u tablici 1, a dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Svi bakterijski sojevi su čuvani na -80°C u 50% glicerolu te su neposredno prije eksperimenta inokulirani u svježu tekuću hranjivu podlogu i inkubirani prekononočno pri optimalnoj temperaturi rasta.

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u eksperimentalnom radu

Bakterijski soj	Genotip	Izvor
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z11.10	Divlji soj	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Divlji soj	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta

3.1.2. Priprema i uzgoj humanih staničnih linija

U radu su korištene humane tumorske epitelne stanice jezika CAL 27, humane tumorske epitelne stanice kolorektalnogadenokarcinoma Caco-2 i humane tumorske epitelne stanice karcinoma jetre HepG2. Stanice su uzgajane u monosloju u T-boci, u RPMI mediju uz dodatak 10% fetalnog seruma u atmosferi CO_2 te na temperaturi od 37°C . Prije eksperimenata, stanice su prevedene u suspenziju korištenjem 0,25 %-tne otopine tripsina.

3.1.3. Priprema radnih koncentracija arbutina

U radu se istraživao biološki učinak arbutina te je u te svrhe korišten standard Arbutina čistoće $\geq 98\%$ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Kemikalija se ne smatra opasnom prema GHS-u (engl. *Globally Harmonized System*). Korištene su koncentracije arbutina u rasponu od 0,2-4 mg mL⁻¹ za ispitivanje citotoksičnosti otopine arbutina na određene bakterijske sojeve dok je u rasponu od 0,4-4 mg mL⁻¹ korišten u svim drugim eksperimentalnim istraživanjima. Navedene koncentracije arbutina su korištene jer koncentracija 0,8 mg mL⁻¹ predstavlja izmjerenu koncentraciju arbutina u jednom napitku čaja od lišća medvjetke (3g usitnjenog homogeniziranog suhog lišća medvjetke preliveno sa 150 mL kipuće vode profiltrirano preko filterpapira), a koncentracija 2,4 mg mL⁻¹ dnevno preporučenu koncentraciju arbutina tokom liječenja infekcija urinarnog trakta. Sve otopine su pripremljene u vodenom mediju. Koncentracija arbutina je izmjerena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Korištene koncentracije arbutina prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Koncentracije arbutina u svježe pripravljenim napicima medvjetke

0,25x	0,2 mg mL⁻¹
0,5x	0,4 mg mL ⁻¹
1x	0,8 mg mL ⁻¹
1,5x	1,2 mg mL ⁻¹
2,5x	2,0 mg mL ⁻¹
3x	2,4 mg mL ⁻¹
5x	4,0 mg mL ⁻¹

3.1.4. Priprema otopina za eksperimente

Tablica 3. Ishodišna otopina Neutral red boje ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
Neutral red boja	50 mg
Etanol	10 mL

Tablica 4. Radna otopina Neutral red boje ($\gamma = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
Ishodišna otopina Neutral red boje ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$)	0,1 mL
RPMI medij za uzgoj stanica	9,9 mL

Tablica 5. Otopina za odbojavanje

SASTOJAK	KOLIČINA
Etanol	50 %
Voda	49 %
Octena kiselina	1 %

Tablica 6. Triton X-100 (w = 0,01 %)

SASTOJAK	KOLIČINA
Triton X-100	10 μL
Fosfatni pufer	10 mL

Tablica 7. Ishodišna otopina 2, 7 – diklorofluoresceindiacetata (DCHF-DA; c = 2 mM)

SASTOJAK	KOLIČINA
DCHF-DA	0,0015 g
DMSO	1,5 mL

Tablica 8. Radna otopina 2, 7– diklorofluoresceindiacetata (DCHF-DA; $c = 0,05 \text{ mM}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
Ishodišna otopina DCHF-DA ($c = 2 \text{ mM}$)	0,25 mL
Fosfatni pufer	9,75 mL

3.1.5. Pribor

- Automatske pipete (max volumena 20, 200, 1000 μL)
- Erlenmayerove tikvice različitih volumena
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena
- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske žlice
- Markeri za pisanje
- Mikrotitarske pločice s 24 bunarića
- Mikrotitarske pločice s 96 bunarića
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Pipetni nastavci
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Propipete
- Staklene čaše
- Staklene epruvete različitih volumena
- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Stakleni lijevak
- T-boce, Falcon (BD Company, SAD)
- Türken- Bürkova komora
- Vata za pravljenje čepova

3.1.6. Aparature

- Analitička vaga (1712 Mp8, SilverEdition, Sartorius, Velika Britanija)
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih pločica (Cecil Instruments Ltd, Engleska)
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ (Forma Scientific, SAD)

- Komora za sterilni rad (Iskra, Slovenija)
- Spektrofotometar, Cecil Instruments Ltd, *Technical Centre Cambridge*, Engleska
- Svjetlosni mikroskop/invertni svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss Jena, Njemačka; Optika Microscopes, Italija)
- Vaga (*Sartorius*, Engleska)
- Vibromikser EV-202 i EV-100, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswickscientific*, SAD

3.1.7. Kemikalije

- Agar, *Biolife*, Italija
- Amonijev klorid (NH₄Cl), *Alkaloid-Skopje*
- Bacto-tripton, *Biolife*, Italija
- Diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA), *SigmaAldrich*, Canada
- Dimetilsulfoksid (DMSO), *Merck*, Njemačka
- Fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran, *CapricornScientific*, GmbH, Njemačka
- Glicerol, *Gram-mol d.o.o*, Hrvatska
- Kalcijev klorid (CaCl₂), *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev dihidrogen fosfat, *Riedel- De Hean*, Njemačka
- Kvašćev ekstrakt, *Biolife*, Italija
- Laktoza, *Kemika*, Hrvatska
- Magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO₄ *7 H₂O), *Merck*, Njemačka
- MRS Broth, *Biolife*, Italija
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂ HPO₄), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev kolrid (NaCl), *Carlo ErbaReagents*, Francuska
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Feinchemie K.- H. Kallies KG*, Njemačka
- RPMI 1640 medij, *CapricornScientific*, GmbH, Njemačka
- Tiamin, *Fluka*, Njemačka
- Tripsin, *CapricornScientific*, GmbH, Njemačka
- Triton X-100, *ACRŌS ORGANICS*, Belgija

3.1.8. Hranjive podloge i fosfatni pufer

Za uzgoj bakterija u ovom radu korištene su kompletne LB i MRS hranjive podloge te selektivne podloge, M9-minimalna podloga s laktozom za uzgoj bakterije *E. coli* i MRS podloga s nalidiksinskom kiselinom za uzgoj bakterije *L. plantarum*. Podloge su pripravljene prema uputama proizvođača i prije korištenja sterilizirane u autoklavu na temperaturi 121°C i pri tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa u vremenu od 15 min. Sastav podloga prikazan je u tablicama 9, 10, 11 i 12. Krute podloge dobivene su dodatkom 15 g L^{-1} agara.

Tablica 9. Sastav kompletne LB hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Bakto-tripton	10 g
Kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	1000 mL

Tablica 10. Sastav kompletne MRS hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
MRS broth	27,6 g
Destilirana voda	1000 mL
*Agar (dodaje se u krute hranjive podloge)	15 g
**Ishodišna otopina nalidiksinske kiseline koncentracije 100 mg mL^{-1} (za selektivne krute hranjive podloge, dodaje se nakon sterilizacije u ohlađenu otopinu, a priprema se u 1M NaOH filtracijom preko $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ membranskog filtera)	300 μL

Tablica 11. Sastav M9-minimalne podloge s laktozom

Sastojak	Količina
Na₂HPO₄	6 g
KH₂PO₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH₄Cl	1 g
Agar	15 g
1 M MgSO₄*7 H₂O	2 mL
1 M CaCl₂	100 µL
20% laktoza	10 mL
Tiamin (2 mgmL⁻¹)	1 mL

Tablica 12. Sastav fosfatnog pufera (PBS)

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8 g
Na₂HPO₄*2 H₂O	1,15 g
KH₂PO₄	0,2 g
Destilirana voda	1000 mL

Fosfatni pufer se sterilizira na temperaturi od 121°C i pri tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa, 15 min.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izrada krivulje rasta bakterijskih kultura

Za određivanje optimalnog vremena uzgoja bakterija *E. coli* i *L. plantarum* napravljena je krivulja rasta. Optimalno vrijeme uzgoja je korišteno u eksperimentima ispitivanja toksičnosti arbutina na navedene bakterijske kulture. Broj živih stanica unutar 24 h uzgoja određen je na način da su naciepljivana odgovarajuća razrjeđenja svakih sat vremena u rasponu od 10^{-1} – 10^{-6} na selektivne MRS hranjive podloge s nalidiksinskom kiselinom za *L. plantarum* i na M9 s laktozom za *E. coli*. Obradom eksperimentalnih podataka nacrtana je krivulja rasta ovisnosti vremena (0-24h) i logaritamske vrijednosti CFU mL⁻¹ (engl. *Colony Forming Units*) za svaku bakterijsku kulturu zasebno te je određena eksponencijalna (log) faza rasta i optimalno vrijeme uzgoja korišteno za daljnja ispitivanja.

3.2.2. Ispitivanje toksičnosti arbutina na bakterijske kulture

Ispitivana je toksičnost arbutina u rasponu koncentracija od 0,2-4 mg mL⁻¹. Preinkubacijska smjesa je napravljena od jednakih omjera bakterijske kulture i određene koncentracije arbutina u 3 replike. Nakon tretmana od 1 h i 2 h u termostatu na 37°C napravljena su mikrorazrjeđenja te su naciepljena na krute selektivne hranjive podloge. Mikrorazrjeđenja su provedena na način da je prvo razrjeđenje (10^{-1}) dobiveno naciepljivanjem 10 µL originalne tretirane bakterijske suspenzije u 90 µL fosfatnog pufera (PBS). Nakon toga je prenesen volumen od 10 µL prvog razrjeđenja u 90 µL fosfatnog pufera (PBS) čime je dobiveno drugo razrjeđenje (10^{-2}). Uzastopnim ponavljanjem opisanog postupka pripremljena je serija takvih razrjeđenja, maksimalno do milijuntog razrjeđenja (10^{-6}). Naciepljene podloge se inkubiraju 24 h (*E. coli*) odnosno 48 h (*L. plantarum*) na 37°C. Obradom dobivenih eksperimentalnih podataka izračuna se postotak preživljenja bakterija po formuli 1:

$$[1] \% \text{ Preživljenje bakterija} = (\text{broj poraslih tretiranih bakterijskih stanica/ mL suspenzije}) / (\text{broj poraslih netretiranih bakterijskih stanica/ mL suspenzije}) * 100$$

3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti arbutina na humanim staničnim linijama

Neutral red metoda je kolorimetrijska metoda za kvantifikaciju vijabilnosti stanica nakon njihove inkubacije s toksičnim sredstvima. Metoda se temelji na unosu *Neutral red* boje i njezinom nakupljanju u lizosomima živih neoštećenih stanica. Kao rezultat se dobije da je količina apsorbirane boje proporcionalna broju živih stanica nakon tretmana s ispitivanom tvari (Borenfreund i sur., 1987).

Ispitivanje citotoksičnosti arbutina je provedeno na CAL 27, Hep G2 i Caco-2 stanicama. Volumen od 100 μL stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} naci jepljen je u mikrotitarske pločice. Nakon što je postignuta subkonfluentna stanična kultura, stanice se tretiraju sa 100 μL arbutina u rasponu koncentracija od 0,4-4 mg mL^{-1} u trajanju od 2 h, 1 h i 15 min u CO_2 inkubatoru na 37°C . Potom se sa stanica uklanja arbutin te se stanice ispiru sa 100 μL fosfatnog pufera. Nakon što se ukloni pufer u svaki bunarić se doda 100 μL radne otopine neutral red boje (Tablica 4.), pripremljene iz ishodišne otopine neutral red boje (Tablica 3.) te se ploče inkubiraju narednih 45 min u CO_2 inkubatoru. Zatim se iz bunarića uklanja boja te se ponovno ispiru sa 100 μL PBS-a. Dodaje se otopina za odbojavanje (Tablica 5.) i na spektrofotometru mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm. Potom se izračuna postotak preživljenja pomoću navedene formule 2:

$$[2] \text{ Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} = (A_{520 \text{ nm}} \text{ ekstrakta} / A_{520 \text{ nm}} \text{ kontrole}) * 100$$

3.3.4. Ispitivanje prooksidativnog/antioksidativnog učinka arbutina DCFH-DA metodom

2,7-Diklorodihidrofluoresceindiacetat (DCFH-DA) se uobičajeno koristi za detekciju reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i za procjenu ukupnog oksidativnog stresa u toksikološkim ispitivanjima. DCFH-DA prelazi staničnu membranu, nakon čega prolazi deacetilaciju unutarstaničnim esterazama. Nastali 2,7-diklorodihidrofluorescein (DCFH) potom reagira s intracelularnim vodikovim peroksidom ili drugim ROS-om kako bi se dobio fluorescentni 2,7-diklorofluorescein (DCF). Intenzitet fluorescencije je proporcionalan količini nastalih kisikovih radikala u stanici (Afri i sur., 2004).

100 μL CAL 27, Hep G2 i Caco-2 stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} je naci jepljeno u crne mikrotitarske pločice. Nakon postignute subkonfluentne stanične kulture, sa stanica se uklanja medij i stanice se tretiraju sa 100 μL arbutina u rasponu koncentracija od 0,4-4 mg mL^{-1} u 3 vremenska intervala (2h, 1 h i 15 min) u CO_2 inkubatoru na 37°C . Nakon

tretmana, iz bunarića se ukloni arbutin, stanice se ispiru sa 100 μL PBS-a i doda 100 μL 0,05 mM radne otopine DCFH-DA koja je pripravljena u PBS-u (Tablica 8.) iz ishodišne otopine (Tablica 7.). Inkubacija traje 30 min te se nakon nje mjeri intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini $\lambda_{em}=485$ i $\lambda_{ex}=530$ nm. Indukcija slobodnih radikala izračuna se prema sljedećoj formuli 3:

$$[3] \text{ Indukcija slobodnih radikala (\% u odnosu na kontrolu) } = (\text{intenzitet fluorescencije ekstrakta} / \% \text{ preživljenja}) / (\text{intenzitet fluorescencije kontrole}) * 100$$

3.3.5. Utjecaj arbutina na promjenu adhezije bakterija za humane stanice

Bakterijske kulture *L. fermentum* i *E. coli* su uzgojene do optimalnog vremena uzgoja određenog pomoću krivulje rasta. Suspenzija epitelnih stanica jezika (CAL 27) i epitelnih stanica crijeva (Caco-2) koncentracije $2 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} se nasadi u pločice s 24 bunarića u volumenu od 1 mL i tretira arbutinom. Tretiranje CAL 27 stanica arbutinom koncentracija 0,8 mg mL^{-1} i 2,4 mg mL^{-1} traje 15 min, a Caco-2 stanica, istim tim koncentracijama, 2 h. Ovi vremenski periodi tretmana i ove koncentracije arbutina su odabrane zbog realnih uvjeta izloženosti ispitivanih staničnih linija vodenom ekstraktu medvjete (čaj) prilikom konzumacije. Koncentracija 0,8 mg mL^{-1} predstavlja koncentraciju arbutina u jednom napitku čaja od lišća medvjete, a 2,4 mg mL^{-1} dnevno preporučenu dozu koja se pije tijekom liječenja infekcija urinarnog trakta. Uz to ove koncentracije arbutina imale citotoksičan utjecaj na ispitivane bakterijske kulture i humane stanice čija se promjena adhezijskog potencijala željela ispitati u ovom radu. Nakon tretmana s arbutinom, s humanih stanica se uklanja arbutin, te se stanice tretiraju suspenzijom bakterija (0,5 mL) 30 min na 37°C . Potom se bakterije koje se nisu vezale za stanice ispiru s 0,5 mL PBS-a te se dodaje 100 μL 0,01 % Triton X-100 otopine (Tablica 6.) i inkubira 15 min u termostatu na 37°C . Epitelne stanice jezika i crijeva se nakon 15 min tretmana s 0,01 % Triton X-100 otopinom razore i ostanu samo bakterijske stanice. Potom se rade mikrorazrijeđenja koja se najepljuju na MRS hranjivu podlogu s nalidixinskom kiselinom za *L. plantarum* i na M9 s laktozom za *E. coli*. Sljedeći dan se prebroje bakterije i izračuna % adhezije bakterija, odnosno broj bakterijskih stanica koje su se vezale na CAL 27 i Caco-2 stanice u odnosu na kontrolu koju predstavlja % adhezije bez tretmana arbutinom prema navedenoj formuli:

$$[4] \% \text{ adhezije bakterija} = (\text{broj poraslih tretiranih bakterijskih stanica} / \text{mL suspenzije}) / (\text{broj poraslih netretiranih bakterijskih stanica} / \text{mL suspenzije}) * 100$$

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je u statističkom programu JASP 0.9.2.0. Podaci su obrađeni One Way ANOVA statističkom analizom korištenjem Tukey-ovog Post Hoc testa. Statistički značajna razlika između eksperimentalno dobivenih podataka utvrđena je kriterijem P vrijednost $<0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Proučavanje citotoksičnog učinka arbutinana bakterijama *L. plantarum* i *E. coli* provelo se uzgojem bakterija u vremenu koji je određen na temelju krivulja rasta pojedine ispitivane bakterijske kulture. Uzgojene bakterijske kulture su tretirane u dva vremenska intervala 1h i 2h pripremljenom koncentracijom arbutina te su nakon tretmana napravljena mikrorazrjeđenja kako bi se izračunalo preživljenje tretiranih bakterija u odnosu na kontrolu. Test citotoksičnosti arbutinana tumorske epitelne stanice jezika, CAL 27, stanice adenokarcinoma epitela debelog crijeva, Caco-2 i na tumorske epitelne stanice jetre, HepG2, napravljen je Neutral red metodom.

Test prooksidativnog/antioksidativnog djelovanja arbutina je proveden DCFH-DA metodom.

Testovi citotoksičnosti i prooksidativnog/antioksidativnog djelovanja arbutina različitim koncentracijama provedeni su u vremenskom rasponu od 15 min, 1 i 2 h.

Test adhezije je napravljen inkubiranjem stanica s arbutinom, CAL 27 stanica 15 min i Caco-2 stanica 2 h, a potom nasadivanjem bakterija, nakon čega su napravljena mikrorazrjeđenja kako bi se nakon 24 h rasta u termostatu na 37°C izbrojale i izračunao postotak adhezije.

Svi rezultati su prikazani grafički kao odnosi postotka (%) preživljenja, odnosno postotka (%) adhezije u ovisnosti o koncentraciji i vremenu tretmana te kao postotak (%) indukcije slobodnih radikala u odnosu na negativnu kontrolu u ovisnosti o koncentraciji i vremenu tretmana.

Statističkom analizom One-way ANOVA testom s Post Hoc Tukey testom uz granicu statističke značajnosti $P < 0,05$, dobiveni su statistički značajni odnosi između koncentracija arbutina koji su prikazani na grafičkom prikazu.

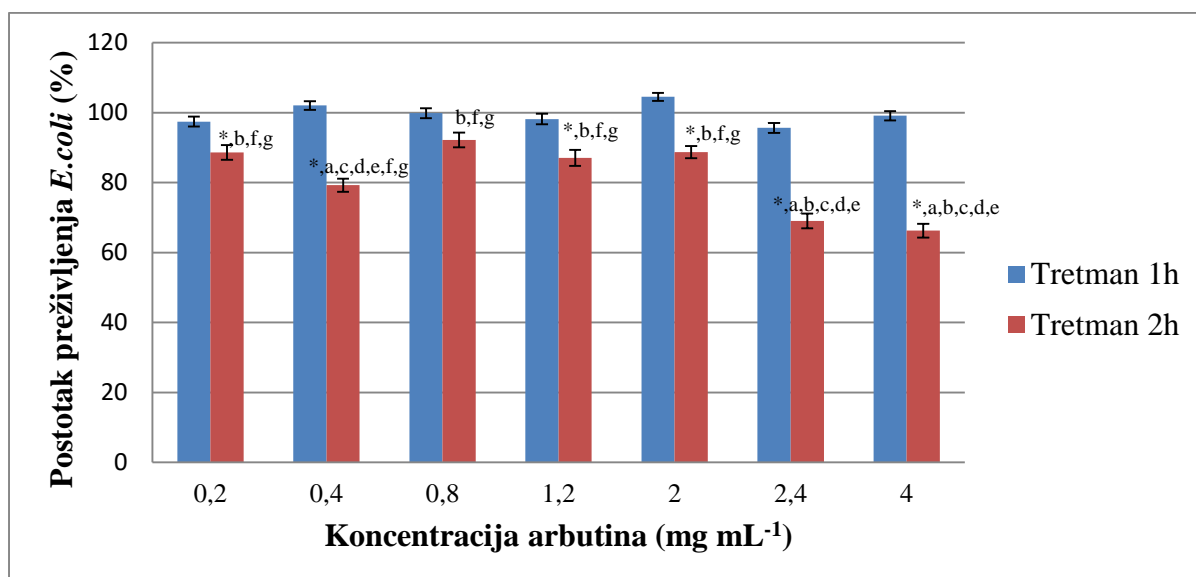
4.1. CITOTOKSIČNOST ARBUTINA IZ MEDVJETKE NA BAKTERIJE *E. coli* I *L. plantarum*

Pomoću izrađenih krivulja rasta *E. coli* i *L. plantarum* određeno je optimalno vrijeme uzgoja unutar eksponencijalne faze rasta ovih bakterijskih kultura što je prikazano u tablici 13. Ta vremena uzgoja su korištena za ispitivanje citotoksičnosti arbutina na spomenute bakterijske kulture.

Tablica 13. Prikaz optimalnog vremena uzgoja bakterija određeno prema krivuljama rasta

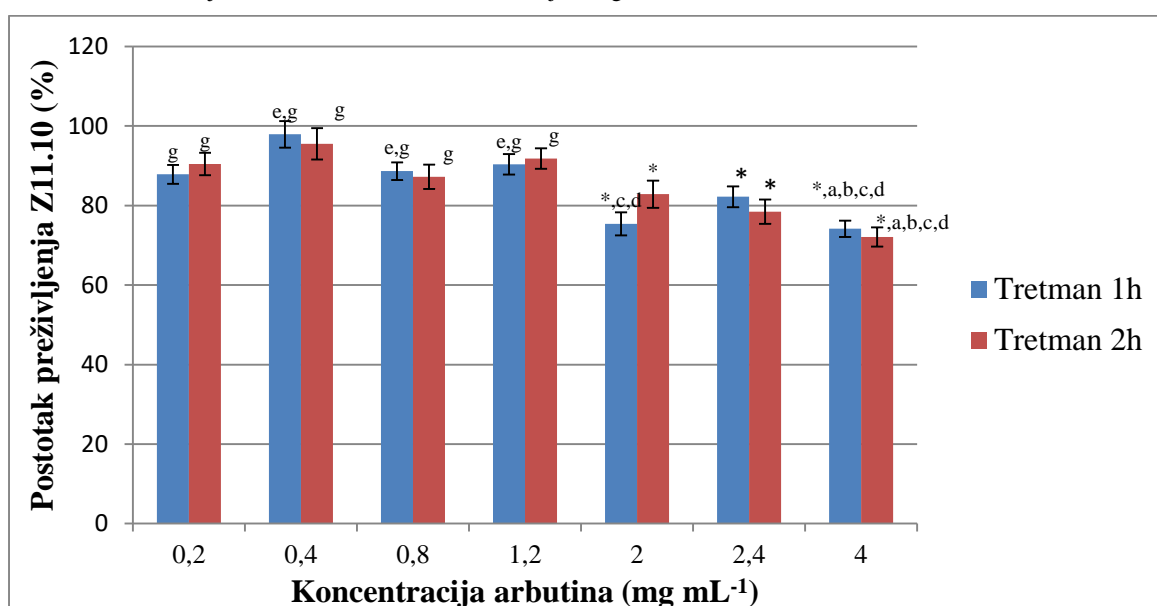
Bakterijska kultura	Optimalno vrijeme uzgoja (h)
<i>Escherichia coli</i> MG1655	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Z11.10)	7

Rezultati dobiveni ovim eksperimentom su prikazani u obliku grafičkog prikaza (slika 3 i slika 4) te pokazuju antimikrobno djelovanje arbutina iz biljnog ekstrakta medvjetke na ispitivane bakterije. Arbutin ne utječe statistički značajno na preživljenje bakterije *E. coli* vremenskom periodu tretmana od 1h dok kod potencijalno probiotičke bakterije *L. plantarum* tretman većim koncentracijama arbutina tijekom 1 h smanjuje preživljenje za 20-30%. Antibakterijsko djelovanje arbutina se povećava duljim vremenom tretmana arbutinom (2 h) te primjena većih koncentracija (1,2 mg mL⁻¹, 2mg mL⁻¹, 2,4 mg mL⁻¹ i 4 mg mL⁻¹ kod *E. coli* i 2 mg mL⁻¹, 2,4 mg mL⁻¹ i 4 mg mL⁻¹ kod *L. plantarum*) ima statistički značajno veću citotoksičnostu odnosu na manje koncentracije i kontrolu. Koncentracija 0,8mg mL⁻¹ koja odgovara količini arbutina u jednom napitku čaja od medvjetke ne utječe statistički značajno na preživljenje ispitivanih bakterija ni u jednom od ispitivanih vremena tretmana, ali koncentracija od 2,4mg mL⁻¹ koja predstavlja preporučenu dnevnu dozu čaja u tretmanu od 2 h smanjuje preživljenje *E. coli* za više od 30% dok je preživljenje *L. plantarum* nakon izloženosti arbutinu koncentracije 2,4 mg mL⁻¹ tijekom 1 h i 2 h statistički značajno manje od one u kontrole.



Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja bakterije *E. coli* o koncentraciji arbutina s prikazanim standardnim devijacijama i statistički značajnim razlikama

*-Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,2mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1,2 mg mL⁻¹, e- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2 mg mL⁻¹, f- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, g- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹



Slika 4. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja bakterije *L. plantarum* o koncentraciji arbutina s prikazanim standardnim devijacijama i statistički značajnim razlikama

*-Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,2mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1,2 mg mL⁻¹, e- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2 mg mL⁻¹, f- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, g- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

Jurica i sur. (2017) su u svom radu istražili antimikrobnu aktivnost arbutina i hidrokinona iz biljke *Arbutus unedo* na nekoliko standardnih laboratorijskih sojeva: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans* te nekoliko kliničkih uropatogenih mikroorganizama: *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *C. albicans* i *C. Parapsilosis* metodom difuzije i mikrodilucijskom metodom. Nakon inkubacije ovih bakterija s arbutinom 24 h, određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije arbutina (MBK), koje su za sojeve *E.coli* iznosile >25 mg arbutina mL^{-1} vode ili metanola. MIK je najmanja koncentracija ksenobiotika koja inhibira rast bakterija, a MBK najniža koncentracija ksenobiotika koja ubija 99,9% bakterija (EMA, 2017). Ovi rezultati su djelomično u skladu s našim istraživanjem jer pokazuju da arbutin utječe na preživljenje bakterijskih stanica u dozi $0,8$ mg mL^{-1} koja se koristi prilikom liječenja infekcije mokraćnog sustava, ali je naše istraživanje pokazalo da koncentracija $2,4$ mg mL^{-1} ili dnevna doza ima određeno antimikrobno djelovanje što nije slučaj u prethodno navedenom radu.

Kundaković i sur. (2014) u svom istraživanju navode da arbutin ima antibakterijski učinak prema četiri Gram-negativne bakterije: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae* i četiri Gram-pozitivne bakterije: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* i *Staphylococcus aureus*, ali pri puno manjim minimalnim inhibitornim koncentracijama od $0,1$ mg mL^{-1} . Razlog tome može biti puno duža inkubacija ispitivanih bakterija (čak 48 h na 37 °C) s arbutinom otopljenim u DMSO / H_2O = 50:50.

Vučić i sur. (2013) su ispitali antibakterijsko djelovanje vodenih, etanolnih i etil acetatnih ekstrakata listova medvjete protiv deset Gram-pozitivnih (*E.faecalis*) i deset Gram-negativnih bakterijskih sojeva (*E.coli*) na temelju mikrodilucijske metode. Nakon 24 h inkubacije bakterija s ekstraktima rezultati istraživanja su pokazali da vodeni ekstrakt ima najveći antibakterijski učinak, da je općenito jače antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne sojeve te da je najmanja MIK vodenog ekstrakta i za sojeve *E.faecalis* i sojeve *E.coli* $1,25$ mg mL^{-1} je u skladu s rezultatima u ovom radu jer se pokazalo da arbutin pokazuje antibakterijsko djelovanje na *E. coli* pri koncentraciji $\geq 1,2$ mg mL^{-1} , a kod *L. plantarum* pri koncentraciji ≥ 2 mg mL^{-1} .

U izvješću koje je podnijela EMA (2017) o *medvjeci* također se navodi kako vodeni ekstrakt medvjete ima antibakterijsko djelovanje protiv 20 različitih sojeva bakterije *E. coli* jer značajno povećava hidrofobnost *E. coli*. Puno manje MIK ekstrakta medvjete u odnosu na MIK arbutina je vjerojatno posljedica i drugih fenolnih tvari koje isto imaju antibakterijski

učinak. To se slaže s preliminarnim rezultatima (nisu prikazani) na vodenom ekstraktu medvjetke koji su pokazali da sam ekstrakt smanjuje preživljenje *E. coli* na ispod 80% tijekom tretmana sa sve četiri koncentracije (0,5x-5x). U slučaju *L. plantarum* je pokazano značajnije antibakterijsko djelovanje ekstrakta medvjetke gdje je prilikom tretmana 0,5x, 1x, 3x i 5x koncentracijama ekstrakta tijekom 1h preživljenje linearno padalo od 60% do 40% u odnosu na kontrolu. S obzirom na rezultate antibakterijskog djelovanja arbutina, može se zaključiti da se u slučaju *E. coli* citotoksično djelovanje ekstrakta medvjetke ne može pripisati arbutinu s obzirom da on nije pokazao nikakvo statistički značajno djelovanje. S druge strane, arbutin djelomično pridonosi citotoksičnom djelovanju ekstrakta medvjetke na potencijalno probiotičke bakterije *L. plantarum*, ali je ono vjerojatno posljedica i drugih fenolnih tvari koje isto imaju antibakterijski učinak.

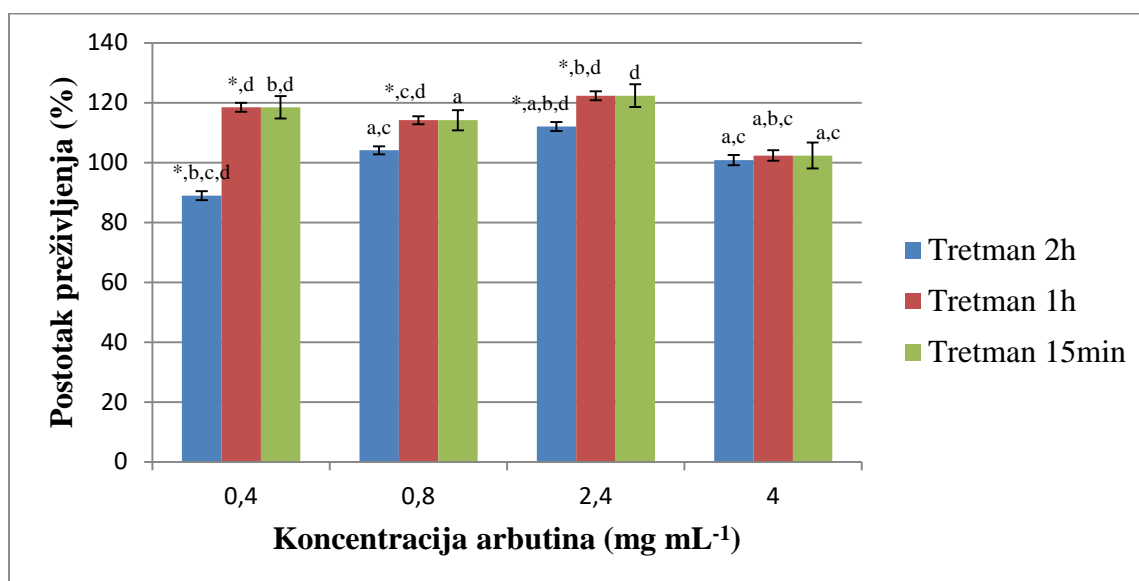
Europska agencija za lijekove (2017) navodi da antimikrobno djelovanje arbutina ovisi o oslobađanju njegovog aglikona, hidrokinona i da se u obzir mora uzeti aktivnost egzoenzimatske β -glukozidaze mikroorganizma koji uzrokuju infekciju mokraćnog sustava. Uzevši to u obzir istražili su da se MIK arbutina u ovisnosti na vrstu mikroorganizma kreće od 0,4 do 0,8%. Najveća ekstracelularna enzimska aktivnost β -glukozidaze pronađena je u rodovima *Streptococcus faecalis* (100%), *Klebsiella* (95%) i *Enterobacter* (72%), a najniža u *E. coli* (11,6%). Blaut i sur. (2006) su tek nakon 24 h inkubacije bakterija iz porodica *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* s arbutinom primijetili potpunu pretvorbu 2 mM (0,54 mg mL⁻¹) arbutina u hidrokinon. U ovom radu tretman bakterijskih kultura arbutinom je iznosio 1 h odnosno 2 h što potpuno isključuje enzimsku aktivnost β -glukozidaze.

4.2. CITOTOKSIČNOST ARBUTINA NA HUMANE STANICE

Citotoksičnost arbutina na humane stanice je određena Neutral red metodom na temelju postotka preživljenja. Stanice su tretirane različitim koncentracijama arbutina u različitom trajanju tretmana od 15 min, 1 h i 2 h. Utjecaj arbutina je specifičan i ima različiti citotoksični /proliferativni učinak na različite humane stanične linije.

4.2.1. Citotoksičnost arbutina na tumorske epitelne stanice jezika CAL 27

Ispitivanje citotoksičnosti arbutina na CAL 27 je pokazalo da koncentracije 0,4 mg mL⁻¹, 0,8 mg mL⁻¹ koja predstavlja koncentraciju arbutina u jednom napitku čaja i 2,4 mg mL⁻¹ koja predstavlja koncentraciju arbutina u dnevno preporučenoj dozi čajautječu na blagu proliferaciju CAL 27 stanica (do 120%) dok najveća koncentracija, koncentracija 4 mg mL⁻¹ ne djeluje niti proliferativno niti citotoksično. Što se tiče različitog vremena tretmana arbutinom, proliferacija je prisutna kod tretmana CAL 27 stanica arbutinom 15 min i 1 h, ali ne i kod tretmana 2 h. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom na slici 5.



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja CAL 27 stanica o koncentraciji arbutina i vremenu izlaganja stanica arbutinu

*- Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4 mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

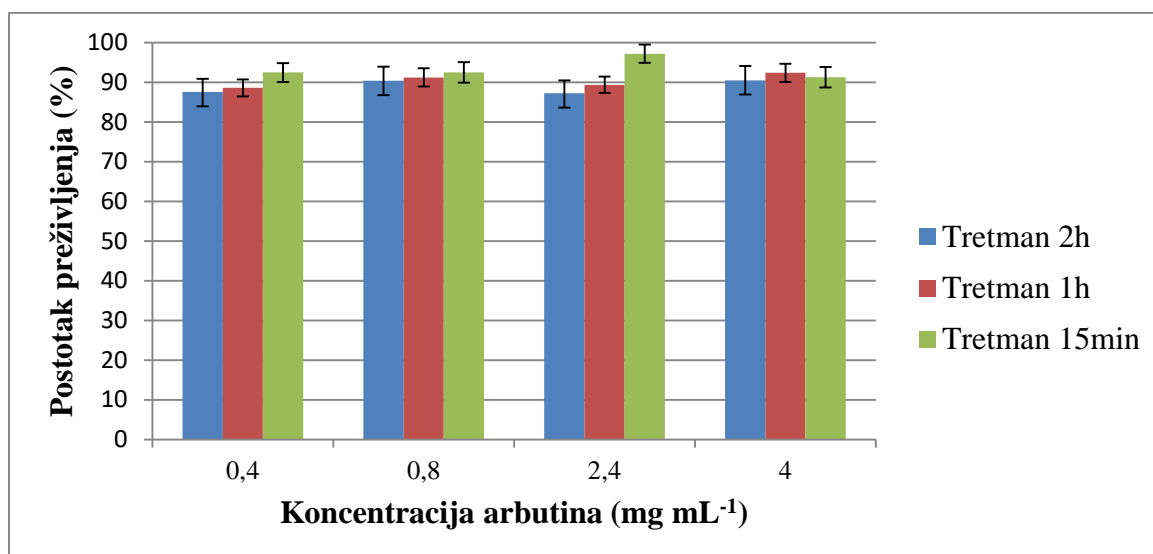
U preliminarnom istraživanju (rezultati nisu prikazani), tijekom dužeg izlaganja stanica ekstraktu medvjete primijećen je pad u postotku preživljenja CAL 27 stanica, dok rezultat najkraćeg vremena izlaganja, 15 min, pokazuje rast, odnosno proliferaciju stanica, pri čemu je najveći rast primijećen kod najniže koncentracije ekstrakta (0,5x). To je suprotno djelovanju arbutina pa se može zaključiti da određeni spojevi unutar ekstrakta medvjete potiskuju proliferativni efekt arbutina te se kao krajnji rezultat jače ispoljava citotoksično djelovanje.

Da se citotoksično djelovanje jače ispoljava djelovanjem ekstrakta lišća medvjete slažu se i Amarowicz i sur. (2013). Oni u svom istraživanju navode kako i sirovi etanolni ekstrakt lišća medvjete (480 mg g⁻¹ arbutina, 1,9 mg g⁻¹ galne kiseline i 95 mg g⁻¹ galotanina) i obe njegove frakcije od kojih jedna nije sadržavala arbutin, a druga je sadržavala 545 mg g⁻¹ arbutina i 2,1 mg g⁻¹ galne kiseline nakon četverodnevne inkubacije smanjuju proliferaciju stanične linije karcinoma dojke (MCF-7), debelog crijeva (HT-29), prostate (DU-145), kože (SK-MEL-5) i kože (MD A-MB-435). IC₅₀ etanolnog ekstrakta lišća medvjete se kreće od 3,7-14,1 µg mL⁻¹ za ove stanične linije.

Seeram i sur. (2004) su ispitivali antiproliferativnu aktivnost ekstrakta brusnice iz porodice *Ericaceae* i njegovih frakcija na različite humane stanične linije među kojima i stanične linije usta i jezika. Antiproliferativna aktivnost je određena pomoću ATP testa nakon 48 h inkubacije ekstrakta i njegovih frakcija sa stanicama. Njihovi rezultati pokazuju da ekstrakt brusnice (0,2 mg mL⁻¹) inhibira proliferaciju tumorske epidermalne stanične linije usta, KB stanice 60%, a tumorske epitelne stanice jezika, CAL-27 stanice 8%. Polifenolna frakcija (0,2 mg mL⁻¹) je inhibirala proliferaciju KB stanica 96,1%, a CAL-27 stanica 95%. Uspoređujući ovo i preliminarno istraživanje može se zaključiti da ekstrakti medvjete i brusnice iz iste porodice *Ericaceae* pokazuju antiproliferativnu aktivnost.

4.2.2. Citotoksičnost arbutina na tumorske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma Caco-2

Niti citotoksični niti proliferativni učinak nije primijećen u cijelom ispitivanom rangu koncentracija arbutina i u svim vremenima tretmana na Caco-2 stanicama. Njihovo preživljenje se kreće od 87 do 97%. Rezultati citotoksičnosti arbutina na Caco-2 stanice su prikazani grafički na slici 6.



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja Caco-2 stanica o koncentraciji arbutina i vremenu izlaganja stanica arbutinu

*- Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4 mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

U preliminarnim istraživanjima utjecaja vodenog ekstrakta medvjete (rezultati nisu prikazani) utvrđeno je kako vrijeme izlaganja (15 min, 1h i 2h) stanica Caco-2 ekstraktu medvjete nema utjecaj na preživljenje stanica što je i u skladu s istraživanjima djelovanja arbutina gdje također nema nikakve razlike u djelovanju ovisno o vremenu. Povećanjem koncentracija ekstrakta medvjete, pri svim vremenima izlaganja stanica, dolazi do stimulacije proliferacije stanica, pri čemu kod koncentracije 5x rast stanica dostiže i preko 120%. Koncentracija 0,5x prilikom tretmana od 2 h pokazuje citotoksični učinak ekstrakta dok više koncentracije dovode do stimulacije proliferacije. Prema tome, iz ovih rezultata se može zaključiti da sam arbutin u ekstraktu medvjete nije odgovoran za proliferaciju stanica Caco-2 ili tek u sinergističkom djelovanju s ostalim sastojcima unutar samog ekstrakta pokazuje stimulaciju proliferacije.

EMA (2017) navodi kako ni puno duže vrijeme inkubacije od 4 dana staničnih linija karcinoma debelog crijeva, HCT-15 arbutinom koncentracija 2,5, 12,5 ili 50 μg mL⁻¹ ne djeluje citotoksično. Naime u tom radu su korištene puno niže koncentracije arbutina od onih korištenih u ovom radu.

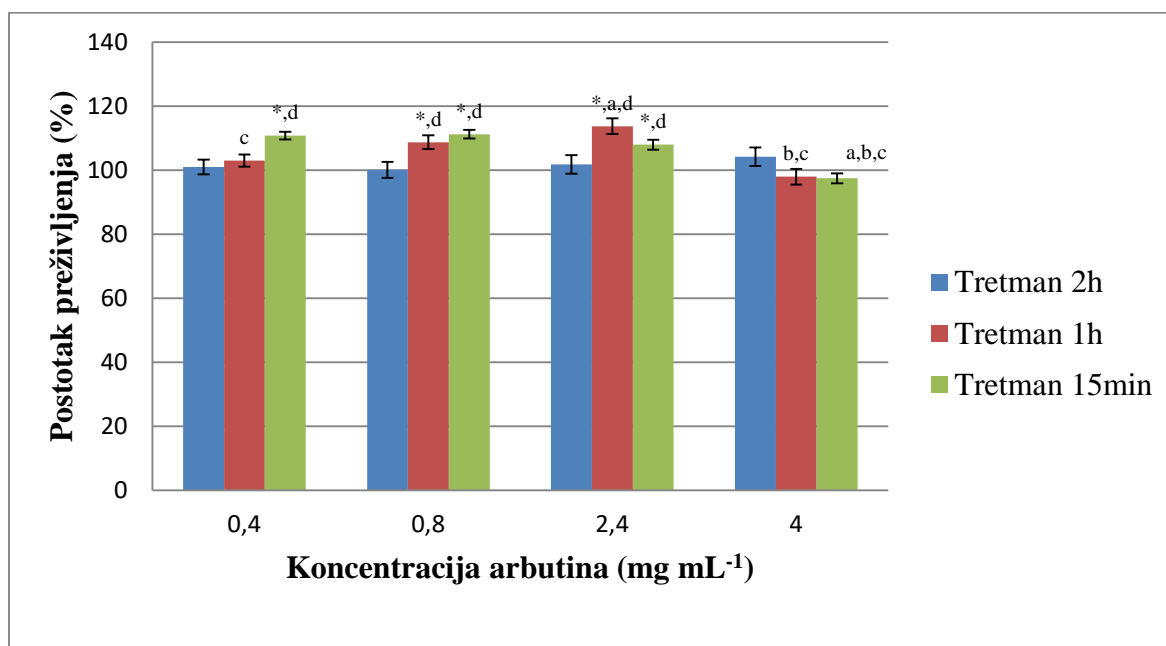
Arbutin nema citotoksični učinak ni na tumorske epitelne stanice mjehura, TCCSUP stanice inkubirane 24 h arbutinom u koncentracijama manjim od 0,5 mg mL⁻¹ (EMA, 2017).

To je u skladu sa istraživanjem u ovom radu u kojem najmanja koncentracija arbutina 0,4 mg mL⁻¹ nije pokazala citotoksični učinak.

Kundaković i sur. (2014) su također istraživali citotoksični učinak arbutina nakon 24 h tretmana, ali sa druge dvije stanične linije. Istraživanje je pokazalo da arbutin nije citotoksičan za stanične linijemelanoma (Fem-x) i fibroblasta zdravih pluća ljudskog embrija (MRC-5) u *in vitro* uvjetima s IC₅₀ > 0,2 mg ml⁻¹. IC₅₀ je koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju staničnog rasta.

4.2.3. Citotoksičnost arbutina na tumorske epitelne stanice jetre HepG2

Citotoksični učinak arbutina u ispitivanim koncentracijama i kod različitog vremena tretmana sa HepG2 stanicama nije primijećen. Ono što je primijećeno je da arbutin u kraćem vremenu tretmana (15 min i 1h) ima blago proliferativno djelovanje na Hep G2 stanice u koncentracijama 0,8 mg mL⁻¹ i 2,4 mg mL⁻¹. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom na slici 7.



Slika 7. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja HepG2 stanica o koncentraciji arbutina i vremenu izlaganja stanica arbutinu

*- Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

Citotoksični učinak arbutina na tumorske epitelne stanice jetre štakora nije primijećen ni u istraživanju kojeg su proveli Asaff i sur. (1987). Naime, oni su koristili puno manje koncentracije arbutina $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ i tokom duljeg vremena 24 h, 48 h i 72 h u odnosu na koncentracije arbutina i vrijeme tretmana ispitivanog u ovom radu. No, da koncentracije arbutina i vrijeme tretmana ne utječu na citotoksičnost arbutina potvrđuju i Khanal i sur. (2011) koji nisu primjetili citotoksični učinak arbutina od 2 mM ($0,54 \text{ mg mL}^{-1}$) na ljudske tumorske epitelne stanice jetre Hep G2. Citotoksični učinak su mjerili pomoću MTT testa, a stanice su tretirali 24h arbutinom. Kang i sur. (2011) navode da niti još veće koncentracije arbutina od čak 10 mM ($2,7 \text{ mg mL}^{-1}$) ne djeluju citotoksično na Hep G2 staničnim linijama koje su isto 24 h bile inkubirane s arbutinom.

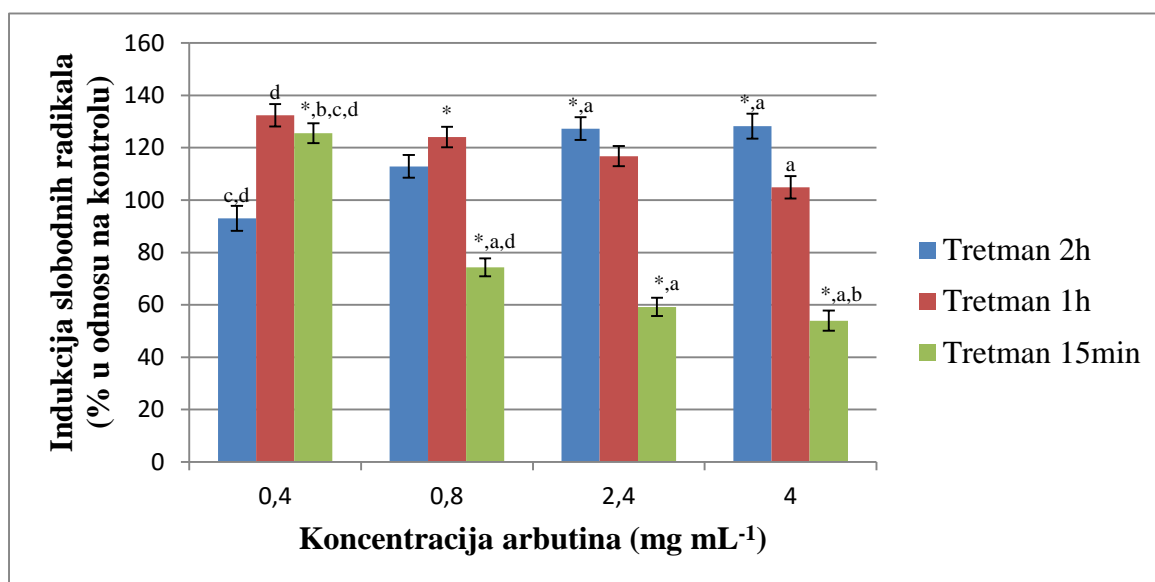
Kang i sur. (2011) su ispitali još i utjecaj metabolizma arbutina pomoću bakterija *Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium adolescentis* koje imaju β -glukozidaznu aktivnost na citotoksičnost u Hep G2 stanicama. Bakterijske stanice su tretirali s arbutinom 24h, a pomoću dobivenog kultiviranog medija su tretirali Hep G2 stanice još 24 h. Navode da sam arbutin u svim koncentracijama nije pokazao citotoksični učinak (rezultate nisu prikazali) dok su koncentracije arbutina $0,4 \text{ mM}$ i $0,6 \text{ mM}$ djelovale citotoksično nakon metabolizma pomoću *B. longum* i *B. adolescentis*. Ovdje je riječ zapravo o citotoksičnosti derivata arbutina odnosno hidrokinona koji je nastao metabolizmom bakterija nakon 24 h inkubacije s arbutinom. To su istražili i Blaut i sur. (2006) koji su primijetili potpunu pretvorbu 2 mM ($0,54 \text{ mg mL}^{-1}$) arbutina u hidrokinon nakon 24 h inkubacije bakterija iz porodica *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* s arbutinom.

4.3. PROOKSIDATIVNI/ANTIOKSIDATIVNI UČINAK ARBUTINA NA HUMANE STANICE

Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina je određen DCFH-DA metodom. Vremensko trajanje tretmana humanih stanica s arbutinom koncentracija $0,4\text{--}4 \text{ mg mL}^{-1}$ iznosilo je 15 min, 1 h te 2h. Utjecaj arbutina je specifičan i ima različiti antioksidativni/prooksidativni učinak na različite humane stanične linije.

4.3.1. Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina na tumorske epitelne stanice jezika CAL 27

Ispitivanje antioksidativnog djelovanja arbutina na CAL 27 je pokazalo da prilikom kraćeg vremena tretmana od 15min, najmanja ispitivana koncentracija arbutina 0,4 mg mL⁻¹ djeluje prooksidativno dok ostale koncentracije 0,8 mg mL⁻¹, 2,4 mg mL⁻¹ i 4 mg mL⁻¹ djeluju antioksidativno tako da se od najmanje do najveće koncentracije linearno povećava antioksidacijsko djelovanje. Takav trend povećanja antioksidacijskog djelovanja s većim koncentracijama primijećen je i kod vremena tretmana 1 h. Suprotni učinak je kod izlaganja CAL 27 stanica arbutinu 2 h gdje najveće koncentracije, 2,4 mg mL⁻¹ i 4 mg mL⁻¹ djeluju prooksidativno, a kod ostalih koncentracija nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani grafički na slici 8.



Slika 8. Grafički prikaz utjecaja arbutina na indukciju slobodnih radikala u CAL 27 stanicama

*- Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4 mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

U preliminarnim istraživanjima (rezultati nisu prikazani) antioksidativnog djelovanja vodenog ekstrakta medvjeteke na CAL 27 stanične linije pokazano je značajno smanjenje postotka indukcije (ispod 60% u odnosu na kontrolu) slobodnih radikala kod sva tri proučavana vremena (15 min, 1h i 2h) i sve četiri ispitivane koncentracije podjednako (0,5-5x). Ako se uzme u obzir realno stanje izlaganja tumorskih stanica epitela jezika CAL 27 samom ekstraktu čaja, ono bi iznosilo 15 min. Kada se uspoređuje antioksidacijsko djelovanje ekstrakta medvjeteke i čiste otopine arbutina, može se zaključiti da je arbutin kao sastavni dio

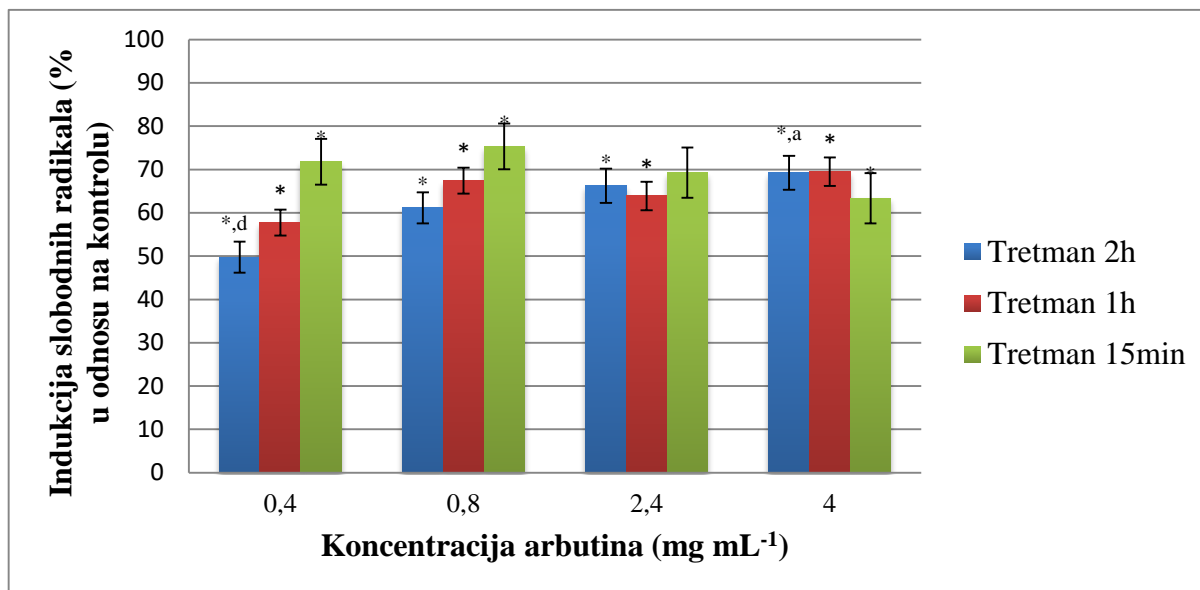
ekstrakt djelomično zaslužan za njegovo antioksidacijsko djelovanje. Tome vrlo vjerojatno pridonose i drugi spojevi unutar samog ekstrakta.

Do danas nije ispitan antioksidacijski učinak ekstrakta medvjette kao i njegovog biološki aktivnog spoja arbutina na epitelne stanice jezika.

Carpenter i sur. (2006) su ispitali utjecaj resveratrola, citroflavan-3-ola i 4 biljna ekstrakta među kojima i ekstrakta medvjette na oksidativni stres u U-937 stanicama koje se često koriste upravo kad se ispituju stanične i biokemijske promjene uzrokovane oksidativnim stresom. Antioksidacijski učinak ekstrakta medvjette su mjerili pomoću postotka glutaciona prisutnog u U-937 stanicama koji također ima antioksidacijska svojstva i koji se može iscrpiti u stanicama za vrijeme oksidativnog stresa. Postotak glutaciona nakon tretmana sa prooksidansom etopozidom je iznosio 54 % u odnosu na kontrolu dok je postotak glutaciona nakon predtretmana U-937 stanica sa koncentracijom ekstrakta medvjette ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 1 h, a potom i tretmana sa etopozidom 24 h iznosio 112 %. Istraživanje je pokazalo da ekstrakt medvjette ima najveću učinkovitost u smanjenju oksidativnog stresa, a slijede ga ekstrakt maslinovog lista, resveratrol, polifenoli iz grožđa, citroflavan-3-ol i *Echinacea*. Iako je korištena različita metoda za ispitivanje antioksidacijskog učinka lišća medvjette dobiveni rezultati su isti i potvrdili su antioksidativni učinak lišća medvjette.

4.3.2. Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina na tumorske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma Caco-2 stanice

Ispitivani antioksidacijski učinak arbutina na Caco-2 stanice je primjećen u cijelom ispitivanom rangu koncentracija arbutina, od najmanje do najveće. Svi tretmani i od 15 min, 1 h i 2 h su pokazali antioksidacijsko djelovanje. Kod najkraćeg vremena tretmana (15 min) veće koncentracije ($2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ i 4 mg mL^{-1}) pokazuju veće antioksidativno djelovanje od manjih koncentracija dok kod duljeg vremena tretmana (1 h i 2 h) manje koncentracije ($0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$) pokazuju veće antioksidativno djelovanje. Rezultati su prikazani grafički na slici 9.



Slika 9. Grafički prikaz utjecaja arbutina na indukciju slobodnih radikala u Caco-2 stanicama

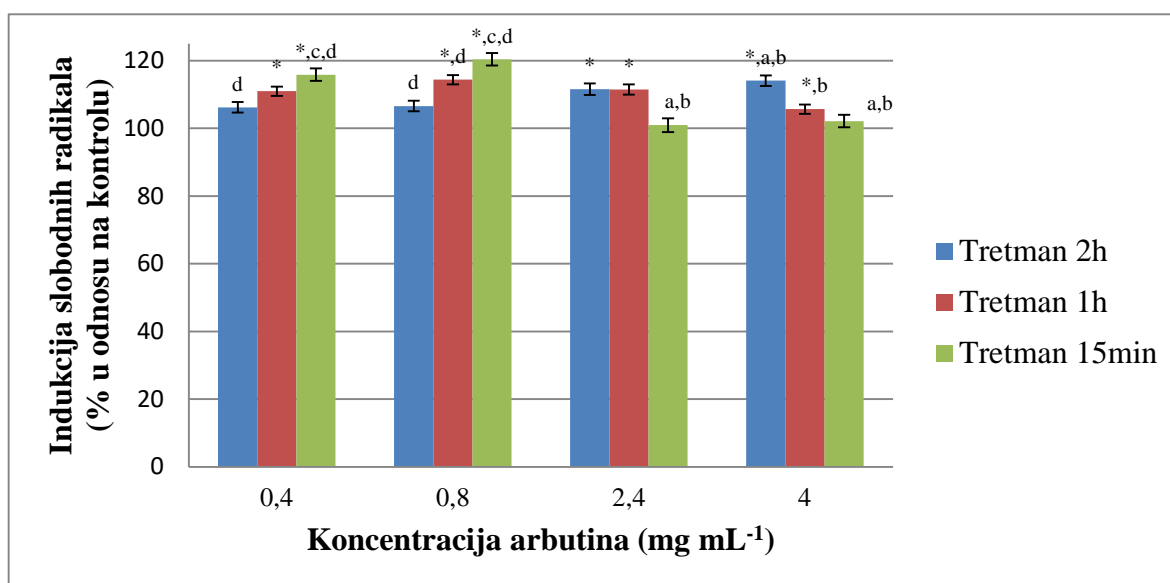
*- Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

Li-Hua i sur. (2014) su u svom istraživanju proučavali kako predtretman stanica ljudskog limfoma, U937 stanica s arbutinom djeluje na indukciju slobodnih radikala do koje dolazi nakon zračenja s 10 Gy x zrakama. Predtretman s arbutinom koncentracija 0,005, 0,1, 0,2 i 0,5 mM je trajao 1h te su stanice nakon zračenja stavljene na inkubaciju 2h ili 6h. Uočili su kako je kod uzorka s predtretmanom s arbutinom značajno smanjena indukcija slobodnih radikala poput hidroksila, peroksinitrita i superoksida i apoptoza stanica uzrokovanih zračenjem.

Takebayashi i sur. (2010) su ispitali antioksidacijska svojstva arbutina i hidrokinona na fibroblastima i eritrocitima ljudske kože nakon njihovog tretmana sa AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid) radikalom. I arbutin i hidrokinon koncentracije 0,05 mM su pokazali antioksidacijsko djelovanje nakon inkubacije sa eritrocitima i 40 mM AAPH na 37 ° C tijekom 3 h uz aeraciju. Nakon inkubacije fibroblasta ljudske kože s 20 mM AAPH u prisutnosti arbutina (0,125-1 mM) i hidrokinona (0,0625-0,125 mM) na 37°C tijekom 24 h arbutin je značajno pokazao zaštitni učinak protiv oksidativnog stresa u fibroblastima, ali hidrokinon nije jer je njegovo antioksidacijsko djelovanje bilo interferirano sa citotoksičnim učinkom. Uspoređujući rad Li-Hua i sur. i Takebayashi i sur. može se zaključiti da još niže koncentracije arbutina u odnosu na one korištene u ovom radu gdje je najniža koncentracija iznosila 0,4 mg mL⁻¹(1,48 mM) imaju antioksidativno djelovanje na humanim stanicama.

4.3.3. Prooksidativni/antioksidativni učinak arbutina na Hep G2 stanice

Ispitivanje antioksidativnog djelovanja arbutina na Hep G2 stanične linije je pokazalo davrijeme tretmana utječe na način da kod dužeg izlaganja arbutinu veće koncentracije (2,4 mg mL⁻¹ i 4 mg mL⁻¹) pokazuju prooksidativno djelovanje dok kod kraćeg izlaganja (15 min) manje koncentracije (0,4 mg mL⁻¹ i 0,8 mg mL⁻¹) pokazuju prooksidativno djelovanje na Hep G2 stanične linije. Kod tretmana izlaganja od 1h sve koncentracije (0,4-4mg mL⁻¹) su pokazale prooksidativno djelovanje. Rezultati su prikazani grafički na slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz utjecaja arbutina na indukciju slobodnih radikala u Hep G2 stanicama

*- Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,4 mg mL⁻¹, b- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,8 mg mL⁻¹, c- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,4 mg mL⁻¹, d- Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 4 mg mL⁻¹

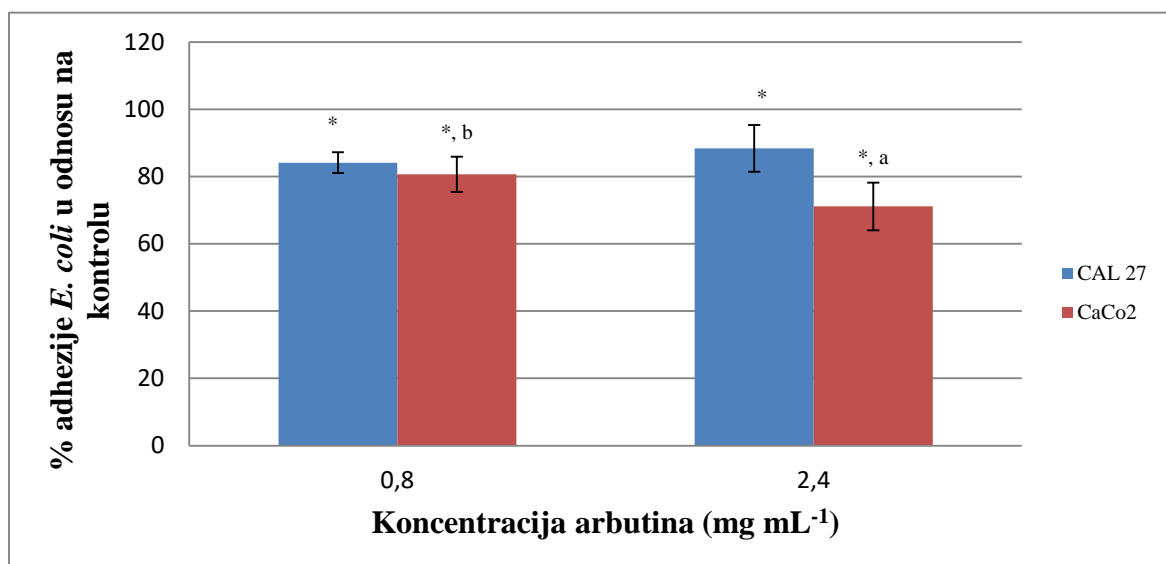
Khanal i sur. (2011) su ispitali utjecaj arbutina na razinu ROS-a na humanim tumorskim stanicama jetre. Stanice su tretirali 20 h s arbutinom i nakon toga su stanice tretirane s H₂DCFDA 30 min te je izmjeren intenzitet fluorescencije. Istraživanje je pokazalo da koncentracije arbutina od 2 mM (0,54 mg mL⁻¹) i niže nisu utjecale na razine ROS-ova što je u skladu s našim istraživanjem u kojem je bio ispitan utjecaj koncentracija arbutina od 0,4 do 4mgmL⁻¹ i gdje najniža koncentracija 0,4 mg mL⁻¹ prilikom najdužeg vremena tretmana 2 h nije utjecala na razinu ROS-ova u odnosu na kontrolu.

4.4. UTJECAJ ARBUTINA NA ADHEZIJU BAKTERIJSKIH STANICA NA TUMORSKE EPITELNE STANICE JEZIKA (CAL 27) I CRIJEVA (Caco-2)

Utjecaj arbutina na adheziju *L.plantarum* i *E.coli* na CAL 27 i Caco-2 stanice se ispitivao na način da se promatrala razlika između vezanja bakterijskih kultura *L.plantarum* i *E.coli* na netretirane stanične linije i one arbutinom tretirane stanične linije. Tretiranje CAL 27 stanica arbutinom koncentracija 0,8 mg mL⁻¹ i 2,4 mg mL⁻¹ traje 15 min, a Caco-2 stanica, istim tim koncentracijama, 2 h. Ovi vremenski periodi tretmana i ove koncentracije arbutina su odabrane zbog realnih uvjeta izloženosti ispitivanih staničnih linija vodenom ekstraktu medvjete (čaj) prilikom konzumacije.

4.4.1. Utjecaj arbutina na adheziju *E. coli* na tumorske epitelne stanice jezika (CAL 27) i crijeva (Caco-2)

Ispitivanje utjecaja arbutina na adheziju bakterije *E.coli* na CAL 27 i Caco-2 stanice je pokazalo da arbutin statistički značajno smanjuje sposobnost adhezije. Obje koncentracije arbutina, 0,8 mg mL⁻¹ i 2,4 mg mL⁻¹ podjednako smanjuju % adhezije *E.coli* na CAL 27 stanice dok koncentracija arbutina 2,4 mg mL⁻¹ ima veći utjecaj na smanjenje % adhezije *E.coli* na Caco-2 stanice od koncentracije 0,8 mg mL⁻¹. Rezultati su prikazani grafički na slici 11.



Slika 11. Grafički prikaz utjecaja arbutina na adheziju *E. coli* na tumorske epitelne stanice jezika (CAL 27) i crijeva (Caco-2)

*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

a-statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju arbutina 0,8 mg mL⁻¹

b-statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju arbutina 2,4 mg mL⁻¹

U preliminarnom istraživanju (rezultati nisu prikazani) utjecaja vodenog ekstrakta medvjete na potencijal adhezije *E. coli* na CAL 27 stanične linije dobiveni su rezultati da ekstrakt u većoj koncentraciji (3x) u odnosu na 1x više smanjuje % adhezije bakterije. S time da je 3x koncentracija ekstrakta smanjila % adhezije na 50%, a sam arbutin na 80%. Ovim rezultatima je dokazano da arbutin kao jedna od biološki aktivnih komponenti čaja djelomično utječe na promjenu sposobnosti vezanja *E. coli* na CAL 27 stanice s obzirom da je tretman arbutinom smanjio % adhezije *E. coli* za CAL 27 stanice na 80%. S druge strane, ekstrakt medvjete u koncentraciji 1x nije imao utjecaj na sposobnost vezanja *E. coli* za Caco-2 staničnu liniju dok je 3x koncentracija smanjila % adhezije na 60%. Taj trend jačeg inhibitornog djelovanja veće koncentracije ekstrakta na sposobnost vezanja prisutan je i u tretmanu s arbutinom čime je opet potvrđeno da arbutin djelomično utječe na sposobnost vezanja *E. coli* i za Caco-2 stanice.

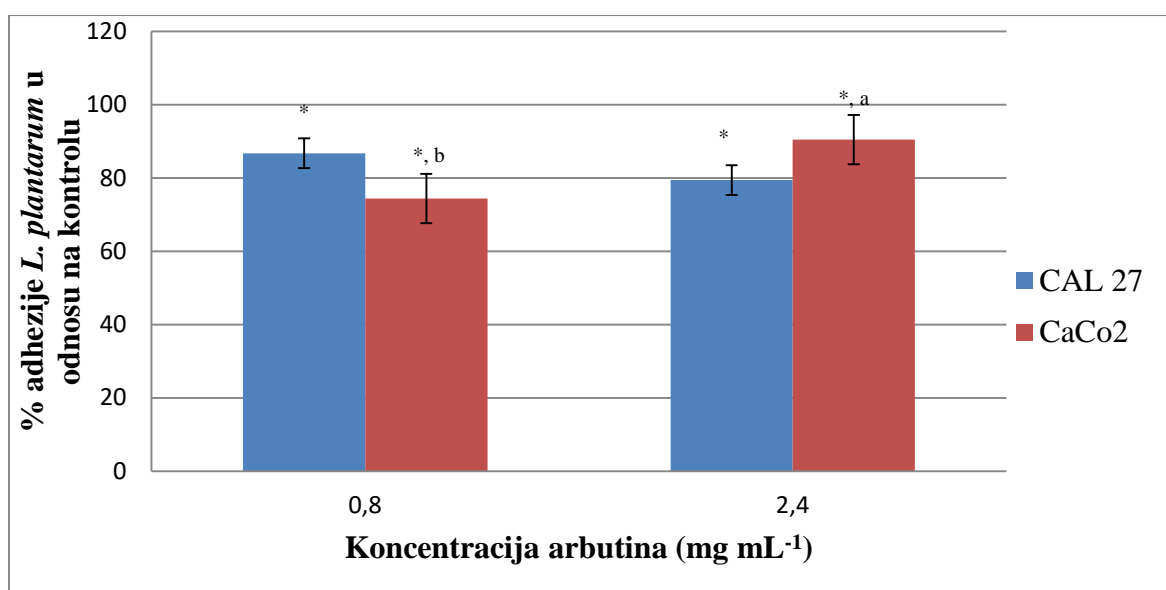
Utjecaj vodenog ekstrakta lišća medvjete kao i utjecaj arbutina kao biološki aktivnog spoja medvjete na inhibiciju postotka adhezije *E. coli* na humane stanice do danas nije istražen. Do danas je nekolicina znanstvenika povezala djelomični antibakterijski učinak vodenog ekstrakta lišća medvjete na *E. coli* zbog njegove sposobnosti da poveća hidrofobnost površine mikrobnih stanica i posljedično smanji njihovu sposobnost adhezije na stanice domaćina (Geetha i sur. (2011), Türi i sur. (1997), Annuk i sur (1999)).

Türi i sur. (1997) su proučavali kako ekstrakti, među kojima i vodeni ekstrakt medvjete, utječu na promjenu površinske hidrofobnosti bakterija u *in vitro* sustavu SAT (engl. *Salt aggregation test*) testom. SAT test je napravljen sa 155 sojeva *E. coli*. Pokazalo se da dekokt lišća medvjete (10 g / 100 mL vode) nakon tretmana sa *E. coli* 15 min znatno poboljšava hidrofobnost i njezina agregacijska svojstva. Annuk i sur. (1999) su koristeći isti test i isti dekokt lišća medvjete kao i Türi i sur., potvrdili antibakterijsko djelovanje dekokta lišća medvjete povećanjem hidrofobnosti i povećanjem agregacijskog svojstva Gram-negativne patogene bakterije *Helicobacter pylori*.

Istraživanje koje su proveli Dykes i sur. (2003) je pokazalo i da etanolni ekstrakt lišća medvjete (5 mg mL⁻¹) nakon inkubacije 1 h statistički značajno povećava hidrofobnost različitih bakterijskih kultura. Hidrofobnost *E. coli* je povećana za 20,35% , a hidrofobnost patogenog soja *E. coli* O157:H7 za 55,09%. Točan mehanizam smanjenja postotka adhezije *E. coli* za humane stanice prilikom tretmana sa ekstraktom medvjete nije razjašnjen, ali iz ovog rada se može zaključiti da je arbutin sigurno jedan od faktora koji sudjeluje u tom mehanizmu.

4.4.2. Utjecaj arbutina na adheziju *L. plantarum* na tumorske epitelne stanice jezika (CAL 27) i crijeva (Caco-2)

Arbutin statistički značajno smanjuje adhezijski potencijal probiotičke bakterije *L. plantarum* prilikom tretmana s obje ispitivane koncentracije ($0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ i $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$). U slučaju CAL 27 stanica koncentracija arbutina $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ima veći utjecaj na smanjenje % adhezije od koncentracije $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$. Suprotno tome, u slučaju Caco-2 stanične linije, manja koncentracija arbutina ($0,8 \text{ mg mL}^{-1}$) je smanjila % adhezije *L. plantarum* na oko 70% dok je veća imala manji utjecaj te je % adhezije ostao na iznad 80% iako je ono statistički značajno manje od kontrole. Rezultati su prikazani grafički na slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz utjecaja arbutina na adheziju *L. plantarum* na tumorske epitelne stanice jezika (CAL 27) i crijeva (Caco-2)

*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

a-statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju arbutina $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$

b-statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju arbutina $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$

U preliminarnom istraživanju (rezultati nisu prikazani) utjecaja vodenog ekstrakta medvjete na potencijal adhezije *L. plantarum* na CAL 27 stanične linije ekstrakt medvjete u koncentraciji 1x smanjio je % adhezije probiotičke bakterije *L. plantarum* na 40%, a u koncentraciji 3x na 60%. Ovi rezultati su u skladu s trendom utjecaja arbutina na sposobnost vezanja *L. plantarum* gdje također obje koncentracije ($0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ i $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$) imaju inhibitorno djelovanje na adheziju za CAL 27 staničnu liniju te % adhezije iznosi oko 80%. Iz usporedbe rezultata djelovanja vodenog ekstrakta medvjete i čiste otopine arbutina kao biološki aktivne komponente iz čaja, može se zaključiti da arbutin djelomično utječe na

smanjenje sposobnosti vezanja *L. plantarum* na CAL 27 staničnu liniju, ali ne u tolikoj mjeri kao sam ekstrakt. U ekstraktu se vjerojatno nalaze i drugi spojevi koji sinergistički zajedno s arbutinom pridonose jačem inhibitornom djelovanju na adheziju.

Utjecaj vodenog ekstrakta lišća medvjette kao i utjecaj arbutina kao biološki aktivnog spoja medvjette na inhibiciju postotka adhezije *L. plantarum* na humane stanice do danas nije istražen. Dykes i sur. (2003) su ispitali utjecaj etanolnog ekstrakta lišća medvjette na površinsku hidrofobnost 25 bakterija prisutnih u hrani koristeći BATH (engl. *Bacterial adherence to hydrocarbons*) test. Inkubacija 5 mg mL⁻¹ ekstrakta sa svakom od 25 ispitivanih bakterija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Prisutnost ekstrakta je uzrokovala značajno povećanje u hidrofobnosti 14, smanjenje u hidrofobnosti 4 bakterije i bez učinka u hidrofobnosti sedam, od 25 ispitivanih bakterija. Nije postojala nikakva jasna poveznica što se tiče razlike u hidrofobnosti nakon tretmana sa etanolnim ekstraktom između Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija ili patogenih i nepatogenih bakterija. Što se tiče smanjenja hidrofobnosti bakterija najmanji značajan pad je bio za 6,59% za *L. brevis* i najveći pad za 42,68% za *S. aureus*. Hidrofobnost *L. plantarum* je smanjena za 4,52%. Iz njihovih rezultata se vidi da se hidrofobnost *L. plantarum* nije povećala, nego dapače smanjila što bi značilo da postoji još neki drugi mehanizam osim povećanja hidrofobnosti bakterije i posljedičnog smanjenja adhezije koji utječe na adheziju *L. plantarum* na humane stanice nakon izlaganja ekstraktu medvjette. Budući da je arbutin u ovom radu pokazao smanjeni postotak adhezije sigurno igra veliku ulogu u tom mehanizmu.

U konačnici gledano s obzirom na rezultate antibakterijskog djelovanja arbutina, može se zaključiti da arbutinima slab citotoksični učinak na probiotičku bakteriju *L. plantarum*, a neznatan citotoksični učinak na *E. coli*.

Arbutin nije citotoksičan za humane ljudske stanice, CAL 27, Caco-2 i Hep G2. Djeluje blago proliferativno na CAL 27 stanice u koncentraciji 0,4 mg mL⁻¹, 0,8 mg mL⁻¹ i 2,4 mg mL⁻¹ tokom 15 min i 1 h, a tokom istih vremena tretmana u koncentraciji 0,8 mg mL⁻¹ i 2,4 mg mL⁻¹ pokazuje proliferativni učinak i na Hep G2 stanice. Na Caco-2 stanicama nije primjećen proliferativni učinak arbutina.

Što se tiče antioksidativnog/prooksidativnog učinka arbutina može se reći da je specifičan i da se razlikuje ovisno o humanoj staničnoj liniji. Tako je antioksidacijski učinak arbutina na CAL 27 primjećen jedino tokom najkraćeg vremena tretmana (15 min) gdje se povećavao linearno s povećanjem koncentracije arbutina od 0,8-4 mg mL⁻¹. Kod tretmana

CAL 27 arbutinom 1h i 2 h primjećen je prooksidativni učinak gdje su kod tretmana 1 h manje koncentracije djelovale prooksidativno, a veće koncentracije su prooksidativni učinak izazvale nakon 2 h tretmana. Ovaj prooksidativni učinak arbutina se može zanemariti budući da se arbutin u *in vivo* sustavu u ustima zadržava kratko. Za razliku od CAL 27 stanica, antioksidacijski učinak arbutina na Caco-2 stanice je primjećen u cijelom ispitivanom rangu koncentracija arbutina i u svim vremenima tretmana. Ono što je sličnost je da se antioksidacijski učinak kod tretmana 15 min povećavao linearno s povećanjem koncentracije arbutina. Antioksidacijski učinak arbutina nije primjećen na Hep G2 stanicama, ali je zato prooksidativni učinak arbutina primjećen tokom svih vremena tretmana gdje su kod tretmana 15 min manje koncentracije djelovale prooksidativno, kod 1 h sve koncentracije, a kod 2 h su veće koncentracije djelovale prooksidativno.

Arbutin statistički značajno smanjuje adhezijski potencijal probiotičke bakterije *L. plantarum* i bakterije *E. coli* na CAL 27 i Caco-2 stanice prilikom tretmana s obje ispitivane koncentracije ($0,8\text{mg mL}^{-1}$ i $2,4\text{ mg mL}^{-1}$) što ukazuje da arbutin može utjecati na promjenu ravnoteže mikroflore koja je iznimno značajna za normalno funkcioniranje organizma. Točan mehanizam smanjenja postotka adhezije *E. coli* i *L. plantarum* za humane stanice prilikom tretmana sa ekstraktom medvjette nije razjašnjen.

5. ZAKLJUČCI

1. Arbutin ima slab citotoksični učinak na potencijalno probiotičku bakteriju *L. plantarum*, a neznan citotoksični učinak na *E. coli*.
2. Arbutin nije citotoksičan za humane ljudske stanice, CAL 27, Caco-2 i Hep G2. Djeluje blago proliferativno na CAL 27 stanice i Hep G2 stanice u koncentracijama manjim od 4 mg mL⁻¹, a proliferativni učinak na Caco-2 stanicama nije primjećen.
3. Antioksidacijski potencijal arbutina na Cal 27 stanicama se ispoljava nakon tretmana arbutinom 15 min, dok se nakon tretmana 1 h i 2 h ispoljava prooksidativni učinak koji se može zanemariti budući da se arbutin u *in vivo* sustavu u ustima zadržava kratko.
4. Antioksidacijski potencijal arbutina na Caco-2 stanicama je primjećen u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija i u svim vremenima tretmana.
5. Antioksidacijski učinak arbutina nije primjećen na Hep G2 stanicama, ali je zato prooksidativni učinak arbutina primjećen tokom svih vremena tretmana.
6. Arbutin statistički značajno smanjuje adhezijski potencijal bakterije *L. plantarum* i bakterije *E. coli* na CAL 27 i Caco-2 stanice prilikom tretmana s obje ispitivane koncentracije (0,8 mg mL⁻¹ i 2,4 mg mL⁻¹).
7. Arbutin iz ekstrakta medvjette ukoliko se ne koristi prema uputama proizvođača u tretiranju infekcija mokraćnog sustava može dovesti do poremećaja mikroflore ljudskog organizma.

6. LITERATURA

- Afri, M., Frimer, A.A., Cohen, Y. (2004) Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer Part IV: Locating 2,7-dichlorofluorescein (DCF), 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids.* **131**, 123–133.
- Afshar, K., Fleischmann, N., Schmiemann, G., Bleidorn, J., Hummers-Pradier, E., Friede, T., Wegscheider, K., Moore, M., Gágyor, I. (2018) Reducing antibiotic use for uncomplicated urinary tract infection in general practice by treatment with uva-ursi (REGATTA) – a double-blind, randomized, controlled comparative effectiveness trial. *Adv. Exp. Med. Biol.* **18**, 203.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B. (2013) Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines by phenolic compounds from a bearberry-leaf crude extract and its fractions. *J. Funct. Food.* **5**, 660-667.
- Andrašević, S., Vranić-Ladavac, M., Pristaš, I., Škerk, V. (2009) Uzročnici infekcija mokraćnog sustava i njihova osjetljivost na antibiotike. *Croat. J. Infect.* **29**, 165-170.
- Annik, H., Hirno, S., Türi, E., Mikelsaar, M., Arak, E., Wadström, T. (1999). Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**, 41–45.
- Berg, R.D. (1997) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**, 430-435.
- 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**, 1940-1974.
- Borenfreund, E., Babich, H., Alguacil, N.M. (1987) Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – the Neutral red (NR) and Tetrazolium MTT tests. *Toxic. In Vitro.* **2**, 1-6.

Busetto, G.M., Giovannone, R., Ferro, M., Tricarico, S., Del Giudice, F., Matei, D.V., Cobelli, O., Gentile, V., De Berardinis, E. (2014) Chronic bacterial prostatitis: efficacy of short-lasting antibiotic therapy with prulifloxacin (Unidrox®) in association with saw palmetto extract, Lactobacillus sporogens and arbutin (Lactorepens®). *BMC Urol.*, **14**,53.

Carpenter, R., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Kerry, J. P. i O'Brien, N. M. (2006). Modulatory Effects of Resveratrol, Citroflavan-3-ol, and Plant-Derived Extracts on Oxidative Stress in U937 Cells. *J. Med. Food.* **9**, 187–195.

De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.***16**, 1018–1028.

Dykes, G. A., Amarowicy, R., Pegg, E. B. (2003b) An antioxidant bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) extract modulates surface hydrophobicity of a wide range of food-related bacteria: implications for functional food safety. *Food control.***14**, 515-518.

ECHA (2018) In vitro metode. ECHA - European Chemicals Agency, <<https://echa.europa.eu/hr/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods>>. Pristupljeno 04. lipnja 2019.

Edwards, S.E., da Costa Rocha, I., Williamsin, E.M., Heinrich, M. (2015) Phytopharmacy: An evidence-based guide to herbal medicinal product, 1.izd., John Wiley & Sons, London.

EMA (2017) Assesmentreport on *Arctostaphylosuva-ursi* (L.) Spreng., folium. EMA-European Medicine Agency, London, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-arctostaphylos-uva-ursi-l-spreng-folium_en.pdf >. Pristupljeno 20. svibnja.2019.

Fotadar, U., Zaveloff, P., Terracio, L. (2004) Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *J.BasicMicrobiol.* **45**, 403-404.

Garcia de Arriba, S., Naser, B., Nolte, K.U. (2013) Risk assessment of free hydroquinone derived from *ArctostaphylosUva-ursi folium* herbal preparations. *Int. J. Toxicol.* **32**, 442-453.

Geetha, R.V., Roy, A., Lakshmi, T. (2011) Nature's Weapon against Urinary Tract Infections. *Int. J. Drug Dev. & Res.* **3**, 85-100.

Houghton, P.J., Hawes, M.J., Lee, C.C., Steventon, G. (2007) Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualising an elephant. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 391-400.

Jenkins, C., Rentenaar, R.J., Ladraud, L., Brisse, S. (2017) Enterobacteriaceae. U: Infectious Diseases, 4. izd. (online) (Cohen, J., ured.), USA, str. 1565-1578, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00180-5>.

Jeong, H.G., Kang, M.J., Kim, H.G., Oh, D.G., Kim, J.S., Lee, S.K., Jeong, T.C. (2013) Role of intestinal microflora in xenobiotic-induced toxicity. *Mol. Nutr. Food. Res.* **57**, 84-99.

Jurica, K., Gobin, I., Kremer, D., Čepo, D.V., Jurišić Grubešić, R., Brčić Karačonji, I., Kosalec, I. (2017) Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J. Herb. Med.* <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.hermed.2017.03.006>

Kajiwara, R., Seto, A., Kofujita, H., Shiba, Y., Oishi, Y., Shibasaki, Y. (2019) Enhanced antimicrobial activities of polymerized arbutin and its derivatives prepared by oxidative polymerization of arbutin. *React. Funct. Polym.* **138**, 39-45.

Kang, M. Y., Ha, H. W., Kim, H. G., Lee, D. H., Kong, M. J., Ahn, Y. T., Kim, D. H., Shin, B. S., Kang, W., Jeong, H. G., Jeong, T. C. (2011) Role of metabolism by intestinal bacteria in arbutin-induced toxicity *in vitro*. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 687-693.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123-140.

Li-Hua, W., Peng, L., Qing-Li, Z., Jin-Lan, P., Yu-Fei, J., Kadowaki, M., Kondo, T. (2014) Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis.* **19**, 1654-1663.

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

Pastuović, T., Bogdanić, Lj., Vuković, V., Samardžić, S. (2008) Infekcije mokraćnog sustava uzrokovane *Escherichia coli* i njihova rezistencija na antibiotike u Osječko-baranjskoj županiji. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. **4**, 15.

Pečivova, J., Nosal, R., Svitekova, K., Mačičkova, T. (2014) Arbutin and decrease of potentially toxic substances generated in human blood neutrophils. *Interdiscipl. Toxicol.* **7**, 195-200.

Ronald, A. (2002) The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *Am. J. Med.* **113**, 14-19.

SCCS, Degen, G.H. (2015) Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) - Opinion on the safety of the use of L-ascorbic acid in cosmetic products. *Regul. Toxicol. Pharm.* **73**, 866-867.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L. i Heber, D. (2004). Total Cranberry Extract versus Its Phytochemical Constituents: Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor Cell Lines. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 2512–2517.

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

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 Res.* **4**, 473-478.

Timbrell, J. (2002) Introduction to Toxicology, 3. Izd., Taylor & Francis, London.

Türi, M., Türi, E., Kõljalg, S., Mikelsaar, M. (1997) Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. *APMIS*. **105**, 956-962.

Vučić, D. M., Petković, M. R., Rodić-Grabovac B. B., Vasić, S. M., Čomić, Lj. R. (2013) *In vitro* efficacy of extracts of *Arctostaphylos uva-ursi* L. on clinical isolated *Escherchia coli* and *Enterococcus faecalis* strains. *Kragujevac J. Sci.* **35**, 107-113.

Xu,W.H., Liang, Q., Zhang, Y.J., Zhao,P. (2015) Naturally Occurring Arbutin Derivatives and Their Bioactivities. *Chem.Biodiversity.* **12**, 54-81.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni

Potpis studenta
