

# Fenolni profil i in vitro učinci meda obične planike (Arbutus unedo L.) na tumorske stanice i limfocite

---

Jurič, Andreja

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:159:148918>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-05**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Andreja Jurič

**FENOLNI PROFIL I *in vitro* UČINCI  
MEDA OBIČNE PLANIKE  
(*Arbutus unedo* L.) NA TUMORSKE  
STANICE I LIMFOCITE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Andreja Jurič

**FENOLNI PROFIL I *in vitro* UČINCI  
MEDA OBIČNE PLANIKE  
(*Arbutus unedo* L.) NA TUMORSKE  
STANICE I LIMFOCITE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

doc. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, v. znan. sur.

prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Andreja Jurič

**PHENOLIC PROFILE AND *in vitro*  
EFFECTS OF STRAWBERRY TREE  
HONEY (*Arbutus unedo* L.) ON TUMOUR  
CELLS AND LYMPHOCYTES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Irena Brčić Karačonji, PhD, Senior Scientific Associate  
Ksenija Durgo, PhD, Full Professor

Zagreb, 2021

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo,  
prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 582.688.3:616-006:616-092.4:638.16(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### FENOLNI PROFIL I *in vitro* UČINCI MEDA OBIČNE PLANIKE (*Arbutus unedo* L.) NA TUMORSKE STANICE I LIMFOCITE

Andreja Jurič, mag. ing. bioproc.

**Rad je izrađen** u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

**Mentori:** doc. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, v. znan. sur. i prof. dr. sc. Ksenija Durgo

**Sažetak:** U ovom su radu istraženi fenolni profil i biološki učinci meda obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njegove glavne bioaktivne komponente homogentizinske kiseline (HGA). Ukupni biološko aktivni spojevi (fenoli i flavonoidi) i antioksidacijski potencijal meda određeni su spektrofotometrijski, a pojedinačni spregom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa visokog razlučivanja (UHPLC-HRMS). Ispitani su *in vitro* biološki učinci (antioksidacijski, geno-/citotoksični i geno-/citoprotektivni) meda i HGA na humanim staničnim modelima karcinoma pločastih stanica jezika (Cal27), hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) i limfocitima. Rezultati su ukazali na visok udio fenolnih spojeva i snažan antioksidacijski kapacitet meda obične planike. Detektirano je 56 fenolnih spojeva, što upućuje na složeni sastav meda. Primjenom mikronukeus testa i analizom kromosomskih aberacija utvrđena je visoka biokompatibilnost HGA, meda i njegova ekstrakta s limfocitima iz ljudske periferne krvi te njihov zaštitni učinak na razini citogenetičkih oštećenja izazvanih irinotekanom. Testirani spojevi pokazali su nisku citotoksičnost prema svim ispitivanim staničnim linijama. Stoga, med obične planike predstavlja značajan fitoterapeutik zbog visokog cito/genoprotektivnog i niskog citotoksičnog učinka.

**Broj stranica:** 172

**Broj slika:** 39

**Broj tablica:** 20

**Broj literaturnih navoda:** 265

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** med obične planike, homogentizinska kiselina, fenolni profil, antioksidacijska aktivnost, citotoksičnost, stanična linija, antimutagenost

**Datum obrane:** 21. listopada 2021.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr. sc. Draženka Komes, red. prof.
2. dr. sc. Nevenka Kopjar, znan. savj. u tr. zv.
3. dr. sc. Anamarija Štafa, doc.

**Rad je pohranjen** u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14 i u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Ksaverska cesta 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 582.688.3:616-006:616-092.4:638.16(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### PHENOLIC PROFILE AND *in vitro* EFFECTS OF STRAWBERRY TREE HONEY (*Arbutus unedo* L.) ON TUMOUR CELLS AND LYMPHOCYTES

Andreja Jurič, M. Eng. Bioproc.

**Thesis performed** at the Institute for Medical Research and Occupational Health and the Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb

**Supervisors:** Asst Prof Irena Brčić Karačonji, PhD, Senior Scientific Associate and Prof Ksenija Durgo, PhD.

**Abstract:** This study investigated the phenolic profile and biological effects of strawberry tree honey (*Arbutus unedo* L.), as well as its main bioactive components homogentisic acid (HGA). Total content of bioactive compounds (phenols and flavonoids) and antioxidant potential of honey were determined using spectrophotometry, and individual phenolics using ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The *in vitro* biological effects (antioxidant, geno- / cytotoxic and geno- / cytoprotective) of honey and HGA were investigated on human cell models of tongue squamous cell carcinoma (Cal27), hepatocellular carcinoma of the liver (HepG2), epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) and lymphocytes. The results showed a high content of phenolics and a strong antioxidant capacity of strawberry tree honey. A total of 56 phenolic compounds were detected, indicating the honey's complex composition. Using the micronucleus test and analysis of chromosomal aberrations, high biocompatibility of HGA, honey and its extract with lymphocytes from human peripheral blood and their protective effect on the level of cytogenetic damage caused by irinotecan were determined. The tested compounds showed low cytotoxicity to all of the cell lines tested. Therefore, strawberry tree honey is an important phytotherapeutic due to its high cyto-/ genoprotective as well as low cytotoxic effect.

**Number of pages:** 172

**Number of figures:** 39

**Number of tables:** 20

**Number of references:** 265

**Original in:** Croatian

**Key words:** strawberry tree honey, homogentisic acid, phenolic profile, antioxidant activity, cytotoxicity, cell line, antimutagenicity

**Date of the thesis defense:** 21 October 2021

**Reviewers:**

1. Draženka Komes, PhD, Full Professor
2. Nevenka Kopjar, PhD, Permanent Scientific Advisor
3. Anamarija Štafa, PhD, Assistant Professor

**Thesis deposited** in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14, and the library of the Institute of Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, Zagreb.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Fenolni profil i *in vitro* učinci meda obične planike (*Arbutus unedo* L.) na tumorske stanice i limfocite“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanjem mentora na sjednici održanoj 28. listopada 2020., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktora znanosti na sjednici održanoj 15. prosinca 2020.

Zahvaljujem,

mentorici, doc. dr. sc. Ireni Brčić Karačonji na ukazanom povjerenju koje mi je nesebično poklonila, na znanju koje svakodnevno prenosi, na iskustvu koje dijeli, na entuzijazmu koji pokazuje prema znanosti, na savjetima koje ću nositi kroz život. Mentorice, užitek je i zadovoljstvo surađivati svaki dan s prijateljskim licem koje je prije svega izvrstan čovjek. Hvala

mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Durgo na uvijek otvorenim vratima Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama, na pomoći i savjetima oko izrade ovog doktorskog rada, na pruženoj prijateljskoj ruci i riječima podrške, na uvođenju u „svijet stanica“. Mentorice, čast mi je surađivati s Vama. Hvala

dr. sc. Nevenki Kopjar na ogromnoj nesebičnoj pomoći oko izrade ovog doktorskog rada, na podijeljenom bogatom znanstvenom i stručnom iskustvu, na strpljenju i silnom trudu koje je uložila vjerujući u mene. Nemjerljivo hvala na svemu

umirovljenoj profesorici dr. sc. Jasni Vorkapić-Furač, na pomoći oko nomenklature fenolnih spojeva u ovom doktorskome radu (zbog kojih se „diže kosa na glavi“), na zaraznoj životnoj energiji, na uvijek nasmijanom, prijateljskom licu koje nikad ne zaboravlja svoje studente. Profesorice, veliko hvala na uvođenju u znanost, na svemu što je bilo i na svemu što tek dolazi

djelatnicima Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, kolegicama i kolegama, a prije svega prijateljima koji su me podržali i bili tu. Uz vas je rad u laboratoriju vedriji i lakši. Teti Vesni na svemu što čini, na majčinskim savjetima, na bezuvjetnoj podršci koju mi pruža

djelatnicima Jedinice za mutagenezu koji su me, otvorenih ruku, primili u svoj laboratorij, naučili me novim tehnikama i pomogli mi oko izrade ovog doktorskog rada

dobrovoljnim darivateljima krvi bez kojih bi bilo nemoguće provesti pokuse  
prof. dr. sc. Draganu Bubalu na peludnim analizama meda obične planike  
prof. dr. sc. Nadi Vahčić na primitku u Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji. Renati Petrović, dipl. ing. na velikoj pomoći oko kemijske analize meda  
izv. prof. dr. sc. Draženu Lušiću na poklonjenim uzorcima meda obične planike  
prof. dr. sc. Dušanki Milojković Opsenica i dr. sc. Urošu Gašiću na pomoći oko analiza fenolnog profila meda obične planike  
Ani Huđek Turković, mag. ing. biotechn. na prijateljskoj pomoći i savjetima

arhivskim analitičarima čiji sam „podstanar“ na svim danima ispunjenim srećom i radosti

susjedima Dušanki i Dani koji bi sigurno bili ponosni prijateljima na brojnim savjetima i podršci

mami Milki, tati Vinku i sestri Ani na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju, strpljenju i vjeri u moj uspjeh. Ovo je vaša zasluga.

U Zagrebu 5. 7. 2021.

Andreja



*Čovječe pazi  
da ne ideš malen  
ispod zvijezda!*

*Pusti  
da cijelog tebe prođe  
blaga svjetlost zvijezda!*

*Da ni za čim ne žališ  
kad se budeš zadnjim pogledima  
rastajao od zvijezda!*

*Na svom koncu  
mjesto u prah  
prijeđi sav u zvijezde.*

*(A.B. Šimić, Opomena)*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Obična planika (<i>Arbutus unedo</i> L.)</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Med</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3. Kemijski sastav meda</b> .....	<b>5</b>
2.3.1. Ugljikohidrati .....	5
2.3.2. Proteini .....	6
2.3.3. Minerali.....	6
2.3.4. Organske kiseline.....	7
2.3.5. Enzimi .....	7
<b>2.4. Med obične planike (<i>Arbutus unedo</i> L.)</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5. Fenolni spojevi</b> .....	<b>10</b>
2.5.1. Flavonoidi.....	10
2.5.2. Fenolne kiseline .....	14
2.5.3. Apsorpcija i metabolizam fenolnih spojeva.....	15
<b>2.6. Botaničko i geografsko podrijetlo meda</b> .....	<b>16</b>
<b>2.7. Biološki učinci meda obične planike</b> .....	<b>18</b>
<b>2.8. Antioksidacijski potencijal meda</b> .....	<b>19</b>
<b>2.9. Prooksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva</b> .....	<b>22</b>
<b>2.10. <i>In vitro</i> učinci na humane tumorske stanične linije</b> .....	<b>22</b>
<b>2.11. Kancerogeneza i kemoterapija</b> .....	<b>25</b>
<b>2.12. Analitičke tehnike za istraživanje fenolnog sastava meda</b> .....	<b>27</b>
2.12.1. Uzorkovanje i predanalitički postupci .....	27
2.12.2. Ekstrakcija i analiza fenolnih spojeva u medu .....	28
<b>2.13. Metode za određivanje udjela ukupnih fenola, flavonola, flavona i flavonoida</b> .....	<b>32</b>
2.13.1. Određivanje udjela ukupnih fenola .....	32
2.13.2. Određivanje udjela flavonola i flavona.....	32
2.13.3. Određivanje udjela flavanona [metoda DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin)]	33
<b>2.14. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta</b> .....	<b>34</b>
2.14.1. Metoda DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal).....	35
2.14.2. Metoda FRAP (eng. <i>Ferring Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	36
<b>2.15. Metode za procjenu citogenetičkih učinaka</b> .....	<b>37</b>
2.15.1. Kromosomske aberacije.....	37

2.15.2. Citohalazinom B-blokirani mikronukleus-test (CBMN-test).....	39
<b>2.16. Određivanje citotoksičnih učinaka testom <i>Neutral red</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>2.17. Određivanje prooksidacijskog učinka testom DCFH-DA .....</b>	<b>41</b>
<b>2.18. Antioksidacijski učinak meda obične planike, njegova ekstrakta i homogentizinske kiseline (HGA) na DNA plazmid phiX174 RF1 .....</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Uzorci .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2. Stanične linije .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3. Kemikalije i uređaji .....</b>	<b>45</b>
3.3.1. Popis kemikalija .....	45
3.3.2. Popis opreme .....	52
<b>3.4. Metode .....</b>	<b>55</b>
3.4.1. Melisopalinološka analiza.....	55
3.4.2. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara meda.....	55
3.4.2.1. <i>Određivanje masenog udjela vode u medu .....</i>	<i>55</i>
3.4.2.2. <i>Određivanje kiselosti meda .....</i>	<i>55</i>
3.4.2.3. <i>Određivanje električne provodljivosti meda .....</i>	<i>56</i>
3.4.2.4. <i>Određivanje reducirajućih šećera .....</i>	<i>56</i>
3.4.3. Spektrofotometrijske metode.....	58
3.4.3.1. <i>Određivanje ukupnih fenola .....</i>	<i>58</i>
3.4.3.2. <i>Određivanje flavonola i flavona .....</i>	<i>58</i>
3.4.3.3. <i>Određivanje flavanona .....</i>	<i>58</i>
3.4.3.4. <i>Metoda DPPH• .....</i>	<i>59</i>
3.4.3.5. <i>Metoda FRAP .....</i>	<i>59</i>
3.4.4. Određivanje fenolnog profila meda UHPLC-LTQ Orbitrap MS-om.....	59
3.4.4.1. <i>Priprava uzoraka meda za analizu .....</i>	<i>59</i>
3.4.4.2. <i>Identifikacija i kvantifikacija fenola.....</i>	<i>59</i>
3.4.5. Priprava fenolnog ekstrakta meda za istraživanje bioloških učinaka .....	60
3.4.5.1. <i>Ekstrakcija HGA iz meda .....</i>	<i>61</i>
3.4.5.2. <i>Identifikacija i kvantifikacija HGA.....</i>	<i>62</i>
3.4.6. Metode za procjenu citogenetičkih učinaka.....	62
3.4.6.1. <i>Uzorci periferne krvi .....</i>	<i>62</i>
3.4.6.2. <i>Plan pokusa .....</i>	<i>63</i>
3.4.6.3. <i>Kromosomske aberacije.....</i>	<i>64</i>
3.4.6.4. <i>Citohalazinom B-blokiran mikronukleus-test (CBMN-test) .....</i>	<i>66</i>

3.4.7.	<i>Učinci in vitro na humane tumorske stanične linije</i> .....	70
3.4.7.1.	<i>Stanične linije</i> .....	70
3.4.7.2.	<i>Nasađivanje i uzgoj stanica</i> .....	70
3.4.7.3.	<i>Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja</i> .....	70
3.4.7.4.	<i>Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra</i> .....	71
3.4.7.5.	<i>Doze i tretman stanica</i> .....	72
3.4.7.6.	<i>Test Neutral red</i> .....	72
3.4.7.7.	<i>Određivanje pro(anti)oksidacijskog učinka (metoda DCFH-DA)</i> ....	74
3.4.8.	<i>Antioksidacijski učinak meda obične planike, njegova ekstrakta i homogenizinske kiseline (HGA) na DNA plazmid phiX174 RF1</i> .....	75
3.4.9.	<i>Statistička obrada podataka</i> .....	76
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>77</b>
4.1.	<b>Odabir uzorka meda obične planike za istraživanja bioloških učinaka</b>	<b>77</b>
4.2.	<b>Pokazatelji kakvoće meda obične planike</b> .....	<b>78</b>
4.3.	<b>Fenolne komponente i antioksidacijski kapacitet meda obične planike</b> .....	<b>78</b>
4.4.	<b>Kromosomske aberacije</b> .....	<b>89</b>
4.5.	<b>Citohalazinom B-blokirani mikronukleus-test (CBMN-test) na ljudskim limfocitima</b> .....	<b>92</b>
4.6.	<b>Antigenotoksični učinci testiranih tvari</b> .....	<b>103</b>
4.7.	<b>Određivanje citotoksičnog učinka</b> .....	<b>110</b>
4.8.	<b>Pro(anti)oksidacijsko djelovanje</b> .....	<b>114</b>
4.9.	<b>Antioksidacijski učinak meda obične planike, ekstrakta i HGA na DNA plazmid phiX174 RF1</b> .....	<b>119</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>122</b>
5.1.	<b>Istraživanja fenolnih komponenti i antioksidacijske aktivnosti</b> .....	<b>122</b>
5.2.	<b>Istraživanja citogenetičkih učinaka meda obične planike, ekstrakta i HGA na humanim limfocitima periferne krvi u uvjetima in vitro</b> .....	<b>123</b>
5.3.	<b>Istraživanja bioloških učinaka meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA na staničnim linijama</b> .....	<b>134</b>
5.4.	<b>Antioksidacijski učinak meda obične planike, njegova ekstrakta i homogetizinske kiseline (HGA) na DNA plazmid phiX174 RF1</b> .....	<b>140</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>142</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS LITERATURE</b> .....	<b>143</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>169</b>

## **1. UVOD**

Budući da neprestano raste broj oboljelih od tumora, sve je veći broj istraživanja s ciljem pronalaženja prirodnih lijekova koji bi predstavljali alternativu klasičnom liječenju protutumorskim lijekovima uz manje nuspojave te veću učinkovitost i nižu cijenu terapije. Jedan od takvih prirodnih proizvoda je med čiji su blagotvorni učinci na ljudsko zdravlje poznati već stoljećima (Bogdanov i sur., 2008). Pozitivni učinci se velikim dijelom pripisuju fenolnim spojevima, sekundarnim metabolitima koje biljke sintetiziraju kao odgovor na stres u svakodnevnoj borbi za opstanak u nepovoljnim životnim i okolišnim uvjetima, poput manjka vode, hranjivih tvari i ekstremnih klimatskih uvjeta (Ajila i sur., 2011).

Istraživanja su pokazala da med mediteranske biljke obične planike (*Arbutus unedo* L.) ima izrazito visoki maseni udio fenolnih spojeva i snažan antioksidacijski kapacitet te zbog toga nekoliko puta veću sposobnost obrane organizma od štetnih slobodnih radikala u usporedbi s drugim vrstama meda (Tariba Lovaković i sur., 2018; Jurić i sur., 2020). Slobodni radikali su reaktivni spojevi koji se unose u organizam iz okoliša, a i produkt su normalnog metabolizma te mogu oštetiti biološki značajne makromolekule poput DNA, proteina, ugljikohidrata i lipida u jezgri i membranama stanica te igraju značajnu ulogu u nastanku tumora (Cianciosi i sur., 2018).

Medu obične planike pripisuju se vrlo snažna antioksidacijska, antibakterijska i protuupalna svojstva, a zbog specifičnog sastava moguće je da posjeduje i antimutagene te antiproliferacijske učinke koji imaju značajnu ulogu u prevenciji i liječenju tumora (Rosa i sur., 2011; Tuberoso i sur., 2013). Antioksidacijski učinak meda uglavnom se pripisuje fenolnim spojevima, među kojima je najzastupljenija homogentizinska kiselina (eng. *Homogentisic acid*, HGA). Sustavna istraživanja fenolnog profila meda obične planike nisu se dosad provodila. Podaci o vrsti i količini fenolnih spojeva u medu obične planike oskudni su i uglavnom se odnose na tekućinskokromatografsku ili plinskokromatografsku kvantifikaciju pojedinačnih markera botaničkog podrijetla. Kemijski sastav meda ovisi i o okolišnim čimbenicima u kojima raste biljka pa je od iznimne važnosti istražiti posebnosti fenolnog profila meda obične planike s hrvatskoga područja. Protutumorski učinak meda pripisuje se raznim mehanizmima: indukciji apoptoze, zaustavljanju staničnog ciklusa, modulaciji oksidacijskog stresa, ublažavanju upale, indukciji permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija i inhibiciji angiogeneze (Cianciosi i sur., 2018). Iako dosadašnja istraživanja upućuju na protutumorski učinak meda, mehanizmi djelovanja na staničnoj i molekularnoj razini slabo su istraženi. Objavljena istraživanja nisu

uključivala istraživanje zaštitne uloge meda na zdrave stanice nakon primjene protutumorskog lijeka, što je od izuzetne važnosti budući da citostatici često imaju toksični učinak ne samo na ciljne tumorske stanice, nego i na ostale stanice u organizmu.

Ciljevi istraživanja u ovom doktorskom rada su:

1. detaljno istražiti fenolni profil meda obične planike s hrvatskog područja spregom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa visokog razlučivanja (UHPLC-LTQ Orbitrap MS)
2. odrediti maseni udio ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijski kapacitet meda primjenom spektrofotometrijskih metoda te odrediti maseni udio HGA primjenom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS)
3. ispitati cito/genoprotektivni učinak meda i HGA na humane limfocite periferne krvi tretirane protutumorskim lijekom irinotekanom primjenom citohalazinom B-blokiranog mikronukleus-testa (CBMN-testa) i analize kromosomskih aberacija za otkrivanje citogenetičkih oštećenja
4. ispitati citotoksično i pro(anti)oksidacijsko djelovanje meda, ekstrakta i HGA na stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) i karcinoma pločastih stanica jezika (Cal27) primjenom testa preživljenja *Neutral red* i testa DCFH-DA

Očekuje se da rezultati istraživanja upotpune saznanja o fenolnim komponentama meda obične planike, selektivnoj toksičnosti ovog meda prema tumorskim stanicama te ulozi oksidacijskog stresa u mehanizmu toksičnosti.

## **2. OPĆI DIO**



## 2.1. Obična planika (*Arbutus unedo* L.)

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je samonikli, zimzeleni grm (slika 1) ili stablo (najčešće od 1,5 do 3 metra visine, najviše do 12 metara) koje raste na rubnim dijelovima šuma, po nepristupačnim predjelima i stjenovitim padinama sredozemnog područja. U Hrvatskoj je rasprostranjena od Istre do dubrovačkog primorja, a osobito na Lošinju, otocima oko Zadra i Dubrovnika te na Pelješcu (Jurica i Brčić Karačonji, 2019). Plod obične planike je maginja (slika 2) koja je jestiva, ali konzumiranje većih količina izaziva probavne smetnje i laganu opijenost. Ime ove biljke potječe od starorimske izreke „*unum tantum edo*“ što znači „jedem samo jednu“.

Obična planika predstavlja potencijalno značajan, a relativno slabo istražen izvor bioaktivnih spojeva koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Među bioaktivnim spojevima ove biljke su fenoli, vitamini i organske kiseline.



**Slika 1.** Obična planika (Nerezine, Mali Lošinj, Primorsko-goranska županija).

Vlastita fotografija.

Svi dijelovi obične planike (korijen, kora, list i plod) sadrže spojeve s antioksidacijskim, diuretskim i antimikrobnim svojstvima te se stoga ljekoviti pripravci ove biljke rabe u narodnoj medicini za liječenje gastrointestinalnih, kardiovaskularnih,

urinarnih i bubrežnih tegoba, kod hipertenzije, dijabetesa i raznih upalnih procesa u organizmu (Carcache-Blanco i sur., 2006; Oliveira i sur., 2011; Jurica, 2016).



**Slika 2.** Plod obične planike – maginja (Nerezine, Mali Lošinj, Primorsko-goranska županija). Vlastita fotografija.

## 2.2. Med

Med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (NN, 2015).

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja med se može podijeliti na:

- med u saću
- med sa saćem ili dijelovima saća
- cijedeni med: dobiva se cijedenjem iz saća, bez ikakve mehaničke obrade
- vrcani med: med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem)
- prešani med: dobiven prešanjem saća, pri umjerenoj temperaturi koja ne smije prijeći 45 °C ili bez zagrijavanja

- filtrirani med: med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi (NN, 2015).

Prema podrijetlu med se dijeli na cvjetni ili nektarni med (med dobiven od nektara biljaka) i medljikovac ili medun [med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka] (NN, 2015).

### 2.3. Kemijski sastav meda

U kemijskom smislu, med predstavlja zasićenu vodenu otopinu šećera koji čine više od 95 % suhe tvari meda, a najveći udio čine jednostavni šećeri glukoza i fruktoza.

Med sadrži 17 % vode, a ostatak su proteini, minerali, vitamini, organske kiseline, fenolni spojevi, hlapljive komponente, voskovi i druge fitokemikalije (slika 3). Neke od ovih supstancâ u med dopijevaju preko pčela, neke preko medonosne biljke, a neke nastaju tijekom zrenja meda u saću (Bogdanov i sur., 2008; Gašić, 2017).



**Slika 3.** Kemijski sastav meda (Gobin i sur., 2014).

#### 2.3.1. Ugljikohidrati

Fruktoza je dominantni šećer u gotovo svim vrstama meda i zajedno s glukozom čini oko 60 % suhe tvari meda. Veći maseni udio glukoze u odnosu na fruktozu pronađen je samo u medu uljane repice (*Brassica napus*), maslačka (*Taraxacum officinale*) i medu biljke *Trichostema lanceolatum* (Cavia i sur., 2002). Med u visokom

postotku sadrži jednostavne šećere pa se zato brzo apsorbira u organizmu. Udjeli raznih šećera u medu ovise o omjeru šećera u cvjetnom nektaru, ali i o količini enzima invertaze koji katalizira reakciju razgradnje saharoze na fruktozu i glukozu. Omjeri fruktoze i glukoze, maltoze i izomaltoze, saharoze i turanoze, kao i maltoze i turanoze mogu se koristiti kao markeri za procjenu mogućeg patvorenja meda glukoznim ili visokofruktoznim sirupom, a također i kao markeri za identifikaciju i klasifikaciju uniflornih vrsta meda (Gobin, 2014; Gašić, 2017).

### 2.3.2. Proteini

Udio proteina u medu iznosi 0,2 %. Proteini i aminokiseline mogu biti biljnog (iz polena koji je poprilično bogat proteinima) ili životinjskog podrijetla (iz žlijezda slinovnica pčela) (Nazarian i sur., 2010; Da Silva i sur., 2016). Iako je udio ukupnih proteina u medu nizak, u medu je nađeno 25 aminokiselina (proteinskih i neproteinskih) čiji udio varira ovisno o biljnoj vrsti (Janiszewska i sur., 2012).

Prosječan udio dušika u medu iznosi oko 0,04 %, dok je udio slobodnih aminokiselina oko 1 %. Glavni izvor aminokiselina u medu je polen (a najzastupljenija aminokiselina je prolin) i u medu ga mora biti više od 180 mg kg<sup>-1</sup>, a najmanje 66 % od ukupnih slobodnih aminokiselina (najčešće 80 – 90 % od svih aminokiselina). Većinom potječe od pčela i u med dopijeva prilikom prerade nektara u med, a njegov udio je predložen kao jedan od pokazatelja zrelosti meda. Udio prolina usko je povezan s udjelom šećera u medu, kao i s aktivnošću enzima glukoza-oksidaze (Flanjak i sur., 2016).

### 2.3.3. Minerali

Maseni udio elemenata u medu varira ovisno o vrsti meda (od 0,04 % u svjetlijim do 0,20 % u tamnijim vrstama meda), a uglavnom se radi o oksidima kalija, fosfora, kalcija i natrija koji potječu iz nektara, odnosno medljike i peludi (Bogdanov i sur., 2007; Da Silva i sur., 2016). Kalij je najzastupljeniji element u medu (jedna trećina od ukupnih minerala) s prosječnim udjelom oko 1500 mg kg<sup>-1</sup>. Med odražava mineralni sastav biljaka od kojih medonosne pčele sakupljaju hranu, a ovisi o vrsti tla na kojem biljka raste (Madejczyk i Baralkiewicz, 2008; Escuredo i sur., 2014).

Tariba Lovaković i suradnici (2018) analizirali su, osim meda obične planike, i druge vrste meda i medljikovca s obalnog hrvatskog područja: hrastov medljikovac,

medljikovac jele, med od mente, kadulje, vriska, kestena, suncokreta, bršljana, timijana, bagrema, uljane repice, amorge, limete i jeruzalemskog trna. Najzastupljeniji elementi pronađeni u svim uzorcima meda bili su kalcij, kalij, magnezij i natrij. Srednja koncentracija ovih elemenata u medu obične planike bila je viša od koncentracija u drugim uniflornim vrstama meda. Također, utvrđena je niža koncentracija selena u uzorcima meda obične planike u usporedbi s ostalim analiziranim vrstama.

#### 2.3.4. Organske kiseline

Prema literaturnim podacima med ima blagu kiselost jer sadrži u prosjeku 0,57 % organskih kiselina (Karabagias i sur., 2014; Da Silva i sur., 2016). Organske kiseline potječu izravno iz nektara ili nastaju od šećera prilikom pretvorbe nektara u med djelovanjem enzima koje pčele izlučuju (Cherchi i sur., 1994). Najzastupljenija organska kiselina u medu je glukonska koja nastaje iz glukoze oksidacijom pomoću glukoza-oksidadze. Nakon nje slijedi limunska kiselina pa se ove dvije kiseline mogu rabiti za razlikovanje cvjetnog meda od medljikovca jer je udio limunske kiseline znatno niži u cvjetnom medu (Mato i sur., 2006).

#### 2.3.5. Enzimi

Specifičnost meda je da sadrži enzime koji potječu od pčele ( $\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza), polena ili iz bakterija koje su prisutne u medu (Gašić, 2017). Enzimi medu daju karakteristična svojstva koja se ne mogu nadomjestiti, a enzimska aktivnost se smanjuje zagrijavanjem meda ili duljim skladištenjem meda pa se stoga aktivnost  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$ -amilaze koristi kao važan parametar u procjeni kvalitete meda, svježine i termičke obrade meda. Osim amilaza, u medu su prisutni enzimi invertaza, glukoza-oksidadza, kiselna fosfataza, proteaza i esteraza (Voldrich i sur., 2009).

### 2.4. Med obične planike (*Arbutus unedo* L.)

Iz cvijeta obične planike pčele rade med koji je snažnog i trpkog okusa. Posebnost ovog meda je da se dobiva od biljke koja, za razliku od ostalih medonosnih biljaka, cvjeta ujesen pa je lako proizvesti uniflorni med izrazito visoke kakvoće. Njegova uporaba osobito je rasprostranjena u Španjolskoj, Portugalu, Francuskoj (Korzika) i Italiji (Sardinija) (Ulloa i sur., 2015), a usprkos dokazanom blagotvornom

učinku na zdravlje čovjeka, u Hrvatskoj je proizvodnja ovog meda još uvijek zanemarena.

Najzastupljeniji fenolni spoj meda obične planike je homogentizinska kiselina (2,5-dihidroksifeniloctena kiselina, HGA) čiji je udio 50 – 60 % u ukupnim fenolnim spojevima (329,1 – 590,3 mg kg<sup>-1</sup>) prisutnih u medu. Ostatak fenolnih spojeva uglavnom je u obliku flavonoida. HGA je prisutna i u medu drugih biljaka (vrijesak, lipa, heljda i dr.), ali je njezin udio znatno niži u odnosu na udio u medu obične planike (Tuberoso i sur., 2010). Cabras i suradnici (1999) predložili su graničnu koncentraciju od 200 mg HGA po kg meda koja bi upućivala da se radi o medu proizvedenom uglavnom od obične planike.

Upravo zato što je HGA karakteristična i znatno zastupljena u medu obične planike smatra se kemijskim markerom botaničkog podrijetla ovog meda, što značajno olakšava potvrdu radi li se doista o medu obične planike budući da melisopalinološka analiza ima, u slučaju ovog meda, mali značaj zbog naopako okrenutog cvijeta te stoga niskog sadržaja peludi. Postojanje pouzdanog kemijskog markera botaničkog podrijetla je od izuzetne važnosti zbog sprječavanja patvorenja meda obične planike dodavanjem jeftinijih vrsta prirodnog meda ili glukozno-fruktoznog sirupa. Med obične planike je zbog izrazito snažnih antioksidacijskih učinaka i male količine prisutne na europskom tržištu 4 – 8 puta skuplji u odnosu na druge vrste meda (Brčić Karačonji i Jurica, 2017).

Pretpostavlja se da je med obične planike potencijalno značajan fitoterapeutik vrijedan opsežnijih istraživanja njegovih komponenti te njihovih bioloških učinaka. Do sada je fenolni sastav meda obične planike neznatno istraživani, a uglavnom se odnosi na tekućinskromatografsku ili plinskromatografsku kvantifikaciju kemijskih markera: HGA (Cabras i sur., 1999; Scanu i sur., 2005; Tuberoso i sur., 2010; Deiana i sur., 2015; Brčić Karačonji i Jurica, 2017), (±)-2-*trans*,4-*trans*-apscizinske kiseline, (±)-2-*cis*,4-*trans*-apscizinske kiseline i unedona (Tuberoso i sur., 2010; Deiana i sur., 2015).

Iz sardinijskog i kanarskog meda obične planike izolirani su aromatski spojevi  $\alpha$ - i  $\beta$ -izoforon te 4-oksoizofoforon koji se također mogu smatrati markerima botaničkog podrijetla (Bianchi i sur., 2005, De la Fuente i sur., 2007). Pronađene su i neke slobodne aminokiseline u medu obične planike i to prolin, glutaminska kiselina, arginin i fenilalanin (Spano i sur., 2009).



**Slika 4.** Med obične planike. Vlastita fotografija.

U usporedbi s drugim vrstama meda, med obične planike ima karakterističan, zreo i intenzivan miris te lako prepoznatljiv gorkast okus. Okus ovog meda je također specifičan jer je u početku blago slatkast, a kasnije izrazito gorak i trpak (Ulloa i sur., 2015).

Med obične planike sadrži  $376 \text{ g kg}^{-1}$  fruktoze i  $327 \text{ g kg}^{-1}$  glukoze. Jantarne je boje kad je tekuć te bež-smeđe tamne boje ( $70,1 \pm 10,0 \text{ mm Pfund}$ ) kad je kristaliziran (slika 4). Karakterizira ga i veća kiselost u odnosu na druge vrste uniflornog meda ( $35,1 \text{ meq kg}^{-1}$ ). Električna provodljivost ovog meda iznosi  $0,74 \pm 0,1 \text{ mS cm}^{-1}$ , što je u skladu s europskom direktivom (Persano Oddo i Piro, 2004).

Posebности kemijskog sastava hrvatskog meda obične planike dosad su istražene u smislu mineralnog sastava, masenog udjela ukupnih fenola i HGA te antioksidacijske aktivnosti. Istraživanja provedena na devet uzoraka meda obične planike s južnog dijela jadranske obale pokazala su veći udio fenola i esencijalnih elemenata te jači antioksidacijski kapacitet u usporedbi s 14 uniflornih vrsta meda prikupljenih u Hrvatskoj (Tariba Lovaković i sur., 2018).

## 2.5. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji se sastoje od jednog ili više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010) te su uključeni u obrambeni mehanizam biljke. Raznolika su skupina spojeva zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, biološke aktivnosti, biosintetskog puta i dr. (Tsao, 2010).

Njihova prisutnost i maseni udio u medu ovise o botaničkom podrijetlu, klimatskim uvjetima, sezonskim i okolišnim čimbenicima, obradi meda i geografskom položaju biljke od koje potječu. Većina fenolnih komponenti prirodno je prisutna u obliku konjugata s mono- i polisaharidima koji su vezani na jednu ili više fenolnih skupina. Također mogu biti prisutni u obliku funkcionalnih derivata kao što su esteri i metil-estri (Malenica Staver i sur., 2014).

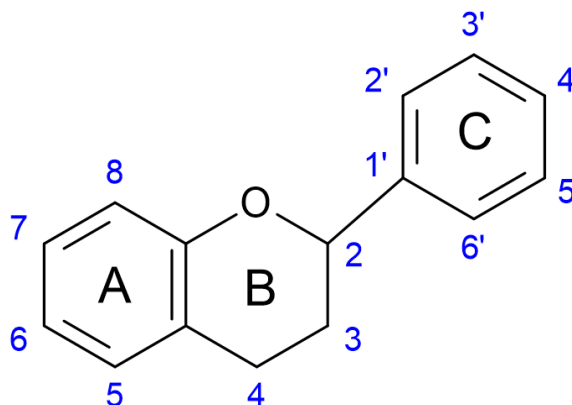
Za antioksidacijska svojstva fenolnih komponenti zaslužan je njihov redoks potencijal zbog kojeg se ponašaju kao reducensi, donori vodika i hvatači singletnoga kisika. Također, ponašaju se i kao kelatori metalnih iona te tako sprečavaju stvaranje slobodnih radikala. Istraživanja su pokazala da fenolni spojevi smanjuju rizik od raznih oboljenja (Rice-Evans i sur., 1997; Huang i sur., 2010).

Fenolni spojevi mogu se podijeliti u tri glavne skupine: flavonoidi, neflavonoidi (fenolne kiseline, stilbeni i lignani) i kondenzirani oblici fenolnih spojeva (kondenzirani tanini, oligomeri, polimeri i ostali kondenzirani oblici) (Fuss, 2003; Manach i sur., 2004; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010; Šamec, 2013).

### 2.5.1. Flavonoidi

Flavonoidi (lat. *flavus* = žuto) predstavljaju jednu od najbrojnijih skupina prirodnih heterocikličkih spojeva s kisikom. Osnovnu strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena (A- i B-prsten) koji su međusobno povezani mostom od triju ugljikova atoma (C-prsten) (slika 5).





**Slika 5.** Osnovna struktura flavonoida i glavne podskupine (Bravo, 1998).

Flavonoidi u prirodi dolaze u slobodnom ili konjugiranom obliku, a u biljkama se često nalaze u obliku glikozida što pridonosi velikoj raznolikosti spojeva. Vežanjem šećera za flavonoide povećava se polarnost molekule, a time i pohranjivanje spojeva u vakuolama biljnih stanica (Huang i sur., 2010).

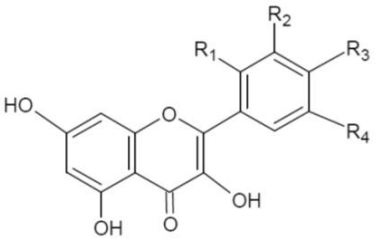
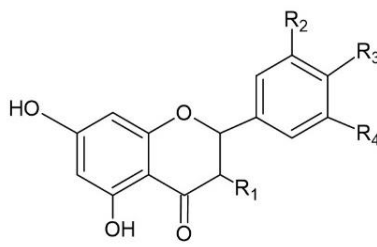
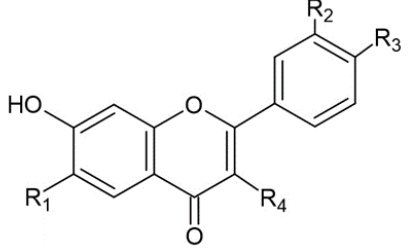
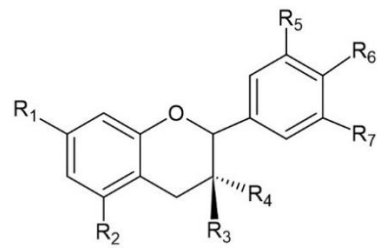
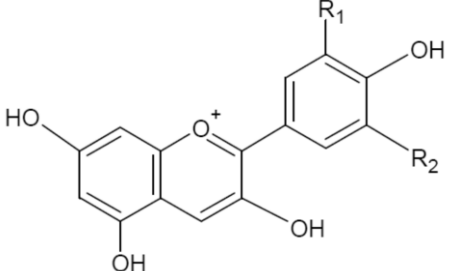
Flavonoidi se najčešće svrstavaju u nekoliko podskupina (slika 6): flavonoli, flavanoni, flavoni, izoflavoni, flavanonoli, flavan-3-oli i antocijanidini (Šamec, 2013).

Flavonoidi su prisutni u namirnicama kao što su voće, povrće, čaj, vino, grožđe, med, propolis, nektar i dr. Udio flavonoida u medu može iznositi i do 0,6 %, dok je njihov udio u polenu 0,5 %, a u propolisu 10 %. Na osnovi literaturnih podataka može se zaključiti da su u medu najzastupljeniji pinocembrin, apigenin, kamferol, kvercetin, pinobanksin, luteolin, galangin, hesperitin i isoramnetin (Anklam, 1998.).

Istraživanja u uvjetima *in vitro* i *ex vivo* su pokazala da flavanoidi inhibiraju oštećenja bioloških molekula peroksinitritom, sprječavaju tumorsku metaboličku aktivaciju, induciraju apoptozu zaustavljanjem staničnog ciklusa, mijenjaju otpornost na lijekove te inhibiraju proliferaciju i angiogene procese. Veća biološka aktivnost flavonoida pripisuje se flavonoidima koji sadrže veći broj OH skupina, dok se u glikozidnom obliku njihova aktivnost smanjuje (Shih i sur., 2007, Huang i sur., 2010; Jurica, 2016).

Istraživanjima je dokazano da flavonoidi pogodno djeluju na bolesti srca i krvnih žila na tri načina: poboljšavaju koronarnu vazodilataciju, smanjuju sposobnost trombocita za stvaranje krvnih ugrušaka i sprečavaju oksidaciju lipoproteina niske gustoće (Khalil i Sulaiman, 2010).

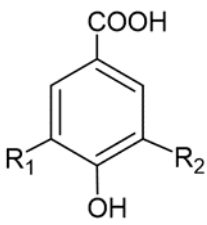
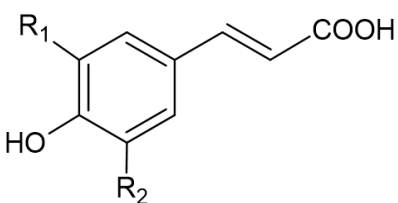
Flavonoidi primarno dospijevaju u med nektarom, ali i preko propolisa i peludi te njihov udio ovisi o vrsti biljke s koje su pčele prikupile nektar. Udio fenola u medu može varirati ovisno o klimatskim uvjetima geografskog područja na kojemu su pčele proizvele med (Gašić, 2017).

<p><b>Flavonoli</b></p>		<p>Kvercetin: <math>R_1=R_4=H</math>, <math>R_2=R_3=OH</math>  Miricetin: <math>R_1=H</math>, <math>R_2=R_3=R_4=OH</math>  Morin: <math>R_1=R_3=OH</math>, <math>R_2=R_4=H</math>  Kamferol: <math>R_1=R_2=R_4=H</math>, <math>R_3=OH</math></p>
<p><b>Flavanoni</b></p>		<p>Hesperitin: <math>R_1=R_4=H</math>, <math>R_2=OH</math>,  <math>R_3=OCH_3</math>  Naringenin: <math>R_1=R_2=R_4=H</math>,  <math>R_3=OH</math>,  Pinocembrin: <math>R_1=R_2=R_3=R_4=H</math>  Pinobanksin: <math>R_1=OH</math>,  <math>R_2=R_3=R_4=H</math>  Eriodiktol: <math>R_1=R_4=H</math>,  <math>R_2=H=R_3=OH</math></p>
<p><b>Flavoni</b></p>		<p>Galangin: <math>R_1=R_2=R_3=H</math>, <math>R_4=OH</math>  Luteolin: <math>R_1=H</math>, <math>R_2=R_3=OH</math>  Apigenin: <math>R_1=R_2=R_4=H</math>, <math>R_3=OH</math>  Krizin: <math>R_1=R_2=R_3=R_4=H</math>  Baikalein: <math>R_1=OH</math>, <math>R_2=R_3=R_4=H</math></p>
<p><b>Flavan-3-oli</b></p>		<p>Katehin:  <math>R_1=R_2=R_4=R_5=R_6=OH</math>,  <math>R_3=R_7=H</math>  Galokatehin: <math>R_1=R_2=R_4=R_5=R_6=</math>  <math>R_7=OH</math>, <math>R_3=H</math>  Epikatehin:  <math>R_1=R_2=R_4=R_5=R_6=OH</math>, <math>R_3=R_7=H</math>  Epigalokatehin:  <math>R_1=R_2=R_4=R_5=R_6=R_7=OH</math>, <math>R_3=H</math></p>
<p><b>Antocijanidini</b></p>		<p>Delfinidin: <math>R_1=OH</math>, <math>R_2=OH</math>  Cijanidin: <math>R_1=OH</math>, <math>R_2=H</math>  Malvidin: <math>R_1=R_2=OCH_3</math>  Peonidin: <math>R_1=OCH_3</math>, <math>R_2=H</math>  Pelargonidin: <math>R_1=H</math>, <math>R_2=H</math></p>

**Slika 6.** Strukturne formule flavonola, flavanona, flavona, flavan-3-ola i antocijanidina (Huang i sur., 2010; Flanjak, 2012; Jurica, 2016).

### 2.5.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dijele na derivate cimetine i benzojeve kiseline (slika 7), a pripadaju grupi poznatih antioksidansâ zbog sposobnosti da predaju molekulama vodik ili elektron. Njihovi stabilni radikali sprječavaju oksidaciju različitih komponenti, naročito masnih kiselina i ulja. Hidroksilni derivati benzojeve (*p*-hidroksibenzojeva, galna, vanilinska, protokatehinska i siringinska kiselina) i cimetine kiseline (*p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska i klorogenska kiselina) prisutni su u hrani biljnog podrijetla (voće, povrće, žitarice). Zastupljeni su u svim dijelovima biljke (korijen, stabljika, lišće, sjeme) (Heleno i sur., 2015).

Hidroksibenzojeva kiselina	Hidroksicimetna kiselina
	
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina: R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =H	<i>p</i> -kumarinska kiselina: R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =H
galna kiselina: R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =OH	kafeinska kiselina: R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH
vanilinska kiselina: R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =H	ferulinska kiselina: R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub>
protokatehuinska kiselina: R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH	sinapinska kiselina: R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub>
siringinska kiselina: R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub>	

**Slika 7.** Strukturne formule fenolnih kiselina (Huang i sur., 2010).

Većina fenolnih kiselina ima antioksidacijski potencijal, kao i potencijal hvatanja slobodnih radikala, a učinak im raste s povećanjem broja hidroksilnih i metoksi-skupina u molekulama (Huang i sur., 2010). Fenolne kiseline mogu inhibirati proliferaciju tumorskih stanica, izazvati apoptozu zaustavljanjem staničnog ciklusa, a imaju i antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antimutagena i protuupalna svojstva (Chaubal i sur., 2005; Larrosa i sur., 2006; Han i sur., 2007; Huang i sur., 2010). Galna kiselina ima značajan učinak na inhibiciju proliferacije stanica, indukciju apoptoze na tumorskim staničnim linijama te pokazuje selektivnu toksičnost za tumorske stanice (Faried i sur., 2007; Huang i sur., 2010).

### 2.5.3. Apsorpcija i metabolizam fenolnih spojeva

Većina fenolnih komponenti je prisutna u obliku glikozida, estera i polimera koji se u organizmu ne mogu apsorbirati u nativnom obliku. Stoga se prije apsorpcije hidroliziraju pomoću crijevne mikroflore ili enzima  $\beta$ -glikozidaze i laktaza-florizin hidrolaze, čime nastaje aglikon. Samo 5 % fenolnih spojeva se apsorbira u tankom crijevu (aglikoni i neki glikozidi), dok ostali fenolni spojevi dopijevaju u debelo crijevo, gdje crijevna mikroflora hidrolizira glikozide u aglikone i intenzivno metabolizira aglikone u razne aromatske kiseline. Aglikoni se metaboliziraju otvaranjem heterocikličkog prstena, što rezultira nastankom različitih kiselina koje se dalje metaboliziraju u derivate benzojeve kiseline (Hollman i sur., 1997; D'Archivio i sur., 2007; Dufour i sur., 2007).

Aglikoni i konjugati glukuronida se portalnom venom prenose u jetru gdje se dalje konjugiraju (metilacija, sulfatiranje i/ili glukuronidacija), čime se povećava njihova hidrofilnost što utječe na njihovu bržu eliminaciju putem žuči i/ili urina. Enzim katehol-O-metil transferaza sudjeluje u metilaciji fenolnih komponenti katalizirajući prijenos metilne skupine iz S-adenozil-L-metionina na fenole poput kvercetina, luteolina, kafeinske kiseline, katehina i cijanidina (Wu i sur., 2002). Aktivnost katehol-O-metil transferaze najviša je u jetri i bubrezima, iako je prisutna i u brojnim tkivima (Tilgmann i Ulmanen, 1996; Piskula i Terao, 1998; D'Archivio i sur., 2007). Sulfotransferaze kataliziraju prijenos sulfata u jetri s 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfata na hidroksilnu skupinu fenolnih spojeva. Točan prijenos još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. UDP-glukuronoziltransferaze, enzimi vezani za membranu endoplazmatskog retikuluma u mnogim tkivima, kataliziraju prijenos glukuronske kiseline iz UDP-glukuronske kiseline na fenolne spojeve. Glukuronidacija se događa u crijevima i jetrima, a najviše se odvija na položaju C3. Vrsta konjugacije ovisi o strukturi spoja, kao i o količini konzumiranog spoja (D'Archivio i sur., 2007).

Konjugacija predstavlja vrlo učinkovit mehanizam uklanjanja slobodnih aglikona pa su oni odsutni ili prisutni u niskim koncentracijama u plazmi nakon konzumacije fenolnih spojeva. Iznimka su katehini zelenog čaja čiji aglikoni mogu biti prisutni u značajnoj koncentraciji u plazmi (do 77 % za epikatehin galat) (Hollman i sur., 1997; D'Archivio i sur., 2007).

Metaboliti fenolnih spojeva cirkuliraju u krvi vezani za proteine, najviše za albumin, a afinitet fenolnih spojeva prema albuminu varira ovisno o njihovoj kemijskoj

strukturi. Vežanje za albumin može imati za posljedice sporiju eliminaciju metabolita te njihovu nižu dostupnost u stanicama i tkivima. Još je uvijek nejasno moraju li fenolni spojevi biti u slobodnom obliku da bi bili biološki aktivni ili mogu imati određenu biološku aktivnost kad su vezani za albumin, kao što je slučaj s kvercetinom (Dufour i sur., 2007).

## 2.6. Botaničko i geografsko podrijetlo meda

Različite vrste meda razlikuju se po svom sastavu ovisno o botaničkom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, vrsti pčela, kao i sposobnosti pčelara, načinu obrade i metodologiji skladištenja meda (Wang i Qing, 2011). Botaničko i geografsko podrijetlo meda utvrđuje se kombinacijom senzorske i melisopalinološke (peludne) analize te određivanjem fizikalno-kemijskih parametara.

Pelud u med dopijeva preko pčele koja ga skuplja s različitih biljaka. Melisopalinološka analiza zasniva se na identifikaciji peludnih zrnaca pod mikroskopom što dugo traje, a predstavlja uobičajeni postupak potvrde botaničkog podrijetla meda. Problem predstavlja što pčele mogu prikupiti pelud i s nemedonosnih biljaka, ali s druge strane to može pomoći pri procjeni geografskog podrijetla meda. Također, filtrirani med ne sadrži pelud, a sama analiza ne može se rabiti za dokazivanje autentičnosti meda jer se peludna zrnca mogu dodavati naknadno u med. Isto tako, postoje i biljke čiji je cvijet okrenut naopako (npr. obična planika) pa melisopalinološka analiza ima mali značaj zbog niže zastupljenosti peludnih zrnaca (Anklam, 1998; Gašić, 2017).

U novije se vrijeme primjenom modernih instrumentnih tehnika ispituje kvaliteta i utvrđuje autentičnost meda te se traže markeri botaničkog i geografskog podrijetla meda analizom specifičnih fitokemikalija kako bi se pronašao kemijski marker određene vrste meda.

U literaturi su kao potencijalni markeri botaničkog i geografskog podrijetla meda opisani niži šećeri i njihovi karakteristični omjeri, enzimi, aminokiseline, organske kiseline i hlapljivi spojevi, minerali, mikroelementi i fenolni spojevi (Wang i Qing, 2011).

Međutim, postoje i poteškoće u procjeni botaničkog i/ili geografskog podrijetla meda korištenjem navedenih spojeva. Tako su šećeri u medu pogodni za detekciju nezakonite prakse (Irudayaraj i sur., 2003; Daniel-Kelly i sur., 2004), odnosno patvorenja meda u proizvodnji (dodavanje različitih sirupa u med), ali nema puno

objavljenih podataka o uporabi šećera kao markera botaničkog i/ili geografskog podrijetla. Enzimi i proizvodi fermentacije (glicerol, etanol) nisu pogodni za procjenu geografskog podrijetla meda, ali pokazuju u kakvim se uvjetima med prerađuje i skladišti.

Profil aminokiselina i organskih kiselina može dati neke informacije o podrijetlu meda, a proteini (na temelju njihove veličine) se mogu rabiti za procjenu botaničkog i geografskog podrijetla meda (Rodriguez-Otero i sur., 1994 i 1995; Anklam, 1998; Won i sur., 2008).

Hlapljivi spojevi mogu se rabiti kao markeri botaničkog podrijetla uniflornog meda, a potječu od nektara ili medljikovca. Problem predstavlja niska koncentracija i složena izolacija hlapljivih spojeva budući da med predstavlja kompleksan medij. Nedostatak je što hlapljivi spojevi također mogu nastati zagrijavanjem meda, kao i prilikom neadekvatnog skladištenja čime je otežana pouzdana karakterizacija botaničkog podrijetla (Anklam, 1998; Benedetti i sur., 2004; Odeh i sur., 2007).

Analiza minerala u medu može biti pogodna za procjenu geografskog podrijetla jer su koncentracije minerala u neposrednoj vezi s područjem na kojem rastu medonosne biljke, ali također mogu biti posljedica zagađenja životne sredine ili onečišćenja tijekom proizvodnje meda. Prema tome, udio minerala u medu može se rabiti kao pokazatelj zagađenja životne sredine i kao posredan pokazatelj geografskog podrijetla meda (Anklam, 1998).

Kvalitativno i kvantitativno određivanje fenola, kao sekundarnih biljnih metabolita, čiji udio u medu ovisi o biljnoj vrsti s koje pčele prikupljaju nektar, može dati korisne informacije o botaničkom podrijetlu meda. Postoje specifični fenoli za pojedine vrste meda. Wang i Qing (2011) su predložili klorogensku kiselinu kao marker botaničkog podrijetla bagremova meda, a elaginsku kiselinu kao marker botaničkog podrijetla meda uljane repice. Dimitrova i suradnici (2007) predložili su 4-hidroksibenzojevu, 4-hidroksifenilmlječnu, ferulinsku i fenilmlječnu kiselinu kao markere botaničkog podrijetla za kestenov med. Također, za kestenov su med karakteristične hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina), dok su veće količine elaginske kiseline karakteristične za vrijeskov med (Tomás-Barberán i sur., 2001). Ferreres i suradnici (1994, 1998) predložili su hesperetin kao marker botaničkog podrijetla citrusovog meda te kamferol kao marker botaničkog porijekla ružmarinova meda. Nadalje, Tomás-Barberán i suradnici (2001) predložili su

kvercetin kao potencijalni marker botaničkog podrijetla suncokretovog meda, a pokazali su i da lavandin i bagremov med u svom fenolnom profilu ne sadrže specifične fenolne spojeve koji bi se mogli koristiti kao markeri botaničkog podrijetla.

Određivanje fenola također nalazi primjenu u procjeni geografskog podrijetla meda budući da njihov udio varira ovisno o klimatskim uvjetima na kojima medonosna biljka raste. Habib i suradnici (2014) pokazali su da med biljaka sa sušnog područja sadrži više fenola od meda biljaka koje ne rastu u sušnom području te ima jači antioksidacijski učinak kao i bolji zaštitni učinak na DNA.

## 2.7. Biološki učinci meda obične planike

Dosadašnja istraživanja meda obične planike upućuju na njegov ljekoviti učinak zbog visokog masenog udjela fenolnih spojeva. Pripisuju mu se vrlo snažna antioksidacijska, antibakterijska i protuupalna svojstva, a zbog specifičnog sastava moguće je da posjeduje i antimutagene te antiproliferacijske učinke koji imaju značajnu ulogu u prevenciji i liječenju tumora (Rosa i sur., 2011; Tuberoso i sur., 2013).

Antioksidacijski učinak meda uglavnom se pripisuje fenolnim spojevima, dominantno HGA (Tariba Lovaković i sur., 2018.), dok je ostatak fenolnih spojeva uglavnom u obliku flavonoida, koji također imaju potencijalno pozitivan učinak na zdravlje (Bogdanov i sur., 2008).

Istraživanja su pokazala da višednevnom konzumacijom (14 dana; 70 g meda otopljenog u 200 mL vode) ovog meda u preporučenim dnevnim dozama kod zdravih muškaraca dolazi do povećanja koncentracije serumskog željeza, smanjenja aktivnosti jetrenih enzima, porasta broja leukocita i trombocita te smanjenja primarnih oštećenja DNA u leukocitima (Brčić Karačonji i sur., 2014; Jurič i sur., 2018). Tretman hrvatskim medom obične planike povećao je stopu preživljenja limfocita periferne krvi te smanjio razinu primarnog oštećenja DNA i razinu oksidacijskog stresa u pokusu izlaganja limfocita UVB zračenju u uvjetima *in vitro* (Jurič i sur., 2019).

Također, med obične planike pokazao je citotoksična svojstva prema humanim stanicama adenokarcinoma crijeva (HCT-116) i metastatskim stanicama adenokarcinoma epitela debelog crijeva (LoVo) te smanjenu toksičnost prema netumorskim stanicama (Afrin i sur., 2017).



## 2.8. Antioksidacijski potencijal meda

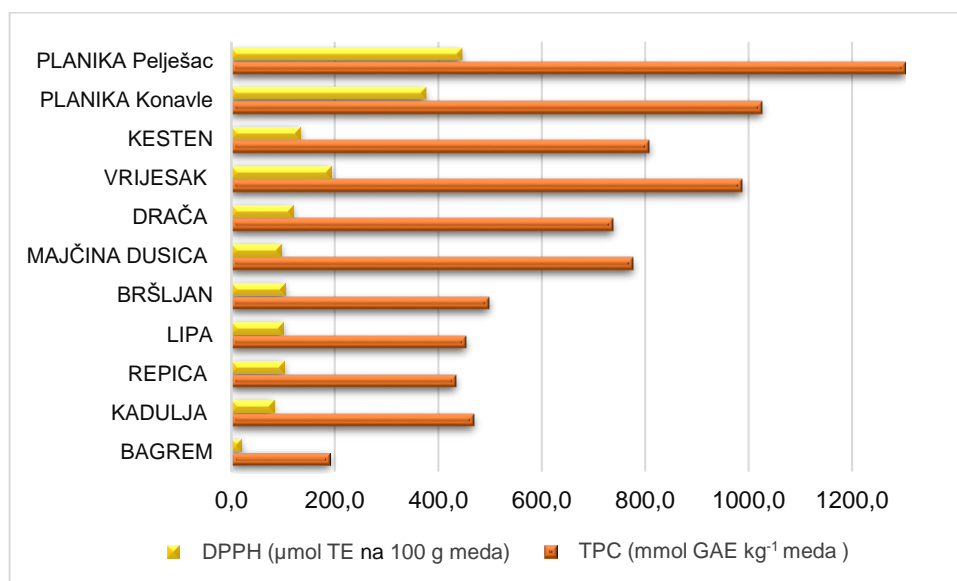
Oksidacijski stres je posljedica neravnoteže između nastanka slobodnih radikala, koji mogu uzrokovati oksidaciju makromolekula (nukleinske kiseline, lipidi, proteini i ugljikohidrati) i antioksidacijske sposobnosti obrane organizma. Najznačajniji slobodni radikali su reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS): superoksid anion  $\bullet\text{O}_2^-$ , hidroksil-radikal  $\bullet\text{OH}$ , alkoksil-radikal  $\text{RO}\bullet$ , peroksil-radikal  $\text{ROO}\bullet$  i hidroperoksil-radikal  $\text{HO}_2\bullet$ . U vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona zbog čega su nestabilni i reaktivni te nastoje postići stabilnu strukturu popunjavajući valentnu orbitalu. Udarajući u druge molekule, slobodni radikal izbija elektrone drugim molekulama čime one također postaju slobodni radikali pa dolazi do niza lančanih reakcija. Stvaranju slobodnih radikala doprinosi UV i ionizirajuće zračenje, prooksidacijski enzimi, različiti onečišćivači iz zraka te nepravilna prehrana. Pojave različitih degenerativnih bolesti (ateroskleroza, karcinomi, astma, hepatitis, dermatitis, bolesti krvožilnog sustava i starenje) zbog oštećenja staničnih membrana lipidnom oksidacijom i/ili oštećenja DNA povezane su s prekomjernim nastankom slobodnih radikala (Lee i sur., 2004; Deng i sur., 2005; Flanjak, 2012). Proces lipidne oksidacije uključen je i u proces starenja jer lipidi koji ulaze u sastav kože reagiraju sa slobodnim radikalima i prelaze u lipidne perokside koji ubrzavaju starenje (Lee i sur., 2001).

Antioksidansi su molekule koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i sprječavaju oksidacijski stres organizma. Djeluju inhibirajući oksidaciju ROS-a, tako što se same oksidiraju i time zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja slobodnih radikala. Pretpostavlja se da glavnu ulogu u antioksidacijskom djelovanju imaju tri mehanizma: prijenos vodikovog atoma, prijenos jednog elektrona i keliranje metala (Oliveira i sur., 2011). Antioksidansi se dijele na primarne koji su prisutni u organizmu i hrani (u malim količinama) te imaju sposobnost odgađanja ili sprječavanja inicijacijskog stupnja lančane reakcije i preventivne (npr. superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza) koji sprječavaju početno stvaranje slobodnih radikala ili smanjuju brzinu kojom se provodi daljnja lančana reakcija (Flanjak, 2012).

Kao odgovor na negativne učinke slobodnih radikala sve je više istraživanja antioksidacijskog djelovanja bioaktivnih spojeva koji se nalaze u različitim prirodnim izvorima poput, voća, povrća, ljekovitog bilja, a također i u medu. Antioksidacijski kapacitet predstavlja mjeru sposobnosti reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidacijskih reakcija kako u hrani, tako i u organizmu.

Posljednjih godina postoji veliko zanimanje za istraživanje antioksidacijskih svojstava meda. Blagotvorni učinci meda većim se dijelom pripisuju njegovom antibakterijskom i antioksidacijskom djelovanju. Točan mehanizam i kemijska struktura različitih komponenata koje su odgovorne za njegovo antioksidacijsko djelovanje nisu još uvijek u potpunosti poznati. Dosadašnja istraživanja su pokazala da antioksidansi prisutni u medu uključuju enzimske (katalaza, glukoza oksidaza, peroksidaza) i neenzimske supstancije. Antioksidacijski kapacitet meda produkt je sinergističkog djelovanja fenolnih komponenti, aminokiselina, enzima, proteina, produkata Maillardovih reakcija, organskih kiselina,  $\alpha$ -tokoferola, derivata karotenoida i askorbinske kiseline. Količina i vrsta ovih antioksidansâ u velikoj mjeri ovisi o vrsti medonosne biljke, a dokazana je i korelacija između antioksidacijskog kapaciteta meda i ukupnog udjela fenola (Gheldof i sur., 2002; Aljadi i Kamaruddin, 2004; Ferreira i sur., 2009).

Tariba Lovaković i suradnici (2018) utvrdili su da med obične planike sadrži visoki udio fenolnih spojeva [ $\bar{x} = 415$  mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)  $\text{kg}^{-1}$ ] u usporedbi s drugim vrstama meda (slika 8). Samo je hrastov medljikovac ( $\bar{x} = 424$  mg GAE  $\text{kg}^{-1}$ ) imao veći udio fenolnih komponenti od meda obične planike. Med obične planike pokazao je i visoki antioksidacijski kapacitet primjenom metode DPPH• [ $\bar{x} = 3,34$  mmol ekvivalenata Troloxa (TE)  $\text{kg}^{-1}$ ]. Također, u ovom istraživanju med obične planike imao je visok udio HGA ( $\bar{x} = 314$  mg  $\text{kg}^{-1}$ ) što značajno pridonosi antioksidacijskom kapacitetu meda.



TE – eng. *Trolox equivalent*  
 GAE – eng. *Galic acid equivalent*

**Slika 8.** Usporedba udjela ukupnih fenola (eng. *Total phenolic content*, TPC) i antioksidacijske aktivnosti (DPPH•) meda obične planike i ostalih vrsta meda s hrvatskoga područja (Tariba Lovaković i sur., 2018).

U preliminarnom istraživanju (Jurič i sur., 2020) određen je fenolni profil meda obične planike s Pelješca u kojem je identificirano 56 spojeva. Analizirani med imao je visoki udio ukupnih fenola (1038 mg GAE kg<sup>-1</sup>) i snažnu antioksidacijsku aktivnost primjenom metode DPPH• (3,32 mmol TE kg<sup>-1</sup>) te visoki udio HGA (280,6 mg kg<sup>-1</sup>).

O djelotvornosti meda najbolje govori činjenica da se danas primjenjuje i u kliničkoj praksi u obliku medicinskog meda (med koji je steriliziran kako bi se uništile bakterijske spore) budući da med ima raznolike biološke učinke i terapijsku primjenu:

- antimikrobni učinak (djeluje na širok spektar bakterijskih sojeva, a učinkovit je i kod mikoza) (Gobin i sur., 2014)
- zacjeljuje rane (dekubitusi, apscesi, opekline, itd.) (White i sur., 2005)
- prebiotik u gastroenterologiji (Ustunol, 2001)
- liječenje ulkusa, gastritisa i *Helicobacter pylori* (Dubtsova, 2009; Molan, 1999)
- pomaže dijabetičarima u smanjenju rizika od komplikacija bolesti (Verbanac, 2010)
- pozitivno djeluje na kardiovaskularni sustav (Yagoobi i sur., 2008; Ahmed i sur., 2011)

- učinkovit je u stomatologiji i kod oralnih lezija (Molan, 1999; El-Haddad i Shawaf, 2013)
- koristi se pri liječenju očnih infekcija (National Honey Board, 2002)
- za smanjenje kašlja, kod prehlade i gripe (Frolov i Peressadin, 2006; Paul i sur., 2007;)
- pronalazi primjenu i u onkologiji (Smirnova i sur., 2000).

## 2.9. Prooksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva

Fenolni spojevi, koji su uglavnom antioksidansi, mogu se ponašati kao prooksidansi pri određenim uvjetima koji omogućuju njihovu autooksidaciju. To se događa u bazičnoj sredini, kad je prisutna visoka koncentracija iona prijelaznog metala i u prisutnosti molekule kisika. Fenolni spojevi s manjim molarnim masama, kao što su kvercetin i galna kiselina imaju jače prooksidacijsko djelovanje od spojeva s većim molarnim masama. S druge strane, fenolni spojevi s velikim molarnim masama, kao što su tanini topljivi u vodi, imaju malu prooksidacijsku aktivnost (Hagerman i sur., 1998; Bors i Michel, 2002; Dai i Mumper, 2010).

Osim antioksidacijskog učinka, HGA također može imati u određenim uvjetima citotoksični učinak zbog mogućnosti stvaranja reaktivnih toksičnih produkata u procesu autooksidacije. Produkti oksidacije HGA se kod bolesnika koji boluju od rijetke nasljedne bolesti alkaptonurije nakupljaju u vezivnom tkivu uzrokujući upalu i degeneraciju tkiva (Rosa i sur., 2011).

## 2.10. *In vitro* učinci na humane tumorske stanične linije

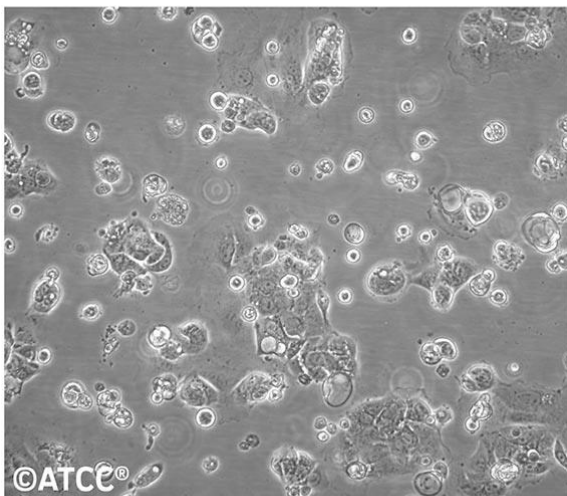
Kako bi se ispitala selektivna citotoksičnost različitih agenasa prema određenom tipu tumorskih stanica rabe se stanične linije. Stanične kulture pogodni su modeli koji imaju široku primjenu za proučavanje biokemijskih i fizioloških procesa, a često se rabe za praćenje učinaka različitih spojeva (testiranje protumorskih lijekova, predviđanje uspješnosti terapije, proučavanje molekularnih mehanizama kojima tumorske stanice postaju otporne na lijekove, itd.). U kulturi se mogu uzgajati različiti tipovi stanica, poput stanica tumora, koštanog tkiva, srčanog tkiva, fibroblasti i brojne druge. Sve dok im se osiguravaju hrana i optimalna atmosfera, stanice će rasti i umnažati se (Ban i Osmak, 1996; Verhoeckx i sur., 2015).

Postojeća literaturna saznanja o učinku meda na tumorske stanične linije vrlo su ograničena. Sardinjski med obične planike i novozelandski manukin med pokazali su u dosadašnjim istraživanjima citotoksična svojstva prema humanim stanicama adenokarcinoma crijeva (HCT-116) i metastatskim stanicama adenokarcinoma epitela debelog crijeva (LoVo) te smanjenu toksičnost prema netumorskim stanicama (Afrin i sur., 2017; Afrin i sur., 2019). Kineski žižulin med imao je citotoksični učinak na stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) (Cheng i sur., 2019), a čileanski ulmov med na stanične linije adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) (Acevedo i sur., 2017).

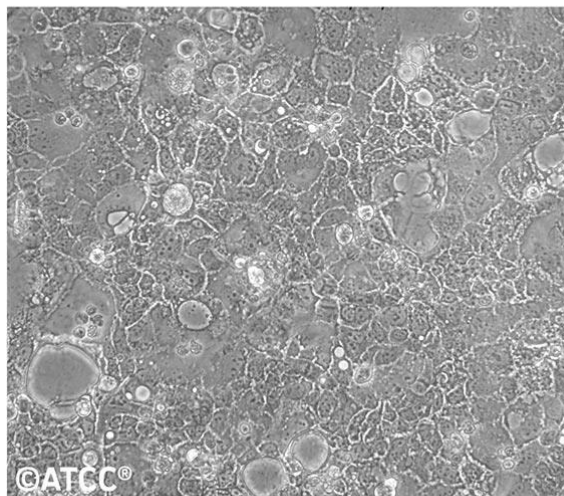
Kang i suradnici (2005) utvrdili su da je HGA smanjila stvaranje ROS-ova unutar stanica stanične linije humanih fibroblasta (WI 38) koje su izložene oksidacijskom stresu induciranim s vodikovim peroksidom. HGA je pokazala zaštitni učinak kada su stanice tretirane različitim koncentracijama jedan sat prije izlaganja vodikovom peroksidu. HGA je pojačala aktivnost katalaze i proteina ERK (eng. *Extracellular signal-regulated kinases*, ERKs) koji igraju važnu ulogu u učinkovitom povećanju antioksidacijskih obrambenih mehanizama u stanicama.

*Stanična linija Caco-2* prikazana na slici 9 uspostavljena je iz epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma debelog crijeva bijelca dobi od 72 godine. Stanice ove stanične kulture spontano diferenciraju i stvaraju monosloj stanica koji morfološki i funkcionalno ima slične karakteristike zrelog enterocita (Sambuy i sur., 2005). Ova se linija koristi za istraživanje tumora, proučavanje stanične permeabilnosti potencijalnih lijekova, pasivne difuzije lijeka, toksičnosti lijekova, itd. (Meunier i sur., 1995).

ATCC Number: **HTB-37**  
Designation: **Caco-2**



Low Density

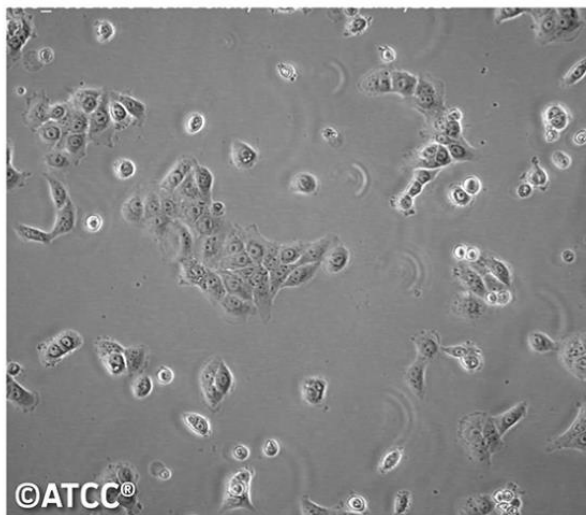


High Density

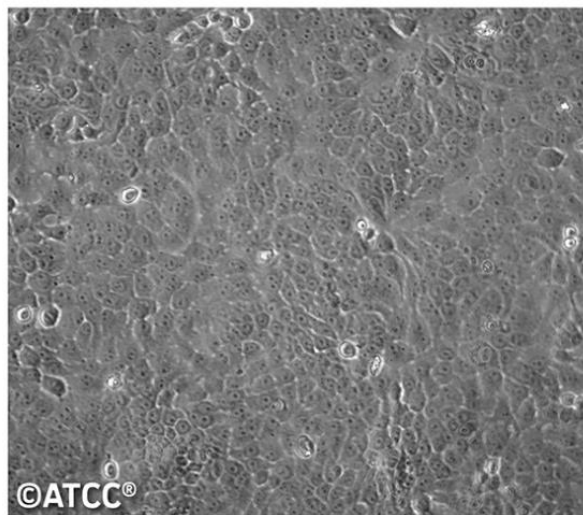
**Slika 9.** Mikroskopska fotografija komercijalno dostupne stanične linije Caco-2 (ATCC, 2020a).

*Stanična linija Cal27* prikazana na slici 10 uspostavljena je od stanica uzorkovanih s lezije jezika pacijenta bijele rase dobi od 56 godina. Jedna je od najčešće korištenih staničnih linija za proučavanje utjecaja ispitivanih spojeva i kemikalija na pločaste epitelne stanice oralnih karcinoma (Jiang i sur., 2009).

ATCC Number: **CRL-2095**  
Designation: **CAL-27**



Low Density



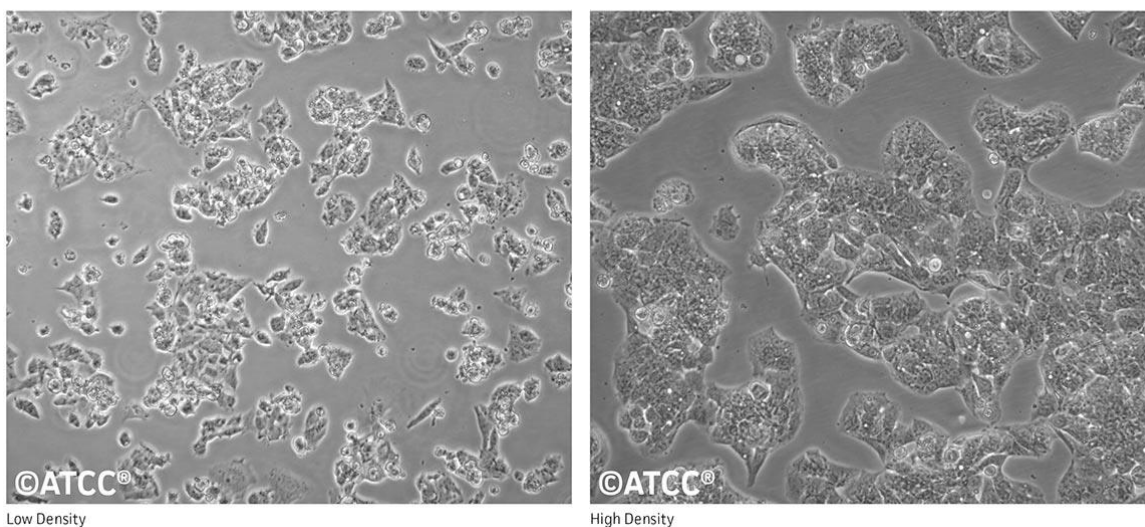
High Density

**Slika 10.** Mikroskopska fotografija komercijalno dostupne stanične linije Cal27 (ATCC, 2020b).

*Stanična linija HepG2* prikazana na slici 11 uspostavljena je iz stanica hepatocelularnog karcinoma bijelca koji je imao 15 godina. Jetra je ključni metabolički organ pa se stanice HepG2 rabe za proučavanje metabolizma brojnih tvari. HepG2 je prva humana tumorska stanična linija jetre koja je zamijenila „zlatni standard“ modela za ispitivanja metabolizma ksenobiotika i citotoksičnosti tvari – humane hepatocite (Gerets i sur., 2012). Stanična linija HepG2 svoju je primjenu našla i kao prvi korak u istraživanjima spojeva s potencijalnim protutumorskim djelovanjem (Mersch-Sundermann i sur., 2004; Batra i Sharma, 2013).

ATCC Number: **HB-8065**

Designation: **Hep G2**



**Slika 11.** Mikroskopska fotografija komercijalno dostupne stanične linije HepG2 (ATCC, 2020c).

## 2.11. Kancerogeneza i kemoterapija

Pod utjecajem egzogenih i/ili endogenih genotoksičnih čimbenika u genomskoj DNA mogu nastati različite vrste oštećenja. Brojni egzogeni agensi mogu uzrokovati nastanak modificiranih baza, jednolančanih lomova (eng. *Single strand breaks*, SSB), dvolančanih lomova (eng. *Double strand breaks*, DSB) ili se mogu stvoriti kovalentni mostovi između komplementarnih lanaca DNA. Egzogeni uzroci oštećenja DNA mogu se svrstati u tri skupine: fizikalni kancerogeni (UV, ionizirajuće i  $\gamma$ -zračenje), kemijski kancerogeni (azbest, benzen) i biološki kancerogeni (infekcije virusima, bakterijama ili parazitima) (Loeb i Harris, 2008). Djelovanjem različitih endogenih metaboličkih procesa (hidroliza, oksidacija i elektrofilni napadi) u genomskoj DNA dolazi do spontanih promjena genetičkog materijala te aktivacije različitih mehanizama

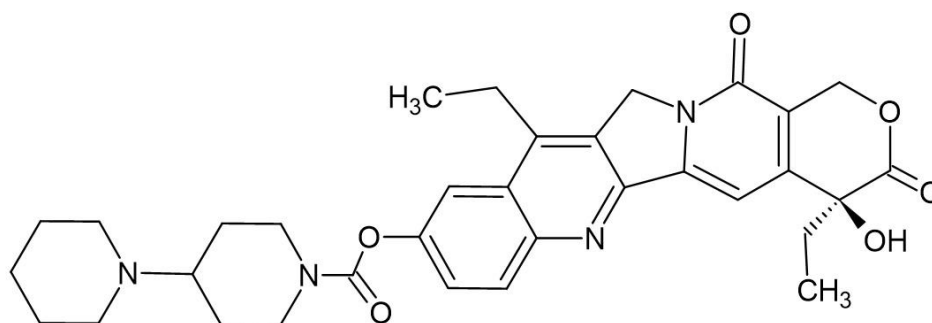
popravaka DNA, pri čemu može doći do pogrešaka koje vode do pojave tumora i drugih bolesti (Boyer i Levin, 2008).

Za razliku od normalnih stanica, tumorske stanice potječu od jedne stanice u kojoj su prisutne razne genske mutacije odgovorne za diobu i regulaciju rasta, a strukturno i funkcionalno se razlikuju od normalnih stanica (Shewach i Kuchta, 2009). Jedinstveno svojstvo tumorskih stanica je sposobnost izbjegavanja apoptoze čime se omogućuje njihovo preživljavanje i dioba stanica s genomskim oštećenjem. Tumorske stanice ne trebaju kontakt s izvanstaničnim matriksom i drugim stanicama koji u fiziološkim uvjetima osiguravaju signale za preživljavanje (Bates i Lewis, 2013).

Kemoterapija podrazumijeva uporabu citostatika, protutumorskih lijekova s malom molekulskom masom za selektivno uništavanje tumora ili barem ograničavanje njegove proliferacije (Thurston, 2007). Svaki citostatik ima jedinstven mehanizam, a cilj kemoterapije je apoptoza tumorskih stanica (Soldić, 2015). Djeluju inhibirajući ili stimulirajući enzime uključene u stanični metabolizam i sintezu proteina ili na signalne puteve. Kako se tumorske stanice brže dijele, citostatici se u njih brže unose. Međutim, postoje i zdrave stanice koje se dijele brzo (stanice koštane srži, stanice gastrointestinalnog epitela i stanice folikula dlake). Budući da citotoksični agensi djeluju neselektivno, oni se i u ovakve zdrave stanice unose brže što objašnjava nastajanje nuspojava (Kraljević i sur., 2006; Thurston, 2007). To se događa zbog nedostatka specifičnosti protutumorskih lijekova, sustavne toksičnosti lijekova, brzog metaboliziranja lijekova, ali i zbog stjecanja otpornosti na citostatike (Kraljević i sur., 2006).

Irinotekan {7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] karbonoloksikamptotecin; poznat i kao CPT-11; slika 12} je polusintetski analog kamptotecina (CPT), kinolinskog alkaloida izoliranog iz kore kineskog stabla *Camptotheca acuminata*. Jedan je od najvažnijih citostatika razvijenih posljednjih desetljeća, koji se primarno rabi u kemoterapiji metastatskog kolorektalnog karcinoma (Jaxel i sur., 1989; Wall i sur., 1996).





**Slika 12.** Strukturna formula irinotekana (Thurston, 2007).

Irinotekan je pred-lijek koji se metabolizira karboksilesterazama (E.C.3.1.1.1; CES1A1 i CES2) u jetri te enzimom butirilkolinesterazom (BChE) iz plazme u aktivni lipofilni metabolit SN-38 (7-etil-10-hidroksi kamptotecin) za koji se smatra da je primarno odgovoran za citotoksičnost (Tsuji i sur., 1991; Pommier i sur., 1998). Smatra se da SN-38 ima 100 do 1000 puta veću protutumorsku aktivnost od irinotekana (Iyer i sur., 1998; Senter i sur., 2001).

Protutumorska aktivnost irinotekana i SN-38 zasniva se na inhibiciji enzima DNA topoizomeraze I jer stvaraju ternarni kompleks koji sprječava udvostručavanje DNA. Time je onemogućeno ponovno spajanje jednolančanih lomova koji nastaju u DNA radi oslobađanja torzijskog stresa. Posljedično tome, na molekuli DNA nastaju nepopravljivi dvolančani lomovi, a djelovanjem endonukleaza nastaju fragmenti DNA, što dovodi do smrti stanice (Mathijssen i sur., 2001; Xu i Villalona-Calero, 2002; de Jong i sur., 2006; Fuchs i sur., 2006).

Irinotekan se u organizam najčešće unosi intravenskom infuzijom, a načini njegove terapijske primjene se razlikuju; dok se u SAD-u najčešće primjenjuje kao monoterapija (350 mg m<sup>-2</sup> tijela, svaka tri tjedna), u Europi i Japanu irinotekan se obično primjenjuje kao dio kombiniranih protokola i u nižim dozama (Europa: 180 mg m<sup>-2</sup>, svaka dva tjedna; Japan 150 mg m<sup>-2</sup>, svaka dva tjedna) (Takano i Sugiyama, 2017).

## 2.12. Analitičke tehnike za istraživanje fenolnog sastava meda

### 2.12.1. Uzorkovanje i predanalitički postupci

Određivanje fenolnih komponenti u medu započinje pravilnim uzorkovanjem s ciljem dobivanja dovoljnog broja reprezentativnih uzoraka kako bi se moglo odrediti geografsko i botaničko podrijetlo. Rezultati dobiveni analizom fenolnih spojeva

ovise o svježini uzorka pa ih je potrebno nakon skupljanja čuvati na hladnom i mračnom mjestu ( $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kako bi kemijski sastav ostao nepromijenjen. Prije analize potrebno je uzorak ostaviti na sobnoj temperaturi te promiješati kako bi se homogenizirao. Ako su u uzorku vidljivi kristali šećera, potrebno ga je lagano zagrijati ( $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) da se otope kristali (Ciulu i sur., 2016).

### 2.12.2. Ekstrakcija i analiza fenolnih spojeva u medu

Ovaj proces uključuje osnovne korake odvajanja komponenti iz matrice uzorka, pročišćavanje, identifikaciju i kvantifikaciju željenih komponenti. U literaturi postoji veliki broj postupaka izolacije fenolnih spojeva iz uzorka meda. Može se rabiti jedna tehnika ekstrakcije, a često se rabi više njih s ciljem što učinkovitijeg odvajanja većeg broja fenolnih spojeva iz meda. Osnovni cilj kod pripreme uzorka je dobivanje ekstrakta koji sadrži sve komponente koje se žele istražiti uz istovremeno što manje izdvajanje komponenti koje smetaju određivanju analita od interesa (Pyrzyska i Biesaga, 2009).

Izolacija fenolnih spojeva iz meda temelji se na nekoliko vrsta ekstrakcije:

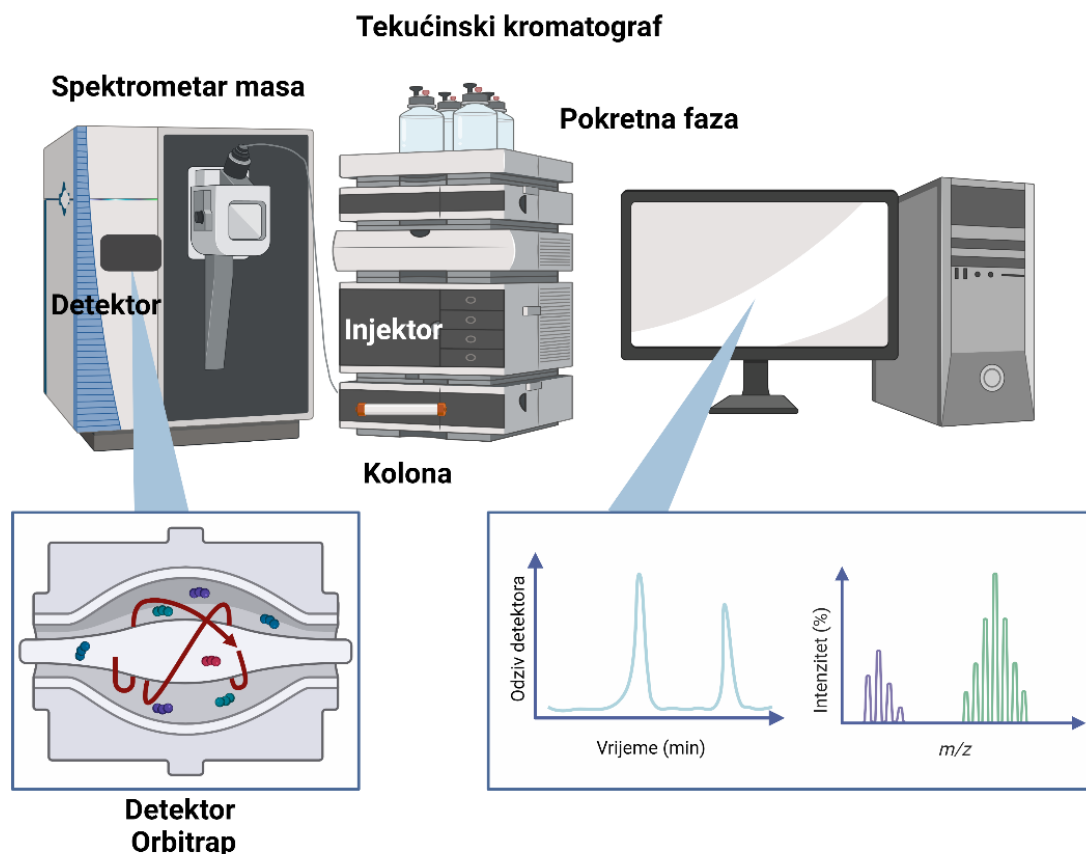
1. tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (eng. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE)
2. kombinacija tekućinsko-čvrste (eng. *Solid-Phase Extraction*, SPE) i tekućinsko-tekućinske ekstrakcije
3. adsorpcija na polimernom adsorbensu u kombinaciji s tekućinsko-čvrstom ili tekućinsko-tekućinskom ekstrakcijom (Ciulu i sur., 2016).

Razdvajanje pojedinih komponenti te njihova identifikacija i kvantifikacija predstavljaju idući korak u definiranju fenolnog profila. Obično se izvode kromatografskim (Ferrerres i sur., 1991; Yao i sur., 2003) ili elektroforetskim (Andrade i sur., 1997; Merken i Beecher, 2000) tehnikama. Izbor instrumentne tehnike i parametara metode ovisi o analitičkim ciljevima, željenom načinu karakterizacije (kvalitativnom i/ili kvantitativnom) te opremi koju analitičar posjeduje.

Najčešće korištena analitička tehnika za odvajanje pojedinih komponenti smjese je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) s obrnutim fazama (eng. *Reverse Phase Configuration*). Razdvajanje analita obično se postiže uporabom kolona C18 oktadecil (ODS). U posljednjih nekoliko godina tehnika UHPLC (eng. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) pokazala se kao brza i učinkovita jer rabi kolone s vrlo malim

promjerom čestica (od oko 1,7  $\mu\text{m}$ ) i izrazito visoke tlakove zbog čega ima niz prednosti kao što su visoka razlučivost, veća osjetljivost i preciznost te značajno skraćeno trajanje analize (Yu i sur., 2001; Gašić, 2017.).

Shematski prikaz tekućinskog kromatografa sa spektrometrom masa prikazan je na slici 13.



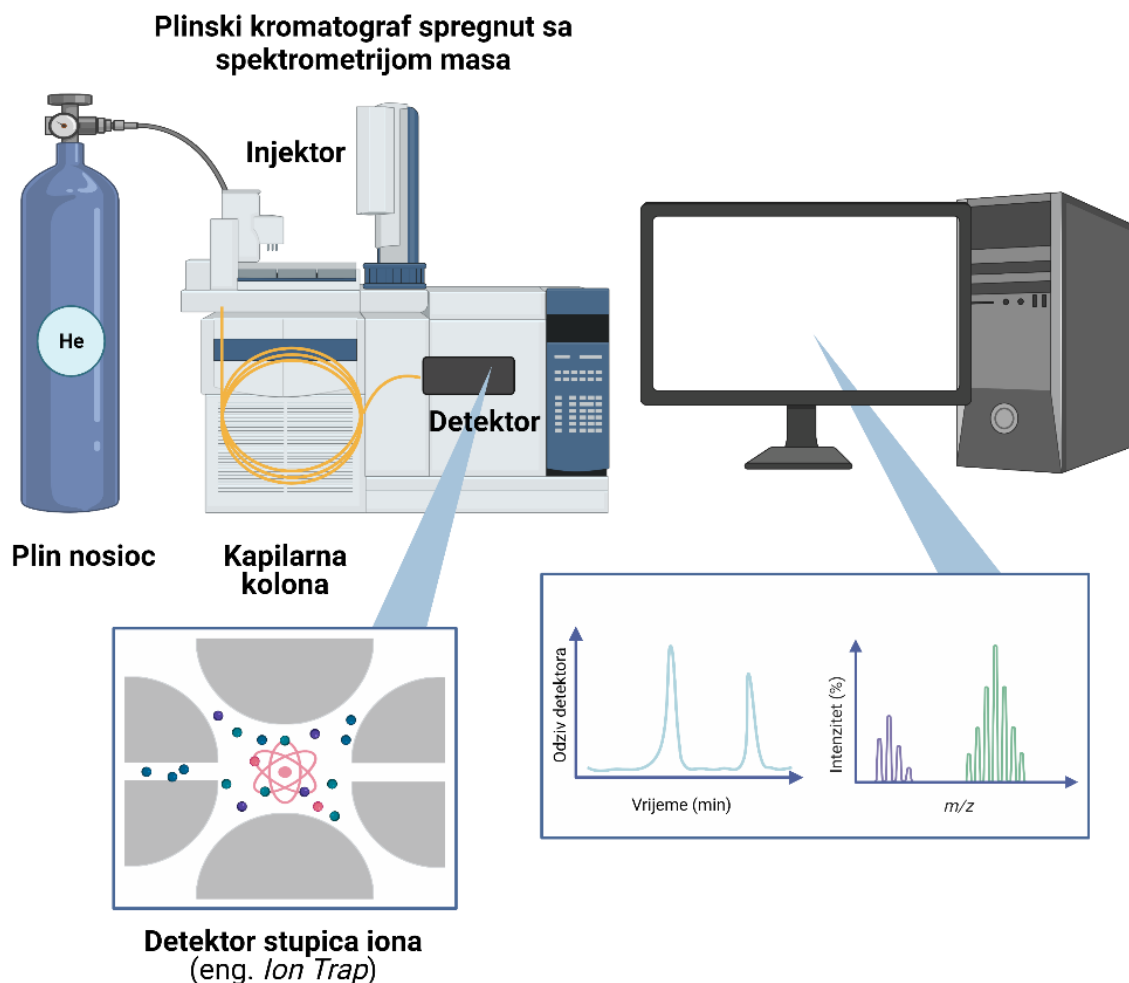
**Slika 13.** Shematski prikaz tekućinskog kromatografa sa spektrometrom masa  
Napravljeno pomoću BioRender.com.

Detektori koji se često rabe za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih komponenti u medu zasnivaju se na mjerenju UV apsorpcije [detektori UV i DAD (eng. *Diode Array Detector*)]. Ako smjesa sadrži visoki udio strukturno sličnih spojeva, uporaba ovih detektora nije pouzdana budući da slični spojevi imaju slične UV spektre. Identifikacija fenola HPLC-UV-om temelji se isključivo na uspoređivanju vremena zadržavanja analita s vremenom zadržavanja analitičkog standarda na koloni. Glavni nedostatak svih spektrofotometrijskih detektora je što ne daju informaciju o strukturi spoja. Upravo zato se sve više kao detektori koriste spektrometri masa (eng. *Mass Spectrometry*,

MS) koji su pogodni za analizu fenolnih komponenti jer se postiže visoka osjetljivost te se dobivaju informacije o molekularnoj masi i strukturi spojeva. Upravo je uporaba detektora MS, kao i tandemnih detektora (MS-MS) dovela do otkrića velikog broja potencijalnih geografskih i botaničkih markera (Ciulu i sur., 2016).

Osnovno načelo kromatografije temelji se na različitoj raspodjeli analita između dvije faze koje se međusobno ne miješaju. Uzorak, koji se analizira tekućinskom kromatografijom, mora biti topljiv u tekućoj pokretnoj fazi (eng. *mobile phase*) koja prolazi kroz kolonu u kojoj se nalazi nepokretna (krutina, gel ili tekućina) faza (eng. *stationary phase*). Komponente iz uzorka se višestruko ponavljano raspoređuju između pokretne i nepokretne faze pri čemu pojedine komponente izlaze iz kolone različitim brzinama ovisno o njihovoj sposobnosti vezanja za nepokretnu fazu. Razdvojeni analiti se mogu osjetljivo i selektivno detektirati, a potom i kvalitativno i kvantitativno analizirati.

Plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography*, GC) se također rabi za odvajanje sastojaka meda (Ajila i sur., 2011). U usporedbi s tehnikom HPLC, pri uporabi tehnike GC nužno je provesti postupak derivatizacije spojeva budući da su fenolni spojevi teško hlapljivi i termolabilni te stoga nisu pogodni za plinskokromatografsku analizu u izvornom obliku (Robbins, 2003). Najčešće rabljena tehnika derivatizacije je siliranje gdje se vodik u fenolnim spojevima zamjenjuje s trimetilsililnom skupinom pa spojevi postaju hlapljivi, termostabilni i manje polarni (Ajila i sur., 2011). Shematski prikaz plinskog kromatografa sa spektrometrom masa prikazan je na slici 14.



**Slika 14.** Shematski prikaz plinskog kromatografa sa spektrometrom masa. Napravljeno pomoću BioRender.com.

Nakon razdvajanja analita na kromatografskoj koloni dolazi do ionizacije istraživane molekule u ionskom izvoru MS-a, a potom i razdvajanju fragmenata na temelju njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) u analizatoru. Detektor potom registrira signal te daje informacije o strukturi molekule. Spektrometar masa predstavlja osjetljiv i specifičan analitički detektor, a spektar masa često se naziva i molekulski otisak prsta, budući da je ovaj spektar jedinstven za svaku komponentu. Detektor masa Orbitrap karakterizira brzo skeniranje, točnost pri određivanju masa i visoka razlučivost (Tomljanović, 2000; Gašić, 2017).

## 2.13. Metode za određivanje udjela ukupnih fenola, flavonola, flavona i flavonoida

### 2.13.1. Određivanje udjela ukupnih fenola

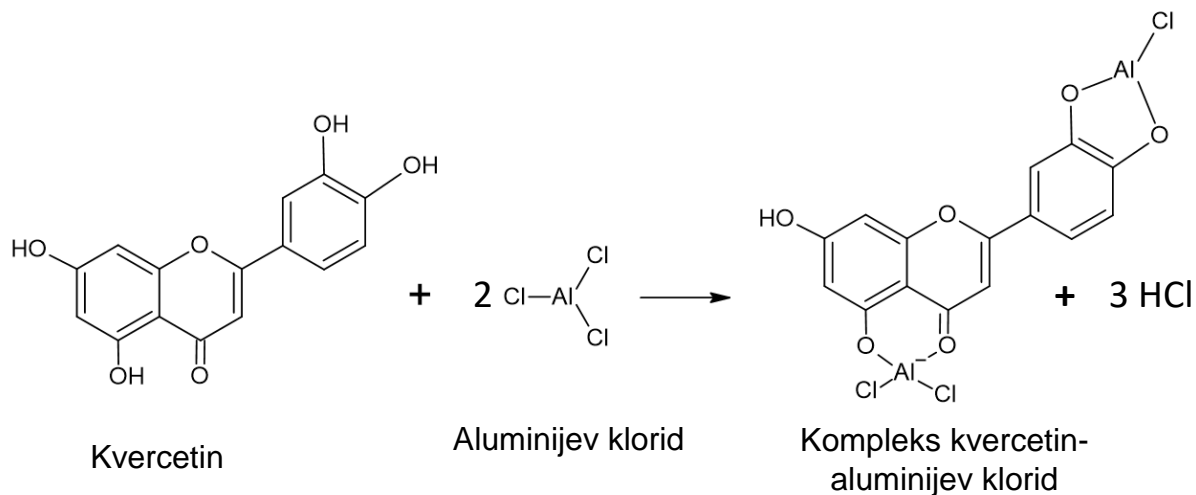
Određivanje udjela ukupnih fenola je spektrofotometrijska metoda i provodi se Folin-Ciocalteu reagensom. Taj reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koje se u reakciji s fenolnim komponentama reduciraju u plavo obojene okside, a promjena boje prati se na valnim duljinama od 745 nm do 765 nm. Intenzitet plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih spojeva. Dobiveni rezultat uključuje, osim ukupnih fenola, i druge reducirajuće, nefenolne komponente u uzorku. Naime, spojevi kao što su peptidi, vitamini C, E, karotenoidi, šećeri (glukoza i fruktoza), aminokiseline, proteini, organske kiseline ili enzimi (glukoza oksidaza i katalaza) također mogu utjecati na višu vrijednost apsorbancije. Nekoliko istraživača je dokazalo da spojevi koji najviše utječu na veće vrijednosti apsorbancije jesu produkti Maillardovih reakcija (melanoidini) do kojih dolazi kad šećeri kondenziraju sa slobodnim aminokiselinama što dovodi do stvaranja smeđih melanoidina (Alvarez-Suares i sur., 2009; Ferreira i sur., 2009; Brudzynski i Miotto, 2011; Alves i sur., 2013; Ulloa i sur., 2015).

Bez obzira na nedostatke, metoda se često rabi zbog brzine i jednostavnosti (Prior i sur., 2005; Sánchez-Rangel i sur., 2013).

### 2.13.2. Određivanje udjela flavonola i flavona

Najčešće korištena je spektrofotometrijska metoda za takozvano određivanje ukupnog masenog udjela flavonoida (eng. *Total Flavonoid Content*, TFC). Ova metoda, koju su u početku predložili Christ i Müller (1960) za analizu biljnih materijala, kasnije je nekoliko puta modificirana. Metoda se temelji na reakciji aluminijevog klorida s C3, C4 i/ili C5 keto hidroksilnom skupinom flavonola i flavona tvoreći kiselinski postojane komplekse (slika 15). Aluminijev klorid stvara i kiselinski labilne komplekse s *o*-supstituiranim hidroksilnim skupinama na A ili B prstenu flavonoida. Kompleksi aluminijevog klorida s funkcionalnijim skupinama flavonola (uključujući kamferol, rutin, kvercetin i kvercitrin) imaju maksimalnu apsorbanciju na 415 – 440 nm (Chang i sur., 2002; Tristantini i Amalia, 2019). Iako ova metoda daje znatno niže vrijednosti od

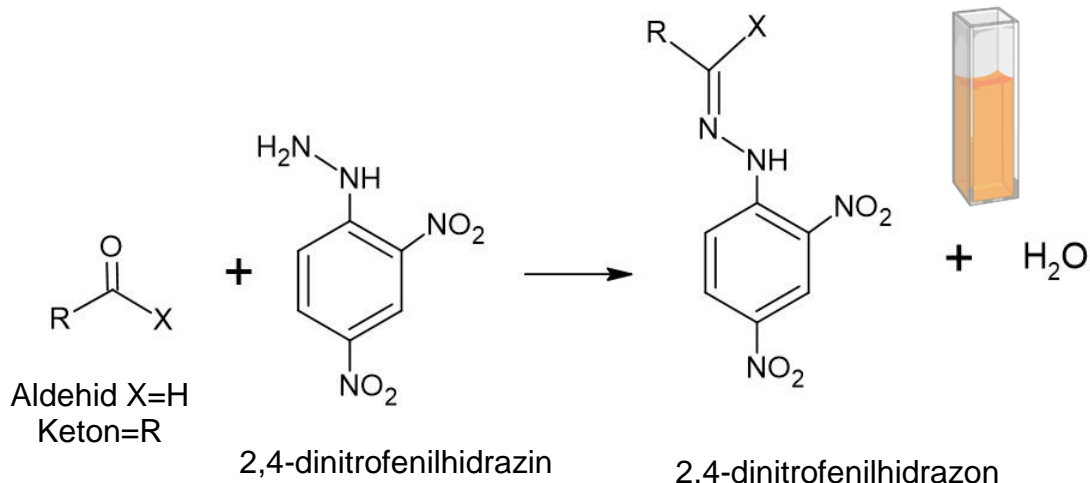
stvarnog udjela flavonoida, njezine su prednosti da je korisna za rutinsku analizu, jer ne zahtjeva sofisticiranu opremu te je brza i jednostavna (Woisky i Salatino, 1998). Rezultati se izražavaju kao ekvivalent standarda kvercetina po kilogramu uzorka meda.



**Slika 15.** Prikaz reakcije aluminijevog klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) s flavonoidima (Amorim i sur., 2008)

### 2.13.3. Određivanje udjela flavanona [metoda DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin)]

Metoda se temelji na kondenzacijskoj reakciji 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s karbonilnim i aldehidnim skupinama flavanona pri čemu nastaju odgovarajući 2,4-dinitrofenilhidrazoni uz oslobađanje vode (slika 16). Maksimalna apsorbancija dobivenih produkata postiže se pri 495 nm (Chang i sur., 2002; Trusheva i sur., 2007). Rezultati se izražavaju kao ekvivalent standarda naringenina po gramu uzorka meda.



**Slika 16.** Prikaz reakcije 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s aldehydima i ketonima (Purdel i sur., 2014)

## 2.14. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Dva su osnovna mehanizma preko kojih antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale: prijenosom elektrona, SET (eng. *Single Electron Transfer*) i prijenosom vodikova atoma, HAT (eng. *Hydrogen Atom Transfer*) (Flanjak, 2012).

Metode koje se temelje na mehanizmu prijenosa elektrona mjere sposobnost antioksidansa da donira elektron i tako reducira komponente, uključujući metale, karbonile i radikale. Ove su metode ovisne o vrsti otapala i pH vrijednosti te su relativno spore. Kod metoda temeljenih na SET-u uobičajeno je mjerenje postotka smanjenja koncentracije slobodnog radikala. Metode su osjetljive na askorbinsku i mokraćnu kiselinu, a do pogrešnih rezultata mogu dovesti elementi u tragovima i kontaminanti (posebno metali). U reakciji probna tvar, koja je ujedno i oksidans, prima elektron od antioksidansa i kao rezultat dolazi do promjene boje reagensa probne tvari, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Metode koje se najčešće koriste za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta su: FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) i TEAC (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (Prior i sur., 2005; Flanjak, 2012).

Metode temeljene na prijenosu vodikova atoma mjere sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima donirajući vodikov atom. To su brze metode koje ne ovise o vrsti otapala i pH vrijednosti sustava. U reakcijskom mehanizmu generator slobodnih radikala oksidira probnu tvar, a antioksidans se s probnom tvari natječe za



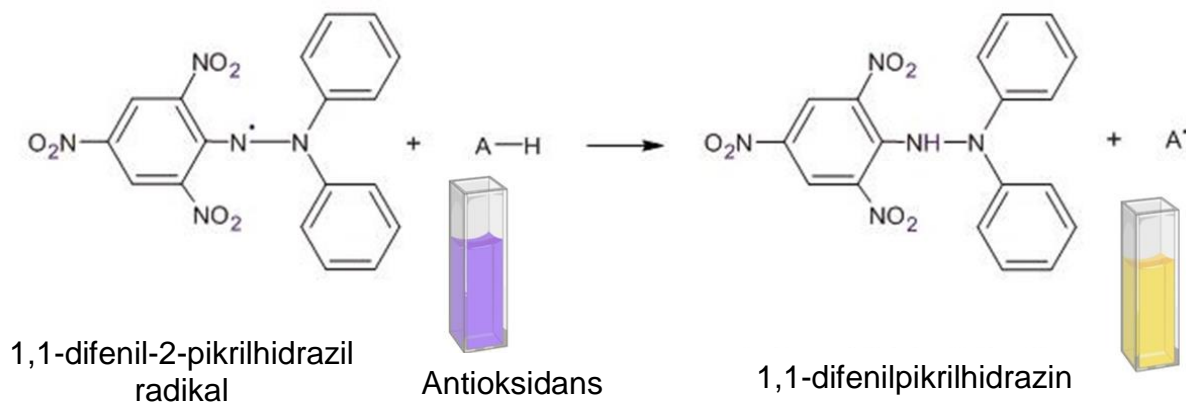
slobodne radikale. Jedan od nedostataka je taj što prisutnost drugih reducirajućih komponenata, uključujući i metale, može dovesti do greške u rezultatima. Metode koje se temelje na mehanizmu HAT, a najčešće se rabe su: ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (eng. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i metoda izbjeljivanja krocina (eng. *Crocin Bleaching Assay*) (Flanjak, 2012).

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta meda ne postoji standardizirana metoda, već se kombiniraju različite metode. Najčešće su to spektrofotometrijske/fluorimetrijske metode kao što su FRAP, DPPH•, TEAC i ORAC zajedno s metodom određivanja ukupnih fenola. Niti jedna metoda ne prikazuje mehanizme djelovanja svih slobodnih radikala i svih antioksidansâ koji su prisutni u kompleksnom sustavu kao što je med (Becker i sur., 2004; Flanjak, 2012).

Brojna istraživanja su pokazala da postoji povezanost između antioksidacijskog kapaciteta meda i udjela fenola. Također su utvrdili da tamnije vrste meda imaju mnogo veći antioksidacijski kapacitet od svjetlijih vrsta (Beretta i sur., 2005; Bertonecelj i sur., 2007).

#### 2.14.1. Metoda DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal)

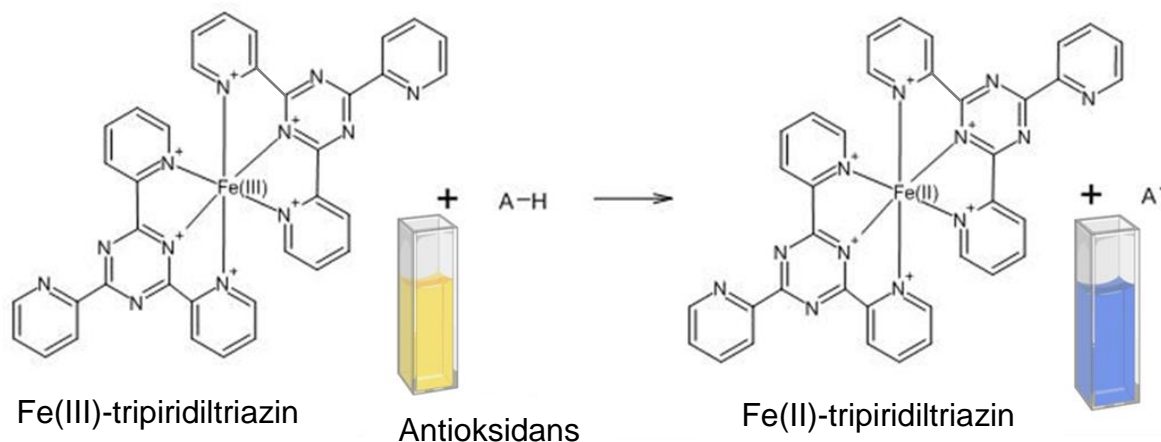
Metoda DPPH• je najčešće korištena metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti u uvjetima *in vitro*. Temelji se na redukciji slobodnog radikala DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) koji ima jedan slobodni elektron koji kruži oko kompleksa DPPH• dajući mu ljubičastu boju. Kompleks je stabilan na sobnoj temperaturi s apsorpcijskim maksimumom na valnoj duljini od 520 nm. Kada se otopina DPPH• pomiješa s antioksidansom (donorom vodikova atoma) DPPH• se reducira pri čemu reakcijska smjesa gubi ljubičastu boju te se može obojiti žuto zbog prisutne pikrilne skupine (slika 17) (Brand-Williams i sur., 1995; Shimada i sur., 1992; Molyneux, 2004; Ashgar i sur., 2008).



**Slika 17.** Prikaz reakcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH•) s antioksidansom (Musa i sur., 2016).

#### 2.14.2. Metoda FRAP (eng. *Ferring Reducing Antioxidant Power*)

Metoda se temelji na antioksidacijskoj sposobnosti testirane tvari da doniranjem elektrona u kiselj sredini (pH = 3,6) reducira željezo u žutom kompleksu Fe(III)-tripiridiltriazina u njegov reducirani Fe(II) oblik pri čemu dolazi do plavog obojenja (slika 18). Spektrofotometrijski se mjeri intenzitet nastalog plavog obojenja pri valnoj duljini od 593 nm, a on je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti. Osnovna kemijska reakcija je ista za sve modifikacije testova FRAP (Berker i sur., 2007). Nedostatak ove metode je što će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidacijsku sposobnost ili ne, a posjeduje niži redoks potencijal od  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , dovesti do redukcije željeza iz feri u fero oblik i tako povećati vrijednost FRAP-a. Prednost ove metode je brzina, jednostavnost, robusnost i niska cijena (Benzie i Strain, 1999; Karadag i sur., 2009; Flanjak, 2012).



**Slika 18.** Prikaz reakcije Fe(III)-tripiridiltriazina s antioksidansom (Huang i sur., 2005).

## 2.15. Metode za procjenu citogenetičkih učinaka

### 2.15.1. Kromosomske aberacije

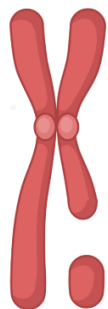
Strukturne aberacije su oštećenja kromosomske strukture koja su vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom. Razlikujemo kromatidne aberacije koje zahvaćaju samo jednu sestrinsku kromatidu jednoga ili više kromosoma i kromosomske aberacije koje uključuju obje sestrinske kromatide jednoga ili više kromosoma. Strukturne aberacije kromosoma mogu se također podijeliti na nestabilne i stabilne. Učestalost nestabilnih aberacija u limfocitima postupno se smanjuje nakon prestanka izlaganja mutagenu, dok se stabilne aberacije mogu otkriti i nakon mnogo godina. Nestabilne aberacije su bicentrični i prstenasti kromosomi, acentrični fragmenti te drugi asimetrični rearanžmani kromosoma. One mogu sterički ometati diobu stanice ili dovesti do gubitka genetičkog materijala u stanicama kćerima, čime se mijenja ekspresija pojedinih gena, a u konačnici nastupa i smrt stanice. Stabilne aberacije su uravnotežene translokacije, inverzije i drugi simetrični rearanžmani koji se diobom mogu prenijeti u stanice kćeri. Mogu se detektirati samo posebnim tehnikama bojanja kromosoma (metode pruganja, fluorescencijska *in situ* hibridizacija – FISH) (Bender i sur., 1988).

Analiza se temelji na 48-satnome uzgoju limfocita iz periferne krvi u hranjivom mediju. Limfociti se u uvjetima *in vitro* potiču na diobu pomoću mitogena fitohemaglutinina. Za vrijeme rasta u kulturi, limfociti prolaze kroz sve faze staničnog ciklusa. Međutim, da bi se mogla analizirati oštećenja na kromosomima, potrebno je zaustaviti diobu u metafazi, kada su oni najbolje uočljivi. To se postiže dodavanjem citostatika kolhicina u kulture tijekom posljednja tri sata kultiviranja. Kolhicin sprječava stvaranje diobenog vretena pa metafazni kromosomi ostaju raspršeni u citoplazmi. Po isteku 48. sata kultiviranja pristupa se izradi mikroskopskih preparata. U prvom koraku primjenom hipotonične otopine kalijeva klorida odvajaju se i liziraju eritrociti, a talog u kojem su limfociti pročišćava se s nekoliko uzastopnih centrifugiranja i fiksiranja stanica otopinom fiksativa (metanol i ledena octena kiselina, 3:1). Pročišćena suspenzija limfocita nakapava se na predmetna stakalca. Mikroskopski preparati suše se na zraku, oboje citološkom bojom Giemsa i pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 1000x) (Albertini i sur., 2000; Vulic i sur., 2015) .

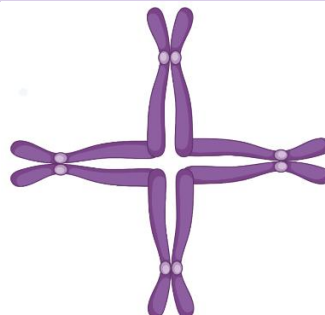
Shematski prikaz vrsta strukturnih aberacija dan je na slici 19.

## KROMATIDNE ABERACIJE

Kromatidni lom



Kromatidne izmjene (tetradrijus)



## KROMOSOMSKE ABERACIJE

Kromosomski lom



Izmjene dijelova između različitih kromosoma

Bicentrični kromosom

Acentrični fragment



Izmjene dijelova između dva kraka istog kromosoma

Centrični prsten



Acentrični fragment



Izmjene dijelova unutar istog kraka kromosoma

„Minute“



Asimetrične

Recipročna translokacija



Pericentrična inverzija



Paracentrična inverzija



Simetrične



**Slika 19.** Vrste strukturalnih aberacija kromosoma. Prilagođeno prema IAEA (2001).

Napravljeno pomoću BioRender.com.

### 2.15.2. Citohalazinom B-blokirani mikronukleus-test (CBMN-test)

Citohalazinom B-blokirani mikronukleus-test na limfocitima periferne krvi (eng. *Cytokinesis-Block Micronucleus Assay*, CBMN) predstavlja standardni test za procjenu genotoksičnosti. Brži je i jednostavniji od testa analize strukturnih aberacija kromosoma, također uključuje limfocite koji se lako uzgajaju, a može podjednako uspješno otkriti i oštećenja diobenog vretena i kromosomske aberacije (Fenech i Morley, 1985; Norppa i sur., 1993; Kirsch-Volders i sur., 1997; Kopjar i sur., 2010).

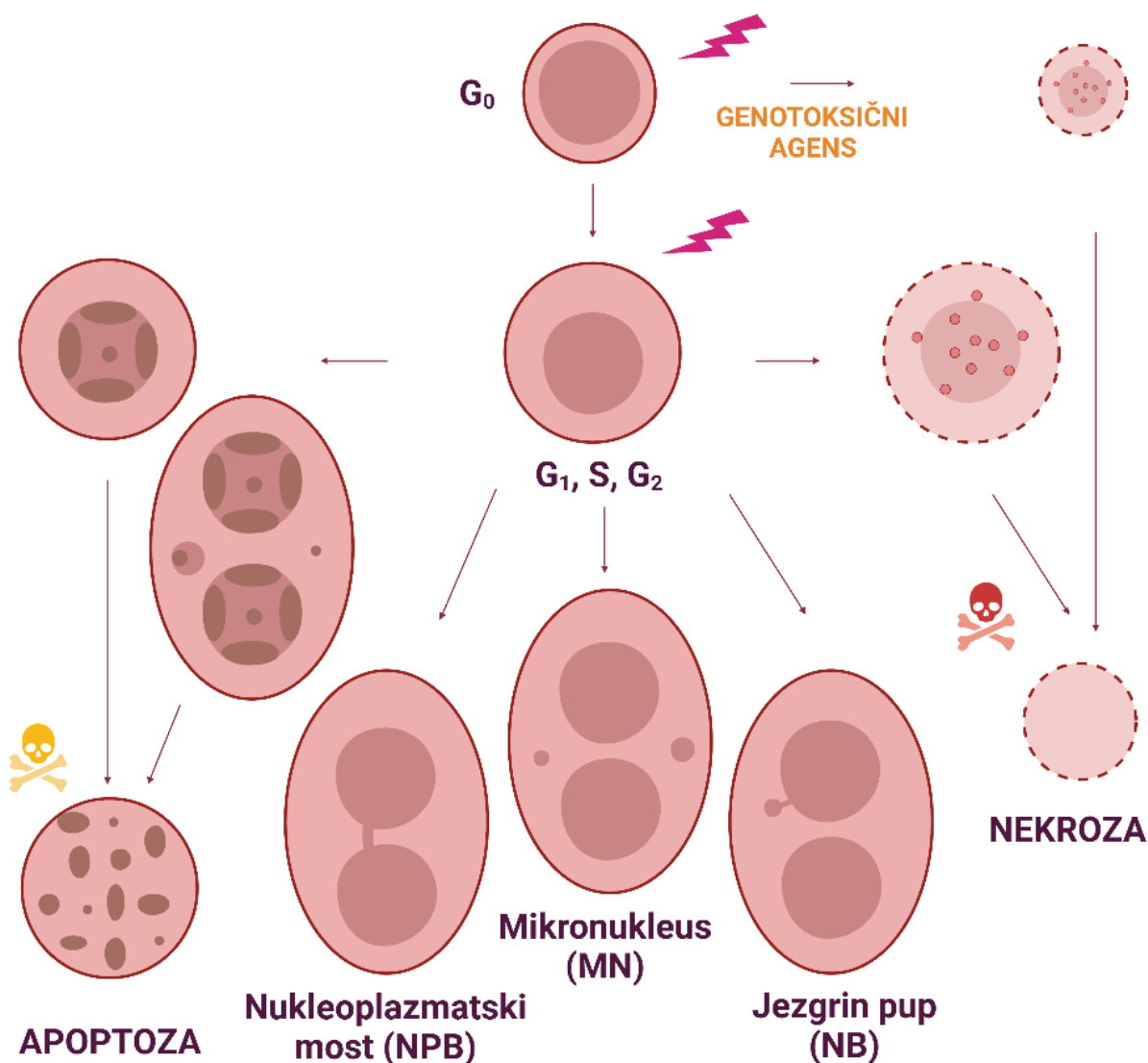
Mikronukleusi su male kromatinske strukture promjera 1/16 – 1/3 promjera glavnih jezgara, smještene samostalno unutar interfazne citoplazme, nalikuju na jezgru, ali su u potpunosti odvojeni od nje (Fenech i sur., 2003). Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata nastalih nakon lomova koji su zaostali u anafazi, a nisu se uspjeli ugraditi u stanice kćeri ili cijelih kromosoma. Nastaju uslijed oštećenja diobenog vretena, oštećenja kinetohora, dijelova mitotskog aparata ili kromosomskih podstrukture te mehaničkih oštećenja (Albertini i sur., 2000, Kopjar i sur., 2010). Pojavnost mikronukleusa upućuje na strukturne i numeričke aberacije kromosoma, kvantitativni je pokazatelj genotoksičnog učinka te se može rabiti i u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Fenech i Morley, 1985; Fenech i sur., 2003, Kopjar i sur., 2010).

Osim mikronukleusa, primjenom CBMN-testa mogu se otkriti i druge morfološke promjene u binuklearnim stanicama, kao što su jezgrini pupovi (eng. *Nuclear Buds*, NB) i nukleoplazmatski mostovi (eng. *Nucleoplasmic Bridges*, NPB). Pupovi morfološki nalikuju mikronukleusima, ali su s jezgrom povezani uskom ili širokom „stabljikom“ nukleoplazmatskog materijala, ovisno o fazi pupanja. Uglavnom sadrže intersticijalnu DNA i nastaju uklanjanjem sadržaja iz jezgre, primjerice amplificirane DNA, prekobrojnih kromosoma i sl. Mostovi predstavljaju neprekinutu nukleoplazmatsku vezu između jezgara u binuklearnoj stanici. Širina nukleoplazmatskog mosta može se znatno razlikovati, ali obično ne prelazi jednu četvrtinu promjera jezgara unutar stanice. Nastaju tijekom anafaze kada se centromere bicentričnih i/ili policentričnih kromosoma povuku na suprotne polove stanice tijekom mitoze. Mogu nastati i fuzijom telomera kromosoma (Fenech i sur. 2011).

Nadalje, primjenom CBMN-testa mogu se procijeniti i citotoksični učinci, jer ova metoda omogućuje morfološko razlikovanje stanica u apoptozi i nekrozi. Stanice u

ranog apoptozi sadrže kondenzirani kromatin unutar jezgre, dok je u kasnoj apoptozi prisutna fragmentacija kromatina u manja nuklearna tijela, sadržana unutar netaknute citoplazme. Stanice u ranog nekrozi imaju blijedo obojenu citoplazmu s brojnim vakuolama i oštećenu citoplazmatsku membranu. U kasnoj nekrozi vidljiv je gubitak citoplazme i oštećena / nepravilna jezgrina membrana, a često je vidljivo i izlivanje jezgrinog sadržaja (Fenech i sur., 2003).

Shematski prikaz vrsta citogenetičkih oštećenja koja se otkrivaju primjenom CBMN-testa dan je na slici 20.



**Slika 20.** Vrste citogenetičkih oštećenja koja se otkrivaju primjenom CBMN-testa (Fenech i sur., 2003). Napravljeno pomoću BioRender.com.

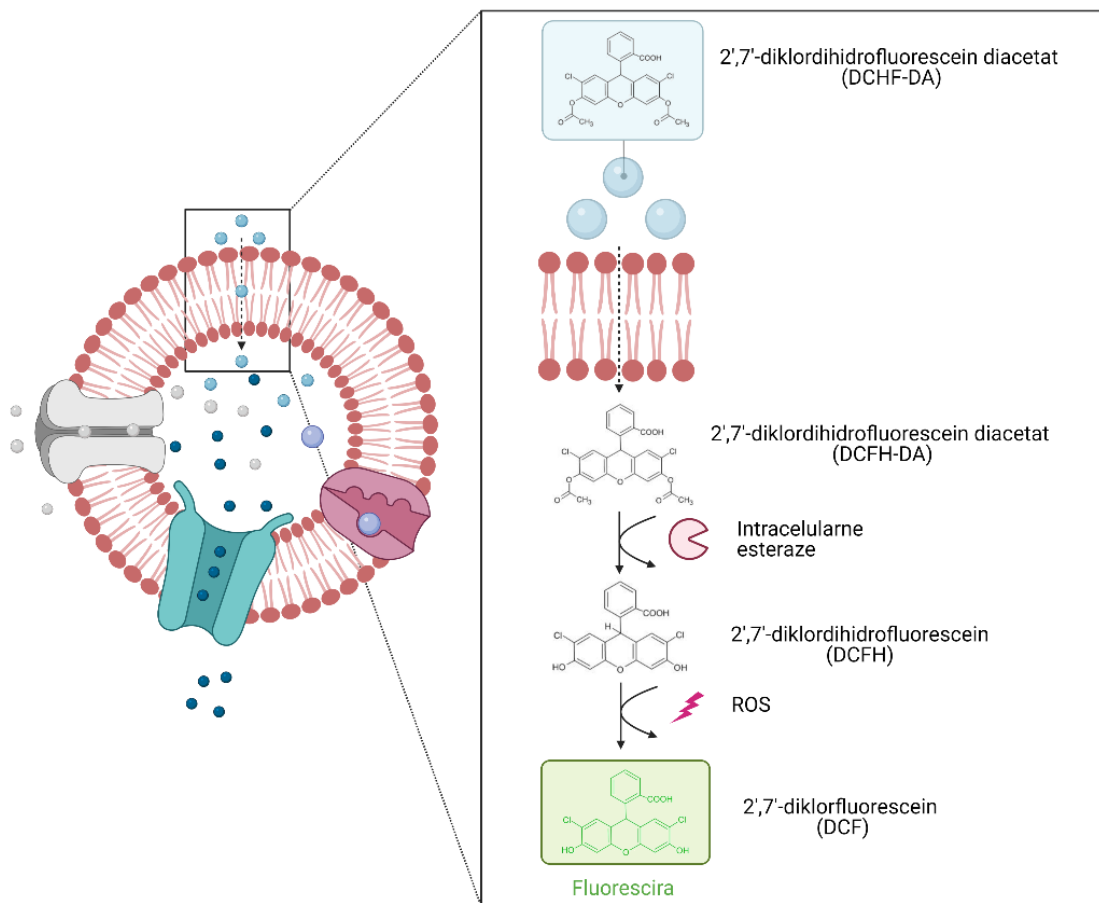
CBMN-test dodatno omogućuje uvid u proliferaciju stanica u uvjetima *in vitro*. Za vrijeme mikroskopske analize uočavaju se limfociti s jednom, dvjema, trima i više glavnih jezgara. Relativne učestalosti tih stanica mogu se rabiti za opisivanje napretka staničnog ciklusa limfocita nakon stimulacije mitogenom. Podatak o tome dobiva se iz indeksa diobe jezgara (eng. *Nuclear Division Index*, NDI) (Eastmond i Tucker, 1989). Sličan se podatak dobiva i iz tzv. proliferacijskog indeksa u limfocitima s blokiranom citokinezom (eng. *Cytokinesis-Block Proliferation Index*, CBPI), koji se izračunava na temelju broja svih pregledanih živih i mrtvih stanica (Lorge i sur., 2008; OECD, 2016).

## 2.16. Određivanje citotoksičnih učinaka testom *Neutral red*

Jedan od najčešće korištenih testova citotoksičnosti je test *Neutral red* koji omogućuje kvantitativnu procjenu broja živih stanica u kulturi. Ovaj jednostavan test temelji se na svojstvu živih stanica da aktivnim transportom unose boju *Neutral red* (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) i vežu je u lizosomima (Repetto i sur., 2008). Ukoliko dođe do oštećenja stanične ili lizosomalne membrane, smanjuje se unos i zadržavanje boje nakon ispiranja i procesa fiksacije (Babich i Borenfreund, 1991). Nakupljanje boje unutar lizosoma znači da nije došlo do oštećenja staničnih membrana. Nakupljena boja u stanici se zatim ekstrahira i mjeri se apsorbancijom pri 540 nm koja je u neposrednoj ovisnosti s brojem živih stanica (Babich i Borenfreund, 1991).

## 2.17. Određivanje prooksidacijskog učinka testom DCFH-DA

Prooksidacijski učinak istraživane tvari određuje se mjerenjem ROS-a. Neionski i nepolarni 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) difuzijom prolazi kroz staničnu membranu nakon čega ga unutarstanične esterase deacetiliraju. Nastaje 2',7'-diklordihidrofluorescein (DCFH) koji reagira s ROS-om u stanici i oksidira se u fluorescentni 2',7'-diklorfluorescein (DCF) koji fluorescira (slika 21) (Afri i sur., 2004). Jačina fluorescencije proporcionalna je udjelu ROS-a (Yang i sur., 1998).



**Slika 21.** Shematski prikaz ulaska 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) u stanicu. Napravljeno pomoću BioRender.com.



## 2.18. Antioksidacijski učinak meda obične planike, njegova ekstrakta i homogentizinske kiseline (HGA) na DNA plazmid phiX174 RF1

Kao što je prethodno navedeno, oksidacijska oštećenja DNA generiraju u stanicama ROS-ove kao rezultat staničnog metabolizma i/ili međudjelovanja s egzogenim izvorima poput kancerogenih spojeva, lijekova i ionizirajućeg zračenja. ROS-ovi s kojima se aerobne stanice najčešće susreću mogu oštetiti DNA i dovesti do lezija baze i šećera, pucanja lanaca, umrežavanja DNA i proteina te stvaranja apurinskih i apirimidinskih mjesta (Li i sur., 1994; Alsulami i sur., 2019).

Za ispitivanje antioksidacijskog učinka meda obične planike, ekstrakta i HGA na genetički materijal, kao *in vitro* model korišten je DNA plazmid phiX174 RF1. To je dvolančani kružni plazmid dugačak 5386 pb s molarnom masom od  $3,5 \times 10^6$  Da, a izoliran je iz bakterije *Escherichia coli* (Sanger i sur., 1977). Ovaj plazmid nije podložan oksidacijskom oštećenju djelovanjem vodikova peroksida ili lomovima koje može uzrokovati UV zračenje. No, u prisutnosti kombinacije vodikova peroksida i UV zračenja dolazi do puknuća superzavijene strukture što izaziva djelomično razmatanje plazmida te taj djelomično razmotan oblik plazmida u gelu putuje sporije od neoštećenog superzavijenog plazmida. Cilj ovog eksperimenta je utvrditi da li će med obične planike, HGA i ekstrakt smanjiti oksidacijska oštećenja nastala istovremenim djelovanjem UV zračenja i vodikova peroksida (Li i sur., 1994; Gilmour i sur. 1996; Thibodeau i Paquette, 1999).

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

### 3.1. Uzorci

Uzorci meda obične planike prikupljeni su u neposrednom kontaktu s pčelarima. Prikupljeno je osam uzoraka meda s područja južne Hrvatske proizvedenih od 2016. do 2018. godine.

Uzorci meda su, po obavljenom uzorkovanju, pohranjeni u staklene posude, poklopljeni metalnim poklopcem te skladišteni na temperaturi 4 – 8 °C do provođenja analiza. Slika 22 prikazuje uzorke s pripadajućim oznakama, godinu proizvodnje te lokacije s kojih potječu proizvedeni uzorci meda.



Oznaka uzorka	Lokacija proizvodnje	Godina proizvodnje
R1	Konavle	2018.
R2	Konavle	2018.
V5	Vrgorac	2017.
V6	Vrgorac	2017.
K7	Konavle	2016.
K8	Konavle	2016.
N14	Pelješac	2016.
M15	Molunat	2016.

**Slika 22.** Područja južne Hrvatske s kojih je prikupljen med obične planike u direktnom kontaktu s pčelarima u vremenskom periodu između 2016. i 2018. godine. Prikupljeno je osam uzoraka meda obične planike s juga Hrvatske kojima su dodijeljene pripadajuće oznake.

## 3.2. Stanične linije

Istraživanja u ovome radu provedena su na humanim staničnim modelima karcinoma pločastih stanica jezika (Cal27), hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) i adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2). Stanične linije opisane su u poglavlju 2.10.

## 3.3. Kemikalije i uređaji

### 3.3.1. Popis kemikalija

#### Melisopalinološka analiza

- glicerinski gel, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- fuksin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- destilirana voda

#### Fizikalno-kemijska svojstva

- natrijev hidroksid (NaOH), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- bakrov sulfat-pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- kalijev natrijev tartarat-tetrahidrat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- klorovodična kiselina (HCl; 36,5 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- saharoza, Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- metilensko modriilo, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- fenolftaleinska otopina (0,5 % u etanolu), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- destilirana voda

Otopine:

Fehlingova otopina A	Fehlingova otopina B	Standardna otopina invertnog šećera (10 g L <sup>-1</sup> )	Metilensko modrilo
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (69,28 g) Destilirana voda (do 1 L)  Otopina se pripremi 24 sata prije titracije.	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O (346 g) NaOH (100 g) Destilirana voda (do 1 L)  Otopina se filtrira.	Saharoza (9,5 g) HCl (36,5 %; 5 mL) Destilirana voda (do 1 L)  <b>Radna otopina (2 g L<sup>-1</sup>)</b>  Standardna otopina (10 g L <sup>-1</sup> ) NaOH (1 mol L <sup>-1</sup> )	Metilensko modrilo (2 g) Destilirana voda (do 1 L)
<i>Standardizacija Fehlingovih otopina</i> Fehlingove otopine A (5 mL) Fehlingove otopine B (5 mL) Radna otopina invertnog šećera (2 g L <sup>-1</sup> ; 25 mL)			Do potpune reakcije

### Spektrofotometrijske metode

a) *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH•:*

- metanol (99,9 %), Merck (Darmstadt, Njemačka)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikal (DPPH•), Fluka (Buch, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Fluka (St. Gallen, Švicarska)

*Priprava reagensa:*

<b>0,18 mmol L<sup>-1</sup></b> <b>1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH•)</b>	<b>4 mmol L<sup>-1</sup></b> <b>6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox)</b>
DPPH• (18 mg) Metanol (do 250 mL)	Trolox (10 mg) Metanol (do 10 mL)

b) *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP:*

- klorovodična kiselina (HCl; 36,5 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev acetat-trihidrat (CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- koncentrirana octena kiselina (CH<sub>3</sub>COOH; 99,5 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- željezov(III) klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- željezov(II) sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Priprava otopina:

300 mmol L <sup>-1</sup> Acetatni pufer (pH = 3,6)	10 mmol L <sup>-1</sup> TPTZ	20 mmol L <sup>-1</sup> FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	500 mmol L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	Reagens FRAP
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> NaO <sub>2</sub> ×3H <sub>2</sub> O Octena kiselina (14,5 mL) Destilirana voda (do 1000 mL)	TPTZ (31 mg) 40 mmol L <sup>-1</sup> HCl (do 10 mL)	FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O (54 mg) Destilirana voda (do 10 mL)	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O (1391 mg) Destilirana voda (do 10 mL)	300 mmol L <sup>-1</sup> Acetatni pufer (100 mL) 10 mmol L <sup>-1</sup> TPTZ (10 mL) 20 mmol L <sup>-1</sup> FeCl <sub>3</sub> (10 mL)

c) *Određivanje udjela ukupnih fenola:*

- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- etanol (96 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- fruktoza, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- glukoza, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- maltoza, Torlak (Beograd, Srbija)
- saharoza, Fluka (St. Gallen, Švicarska)

Priprava radnog standarda galne kiseline i otopine šećera (umjetni med):

Galna kiselina (5000 mg L <sup>-1</sup> )	Umjetni med (otopina šećera)	Korištena za sve provedene analize
Galna kiselina (55 mg) Etanol (1 mL) Destilirana voda (do 10 mL)	Fruktoza (40 mg) Glukoza (30 mg) Maltoza (8 mg) Saharoza (2 mg) Destilirana voda (do 10 mL)	

d) Metode za određivanje udjela ukupnih flavonola, flavona i flavanona

- aluminijev klorid (AlCl<sub>3</sub>), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNP; 97 %), Kemika (Zagreb, Croatia)
- kvercetin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- naringenin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- metanol (99,9 %), Merck (Darmstadt, Njemačka)
- etanol (96 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- kalijev hidroksid (KOH), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Priprava radnih standarda i otopina:

Kvercetin (1 g L <sup>-1</sup> )	Naringenin (5 g L <sup>-1</sup> )	Aluminijev klorid (5 %)	Otopina DNP (1 %)	Otopina KOH (10 %)
Kvercetin (1 mg) Destilirana voda (do 1 mL)	Naringenin (5 mg) Destilirana voda (do 1 mL)	Aluminijev klorid (5 g) Metanol (do 100 mL)	DNP (1 g) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 mL) Metanol (do 100 mL)	KOH (10 g) Metanol (do 100 mL)

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenola UHPLC-LTQ Orbitrap MS-om

- acetonitril (čistoće za MS), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- octena kiselina (CH<sub>3</sub>COOH; 99,99 %), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- klorovodična kiselina (HCl; 36,5 %), Merck (Darmstadt, Njemačka)
- metanol (čistoće za HPLC), Merck (Darmstadt, Njemačka)

- ultračista voda (0,055  $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
- Standardi:

Galna kiselina	Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
Protokatehinska kiselina	
4-Hidroksibenzojeva kiselina	
4-Hidroksifeniloctena kiselina	
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	
Kafeinska kiselina	
Ferulinska kiselina	
Neoklorogenska kiselina	
Pinocembrin	
Naringenin	
Krizin	
Apigenin	
Luteolin	
Akacetin	
Galangin	
Kamferol	
Kvercetin	
Kamferol-7-glukozid	
Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozid	
Rutin	
Izorhamnetin 3- <i>O</i> -glukozid	

#### Dobivanje ekstrakta meda i određivanje HGA GC-MS-om

- metanol (99,9 %), Merck (Darmstadt, Njemačka)
- homogentizinska kiselina (HGA), Sigma-Aldrich (Steinhheim, Njemačka)
- *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoracetamid (BSTFA) s 1 % trimetilklorosilanom (TMCS), Restek (Bellefonte, SAD)
- etil-acetat, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- destilirana voda

#### Kromosomske aberacije i CBMN-test

- medij RPMI 1640 (L-glutamin, 25 mmol L<sup>-1</sup> Hapes), Lonza, BioWhittaker (Walkersville, SAD)
- citohalazin B, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- kolhicin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- irinotekan, LC Laboratories, (Woburn, SAD)
- bleomicin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)



- fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran (FBS), Gibco (Carlsbad, SAD)
- penicilin i streptomycin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- fitohemaglutinin, Remel (San Diego, SAD)
- kalijev klorid (KCl; 0,075 mol L<sup>-1</sup>), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- metanol (99,9 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (CH<sub>3</sub>COOH; 99,9 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- dimetilsulfoksid (DMSO), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- boja Giemsa, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- glicerol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- fiziološka otopina (0,9 %-tna otopina natrijeva klorida)

*Otopine:*

Ibraimova otopina	Otopina za fiksiranje	Otopina Giemsa	Otopina kolhicina	Otopina citohalazina B
Metanol (3 mL) Ledena octena kiselina (5 mL) Destilirana voda (do 100 mL)	Metanol (300 mL) Ledena octena kiselina (100 mL)	Giemsa boja (5 mL) Destilirana voda (do 100 mL)	<b>Izvorna otopina</b>	<b>Izvorna otopina</b>
			Kolhicin (40 mg) Destilirana voda (do 100 mL)	Citohalazin (10 mg) DMSO (2 mL)
			<b>Radna otopina (0,004 %)</b>	<b>Radna otopina</b>
			Ishodišna otopina (1 mL) Destilirana voda (do 10 mL)	Ishodišna otopina (1 mL) F-10 medij (do 10 mL)

Uzgoj stanica, provođenje testa citotoksičnosti i određivanje prooksidacijskog učinka

*a) Kemikalije za uzgoj stanica:*

- medij RPMI 1640 (L-glutamin, 25 mmol L<sup>-1</sup> HEPES), Lonza, BioWhittaker (Walkersville, SAD)
- fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran (FBS), Gibco (Carlsbad, SAD)
- otopina EDTA-tripsina (0,02 % EDTA; 0,25 % tripsin), Gibco (Carlsbad, SAD)
- penicilin (10000 U mL<sup>-1</sup>) i streptomycin (10 mg mL<sup>-1</sup>), Gibco (Grand Island, NY, SAD)

b) *Test citotoksičnosti (test Neutral red):*

- ledena octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 99,9 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- *Neutral red* (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin-hidroklorid), Sigma-Aldrich (Steinhheim, Njemačka)
- trikloroocena kiselina (TCA), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- kalijev klorid ( $\text{KCl}$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidrogenfosfat dekahidrat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ), Acros Organics (New Jersey, SAD)
- kalijev hidrogenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- etanol (96 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 99,5 %), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

c) *Prooksidacijski učinak:*

- dimetilsulfoksid (DMSO), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2',7'-diklorfluoroscein-diacetat (DCFH-DA), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- Fosfatni pufer – PBS pufer ( $\text{pH} = 7,2 - 7,4$ )

*Priprava otopina:*

<b>Fosfatni pufer – PBS (<math>\text{pH} = 7,2 - 7,4</math>)</b>	<b><i>Neutral red</i></b>	<b>Otopina za odbojavanje</b>	<b>Otopina DCFH-DA</b>
NaCl (8,0 g) KCl (0,2 g) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (2,2 g) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,2 g) Destilirana voda (do 1000 mL)	<b>Izvorna otopina</b> (5 mg mL <sup>-1</sup> )	Octena kiselina (1 mL) Etanol (50 mL) Destilirana voda (49 mL)	<b>Izvorna otopina</b> (2 mmol L <sup>-1</sup> )
	<i>Neutral red</i> (50 mg) Etanol (do 10 mL)		DMSO (2 mL) DCFH-DA (2 mg)
	<b>Radna otopina</b> (0,005 mg mL <sup>-1</sup> )		<b>Radna otopina</b> (50 μmol L <sup>-1</sup> )
	Izvorna otopina (0,1 mL) RPMI medij za uzgoj stanica (do 10 mL)		Izvorna otopina (0,5 mL) pufer PBS (9,3 mL)
Sterilizira se 15 minuta pri 120 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa			

d) *Antioksidacijski učinak na DNA plazmid phiX174 RF1*

- DNA plazmid phiX174 RF1, Promega Corporation, Wisconsin, SAD
- TRIS pufer, Invitrogene (Massachusetts, SAD)
- ledena octena kiselina (CH<sub>3</sub>COOH; 99,9 %), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- agaroz, Invitrogen (Massachusetts, SAD)
- bromtimol plavo, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- glicerol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- vodikov peroksid (3 %), Merck (Darmstadt, Njemačka)
- etidijev bromid, Merck (Darmstadt, Njemačka)

*Priprava otopina:*

TAE pufer	Agarozni gel (1,5 %)	Obojeni pufer za nanošenje (eng. <i>loading buffer</i> )
TRIS (48,4 g) Ledena octena kiselina (11,4 mL) EDTA (3,7 g) Destilirana voda (do 1 L)	Agaroz (1,5 g) TAE pufer (do 100 mL)	Bromtimol plavo (0,2 g) Glicerol (50 %; 6 mL) Destilirana voda (4 mL)

## 3.3.2. Popis opreme

*Melisopalinološka analiza*

- mikroskop Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Jena, Njemačka) priključen na digitalni fotoaparati model AxioCam 208 Color (Carl Zeiss, Jena, Njemačka) i povezan sa sustavom za analizu (ZEN 3.1 plavo izdanje)

*Fizikalno-kemijska svojstva*

- polarimetar, Carl Zeiss (Jena, Njemačka)
- refraktometar Model I, Carl Zeiss (Jena, Njemačka)
- konduktometar SevenGo, Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- analitička vaga AX 200, Shimadzu (Kyoto, Japan)
- vodena kupelj VK3EN, INKO (Zagreb, Hrvatska)

*Spektrofotometrijske metode:*

- UV-VIS spektrofotometar, Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)

### *Kvalitativna i kvantitativna analiza fenola*

- kolone za ekstrakciju na čvrstom nosaču (eng. *Solid-Phase Extraction*, SPE) C18–E (500 mg; 3 mL), Phenomenex (Torrance, SAD)
- PTFE filteri za HPLC (0,45 µm), Supelco (Bellefonte, SAD)
- sustav za dobivanje ultračiste vode (MicroPure, 0,055 µS cm<sup>-1</sup>), TKA (Niederelbert, Njemačka)
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti uz spektrometar masa visoke rezolucije kao detektor UHPLC–LTQ Orbitrap XL, ThermoFisher Scientific (Bremen, Njemačka)
- kolona Synchronis C18 (100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 µm), ThermoFisher Scientific (Bremen, Njemačka)

### *Dobivanje ekstrakta meda i određivanje HGA*

- kolone za ekstrakciju na čvrstom nosaču [eng. *Solid-Phase Extraction* (SPE)] Oasis HLB (200 mg; 3 mL), Waters (Etten-Leur, Nizozemska)
- PTFE filteri (0,2 µm), LLG Labware (Meckenheim, Njemačka)
- plinski kromatograf TRACE 1300, Thermo Scientific (Milano, Italija) spregnut sa spektrometrom masa ITQ 700 Ion Trap, Thermo Scientific (Austin, SAD) uz računalni program Xcalibur (verzija 2.1, Thermo Fisher, Bremen, Njemačka).
- kapilarna kolona TraceGOLD TG-5MS (5 % difenil, 95 % dimetilpolisiloksan; duljina: 30 m; unutarnji promjer: 0,25 mm; debljina filma: 0,25 µm), Thermo Scientific (Runcorn, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- rotacijski vakuum-uparivač, Devarot (Ljubljana, Slovenija)

### *Kromosomske aberacije i CBMN-test*

- inkubator Heraeus Hera Cell 240, Thermo Scientific (Runcorn, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- epruvete za vađenje krvi s litij-heparinom Becton Dickinson (Wokingham, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- centrifuga ROTOFIX 32A, Hettich (Tuttlingen, Njemačka)
- svjetlosni mikroskop, Leitz Laborlux D (Hesse, Njemačka)

*Uzgoj stanica, test citotoksičnosti, određivanje peroksidacijskog učinka i antioksidacijskog učinka na DNA plazmid phiX174 RF1*

- analitička vaga 712 Mp8, Siver Edition, Sartorius (London, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- centrifuga HC-240, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Forma Scientific (Austin, SAD)
- invertni mikroskop, Optika Microscopes (Ponteranica, Italija)
- komora za sterilni rad, Iskra (Ljubljana, Slovenija)
- spektrofotometar i čitač mikrotitarskih pločica, Cecil Instruments Ltd, Technical Centre (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- vaga (Sartorius, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- vibromikser EV-202, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- sustav za elektroforezu Owl EasyCast B1 Mini Gel Electrophoresis System, Thermo Scientific (Runcorn, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- UV transiluminator UVIpure BXT-F26 MX UVITEC Cambridge (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Gel Analyzer 19.1, [www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Melisopalinološka analiza

Peludni spektar, morfometrija peludnih zrna i relativna učestalost peludnih vrsta nektarifernih vrsta provedeni su u sedimentu meda na svjetlosnom mikroskopu pri uvećanju 400 – 1000x. Identifikacija je podržana literaturnim podacima i internom referentnom bibliotekom peludnog zrna (Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet).

#### 3.4.2. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara meda

Fizikalno-kemijski parametri u medu određeni su prema međunarodno priznatim metodama za analize meda (IHC, 2009), a u skladu s propisima komisije Codex Alimentarius (2001) i Direktive o medu (The Council of the European Union, 2002).

##### 3.4.2.1. Određivanje masenog udjela vode u medu

Priprema uzorka meda za analizu ovisi o njegovoj konzistenciji (IHC, 2009). Svi uzorci meda bili su u tekućem stanju te su se prije analize promiješali štapićem.

Maseni udio vode u medu odredio se pri temperaturi od 20 °C pomoću refraktometra. Na temelju izmjerenog indeksa refrakcije izračunat je maseni udio vode (% w/w) pomoću tablice za proračun udjela vode u medu (IHC, 2009).

Ako se indeks refrakcije određuje na temperaturi koja nije 20 °C, u obzir se uzima korekcija temperature:

- temperatura viša od 20 °C – dodati 0,00023 za svaki °C
- temperatura do 20 °C – oduzeti 0,00023 za svaki °C

##### 3.4.2.2. Određivanje kiselosti meda

Uzorak meda se titrirao, uz prisutnost indikatora fenolftaleina, otopinom natrijeva hidroksida (0,1 mol L<sup>-1</sup>) do pojave svjetlo ružičaste boje (IHC, 2009).

Kiselost se izračunala prema formuli:

$$Kiselost = 10 \times V \text{ (mmol kg}^{-1}\text{)}$$

gdje je:

V – volumen NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) potreban za neutralizaciju 10 g meda

### 3.4.2.3. Određivanje električne provodljivosti meda

Za određivanje električne provodljivosti meda pripremila se 20 %-tna otopine meda: 20 g meda otopilo se u destiliranoj vodi, prebacilo u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunilo destiliranom vodom do oznake. Dodano je 40 mL pripremljene otopine u posudu i termostatirano na 20 °C u vodenoj kupelji. Mjerila se električna otpornost (obrnuto proporcionalna električnoj provodljivosti) koristeći konduktometar (IHC, 2009).

Električna provodljivost je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$S_H = K \times G$$

gdje je:

$S_H$  – električna otpornost meda ( $\text{mS cm}^{-1}$ )

$K$  – konstanta elektrode ( $\text{cm}^{-1}$ )

$G$  – provodljivost (mS)

Rezultati su prikazani s točnošću  $10^{-2}$  mS  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4.2.4. Određivanje reducirajućih šećera

Metoda se temelji na redukciji Fehlingove otopine titracijom pomoću otopine reduciranih šećera iz meda uz upotrebu metilenskog modrila kao indikatora (IHC, 2009).

a) Izvagana su 2 g homogeniziranoga meda ( $m_2$ ), prenesena u odmjerenu tikvicu obujma 200 mL i otopljena u vodi, a tikvica se dopunila vodom do oznake.

b) Odmjeralo se 50 mL otopine meda pod a) i dodalo joj se destilirane vode do 100 mL (razrijeđena otopina meda).

## PRETHODNA TITRACIJA

Ukupni volumen tvari koja reagira na kraju redukcijske titracije mora biti 35 mL, a to se postiglo dodavanjem određene količine vode prije početka titracije. S obzirom na to da je Pravilnikom za med (NN, 2015) propisano više od 60 % reducirajućih šećera (računatih kao invertni šećer), najprije je obavljena titracija da bi se utvrdio točan volumen vode koji se dodaje kako bi se u postupku analize osigurala redukcija

pri stalnom volumenu. Volumen potrebne količine vode dobio se odbijanjem potrošenog volumena razrijeđene otopine meda u prethodnoj titraciji. Pipetom se odmjerilo 5 mL Fehlingove otopine A i prenijelo u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL, potom je dodano 5 mL Fehlingove otopine B, 7 mL destilirane vode, malo plovućca i 15 mL razrijeđene otopine meda iz birete. Medna se mješavina zagrijala do vrenja, a nakon dvije minute, dodan je 1 mL 0,2 %-tne otopine metilenskog modrila. Titracija je završena nakon tri minute, ponovnim dodavanjem razrijeđene otopine meda sve dok boja indikatora nije iščeznula. Potrošeni volumen razrijeđene otopine meda koji je potpuno reduciran obilježio se s „X mL“.

### ODREĐIVANJE

Pipetom se odmjerilo 5 mL Fehlingove otopine A i prenijelo u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL te je dodano 5 mL Fehlingove otopine B. Potom je dodano (25 mL – „X mL“) destilirane vode, malo kamena plovućca i iz birete razrijeđena otopina meda, tako da je za kompletnu titraciju ostalo oko 1,5 mL („X mL“ – 1,5 mL). Hladna mješavina zagrijavala se do vrenja i dvije minute je održavano umjereno vrenje. Za vrijeme vrenja dodan je 1,0 mL 0,2 %-tne otopine metilenskoga modrila. Titracija se, dodavanjem razrijeđene otopine meda do obezbojenja indikatora, morala završiti ukupno za tri minute. Potrošena količina razrijeđene otopine meda obilježena je s "V mL".

### IZRAČUNAVANJE

Invertni šećer izražen je u g na 100 g uzorka prema sljedećoj formuli:

$$m_{i\check{s}} = \frac{2}{m} \times \frac{1000}{V}$$

gdje je:

$m_{i\check{s}}$  – invertni šećer (g)

$m$  – masa uzorka (g)

$V_2$  – volumen razrijeđene otopine meda potrošen za određivanje (mL)

Napomena: Radi preciznosti i ponovljivosti rezultata nužno je za svaki pokus odrediti koliki volumen vode valja dodati da bi ukupan volumen iznosio 35 mL.



### 3.4.3. Spektrofotometrijske metode

#### 3.4.3.1. *Određivanje ukupnih fenola*

Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem (10 s) uzorka meda (50 µL razrijeđen 10× u destiliranoj vodi), destilirane vode (1,4 mL) i Folin-Ciocalteu reagensa (100 µL). Nakon 5 minuta dodana je otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 %; 1,5 mL) te je smjesa homogenizirana miješanjem 10 sekundi. Slijedila je inkubacija uzoraka u trajanju od 30 minuta pri 40 °C u tami nakon čega je izmjerena apsorbancija spektrofotometrom UV-VIS na 725 nm. Pomoću baždarnog dijagrama za galnu kiselinu izračunat je maseni udio fenola u uzorku i izražen je kao mg ekvivalenata galne kiseline po kg uzorka. Kao slijepa proba korišteno je ekstrakcijsko sredstvo (voda).

#### 3.4.3.2. *Određivanje flavonola i flavona*

Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem (10 s) uzorka meda (200 µL; razrijeđen 5× u destiliranoj vodi), metanola (700 µL) i 5 % otopine aluminijevog klorida (100 µL). Slijedila je inkubacija uzoraka u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi u tami nakon čega je mjerena apsorbancija spektrofotometrom UV-VIS na 425 nm. Pomoću baždarnog dijagrama za kvercetin izračunat je maseni udio flavonola i flavona u uzorku i izražen je kao mg ekvivalenata kvercetina po kg uzorka. Kao slijepa proba korištena je voda.

#### 3.4.3.3. *Određivanje flavanona*

Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem (10 s) uzorka meda (100 µL; razrijeđen 10× u destiliranoj vodi) i 1 % otopine 2,4-dinitrofenilhidrazina (200 µL). Slijedila je inkubacija uzoraka u trajanju od 50 minuta pri 50 °C u tami. Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu dodano je 700 µL 10 % otopine kalijeva hidroksida i 2 mL metanola te je mjerena apsorbancija spektrofotometrom UV-VIS na 495 nm. Pomoću baždarnog dijagrama za naringenin izračunat je maseni udio flavanona u uzorku i izražen je kao mg ekvivalenata naringenina po g uzorka. Kao slijepa proba korištena je voda.

#### 3.4.3.4. Metoda DPPH•

Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem (10 s) uzorka meda (200  $\mu$ L; razrijeđen 10 $\times$  u destiliranoj vodi) vodi i otopine 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikala (0,18 mmol L<sup>-1</sup>; 1,5 mL). Slijedila je inkubacija uzoraka u trajanju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi u tami nakon čega je mjerena apsorbancija spektrofotometrom UV-VIS na 517 nm. Mjerena je početna apsorbancija ( $A_0$  – metanol) i apsorbancija nakon inkubacije ( $A_{30\text{min}}$ ). Rezultat je izražen kao mmol ekvivalenata Troloxa po kilogramu meda.

#### 3.4.3.5. Metoda FRAP

Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem (10 s) uzorka meda (200  $\mu$ L; razrijeđen 20 $\times$  u destiliranoj vodi) i reagensa FRAP (1,8 mL). Slijedila je inkubacija uzoraka u trajanju od 10 minuta na temperaturi pri 37 °C u vodenoj kupelji nakon čega je mjerena apsorbancija spektrofotometrom UV-VIS na 593 nm. Rezultati su izraženi kao mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O u 5 % otopini meda.

#### 3.4.4. Određivanje fenolnog profila meda UHPLC-LTQ Orbitrap MS-om

##### 3.4.4.1. Priprava uzoraka meda za analizu

Za ekstrakciju fenola iz uzoraka meda obične planike korištena je ekstrakcija na čvrstom nosaču (SPE). Uzorak meda (5 g) otopljen je u 5 mL demineralizirane vode, zakiseljen na pH = 2 s 0,1 % klorovodičnom kiselinom, a potom homogeniziran u ultrazvučnoj kupelji 30 minuta na sobnoj temperaturi. Dobivena otopina je potom filtrirana kako bi se uklonile čvrste čestice. Kolone za ekstrakciju su kondicionirane dodavanjem 3 mL acetonitrila i potom 9 mL vode na kolonu, nakon čega je na kolonu dodano 5 mL filtrirane otopine meda bez uporabom vakuuma. Šećer i drugi polarni sastojci meda uklonjeni su sa sorbensa u koloni dodavanjem 6 mL zakiseljene vode (pH = 2). Fenoli su potom eluirani s 1,5 mL acetonitrila i filtrirani prije analize uporabom 0,45  $\mu$ m-filtera.

##### 3.4.4.2. Identifikacija i kvantifikacija fenola

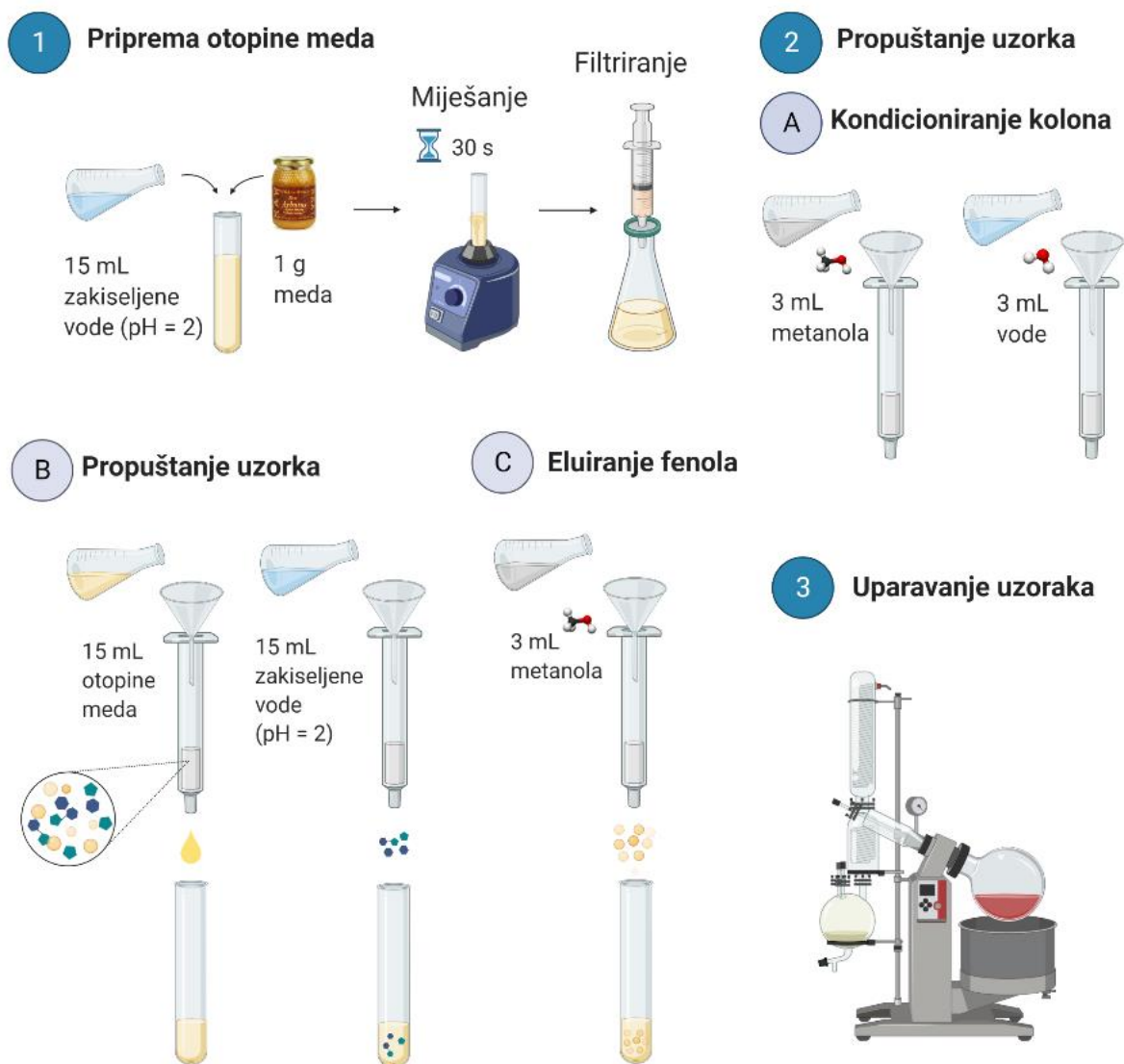
Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenola u meda obične planike korišten je tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti s kvarternom crpkom

Accela 600 i automatskim uzorkivačem Accela te povezan s hibridnim spektrometrom masa visoke rezolucije (UHPLC-LTQ OrbiTrap XL) i ionizaciju elektroraspršenjem uz grijanje (eng. *Heated Electrospray Ionization*, HESI). Za razdvajanje fenolnih spojeva korištena je kolona Synchronis C18 (100 mm × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 μm). Pokretna faza se sastojala od vode, 0,01 %-tne octene kiseline (A) i acetonitrila (B). Analiti su eluirani u sljedećem koncentracijskom gradijentu: 0 – 1 min: 5 % B; 1 – 16 min: 5 – 95 % B; 16 – 16,1 min: 95 – 5% B; 5 % B: 4 min. Protok je bio 0,3 mL min<sup>-1</sup>, a volumen injektiranog uzorka 5 μL.

Spektri masa snimljeni su u negativnom ionizacijskom načinu snimanja u rasponu  $m/z$  od 100 do 1000. Parametri ionskog izvora opisani su u radu Gašića i suradnika (2015). Za kontrolu instrumentnih parametara, prikupljanje i analizu podataka korišten je program Xcalibur. Fenoli su identificirani temeljem odgovarajućih spektralnih karakteristika: spektar masa, točna molarna masa, karakteristična fragmentacija i karakteristično vrijeme zadržavanja analita. Snimanjem točne mase molekulskog iona ( $[M-H]^-$ ) nepoznatog spoja dobivena je informacija o molekularnoj formuli, dok je MS<sup>n</sup> fragmentacija doprinijela u razjašnjavanju strukture nepoznatog spoja (Jurić i sur., 2020).

#### 3.4.5. Priprava fenolnog ekstrakta meda za istraživanje bioloških učinaka

Za ekstrakciju polifenola iz uzoraka meda obične planike korištena je ekstrakcija analita na čvrstom nosaču (SPE). Uzorak meda (1 g) otopljen je u 15 mL demineralizirane vode, zakiseljene na pH = 2 s 0,1 % klorovodičnom kiselinom. Dobivena otopina kratko je promiješana (30 s) te potom filtrirana kako bi se uklonile čvrste čestice. Kolone su kondicionirane dodavanjem 3 mL metanola te potom 3 mL vode na kolonu, nakon čega je na kolonu dodano 15 mL uzorka bez uporabe vakuuma, a zatim 15 mL zakiseljene vode (pH = 2) kako bi se uklonili šećeri i drugi polarni sastojci meda. Fenolni spojevi su potom eluirani s 3 mL metanola. Uzorci su upareni do suhog uporabom rotacijskog vakuum-uparivača (slika 23).



**Slika 23.** Shematski prikaz dobivanja ekstrakta meda obične planike. Napravljeno pomoću BioRender.com.

#### 3.4.5.1. Ekstrakcija HGA iz meda

Za ekstrakciju HGA iz meda kao organsko otapalo upotrijebljen je etil-acetat (Brčić Karačonji i Jurica, 2017). Uzorak meda razrijeđen je ultračistom vodom (1:50, w/v) te je uzorak filtriran kroz 0,2  $\mu\text{m}$ -filter. Alikvot od 2 mL filtrirane otopine prebačen je u staklenu epruvetu s brušenim čepom i zakiseljen na pH = 2 s 1 mol L<sup>-1</sup> klorovodičnom kiselinom, a potom je dodan 1 g natrijeva klorida i otopina je snažno promiješana. Nakon dodatka 2 mL etil-acetata, uzorak je promiješan na vibracijskoj miješalici u trajanju od 1 minute. Nakon razdvajanja vodenog i organskog sloja, 1 mL organskog sloja prebačen je u epruvetu i uparen na sobnoj temperaturi u struji dušika

do suhog ostatka na koji je dodano 50  $\mu\text{L}$  sredstva za derivatizaciju (BSTFA + 1 % TMCS). Derivatizacija je provedena pri 60 °C u trajanju od 30 minuta. Nakon hlađenja, 1  $\mu\text{L}$  uzorka je injektiran u injektor GC-a.

#### 3.4.5.2. Identifikacija i kvantifikacija HGA

Za određivanje HGA u medu obične planike korišten je plinski kromatograf uz spektrometar masa kao detektor (Brčić Karačonji i Jurica, 2017). HGA je razdvojena od ostalih sastojaka iz uzorka na kapilarnoj koloni TG-5MS. Kao pokretna faza korišten je helij uz protok od 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Početna temperatura injektora bila je 50 °C, a nakon 0,1 minute injektor je zagrijan na 280 °C brzinom od 200 °C u minuti. Na početku se temperatura u plinskokromatografskoj pećnici održavala na 60 °C tijekom 1 minute, a zatim se povisila na 210 °C, zagrijavanjem od 10 °C u minuti te nakon 1 minute do 280 °C, zagrijavanjem od 40 °C u minuti. Temperatura međuspoja bila je 280 °C, a ionskog izvora 200 °C.

Rabljena je ionizacija elektronima pri 70 eV. Praćene su karakteristične vrijednosti omjera mase i naboja ( $m/z$ ) odabranih iona (eng. *Selected Ion Monitoring*, SIM) za trimetilsililni derivat HGA (HGA-3TMS): 384, 73 i 341. Za kvantifikaciju metodom vanjskog standarda upotrijebljen je ion  $m/z$  384. Uz potvrđne ione, identifikacija je provedena i usporedbom vremena zadržavanja HGA u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja HGA u kromatogramu standardne otopine HGA pripravljene u slijepoj matrici uzorka te u čistom otapalu. Kao slijepa matrica upotrijebljen je bagremov med koji ne sadrži HGA. Uzorci su analizirani u triplicatu, a udio HGA u medu je izražen u mg HGA po kg meda obične planike.

#### 3.4.6. Metode za procjenu citogenetičkih učinaka

##### 3.4.6.1. Uzorci periferne krvi

U istraživanju su korišteni uzorci periferne krvi tri zdrava dobrovoljca nepušača muškog spola (32, 27 i 32 godine). Unatrag godinu dana davatelji krvi nisu bili izloženi ionizirajućem ili neionizirajućem zračenju, niti kemijskim mutagenima. Krv je izvađena u sterilnim uvjetima u spremnike (epruvete) s litij-heparinom volumena 5 mL. Za potrebe pokusa izvađeno je ukupno 80 mL venske krvi po ispitaniku.

Ispitanici su bili upoznati sa svrhom istraživanja te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (br. 100–21/19-12) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. 380-59-10106-20-111/119).

### 3.4.6.2. Plan pokusa

U tablici 1 prikazan je plan pokusa za citogenetičke analize na uzorcima periferne krvi.

**Tablica 1.** Plan pokusa s opisom pokusnih skupina i koncentracijama testiranih tvari.

Uzorci u pokusu	Testirane koncentracije
Negativna kontrola	-
1× Med (dnevna doza)	0,71 g L <sup>-1</sup>
5× Med	3,5 g L <sup>-1</sup>
10× Med	7,1 g L <sup>-1</sup>
Umjetni med	0,71 g L <sup>-1</sup>
1× Ekstrakt	2,5 mg L <sup>-1</sup>
5× Ekstrakt	12,5 mg L <sup>-1</sup>
10× Ekstrakt	25 mg L <sup>-1</sup>
1× HGA	0,214 mg L <sup>-1</sup>
5× HGA	1,07 mg L <sup>-1</sup>
10× HGA	2,14 mg L <sup>-1</sup>
Irinotekan (IRI)	9 μg mL <sup>-1</sup>
1× Med + irinotekan	0,71 g L <sup>-1</sup> 1× Med + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
5× Med + irinotekan	3,5 g L <sup>-1</sup> 5× Med + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
10× Med + irinotekan	7,1 g L <sup>-1</sup> 10× Med + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
Umjetni med + irinotekan	0,71 g L <sup>-1</sup> Umjetni med + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
1× Ekstrakt + irinotekan	2,5 mg L <sup>-1</sup> 1× Ekstrakt + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
5× Ekstrakt + irinotekan	12,5 mg L <sup>-1</sup> 5× Ekstrakt + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
10× Ekstrakt + irinotekan	25 mg L <sup>-1</sup> 10× Ekstrakt + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
1× HGA + irinotekan	0,214 mg L <sup>-1</sup> 1× HGA + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
5× HGA + irinotekan	1,07 mg L <sup>-1</sup> 5× HGA + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
10× HGA + irinotekan	2,14 mg L <sup>-1</sup> 10× HGA + 9 μg mL <sup>-1</sup> IRI
Bleomicin (pozitivna kontrola)	15 μg mL <sup>-1</sup>

Koncentracije koje su korištene pri tretmanu stanica izračunate su na temelju uobičajene dnevne doze meda (50 g meda; dvije velike žlice meda). Koncentracija HGA i ekstrakta preračunate su na količinu HGA u medu (306,8 mg kg<sup>-1</sup> meda) i količinu ekstrakta dobivenog iz meda (5 mg g<sup>-1</sup> meda).

Učinci meda, ekstrakta i HGA na limfocite ispitani su u koncentracijama koje odgovaraju njihovoj dnevnoj dozi, 5 puta većoj i 10 puta većoj dozi od dnevne doze.

Uzorak umjetnog meda testiran je pri koncentraciji koja odgovara dnevnoj dozi.

Koncentracija citostatika irinotekana korištena u pokusu odgovarala je terapijskoj koncentraciji od  $350 \text{ mg m}^{-2}$  (Takano i Sugiyama, 2017), što preračunato na prosječnu tjelesnu masu osobe od 70 kg i površinu tijela od  $1,8 \text{ m}^2$  iznosi konačnih  $9 \text{ }\mu\text{g}$  lijeka u mililitru hranjivog medija s uzorcima krvi. U pokus su bile uključene i kombinacije svih ispitivanih koncentracija meda, ekstrakta i HGA s irinotekanom, radi procjene njihovih mogućih zaštitnih učinaka.

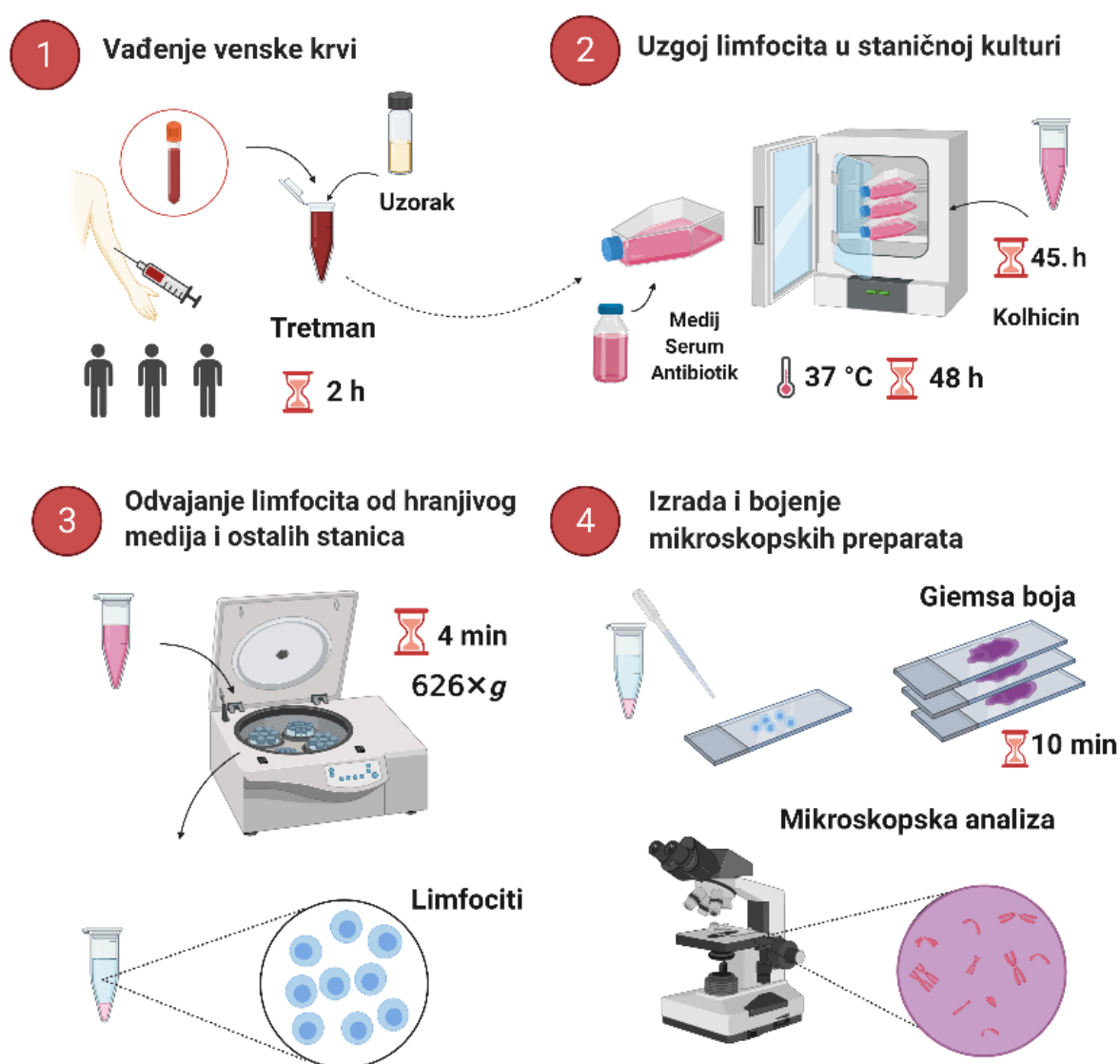
Kao pozitivna kontrola korišten je dokazani genotoksični spoj – citostatik bleomicin, koji je primijenjen u koncentraciji  $15 \text{ }\mu\text{g}$  lijeka u mililitru hranjivog medija s uzorcima krvi.

Svi su tretmani trajali 2 sata.

#### 3.4.6.3. Kromosomske aberacije

Test analize kromosomskih aberacija u limfocitima proveden je u skladu s preporukama Međunarodnog programa za kemijsku sigurnost (eng. *International Programme on Chemical Safety, IPCS*) gdje je detaljno opisan metodološki postupak (Albertini i sur., 2000). Ukratko, kako bi se uspostavile kulture limfocita, nakon tretmana od 2 sata puna krv ( $0,5 \text{ mL}$ ) dodana je u  $6 \text{ mL}$  hranjivog medija RPMI-1640 uz dodatak  $1 \text{ mL}$  toplinski inaktiviranog fetalnog telećeg seruma i antibiotika. Kako bi se potaknula mitozu, u kulturu je dodano  $0,1 \text{ mL}$  otopine fitohemaglutinina. Uzgoj stanica provodio se u plastičnim T-bocama koje su inkubirane pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , u vlažnoj atmosferi s  $5 \text{ }\%$   $\text{CO}_2$  tijekom 48 sati. Kako bi se zaustavila dioba limfocita u metafazi, u 45. satu uzgoja u kulturu je dodana otopina kolhicina ( $0,004 \text{ }\%$ ). Po završetku kultiviranja provedeno je izdvajanje limfocita od medija i ostalih stanica centrifugiranjem pri  $626\times g$ , 4 minute čime su istaložene stanice. Nakon uklanjanja medija provedena je obrada taloga hipotoničnom otopinom KCl ( $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ ) kako bi se uklonili eritrociti. Na talog je potom dodano  $5 \text{ mL}$  Ibraimove otopine te je suspenzija stanica ponovno centrifugirana pri  $626\times g$ , 4 minute. Na dobiveni talog dodan je hladni metanol i ponovno je provedeno centrifugiranje. Nadalje, provedeno je višekratno fiksiranje s otopinom za fiksiranje uz ponovno centrifugiranje pri  $626\times g$  čime su istaložene stanice koje su ponovno isprane. Ispiranje se ponavljalo sve dok se nije dobila čista suspenzija limfocita koja je nakapana na mikroskopska stakalca i sušena na zraku te potom obojena  $5 \text{ }\%$ -tnom otopinom boje Giemsa. Slijedila je

mikroskopska analiza pomoću svjetlosnog mikroskopa pri povećanju 1000×. Analizirana su po tri neovisna preparata te je pregledano 600 metafaza po svakoj eksperimentalnoj točki po donoru, odnosno ukupno 1800 metafaza za svaki uzorak. Na slici 24 shematski je prikazan postupak provođenja analize kromosomskih aberacija.



**Slika 24.** Shematski prikaz provođenja analize kromosomskih aberacija. Napravljeno pomoću BioRender.com.

Mikroskopska analiza uključivala je brojenje stanica sa strukturnim oštećenjima koja zahvaćaju kromatide ili cjelovite kromosome. Od kromatidnih aberacija bilježena je učestalost kromatidnih lomova i tetradijusa, a od kromosomskih aberacija učestalost kromosomskih lomova, acentričnih fragmenata, bicentričnih kromosoma,



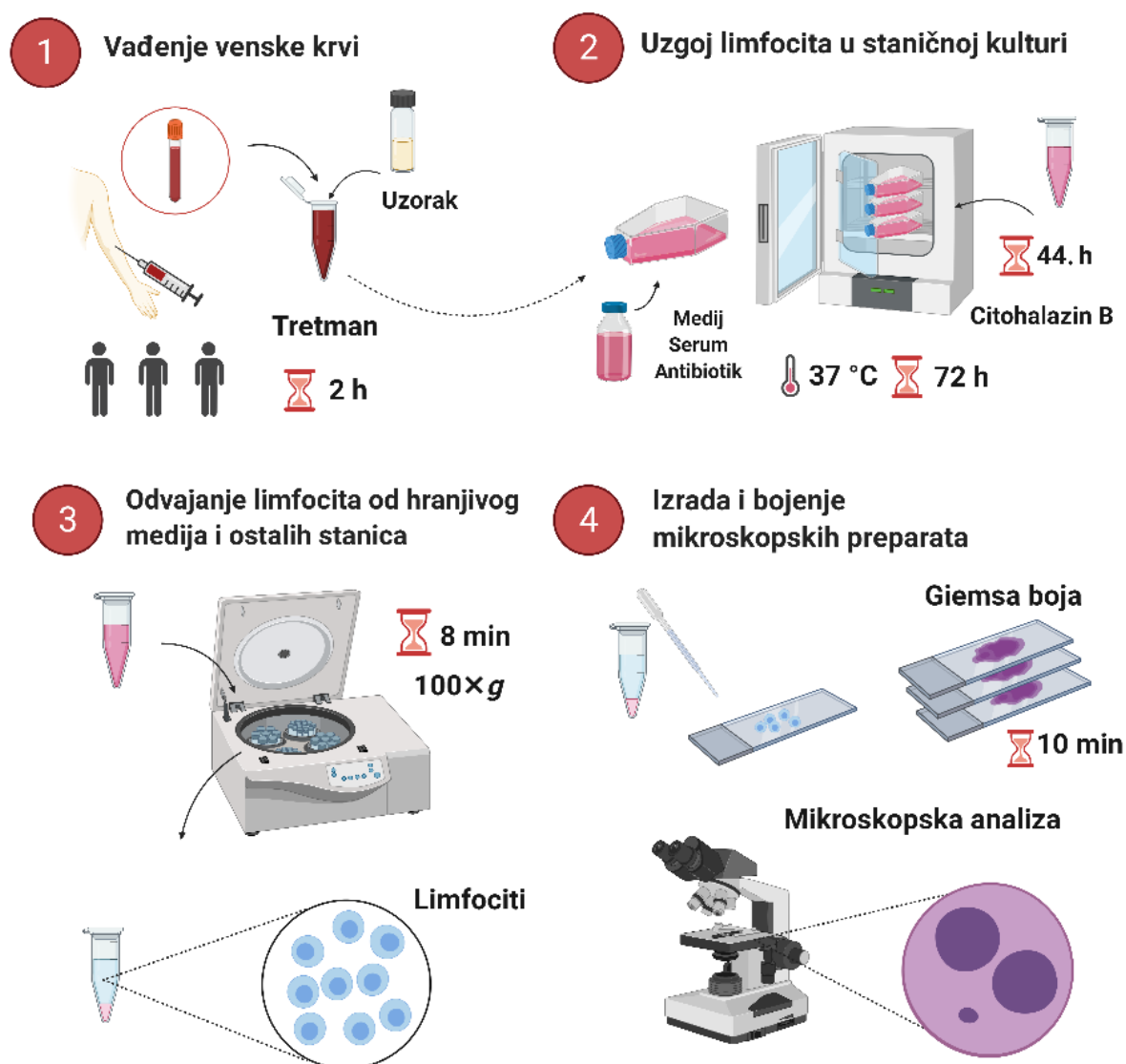
policentričnih kromosoma te prstenastih kromosoma, u skladu s kriterijima opisanim u publikaciji Carrano i Natarajan (1988).

#### 3.4.6.4. Citohalazinom B-blokiran mikronukleus-test (CBMN-test)

Protokol CBMN-testa koji su razvili Fenech i Morley (1985) uključuje 72-satni uzgoj limfocita periferne krvi u uvjetima *in vitro*, pri čemu se radi inhibicije citokineze u 44. satu u stanične kulture dodaje citohalazin B. On sprječava diobu citoplazme pa se mikronukleusi mogu jednostavno brojati unutar binuklearnih stanica.

Postupak testiranja uključivao je dvosatno izlaganje pune krvi testiranim spojevima nakon čega su iz tretirane krvi uspostavljene kulture limfocita. Kako bi se uspostavile kulture limfocita, nakon tretmana od 2 sata puna krv (0,5 mL) dodana je u 6 mL hranjivog medija RPMI-1640 uz dodatak 1 mL toplinski inaktiviranog fetalnog telećeg seruma i antibiotika. Kako bi se potaknula mitozu, u kulture je dodano 0,1 mL otopine fitohemaglutinina. Uzgoj se provodio u plastičnim T-bocama koje su inkubirane pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> tijekom 72 sata. U 44. satu uzgoja u kulture je dodano 6 µg mL<sup>-1</sup> citohalazina B. Po završetku kultivacije provedeno je izdvajanje limfocita iz medija i ostalih stanica centrifugiranjem pri 100×g, 8 minuta čime su istaložene stanice. Nakon uklanjanja medija provedena je obrada taloga hipotoničnom otopinom KCl (0,075 mol L<sup>-1</sup>) uz ponovno centrifugiranje pri 100×g, 8 minuta, stanice su oborene i isprane. Ispiranje se ponavljalo sve dok se nije dobila čista suspenzija limfocita koja je nakapana na mikroskopska stakalca i sušena na zraku. Za bojenje mikroskopskih preparata (10 minuta na sobnoj temperaturi) korištena je otopina boje Giemsa. Ova se boja specifično veže za fosfatne skupine u molekuli DNA, osobito u dijelovima koji su bogati s parovima adenina i timina. Nakon bojenja preparati su isprani vodom i osušeni na zraku. Slijedila je mikroskopska analiza pomoću svjetlosnog mikroskopa pri povećanju 1000×.

Na slici 25 shematski je prikazan postupak provođenja analize CBMN-testa.



**Slika 25.** Shematski prikaz citohalazinom B-blokiranog mikronukleus-testa (CBMN-test). Napravljeno pomoću BioRender.com.

Mikroskopska analiza uključila je brojanje  $3 \times 1000$  binuklearnih (BN) stanica u svakom uzorku. U BN stanicama je, sukladno kriterijima propisanim za CBMN-test (Fenech i sur., 2003) izbrojen ukupni broj mikronukleusa (MN), jezgrinih pupova (eng. *Nuclear Buds*, NB), nukleoplazmatskih mostova (eng. *Nucleoplasmic Bridges*, NPB) te broj stanica u apoptozi i nekrozi.

Indeks diobe jezgara (eng. *Nuclear Division Index*, NDI) izračunat je prema formuli koju su predložili Eastmond i Tucker (1989):

$$\text{NDI} = \frac{(M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4)}{N}$$

gdje je:

$M_1 - M_4$  broj stanica s jednom do četiri jezgre,

$N$  ukupni broj izbrojenih živih stanica.

Najniža moguća vrijednost NDI je 1,0, a dobije se kada su sve žive stanice mononuklearne, dakle ako nije uspjela stimulacija mitogenom te se stanice nisu podijelile. Ako su sve stanice završile jednu diobu nakon stimulacije mitogenom, vrijednost NDI bit će 2,0. Vrijednost NDI može biti veća od 2,0 ako je veći broj stanica završio više od jedne diobe za vrijeme djelovanja inhibitora citokineze pa sadrže više od 2 jezgre.

Na osnovi ukupnog broja svih pregledanih živih i mrtvih stanica za sve je uzorke izračunata i vrijednost tzv. proliferacijskog indeksa u limfocitima s blokiranom citokinezom (eng. *Cytokinesis-Block Proliferation Index*, CBPI) (Lorge i sur., 2008; OECD, 2016).

Za izračun je korištena sljedeća formula:

$$\text{CBPI} = \frac{(\text{broj mononuklearnih st.} + 2 \times \text{broj binuklearnih st.} + 3 \times \text{broj multinuklearnih st.})}{\text{ukupni broj stanica}}$$

Vrijednost CBPI od 1,0 dobije se kada su sve stanice mononuklearne.

Nadalje, iz dobivenih je podataka za svaki uzorak izračunat % citostaze, prema formuli:

$$\% \text{ citostaze} = 100 - 100 \times \left[ \frac{(\text{CBPI}_T - 1)}{(\text{CBPI}_K - 1)} \right]$$

gdje je:

$T$  tretirani, a  $K$  kontrolni uzorak.

Vrijednost CBPI od 1,0 odgovara citostazi od 100%.

Za svaki uzorak izračunat je i replikacijski indeks (RI) koji upućuje na relativni broj staničnih ciklusa po stanici tijekom razdoblja izloženosti citohalazinu B u tretiranim uzorcima u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Za njegov je izračun korištena sljedeća formula:

$$RI = \frac{[(\text{broj mononuklearnih st.}) + (2 \times \text{broj multinuklearnih st.})]/\text{ukupan broj stanica}_{\text{tretirani uzorak}}}{[(\text{broj mononuklearnih st.}) + (2 \times \text{broj multinuklearnih st.})]/\text{ukupan broj stanica}_{\text{kontrola}}} \times 100$$

Za tumačenje rezultata važno je napomenuti da su citostaza i RI u međusobnom odnosu prema formuli:

$$\text{Citostaza} = 100 - RI,$$

iz čega proizlazi kako primjerice vrijednost RI od 53 % znači da se u usporedbi s brojem stanica koje su se podijelile u kontrolnom uzorku (dajući binuklearne i multinuklearne stanice) u tretiranom uzorku podijelilo samo 53 % od tog broja, što odgovara citostazi od 47 %.

Na osnovi podataka o učestalosti mikronukleusa u limfocitima tretiranim irinotekanom te u limfocitima tretiranim kombinacijama irinotekana s medom, ekstraktom i HGA izračunate su vrijednosti indeksa mutagenosti (MutI) (Scarpato i sur., 1998), u skladu s formulom:

$$\text{MutI} = \frac{(\text{MN}_{\text{MUT+ANTIMUT}} - \text{MN}_{\text{MUT}})}{\text{MN}_{\text{MUT}}}$$

gdje je:

$\text{MN}_{\text{MUT}}$  broj mikronukleusa u uzorku tretiranom mutagenom

$\text{MN}_{\text{MUT+ANTIMUT}}$  broj mikronukleusa u uzorku tretiranom kombinacijom mutagena i testiranog potencijalnog antimutagena.

Rezultat izračuna može imati pozitivnu ili negativnu vrijednost. Negativni predznaci dobivenih vrijednosti upućuju na smanjivanje mutagenog učinka pod utjecajem testirane tvari.

### 3.4.7. Učinci *in vitro* na humane tumorske stanične linije

#### 3.4.7.1. Stanične linije

Istraživanja u ovome radu provedena su na kontinuiranim humanim staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) i karcinoma pločastih stanica jezika (Cal27). Stanice su rasle kao jednoslojna kultura u plastičnim T-bocama ravnih stijenki te u mikrotitarskim pločicama s jažicama u inkubatoru pri 37 °C i u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Kao medij za rast je korišten kompletirani medij uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (FBS) konačne koncentracije od 10 %.

#### 3.4.7.2. Nasađivanje i uzgoj stanica

Zamrznute stanične kulture (s 10 % glicerola) su s -80 °C odmrznute u vodenoj kupelji pri 37 °C, a potom je centrifugiranjem pri 156×g u trajanju 5 minuta uklonjen supernatant koji sadrži ostatke medija i krioprotektivnog sredstva (glicerola). Na talog je potom dodan 1 mL novog medija zagrijanog pri 37 °C. Stanice su resuspendirane i ponovo centrifugirane pri 156×g u trajanju 5 minuta te je u svrhu propagacije talog prebačen u Petrijevu zdjelicu promjera 5 cm. Nakon 24 sata uzgoja pri optimalnim uvjetima rasta stanice su tripsinizirane tripsinom i nasađene u T-bocu većeg volumena te uzgajane do subkonfluentnog stanja, kako bi se mogle rabiti za daljni eksperiment.

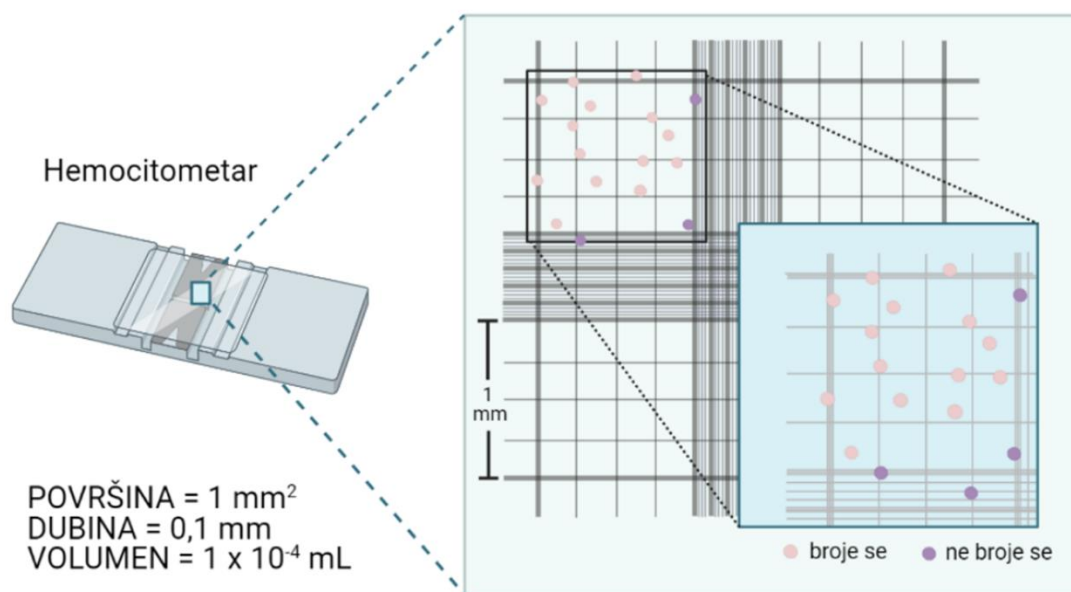
#### 3.4.7.3. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Stanice su presađene nakon što su postigle 80 – 90 % konfluentnosti. Priprema stanica u T-bocama započela je uklanjanjem medija sa stanica koje su zatim isprane puferom PBS kako bi se u potpunosti uklonio stanični medij koji bi mogao inhibirati tripsin. Na isprane stanice dodana je otopina tripsina, pri čemu serinske proteaze hidroliziraju proteine kako bi se adherentne stanice odvojile od podloge i dobile stanice u suspenziji. Stanice s tripsinom su se inkubirale, a vrijeme izloženosti ovisilo je o vrsti stanica pa je bila potrebna stalna kontrola pod mikroskopom (stanice iz vretenastog oblika poprimaju okrugli oblik). Proteolitički učinak tripsina zaustavio se dodavanjem kompletiranog medija sa serumom na stanice (Freshney, 2000). Stanice je bilo potrebno izbrojati i nasaditi točno određeni broj (koncentracija 10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup>) kako

bi se dobivene vrijednosti eksperimentom mogle uspoređivati i kako bi podjednaki broj stanica bio izložen djelovanju određenog spoja.

#### 3.4.7.4. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra

Za određivanje broja stanica iz početne stanične suspenzije izuzeto je 20  $\mu\text{L}$  uzorka koji je stavljen u Bürker-Türkovu komoricu ispod postavljenog pokrovnog stakalca. Stanice su brojane u četiri velika kvadrata (koji se sastoje se od 16 malih kvadrata). Prostor između postavljene predmetnice i pokrovnog stakalca debljine je 0,1 mm, dok je površina svakog kvadrata 1  $\text{mm}^2$ , što čini ukupni volumen od  $10^{-4}$  mL. Broj stanica, izražen po jednom mililitru stanične suspenzije, dobio se iz srednje vrijednosti stanica izbrojanih u četiri velika kvadrata. Potrebno je bilo izbrojati što više stanica, 100 – 300, odnosno za preciznije eksperimente 500 – 1000 stanica kako bi točnost nasađivanja određenog broja stanica bila što veća (slika 26) (Freshney, 2000).



**Slika 26.** Brojanje stanica pomoću hemocitometra (prilagođeno prema HEMO, 1998). Napravljeno pomoću BioRender.com.

### 3.4.7.5. Doze i tretman stanica

Doze koje su korištene pri tretmanu stanica izračunate su na temelju uobičajene dnevne doze meda (50 g meda; dvije velike žlice meda):

**Tablica 2.** Plan pokusa s opisom pokusnih skupina i koncentracijama testiranih tvari.

	Umjetni med (g L <sup>-1</sup> )	Med (g L <sup>-1</sup> )	Ekstrakt (mg L <sup>-1</sup> )	HGA (mg L <sup>-1</sup> )
<b>0,5× Dnevna doza</b>	0,35	0,35	1,25	0,107
<b>Dnevna doza</b>	0,71	0,71	2,5	0,214
<b>2,5× Dnevna doza</b>	1,77	1,77	6,25	0,535
<b>5× Dnevna doza</b>	3,5	3,5	12,5	1,07

### 3.4.7.6. Test *Neutral red*

Nakon tripsinizacije i brojenja stanica, pripravljena je stanična suspenzija u koncentraciji od 10<sup>5</sup> stanica po mL te je po 100 µL stanične suspenzije nasađeno u svaku jažicu mikrotitarske pločice s 96 jažica. Stanice su inkubirane 24 sata pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> kako bi postigli subkonfluentnu kulturu.

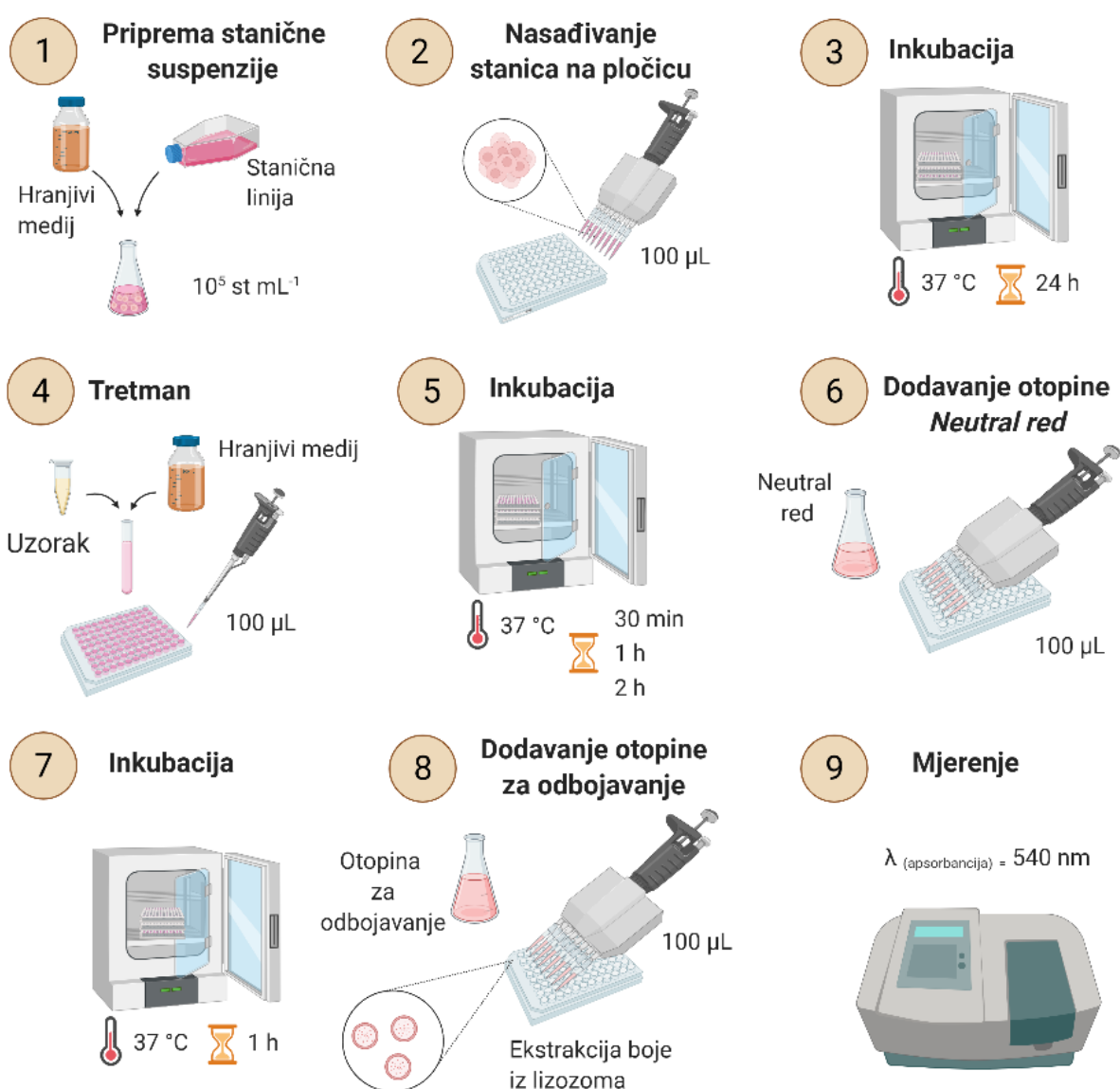
Idućeg dana uklonjen je medij sa stanica, a stanice su tretirane prethodno pripremljenim otopinama meda, ekstrakta, HGA i umjetnog meda u hranjivom mediju različitih koncentracija (tablica 2) u vremenskim intervalima tretmana od 30 minuta, 1 sat i 2 sata pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Kao negativna kontrola, korišten je uzgojni medij.

Po završetku tretmana uklonjene su otopine kojima su tretirane stanice te su stanice isprane puferom PBS (100 µL) kako bi se uklonili ostaci testiranih uzoraka. Na isprane stanice dodano je 100 µL pripremljene radna otopina boje *Neutral red* te je slijedila inkubacija u trajanju od 1 sat pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon završetka vremena inkubacije otopina *Neutral red* je uklonjena, a stanice su ponovno isprane puferom PBS (100 µL). Naposljetku, na stanice je dodana otopina za odbojavanje (100 µL) kako bi se boja ekstrahirala iz lizosoma živih stanica (Repetto i sur., 2008). Intenzitet obojenja izmjeren je spektrofotometrom pri valnoj duljini od 540 nm. Mrtve ili oštećene stanice ne mogu zadržati boju *Neutral red* nakon ispiranja pa je

intenzitet obojenja, kao i vrijednost apsorbancije, linearno povezan s koncentracijom preživjelih stanica nakon tretmana ispitivanim uzorcima. Kao slijepa proba služila je jažica u koju nisu nacijepljene stanice. Na slici 27 prikazan je cijeli postupak provođenja testa *Neutral red*.

Postotak preživljenja izračunat je u odnosu na negativnu kontrolu prema jednadžbi:

$$\text{Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} = \left( \frac{A_{520 \text{ nm otopine koja se testira}}}{A_{520 \text{ nm kontrole}}} \right) \times 100$$



Slika 27. Shematski prikaz testa *Neutral red*. Napravljeno pomoću BioRender.com.



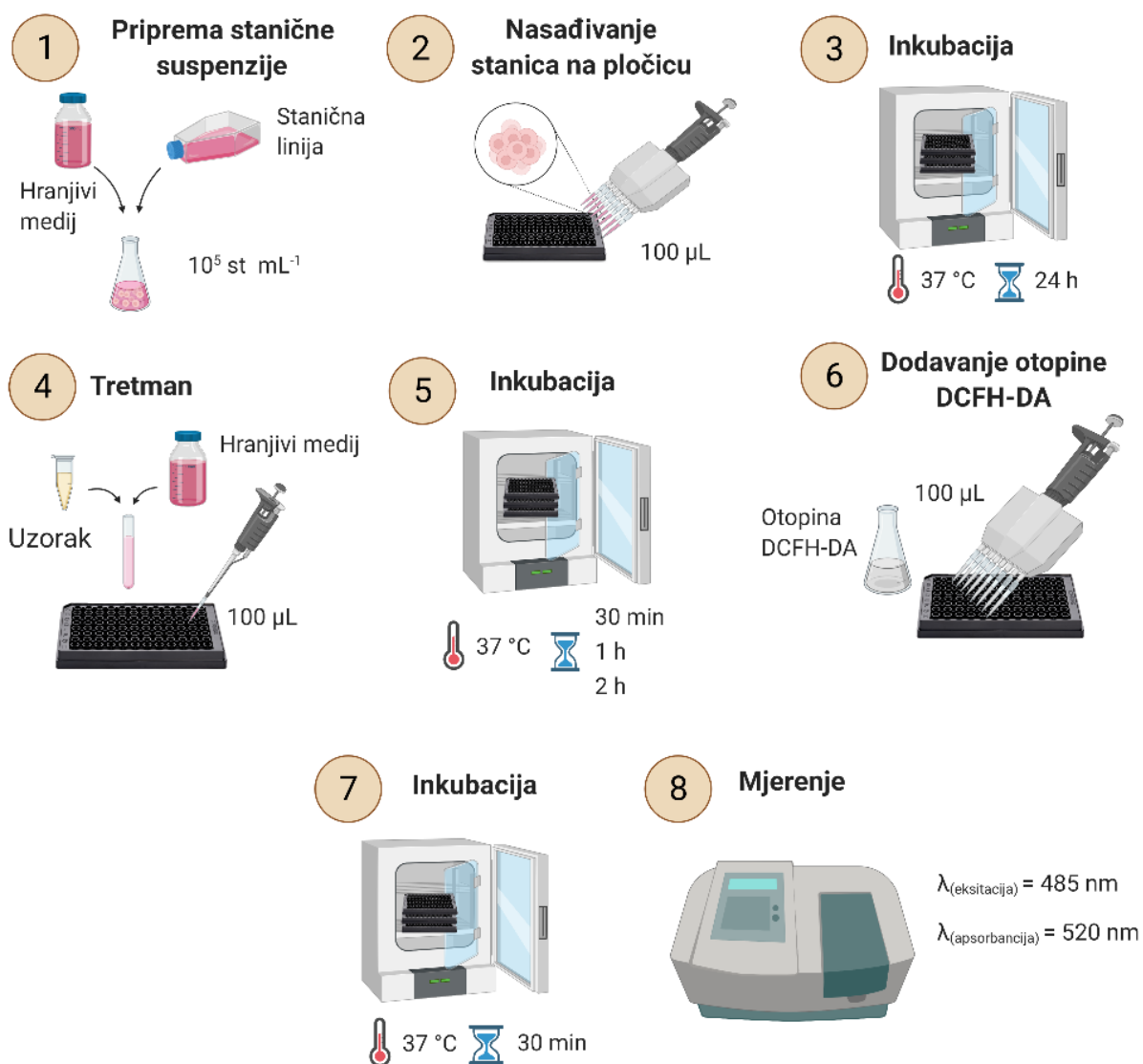
### 3.4.7.7. Određivanje pro(anti)oksidacijskog učinka (metoda DCFH-DA)

Nakon tripsinizacije i određivanja broja stanica, pripravljena je stanična suspenzija u koncentraciji od  $10^5$  stanica po mL te je 100  $\mu$ L stanične suspenzije nasađeno u crnu mikrotitarsku pločicu s 96 jažica.

Stanice su inkubirane 24 sata pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> kako bi se dobila subkonfluentna kultura. Idućeg dana, uklonjen je medij sa stanica, a stanice su tretirane s prethodno pripremljenim otopinama meda, ekstrakta, HGA i umjetnog meda različitih koncentracija (tablica 2) u vremenskim intervalima tretmana od 30 minuta, 1 sat i 2 sata pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Kao negativna kontrola, korišten je uzgojni medij. Po završetku tretmana uklonjene su testirane otopine te su stanice isprane puferom PBS (100  $\mu$ L) kako bi se uklonili ostaci uzoraka kojima su stanice bile tretirane. Nakon toga, na isprane je stanice dodana pripravljena radna otopina 2',7'-dikolorofluorescein-diacetata (DCFH-DA) u PBS-u (50  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>; 100  $\mu$ L) te je slijedila inkubacija u trajanju od 30 minuta pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Intenzitet fluorescencije određen je na fluorimetru pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije 520 nm (slika 28) te je proporcionalan količini slobodnih radikala u stanici.

Kako bi se izmjerena fluorescencija mogla izraziti po postotku preživjelih stanica, ponovno se provodio test *Neutral red* i izračunat je kvocijent preživljenja. Prooksidacijsko djelovanje izračunava se kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljenja u odnosu na kontrolu. Svaki je eksperiment ponovljen barem tri puta, a svaka je koncentracija izmjerena u četiri replike. Indukcija ROS-a izračunata je u odnosu na negativnu kontrolu i postotka preživljenja prema jednadžbi:

$$\text{Indukcija ROS}_{\% \text{ u odnosu na kontrolu}} = \frac{\frac{\text{intenzitet fluorescencije}_{\text{otopina koje se testiraju}}}{\% \text{ preživljenja}}}{\text{intenzitet fluorescencije kontrole}} \times 100$$



**Slika 28.** Shematski prikaz metode DCFH-DA. Napravljeno pomoću BioRender.com.

### 3.4.8. Antioksidacijski učinak meda obične planike, njegova ekstrakta i homogentizinske kiseline (HGA) na DNA plazmid phiX174 RF1

Reakcijska smjesa sastavljena je od plazmida ( $3 \mu\text{L}$ ;  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), meda obične planike, ekstrakta, HGA odnosno umjetnog meda u koncentracijama koje su navedene u tablici 2 te vodikovog peroksida ( $1 \mu\text{L}$ ; 3 %) u puferu TAE (reakcijska smjesa ukupnog volumena do  $30 \mu\text{L}$ ). Ovako pripremljena smjesa izložena je djelovanju UV zračenja u trajanju od 16 minuta (jakost UV lampe  $1 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Keum i sur., 2000; Šamec, 2013). Nakon inkubacije i zračenja uzorci su nanoseni na agarozni gel (1,5 %) koji je prethodno pripremljen u puferu TAE (Lee i sur., 2012). Elektroforeza je provedena u puferu TAE u trajnju od 60 minuta i pri jakosti električne struje od 150

mA. Nakon provedene elektroforeze plazmid je obojan u otopini etidijevog bromida te vizualiziran pod UV svjetlom (Alsulami i sur., 2019). Fotografije gelova obrađene su u programu Gel Analyzer.

#### 3.4.9. Statistička obrada podataka

Rezultati su automatski pohranjeni na računalo u programu Excel u obliku tablica, koje su potom podvrgnute matematičkoj i statističkoj obradi primjenom odgovarajućih programa (STATISTICA ver. 13, StatSoft, SAD). Normalnost distribucije podataka potvrđena je Kolmogorov-Smirnov (KS) testom. Kako je p vrijednost testa KS bila veća od 0,05, utvrđeno je da se radi o normalnoj raspodjeli podataka. Za procjenu *in vitro* učinka na humane tumorske stanične linije provedena je analiza varijance koristeći faktorijska ANOVA test (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) *post-hoc* test. Za procjenu citogenetičkih učinaka statistička obrada podataka napravljena je klasičnom deskriptivnom statistikom uporabom testova ANOVA i  $\chi^2$ -testa. Za prag statističke značajnosti određen je  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Odabir uzorka meda obične planike za istraživanja bioloških učinaka

U osam uzoraka meda obične planike prikupljenih s hrvatskog područja u sklopu preliminarnog istraživanja određen je maseni udio ukupnih bioaktivnih spojeva, antioksidacijska aktivnost te maseni udio najzastupljenije bioaktivne komponente HGA.

Udio ukupnih fenola, flavonola, flavona, flavanona i antioksidacijski kapacitet (metode DPPH• i FRAP) određen je primjenom spektrofotometrijskih metoda.

Za određivanje udjela HGA u medu obične planike primijenjena je tehnika GC-MS. Ispitivani spoj je identificiran usporedbom vremena zadržavanja u koloni i spektra masa analita u uzorku meda obične planike s vremenom zadržavanja i spektrom masa istog analita u standardnoj smjesi koja je pripravljena dodavanjem standardne otopine HGA točno određene koncentracije u bagremov med koji ne sadrži HGA (slike 29 i 30). Maseni udio HGA u uzorcima bio je u rasponu 113,5 – 306,8 mg kg<sup>-1</sup>. Tri analizirana uzorka (R1, R2 i M15) imala su maseni udio HGA ispod granične koncentracije od 200 mg kg<sup>-1</sup> koju su Cabras i suradnici (1999) predložili kao najnižu koncentraciju, a koja bi upućivala da se radi o medu proizvedenom uglavnom od obične planike.

Nakon isključivanja nezadovoljavajućih uzoraka, za daljnja istraživanja odabran je med obične planike s vrgoračkog područja (uzorak V6) jer je sadržavao najveći udio HGA i ukupnih fenola te je imao najveći antioksidacijski kapacitet (FRAP) (tablica 3).

**Tablica 3.** Maseni udio fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet meda obične planike.

Oznaka uzorka	HGA (mg kg <sup>-1</sup> )	TPC (mg GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC		DPPH• (mmol TE kg <sup>-1</sup> )	FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O u 5 % otopini)
			Flavonoli + flavoni (mg QE kg <sup>-1</sup> )	Flavanoni (mg NE g <sup>-1</sup> )		
R1	160,4	1013,3 ± 84,0	136,2 ± 0,0	2,09 ± 0,20	0,88 ± 0,05	0,70 ± 0,13
R2	154,1	1021,1 ± 105,9	139,2 ± 0,0	2,19 ± 0,22	0,90 ± 0,07	0,56 ± 0,12
V5	297,9	1528,1 ± 29,5	136,4 ± 0,0	2,36 ± 0,08	3,01 ± 0,05	1,29 ± 0,10
V6	<b>306,8</b>	<b>1670,6 ± 58,1</b>	143,5 ± 0,0	2,40 ± 0,08	2,96 ± 0,08	<b>1,35 ± 0,14</b>
K7	220,0	893,1 ± 61,7	140,1 ± 0,0	2,71 ± 0,28	0,59 ± 0,05	0,66 ± 0,09
K8	245,6	966,1 ± 163,6	135,9 ± 0,0	2,86 ± 0,65	0,68 ± 0,04	0,59 ± 0,02
N14	273,3	1642,7 ± 6,3	199,1 ± 0,0	2,65 ± 0,36	3,79 ± 0,01	0,93 ± 0,11
M15	113,5	1435,5 ± 47,7	102,3 ± 0,0	3,34 ± 0,04	3,78 ± 0,01	1,15 ± 0,01

TFC – eng. *Total flavonoid content*; HGA – homogentizinska kiselina; TPC – eng. *Total phenolic content*; QE – eng. *Quercetin equivalent*; NE – eng. *Narginein equivalent*; TE – eng. *Trolox equivalent*

#### 4.2. Pokazatelji kakvoće meda obične planike

Udio peludi obične planike u uzorku vrgoračkog meda bio je 8 %, a uočena je prisutnost u tragovima peludi bršljana (*Hedera helix* L.) i porodice *Cistaceae* (bušini).

Fizikalno-kemijski parametri kakvoće meda (fruktoza 34,2 g na 100 g meda; glukoza 32,5 g na 100 g meda; maseni udio vode 17,8 %; električna provodljivost 0,583 mS cm<sup>-1</sup>; kiselost 44,8 mmol kg<sup>-1</sup>) bili su u skladu s kriterijima propisanih Pravilnikom o medu (NN 53/2015).

#### 4.3. Fenolne komponente i antioksidacijski kapacitet meda obične planike

Ukupni udio fenola, flavonola, flavona, flavanona te antioksidacijski kapacitet meda određeni su spektrofotometrijskim metodama te su rezultati prikazani u tablici 3. Jači antioksidacijski kapacitet bio je uglavnom povezan s većim masenim udjelom HGA i ukupnih fenola.

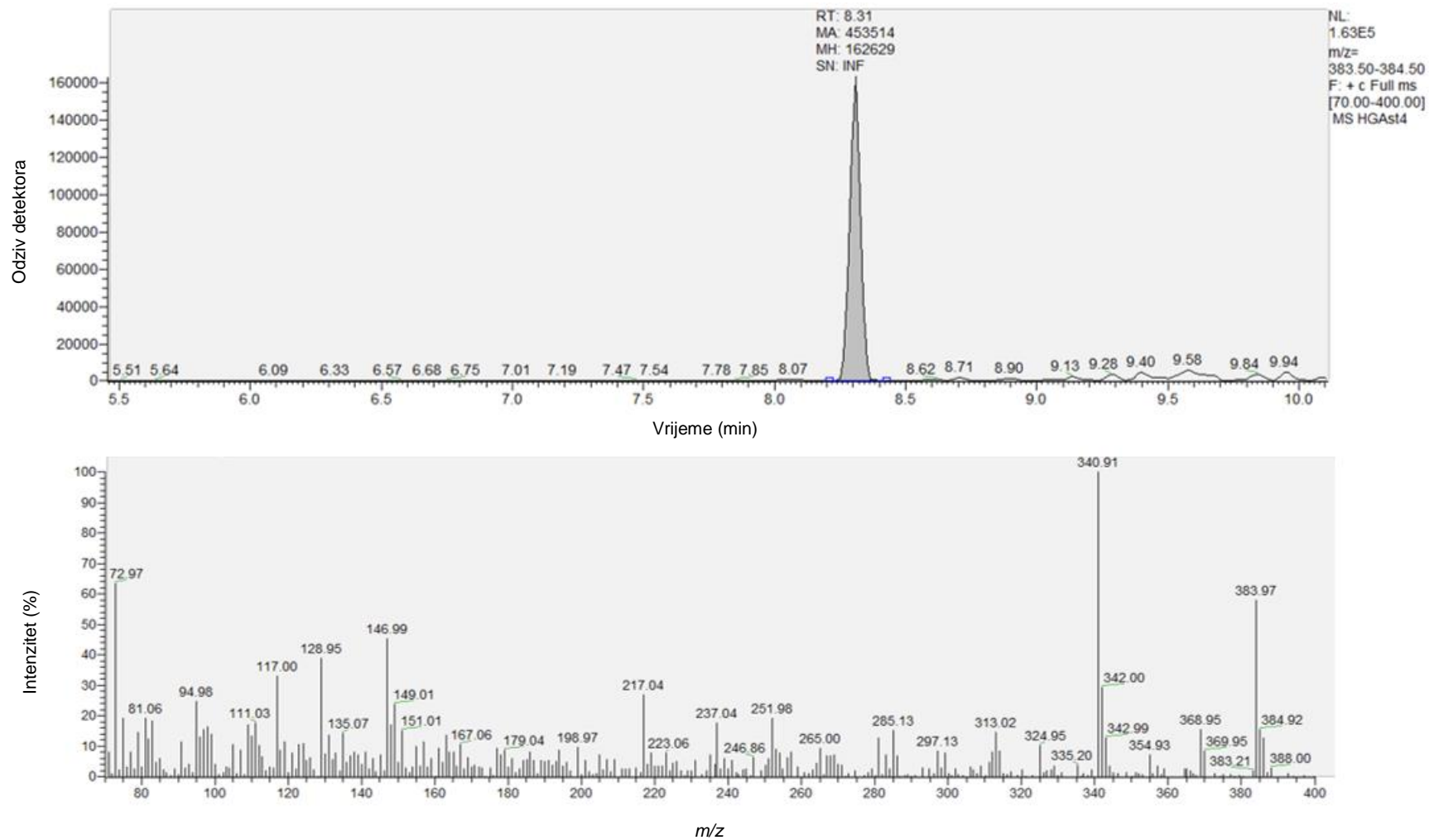
Fenolni profil meda obične planike određen je primjenom tehnike UHPLC-LTQ Orbitrap MS.

Identificirano je 56 fenolnih spojeva (16 fenolnih kiselina, 10 derivata fenolnih kiselina, 14 flavonoida i 16 flavonoidnih derivata) prema njihovim točnim masama ([M–H]<sup>-</sup>) i karakterističnim fragmentacijama (tablica 4).

Kvantificirano je 12 fenolnih spoja prema odgovarajućim spektralnim karakteristikama: spektru masa, točnim masama, karakterističnim fragmentacijama, karakterističnim vremenima zadržavanja spojeva u kromatografskoj koloni i

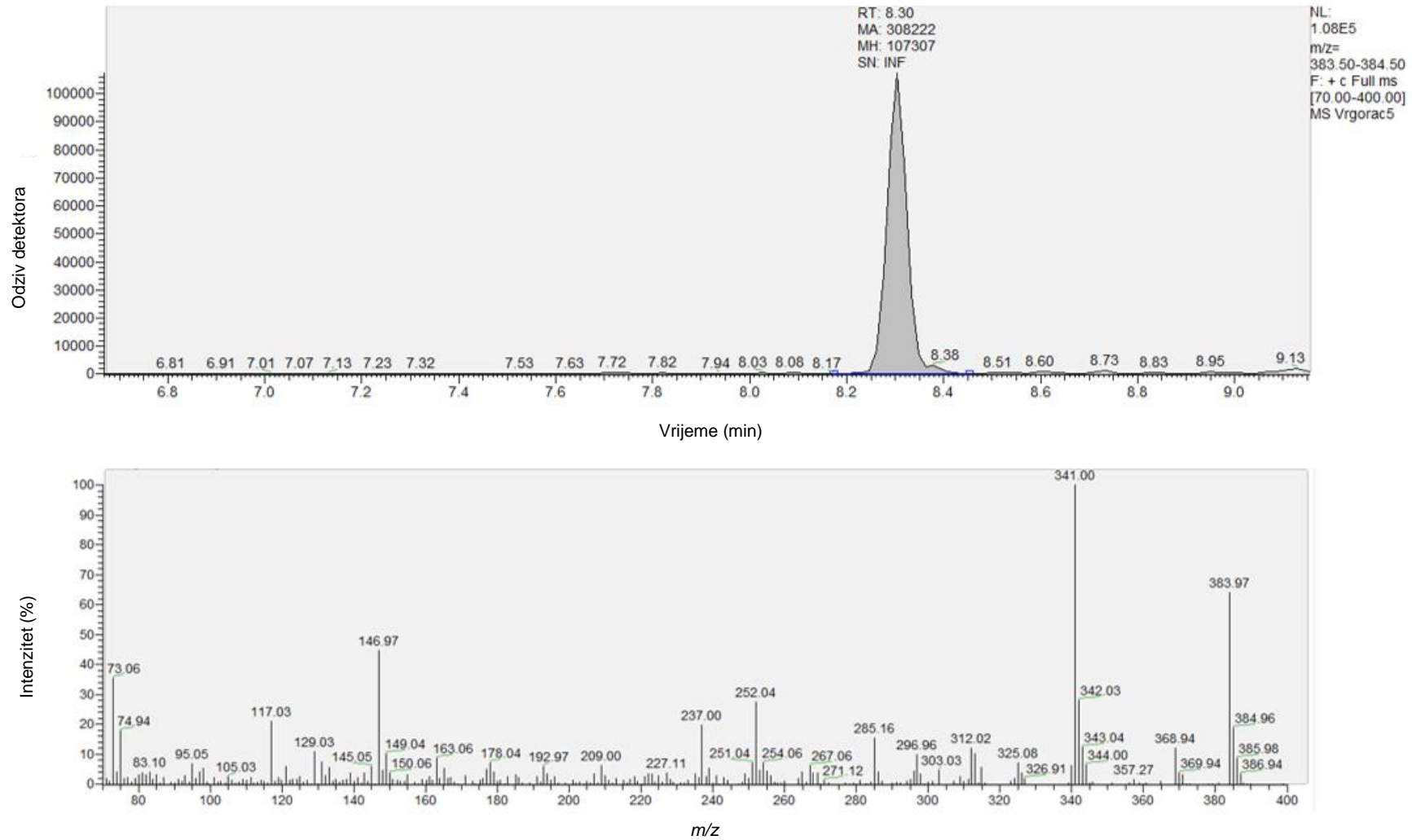
---

usporedbom s dostupnim standardima (tablica 5). Među kvantificiranim fenolnim grupama nalazi se šest fenolnih kiselina, četiri flavonoida-aglikona (dva flavonola, jedan flavanon i jedan flavon) te dva flavonolna glikozida (tablica 5). Dva najzastupljenija fenolna spoja određena UHPLC-LTQ Orbitrap MS-om bila su kvercetin 3-O-ramnozid ( $0,363 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i 4-hidroksifeniloctena kiselina ( $0,137 \text{ mg kg}^{-1}$ ).



**Slika 29.** Ionski kromatogram ( $m/z$  384; vrijeme zadržavanja,  $t_R = 8,31$  min) i spektar masa standardne otopine homogentizinske kiseline (HGA) u bagremovom medu. Maseni udio HGA u bagremovom medu je  $430 \text{ mg kg}^{-1}$ .





**Slika 30.** Ionski kromatogram ( $m/z$  384; vrijeme zadržavanja,  $t_R = 8,30$  min) i spektar masa homogentizinske kiseline (HGA) detektirane u medu obične planike s vrgoračkog područja. Maseni udio HGA u medu obične planike je  $306,8 \text{ mg kg}^{-1}$ .

**Tablica 4.** Trivijalna i sustavna (IUPAC) imena, molekulske formule identificiranih fenolnih spojeva UHPLC-LTQ Orbitrap MS-om te njihove izračunate i točne mase  $[M-H]^-$  u medu obične planike s hrvatskog područja.

Broj spoja	Trivijalno ime	Sustavno ime (IUPAC)	Vrsta spoja	Molekulska formula $[M-H]^-$	Teorijska relativna molekulska masa, $[M-H]^-$	Izračunata relativna molekulska masa, $[M-H]^-$	$\Delta$ / ppm
1	Galna kiselina	3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (3,4,5-trihidroksibenzenkarboksilna kiselina)	Fenolna kiselina	$C_7H_5O_5^-$	169,0143	169,0135	4,7
2	Protokatehinska kiselina-3-O-glukozid	4-hidroksi-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksibenzojeva kiselina 3-O- $\beta$ -D-glukopiranozil-3,4-dihidroksibenzojeva kiselina	Glukozid fenolne kiseline	$C_{13}H_{15}O_9^-$	315,0722	315,0708	4,4
3	Prodelfinidin dimer B <sub>3</sub>	2-(3,4-dihidroksifenil)-8-[3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-kromen-4-il]-3,4-dihidro-2H-kromen-3,5,7-triol	Flavanol	$C_{30}H_{25}O_{13}^-$	593,1301	593,1288	2,2
4	Vanilinska kiselina-4-O-glukozid	3-metoksi-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksibenzojeva kiselina 4-O- $\beta$ -D-glukopiranozil-4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina	Glukozid fenolne kiseline	$C_{14}H_{17}O_9^-$	329,0878	329,0862	4,8
5	Protokatehinska kiselina	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (3,4-dihidroksibenzenkarboksilna kiselina)	Fenolna kiselina	$C_7H_5O_4^-$	153,0193	153,01878	4,3
6	Klorogenska kiselina-glukozid 5-O-(4'-kafeoilglukozil)kina kiselina	{(3R,5R)-1,3,5-trihidroksi-4-[(E)-3-[4-hidroksi-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksifenil]prop-2-enoil]oksicikloheksan-1-karboksilna kiselina}	Glukozid fenolne kiseline	$C_{22}H_{27}O_{14}^-$	515,1401	515,1392	1,8
7	4-Hidroksibenzojeva kiselina-4-O-glukozid	4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi}benzojeva kiselina 4-O- $\beta$ -D-glukopiranozilbenzojeva kiselina	Glukozid fenolne kiseline	$C_{13}H_{15}O_8^-$	299,0772	299,0760	4,3
8	Kafeinska kiselina-3-O-glukozid	(E)-3-{4-hidroksi-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksifenil}prop-2-enska kiselina 3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enska kiselina	Glukozid fenolne kiseline	$C_{15}H_{17}O_9^-$	341,0878	341,0862	4,8
9	Eskulin	7-hidroksi-6-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi}-2H-kromen-2-on	Glukozid fenolne kiseline	$C_{15}H_{15}O_9^-$	339,0722	339,0711	3,0

nastavak Tablice 4.

10	-	4-hidroksibenzojeva kiselina	Fenolna kiselina	$C_7H_5O_3^-$	137,0244	137,0239	3,8
11	Neoklorogenska kiselina	trans-5-O-kafeoilkina kiselina [5-O-(trans-3,4-dihidroksicinamoil)-D-kina kiselina] {(1R,3R,4S,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}-1,4,5-trihidroksicikloheksan-1-karboksilna kiselina	Fenolna kiselina	$C_{16}H_{17}O_9^-$	353,0878	353,0864	4,0
12	Katehin	(2R,3S)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-kromen-3,5,7-triol	Flavanol	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,0718	289,0706	4,2
13	p-Kumarinska kiselina 4-O-glukozid	(2E)-3-{4[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi}fenilprop-2-enska kiselina 4-O-β-D-glukopiranozil-p-kumarinska kiselina	Glukozid fenolne kiseline	$C_{15}H_{17}O_8^-$	325,0929	325,0913	5,0
14	Procijanidin dimer B <sub>3</sub>	(2R,3S)-2-(3,4-dihidroksifenil)-8-[(2R,3S,4S)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-3,4-dihidro-2H-kromen-4-il]-3,4-dihidro-2H-kromen-3,5,7-triol	Flavanol	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,1352	577,1334	3,1
15	Kafeinska kiselina	3,4-dihidroksicimetna kiselina (3,4-dihidroksifenilakrilna kiselina) [3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enska kiselina]	Fenolna kiselina	$C_9H_7O_4^-$	179,0350	179,0343	4,0
16	Vanilinska kiselina	4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina	Fenolna kiselina	$C_8H_7O_4^-$	167,0350	167,0342	4,6
17	Ferulinska kiselina-4-O-glukozid	(E)-3-{3-metoksi-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi}fenilprop-2-enska kiselina (E)-4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina	Glukozid fenolne kiseline	$C_{16}H_{19}O_9^-$	355,1035	355,1024	2,9
18	Siringinska kiselina	4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzenkarboksilna kiselina	Fenolna kiselina	$C_9H_9O_5^-$	197,0456	197,0446	4,7
19	Epikatehin	(2R,3R)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-kromen-3,5,7-triol	Flavanol	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,0718	289,0704	4,8
20	5-O-kafeoilšikiminska kiselina	{(3R,4R,5R)-5-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}-3,4-dihidroksicikloheks-1-en-1-karboksilna kiselina	Fenolna kiselina	$C_{16}H_{15}O_8^-$	335,0772	335,0762	3,1
21	5-O-p-kumaroilkina kiselina	{(1S,3R,4R,5R)-1,3,4-trihidroksi-5-[(E)-3-(4-hidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}-cikloheksan-1-karboksilna kiselina}	Fenolna kiselina	$C_{16}H_{17}O_8^-$	337,0929	337,0916	4,0

nastavak Tablice 4.

22	Izorhamnetin-3,7-O-diglukozid	5-hidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3,7-bis{[3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)]-(2S,3R,4S,5S,6R)oksan-2-il]oksi}kromen-4-on	Glukozid flavona	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup>	639,1567	639,1545	3,4
23	Kamferol-3-O-heksozilheksozid	5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-3-[3,4,5-trihidroksi-6-{{3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksimetil}oksan-2-il]oksikromen-4-on	Glikozid flavonola	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	609,1461	609,1443	3,0
24	Rutin (Kvercetin-3-rutinozid)	3,3',4',5,7-Pentahidroksiflavon-3-rutinozid	Glikozid flavonola	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	609,1461	609,1431	4,9
25	p-Kumarinska kiselina	4-hidroksicimetna kiselina 3-(4-hidroksifenil)akrilna kiselina [(2E)-3-(4-hidroksifenil)prop-2-enska kiselina]	Fenolna kiselina	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	163,0401	163,0393	4,7
26	Apigenin-8-C-glukozid Viteksin	5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]kromen-4-on	Glikozid flavona	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	431,0984	431,0965	4,4
27	-	4-hidroksifeniloktana kiselina (4-hidroksifeniletanska kiselina)	Fenolna kiselina	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	151,0401	151,0396	3,3
28	Kvercetin-3-O-galaktozid Hiperin Hiperozid	2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on	Glikozid flavonola	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	463,0882	463,0869	2,9
29	Kamferol-3-O-glukozid-7-O-ramnozid	5-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-3-[3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi-7-(3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il)oksikromen-4-on	Glikozid flavonola	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	593,1512	593,1497	2,5
30	Vanilin	4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid	Aldehid fenola	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	151,0401	151,0395	4,0
31	Sinapinska kiselina	(E)-3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)prop-2-enska kiselina 3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina	Fenolna kiselina	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	223,0612	223,0601	4,9
32	Ferulinska kiselina	4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina [(2E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)prop-2-enska kiselina]	Fenolna kiselina	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	193,0506	193,0497	4,6
33	Izorhamnetin-3-ramnoglukozid Izorhamnetin-3-O-rutinozid Narcisin	5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-{{(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi-metil}oksan-2-il]oksikromen-4-on	Glikozid flavona	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	623,1618	623,1594	3,9

nastavak Tablice 4.

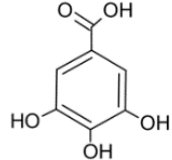
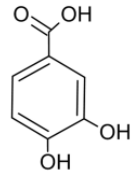
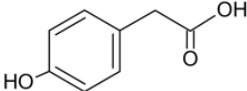
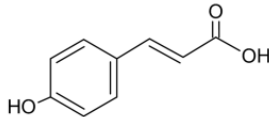
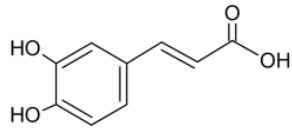
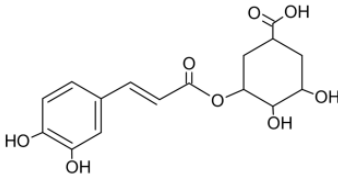
34	Kvercetin-3-O-pentozid Reinutrin	2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-(3,4,5-trihidroksioksan-2-il)oksikromen-4-on	Glikozid flavonola	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	433,0776	433,0755	4,8
35	Naringenin-7-ramnoglukozid Naringin	(2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihidroksi-6-(hidroksimetil)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]-oksioksan-2-il]-oksi-5-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-2,3-dihidroksikromen-4-on	Glikozid Flavanona	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	579,1719	579,1692	4,7
36	Izorhamnetin-3-O-glukozid	{5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on}	Glikozid flavona	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	477,1039	477,1025	2,8
37	Kamferol-3-O-glukozid Astragaln	5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on	Glukozid flavonola	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447,0933	447,0922	2,4
38	Kamferol-7-glukozid	{3,5-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on}	Glukozid flavonola	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447,09329	447,09167	3,62
39	Kvercetin 3-O-ramnozid	3,3',4',5,7-pentahidroksi-3-O-ramnozid {2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-[(2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksikromen-4-on}	Glikozid flavonola	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	447,09329	447,09261	1,5
40	3,4-Dikafeoilkina kiselina	(1S,3R,4R,5R)-3,4-bis{[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}-1,5-dihidroksicikloheksan-1-karboksilna kiselina	Fenolna kiselina	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	515,1195	515,1179	3,1
41	Koniferil aldehid Ferulil aldehid	(2E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)prop-2-enal (2E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilaldehid	Aldehid fenola	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	177,0557	177,0549	4,9
42	3-O-kafeoil-5-O-kumaroilkina kiselina	(1S,3R,4R,5R)-3-[(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi-5-[(3-(4-hidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}-1,4-dihidroksicikloheksan-1-karboksilna kiselina	Fenolna kiselina	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	499,1240	499,1233	1,4
43	Kamferol-3-O-acetilglukozid 6-O-Acetilastragaln	[(2R,3S,6S)-6-[5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4-oksokromen-3-il]oksi-3,4,5-trihidroksioksan-2-il]metil acetat	Glukozid flavonola	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	489,1039	489,1030	1,7
44	Metil-3,5-di-O-kafeoilkinat	metil-[(3R,5R)-3,5-[(2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}-1,4-dihidroksicikloheksan-1-karboksilat	Metilni ester fenolne kiseline	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	529,1352	529,1339	2,5

nastavak Tablice 4.

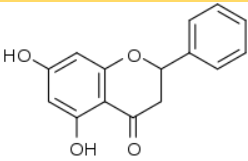
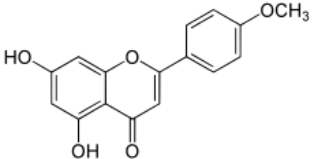
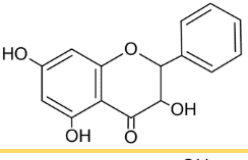
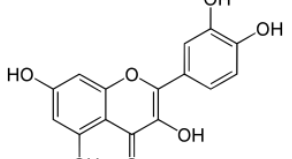
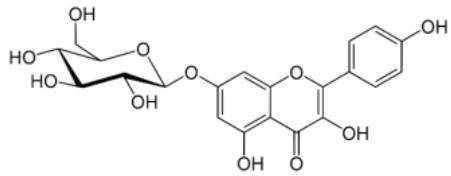
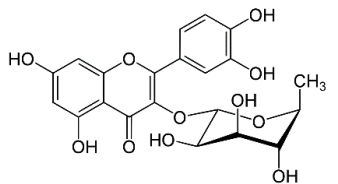
45	Luteolin	3',4',5,7-tetrahidroksiflavon [2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromen-4-on] [2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavon	$C_{15}H_9O_6^-$	285,0405	285,0392	4,5
46	Kvercetin	3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon [2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavonol	$C_{15}H_9O_7^-$	301,0354	301,0339	4,9
47	Cimetna kiselina 3-Fenilakrilna kiselina	(2E)-3-fenilprop-2-enska kiselina	Fenolna kiselina	$C_9H_7O_2^-$	147,0452	147,0446	3,5
48	Metil-4-kumarat	metil-(E)-[3-(4-hidroksifenil)]prop-2-enoat	Metilni ester fenolne kiseline	$C_{10}H_9O_3^-$	177,0557	177,0550	3,8
49	Naringinin	4',5,7-trihidroksiflavanon [2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavanon	$C_{15}H_{11}O_5^-$	271,0612	271,0599	4,7
50	Kamferol (Kemferol)	3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)kromen-4-on [3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavonol	$C_{15}H_9O_6^-$	285,0405	285,0392	4,4
51	Izorhamnetin	3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on	Flavon	$C_{16}H_{11}O_7^-$	315,0510	315,0498	4,0
52	Ramentin 7-O-Metil-kvercetin	2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5-dihidroksi-7-metoksikromen-4-on	Flavon	$C_{16}H_{11}O_7^-$	315,0510	315,0499	3,8
53	Krizin	5,7-dihidroksi-2-fenilkromen-4-on [5,7-dihidroksi-2-fenil-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavon	$C_{15}H_9O_4^-$	253,0506	253,0494	4,9
54	Pinocembrin (Dihidrokrizin)	5,7-dihidroksi-2-fenil-2,3-dihidroksikromen-4-on [2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-fenil-4H-benzopiran-4-on]	Flavanon	$C_{15}H_{11}O_4^-$	255,0663	255,0651	4,7
55	Galangin	3,5,7-trihidroksiflavon [3,5,7-trihidroksi-2-fenil-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavon	$C_{15}H_9O_5^-$	269,0455	269,0443	4,7
56	Akacetin	5,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon [5,7-dihidroksi-2-(4-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavon	$C_{16}H_{11}O_5^-$	283,0612	283,0611	0.11

**Napomena:** Spojevi su navedeni prema rastućem vremenu zadržavanja u kromatografskoj koloni.

**Tablica 5.** Trivijalna i sustavna (IUPAC) imena, prikaz strukturnih formula kvantificiranih fenolnih spojeva te njihov maseni udio u medu obične planike s vrgoračkog područja.

Broj spoja	Trivijalno ime	Sustavno ime (IUPAC)	Vrsta spoja	Strukturna formula	Maseni udio (mg kg <sup>-1</sup> )
1	Galna kiselina	3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (3,4,5-trihidroksibenzenkarboksilna kiselina)	Fenolna kiselina		0,011
2	Protokatehinska kiselina	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (3,4-dihidroksibenzenkarboksilna kiselina)	Fenolna kiselina		0,008
3	-	4-hidroksifenilactena kiselina (4-hidroksifeniletanska kiselina)	Fenolna kiselina		0,138
4	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	4-hidroksicimetna kiselina 3-(4-hidroksifenil)akrilna kiselina [(2 <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-fenil)prop-2-enska kiselina]	Fenolna kiselina		0,038
5	Kafeinska kiselina	3,4-dihidroksicimetna kiselina (3,4-dihidroksifenilakrilna kiselina)[ 3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enska kiselina]	Fenolna kiselina		0,008
6	Neoklorogenska kiselina	trans-5- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina [5- <i>O</i> -(trans-3,4-dihidroksicinamoil)- <i>D</i> -kina kiselina] {(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-3-[( <i>E</i> )-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enil]oksi-1,4,5-trihidroksicikloheksan-1-karboksilna kiselina}	Fenolna kiselina		0,031

nastavak Tablice 5.

7	Pinocembrin (Dihidrokrizin)	5,7-dihidroksi-2-fenil-2,3-dihidroksifenil-4-on [2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-fenil-4H-benzopiran-4-on]	Flavanon		0,009
8	Akacetin	5,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon [5,7-dihidroksi-2-(4-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavon		0,008
9	Galangin	3,5,7-trihidroksiflavon [3,5,7-trihidroksi-2-fenil-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavon		0,004
10	Kvercetin	3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon [2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on]	Flavonol		0,004
11	Kamferol-7-glukozid	{3,5-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on}	Glukozid flavonola		0,007
12	Kvercetin-3-O-ramnozid	3,3',4',5,7-pentahidroksi-3-O-ramnozid {2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-[(2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksikromen-4-on}	Glikozid flavonola		0,363



#### 4.4. Kromosomske aberacije

Ukupni rezultati analize kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi trojice ispitanika prikazani su u tablici 6. Učestalost limfocita s kromosomskim aberacijama u negativnoj kontroli vrlo je niska, svega njih 13 na 1800 pregledanih stanica. U kvalitativnom pogledu, među utvrđenim vrstama aberacija u negativnoj kontroli prevladavaju kromatidni lomovi, a utvrđena je i manje učestala pojava acentričnih fragmenata.

Izloženost testiranim uzorcima izazvala je odstupanja ukupnog broja stanica s aberacijama prema negativnoj kontroli. Statistički značajne razlike u zastupljenosti stanica s aberacijama između testiranih uzoraka prikazane su u tablici 6. Najveća učestalost stanica s aberacijama utvrđena je u uzorku tretiranom s 10× koncentriranim ekstraktom meda obične planike. Treba istaknuti kako je tretman ekstraktom povećao učestalost kromatidnih lomova i acentričnih fragmenata u odnosu na kontrolu. Za razliku od ekstrakta, med i HGA vrlo malo su utjecali na pojavnost kromosomskih oštećenja.

Radi procjene mogućih protektivnih/antigenotoksičnih/antimutagenih učinaka testiranih tvari, provedeni su dodatni tretmani uporabom svih istraživanih koncentracija meda obične planike, ekstrakta meda te HGA u kombinaciji s citostatikom irinotekanom. Usporedno je ispitivan uzorak umjetnog meda, a u pokus je kao pozitivna kontrola za vjerodostojnost metode analize kromosomskih aberacija uključen i bleomicin, kao dokazani mutageni i citotoksični agens.

Kako se vidi iz rezultata prikazanih u tablici 6, tretman irinotekanom izazvao je veliki porast broja stanica koje sadrže kromosomske aberacije, utjecao je na povećanje učestalosti kromatidnih lomova i acentričnih fragmenata, a doveo je i do pojave kromosomskih oštećenja koja u uzorcima negativne kontrole i testiranih tvari bez dodatka citostatika nisu zabilježene (kromosomski lom, bicentrični kromosomi i tetradijus).

S izuzetkom umjetnog meda, sve su testirane tvari uspješno smanjile pojavnost stanica s kromosomskim aberacijama. Najbolji učinak uočen je nakon kombiniranog tretmana s medom obične planike. Statističke značajnosti uočenih razlika između testiranih uzoraka prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Ukupni rezultati analize kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi trojice ispitanika.

Parametar Uzorak	Broj stanica s abercijama (na 1800 stanica)	Vrste kromosomskih aberacija na 1800 metafaza (ukupno / sr. vr. ± SD)				
		Kromatidni lom	Kromosomski lom	Acentrični fragment	Bicentrični kromosom	Tetradijus
Negativna kontrola*	13	10 1,1 ± 0,60	-	3 0,3 ± 0,50	-	-
1× Med <sup>a</sup>	15	10 1,1 ± 0,60	-	5 0,6 ± 0,53	-	-
5× Med <sup>b</sup>	18	14 1,6 ± 0,53	-	4 0,4 ± 0,53	-	-
10× Med <sup>c</sup>	16	12 1,3 ± 0,50	-	4 0,4 ± 0,53	-	-
Umjetni med <sup>d</sup>	16	12 1,3 ± 0,71	-	4 0,4 ± 0,73	-	-
1× Ekstrakt <sup>e</sup>	30 *,a,c,d,h,i,j	23 2,6 ± 0,88	-	7 0,8 ± 0,44	-	-
5× Ekstrakt <sup>f</sup>	37 *,a,b,c,d,h,i,j	23 2,6 ± 0,88	-	14 1,6 ± 0,53	-	-
10× Ekstrakt <sup>g</sup>	42 *,a,b,c,d,h,i,j	27 3,0 ± 1,12	1 0,1 ± 0,33	15 1,7 ± 0,87	-	-
1× HGA <sup>h</sup>	15	11 1,2 ± 0,67	-	4 0,4 ± 0,53	-	-
5× HGA <sup>i</sup>	13	9 1,0 ± 0,71	-	4 0,4 ± 0,53	-	-
10× HGA <sup>j</sup>	15	9 1,0 ± 0,50	1 0,1 ± 0,33	5 0,6 ± 0,53	-	-
Irinotekan <sup>k</sup>	104 <sup>#</sup>	59 <sup>#</sup> 6,6 ± 2,07	5 0,6 ± 0,88	46 <sup>\$</sup> 5,1 ± 2,15	4 <sup>*,a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,l,m,p,q,r,s,t,u</sup> 0,4 ± 0,53	2 0,2 ± 0,67
1× Med + irinotekan <sup>l</sup>	39 *,a,b,c,d,h,i,j	18 2,0 ± 0,87	4 0,4 ± 0,53	16 1,8 ± 0,83	-	5 0,6 ± 0,88

nastavak Tablice 6.

<b>5x Med + irinotekan<sup>m</sup></b>	46 *,a,b,c,d,h,i,j	24 2,7 ± 1,41	5 0,6 ± 0,73	14 1,6 ± 0,88	-	5 0,6 ± 0,73
<b>10x Med + irinotekan<sup>n</sup></b>	49 *,a,b,c,d,e,h,i,j	26 2,9 ± 1,54	3 0,3 ± 0,71	17 1,9 ± 0,78	2 0,2 ± 0,44	5 0,6 ± 0,73
<b>Umjetni med + irinotekan<sup>o</sup></b>	117 <sup>\$</sup>	80 <sup>\$</sup> 8,9 ± 2,98	11 <sup>*,a,b,c,d,e,h,i,j,l,n,p,q,r,s,t,u</sup> 1,2 ± 0,97	35 <sup>&amp;</sup> 3,9 ± 2,26	2 0,2 ± 0,44	1 0,1 ± 0,33
<b>1x Ekstrakt + irinotekan<sup>p</sup></b>	59 *,a,b,c,d,e,h,i,j,l	33 <sup>*,a,b,c,d,h,i,j</sup> 3,7 ± 0,87	3 0,3 ± 0,50	19 <sup>*,b,c,d,h,i</sup> 2,1 ± 0,60	-	4 0,5 ± 0,33
<b>5x Ekstrakt + irinotekan<sup>q</sup></b>	53 *,a,b,c,d,e,h,i,j	37 <sup>*,a,b,c,d,h,i,j,l</sup> 4,1 ± 1,27	3 0,3 ± 0,71	15 1,7 ± 1,41	-	1 0,1 ± 0,33
<b>10x Ekstrakt + irinotekan<sup>r</sup></b>	47 *,a,b,c,d,e,h,i,j	31 <sup>*,a,c,d,h,i,j</sup> 3,4 ± 0,88	1 0,1 ± 0,33	18 <sup>*</sup> 2,0 ± 0,71	-	-
<b>1x HGA + irinotekan<sup>s</sup></b>	58 *,a,b,c,d,e,f,h,i,j	35 <sup>*,a,b,c,d,h,i,j</sup> 3,9 ± 1,54	2 0,2 ± 0,44	19 <sup>*,b,c,d,h,i</sup> 2,1 ± 0,78	1 0,1 ± 0,33	4 0,4 ± 0,73
<b>5x HGA + irinotekan<sup>t</sup></b>	59 *,a,b,c,d,e,f,h,i,j,l	39 <sup>*,a,b,c,d,h,i,j,l</sup> 4,3 ± 1,50	2 0,2 ± 0,44	16 2,0 ± 0,93	-	3 0,3 ± 0,50
<b>10x HGA + irinotekan<sup>u</sup></b>	47 *,a,b,c,d,e,h,i,j	29 <sup>*,a,i,j</sup> 3,2 ± 0,97	-	19 <sup>*,b,c,d,h,i</sup> 2,1 ± 1,05	-	-
<b>Bleomicin (pozitivna kontrola)</b>	188 <sup>↑</sup>	157 <sup>↑</sup> 17,4 ± 7,26	18 <sup>↑</sup> 2,0 ± 1,50	70 <sup>↑</sup> 7,8 ± 1,64	11 <sup>↑</sup> 1,4 ± 0,74	-

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih metafaza iznosio je 1800. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplikatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 200 metafaza po jednoj analizi (3 x 3 x 200 = 1800).

Statistička obrada podataka za broj stanica provedena je pomoću  $\chi^2$ -testa, a za vrste aberacija pomoću analize varijance s *post-hoc* Tukeyevim HSD testom, uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno povišene u odnosu na ostale uzorke. ↑ – u usporedbi sa svim ostalim uzorcima; # – u usporedbi sa svim uzorcima osim kombinacije "umjetni med + irinotekan"; & – u usporedbi sa svim uzorcima osim irinotekana; \$ – u usporedbi sa svim uzorcima osim pozitivne kontrole.

#### 4.5. Citohalazinom B-blokirani mikronukleus-test (CBMN-test) na ljudskim limfocitima

Ukupni rezultati CBMN-testa u kontrolnim limfocitima periferne krvi trojice ispitanika te limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, ekstraktom i HGA prikazani su u tablici 7.

Učestalost mikronukleusa (MN) u binuklearnim (BN) limfocitima negativne kontrole vrlo je niska, svega 2,4 MN na 1000 pregledanih BN limfocita. Izloženost testiranim uzorcima izazvala je manja odstupanja ukupnog broja MN prema negativnoj kontroli. Najveća učestalost MN od 3,8 na 1000 pregledanih BN limfocita utvrđena je u uzorku tretiranom s 10× ekstraktom meda obične planike.

Razlike u zastupljenosti binuklearnih limfocita s mikronukleusima ( $BN_{MN}$ ) između negativne kontrole i testiranih uzoraka nisu statistički značajne.

U uzorku negativne kontrole te svim testiranim uzorcima utvrđene su samo stanice koje sadrže po jedan MN (tablica 7).

Rezultati koji se odnose na pojavnost jezgrinih pupova (eng. *Nuclear bud*, NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže ( $BN_{NB}$ ) prikazani su u tablici 8.

Učestalost NB-a u binuklearnim (BN) limfocitima negativne kontrole vrlo je niska, svega 1,9 NB na 1000 pregledanih BN limfocita. Izloženost testiranim uzorcima izazvala je manja odstupanja ukupnog broja NB-a prema negativnoj kontroli. Najveća učestalost NB od 3,2 na 1000 pregledanih BN limfocita utvrđena je u uzorku tretiranom umjetnim medom.

Razlike u zastupljenosti binuklearnih limfocita s NB-om ( $BN_{NB}$ ) između negativne kontrole i testiranih uzoraka nisu statistički značajne (tablica 8).

Kako je vidljivo iz tablice 8, u negativnoj kontroli te ni u jednom uzorku izloženom testiranim tvarima nisu zabilježeni nukleoplazmatski mostovi (eng. *Nucleoplasmic bridge* NPB).

**Tablica 7.** Ukupni rezultati CBMN-testa u kontrolnim limfocitima periferne krvi trojice ispitanika te limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, ekstraktom i homogentizinskom kiselinom (HGA). Prikazani su podaci o učestalosti mikronukleusa (MN) u binuklearnim (BN) limfocitima i raspodjeli binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>).

Parametar Uzorak	NK	Med			Umjetni med	Ekstrakt			HGA		
		1x	5x	10x		1x	5x	10x	1x	5x	10x
<b>Učestalost mikronukleusa (MN)</b>											
<b>Σ MN / 9000 BN limfocita</b>	22	24	25	21	28	25	28	34	25	27	26
<b>Broj MN / 1000 BN limfocita</b>	2,4	2,7	2,8	2,3	3,1	2,8	3,1	3,8	2,8	3,0	2,9
<b>Raspodjela binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>)</b>											
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 9000 BN limfocita</b>	22	24	25	21	28	25	28	34	25	27	26
<b>ΣBN<sub>MN1</sub></b>	22	24	25	21	28	25	28	34	25	27	26
<b>ΣBN<sub>MN2</sub></b>	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
<b>ΣBN<sub>MN3</sub></b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Ukupni % BN<sub>MN</sub></b>	0,24	0,27	0,28	0,23	0,31	0,28	0,31	0,38	0,28	0,30	0,29
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 1000 BN limfocita</b>	2,4	2,7	2,8	2,3	3,1	2,8	3,1	3,8	2,8	3,0	2,9

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih binuklearnih limfocita iznosio je 9000. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplikatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 1000 binuklearnih limfocita po jednoj analizi (3 × 3 × 1000 = 9000). Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Nijedna razlika između uzoraka nije statistički značajna. NK – negativna kontrola.

**Tablica 8.** Ukupni rezultati CBMN-testa u kontrolnim limfocitima periferne krvi trojice ispitanika te limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, ekstraktom i homogentizinskom kiselinom (HGA). Prikazani su podaci o pojavnosti jezgrinih pupova (eng. *Nuclear bud*, NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>), te pojavnosti nukleoplazmatskih mostova (eng. *Nucleoplasmic bridge*, NPB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>).

Parametar	Uzorak	NK	Med			Umjetni med <sup>d</sup>	Ekstrakt			HGA		
			1x	5x	10x		1x	5x	10x	1x	5x	10x
<b>Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>)</b>												
<b>Σ NB / 9000 BN limfocita</b>		17	22	20	25	29	23	25	27	20	24	24
<b>Broj NB / 1000 BN limfocita</b>		1,9	2,4	2,2	2,8	3,2	2,6	2,8	3,0	2,2	2,7	2,7
<b>ΣBN<sub>NB</sub> / 9000 BN limfocita</b>		17	22	20	25	29	23	25	27	20	24	23
<b>Ukupni % BN<sub>NB</sub></b>		0,19	0,24	0,22	0,28	0,32	0,26	0,28	0,30	0,22	0,27	0,26
<b>ΣBN<sub>NB</sub> /1000 BN limfocita</b>		1,9	2,4	2,2	2,8	3,2	2,6	2,8	3,0	2,2	2,7	2,6
<b>Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>)</b>												
<b>Σ NPB/9000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Broj NPB/1000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>ΣBN<sub>NPB</sub> /9000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Ukupni % BN<sub>NPB</sub></b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>ΣBN<sub>NPB</sub> /1000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih binuklearnih limfocita iznosio je 9000. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplikatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 1000 binuklearnih limfocita po jednoj analizi (3 × 3 × 1000 = 9000).

Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Nijedna razlika između uzoraka nije statistički značajna.

NK – negativna kontrola.

Ukupni rezultati stanične kinetike i preživljenja limfocita periferne krvi u kontrolnim uzorcima trojice ispitanika te uzorcima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, ekstraktom i HGA prikazani su u tablici 9.

U uzorku negativne kontrole utvrđena je najviša vrijednost indeksa diobe jezgara od 2,031. Svi testirani uzorci imali su određena odstupanja od te vrijednosti, čije su statističke značajnosti označene u tablici 8. Valja naglasiti da su najveća odstupanja zabilježena u uzorcima tretiranim s ekstraktom meda obične planike, a takvi rezultati upućuju na sposobnost testiranih uzoraka da uspore i/ili zakoče diobu limfocita, osobito pri prolazu stanica iz  $M_1$  u  $M_2$  (uz posljedični porast broja stanica u  $M_1$ ) što je uzrokovalo i manji broj stanica koje su ušle u  $M_3$  i  $M_4$ .

Sve navedeno odražava se i na vrijednosti replikacijskog indeksa (tablica 9).

Tretmani testiranim tvarima potaknuli su dio limfocita na apoptozu, odnosno programiranu staničnu smrt. Najveći broj stanica u apoptozi (28/9000) utvrđen je u uzorku tretiranom s 10× koncentriranim ekstraktom meda obične planike i ta je vrijednost statistički značajno ( $p < 0,05$   $\chi^2$ -test) odstupala prema negativnoj kontroli i uzorku tretiranom s 1× medom obične planike (tablica 9).

U uzorku negativne kontrole utvrđen je vrlo mali broj stanica u nekrozi (3/9000). Svi tretmani su doveli do statistički značajnog porasta ( $p < 0,05$   $\chi^2$ -test) broja stanica u nekrozi, pri čemu je njih najviše (20/9000) utvrđeno u uzorku tretiranom s 10× koncentriranim ekstraktom meda obične planike.

Uzevši u obzir podatke o broju svih živih i mrtvih stanica u negativnoj kontroli i testiranim uzorcima, izračunate su vrijednosti proliferacijskog indeksa (CBPI). U uzorku negativne kontrole utvrđena je najviša vrijednost CBPI od 1,954. Svi testirani uzorci imali su određena odstupanja od te vrijednosti, čije su statističke značajnosti označene u tablici 9.

Na osnovi dobivenih vrijednosti izračunat je i postotak citostaze za sve uzorke. Treba istaknuti da su sva tri testirana uzorka ekstrakta meda obične planike s vrijednostima % citostaze oko ili malo više od 20 % pokazala značajan citostatski učinak. Za razliku od njih, med obične planike i HGA u testiranim koncentracijama imaju slabi, (čak zanemariv) citostatski učinak (tablica 9).

**Tablica 9.** Ukupni rezultati stanične kinetike i preživljenja limfocita periferne krvi u kontrolnim uzorcima trojice ispitanika te uzorcima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, ekstraktom i homogentizinskom kiselinom (HGA).

Parametar	Uzorak	NK*	Med			Umjetni med <sup>d</sup>	Ekstrakt			HGA		
			1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>e</sup>	5x <sup>f</sup>	10x <sup>g</sup>	1x <sup>h</sup>	5x <sup>i</sup>	10x <sup>j</sup>
$\Sigma M_1$		1383	1566	1463	1405	1472	2508	2448	2396	1426	1471	1656
$\Sigma M_2$		6618	6429	6576	6601	6710	6097	6178	6231	6618	6608	6351
$\Sigma M_3$		333	306	283	313	263	141	161	133	267	242	278
$\Sigma M_4$		666	699	678	681	555	254	213	240	689	679	715
NDI		2,031 a,d,e,f,g,h,i,j	2,015 d,e,f,g,i	2,020 d,e,f,g,j	2,030 a,d,e,f,g,i,j	1,989 e,f,g	1,793	1,793	1,802	2,024 a,d,e,f,g,j	2,014 d,e,f,g,j	2,006 d,e,f,g
Replikacijski indeks		100	97,8	98,4	99,5	96,7	79,7	80,2	80,7	98,8	97,9	96,6
$\Sigma$ Limfociti u apoptozi		13	14	20	18	19	21	24	28 <sup>*,a</sup>	19	19	19
% Limfociti u apoptozi		0,14	0,16	0,22	0,20	0,21	0,23	0,27	0,31	0,21	0,21	0,21
Broj apoptoza po analizi		1,44	1,56	2,22	2,00	2,11	2,33	2,67	3,11	2,11	2,11	2,11
$\Sigma$ Limfociti u nekrozi		3	12*	15*	16*	16*	17*	17*	20*	12*	14*	16*
% Limfociti u nekrozi		0,03	0,13	0,17	0,18	0,18	0,19	0,19	0,22	0,13	0,16	0,18
Broj nekroza po analizi		0,33	1,33	1,67	1,78	1,78	1,89	1,89	2,22	1,33	1,56	1,78
CBPI		1,954 a,b,d,e,f,g,h,i,j	1,932 d,e,f,g	1,937 d,e,f,g,j	1,947 a,d,e,f,g,i,j	1,920 e,f,g	1,758	1,762	1,766	1,941 a,d,j	1,932 d,j	1,919
% citostaze		0	2,3	1,8	0,7	3,6	20,6	20,2	19,7	1,3	2,3	3,7

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih limfocita iznosio je 9000. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplikatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 1000 limfocita po jednoj analizi ( $3 \times 3 \times 1000 = 9000$ ). Vrijednosti indeksa diobe jezgara (eng. *Nuclear Division Index*, NDI) izračunate su prema formuli koju su predložili Eastmond i Tucker (1989):  $NDI = (M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / N$ , gdje je  $M_1 - M_4$  broj stanica s jednom do četiri jezgre, a N ukupni broj izbrojenih živih stanica. Replikacijski indeks je izračunat prema formuli:  $RI = \{[(\text{broj dvojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj višejezgrenih stanica})] / (\text{ukupan broj stanica})\} / \{[(\text{broj dvojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj višejezgrenih stanica})] / (\text{ukupan broj stanica u kontrolnoj skupini})\} \times 100$  (Lorge i sur., 2008). Vrijednosti proliferacijskog indeksa (CBPI) izračunate su prema formuli:  $CBPI = [(\text{broj jednojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj dvojezgrenih stanica}) + (3 \times \text{broj višejezgrenih stanica})] / (\text{ukupan broj stanica})$  (OECD, 2016). % citostaze izračunat je prema formuli: % citostaze =  $100 - 100 \times \{(\text{CBPI skupine} - 1) / (\text{CBPI kontrolne skupine})\}$  (OECD, 2016). Statistička obrada podataka provedena je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno više u odnosu na ostale uzorke. NK – negativna kontrola.



Radi procjene mogućih protektivnih/antigenotoksičnih/antimutagenih učinaka testiranih tvari, provedeni su dodatni tretmani uporabom svih istraživanih koncentracija meda obične planike, ekstrakta te HGA u kombinaciji s citostatikom irinotekanom. Usporedno je ispitivan uzorak umjetnog meda, a u pokus je kao pozitivna kontrola za vjerodostojnost metode CBMN-testa uključen i bleomicin, kao dokazani mutageni i citotoksični agensi.

U tablici 10 prikazani su rezultati za učestalost mikronukleusa (MN) u binuklearnim (BN) limfocitima. Tretman irinotekanom izazvao je veliki porast broja mikronukleusa i stanica koje ih sadrže, a sve su testirane tvari uspješno snizile njihovu pojavnost. Najslabiji učinak uočen je nakon izlaganja umjetnom medu. Statističke značajnosti razlika u zastupljenosti binuklearnih limfocita s mikronukleusima ( $BN_{MN}$ ) između testiranih uzoraka prikazane su u tablici 10. Najviše testiranih uzoraka imalo je visoku pojavnost stanica koje sadrže po jedan MN, u nekima su uočeni i binuklearnih limfociti s dva MN (irinotekan, najviše testirana koncentracija meda, umjetni med, dvije niže testirane koncentracije ekstrakta i bleomicin). Limfociti koji sadrže po tri MN zabilježeni su samo nakon izlaganja citostaticima irinotekanu i bleomicinu.

Na osnovi podataka o učestalosti mikronukleusa u limfocitima tretiranim irinotekanom te u limfocitima tretiranim kombinacijama irinotekana s medom, ekstraktom i HGA izračunate su vrijednosti indeksa mutagenosti ( $MutI$ ) koje su prikazane u tablici 11. Negativni predznaci dobivenih vrijednosti upućuju na smanjivanje genotoksičnog učinka irinotekana pod utjecajem svih testiranih tvari. Treba istaknuti da za procjenu učinkovitosti promatramo najviše apsolutne vrijednosti, a iz njih se može zaključiti da je najučinkovitija kombinacija ona u kojoj je korištena peterostruka koncentracija meda/ekstrakta/HGA. Nadalje, koncentracija meda i HGA koja odgovara dnevnoj dozi pokazala se djelotvornijom u smanjenju pojavnosti mikronukleusa od njihove deseterostruke koncentracije.

Rezultati koji se odnose na pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže ( $BN_{NB}$ ) prikazani su u tablici 12. Tretman irinotekanom izazvao je visoku učestalost NB-a u binuklearnim (BN) limfocitima (66 na 9000 pregledanih BN limfocita). U kombinaciji s umjetnim medom, broj NB-a još malo je porastao. Istovremeni tretmani sa svim testiranim tvarima smanjili su učestalost NB-a, pri čemu je najdjelotvorniji med. Statističke značajnosti razlika u zastupljenosti binuklearnih limfocita s NB ( $BN_{NB}$ ) između testiranih uzoraka prikazane su u tablici 12. Iz rezultata prikazanih u istoj tablici vidljivo je da su nukleoplazmatski mostovi zabilježeni nakon tretmana irinotekanom, kao i u

**Tablica 10.** Skupni rezultati CBMN-testa u limfocitima periferne krvi trojice ispitanika tretiranim s irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana i meda obične planike, ekstrakta i homogentizinske kiseline (HGA). U pokusu je kao pozitivna kontrola korišten bleomicin. Prikazani su podaci o učestalosti mikronukleusa (MN) u binuklearnim (BN) limfocitima i raspodjeli binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>).

Parametar Uzorak	IRI*	Med + IRI			Umjetni med + IRI <sup>d</sup>	Ekstrakt + IRI			HGA + IRI			Bleomicin <sup>k</sup>
		1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>e</sup>	5x <sup>f</sup>	10x <sup>g</sup>	1x <sup>h</sup>	5x <sup>i</sup>	10x <sup>j</sup>	
<b>Učestalost mikronukleusa (MN)</b>												
<b>Σ MN / 9000 BN limfocita</b>	117	62	53	67	109	60	52	58	66	59	74	158
<b>Broj MN / 1000 BN limfocita</b>	13,0	6,9	5,9	7,4	12,1	6,7	5,8	6,4	7,3	6,6	8,2	17,6
<b>Raspodjela binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>)</b>												
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 9000 BN limfocita</b>	108 <sub>a,b,c,e,f,g,h,i,j</sub>	62	59	66	106 <sub>a,b,c,e,f,g,h,i,j</sub>	58	51	58	66	59	74 <sup>f</sup>	140 <sup>#</sup>
<b>ΣBN<sub>MN1</sub></b>	100	62	59	65	103	56	50	58	66	59	74	123 <sup>#</sup>
<b>ΣBN<sub>MN2</sub></b>	7	0	0	1	3	2	1	0	0	0	0	16 <sup>#</sup>
<b>ΣBN<sub>MN3</sub></b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Ukupni % BN<sub>MN</sub></b>	1,2	0,69	0,59	0,73	1,18	0,64	0,57	0,64	0,73	0,66	0,82	1,56
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 1000 BN limfocita</b>	12,0	6,9	5,9	7,3	11,8	6,4	5,7	6,4	7,3	6,6	8,2	15,6

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih binuklearnih limfocita iznosio je 9000. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplicatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 1000 binuklearnih limfocita po jednoj analizi (3 × 3 × 1000 = 9000).

Statistička obrada podataka provedena je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno povišene u odnosu na ostale uzorke. # – u usporedbi sa svim ostalim uzorcima.

**Tablica 11.** Vrijednosti indeksa mutagenosti (MutI) izračunate na osnovi podataka o učestalosti mikronukleusa u limfocitima tretiranim irinotekanom (IRI) te u limfocitima tretiranim kombinacijama irinotekana s medom, ekstraktom i homogentizinskom kiselinom (HGA).

Parametar Uzorak	Med + IRI			Umjetni med + IRI	Ekstrakt + IRI			HGA + IRI		
	1x	5x	10x		1x	5x	10x	1x	5x	10x
<b>MutI</b>	-0,47	-0,55	-0,43	-0,07	-0,49	-0,56	-0,50	-0,44	-0,50	-0,37

**Napomena:** Indeks mutagenosti (MutI) izračunat je primjenom formule:  $MutI = (MN_{IRI+TESTIRANI\ ANTIMUTAGEN} - MN_{IRI}) / MN_{IRI}$  (Scarpato i sur., 1998).

**Tablica 12.** Ukupni rezultati CBMN-testa u limfocitima periferne krvi trojice ispitanika tretiranim u uvjetima *in vitro* s irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana i meda obične planike, ekstrakta i homogentizinske kiseline (HGA). U pokusu je kao pozitivna kontrola korišten bleomicin. Prikazani su podaci o pojavnosti jezgrinih pupova (eng. *Nuclear bud*, NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>), te pojavnosti nukleoplazmatskih mostova (eng. *Nucleoplasmic bridge*, NPB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>).

Parametar Uzorak	IRI*	Med + IRI			Umjetni med + IRI <sup>d</sup>	Ekstrakt + IRI			HGA + IRI			Bleomicin <sup>k</sup>
		1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>e</sup>	5x <sup>f</sup>	10x <sup>g</sup>	1x <sup>h</sup>	5x <sup>i</sup>	10x <sup>j</sup>	
<b>Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>)</b>												
Σ NB / 9000 BN limfocita	66	35	36	40	70	46	42	49	45	39	44	88
Broj NB / 1000 BN limfocita	7,3	3,9	4,0	4,4	7,8	5,1	4,7	5,4	5,0	4,3	4,9	9,8
ΣBN <sub>NB</sub> / 9000 BN limfocita	66 <small>a,b,c,f,h,i,j</small>	35	36	40	70 <small>a,b,c,e,f,h,i,j</small>	46	42	49	45	39	44	88 <small>a,b,c,e,f,g,h,i,j</small>
Ukupni % BN <sub>NB</sub>	0,73	0,39	0,40	0,44	0,78	0,51	0,47	0,54	0,50	0,43	0,49	0,98
ΣBN <sub>NB</sub> / 1000 BN limfocita	7,3	3,9	4,0	4,4	7,8	5,1	4,7	5,4	5,0	4,3	4,9	9,8
<b>Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>)</b>												
Σ NPB / 9000 BN limfocita	6	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	13
Broj NPB / 1000 BN limfocita	0,7	0	0	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0	1,4
ΣBN <sub>NPB</sub> / 9000 BN limfocita	6	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	13 <small>a,b,c,e,f,g,h,i,j</small>
Ukupni % BN <sub>NPB</sub>	0,07	0	0	0	0,01	0,02	0	0	0	0	0	0,14
ΣBN <sub>NPB</sub> / 1000 BN limfocita	0,7	0	0	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0	1,4

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih binuklearnih limfocita iznosio je 9000. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplikatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 1000 binuklearnih limfocita po jednoj analizi (3 × 3 × 1000 = 9000). Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno povišene u odnosu na ostale uzorke.

uzorcima tretiranim kombinacijom 1× meda i irinotekana te umjetnog meda i irinotekana.

Ukupni rezultati stanične kinetike prikazani su u tablici 13. Nakon tretmana irinotekanom utvrđena je vrijednost indeksa diobe jezgara od 1,936. Svi testirani uzorci imali su određena odstupanja od te vrijednosti, čije su statističke značajnosti označene u tablici 11. Treba istaknuti da su najniže vrijednosti indeksa diobe jezgara zabilježene u uzorcima tretiranim s ekstraktom meda obične planike. U tim uzorcima uočen je veliki porast broja stanica u M<sub>1</sub>, praćen smanjenim brojem stanica koje su ušle u M<sub>2</sub>, a osobito u M<sub>3</sub> i M<sub>4</sub>.

Sve navedeno odražava se i na vrijednosti replikacijskog indeksa. Valja napomenuti da su med i HGA ipak u određenoj mjeri uspjeli nadvladati štetne učinke irinotekana na diobu stanica, što se vidi iz rezultata prikazanih u tablici 13.

Tretman irinotekanom potaknuo je dio limfocita na apoptozu. Dodatak meda i HGA irinotekanu pridonio je padu broja stanica u apoptozu pri sve tri njihove ispitane koncentracije. Međutim, dodatak ekstrakta djelovao je suprotno, izazivajući još jači citotoksični učinak od samog irinotekana. U uzorku tretiranom irinotekanom utvrđen je i porast broja stanica u nekrozi. Većina kombiniranih tretmana dovela je do pada broja stanica u nekrozi u odnosu na irinotekan, pri čemu su med i HGA učinkovitiji od ekstrakta. Statistička značajnost svih dobivenih rezultata za apoptoze i nekroze prikazana je u tablici 13.

Na osnovi podataka o broju svih živih i mrtvih stanica izračunate su vrijednosti proliferacijskog indeksa (CBPI). Nakon tretmana irinotekanom utvrđena je vrijednost CPBI od 1,877. Svi testirani uzorci imali su određena odstupanja od te vrijednosti, čije su statističke značajnosti označene u tablici 13. Treba istaknuti da su najniže vrijednosti indeksa diobe jezgara zabilježene u uzorcima tretiranim s ekstraktom meda obične planike. Također, za sve uzorke je izračunat i postotak citostaze. Sve tri kombinacije irinotekana i ekstrakta meda obične planike s vrijednostima % citostaze višim od 25 % pokazuju da dodavanje ekstrakta pridonosi snažnijem citostatskom učinku irinotekana. Za razliku od njih, primijenjeni u kombinaciji s irinotekanom, med obične planike i HGA u testiranim koncentracijama umanjili su citostatski učinak irinotekana (tablica 13).

**Tablica 13.** Ukupni rezultati stanične kinetike i preživljenja limfocita periferne krvi trojice ispitanika tretiranim u uvjetima *in vitro* s irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana i meda obične planike, ekstrakta meda i homogentizinske kiseline (HGA). U pokusu je kao pozitivna kontrola korišten bleomicin.

Parametar Uzorak	IRI*	Med + IRI			Umjetni med +	Ekstrakt + IRI			HGA + IRI			Bleomicin <sup>k</sup>
		1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>	IRI <sup>d</sup>	1x <sup>e</sup>	5x <sup>f</sup>	10x <sup>g</sup>	1x <sup>h</sup>	5x <sup>i</sup>	10x <sup>j</sup>	
M <sub>1</sub>	1600	1481	1570	1578	1729	2768	2776	2887	1614	1632	1411	3653
M <sub>2</sub>	6779	6906	6809	6812	6630	5945	6060	5891	6665	6747	6896	5112
M <sub>3</sub>	214	230	214	207	222	130	79	110	220	172	233	139
M <sub>4</sub>	407	383	407	403	419	157	85	112	501	449	460	96
NDI	1,936 e,f,g,k	1,946 d,e,f,g,i,k	1,940 d,e,f,g,i,k	1,937 d,e,f,g,k	1,926 e,f,g,k	1,742 f,g,k	1,719 g,k	1,716 k	1,956 *,a,b,c,d,e,f,g,i,k	1,938 d,e,f,g,k	1,971 *,a,b,c,d,e,f,g,h,i,k	1,631
Replikacijski indeks	92,6	94,1	93,0	92,9	91,4	75,1	73,7	72,9	93,8	92,4	95,8	63,5
Σ Limfociti u apoptozi	34	22	32	29	25	51 a,b,c,d,h,i	44 a,d,h,i	53 *,a,b,c,d,h,i	25	21	32	118 <sup>#</sup>
% Limfociti u apoptozi	0,38	0,24	0,36	0,32	0,28	0,57	0,49	0,59	0,28	0,23	0,36	1,31
Broj apoptoza po analizi	3,78	2,44	3,56	3,22	2,78	5,67	4,89	5,89	2,78	2,33	3,56	13,11
Σ Limfociti u nekrozi	35 <sup>h</sup>	23	23	22	35 <sup>h</sup>	34	31	37 <sup>h</sup>	20	23	22	81 <sup>#</sup>
% Limfociti u nekrozi	0,39	0,26	0,26	0,24	0,39	0,38	0,34	0,41	0,22	0,26	0,24	0,9
Broj nekroza po analizi	3,89	2,56	2,56	2,44	3,89	3,78	3,44	4,11	2,22	2,56	2,44	9,0
CBPI	1,877 e,f,g,k	1,894 *,d,e,f,g,h,i,k	1,883 d,e,f,g,k	1,882 d,e,f,g,k	1,867 e,f,g,k	1,708 f,g,k	1,696 g,k	1,687 k	1,891 *,b,c,d,e,f,g,k	1,878 *,d,e,f,g,k	1,910 *,b,c,d,e,f,g,h,i,k	1,585
% citostaze	8,1	6,3	7,4	7,6	9,1	25,8	27,1	28,0	6,6	7,9	4,6	38,7

**Napomena:** Ukupni broj pregledanih binuklearnih limfocita iznosio je 9000. Mikroskopske analize su provedene na svjetlosnom mikroskopu Leitz Laborlux D, pod povećanjem 1000x, u triplikatu za svakog od trojice ispitanika, pregledom 1000 binuklearnih limfocita po jednoj analizi (3 × 3 × 1000 = 9000). Vrijednosti indeksa diobe jezgara (eng. *Nuclear Division Index*, NDI) izračunate su prema formuli koju su predložili Eastmond i Tucker (1989):  $NDI = (M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / N$ , gdje je M<sub>1</sub> – M<sub>4</sub> broj stanica s jednom do četiri jezgre, a N ukupni broj izbrojenih živih stanica. Replikacijski indeks je izračunat prema formuli:  $RI = \{[(\text{broj dvojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj višezzgrenih stanica})] \div (\text{ukupan broj stanica})\} / \{[(\text{broj dvojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj višezzgrenih stanica})] \div (\text{ukupan broj stanica u kontrolnoj skupini})\} \times 100$  (Lorge i sur., 2008). Vrijednosti proliferacijskog indeksa (CBPI) izračunate su prema formuli:  $CBPI = [(\text{broj jednojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj dvojezgrenih stanica}) + (3 \times \text{broj višezzgrenih stanica})] \div (\text{ukupan broj stanica})$  (OECD, 2016). % citostaze izračunat je prema formuli: % citostaze =  $100 - 100 \times \{(\text{CBPI skupine} - 1) / (\text{CBPI kontrolne skupine})\}$  (OECD, 2016). Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno više u odnosu na ostale uzorke. # – u usporedbi sa svim ostalim uzorcima.

#### 4.6. Antigenotoksični učinci testiranih tvari

Radi procjene antigenotoksičnih i protektivnih učinaka testiranih tvari, napravljeni su usporedni prikazi za rezultate CBMN-testa, stanične kinetike i preživljenja nakon tretmana sa svim koncentracijama bez irinotekana te s irinotekanom.

Za med obične planike, ti su podaci prikazani u tablicama 14 i 15, za ekstrakt u tablicama 16 i 17, a za HGA u tablicama 18 i 19.

Najvažniji zaključci koji se mogu izvesti iz tih prikaza su da sami testirani spojevi ne izazivaju značajne štetne učinke na razini genoma limfocita, a u kombinaciji s irinotekanom, svi su pokazali određeni antigenotoksični potencijal.

U pogledu utjecaja na proliferaciju stanica, ekstrakt meda obične planike kod sve tri testirane koncentracije pokazao je inhibicijski učinak na diobu.

Statističke značajnosti razlika koje su uočene između testiranih uzoraka označene su u tablicama 14 – 19.

**Tablica 14.** Ukupni rezultati CBMN-testa u kontrolnim limfocitima periferne krvi trojice ispitanika te u limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana (IRI) i meda obične planike.

Parametar	Uzorak	NK*	Med			IRI <sup>#</sup>	Med + IRI		
			1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>d</sup>	5x <sup>e</sup>	10x <sup>f</sup>
<b>Učestalost mikronukleusa (MN)</b>									
<b>Σ MN / 9000 BN limfocita</b>		22	24	25	21	117	62	53	67
<b>Broj MN / 1000 BN limfocita</b>		2,4	2,7	2,8	2,3	13,0	6,9	5,9	7,4
<b>Raspodjela binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>)</b>									
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 9000 BN limfocita</b>		22	24	25	21	108 <sup>*,d,e,f</sup>	62 <sup>a↓</sup>	53 <sup>b↓</sup>	66 <sup>c↓</sup>
<b>ΣBN<sub>MN1</sub></b>		22	24	25	21	100	62	53	65
<b>ΣBN<sub>MN2</sub></b>		0	0	0	0	7	0	0	1
<b>ΣBN<sub>MN3</sub></b>		0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Ukupni % BN<sub>MN</sub></b>		0,24	0,27	0,28	0,23	1,20	0,69	0,59	0,73
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 1000 BN limfocita</b>		2,4	2,7	2,8	2,3	12,0	6,9	5,9	7,3
<b>Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>)</b>									
<b>Σ NB / 9000 BN limfocita</b>		17	22	20	25	66	35	36	40
<b>Broj NB / 1000 BN limfocita</b>		1,9	2,4	2,2	2,8	7,3	3,9	4,0	4,4
<b>ΣBN<sub>NB</sub> / 9000 BN limfocita</b>		17	22	20	25	66 <sup>*,d,e,f</sup>	35 <sup>↓</sup>	36 <sup>↓</sup>	40 <sup>c↓</sup>
<b>Ukupni % BN<sub>NB</sub></b>		0,19	0,24	0,22	0,28	0,73	0,39	0,40	0,44
<b>ΣBN<sub>NB</sub> / 1000 BN limfocita</b>		1,9	2,4	2,2	2,8	7,3	3,9	4,0	4,4
<b>Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>)</b>									
<b>Σ NPB / 9000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	6	0	0	0
<b>Broj NPB / 1000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0,7	0	0	0
<b>ΣBN<sub>NPB</sub> / 9000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	6 <sup>*,d,e,f</sup>	0	0	0
<b>Ukupni % BN<sub>NPB</sub></b>		0	0	0	0	0,07	0	0	0
<b>ΣBN<sub>NPB</sub> / 1000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0,7	0	0	0

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. a, b i c – statistički značajan porast prema istim uzorcima bez IRI; \*, d, e i f – statistički značajno više vrijednosti prema označenim skupinama; ↓ – statistički značajan pad u usporedbi s IRI.  
NK – negativna kontrola.



**Tablica 15.** Ukupni rezultati stanične kinetike i preživljenja u kontrolnim limfocitima (NK) periferne krvi trojice ispitanika te u limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s medom obične planike, irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana (IRI) i meda obične planike.

Parametar Uzorak	NK*	Med			IRI <sup>#</sup>	Med + IRI		
		1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>d</sup>	5x <sup>e</sup>	10x <sup>f</sup>
Σ M <sub>1</sub>	1383	1566	1463	1405	1600	1481	1570	1578
Σ M <sub>2</sub>	6618	6429	6576	6601	6779	6906	6809	6812
Σ M <sub>3</sub>	333	306	283	313	214	230	214	207
Σ M <sub>4</sub>	666	699	678	681	407	383	407	403
NDI	2,031 # <sub>a,d,e,f</sub>	2,015 <sup>d</sup>	2,020 <sup>e</sup>	2,030 <sup>a,f</sup>	1,936	1,946↓	1,940↓	1,937↓
Replikacijski indeks	100	97,8	98,4	99,5	92,6	94,1	93,0	92,9
Σ Limfociti u apoptozi	13	14	20	18	34 <sup>*</sup>	22	32 <sup>b</sup>	29 <sup>c</sup>
% Limfociti u apoptozi	0,14	0,16	0,22	0,20	0,38	0,24	0,36	0,32
Broj apoptoza po analizi	1,44	1,56	2,22	2,00	3,78	2,44	3,56	3,22
Σ Limfociti u nekrozi	3	12	15	16	35 <sup>*</sup>	23	23	22
% Limfociti u nekrozi	0,03	0,13	0,17	0,18	0,39	0,26	0,26	0,24
Broj nekroza po analizi	0,33	1,33	1,67	1,78	3,89	2,56	2,56	2,44
CBPI	1,954 # <sub>a,b</sub>	1,932 <sup>d</sup>	1,937 <sup>e</sup>	1,947 <sup>f</sup>	1,877	1,894 <sup>#</sup> ↓	1,883↓	1,882↓
% citostaze	0	2,3	1,8	0,7	8,1	6,3	7,4	7,6

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno više u odnosu na ostale uzorke ↓ – statistički značajan pad u odnosu na isti uzorak bez IRI.

**Tablica 16.** Ukupni rezultati CBMN-testa u kontrolnim limfocitima (NK) periferne krvi trojice ispitanika i limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s ekstraktom meda obične planike, irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana (IRI) i ekstrakta meda obične planike.

Parametar	Uzorak	NK*	Ekstrakt			IRI <sup>#</sup>	Ekstrakt + IRI		
			1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>d</sup>	5x <sup>e</sup>	10x <sup>f</sup>
<b>Učestalost mikronukleusa (MN)</b>									
<b>Σ MN / 9000 BN limfocita</b>		22	25	28	34	117	60	52	58
<b>Broj MN / 1000 BN limfocita</b>		2,4	2,8	3,1	3,8	13,0	6,7	5,8	6,4
<b>Raspodjela binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>)</b>									
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 9000 BN limfocita</b>		22	25	28	34	108*	58 <sup>a</sup>	51 <sup>b</sup>	58 <sup>c</sup>
<b>ΣBN<sub>MN1</sub></b>		22	25	28	34	100	56	50	58
<b>ΣBN<sub>MN2</sub></b>		0	0	0	0	7	2	1	0
<b>ΣBN<sub>MN3</sub></b>		0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Ukupni % BN<sub>MN</sub></b>		0,24	0,28	0,31	0,38	1,20	0,64	0,57	0,64
<b>ΣBN<sub>MN</sub> / 1000 BN limfocita</b>		2,4	2,8	3,1	3,8	12,0	6,4	5,7	6,4
<b>Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>)</b>									
<b>Σ NB / 9000 BN limfocita</b>		17	23	25	27	66	46	42	49
<b>Broj NB / 1000 BN limfocita</b>		1,9	2,6	2,8	3,0	7,3	5,1	4,7	5,4
<b>ΣBN<sub>NB</sub> / 9000 BN limfocita</b>		17	23	25	27	66*	46 <sup>a</sup>	42 <sup>b</sup>	49 <sup>c</sup>
<b>Ukupni % BN<sub>NB</sub></b>		0,19	0,26	0,28	0,30	0,73	0,51	0,47	0,54
<b>ΣBN<sub>NB</sub> / 1000 BN limfocita</b>		1,9	2,6	2,8	3,0	7,3	5,1	4,7	5,4
<b>Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>)</b>									
<b>Σ NPB / 9000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	6	2	0	0
<b>Broj NPB / 1000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0,7	0,2	0	0
<b>ΣBN<sub>NPB</sub> / 9000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	6 <sup>*,e,f</sup>	2	0	0
<b>Ukupni % BN<sub>NPB</sub></b>		0	0	0	0	0,07	0,02	0	0
<b>ΣBN<sub>NPB</sub> / 1000 BN limfocita</b>		0	0	0	0	0,7	0,2	0	0

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . \* – statistički značajan porast prema negativnoj kontroli; a, b i c – statistički značajan porast prema istim uzorcima bez IRI; e – statistički značajno više prema uzorku 5x ekstrakt + IRI; f – statistički značajno više prema uzorku 10x ekstrakt + IRI.

**Tablica 17.** Ukupni rezultati stanične kinetike i preživljenja u kontrolnim limfocitima (NK) periferne krvi trojice ispitanika te limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s ekstraktom meda, irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana i ekstrakta meda obične planike.

Parametar	Uzorak	NK*	Ekstrakt			IRI <sup>#</sup>	Ekstrakt + IRI		
			1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>d</sup>	5x <sup>e</sup>	10x <sup>f</sup>
$\Sigma M_1$		1383	2508	2448	2396	1600	2768	2776	2887
$\Sigma M_2$		6618	6097	6178	6231	6779	5945	6060	5891
$\Sigma M_3$		333	141	161	133	214	130	79	110
$\Sigma M_4$		666	254	213	240	407	157	85	112
NDI		2,031 #,a,b,c	1,793 d	1,793 e	1,802 f	1,936 d,e,f	1,742 e,f	1,719 f	1,716
Replikacijski indeks		100	79,7	80,2	80,7	92,6	75,1	73,7	72,9
$\Sigma$ Limfociti u apoptozi		13	21	24	28	34*	51 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>	53 <sup>#,c</sup>
% Limfociti u apoptozi		0,14	0,23	0,27	0,31	0,38	0,57	0,49	0,59
Broj apoptoza po analizi		1,44	2,33	2,67	3,11	3,78	5,67	4,89	5,89
$\Sigma$ Limfociti u nekrozi		3	17*	17*	20*	35*	34 <sup>a</sup>	31 <sup>b</sup>	37 <sup>c</sup>
% Limfociti u nekrozi		0,03	0,19	0,19	0,22	0,39	0,38	0,34	0,41
Broj nekroza po analizi		0,33	1,89	1,89	2,22	3,89	3,78	3,44	4,11
CBPI		1,954 #,a,b,c	1,758 d	1,762 e	1,766 f	1,877 d,e,f	1,708 e,f	1,696 f	1,687
% citostaze		0	20,6	20,2	19,7	8,1	25,8	27,1	28,0

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno više u odnosu na ostale uzorke.

**Tablica 18.** Ukupni rezultati CBMN-testa u kontrolnim limfocitima (NK) periferne krvi trojice ispitanika i limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s homogentizinskom kiselinom (HGA), irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana (IRI) i homogentizinske kiseline (HGA).

Parametar	Uzorak	NK*	HGA			IRI <sup>#</sup>	HGA + IRI		
			1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>d</sup>	5x <sup>e</sup>	10x <sup>f</sup>
<b>Učestalost mikronukleusa (MN)</b>									
$\Sigma$ MN / 9000 BN limfocita		22	25	27	26	117	66	59	74
Broj MN / 1000 BN limfocita		2,4	2,8	3,0	2,9	13,0	7,3	6,6	8,2
<b>Raspodjela binuklearnih limfocita s mikronukleusima (BN<sub>MN</sub>)</b>									
$\Sigma$ BN <sub>MN</sub> / 9000 BN limfocita		22	25	27	26	108 <sup>*,d,e,f</sup>	66 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>	74 <sup>c</sup>
$\Sigma$ BN <sub>MN1</sub>		22	25	27	26	100	66	59	74
$\Sigma$ BN <sub>MN2</sub>		0	0	0	0	7	0	0	0
$\Sigma$ BN <sub>MN3</sub>		0	0	0	0	1	0	0	0
Ukupni % BN <sub>MN</sub>		0,24	0,28	0,30	0,29	1,20	0,73	0,66	0,82
$\Sigma$ BN <sub>MN</sub> / 1000 BN limfocita		2,4	2,8	3,0	2,9	12,0	7,3	6,6	8,2
<b>Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NB</sub>)</b>									
$\Sigma$ NB / 9000 BN limfocita		17	20	24	24	66	45	39	44
Broj NB / 1000 BN limfocita		1,9	2,2	2,7	2,7	7,3	5,0	4,3	4,9
$\Sigma$ BN <sub>NB</sub> / 9000 BN limfocita		17	20	24	23	66 <sup>*,d,e,f</sup>	45 <sup>a</sup>	39 <sup>b</sup>	44 <sup>c</sup>
Ukupni % BN <sub>NB</sub>		0,19	0,22	0,27	0,26	0,73	0,50	0,43	0,49
$\Sigma$ BN <sub>NB</sub> / 1000 BN limfocita		1,9	2,2	2,7	2,6	7,3	5,0	4,3	4,9
<b>Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih limfocita koji ih sadrže (BN<sub>NPB</sub>)</b>									
$\Sigma$ NPB / 9000 BN limfocita		0	0	0	0	6	0	0	0
Broj NPB / 1000 BN limfocita		0	0	0	0	0,7	0	0	0
$\Sigma$ BN <sub>NPB</sub> / 9000 BN limfocita		0	0	0	0	6 <sup>*,d,e,f</sup>	0	0	0
Ukupni % BN <sub>NPB</sub>		0	0	0	0	0,07	0	0	0
$\Sigma$ BN <sub>NPB</sub> / 1000 BN limfocita		0	0	0	0	0,7	0	0	0

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. \* – statistički značajan porast prema negativnoj kontroli; a, b i c – statistički značajan porast prema istim uzorcima bez IRI; d – statistički značajno više prema uzorku 1x ekstrakt + IRI; e – statistički značajno više prema uzorku 5x ekstrakt + IRI; f – statistički značajno više prema uzorku 10x ekstrakt + IRI.

**Tablica 19.** Ukupni rezultati stanične kinetike i preživljenja u kontrolnim limfocitima (NK) periferne krvi trojice ispitanika te limfocitima tretiranim u uvjetima *in vitro* s homogentizinskom kiselinom (HGA), irinotekanom (IRI), te kombinacijama irinotekana (IRI) i homogentizinske kiseline (HGA).

Parametar Uzorak	NK*	HGA			IRI <sup>#</sup>	HGA + IRI		
		1x <sup>a</sup>	5x <sup>b</sup>	10x <sup>c</sup>		1x <sup>d</sup>	5x <sup>e</sup>	10x <sup>f</sup>
Σ M <sub>1</sub>	1383	1426	1471	1656	1600	1614	1632	1411
Σ M <sub>2</sub>	6618	6618	6608	6351	6779	6665	6747	6896
Σ M <sub>3</sub>	333	267	242	278	214	220	172	233
Σ M <sub>4</sub>	666	689	679	715	407	501	449	460
NDI	2,031 #,a,b,c	2,024 c,d	2,014 c,e	2,006 f	1,936	1,956 #,e	1,938	1,971 #,e
Replikacijski indeks	100	98,8	97,9	96,9	92,6	93,8	92,4	95,8
Σ Limfociti u apoptozi	13	19	19	19	34 <sup>*</sup>	25	21	32
% Limfociti u apoptozi	0,14	0,21	0,21	0,21	0,38	0,28	0,23	0,36
Broj apoptoza po analizi	1,44	2,11	2,11	2,11	3,78	2,78	2,33	3,56
Σ Limfociti u nekrozi	3	12 <sup>*</sup>	14 <sup>*</sup>	16 <sup>*</sup>	35 <sup>*</sup>	20	23	22
% Limfociti u nekrozi	0,03	0,13	0,16	0,18	0,39	0,22	0,26	0,24
Broj nekroza po analizi	0,33	1,33	1,56	1,78	3,89	2,22	2,56	2,44
CBPI	1,954 #,a,b,c	1,941 c,d	1,932 c,e	1,919 f	1,877	1,891 #	1,878 #	1,910 #
% citostaze	0	1,3	2,3	3,7	8,1	6,6	7,9	4,6

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću  $\chi^2$ -testa, uz  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti. Istaknute su vrijednosti koje su statistički značajno više u odnosu na ostale uzorke.

#### 4.7. Određivanje citotoksičnog učinka

Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina meda, ekstrakta, HGA i umjetnog meda, različitih koncentracija na staničnim linijama HepG2, Caco-2 i Cal27 provedeno je *Neutral red* testom, opisanom u poglavlju 3.4.7.6. Citotoksični učinak navedenih otopina praćen je u vremenu izloženosti stanica od 30 minuta, jedan i dva sata, nakon čega je utvrđeno njihovo preživljenje u odnosu na netretirane stanice (negativnu kontrolu).

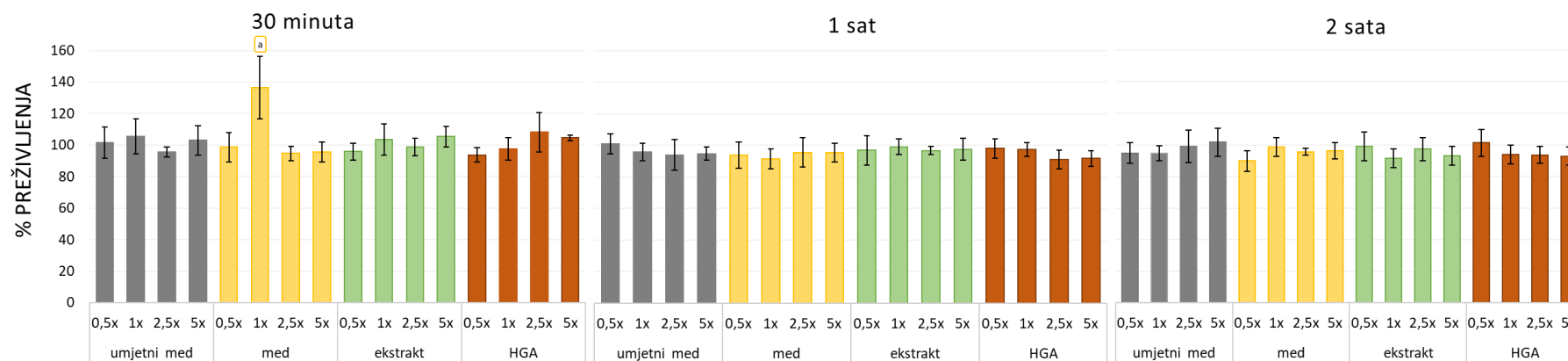
Rezultati su prikazani kao ovisnost preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izračunata iz vrijednosti apsorbancije kao postotak kontrole) o različitim koncentracijama otopine meda, umjetnog meda, ekstrakta meda i HGA.

Slike 31, 32 i 33 prikazuju rezultate za citotoksične učinke različitih koncentracija otopina umjetnog meda, meda, ekstrakta meda i HGA na stanične linije HepG2, Caco-2 i Cal27 nakon inkubacije stanica u trajanju od 30 minuta, jedan i dva sata.

Iz rezultata prikazanih na slici 31 vidljivo je kako samo jedna testirana koncentracija meda obične planike, ona koja odgovara dnevnom unosu meda, statistički značajno smanjuje citotoksičnost, tj. poboljšava preživljenje HepG2 stanica, i to nakon najkraćeg vremena izlaganja od 30 minuta. Svi ostali rezultati ne govore u prilog značajnih vremenski ili koncentracijski ovisnih utjecaja testiranih tvari na preživljenje HepG2 stanica.

Slika 32 prikazuje rezultate preživljenja Caco-2 stanica. Najviše razlika u preživljenju stanica između testiranih uzoraka vidljivo je pri najkraćem vremenu izlaganja od 30 minuta, gdje ekstrakt i HGA pri svim koncentracijama pospješuju preživljenje Caco-2 stanica u odnosu na odgovarajuće uzorke meda obične planike. Produljenim vremenom izlaganja se te razlike smanjuju. Iako nema statističke značajnosti, za koncentracije koje odgovaraju dnevnom unosu vidljiv je trend preživljenja HGA > ekstrakt > med u vremenskim točkama 30 minuta i 1 sat.

Rezultati prikazani na slici 33 ne upućuju na jasne vremenski ili koncentracijski ovisne utjecaje testiranih tvari na preživljenje Cal27 stanica nakon tretmana. Ova vrsta stanica pri kraćim vremenima izlaganja najbolje raste uz dodatak umjetnog meda. Testirani uzorci meda obične planike, ekstrakta i HGA su pri koncentraciji koja odgovara dnevnom unosu pokazali najnižu citotoksičnost pri vremenu izloženosti od 1 sata.



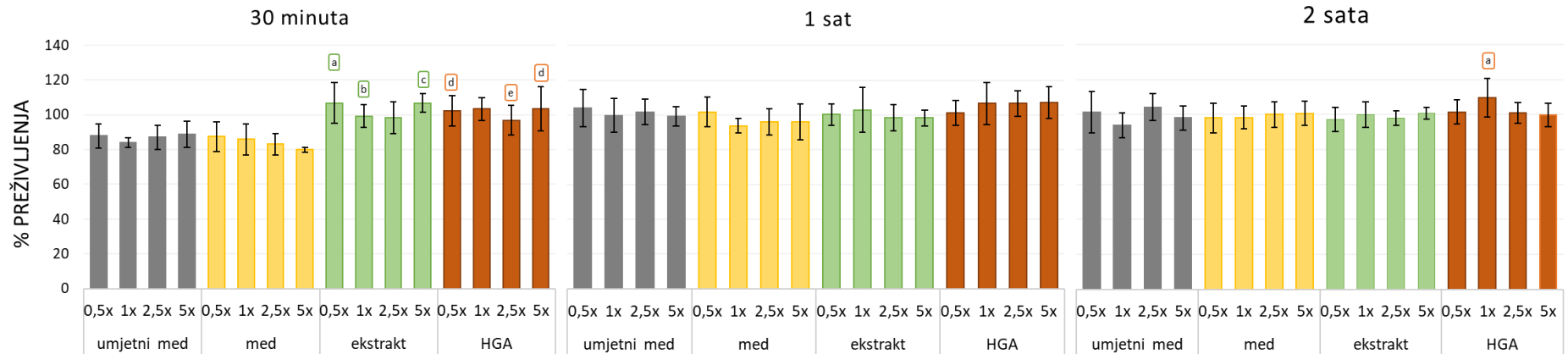
**Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )  
u odnosu na:**

**30 min**

a – umjetni med u svim koncentracijama, med  
(u koncentracijama od 0,5x, 2,5x i 5x),  
ekstrakt i HGA u svim koncentracijama

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću faktorijskog ANOVA testa (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) *post-hoc* test,  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti.

**Slika 31.** Preživljenje stanične linije HepG2 nakon tretmana od 30 minuta, jedan i dva sata s različitim koncentracijama meda, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda.



**Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u odnosu na:**

**30 min**

a – umjetni med i med u svim koncentracijama

b – med u koncentraciji 5x

c – umjetni med i med u svim koncentracijama

d – umjetni med u koncentraciji od 1x te med u koncentraciji od 1x, 2,5x i 5x

e – umjetni med u koncentraciji od 1x te med u svim koncentracijama

**Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u odnosu na:**

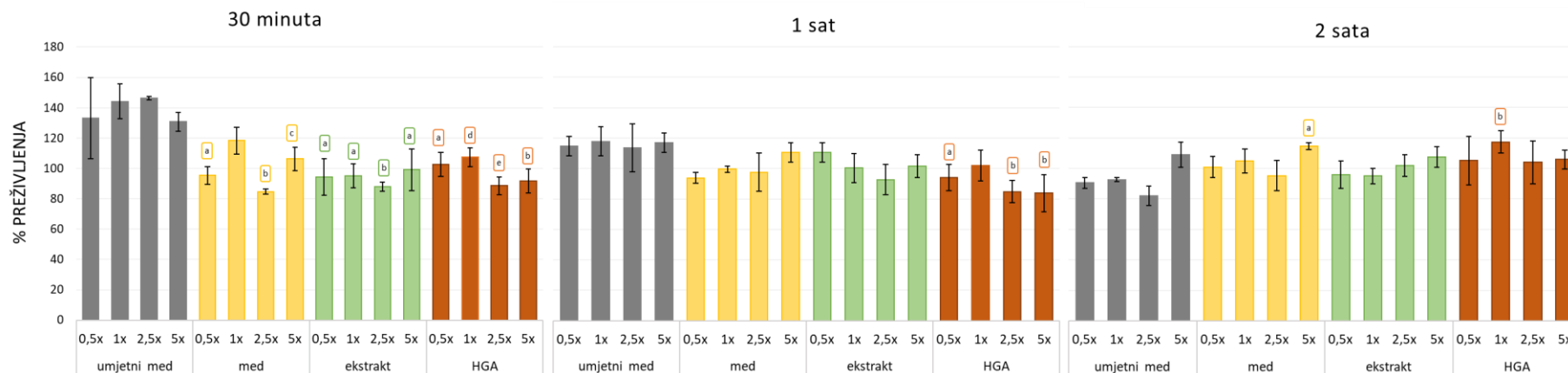
**2 h**

a – umjetni med u koncentraciji od 1x

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću faktorijskog ANOVA testa (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) *post-hoc* test,  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti.

**Slika 32.** Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon tretmana od 30 minuta, jedan i dva sata s različitim koncentracijama meda, njegova ekstrakta i HGA i umjetnog meda.





### Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u odnosu na:

30 min	1 h	2 h
a – umjetni med u svim koncentracijama	a – umjetni med u koncentraciji od 1x	a – umjetni med u koncentraciji od 2,5x
b – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentraciji od 1x	b – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentraciji od 5 x	b – umjetni med u koncentracijama od 0,5 x, 1x i 2,5x, med u koncentraciji od 2,5 x i ekstrakt u koncentracijama od 0,5x i 1x
c – umjetni med u koncentracijama od 1x i 2,5x		
d – umjetni med u koncentracijama od 1x i 2,5x		
e – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentraciji od 1x i HGA u koncentraciji 1x		

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću faktorijskog ANOVA testa (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) post-hoc test,  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti.

**Slika 33.** Preživljenje stanične linije Cal27 nakon tretmana od 30 minuta, jedan i dva sata s različitim koncentracijama meda, njegova ekstrakta i HGA i umjetnog meda.

#### 4.8. Pro(anti)oksidacijsko djelovanje

Ispitivanje pro(anti)oksidacijskog učinka otopina različitih koncentracija meda obične planike, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda, na staničnim linijama HepG2, Caco-2 i Cal27 provedeno je metodom DCFH-DA koja je opisana u poglavlju 3.4.7.7. Pro(anti)oksidacijsko djelovanje navedenih otopina praćeno je u vremenu izloženosti stanica od 30 minuta, jedan i dva sata, nakon čega je izračunata indukcija slobodnih radikala pojedine koncentracije u odnosu na netretirane stanice (negativnu kontrolu).

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost intenziteta fluorescencije (izračunate kao umnožak fluorescencije DCF i kvocijenta preživljenja stanica dobivenog provođenjem testa *Neutral red*) o koncentracijama testiranih otopina.

Na slikama 34, 35 i 36 prikazani su rezultati za pro(anti)oksidacijske učinke različitih koncentracija meda obične planike, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda na stanične linije HepG2, Caco-2 i Cal27 nakon inkubacije stanica u trajanju od 30 minuta, jedan i dva sata.

Vidljivo je da umjetni med na sve tri vrste stanica izaziva koncentracijski ovisni porast % ROS, što je osobito izraženo nakon 30 minuta i 1 sat izlaganja i nešto manje nakon 2 sata izlaganja. Testirani uzorci meda obične planike, nisu imali nikakav utjecaj na promjenu indukcije slobodnih radikala niti u jednoj ispitivanoj staničnoj liniji, osim najveće koncentracije (5x) koja je izazvala prooksidacijski učinak nakon 2 sata izlaganja u tumorskoj staničnoj liniji HepG2 (slika 34) odnosno Caco-2 stanica (slika 35). Stanice tumorskog podrijetla epitela usne šupljine Cal27 pokazale su se najosjetljivije na prooksidacijsko djelovanje najviše koncentracije meda koji je pri svim istraživanim vremenima tretmana izazvao prooksidacijsko djelovanje (slika 36).

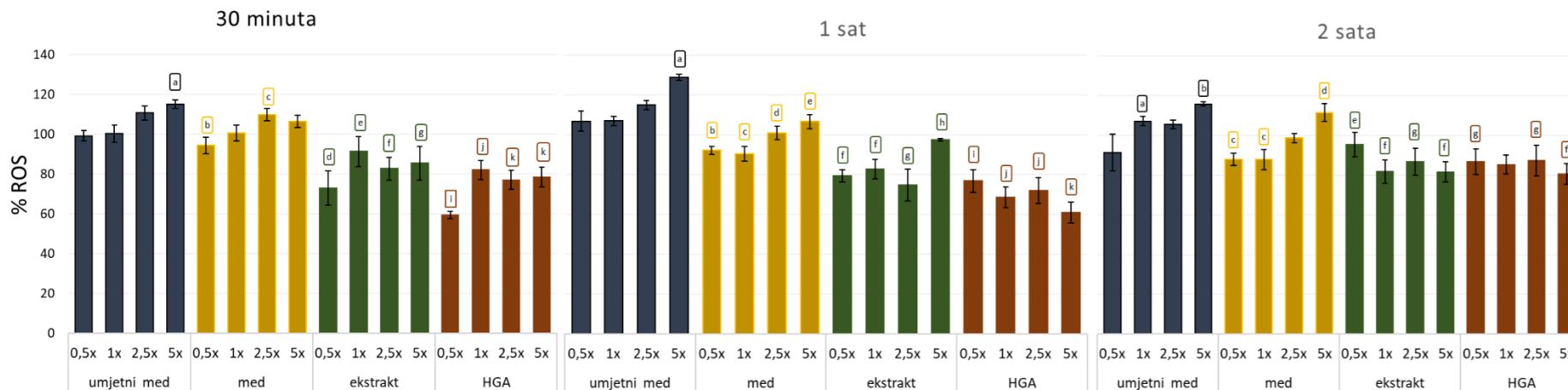
Ekstrakt meda te HGA pokazali su antioksidacijsko djelovanje na sve tri stanične linije u sva tri istraživana vremena, s time da je taj učinak najizraženiji na staničnoj liniji Caco-2 (slika 35). Antioksidacijsko djelovanje nije koncentracijski ovisno već sve četiri istraživane koncentracije pokazuju podjednaku antioksidacijsku aktivnost. Isto tako, bitno je napomenuti da ne postoji razlika u antioksidacijskom djelovanju ekstrakta meda i HGA. S obzirom na intenzitet antioksidacijskog djelovanja, ono je najizraženije na tumorskoj staničnoj liniji Caco-2 (slika 35), zatim na tumorskim stanicama epitela usne šupljine Cal27 (slika 36) te najslabije na tumorskim stanicama jetre, HepG2 (slika 34).

---

Obzirom na koncentracije koje odgovaraju dnevnom unosu, u vremenima 30 minuta i 1 sat % indukcije ROS-a pada te slijedi obrazac med > ekstrakt > HGA na staničnoj liniji HepG2.

U slučaju Caco-2 stanica, koncentracije koje odgovaraju dnevnom unosu ukazuju na to da med nakon sva tri vremena izloženosti izaziva veći % indukcije ROS-a u odnosu na ekstrakt i HGA koji pokazuju izraziti antioksidacijski učinak nakon tretmana od 30 minuta i 1 sat.

Nakon tretmana Cal27 stanica, koncentracijama koje odgovaraju dnevnom unosu, u vremenima 30 minuta i 1 sat % indukcije ROS se smanjuje i slijedi obrazac med > ekstrakt > HGA s time da ekstrakt i HGA pokazuju antioksidacijsko djelovanje nakon 30 minuta i 1 sat, a tretman od 2 sata nema učinka na promjenu statusa slobodnih radikala.

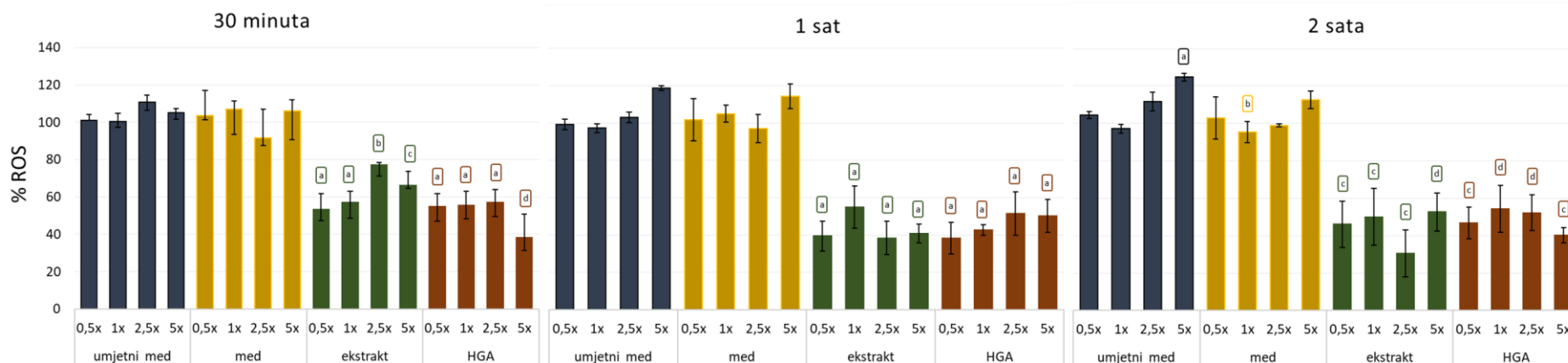


**Statistički značajne razlike (p < 0,05) u odnosu na:**

30 min	1 h	2 h
a – umjetni med u koncentraciji od 0,5x	a – umjetni med u koncentracijama od 0,5x i 1x	a – umjetni med u koncentraciji od 0,5x
b – umjetni med u koncentracijama od 2,5x i 5x	b – umjetni med u koncentracijama od 0,5x i 2,5x i 5x	b – umjetni med u koncentraciji od 1x
c – med u koncentraciji od 0,5x	c – umjetni med u svim koncentracijama	c – umjetni med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x
d – umjetni med u svim koncentracijama i med u svim koncentracijama	d – umjetni med u koncentraciji od 5x	d – umjetni med u koncentraciji od 0,5x i med u koncentraciji od 0,5x i 1x
e – umjetni med u koncentracijama 2,5x i 5x, med u koncentracijama od 2,5x i 5x i ekstrakt u koncentraciji od 0,5x	e – umjetni med u koncentraciji 5x i med u koncentracijama od 0,5x i 1x	e – umjetni med u koncentraciji od 5x i med u koncentraciji od 5x
f – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x	f – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentracijama od 2,5x i 5x	f – umjetni med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x i med u koncentracijama od 2,5x i 5x i ekstrakt u koncentraciji od 0,5x
g – umjetni med u koncentracijama 1x, 2,5x i 5x i med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x	g – umjetni med u svim koncentracijama i med u svim koncentracijama	g – umjetni med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x i med u koncentraciji od 5x
i – umjetni med u svim koncentracijama, med u svim koncentracijama i ekstrakt u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x	h – umjetni med u koncentracijama od 2,5x i 5x i ekstrakt u koncentracijama od 0,5x 1x i 5x	
j – umjetni med u svim koncentracijama, med u koncentracijama 1x, 2,5x i 5x i HGA u koncentraciji od 0,5x	i – umjetni med u svim koncentracijama, med u koncentracijama 2,5x i 5x i ekstrakt u koncentraciji od 5x	
k – umjetni med u svim koncentracijama, med u svim koncentracijama i HGA u koncentraciji od 0,5x	j – umjetni med u svim koncentracijama, med u svim koncentracijama i ekstrakt u koncentraciji od 5x	
	k – umjetni med u svim koncentracijama, med u svim koncentracijama, ekstrakt u koncentracijama od 0,5x, 1x i 5x i HGA u koncentraciji od 0,5x	

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću faktorijskog ANOVA testa (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) post-hoc test, p < 0,05. Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti.

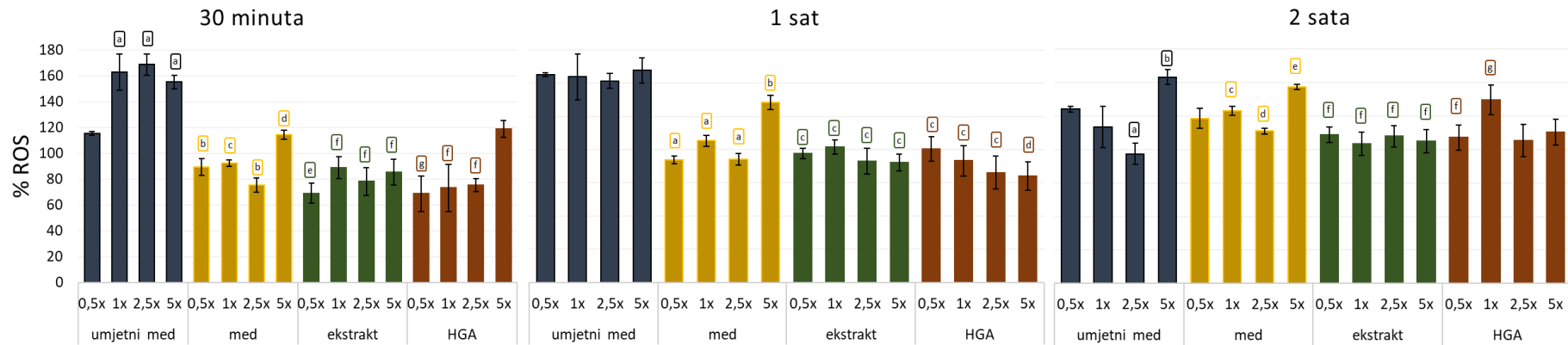
**Slika 34.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana od 30 minuta, jedan i dva sata s različitim koncentracijama meda, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda.



Statistički značajne razlike (p < 0,05) u odnosu na:		
30 min	1 h	2 h
a – umjetni med u svim koncentracijama i med u svim koncentracijama	a – umjetni med u svim koncentracijama i med u svim koncentracijama	a – umjetni med u koncentraciji od 1x
b – umjetni med u koncentracijama od 2,5x i 5x i med u koncentracijama od 0,5x, 1x i 5x		b – umjetni med u koncentraciji od 5x
c – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentracijama od 0,5x, 1x i 5x		c – umjetni med u svim koncentracijama i med u svim koncentracijama
d – umjetni med u svim koncentracijama, med u svim koncentracijama i ekstrakt 2,5x i 5x		d – umjetni med u svim koncentracijama, med u svim koncentracijama i ekstrakt u koncentraciji od 2,5x

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću faktorijskog ANOVA testa (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) post-hoc test, p < 0,05. Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti.

**Slika 35.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana od 30 minuta, jedan i dva sata s različitim koncentracijama meda, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda.



**Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u odnosu na:**

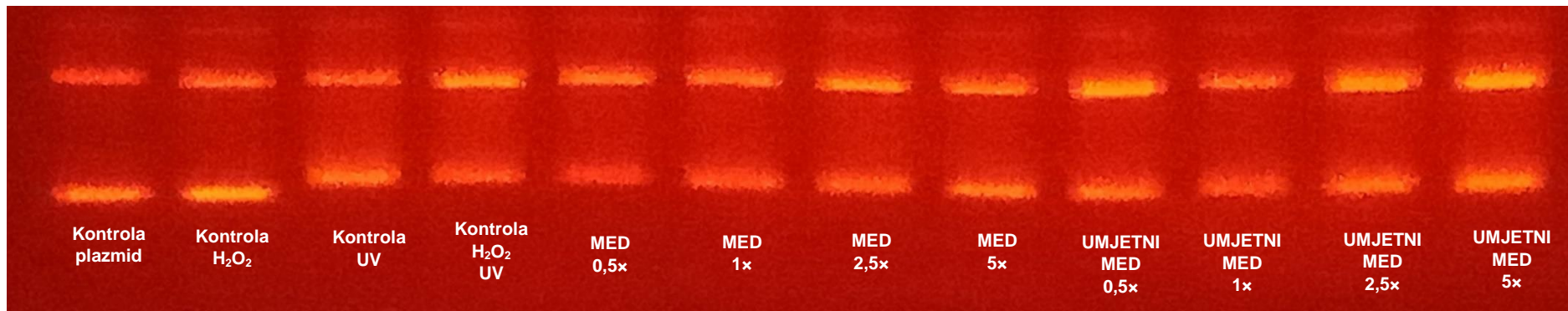
30 min	1 h	2 h
a – umjetni med u koncentraciji od 0,5x	a – umjetni med u koncentraciji od 0,5x	a – umjetni med u koncentraciji od 0,5x
b – umjetni med u svim koncentracijama	b – med u koncentraciji od 0,5x i 1x	b – umjetni med u koncentracijama od 1x i 2,5x
c – umjetni med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x	c – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentraciji od 5x	c – umjetni med u koncentraciji od 2,5x
d – umjetni med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x i med u koncentracijama od 0,5x, 1x i 2,5x	d – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentracijama od 1x i 5x	d – umjetni med u koncentraciji od 5x
e – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentracijama od 1x i 5x		e – umjetni med u koncentraciji od 2,5x i med u koncentraciji od 2,5x
f – umjetni med u svim koncentracijama i med u koncentraciji od 5x		f – umjetni med u koncentraciji od 5x i med u koncentraciji od 5x
g – umjetni med u svim koncentracijama, med u koncentracijama od 0,5x, 1x i 5x i ekstrakt u koncentraciji 1x		g – umjetni med u koncentraciji od 2,5x, ekstrakt u svim koncentracijama i HGA u koncentraciji od 0,5x
h – umjetni med u koncentracijama od 1x, 2,5x i 5x, med u koncentracijama od 0,5x, 1x, 2,5x, ekstrakt u svim koncentracijama i HGA u svim koncentracijama		

**Napomena:** Statistička značajnost ispitana je pomoću faktorijskog ANOVA testa (tip II) uz Tukey's HSD (eng. *Honestly Significant Difference*) *post-hoc* test,  $p < 0,05$ . Mala slova pokraj naziva uzorka upućuju na oznaku korištenu pri označavanju statističke značajnosti.

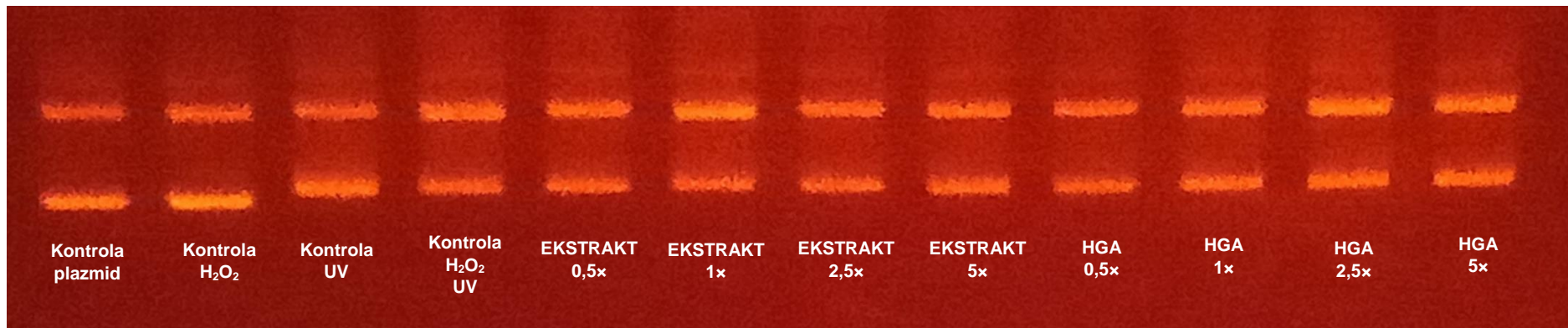
**Slika 36.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije Cal27 nakon tretmana od 30 minuta, jedan i dva sata s različitim koncentracijama meda, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda.

#### 4.9. Antioksidacijski učinak meda obične planike, ekstrakta i HGA na DNA plazmid phiX174 RF1

Na slikama 37 i 38 prikazani su rezultati antioksidacijskog djelovanja meda obične planike i umjetnog meda (slika 37) te ekstrakta meda i HGA (slika 38).



**Slika 37.** Antioksidacijsko djelovanje meda obične planike



**Slika 38.** Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta meda obične planike i homogentizinske kiseline (HGA)

Analiza intenziteta vrpce superzavijenog (donjeg) i otvorene forme kružnog plazmida (sporijeg) provedena je pomoću programa Gel Analyzer te su se mjerenjem intenziteta i omjerom intenziteta superzavijenog (neoštećenog) i otvorenog kružnog (oštećenog) plazmida dobili kvocijenti pomoću kojih je moguće odrediti koncentracije pri kojima med obične planike, ekstrakt meda, HGA te umjetni pokazuju antioksidacijsko djelovanje. U tablici 20 prikazani su omjeri intenziteta superzavijenog i otvorenog kružnog plazmida. U zagradama su prikazani kvocijenti superzavijenog i otvorenog kružnog plazmida netretiranog plazmida (NK, negativna kontrola) te plazmida ozračenog UV svjetlom i tretiranog s vodikovim peroksidom (PK, pozitivna kontrola).

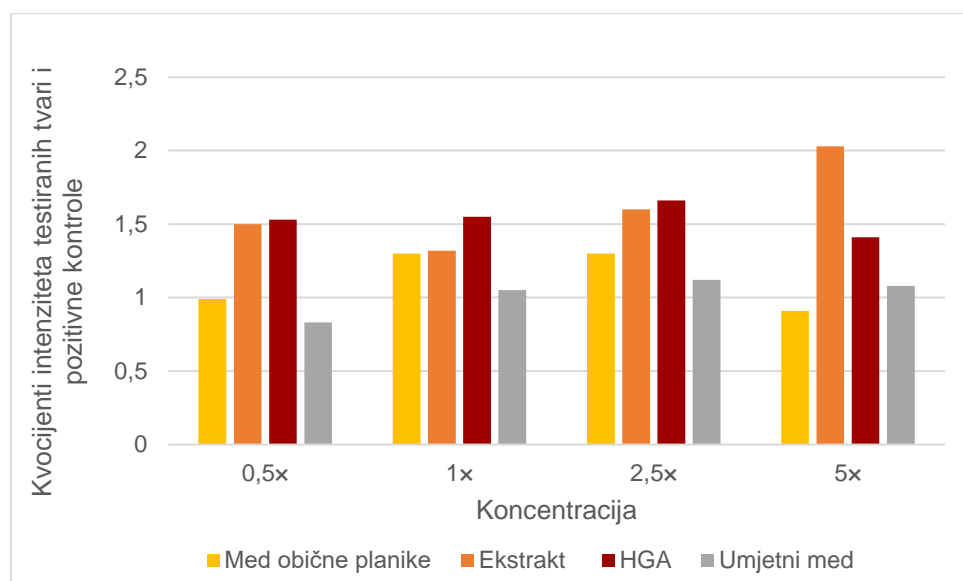
**Tablica 20.** Omjeri intenziteta superzavijenog i zavijenog plazmida kod različitih koncentracija meda obične planike, njegova ekstrakta, homogentizinske kiseline (HGA) i umjetnog meda

Koncentracija	Med	Ekstrakt	HGA	Umjetni med
<b>0,5x</b>	0,834 (1,279 NK; 0,842 PK)	0,84 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,859 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,7(1,279 K; 0,842 PK)
<b>1x</b>	1,097 (1,279 NK; 0,842 PK)	0,74 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,867 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,89 (1,279 K; 0,842 PK)
<b>2,5x</b>	1,086 (1,279 NK; 0,842 PK)	0,899 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,93 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,94 (1,279 K; 0,842 PK)
<b>5x</b>	0,765 (1,279 NK; 0,842 PK)	1,137 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,79 (2,27 NK, 0,56 PK)	0,91(1,279 K; 0,842 PK)

**Napomena:** NK – negativna kontrola (netretirani plazmid); PK – pozitivna kontrola (plazmid ozračen UV svjetlom i tretiran s vodikovim peroksidom)

Na slici 39 prikazan je odnos antioksidacijskog djelovanja meda obične planike, njegova ekstrakta, HGA i umjetnog meda. Iz priloženog se može uočiti da protektivno djelovanje pada u nizu: ekstrakt > HGA > med > umjetni med.





**Slika 39.** Odnos antioksidacijskog djelovanja meda obične planike, njegova ekstrakta, homogentizinske kiseline (HGA) te umjetnog meda

Najjače izraženo antioksidacijsko djelovanje u trendu testirana koncentracija – odgovor imaju ekstrakt meda te HGA s time da najveća istraživana koncentracija HGA pokazuje pad u antioksidacijskom djelovanju. S druge strane, med je pokazao nešto slabiji antioksidacijski učinak dok umjetni med nije utjecao na promjenu oksidacijskog oštećenja izazvanog ROS-ovima generiranih iz vodikova peroksida djelovanjem UV zračenja.

## **5. RASPRAVA**

Sve češća uporaba prirodnih proizvoda u fitoterapiji ili njihova prisutnost u sastavu različitih nutraceutika otvara mnoga pitanja o njihovoj sigurnosti, biokompatibilnosti i potencijalnim zdravstvenim rizicima povezanim s njihovom konzumacijom.

Med obične planike predstavlja potencijalno vrijedan proizvod za razvoj novih nutraceutika, čija je proizvodnja ograničena na određena geografska područja, a čiji su fitokemijski, biokemijski i biološki, a osobito genetički učinci, unatoč dugoj tradicionalnoj upotrebi, još uvijek slabo dokumentirani.

U narodnoj medicini, med obične planike (*Arbutus unedo* L.), uobičajeno se rabi u različite ljekovite svrhe (Afrin i sur. 2017, 2019, 2020; Tuberoso i sur. 2013; Tariba Lovaković i sur. 2018; Petretto i sur. 2015), iako još uvijek nedostaju podaci o specifičnom sastojku (ili sastojcima) odgovornim za njegove zaštitne učinke koji su do sada uočeni. Također, malobrojna su znanstvena istraživanja o kemijskom sastavu i učincima ovog meda na zdravlje ljudi.

### 5.1. Istraživanja fenolnih komponenti i antioksidacijske aktivnosti

Fenolni spojevi, sekundarni biljni metaboliti, smatraju se zaslužnima za zaštitni učinak u smanjenju rizika od različitih bolesti. Međutim, ne postoji točno objašnjen mehanizam na kojem se temelji blagotvorni učinak meda obične planike.

Budući da obična planika raste na mediteranskom području u surovim klimatskim uvjetima, kemijski sastav meda ovisit će o okolišnim čimbenicima u kojima raste biljka.

Fenolni sastav meda obične planike neznatno je istraživan, a uglavnom se odnosi na kvantifikaciju HGA, ( $\pm$ )-2-*trans*,4-*trans*-apscizinske kiseline, ( $\pm$ )-2-*cis*,4-*trans*-apscizinske kiseline i unedona (Brčić Karačonji i Jurica, 2017; Cabras i sur., 1999; Deiana i sur., 2015; Scanu i sur., 2005; Tuberoso i sur., 2010) koji se smatraju kemijskim markerima. Samo su u jednom istraživanju koje je provedeno na sardinijskom medu obične planike kvantificirani ostali fenolni spojevi, ali u ograničenom opsegu. Odredili su da med obične planike sadrži najviše kamferola ( $10,6 \text{ mg kg}^{-1} \pm 2,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i luteolina ( $9,6 \text{ mg kg}^{-1} \pm 1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Uz ove fenole određeni su još i sinirginska kiselina, rutin, apigenin, galangin, pinocembrin, pinobanksin te *trans*-cimetna kiselina (Petretto i sur., 2015).

U ovom doktorskom radu med obične planike je, u suradnji s pčelarima, prikupljen s hrvatskog područja (osam uzoraka) te je određen udio ukupnih bioaktivnih spojeva, antioksidacijska aktivnost te maseni udio HGA kako bi se u daljnjem istraživanju rabio med s najjačom biološkom aktivnošću.

Utvrđeno je da med s vrgoračkog područja ima najveći udio ukupnih bioaktivnih spojeva, HGA te najsnažniju antioksidacijsku aktivnost. Maseni udio HGA bio je u skladu s rezultatima drugih istraživanja u kojima je određen prosječni maseni udio HGA u rasponu 166 – 932 mg kg<sup>-1</sup> (Brčić Karačonji i Jurica, 2017; Cabras i sur., 1999; Deiana i sur., 2015; Tuberoso i sur., 2010).

Med obične planike odabran za ovo istraživanje imao je visok udio ukupnih fenola (1671 mg GAE kg<sup>-1</sup>), flavonola i flavona (143,5 mg QE kg<sup>-1</sup>) te snažan antioksidacijski kapacitet određen metodama DPPH• (2,96 mmol TE kg<sup>-1</sup>) i FRAP (1,35 ± 0,14 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O u 5 % otopini) što je u skladu s rezultatima prethodno objavljenih istraživanja (Afrin i sur., 2017; Rosa i sur., 2011; Tuberoso i sur., 2013; Ulloa i sur., 2015). Štoviše, med obične planike imao je znatno veći udio ukupnih fenola u usporedbi s drugim vrstama meda (npr. eukaliptus, suncokret, lavanda, timijan, ružmarin, naranča, limeta, bagrem i kesten) (Alves i sur., 2013; Ciulu i sur., 2018).

Fenolni profil meda obične planike detaljno je istražen uporabom tekućinskokromatografske analize ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) uz hibridni spektrometar masa visoke rezolucije kao detektor (LTQ Orbitrap MS) kojim je identificirano 56 fenolnih spojeva, a nedvojbeno je kvantificirano 12 bioaktivnih spojeva, što predstavlja dosad najopsežnije istraživanje bioaktivnih komponenti meda obične planike.

## **5.2. Istraživanja citogenetičkih učinaka meda obične planike, ekstrakta i HGA na humanim limfocitima periferne krvi u uvjetima *in vitro***

Do danas nije provedeno mnogo istraživanja o učincima meda na razini stanica i genoma. Yaacob i suradnici (2017) objavili su opsežan pregledni rad koji pruža dobar uvid u dosadašnja istraživanja o utjecaju meda na stabilnost genoma u uvjetima *in vitro* i *in vivo*.

U ovome su istraživanju u uvjetima *in vitro* po prvi puta ispitani mogući genotoksični učinci meda obične planike, njegova ekstrakta i glavne komponente HGA na modelu ljudskih limfocita periferne krvi. Poznavanje biološke aktivnosti i

toksikološkog profila testiranih uzoraka važno je radi procjene rizika povezanih s primjenom meda obične planike u fitoterapiji. Kako o toj problematici u svjetskoj literaturi do sada nije bilo objavljenih rezultata, naše se istraživanje temelji na dostupnim podacima za druge vrste meda. Polazimo od pretpostavke da med obične planike u koncentraciji koja odgovara dozi dnevnog unosa ne bi trebao uzrokovati značajnije razine oštećenja u genomu zdravih stanica, a da bi mogao pokazati zaštitnu ulogu u kombinaciji s genotoksičnim spojem, citostatikom irinotekanom.

Prikupljanje dokaza o mogućim blagotvornim učincima prirodnih proizvoda kada se uzimaju istodobno s antineoplastičnim lijekovima prioritet je, s obzirom na to da različite terapije, koje se rabe protiv karcinoma, izazivaju značajne štetne učinke. Imajući na umu da pacijenti s karcinomom često rabe med kao potpurnu fitoterapiju za ublažavanje simptoma povezanih s kemoterapijom, bilo je neophodno istražiti nude li med obične planike, njegov ekstrakt i HGA, bilo kakvu zaštitu protiv oštećenja izazvanog s irinotekanom u „zdravim“ ljudskim stanicama, kao što su limfociti.

Prije ovog istraživanja, u samo jednom je radu (El-Dahtory i Yahia, 2011) korišten model ljudskih limfocita za proučavanje potencijalnih zaštitnih učinaka meda na razini kromosoma u uvjetima *in vitro*. Spomenuti autori su dokazali da dodatak meda značajno smanjuje razinu kromosomskih oštećenja induciranih mitomicinom C u limfocitima bolesnika s Fanconijevom anemijom. Međutim, nisu točno naveli koja je vrsta meda korištena i nisu dali informacije u vezi s njegovim fitokemijskim profilom, što predstavlja glavne slabosti te studije. Upravo obrnuto, u ovom je radu korišten uzorak meda obične planike koji je fitokemijski dobro okarakteriziran i primijenjen zajedno s antineoplastičnim lijekom irinotekanom koji je danas vodeći lijek u mnogim protokolima kemoterapije za metastatski karcinom debelog crijeva, čija je učestalost u svijetu u stalnom porastu (Argevani i sur., 2020; Kciuk i sur., 2020; Kawai i sur., 2021). Nadalje, u našim su laboratorijima ranije provedena istraživanja djelovanja tog lijeka (Kopjar i sur., 2007), koja su potvrdila njegove genotoksične učinke na staničnoj razini, što je bila dobra polazišna točka za istraživanje do sada nepoznatih zaštitnih učinaka meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA u kombinaciji s irinotekanom. Irinotekan djeluje specifično na razini DNA izravnim utjecajem na enzim DNA topoizomerazu I, promičući oksidacijski stres (Mathijssen i sur., 2001; de Jong i sur., 2006; Fuchs i sur., 2006; Fujita i sur., 2015). Rezultati ranijeg istraživanja (Kopjar i sur., 2007) upućuju da irinotekan uzrokuje visoku razinu kromosomske nestabilnosti u ljudskim limfocitima primijenjen u koncentracijama koje odgovaraju dvjema najčešće primijenjenim

terapijskim dozama lijeka. U ovom smo istraživanju rabili koncentraciju koja je odgovarala terapijskoj dozi lijeka (350 mg m<sup>-2</sup>) primijenjenog kao monoterapija prve linije u liječenju karcinoma debelog crijeva (Takano i Sugiyama, 2017).

Limfociti periferne krvi izabrani su kao prikladan model za istraživanje jer su to primarne stanice na kojima se temelje različiti citogenetički testovi, priznati od međunarodnih regulatornih agencija i tijela (primjerice Međunarodne agencije za atomsku energiju – IAEA, Međunarodnog programa za kemijsku sigurnost – IPCS, Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj – OECD).

Prednost limfocita kao modela za istraživanje je što se ove primarne stanice odlikuju stabilnim genomom, kontroliranom proliferacijom i diobom, za razliku od najčešće korištenih staničnih linija, posebno onih tumorskog podrijetla. Budući da nema sličnih studija na istom staničnom modelu koje su istraživale utjecaj meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA, ova preliminarna studija bila je usmjerena na uporabu dviju najčešćih citogenetičkih metoda koje otkrivaju širok spektar ishoda na razini genoma/stanice u limfocitima. Prvi je test analize kromosomskih aberacija, koji se ubraja u najvažnije metode biodozimetrije i nezamjenjiv je za procjenu učinaka različitih kemijskih i fizikalnih agensâ na ljudski genom. Druga metoda je citohalazinom B-blokiran mikronukleus-test (CBMN-test) u tzv. „cytome“ inačici, koji omogućuje istovremeno otkrivanje oštećenja kromosoma i diobenog vretena, procjenu citotoksičnih učinaka kroz utvrđivanje broja stanica u apoptozi i nekrozi, a također daje i podatke o staničnoj proliferaciji i mogućim zastojsima diobe (Fenech, 2007).

Rezultati biološkog pokusa provedenog kombinacijom dviju spomenutih metoda u uvjetima *in vitro* potvrdili su polazišnu hipotezu i pružaju prve dokaze o visokoj biokompatibilnosti meda, ekstrakta i HGA s limfocitima iz ljudske periferne krvi i njihovom zaštitnom učinku na razinu citogenetičkih oštećenja izazvanih irinotekanom.

Treba istaknuti kako su med obične planike i HGA vrlo malo utjecali na pojavnost kromosomskih oštećenja u limfocitima. Međutim, uzorci ekstrakta meda obične planike kod sve tri testirane koncentracije povisili su učestalost kromatidnih lomova i acentričnih kromosoma u odnosu na kontrolne limfocite. Taj se rezultat može dovesti u vezu s kemijskim sastavom istraženih uzoraka. To su nove informacije koje prije nisu bile poznate. Dobiveni rezultati podupiru predložene hipoteze i govore u prilog nastavka istraživanja s ovom vrstom meda, usmjerenih na daljnje pojašnjenje mehanizama njegovih geno-/citoprotektivnih učinaka.

Kao što je utvrđeno u mnogim prethodnim istraživanjima s drugim prirodnim spojevima ili njihovim smjesama, njihovi su blagotvorni učinci u velikoj mjeri povezani s antioksidacijskim potencijalom. Postojeća izvješća upućuju da velike količine fenolnih spojeva, posebno HGA, doprinose superiornim antioksidacijskim svojstvima meda obične planike u usporedbi s drugim vrstama meda (Cabras i sur. 1999; Tuberoso i sur. 2010; Rosa i sur., 2011; Ulloa i sur., 2015; Tariba Lovaković i sur., 2018). Uzorak meda testiran u ovom istraživanju ima složeni fitokemijski profil. Kao što je navedeno u rezultatima, karakterizira ga visoki udio HGA ( $306,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Od fenolnih spojeva u ovome medu nalaze se, između ostalih, još i: akacetin, kvercetin, pinocembrin, apigenin, krizin te kiseline: *p*-hidroksibenzojeva, *p*-hidroksifeniloctena, *p*-kumarinska, galna, ferulinska, kafeinska i protokatehuinska. Ovakva složena matrica snažnih bioaktivnih spojeva vjerojatno je odgovorna za ukupnu nisku citotoksičnost i genotoksičnost, utvrđene primjenom analiza kromosomskih aberacija i CBMN-testom nakon tretmana limfocita s testiranim tvarima. Analizom kromosomskih aberacija dokazano je da testirane tvari u ispitivanim koncentracijama nisu bile značajno klastogene. Primjerice, HGA nije značajno oštetila kromosome limfocita. Mala i beznačajna povećanja učestalosti kromatidnih lomova i acentričnih fragmenata u limfocitima tretiranim s HGA u odnosu na negativnu kontrolu vjerojatno su bila povezana s oksidacijskim oštećenjem. To potkrepljuju prethodna zapažanja Hiraku i suradnika (1998) koji su uočili oksidacijska oštećenja izazvana s HGA na fragmentima ljudske DNA, ali pri mnogo višim koncentracijama od koncentracija testiranih u ovom istraživanju. Martin i Batkoff (1987) također su izvijestili da HGA može djelovati prooksidacijski i stvoriti  $\text{O}_2^-$ , vodikov peroksid i hidroksi-radikal.

Utvrđeno je da ekstrakt meda obične planike uzrokuje više oštećenja genoma od meda obične planike, što upućuje na mogućnost da su neki fenolni spojevi koji se nalaze u ekstraktu, a u odsutnosti reducirajućih šećera, genotoksični – uzrokujući izravno oštećenje, ili da je kod ekstrakta ukupan sastav fenolnih spojeva potencirao oksidacijski stres, neizravno dovodeći do nestabilnosti genoma što je rezultiralo vidljivim promjenama strukture kromosoma, pojavom mikronukleusa (MN), jezgrinih pupova (NP) i nukleoplazmatskih mostova (NPB).

Učinci meda obične planike na procese oksidacijskog stresa do sada su slabo istraženi. Na primjer, Afrin i suradnici (2017) izvijestili su da je sardinijski med obične planike uzrokovao povećano unutarstanično stvaranje ROS-a u stanicama adenokarcinoma debelog crijeva (HCT-116) i metastatskim stanicama debelog crijeva

(LoVo), što je pridonijelo njegovom efektu citotoksičnosti. Dostupna literatura upućuje na potencijalnu ulogu fenolnih spojeva meda u oksidacijskom stresu, zbog njihove „dvojne prirode“. Mnogi fenolni spojevi kojima obiluje med obične planike s vrgoračkog područja mogu imati anti- i prooksidacijski učinak (Martin-Cordero i sur., 2012; Carochi i Ferreira 2013; Khan i sur., 2020). Kao što je poznato, „ponašanje“ fenolnih spojeva kao prooksidansa u velikoj mjeri ovisi o okolišu u kojem su prisutni. Prooksidacijski učinak ovisan je i o prisutnosti kisika i nekih redoks-aktivnih metalnih iona, poput željeza i bakra, što može dovesti do lomova u molekuli DNA uslijed oksidacijskih oštećenja (Yen i sur., 2003; Azmi i sur., 2006; Carochi i Ferreira, 2013).

Svi gore navedeni dokazi potvrđuju da je izloženost testiranim uzorcima u konačnici mogla rezultirati određenom razinom nestabilnosti genoma. Rezultati u ovom doktorskom radu su potvrdili ovu pretpostavku. Niska razina kromosomskih oštećenja nakon tretmana s medom obične planike, njegovim ekstraktom i HGA, očito je povezana s izravnim i neizravnim učincima fenolnih spojeva na genom limfocita. Također je utvrđen visok stupanj podudarnosti između dviju citogenetičkih metoda. S obzirom da su istraživani uzorci bili smjese različitih spojeva, ukupni učinci koji su potvrđeni zasigurno su rezultat njihovih međudjelovanja. Nadalje, također postoji mogućnost da se prooksidacijski učinci i genotoksičnost jednog spoja mogu modulirati zaštitnim svojstvima drugog.

Prije rasprave o značaju dobivenih rezultata, važno je podsjetiti na glavnu razliku između metoda koje su korištene: dok je pojavnost strukturnih aberacija kromosoma utvrđena u metafazi prve generacije stanica nakon izlaganja testiranim spojevima (Albertini i sur., 2000), mikronukleusi, jezgrični pupovi i nukleoplazmatski mostovi utvrđuju se u binuklearnim stanicama, tj. u drugoj *in vitro* diobi nakon stimulacije fitohemaglutininom (Fenech, 2000). Poznato je da veće razine strukturnih kromosomskih aberacija često dovode do povećanih oštećenja mjerenih CBMN-testom, i obrnuto (Mateuca i sur., 2006). Isto je primijećeno u ovom istraživanju.

Općenito, rezultati CBMN-testa potvrdili su visoku biokompatibilnost meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA s limfocitima. Treba istaknuti da je i u ovome testu ekstrakt meda obične planike pokazao malo veću sposobnost za izazivanje mikronukleusa u odnosu na med obične planike i HGA, premda bez statističke značajnosti. Kako mikronukleusi nastaju od oštećenih kromosoma ili njihovih dijelova koji se nisu pravilno rasporedili u stanice kćeri, a analizom kromosomskih aberacija utvrđeno je da ekstrakt meda izaziva značajan porast broja acentričnih fragmenata u



odnosu na kontrolu, dio oštećenog genetičkog materijala nedvojbeno završava u mikronukleusima. Pretpostavlja se da upravo ti oštećeni fragmenti kromosoma daju glavni doprinos nastanku mikronukleusa. Ukupni rezultati ovog istraživanja potvrđuju niske citogenetičke rizike u smislu pojavnosti mikronukleusa u limfocitima ljudske periferne krvi povezane s kratkotrajnom *in vitro* izloženošću ispitivanim koncentracijama meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA.

Ovdje se također mora spomenuti još jedna važna činjenica, koja je mogla pridonijeti različitim biološkim odgovorima uočenim nakon tretmana medom i njegovim ekstraktom. Ono što temeljno razlikuje testirani med od njegova ekstrakta jest udio šećera. Med istraživani u ovom radu sadržavao je 34,2 g fruktoze i 32,5 g glukoze na 100 g meda. Kako se radi o reducirajućim šećerima, oni doniranjem elektrona drugim molekulama pružaju reducirajuću snagu potrebnu za smanjenje oksidacijskog stresa. Ekstrakt meda sadrži samo fenolne spojeve, a nedostaju mu jednostavni šećeri. Vrlo je moguće da je odsutnost šećera u ispitivanom ekstraktu pridonijela njegovom većem prooksidacijskom djelovanju u odnosu na med obične planike. Budući da i glukoza i fruktoza lako ulaze u stanice, vjerojatno je da su limfociti tretirani medom pohranili dodatnu količinu reducirajućeg šećera u usporedbi sa stanicama tretiranim drugim spojevima pa bi niži geno-/citotoksični učinci, uočeni u stanicama tretiranim medom, mogli biti povezani s potencijalom tih reducirajućih šećera da neutraliziraju reaktivne spojeve nastale tijekom *in vitro* rasta stanica, što je pridonijelo nižoj razini oštećenja DNA i kromosoma.

Na temelju rezultata o učestalosti kromosomskih aberacija u uzorcima gdje su med, njegov ekstrakt i HGA, kombinirani s irinotekanom, očito je da su sve testirane tvari zaštitile limfocite od štetnih učinaka irinotekana. Primjenom testa analize kromosomskih aberacija dokazano je da svi istraživani uzorci smanjuju pojavnost limfocita sa strukturnim oštećenjima kromosoma, pri čemu je najbolju zaštitnu ulogu pokazao med obične planike. Taj se rezultat može dovesti u vezu s njegovim složenim fitokemijskim sastavom te su uočena geno-/citoprotektivna svojstva vjerojatno rezultat međudjelovanja između različitih spojeva koje taj med sadrži. Da je ta pretpostavka točna, upućuju i rezultati dobiveni pri usporednom testiranju uzorka umjetnog meda, koji ima vrlo pojednostavljeni sastav (sadrži samo šećere) i nedostaju mu mnogi potencijalno korisni spojevi koje prirodni med sadrži. Premda sam umjetni med u koncentraciji koja odgovara dnevnom unosu meda nije pokazao visoki potencijal za oštećenja genoma limfocita, kada je bio testiran u kombinaciji s citostatikom

irinotekanom on nije pokazao nikakav zaštitni učinak. Naprotiv, mikroskopska analiza tog uzorka pokazala je porast broja kromatidnih lomova, acentričnih fragmenata i kromosomskih lomova u odnosu na uzorak tretiran samo irinotekanom.

Pomoću CBMN-testa dokazalo se da se niža incidencija aberantnih limfocita odrazila na smanjenje broja MN u tretiranim kulturama. Rezultati CBMN-testa potvrdili su da med obične planike u kombinaciji s irinotekanom, pri svim testiranim koncentracijama pokazuje malo bolja zaštitna svojstva od kombinacija ekstrakta meda i HGA s tim citostatikom, uzmu li se u obzir različite vrste oštećenja (mikronukleusi, jezgri pupovi i nukleoplazmatski mostovi) koje ovaj test otkriva.

Osim mikronukleusa, tijekom mikroskopskih analiza na istim je preparatima određena i pojavnost NB-a i NPB-a. Kao što je poznato, pupanje jezgre posljedica je procesa popravka DNA koji rezultiraju stvaranjem prekomjerno umnožene DNA koja se nakuplja u perifernom dijelu jezgre stvarajući pupove. NB-i također potječu od intersticijskih ili terminalnih centričnih fragmenata istisnutih iz jezgre (Thomas i sur., 2003; Fenech, 2006; Lindberg i sur., 2007). U ovom istraživanju primijećen je značajan porast učestalosti NB nakon tretmana s irinotekanom, što je u skladu s rezultatima ranijeg istraživanja (Kopjar i sur. 2007). Testirane tvari, same po sebi, pokazale su niski potencijal za izazivanje NB-a, a u kombiniranim tretmanima su utjecale na pad njihovog broja. Nadalje, testirane tvari, same po sebi, nisu izazivale nastanak NPB-a. Spomenuta vrsta oštećenja pretežno potječe od pogrešnog popravka DNA i upućuje na postojanje kromosomskih preslagivanja (re-aranžmana) (Thomas i sur., 2003; Fenech, 2006; Fenech i sur., 2011). NPB je utvrđen samo na preparatima pripremljenim iz kultura limfocita tretiranih s irinotekanom i u pozitivnoj kontroli (bleomicin). U tim su uzorcima pronađene i složene strukturne kromosomske aberacije, što je potvrdilo gore spomenuti mehanizam u podlozi nastanka NPB-a.

Na temelju eksperimentalnih podataka izračunat je indeks mutagenosti (Mutl), koji su, kao značajan pokazatelj stupnja mutagenosti, prethodno opisali Scarpato i suradnici (1998). Izračunat je na osnovi učestalosti MN-a utvrđenih u kulturama limfocita nakon kombiniranog tretmana s irinotekanom i onih utvrđenih nakon tretmana samo s irinotekanom. Dobivene vrijednosti Mutl ukazuju da testirane tvari smanjuju genotoksični učinak irinotekana. Primjerice, HGA, primijenjena u kombiniranom tretmanu, smanjila je genotoksični učinak irinotekana u slijedu  $5\times HGA > 1\times HGA > 10\times HGA$ . Činjenica da je  $5\times HGA$  pružila veću zaštitu od  $10\times HGA$ , a da je vrijednost Mutl izračunata za  $10\times HGA$  bila niža od vrijednosti izračunatih i za  $5\times HGA$  i  $1\times HGA$ ,

ukazuje na mogućnost da je pri najvišoj koncentraciji HGA pokazala svoju dvojnuru prirodu te je zbog prooksidacijskih učinaka ukupni zaštitni učinak bio donekle smanjen što bi trebalo bolje istražiti, a budući pokusi nesumnjivo bi trebali dokazati narušava li koncentracija 10x HGA prooksidacijsko-antioksidacijsku ravnotežu.

Uzimajući u obzir zapažanja Kanga i suradnika (2005), koji su dokumentirali antioksidacijske učinke HGA u staničnoj liniji WI 38, i one Rose i suradnika (2011) koji su također pronašli značajan antioksidacijski potencijal HGA na stanicama Caco-2, vjerojatna je pretpostavka da HGA pri kombiniranom tretmanu s irinotekanom jača ukupne unutarstanične zaštitne kapacitete u limfocitima. Ako je tako, djelujući i sama kao antioksidans i potencirajući unutarstanične obrambene sustave, HGA je smanjila oštećenje genoma izazvano s irinotekanom i smanjila potrebe za opsežnim popravkom DNA koji bi mogao rezultirati stvaranjem aberantnih kromosoma, jezgrinih pupova ili mikronukleusa. Snažne antioksidacijske aktivnosti fenolnih kiselina u uvjetima *in vitro* u mnogim su radovima dobro dokumentirane, a među njima je i noviji rad Kiokiasa i suradnika (2020). Slično objašnjenje odnosi se i na zaštitno djelovanje meda i ekstrakta, koji su, kako je već ranije istaknuto složene matrice bogate različitim fenolnim spojevima sposobnim pojačati ili potaknuti na aktivnost ukupne unutarstanične zaštitne kapacitete u limfocitima.

Dobiveni rezultati također su pokazali da dio limfocita s nepopravljivim oštećenjima genoma ugiba nakon završetka tretmana. Uzimajući u obzir uočene vrste citogenetičkih oštećenja, dio tretiranih stanica koje su sadržavale nepopravljive lezije očito je ušao u proces kontrolirane stanične smrti. Podaci o općoj citotoksičnosti, utvrđeni na temelju morfoloških značajki apoptotičnih i nekrotičnih limfocita, utvrđenih na preparatima pripremljenim za CBMN-test, upućuju da su svi testirani uzorci izazvali blagi porast broja stanica u apoptozi i nekrozi u odnosu na kontrolu, ali bez značajnijih međusobnih razlika. Taj rezultat bio je očekivan, s obzirom da unošenje bilo koje testirane tvari u staničnu kulturu u određenoj mjeri remeti uvjete potrebne za rast limfocita i dio stanica spontano ugiba. Međutim, u cjelini uzevši, testirani spojevi imaju vrlo niski citotoksični potencijal.

Kako citotoksični i apoptotički potencijal meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA u uvjetima *in vitro* još nije proučavan na istom staničnom modelu, ne postoje slični podaci za raspravu o dobivenim rezultatima. S obzirom da CBMN-test omogućuje samo morfološko određivanje apoptotičnih limfocita, ne možemo predložiti mehanizme u pozadini apoptoze inducirane s testiranim tvarima, a to se u sljedećim

istraživanjima mora objasniti primjenom drugih, specifičnijih metodama za otkrivanje i karakterizaciju apoptoze.

Osim citogenetičkih i citotoksičnih učinaka uočenih nakon tretmana, potrebno je spomenuti i učinke tretmana na proliferaciju stanica. Važan doprinos ovog istraživanja su novi i do sada nepoznati podaci o utjecaju testiranih uzoraka meda obične planike, ekstrakta meda i HGA na proliferaciju limfocita. Utvrđeno je da je ekstrakt meda, sam po sebi, pokazao najjači citostatski učinak, uzrokujući zastoj u prvoj *in vitro* diobi u odnosu na negativnu kontrolu, što se odrazilo manjim brojem stanica u sljedećim diobama, osobito trećoj i četvrtoj. Također, ekstrakt meda u kombinaciji s irinotekanom izazvao je najveće zastoje u diobi stanica u odnosu na ostale kombinacije, i najveći pad vrijednosti indeksa diobe jezgara – NDI i proliferacijskog indeksa u limfocitima s blokiranom citokinezom – CBPI. Također treba primijetiti je u uzorcima kombinacija ekstrakta meda i irinotekana uočena i najviša smrtnost stanica. Uvidom u dostupnu literaturu, jedno od mogućih objašnjenja razlike između meda i ekstrakta za uočene učinke na razini proliferacije limfocita moglo bi se povezati s ranije spomenutom razlikom u udjelu šećera. Kao što je detaljno opisano u opisu eksperimentalnog dizajna, tretirani limfociti uvedeni su u stanične kulture, prema protokolima za analizu kromosomskih aberacija i analizu CBMN-testa. Za njihov je uzgoj korišten medij RPMI-1640 u kojem glukoza (sadržana u koncentraciji  $2 \text{ g L}^{-1}$ ) predstavlja glavni izvor energije za rastuće stanice. Pretpostavlja se da bi se dodatne količine fruktoze i glukoze, koje su ušle u stanice tretirane medom, mogle rabiti kao dodatni izvori energije potrebni za održavanje rasta i proliferacije stanica u uvjetima *in vitro*. To je mogući razlog zašto limfociti tretirani medom nisu pokazivali kašnjenja u staničnom ciklusu, za razliku od onih tretiranih ekstraktom meda. Drugi uzrok razlike u proliferaciji stanica su učinci fenolnih spojeva na stanični ciklus. Postojeća literatura dokumentira antiproliferacijska svojstva različitih vrsta meda (Jaganathan i Mandal, 2009; Jaganathan i sur., 2015; Afrin i sur., 2017; Imtara i sur., 2019; Mumtaz i sur., 2020) te antiproliferacijske i citostatičke učinke nastale nakon izlaganja istim ili srodnim fenolnim spojevima, kao što su oni prisutni u ovom radu. Gotovo svi gore navedeni radovi koji izvještavaju o citotoksičnim ili apoptotičkim učincima specifičnih fenolnih spojeva upućuju i na njihova antiproliferacijska svojstva (Serrano i sur., 1998; Choi i sur., 2001; Hsu i sur., 2004a, i b; Janicke i sur., 2011; Spilioti i sur., 2014; Samarghandian i sur., 2016; Wang i sur., 2016; Hashemzaei i sur., 2017; Kabala-Dzik i sur., 2017; Kandhari i sur., 2019).

Rezultati, vezani uz proliferaciju limfocita, vrijedni su daljnjih istraživanja, u kojima bi trebalo provjeriti pokazuje li ekstrakt meda obične planike slične učinke i s nekim drugim citostaticima, kako na istom modelu, tako i na drugim vrstama stanica jer bi to opravdalo razvoj pomoćnih ljekovitih sredstava sličnog fitokemijskoga sastava za moguću primjenu kod bolesnika s tumorima.

### Ograničenja primijenjenog eksperimentalnog modela

Istraživanja provedena u ovom doktorskom radu imaju određena ograničenja. Korištenjem *in vitro* modela, procijenjeni su učinci meda obične planike i njegova ekstrakta na jednoj vrsti primarnih stanica, a te su stanice bile izravno izložene testiranim tvarima. Ova je vrsta izloženosti najbližnja slučajevima kada se med ili njegovi proizvodi rabe u lokalnom liječenju, na primjer za zacjeljivanje rana. Međutim, u stvarnom životu med se češće uzima oralnim putem. U tom slučaju, prije nego što se ostvari bilo kakvo farmakološko djelovanje, med se probavlja, što rezultira razlikama u apsorpciji koje dovode do različite bioraspodjelivosti sastojaka meda za različite tipove stanica. Stoga, rezultati dobiveni na ovom staničnom modelu, iako vrijedni i informativni, valjani su samo u okviru predloženog modela i ne mogu se izravno ekstrapolirati na stvarne scenarije. U ovoj početnoj fazi istraživanja, glavni cilj ovog rada bio je priopćiti nove dokaze, ali ne i pružiti klinički korisne informacije. Limfociti su izabrani ponajprije zbog svog stabilnog genoma, što im svakako daje prednost pred staničnim modelima temeljenim na različitim linijama stanica tumorskog podrijetla koje mogu imati „urođena“ kromosomska oštećenja i narušenu kontrolu diobe i proliferacije u uvjetima *in vitro*. S obzirom da limfociti nemaju vlastiti sustav enzima za metaboličku aktivaciju, kako bi se provjerilo utječu li metaboličke pretvorbe komponenti meda na eventualne razlike u stupnju oštećenja genoma, buduća se istraživanja trebaju nastaviti na drugim vrstama stanica, a tu bi kao sljedeći koristan model mogli poslužiti primarni hepatociti, koji imaju značajnu ulogu u istraživanju i razvoju novih lijekova i pomoćnih ljekovitih sredstava (Yamaguchi i sur., 2019).

Nadalje, ovo istraživanje je rezultiralo mnogim otvorenim pitanjima koja zaslužuju daljnja istraživanja, na primjer utječu li i na koji način razlike u putu izlaganja na zaštitne učinke koje nudi med i koji bi se ishodi tretmana mogli očekivati na drugim vrstama stanica. Sljedeće važno pitanje je problem sa standardizacijom, s obzirom na to da se med iz različitih geografskih područja može razlikovati u svom fitokemijskom sastavu, a da se udio glavnih fenolnih komponenti također može razlikovati tijekom godina.

Budući da bi svi ovi čimbenici mogli modificirati biološki odgovor, ovo pitanje treba dalje detaljnije proučiti.

Konačno, u ovom je radu utvrđena veza između HGA i bolesti alkaptonurije kod ljudi. Treba naglasiti da rizika, proizašlog iz količine HGA unesene preporučenom konzumacijom meda obične planike, ne bi trebalo biti. Koncentracije HGA, koje bi se mogle uzeti svakodnevnom konzumacijom meda obične planike, preniske su da bi predstavljale bilo kakvu prijetnju zdravim ljudima ili pogoršale simptome bolesti u ispitanika s manjkom enzima homogentizat-1,2 dioksigenaze. Važno je napomenuti da su dvije niže koncentracije HGA testirane u ovoj studiji (1,27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  1 $\times$  HGA i 6,36  $\mu\text{mol L}^{-1}$  5 $\times$  HGA) bile mnogo niže nego što je bilo koja od spomenutih koncentracija relevantna u istraživanju patoloških stanja u ljudi. Najviša ispitivana koncentracija, 10 $\times$  HGA, odgovarala je 12,72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Bila je nešto viša od najniže serumske koncentracije HGA zabilježene u bolesnika s alkaptonurijom u istraživanju Milan i suradnika (2017). U tom su istraživanju koncentracije HGA u serumu bile od 11,9 do 75,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , s prosjekom od 30,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Olsson i suradnici (2015) izmjerili su u serumu 32 pacijenta s alkaptonurijom koncentraciju HGA u rasponu od 22,5 do 49,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . U tri pacijenta koja su sudjelovala u istraživanju Hughesa i suradnika (2015) početne koncentracije HGA u serumu bile su 75,2, 30,2 i 42,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Kako su izvijestili Bory i suradnici (1990) razine HGA u plazmi pet bolesnika s alkaptonurijom bile su od 33 do 38  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Kad se uzmu u obzir sve ove vrijednosti, očito je da se koncentracije HGA koje bi se mogle smatrati štetnima za ljude rijetko mogu postići kod zdravih ispitanika koji će konzumirati hranu bogatu HGA ili nutraceutike koji ju sadrže. Drugim riječima, teško je očekivati u stvarnom scenariju da bi prosječna osoba dnevno konzumirala preko 600 g meda obične planike bogatog s HGA koja bi se u potpunosti apsorbirala iz probavnog trakta, što je potrebno za postizanje potencijalno štetne razine spoja u slučaju potpunog nedostatka enzima koji metabolizira ovaj spoj.

### Zaključci i polazišta za buduća istraživanja

Svi prikupljeni podaci potvrdili su nizak genotoksični potencijal meda obične planike prema limfocitima ljudske periferne krvi. HGA je vrlo važna bioaktivna komponenta meda obične planike koja je pokazala općenito povoljne učinke na ispitivanom limfocitnom modelu *in vitro*. Med je pokazao bolju biokompatibilnost od njegova ekstrakta, praćenu nižom učestalošću kromosomskih aberacija, mikronukleusa i drugih struktura u CBMN-testu. Med također nije naštetio proliferaciji

limfocita u uvjetima *in vitro* i pokazao je dobro geno-/citoprotektivno djelovanje protiv oštećenja izazvanih irinotekanom u ovom tipu stanica. Ovi su nalazi relevantni za donošenje preliminarnog zaključka o *in vitro* sigurnosti ispitivanog meda. Zanimljivo otkriće, vrijedno daljnjeg proučavanja, je pojačavanje citostaze ekstraktom meda kad se ekstrakt daje u kombinaciji s irinotekanom. Ovo se pitanje mora razjasniti i dodatno istražiti, prije donošenja bilo kakvih odluka u vezi s potencijalnom uporabom ekstrakta meda obične planike u razvoju ili proizvodnji nutraceutika, imajući na umu da su takvi učinci poželjni na stanične linije tumora, ali ne i na zdrave stanice poput limfocita.

Nesumnjivo je da su prije donošenja bilo kakvih zaključaka relevantnih za procjenu rizika za ljude potrebna daljnja istraživanja primjenom složenijih eksperimentalnih modela uporebom specifičnijih metoda biokemijske i molekularne biologije. Imajući na umu da su ovo bila preliminarna istraživanja koja planiramo proširiti, ograničenja postavljena korištenim eksperimentalnim dizajnom sigurno će biti nadvladana u budućim istraživanjima. Ona bi se trebala proširiti i na *in vivo* modele sustava za procjenu sigurnosti svih ovdje testiranih tvari nakon duljeg izlaganja i dati podatke iz kojih će se ekstrapolirati koncentracije koje se smiju sigurno rabiti za prehranu ljudi ili u terapijske svrhe.

### **5.3. Istraživanja bioloških učinaka meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA na staničnim linijama**

U okviru ovog istraživanja, citotoksični učinci testiranih uzoraka meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA procijenjeni su primjenom testa *Neutral red* na kontinuiranim humanim staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) i karcinoma pločastih stanica jezika (Cal27). Ovi su stanični modeli izabrani s obzirom na to da biološka aktivnost fenolnih spojeva prisutnih u medu ovisi o apsorpciji u crijevima i metabolizmu u jetri, a usna šupljina je prvo mjesto međudjelovanja organizma i istraživanih tvari.

S obzirom na to da se radi o staničnim linijama različitog podrijetla koje su u određenoj mjeri zadržale svojstva tkivâ iz kojih potječu, pretpostavljeno je da će se njihovi odgovori na primijenjene tretmane razlikovati te da će dobiveni rezultati ukazati na razlike u osjetljivosti ovih stanica.

Općenito, pri izboru staničnih modela važnu ulogu ima njihova sposobnost za metaboliziranje kemikalija. Kako stanice HepG2 imaju očuvane aktivnosti brojnih

enzima važnih za metabolizam ksenobiotika, one su u vrlo širokoj primjeni za istraživanje potencijalno toksičnih učinaka nepoznatih tvari, koje bi mogle imati protutumorsko djelovanje (Batra i Sharma, 2013; Mersch-Sundermann i sur., 2004). Izbor ove stanične linije vrlo je važan pri testiranjima složenih matrica kao što je med, koje u svom sastavu imaju niz biološki aktivnih spojeva čija se djelotvornost može mijenjati uslijed metaboličke transformacije. Stanice Caco-2, kao model enterocita, neizbježne su u istraživanjima toksičnosti spojeva koji se u organizam unose hranom. Najviše se rabe u istraživanjima lijekova te za otkrivanje supstrata, inhibitora i induktora crijevnih transportera te posebno P-glikoproteina. Zadržale su aktivnosti različitih prijenosnika, enzima i nuklearnih receptora. U smislu metaboličke kompetencije, posjeduju aktivnosti više metaboličkih enzima, kao što su citokrom P450 1A (CYP1A), sulfotransferaze, glutation S-transferaze i UDP-glukuronoziltransferaze (Sun i sur., 2008; Chang i sur., 2021). Stanična linija Cal27 u odnosu na HepG2 i Caco-2 manje je metabolički kompetentna, međutim, također posjeduje aktivnost nekih enzima CYP (Yang i Raner, 2005).

Podaci o razlikama u citotoksičnosti značajni su za procjenu sigurnosnog profila slabo istraženih vrsta meda, a osobito za razvijanje bilo kakvih proizvoda koji se temelje na medu i njegovim komponentama. Stoga je, u okviru ovog istraživanja, poseban naglasak dan istraživanju različitih koncentracija meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA jer o njihovom djelovanju nema dovoljno relevantnih podataka. Kako bi se procijenilo postoji li i koliki je razmjer vremenski-ovisnih razlika u citotoksičnosti, izabrana su tri vremena inkubacije stanica u trajanju od 30 minuta, jednog i dva sata.

Dobiveni rezultati upućuju na nisku citotoksičnost svih testiranih uzoraka, bez obzira što su najviše testirane koncentracije odgovarale 5× dozi njihova dnevnog unosa. Primjerice, najviše utvrđeno smanjenje preživljenja stanica u pokusu utvrđeno je nakon tretmana Caco-2 stanica u trajanju od 30 minuta pri koncentraciji koja odgovara 5× dozi dnevnog unosa.

Općenito, iz dobivenih je rezultata vidljivo da ne postoje vremenski ili koncentracijski ovisni utjecaji testiranih tvari na preživljenje stanica. Gotovo ni u jednoj staničnoj liniji nije uočen jasan i dosljedan trend rasta ili pada citotoksičnosti ovisan o vremenu ili koncentraciji. Takav rezultat ne iznenađuje, uzme li se u obzir složeni fitokemijski profil testiranih tvari u kojima su mogući i sinergistički i antagonistički učinci njihovih komponenti na preživljenje stanica.



Fenomen citotoksičnih učinaka različitih vrsta meda tek je u novije vrijeme prepoznat i opisan u literaturi (Jaganathan i sur., 2015; Mumtaz i sur., 2020) ili potvrđen rezultatima nekih novijih studija. Nedavno su Imtara i suradnici (2019) izvijestili o citotoksičnim učincima nekih vrsta meda, prikupljenih u Maroku i Palestini, na ljudske stanične linije HCT-116 i MCF-7. Pronašli su korelaciju između uočenih učinaka i specifičnih fitokemijskih profila ispitivanih uzoraka meda. Sardinjski med obične planike i novozelandski manukin med pokazali su u dosadašnjim istraživanjima citotoksična svojstva prema humanim stanicama (HCT-116) i metastatskim stanicama adenokarcinoma epitela debelog crijeva (LoVo) te smanjenu toksičnost prema netumorskim stanicama (Afrin i sur., 2017; Afrin i sur., 2019). Spomenuti autori u istraživanju iz 2017. godine utvrdili su da sardinjski med obične planike pokazuje bolji antikancerogeni potencijal u usporedbi s manukinim medom. Kineski žižulin med imao je citotoksični učinak na stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) (Cheng i sur., 2019), a čileanski ulmov med na stanične linije adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) (Acevedo i sur., 2017).

Kao što je prethodno spomenuto, botaničko podrijetlo meda obične planike prvenstveno se dokazuje senzorskom analizom i određivanjem masenog udjela HGA zbog niske zastupljenosti peludi. Zanimljivo je da je citotoksični potencijal HGA gotovo nepoznat i ovo je istraživanje prvo u okviru kojega su dobiveni podaci o tome. Za razliku od HGA, postojeća literatura dokumentira citotoksičnost mnogih fenola koji su također prisutni u uzorcima meda obične planike i njegova ekstrakta. Ukratko, u ovome medu kvantificirani su: akacetin, kvercetin, pinocembrin, apigenin, krizin te kiseline: *p*-hidroksibenzojeva, *p*-hidroksifeniloctena, *p*-kumarinska, galna, ferulinska, kafeinska i protokatehuinska. Ovakva složena matrica snažnih bioaktivnih spojeva odgovorna je za ukupnu izmjerenu citotoksičnost. Prijašnja su istraživanja drugih autora dokazala citotoksični potencijal spomenutih spojeva. Primjerice, akacetin izaziva citotoksične učinke na stanicama HepG2 (Hsu i sur., 2004a), A549 (Hsu i sur., 2004b), AGS stanicama humanog karcinoma želuca (Pan i sur., 2005), B-stanicama kronične limfocitne leukemije (Salimi i sur., 2016) te ljudskim staničnim linijama karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-468 (Kandhari i sur., 2019). *p*-Kumarinska kiselina izazvala je apoptozu u stanicama raka debelog crijeva HCT-15 (Jaganathan i sur., 2015). Galna kiselina uzrokovala je citotoksičnost putem apoptoze i/ili nekroze u stanicama HeLa (You i sur., 2010), dok su njihovi derivati pokazali apoptotički potencijal u nekoliko staničnih linija tumorskog podrijetla, kako su izvijestili Serrano i suradnici (1998). Wang

i suradnici (2016) utvrdili su da ferulinska kiselina potiče staničnu smrt u linijama osteosarkoma 143B i MG63. Chang i suradnici (2010) izvijestili su da je kafeinska kiselina inducirala apoptozu u stanicama HeLa. Kabala-Dzik i suradnici (2017) također su otkrili citotoksične učinke kafeinske kiseline u ljudskim stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231, iako njezin fenetil-ester u tom pogledu ima snažnije djelovanje. Yin i suradnici (2009) pokazali su apoptotičke učinke protokatehuinske kiseline na nekoliko staničnih linija: ljudski rak dojke MCF7, rak pluća A549, stanice HepG2, HeLa i stanice karcinoma prostate LNCaP. Visok udio protokatehuinske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline, među ostalim komponentama utvrđenim u uzorcima grčkog meda, ističe se kao važan doprinositelj njihovim protutumorskim učincima (Spilioti i sur., 2014). Choi i suradnici (2001) izvijestili su o kvercetinom potaknutoj apoptozi u ljudskim stanicama raka dojke. Hashemzaei i suradnici (2017) izvijestili su da je kvercetin značajno inducirao staničnu smrt u linijama CT-26, LNCaP, MOLT-4 i Raji. Pinocembrin je inducirao apoptozu u staničnoj liniji raka debelog crijeva HCT 116 (Kumar i sur., 2007) te u staničnim linijama melanoma B16F10 i A375 (Zheng i sur., 2018). Prema izvješćima Budhraje i suradnika (2012), apigeninom je potaknuta citotoksičnost u stanicama ljudske leukemije. Yang i suradnici (2018) otkrili su da apigenin inducira apoptozu i autofagiju u stanicama hepatocelularnog karcinoma. Woo i suradnici (2004) dokumentirali su citotoksičnost krizina u stanicama leukemije U937, dok su Khoo i suradnici (2010) utvrdili citotoksične učinke krizina na različitim staničnim linijama ljudskog karcinoma, a Samarghandian i suradnici (2016) potvrdili citotoksičnost krizina na stanicama adenokarcinoma dojke čovjeka uslijed apoptoze. Iz svih ovih istraživanja moglo bi se zaključiti da zbog svog složenog fenolnog sastava testirani med i njegov ekstrakt mogu pokrenuti staničnu smrt putem gotovo svih poznatih mehanizama apoptoze i nekroze.

Na temelju saznanja iz literature i vlastitih rezultata može se zaključiti kako su na dobivene vrijednosti preživljenja stanica sigurno utjecale složene interakcije komponenti prisutnih u medu i/ili njegovu ekstraktu. Također, metaboličke razlike između korištenih staničnih modela u mnogome su pridonijele razlikama u citotoksičnosti testiranih tvari. Rezultati, dobiveni u ovom radu, potvrdili su da su stanice različito osjetljive na iste tretmane. Poznato je da je različita osjetljivost urođeno svojstvo svake vrste stanica, a ona se može dovesti u vezu i s općenitom stabilnosti ili nestabilnosti genoma u ovim staničnim linijama, kojima zbog tumorskog podrijetla mogu biti narušeni i sustavi kontrole diobe i rasta te mehanizmi odgovorni za poticanje stanične smrti nakon tretmana.

Treba napomenuti da su neki od testiranih uzoraka potaknuli rast tretiranih stanica. Primjerice, u slučaju stanica HepG2 značajan je učinak pokazao med pri koncentraciji koja odgovara dnevnom unosu nakon najkraćeg vremena izlaganja od 30 minuta. Slično je djelovala HGA na stanicama CaCo-2 pri istoj koncentraciji nakon 2 sata izlaganja. Na stanicama Cal27 uočili smo najviše točaka u kojima je nakon tretmana došlo do pojačanog rasta stanica, čemu su pridonijele sve testirane tvari. Ovi učinci za testirani med i njegov ekstrakt mogu se dovesti u vezu s njihovim specifičnim i složenim sastavom, u kojem su moguća međudjelovanja između spojeva (sinergizam, aditivni učinci u smislu pojačavanja učinaka pojedinačnog spoja koja utječu na proces diobe stanica). Neke su stanice vjerojatno bolje rasle u uvjetima *in vitro* i zbog prisutnosti šećera u testiranim uzorcima. Nadalje, u obzir valja uzeti i činjenicu da niske koncentracije nekih spojeva u uvjetima *in vitro* mogu izazvati citotoksične učinke, dok u višim koncentracijama isti taj spoj može poticati proliferaciju stanica tumorskog podrijetla putem procesa hormeze (Kustiawan i sur., 2014).

Osim do sada spomenutih čimbenika koji pridonose citotoksičnosti testiranih spojeva ili njihovom stimulirajućem učinku na diobu, treba spomenuti i razlike u prooksidacijskom potencijalu koje također u velikoj mjeri mogu utjecati na preživljavanje stanica. Na temelju podataka iz literature i ranijih istraživanja poznato je da brojni fenolni spojevi, kojima obiluje testirani uzorak meda, imaju „dvojnu prirodu“. To znači da ovisno o uvjetima okoliša u kojem su prisutni mogu imati anti- i prooksidacijski učinak (Martin-Cordero i sur., 2012; Carocho i Ferreira, 2013; Khan i sur., 2020). Prooksidacijski učinak ovisan je o prisutnosti kisika i nekih redoks-aktivnih metalnih iona, poput željeza i bakra (Yen i sur., 2003; Azmi i sur., 2006; Carocho i Ferreira, 2013). Smatra se da uslijed prooksidacijskog djelovanja mnogi fenolni spojevi mogu potaknuti procese lipidne peroksidacije, oštećenja DNA te apoptozu, kako u zdravim, tako i u tumorskim stanicama (Eghbaliferiz i Iranshahi, 2016).

Najzastupljeniji fenolni spoj u testiranom medu i njegovu ekstraktu bila je HGA. Kang i suradnici (2005) utvrdili su da je HGA (u koncentraciji od 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) smanjila stvaranje ROS-a unutar stanica stanične linije humanih fibroblasta (WI 38) koje su izložene oksidacijskom stresu induciranim s vodikovim peroksidom. HGA je pokazala zaštitni učinak kada su stanice njome tretirane jedan sat prije izlaganja vodikovom peroksidu. HGA je pojačala aktivnost katalaze i proteina ERK (eng. *Extracellular signal-regulated kinases*, ERKs) koji igraju važnu ulogu u učinkovitom povećanju antioksidacijskih obrambenih mehanizama u stanicama. Međutim, ima i suprotnih

zapažanja. Martin i Batkoff (1987) izvijestili su da je HGA sposobna za prooksidacijsko djelovanje, a u radu Hiraku i suradnika (1998) uočena su oksidacijska oštećenja izazvana s HGA na fragmentima ljudske DNA, ali pri mnogo višim koncentracijama od onih istraživanih u ovom radu. Prooksidacijski učinak na DNA u uvjetima *in vitro* ranije su zabilježeni za neke prirodne fenolne kiseline srodne HGA (Lodovici i sur., 2001; Bhat i sur., 2007).

Kao što je spomenuto, Afrin i suradnici (2017) izvijestili su da je sardinijski med obične planike uzrokovao povećano unutarstanično stvaranje ROS-a u stanicama adenokarcinoma debelog crijeva (HCT-116) i metastatskim stanicama debelog crijeva (LoVo) nakon tretmana od 24, 48 i 72 sata te u koncentracijskom rasponu 3 – 20 mg mL<sup>-1</sup> za stanice HCT-116 i 5 – 60 mg mL<sup>-1</sup> za stanice LoVo. U razmatranju cjelokupnog učinka meda treba uzeti u obzir spojeve koji su u njegovom sastavu najzastupljeniji i njihove pojedinačne učinke kao i vrijeme izlaganja stanica te koncentracije testiranih spojeva. Za neke od ranije spomenutih fenolnih komponenti istraživanog meda već su ranije dokumentirani prooksidacijski učinci. Primjerice, Pan i suradnici (2005) su na staničnoj liniji AGS ljudskog karcinoma želuca otkrili da je akacetin, koji je prisutan u visokoj koncentraciji u istraživanim uzorcima u ovom radu, stimulirao proizvodnju ROS-a. Također, postoje dokazi o sličnim učincima drugih sastojaka. Lodovici i suradnici (2001) otkrili su da je 3-hidroksibenzojeva kiselina sposobna pojačati oksidacijsko oštećenje DNA u uvjetima *in vitro*. O prooksidacijskim svojstvima galne kiseline prethodno su izvijestili Yen i suradnici (2003) i Sohi i suradnici (2003). Bhat i suradnici (2007) primijetili su da kafeinska kiselina prooksidacijskim djelovanjem uzrokuje oštećenja DNA u limfocitima ljudske periferne krvi. Maistro i suradnici (2011) izvijestili su o prooksidacijskom djelovanju kafeinske i ferulinske kiseline u stanicama tkiva hepatoma štakora, dok su Chedea i suradnici (2012) opisali prooksidacijske učinke kvercetina i kafeinske kiseline. O kvercetinu i njegovom prooksidacijskom djelovanju dokaze daju i istraživanja drugih autora (Metodiewa i sur., 1999; Lee i sur., 2003; Yang i sur., 2012). Truong i suradnici (2020) utvrdili su da antioksidacijsko djelovanje ferulinske kiseline uglavnom prevladava nad prooksidacijskim, iako potonje postaje značajno u nekim specifičnim uvjetima. Miyoshi i suradnici (2007) dokazali su prooksidacijski potencijal apigenina na ljudskim stanicama leukemije HL-60, dok slične učinke nisu našli za krizin. Ovdje su spomenute samo najvažnije fenolne komponente meda obične planike i njegova ekstrakta. Međutim, iz detaljne analize njihova fotokemijskog profila jasno je da se radi o vrlo složenoj matrici bioaktivnih spojeva koji

svojim uzajamnim djelovanjima mogu pojačati ili oslabiti pojedinačna anti- ili prooksidacijska svojstva pojedinačnih spojeva, što se vidi i iz rezultata dobivenih u ovom doktorskom radu.

U cjelini uzevši, podaci dobiveni na staničnim linijama potvrđuju specifičnost primijenjenog modela testiranja za procjenu citotoksičnih učinaka svih testiranih tvari. Najvažnije zapažanje koje proizlazi iz provedenih pokusa je da pri koncentracijama koje su korištene u ovom pokusu sve testirane tvari imaju nisku citotoksičnost i visoku biokompatibilnost, što je dobra polazišna osnova za nastavak istraživanja njihovih bioloških učinaka na drugim modelima.

#### **5.4. Antioksidacijski učinak meda obične planike, njegova ekstrakta i homogetizinske kiseline (HGA) na DNA plazmid phiX174 RF1**

U okviru ovog istraživanja, uporabom DNA plazmida phiX174 RF1 istražena je sposobnost testiranih tvari da inhibiraju inducirane hidroksilne radikale, iz čega se može procijeniti njihov antioksidacijski potencijal. Ova je jednostavna *in vitro* metoda do sada našla primjenu u različitim istraživanjima (Li i sur., 1994; Gilmour i sur. 1996; Thibodeau i Paquette, 1999; Alsulami i sur., 2019). Pomoću navedene metode, razine i aktivnost slobodnih radikala mjere se na temelju stupnja zavijenosti DNA plazmida phiX174 RF1 koji je superzavijen, a djelovanjem slobodnih radikala i UV zračenja on se cijepa u otvorene kružne i linearne oblike. Nakon inkubacije plazmidne DNA s istraživanim uzorcima provodi se elektroforeza kojom se – uslijed razdvajanja na agaroznom gelu – detektira superzavijena DNA, odnosno otvorena kružna DNA. Omjer intenziteta superzavijene odnosno otvorene kružne DNA pokazatelj je stupnja oštećenja DNA izazvanog slobodnim radikalima, a ako se u reakcijsku smjesu stavi potencijalni antioksidans odnosno smjesa spojeva s potencijalno antioksidacijskim djelovanjem, promjenom omjera intenziteta superzavijene i kružne molekule DNA moguće je odrediti radi li se o antioksidacijskom djelovanju. Količina superzavijene DNA, prisutna nakon tretmana, u usporedbi s kontrolom, upućuje na razinu oštećenja plazmida slobodnim radikalima. Nastanak jednolančanog loma u molekuli DNA plazmida dovodi do stvaranja otvorenog kružnog plazmida, dok nastanak linearnog oblika plazmidne DNA upućuje na dvolančani lom, no taj je događaj relativno rijedak ako se kao izvor slobodnih radikala rabi hidroksil-radikal. Tijekom elektroforeze, superzavijena DNA migrira brže od svog linearnog oblika, dok otvorena kružna DNA

migrira znatno sporije od superzavijenog ili linearnog oblika (Thibodeau i Paquette, 1999). U ovom radu nastali hidroksilni radikali nisu uzrokovali nastanak lineariziranog plazmida.

Analizom rezultata dobivenih primjenom metode s DNA plazmidom phiX174 RF1, testirani uzorci ekstrakta meda i HGA pokazali su najjače antioksidacijsko djelovanje u trendu testirana koncentracija – odgovor. Nadalje, rezultati dobiveni za ekstrakt meda, u usporedbi s HGA, upućuju na doprinos fenolnih spojeva prisutnih u ekstraktu na njegov bolji antioksidacijski učinak. Med obične planike pokazao je nešto slabiji antioksidacijski učinak, a umjetni med nije utjecao na promjenu oksidacijskog oštećenja izazvanog vodikovim peroksidom i zračenjem UV svjetlom. Rezultati u ovom radu upućuju da smjesa biološki aktivnih tvari prisutnih u ekstraktu meda utječe na ukupni antioksidacijski karakter ekstrakta meda. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima koji su dobiveni u istraživanjima antioksidacijskog djelovanja meda, ekstrakta meda i HGA na tumorskim staničnim linijama gdje je vidljivo da je najjače antioksidacijsko djelovanje imao ekstrakt meda i HGA, upućujući na zaključak da bitnu ulogu u ukupnom prooksidacijskom/antioksidacijskom djelovanju neke tvari ili smjese tvari vrlo često imaju i neke inertne tvari kao što su šećeri koji, u ovisnosti o eksperimentalnim uvjetima, mogu značajno utjecati na antioksidacijsko ili prooksidacijsko djelovanje.

## **6. ZAKLJUČCI**

---

Na temelju provedenih istraživanja u ovom doktorskom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Snažan antioksidacijski kapacitet meda obične planike posljedica je visokog masenog udjela ukupnih fenola i flavonoida te visokog udjela glavne bioaktivne sastavnice HGA.
2. Spregom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa visokog razlučivanja (UHPLC-LTQ Orbitrap MS) po prvi je puta prema saznanju autora određen detaljan fenolni profil meda obične planike s hrvatskog područja. Identificirano je 56 fenolnih spoja (16 fenolnih kiselina, 10 derivata fenolnih kiselina, 14 flavonoida i 16 flavonoidnih derivata), a kvantificirano ih je 12. Veliki broj fenolnih komponenti prisutnih u medu obične planike može djelovati sinergistički i antagonistički na biološke sustave.
3. Utvrđena je visoka biokompatibilnost meda obične planike, njegova ekstrakta i HGA s limfocitima iz ljudske periferne krvi i njihov zaštitni učinak na razinu citogenetičkih oštećenja izazvanih irinotekanom.
4. Med je pokazao bolju biokompatibilnost od njegova ekstrakta, praćenu nižom učestalošću kromosomskih aberacija, mikronukleusa i drugih struktura u CBMN-testu. Med također nije naštetio proliferaciji limfocita u uvjetima *in vitro* i pokazao je dobro geno-/citoprotektivno djelovanje protiv oštećenja izazvanih irinotekanom u ovom tipu stanica.
5. Med obične planike, ekstrakt meda i HGA, pokazali su nisku citotoksičnost prema svim istraživanim tumorskim staničnim linijama (HepG2, Caco-2 i Cal27).
6. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da ne postoje vremenski ili koncentracijski ovisni utjecaji testiranih tvari na preživljavanje stanica što može biti posljedica složenog fitokemijskog profila meda obične planike pa su mogući i sinergistički i antagonistički učinci njegovih komponenti na preživljavanje stanica.
7. Ekstrakt meda obične planike i HGA pokazali su antioksidacijsko djelovanje na sve tri tumorske stanične linije u sva tri istraživana vremena neovisno o testiranoj koncentraciji.



## **7. POPIS LITERATURE**

Acevedo, F., Torres, P., Oomah, B.D., de Alencar, S.M., Prado Massarioli, A., Martín-Venegas, R., Albarral-Ávila, V., Burgos-Díaz, C., Ferrer, R., Rubilar, M. (2017) Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and *in vitro* bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. *Food Res. Int.* **94**, 20-28.

Afri, M., Frimer, 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.

Afrin, S., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., Bompadre, S., Quiles, J.L., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F., Battino, M. (2017) Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ROS generation: A comparison with manuka honey. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 613-632.

Afrin, S., Giampieri, F., Cianciosi, D., Pistollato, F., Ansary, J., Pacetti, M., Amici, A., Reboredo-Rodríguez, P., Simal-Gandara, J., Quiles, J.L., Forbes-Hernández, T.Y., Battino, M. (2019) Strawberry tree honey as a new potential functional food. Part 1: Strawberry tree honey reduces colon cancer cell proliferation and colony formation ability, inhibits cell cycle and promotes apoptosis by regulating EGFR and MAPKs signaling pathways. *J. Funct. Foods* **57**, 439-452.

Afrin, S., Haneefa, S.M., Fernandez-Cabezudo, M.J., Giampieri, F., Al-Ramadi, B.K., Battino, M. (2020) Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: an evidence-based review. *Nutr. Res. Rev.* **33**, 50-76.

Ahmed, A., Khan, A., Azim, M.K., Saeed, S.A., Mesaik, M.A., Ahmed, S., Imran, I. (2011) Effect of natural honey on human platelets and blood coagulation proteins. *J. Pharm. Sci.* **24**, 389-397.

Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valero, J.R. (2011) Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31**, 227-249.

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.* **463**, 111-172.

- Aljadi, A.M., Kamaruddin, M.Y. (2004) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* **85**, 513-518.
- Alsulami, R.N., Budkina, D.S., Sallans, L., Khisamutdinov, E.F., Pandey, U., Glusac, K., Wilson, R.M. (2019) Oxidation of nucleic acids: Chemistry of pyrene quinone (PQ 1) and development of dihydrodioxins (DHD 2) as DNA photooxidizing agents. *J. Photoch. Photobio. A* **376**, 224-237.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., Battino, M. (2009) Methodological aspects about determination of phenolic compounds and *in vitro* evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review. *Curr. Anal. Chem.* **5**, 293-302.
- Alves, A., Ramos, A., Gonçalves, M.M., Bernardo, M., Mendes, B. (2013) Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J. Food Compos. Anal.* **30**, 130-138.
- Amorim, E.L.C., Nascimento, J.E., Monteiro, J.M., da Silva Peixoto Sobrinho, T.J., Araujo, T.G., de Albuquerque, U.P. (2008) A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. *Funct. Ecosyst. Comm.* **2**, 88-94.
- Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. (1997) Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* **60**, 79-84.
- Anklam, E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **63**, 549-562.
- Argevani, L., Hughes, C., Schuh, M.J. (2020) Dosage adjustment of irinotecan in patients with UGT1A1 polymorphisms: A review of current literature. *Innov. Pharm.* **11**, 1-7.
- Ashgar, M.N., Khan, I.U., Qureshi, I.Z., Mukhtar, A., Ahmad, F. (2008) Modified 2,2'-azinobis(3-ethylbenzo thiazoline)-6-sulphonic acid radical cation decolorization assay for antioxidant activity of human plasma and extracts of traditional medicinal plants. *Acta Chim. Slov.* **55**, 408-418.

---

ATCC (2020a) American Type Culture Collection. ATCC – The Global Bioresource center: Caco-2, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 15. studenoga 2020.

ATCC (2020b) American Type Culture Collection. ATCC – The Global Bioresource center: Cal27, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2095.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 15. studenoga 2020.

ATCC (2020c) American Type Culture Collection. ATCC – The Global Bioresource center: HepG2, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 15. studenoga 2020.

Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hanif, S., Hadi, S.M. (2006) Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* **580**, 533-538.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2101-2103.

Ban, J., Osmak, M. (1996) Načela proliferacije tumora. U: Klinička onkologija (Turić, M., Kolarić, K., Eljuga, D., urednici), Nakladni zavod Globus, Zagreb, 37-55.

Bates, D.J.P., Lewis, L.D. (2013) Manipulating the apoptotic pathway: potential therapeutics for cancer patients. *J. Clin. Pharmacol.* **76**, 381-395.

Batra, P., Sharma, A.K. (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech.* **3**, 439-459.

Becker E.M., Nissen L.R., Skibsted L.H. (2004) Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* **219**, 561-571.

Bender, M.A., Preston, J.R., Leonard, R.C., Pyatt, B.E., Gooch, P.C., Shelby, M.D. (1988) Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutat. Res.* **204**, 421-433.

Benedetti, S., Mannino, S., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. (2004) Electronic nose and neural network use for the classification of honey. *Apidologie* **35**, 397-402.

- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999)** Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **299**, 15–27.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005)** Standardization of antioxidant properties of honey by combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **533**, 185-191.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, İ., Reşat, A. (2007)** Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* **72**, 1157-1165.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007)** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **105**, 822-828.
- Bhat, S.H., Azmi, A.S., Hadi, S.M. (2007)** Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **218**, 249-255.
- Bianchi, F., Careri, M., Musci, M. (2005)** Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **89**, 527-532.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbuhl, W., Gallmann, P. (2007)** Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *J. Apic. Res.* **46**, 269-275.
- Bogdanov, S., Jurendić, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008)** Honey for nutrition and health: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* **27**, 677-689.
- Bors, W., Michel, C. (2002)** Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 57-69.
- Bory, C., Boulieu, R., Chantin, C., Mathieu, M. (1990)** Diagnosis of alcaptonuria: Rapid analysis of homogentisic acid by HPLC. *Clin. Chim. Acta* **189**, 7-11.
- Boyel, P., Levin, B. (2008)** World Cancer Report 2008. IARC – International Agency for Research on Cancer, <<https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2008>>. Pristupljeno 30. rujna 2020.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity *LWT*, **28**, 25–30.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Brčić Karačonji, I., Jurica, K. (2017) Development and validation of gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of homogentisic acid in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. AOAC Int.* **100**, 889-892.
- Brčić Karačonji, I., Tariba, B., Živković, T., Brajenović, N., Jurica, K., Pezer, M., Turkalj, M., Vihnanek Lazarus, M., Lušić, D., Pizent, A. (2014) Beneficial effects of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey supplementation in men, Book of Abstracts of the International Symposium on Bee Products, 3<sup>rd</sup> Edition – Annual Meeting of the International Honey Commission (IHC), 110.
- Brudzynski, K., Miotto, D. (2011) The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chem.* **124**, 869-874.
- Budhreja, A., Gao, N., Zhang, Z., Son, Y.O., Cheng, S., Wang, X., Ding, S., Hitron, A., Chen, G., Luo, J., Shi, X. (2012) Apigenin induces apoptosis in human leukemia cells and exhibits anti-leukemic activity *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 132-142.
- Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C., Ghelli, S. (1999) Homogentisic acid: A phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4064-4067.
- Carcache-Blanco, E.J., Cuendet, M., Park, E.J., Su, B.N., Rivero-Cruz, J.F., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Douglas, K.A. (2006) Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Nat. Prod. Res.* **20**, 327-334.
- Carocho, M., Ferreira, I.C. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15-25.
- Carrano A.V. i Natarajan A.T. (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* **204**, 379-406.
- Cavia, M.M., Fernandez-Muin, M.A., Gomez-Alonso, E., Montes-Perez, M.J., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2002) Evolution of fructose and glucose in honey over one year: Influence of induced granulation. *Food Chem.* **78**, 157-161.

- Chang, C.F., Chang, Y.C., Lin, J.T., Yu, C.W., Kao, Y.T. (2021) Evaluation of inhibitors of intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10 using raloxifene as a substrate in Caco-2 cells: Studies with four flavonoids of *Scutellaria baicalensis*. *Toxicol. In Vitro* **72**, 105087.
- Chang, W.C., Hsieh, C.H., Hsiao, M.W., Lin, W.C., Hung, Y.C., Ye, J.C. (2010) Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan Obstet. Gynecol.* **49**, 419-424.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **10**, 178-182.
- Chaubal, R., Mujumdar, A.M., Misar, A., Deshpande, N.R. (2005) Isolation of phenolic compounds from *Acacia nilotica* with topical antiinflammatory activity. *Asian J. Chem.* **17**, 1595-1599.
- Chedea, V.S., Choueiri, L., Jisaka, M., Kefalas, P. (2012) *o*-Quinone involvement in the prooxidant tendency of a mixture of quercetin and caffeic acid. *Food Chem.* **135**, 1999-2004.
- Cheng, N., Zhao, H., Chen, S., He, Q., Cao, W. (2019) Jujube honey induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell via DNA damage, p53 expression, and caspase activation. *J. Food Biochem.* **43**, 12998.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., Cabras, P. (1994) Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J. Chromatogr. A* **669**, 59-64.
- Choi, J.A., Kim, J.Y., Lee, J.Y., Kang, C.M., Kwon, H.J., Yoo, Y.D., Kim, T.W., Lee, Y.S., Lee, S.J. (2001) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int. J. Oncol.* **19**, 837-844.
- Chong, J., Poutaraud, A., Huguene, P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **177**, 143-155.
- Christ B. i Müller K.H. (1960) Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch Pharm.* **293**, 1033-1042.
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Gasparri, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P.P., Zhang, J., Lamas, L.B., Martínez Flórez, S., Toyos, P.A., Quiles, J.L.,

Giampieri, F., Battino, M. (2018) Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* **23**, 2322-2342.

Ciulu, M., Spano, N., Pilo, M.I., Sanna, G. (2016) Recent advances in the analysis of phenolic compounds in unifloral honeys. *Molecules* **21**, 451-483.

Codex Alimentarius International Food Standardss (2001) <[https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf)>. Pristupljeno 11. listopada 2020.

Da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* **196**, 309-323.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità* **43**, 348-361.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.

Daniel-Kelly, J.F., Downey, G., Fouratier, V. (2004) Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 33-39.

Deiana, V., Tuberoso, C., Satta, A., Pinna, C., Camarda, I., Spano, N., Ciulu, M., Floris, I. (2015) Relationship between markers of botanical origin in nectar and honey of the strawberry tree (*Arbutus unedo*) throughout flowering periods in different years and in different geographical areas. *J. Apic. Res.* **54**, 342-349.

Deng, S.L., Chen, W.F., Zhou, B., Lang, Y., Liu, Z.L. (2005) Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chem.* **98**, 112-119.

De la Fuente, E., Sanz, M.L., Martínez-Castro, I., Sanz, J., Ruiz-Matute, A.I. (2007) Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chem.* **105**, 84-93.

De Jong, F.A., de Jonge, M.J.A., Verweij, J., Mathijssen, R.H.J. (2006) Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett.* **234**, 90-106.



- Dimitrova, B., Gevrenova, R., Anklam, E. (2007) Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and highperformance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **18**, 24-32.
- Dubtsova, E. (2009) Clinical studies with bee products for therapy of some nutritional diseases (in Russian), Central Moscow Institute of Gastroenterology Moscow, 1-38.
- Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. (2007) Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 241-252.
- Eastmond D.A., Tucker J.D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* **13**, 34–43.
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M. (2016) Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother. Res.* **30**, 1379-1391.
- El-Dahtory, F.A.M., Yahia, S. (2011) Cytoprotective effect of honey against chromosomal breakage in fanconi anemia patients *in vitro*. *Indian J. Hum. Genet.* **17**, 77-81.
- El-Haddad, S.A., Shawaf, M.D. (2013) Effect of honey for treatment of some common oral lesions: Follow up of 50 cases. *J. Dent. Oral Hyg.* **5**, 55-61.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, M.C. (2014) Contribution of botanical origin and sugar composition of honey on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* **149**, 84-90.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L.S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H. (2007) Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* **30**, 605-613.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res.* **455**, 81-95.
- Fenech, M. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* **600**, 58-66.

- Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* **2**, 1084-1104.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **534**, 65-75.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **26**, 125-132.
- Fenech, M., Morley, A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* **147**, 29-36.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M. (2009) Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* **114**, 1438-1443.
- Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Tomas-Lorente, F. (1991) A HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *J. Sci. Food Agr.* **56**, 49-56.
- Ferreres, F., Giner, J.M., Tomás-Barberán, F.A. (1994) A comparative study of hesperetin and methylanthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *J. Sci. Food Agric.* **65**, 371-372.
- Ferreres, F., Juan, T., Pérez-Arquillué, C., Herrera-Martache, A., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A. (1998) Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *J. Sci. Food Agric.* **77**, 506-510.
- Flanjak, I. (2012) Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Doktorski rad.
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjeric, D., Primorac, Lj. (2016) Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 39-48.
- Freshney, R.I. (2000) Quantitation-cell counting. U: Wiley, J., Freshney, R.I., uredinici. Culture of animal, John Wiley & Sons, Inc., Publication NY, New York.

- Frolov, V.M., Peressadin, N.A. (2006) Honey against influenza and sore throat. *Pcelovodstvo* **10**, 52-53.
- Fuchs, C., Mitchell, E.P., Hoff, P.M. (2006) Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* **32**, 491-503.
- Fujita, K., Kubota, Y., Ishida, H., Sasaki, Y. (2015) Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **21**, 12234-12248.
- Fuss, E. (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochem. Rev.* **2**, 307-320.
- Gašić, U. (2017) Fitohemijski markeri botaničkog i geografskog porekla meda, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Doktorski rad.
- Gašić, U.M., Natić, M.N., Mišić, D.M., Vukić Lušić, D., Milojković-Opsenica, D.M., Tešić, Ž.Lj., Lušić D. (2015) Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *J. Food Compost. Anal.* **44**, 128-138.
- Gerets, H.H., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Deplechin, B.O., Dhalluin, S., Atienzar, F.A. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol.* **28**, 69-87.
- Gheldof, N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5870-5877.
- Gilmour, P.S., Brown, D.M., Gordon Lindsay, T., Beswick, P.H., MacNee, W., Donaldson, K. (1996) Adverse health effects of PM<sub>10</sub> particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup. Environ. Med.* **53**, 817-822.
- Gobin, I., Vučković, D., Lušić, D. (2014) Antibakterijska svojstva meda: Pregledni članak. *Med. Flum.* **50**, 150-157.
- Habib, H.M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, U.D., Ibrahim, W.H. (2014) Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chem.* **153**, 28-34.

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Reichel, T.L. (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887-1892.

Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 950-988.

Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R.E., Tabrizian, K., Taghdisi, S.M., Sadegh, S.E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N.Y., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M., Rezaee, R. (2017) Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo*. *Oncol. Rep.* **38**, 819-828.

Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2015) Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.* **173**, 501-513.

HEMO (1998) Hemocytometer Cell Counting Protocol. <<http://home.sandiego.edu/~josephprovost/Hemocytometer%20Cell%20Counting%20Protocol.pdf>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2020.

Hiraku, Y., Yamasaki, M., Kawanishi, S. (1998) Oxidative DNA damage induced by homogentisic acid, a tyrosine metabolite. *FEBS Lett.* **432**, 13-26.

Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J., Katan, M.B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276-1282.

Honey – Health and Therapeutic Qualities (2002) National Honey Board, <<https://www.biologiq.nl/UserFiles/Compendium%20Honey%202002.pdf>>.

Pristupljeno 15. siječnja 2021.

Hsu, Y.L., Kuo, P.L, Lin, C.C. (2004a) Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 823-829.

Hsu, Y.L., Kuo, P.L, Liu, C.F., Lin, C.C. (2004b) Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer Lett.* **212**, 53-60.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856.

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

Hughes, A.T., Milan, A.M., Davison, A.S., Christensen, P., Ross, G., Gallagher, J.A., Dutton, J.J., Ranganath, L.R. (2015) Serum markers in alkaptonuria: simultaneous analysis of homogentisic acid, tyrosine and nitisinone by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ann. Clin. Biochem.* **5**, 597-605.

International Atomic Energy Agency – IAEA (2001) Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Technical Report Series no. 405.

Imtara, H., Kmail, A., Touzani, S., Khader, M., Hamarshi, H., Saad, B., Lyoussi, B. (2019) Chemical analysis and cytotoxic and cytostatic effects of twelve honey samples collected from different regions in Morocco and Palestine. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2019**, 1-11.

International Honey Commission (2009) Harmonised methods of the International Honey Commission, <[www.ihc-platform.net](http://www.ihc-platform.net)>, Pristupljeno 1. srpnja 2020.

Irudayaraj, J., Xu, F., Tewari, J. (2003) Rapid determination of invert cane sugar adulteration in honey using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *J. Food Sci.* **68**, 2040-2045.

Iyer, L., King, C.D., Whittington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L., Ratain, M.J. (1998) Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridin diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J. Clin. Invest.* **101**, 847-854.

Jaganathan, K.S., Arunpandian, B., Vellayappan, V.M, Asokan, K.M., Subramanian, P.A., John, A.A., Eko, S., Razak, I.A.S., Mohsen, M. (2015) A review on antiproliferative and apoptotic activities of natural honey. *AAMCE4* **15**, 48-56.

Jaganathan, K.S., Mandal, M. (2009) Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells. *JAAS* **1**, 29-36.

Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Önning, G., Åkesson, B., Cirenajwis, H.M., Oredsson, S.M. (2011) The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and *p*-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr. Cancer* **63**, 611-622.

Janiszewska, K., Aniołowska, M., Nowakowski, P. (2012) Free amino acids content of honeys from Poland. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **62**, 85-89.

Jaxel, C., Kohn, K.W., Wani, M.C., Wall, M.E., Pommier, Y. (1989) Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I. Evidence for a specific receptor site and for a relation to antitumor activity. *Cancer Res.* **49**, 1465-1469.

Jiang, L., Ji, N., Zhou, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Z., Chen, Q., Zeng, X. (2009) CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncol.* **45**, e204-e207.

Jurica, K. (2016) Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Doktorski rad.

Jurica, K., Brčić Karačonji, I. (2019) Maginja – neotkriveno mediteransko blago. U: Znanstveni dalekozor (Stipičević, S., urednica), Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, 21-26.

Jurič, A., Brčić Karačonji, I., Žunec, S., Mikolić, A., Kopjar, N. (2019) Cito/genoprotektivni i antioksidacijski učinci meda obične planike na oštećenja ljudskih limfocita izazvana UVB zračenjem u uvjetima *in vitro*. Zbornik radova 12. simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Varaždin, 121-126.

Jurič, A., Gašić, U., Brčić Karačonji, I., Jurica, K., Milojković-Opsenica, D. (2020) The phenolic profile of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Serb. Chem. Soc.* **85**, 1011-1019.

Jurič, A., Mladinić, M., Želježić, D., Pezer, M., Turkalj, M., Jurica, K., Kopjar, N., Brčić Karačonji, I. (2018) Human intervention trial with strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Impact on DNA stability and haematological parameters. U: Matović, V., urednica. 10<sup>th</sup> Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) & 12<sup>th</sup> Congress of the Serbian Society of Toxicology (12th SCT), Book of Abstracts. Society of Toxicology, Beograd, Srbija, 112.

Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Ż., Stojko, R., Wojtyczka, R.D., Stojko, J. (2017) Comparison of two components of propolis: caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) to induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. *Molecules* **22**, 1554.

- Kandhari, K., Mishra, J.P.N., Singh, R.P. (2019) Acacetin inhibits cell proliferation, survival, and migration in human breast cancer cells. *Int. J. Pharma. Biol. Sci.* **9**, 443-452.
- Kang, K.A., Chae, S., Lee, K.H., Zhang, R., Jung, M.S., You, H.J., Kim, J.S., Hyun, J.W. (2005) Antioxidant effect of homogentisic acid on hydrogen peroxide induced oxidative stress in human lung fibroblast cells. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **10**, 556-563.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009) Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods* **2**, 41-60.
- Karabagias, I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M.G. (2014) Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chem.* **146**, 548-557.
- Kawai, S., Takeshima, N., Hayasaka, Y., Notsu, A., Yamazaki, M., Kawabata, T., Yamazaki, K., Mori, K., Yasui, K. (2021) Comparison of irinotecan and oxaliplatin as the first-line therapies for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* **21**, 116.
- Kciuk, M., Marciniak, B., Kontek, R. (2020) Irinotecan-still an important player in cancer chemotherapy: A comprehensive overview. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4919.
- Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, J.M., Chun, K.S., Park, J.H., Lee, S.K., Kwon, H., Surh, Y.J. (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heatprocessed ginseng. *Cancer Letters* **150**, 41-48.
- Khalil, M.I., Sulaiman, S.A. (2010) The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: A review. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **7**, 315-321.
- Khan, Z.S., Chatterjee, N.S., Shabeer, T.P.A., Shaikh, S., Banerjee, K. (2020) Profile of triacylglycerols, phenols, and vitamin E of Manjari Medika grape seed oil and cake: Introducing a novel Indian variety. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **122**, 1-9.
- Khoo, B.Y., Chua, S.L., Balaram, P. (2010) Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 2188-2199.

- Kiokias, S., Proestos, C., Oreopoulou, V. (2020) Phenolic acids of plant origin-a review on their antioxidant activity *in vitro* (o/w emulsion systems) along with their *in vivo* health biochemical properties. *Foods* **9**, 534.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P. (1997) The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* **392**, 19-30.
- Kopjar, N., Želježić, D., Kašuba, V., Rozgaj, R. (2010) Antineoplastic drugs as a potential risk factor in occupational settings: mechanisms of action at the cell level, genotoxic effects, and their detection using different biomarkers. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **61**, 121-146.
- Kopjar, N., Želježić, D., Lucić Vrdoljak, A., Radić, B., Ramić, S., Milić, M., Gamulin, M., Pavlica, V., Fučić, A. (2007) Irinotecan toxicity to human blood cells *in vitro*: Relationship between various biomarkers. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **100**, 403-413.
- Kraljević, S., Sedic, M., Scott, M., Gehrig, P., Schlapbach, R., Pavelic, K. (2006) Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: What can be seen from the proteomics point of view? *Cancer Treat. Rev.* **32**, 619-629.
- Kumar, M.A.S., Nair, M., Hema, P.S., Mohan, J., Santhoshkumar, T.R. (2007) Pinocembrin triggers Bax-dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* **46**, 231-241.
- Kustiawan, P.M., Puthong, S., Arung, E.T., Chanchao, C. (2014) *In vitro* cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **4**, 549-556.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2006) The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 611-625.
- Lee, C.K., Lee, P.H., Kuo, Y.H. (2001) The chemical constituents from the aril of *Cassia fistula* L. *Chin. Chem. Soc.* **48**, 1053-1058.



- Lee, J.C., Kim, J., Park, J.K., Chung, G.H., Jang, Y.S. (2003) The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.* **291**, 386-397.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidant nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **3**, 21-32.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Jove-J. Vis. Exp.* **62**, 3923-3927.
- Li, Y., Trush, M.A., Yager, J.D. (1994) DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis* **15**, 1421-1427.
- Lindberg, H.K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G.C., Norppa, H., Fenech, M. (2007) Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res.* **617**, 33-45.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M., Dolara, P. (2001) Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 1205-1210.
- Loeb, L.A., Harris, C.C. (2008) Advances in chemical carcinogenesis: A historical review and perspective. *Cancer Res.* **68**, 6863-6872.
- Lorge E., Hayashi M., Albertini S., Kirkland D. (2008) Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutat Res.* **655**, 1-3.
- Madejczyk, M., Baralkiewicz, D. (2008) Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Anal. Chim. Acta* **617**, 11-17.
- Maistro, E.L., Angeli, J.P., Andrade, S.F., Mantovani, M.S. (2011) *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. *Genet. Mol. Res.* **10**, 1130-1140.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.
- Martin, J.P., Batkoff, B. (1987) Homogentisic acid autoxidation and oxygen radical generation: implications for the etiology of alkaptonuric arthritis. *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 241-250.

- Martin-Cordero, C., Leon-Gonzalez, A.J., Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Lopez-Lazaro, M. (2012)** Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Curr. Drug Targets* **13**, 1006-1028.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decodier, I., Kirsch-Volders, M. (2006)** Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochemie* **88**, 1515-1531.
- Mathijssen, R.H.J., Van Alphen R.J., Verweij, J., Loos, W.J., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A. (2001)** Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.* **7**, 2182-2194.
- Mato, I., Huidobro, J., Simal-Lozano, J. (2006)** Review: Analytical methods for the determination of organic acids in honey. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **36**, 3-11.
- Malenica Staver, M., Ratkaj, I., Broznić, D., Jerković, I., Marijanović, Z., Željezić, D., Kraljević Pavelić, S. (2014)** Bioactivity of *Satureja montana* L. honey extracts and their profile screening. *RSC Advances* **4**, 47329-47340.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000)** Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 577-599.
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004)** Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* **198**, 329-340.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickançaitė, E., Segura-Aguilar, J. (1999)** Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 107-116.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., Fabre, G. (1995)** The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* **11**, 187-194.
- Milan, A.M., Hughes, A.T., Davison, A.S., Devine, J., Usher, J., Curtis, S., Khedr, M., Gallagher, J.A., Ranganath, L.R. (2017)** The effect of nitisinone on homogentisic acid and tyrosine: A two-year survey of patients attending the National Alkaptonuria Centre, Liverpool. *Ann Clin Biochem.* **54**, 323-330.

- Miyoshi, N., Naniwa, K., Yamada, T., Osawa, T., Nakamura, Y. (2007) Dietary flavonoid apigenin is a potential inducer of intracellular oxidative stress: The role in the interruptive apoptotic signal. *Arch. Biochem. Biophys.* **466**, 274-282.
- Molan, P.C. (1999) Why honey is effective as a medicine. – 1. Its use in modern medicine. *Bee World* **80**, 80-92.
- Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- Mumtaz, P.T., Bashir, S.M., Rather, M.A., Dar, K.B., Taban, Q. (2020) Antiproliferative and apoptotic activities of natural honey. U: *Therapeutic Applications of Honey and its Phytochemicals* (Rehman, M.U., Majid, S., urednici), Springer, Singapore, 345-360.
- Musa K.H., Abdullah A., Kuswandi B., Hidayat M.A. (2013) A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chem.* **141**, 4102-4106.
- Nazarian, H., Taghavizad, R., Majd, A. (2010) Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pakistan J. Bot.* **42**, 3221-3228.
- Norppa, H., Luomahaara, S., Heikanen, H., Roth, S., Sorsa, M., Renzi, L., Lindholm, C. (1993) Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ. Health Perspect.* **101**, 139-143.
- OECD/OCDE, 2016: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487. *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264861-en.pdf?expires=1633936873&id=id&accname=guest&checksum=830CA135B6D484E8B985C1247B4D353E>>. Pristupljeno 30. rujna 2020.
- Odeh, I., Abu-Lafi, S., Dewik, H., Al-Najjar, I., Imam, A., Dembitsky, V.M., Hanuš, L.O. (2007) A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chem.* **101**, 1393-1397.
- Oliveira, I., Baptista, P., Bento, A., Pereira, J.A. (2011) *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *J. Food Nutr. Res.* **50**, 73-85.
- Olsson, B., Cox, T.F., Psarelli, E.E., Szamosi, J., Hughes, A.T., Milan, A.M., Hall, A.K., Rovensky, J., Ranganath, L.R. (2015) Relationship between serum concentrations of

nitisinone and its effect on homogentisic acid and tyrosine in patients with alkaptonuria. *JIMD Rep.* **24**, 21-27.

Pan, M.H., Lai, C.S., Hsu, P.C., Wang, Y.J. (2005) Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *Agric. Food Chem.* **53**, 620-630.

Paul, I.M., Beiler, J., McMonagle, A., Shaffer, M.L., Duda, L., Berlin, C.M. (2007) Effect of honey, dextromethorphan, and no treatment on nocturnal cough and sleep quality for coughing children and their parents. *JAMA Pediatr.* **161**, 1140-1146.

Persano Oddo, L., Piro, R. (2004) Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie* **35**, S38-S81.

Petretto, G.L., Cossu, M., Alamanni, M.C. (2015) Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**, 482-491.

Piskula, M.K., Terao, J. (1998) Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* **128**, 1172-1178.

Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Slrumberg, D. (1998) Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 83-106.

Pravilnik o medu (2015). *Narodne novine* **53**, Zagreb.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.

Purdel, N.C., Margina, D., Ilie, M. (2014) Current methods used in the protein carbonyl assay. *Annu. Res. Rev. Biol.* **4**, 2015-2026.

Pyrzynska, K., Biesaga, M. (2009) Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends Anal. Chem.* **28**, 893-902.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125-1131.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
- Robbins, R.J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2866-2887.
- Rodriguez-Otero, J.L., Paseiro, P., Simal, J., Cepeda, A. (1994) Mineral content of the honeys produced in Galicia (north-west Spain). *Food Chem.* **49**, 169-171.
- Rodriguez-Otero, J.L., Paseiro, P., Simal, J., Terradillos, L., Cepeda, A. (1995) Silicon, phosphorus, sulphur, chlorine and ash contents of Spanish commercial honeys. *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **200**, 233-234.
- Rosa, A., Tuberoso, C.I.G., Atzeri, A., Melis, M.P., Bifulco, E., Dessì, M.A. (2011) Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chem.* **129**, 1045-1053.
- Salimi, A., Roudkenar, M.H., Sadeghi, L., Mohseni, A., Seydi, E., Pirahmadi, N., Pourahmad, J. (2016) Selective anticancer activity of acacetin against chronic lymphocytic leukemia using both *in vivo* and *in vitro* methods: key role of oxidative stress and cancerous mitochondria. *Nutr Cancer* **68**, 1404-1416.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Borji, A., Hasanzadeh, M., Jabbari, F., Farkhondeh, T., Samini, M. (2016) Inhibitory and cytotoxic activities of chrysin on human breast adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Pharmacogn. Mag.* **12**, 436-440.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **21**, 1-26.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L. Jacobo-Velázquez, D.A. (2013) The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **5**, 5990-5999.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695.
- Scanu, R., Spano, N., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Sanna, G., Tapparo, A. (2005) Direct chromatographic methods for the rapid determination of homogentisic acid in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Chromatogr. A* **1090**, 76-80.

- Scarpato, R., Bertoli, A., Naccarati, A., Migliore, L., Cocchi, L., Barale, R., Pistelli, L. (1998) Different effects of newly isolated saponins on the mutagenicity and cytotoxicity of the anticancer drugs mitomycin C and bleomycin in human lymphocytes. *Mutat Res.* **420**, 49-54.
- Senter, P.D., Beam, K.S., Mixan, B., Wahl, A.F. (2001) Identification and activities of human carboxylesterases for the activation of CPT-11, a clinically approved anticancer drug. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1074-1080.
- Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespón, C., Villar, M.L., Nocito, M., González-Porqué, P. (1998) Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.* **350**, 49-54.
- Shih, P.H., Yeh, C.T., Yen, G.C. (2007) Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9427-9435.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 945-948.
- Shewach, D.S., Kuchta, R.D. (2009) Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chem. Rev.* **109**, 2859-2861.
- Smirnova, I.I., Filatova, E.I., Suvorov, A.N., Bylinskaia, E.N. (2000) The use of therapeutic/prophylactic dragee "honey laminolact" in radiotherapy of uterine tumors. *Vopr. Onkol.* **46**, 748-750.
- Sohi, K.K., Mittal, N., Hundal, M.K., Khanduja, K.L. (2003) Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **49**, 221-227.
- Soldić, Ž. (2015) Kemoterapija u liječenju zloćudnih bolesti, Pliva zdravlje, <<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/27160/Kemoterapija-u-lijecenju-zlocudnih-bolesti.html>>. Pristupljeno 20. prosinca 2020.
- Spano, N., Piras, I., Ciulu, M., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Sanna, G. (2009) Reversed-phase liquid chromatographic profile of free amino acids in strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. AOAC Int.* **92**, 1145-1152.

Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., Chinou, I., Kassi, E., Karabournioti, S., Moutsatsou, P. (2014) Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PLoS One* **9**, 94860.

Sun, H., Chow, E.C., Liu, S., Du, Y., Pang, K.S. (2008) The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 395-411.

Stalikas, C.D. (2010) Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods. U: Uppu, R.M., i sur., urednici. *Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular Biology* 610, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC, 65-90.

Šamec, D. (2013) Fitokemijska i genetska istraživanja endemičnih vrsta *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, Doktorski rad.

Takano, M., Sugiyama, T. (2017) UGT1A1 polymorphisms in cancer: impact on irinotecan treatment. *Pharmacogenomics Pers. Med.* **10**, 61-68.

Tariba Lovaković, B., Lazarus, M., Brčić Karačonji, I., Jurica, K., Živković Semren, T., Lušić, D., Brajenović, N., Pelaić, Z., Pizent, A. (2018) A Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **45**, 85-92.

Thurston, D.E. (2007) *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. Taylor and Francis Group, Boca Raton.

Tilgmann, C., Ulmanen, I. (1996) Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **684**, 147-161.

The Council of the European Union (2002) <<https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2001/110/oj>>. Pristupljeno 11. listopada 2020.

Thibodeau, P.A., Paquette, B. (1999) DNA damage induced by catecholestrogens in the presence of copper (II): generation of reactive oxygen species and enhancement by NADH. *Free Rad. Biol. Med.* **27**, 1367-1377.

- Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M. (2003) Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* **18**, 187-194.
- Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E. (2001) HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 485-496.
- Tomljanović, M. (2000) Instrumentalne kemijske metode I dio. U. G. Hijatus, Zenica, Bosna i Hercegovina.
- Tristantini, D., Amalia, R. (2019) Quercetin concentration and total flavonoid content of anti-atherosclerotic herbs using aluminum chloride colorimetric assay. *AIP Conf. Proc.* 2193.
- Truong, D.H., Nhung, N.T.A., Dao, D.Q. (2020) Iron ions chelation-based antioxidant potential vs. pro-oxidant risk of ferulic acid: A DFT study in aqueous phase. *Comput. Theor. Chem.* **1185**, 112905.
- Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. (2007) Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem. Cent. J.* **1**, 13.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.
- Tsuji, T., Kaneda, N., Kado, K., Yokokura, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D. (1991) CPT-11 converting enzyme from rat serum purification and some properties. *J. Pharmacobiodyn.* **14**, 341-349.
- Tuberoso, C.I.G., Bifulco, E., Caboni, P., Cottiglia, F., Cabras, P., Floris, I. (2010) Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 384-389.
- Tuberoso, C.I.G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D., Pirisi, F.M. (2013) Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of *Cannonau* wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.* **140**, 686-691.
- Ulloa, P.A., Maia, M., Brigas, A.F. (2015) Physicochemical parameters and bioactive compounds of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Chem.* **2015**, 602792.



- Ustunol, Z. (2001) Oligosaccharide composition and content of honey from different floral sources and their influence on growth of intestinal microflora. National Honey Board, Michigan, SAD.
- Verbanac, D. (2010) Med u prehrani i dijetoterapiji, Pliva zdravlje, <<https://www.plivazdravlje.hr/centar/prehrana/namirnica/132/Med.html>>, Pristupljeno 10. listopada 2020.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (2015) The Impact of Food Bioactives on Health *In Vitro* and *Ex Vivo* Models. Springer, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- Voldrich, M., Rajchl, A., Cizkova, H., Cuhra, P. (2009) Detection of foreign enzyme addition into the adulterated honey. *Czech. J. Food Sci.* **27**, S280-S282.
- Vulic, A., Durgo, K., Pleadin, J., Herceg, L., Kopjar, N. (2015) Mutagenicity and DNA-damaging potential of clenbuterol and its metabolite 4-amino-3,5-dichlorobenzoic acid *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **77**, 82-92.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E. (1996) Plant antitumor agents. 1. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3888-3890.
- Wang, T., Gong, X., Jiang, R., Li, H., Du, W., Kuang, G. (2016) Ferulic acid inhibits proliferation and promotes apoptosis via blockage of PI3K/Akt pathway in osteosarcoma cell. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 968-980.
- Wang, J., Qing, X.L. (2011) Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Adv. Food Nutr. Res.* **62**, 89-137.
- White, R., Molan, P., Copper, R. (2005) Honey: A Modern Wound Management Product. Wounds, Aberdeen, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- Woisky, R.G., Salatino, A. (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* **37**, 99-105.
- Won, S.R., Lee, D.C., Ko, S.H., Kim, J.W., Rhee, H.I. (2008) Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Int. Food Res. J.* **41**, 952-956.

- Woo, K.J., Jeong, Y.J., Park, J.W., Kwon, T.K. (2004) Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1215-1222.
- Wu, X., Cao, G., Prior, R.L. (2002) Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J. Nutr.* **132**, 1865-1871.
- Xu, Y., Villalona-Calero, M.A. (2002) Irinotecan: Mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol.* **13**, 1841-1851.
- Yaacob, M., Stanis, A.J., Rajab, N.B., Shahar, S., Sharif, R. (2017) Current knowledge on honey and its derivatives with genomic stability: a mini review. *J. Agric. Sci.* **9**, 145-155.
- Yagoobi, N., Ghayour-Mobarhan, M., Parizadeh, S.M.R., Abasalti, Z., Yaghoobi, Z., Yaghoobi, F., Esmaeili, H., Kazemi-Bajestani, S.M.R., Aghasizadeh, R., Saloom, K.Y., Ferns, G.A.A. (2008) Natural honey and cardiovascular risk factors; Effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body weight compared with sucrose. *Sci. World J.* **8**, 463-469.
- Yamaguchi, T., Matsuzaki, J., Katsuda, T., Saito, Y., Saito, H., Ochiya, T. (2019) Generation of functional human hepatocytes *in vitro*: current status and future prospects. *Inflamm. Regen.* **39**, 13.
- Yang, B., Chen, F., Hua, Y., Huang, S.S., Lin, S., Wen, L., Jiang, Y. (2012) Prooxidant activities of quercetin, *p*-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure-activity relationship. *Food Chem.* **131**, 508-512.
- Yang, B., Chen, F., Wang, G. (2018) Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **103**, 699-707.
- Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W., Oh, K.S. (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* **13**, 998-1002.
- Yang, S.P., Raner, G.M. (2005) Cytochrome P450 expression and activities in human tongue cells and their modulation by green tea extract. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **202**, 140-150.

- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. (2003) Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chem.* **81**, 159-168.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L., Huang, S.L. (2003) Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **6**, 1215-1222.
- Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M., Hsu, C.K. (2009) Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6468-6473.
- You, B.R., Moon, H.J., Han, Y.H., Park, W.H. (2010) Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1334-1340.
- Yu, J., Vasanthan, T., Temelli, F. (2001) Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 4352-4358.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Andreja Jurič rođena je 4. 9. 1987. u Zagrebu. Pohađala je VII. gimnaziju u Zagrebu gdje je maturirala 2006. godine, nakon čega upisuje studij Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U akademskoj godini 2010./2011. dobiva Rektorovu nagradu za rad „Zeleno, zeleno, zeleno: otapala, katalizatori, procesi“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Vorkapić-Furač. Diplomirala je 2013. godine nakon obranjene teme diplomskog rada „Priprava biodizela s ionskim tekućinama“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković i stekla titulu magistre inženjerke bioprocesnog inženjerstva. Godine 2014. zapošljava se u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ u Službi kemijsko-fizikalnih i toksikoloških vještačenja, gdje je, na mjestu vještaka za toksikološka vještačenja, radila do 2015. godine. Od 2017. godine zaposlena je na mjestu asistenta u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Poslijediplomski doktorski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam upisala je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017. Godine 2020. prijavila je i uspješno obranila temu doktorskoga rada uz mentorstvo doc. dr. sc. Irene Brčić Karačonji i prof. dr. sc. Ksenije Durgo.

Prvi je autor ili ravnopravni koautor 11 izvornih znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u bazi Web of Science Core Collection/Current Contents i prvi autor ili ravnopravni koautor 12 sažetaka priopćenja kongresa održanih u Hrvatskoj i inozemstvu. Svoje znanje na području toksikologije usavršavala je na tečajevima „HPLC fundamentals – theory and practice“ u Zagrebu, „Comet Workshop – Basic comet assay techniques“ u Sarajevu, BiH, i „EUROTOX course – Regulatory toxicology“ u Otočecu, Slovenija te na studijskom boravaku u laboratoriju Department of Agriculture, Food and Marine, Backweston Laboratory Complex, Celbridge, Irska (16. 4. – 16. 6. 2021.).

Dobitnica je stipendije EUROTOX-a i COST-a te stipendije Hrvatskog toksikološkog društva za poticanje rada mladih znanstvenika. Aktivno sudjeluje na području popularizacije znanosti te je član radne skupine „Sustav ranog upozoravanja u slučaju pojave novih psihoaktivnih tvari u Republici Hrvatskoj“ i Hrvatskog toksikološkog društva. Član je Organizacijskog odbora znanstvenog skupa CROTOX 2021 te je predstavnik asistenata i poslijedoktoranada u Znanstvenom vijeću Instituta.

## Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja autora

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Web of Science Core Collection/Current Contents

**Jurič, A.**, Brčić Karačonji, I., Kopjar, N. (2021) Homogentisic acid, a main phenolic constituent of strawberry tree honey, protects human peripheral blood lymphocytes against irinotecan-induced cytogenetic damage *in vitro*. *Chem. Biol. Interact* **349**, 109672.

Jagić, K., Dvorščak, M., **Jurič, A.**, Safner, T., Klinčić, D. (2021) Optimization and validation of two-step method for determination of polybrominated diphenyl ethers in Croatian house dust samples. *Anal. Methods* **13**, 3504-3510.

Lazarus, M., Tariba Lovaković, B., Orct, T., Sekovanić, A., Bilandžić, N., Đokić, M., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., **Jurič, A.**, Denžić Lugomer, M., Bubalo, D. (2021) Difference in pesticides, trace metal(loid)s and drug residues between certified organic and conventional honeys from Croatia. *Chemosphere* **266**, 128954.

Jagić, K., Dvorščak, M., **Jurič, A.**, Safner, T., Klinčić, D. (2021) Preliminary results on polybrominated diphenyl ether contamination status in Croatian households and insights into children's exposure. *Environ. Toxicol. Phar.* **84**, 103603.

Lazarus, M., Tariba Lovaković, B., Sekovanić, A., Orct, T., **Jurič, A.**, Prđun, S., Denžić Lugomer, M., Bubalo, D. (2021) Combined approach to studying authenticity markers following spatial, temporal and production practice trends in honey from Croatia. *Eur. Food Res. Technol.* **247**, 1511-1523.

Pizent, A., Lazarus, M., Kovačić, J., Tariba Lovaković, B., Brčić Karačonji, I., Živković Semren, T., Sekovanić, A., Orct, T., Branović-Čakanić, K., Brajenović, N., **Jurič, A.**, Miškulin, I., Škrgatić, I., Stasenko, S., Mioč, T., Jurasović, J., Piasek, M. (2020) Cigarette smoking during pregnancy: Effects on antioxidant enzymes, metallothionein and trace elements in mother-newborn pairs. *Biomolecules* **10**, 892.

**Jurič, A.**, Gašić, U., Brčić Karačonji, I., Jurica, K., Milojković Opsenica, D. (2020) The phenolic profile of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Serb. Chem. Soc.* **85**, 1011-1019.

Prester, Lj., Mikolić, A., **Jurič, A.**, Fuchs, N., Neuberg, M., Lucić Vrdoljak, A., Brčić Karačonji, I. (2018) Effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on irinotecan-induced clinical effects in rats. *Chem. Biol. Interact.* **294**, 128-134.

Brajenović, N., Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.** (2018) Levels of polychlorinated biphenyls in human milk samples in European countries. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69**, 135-153.

Lucić Vrdoljak, A., Fuchs, N., Mikolić, A., Žunec, S., Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.**, Prester, Lj., Micek, V., Neuberg, M., Čanović, S., Mršić, G., Kopjar, N. (2018) Irinotecan and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: a preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. *Molecules*, **23**, 1332.

**Jurič, A.**, Fijačko, A., Bakulić, L., Orešić, T. Gmajnički, I. (2018) Evaluation of breath alcohol analysers by comparison of breath and blood alcohol concentrations. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69**, 69-75.

*Stručno-popularni rad*

Brčić Karačonji, I., Brajenović, N., **Jurič, A.** (2017) Kosa kao dokaz. *Priroda* **7-8**, 8-10.

*Sažeci u knjigama sažetaka*

**Jurič, A.**, Gašić, U., Huđek, A., Milojković-Opsenica, D., Lušić, D., Durgo, K., Kopjar, N., Brčić Karačonji, I. (2021) *In vitro* assessment of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. Conference Book of the 20<sup>th</sup> International Virtual Congress of the International Society of Ethnopharmacology, Solun, Grčka, 184.

Huđek, A., Joukhadar, L., **Jurič, A.**, Bačun-Družina, V., Kopjar, N., Durgo, K. (2019) Genotoxic effect of irinotecan on human liver and colon tumor cells. Book of Abstracts of the 1<sup>st</sup> Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 90.

**Jurič, A.**, Brčić Karačonji, I., Žunec, S., Mikolić A., Kopjar, N. (2019) Cito/genoprotektivni i antioksidacijski učinci meda obične planike na oštećenja ljudskih limfocita izazvana UVB zračenjem u uvjetima *in vitro*. Zbornik radova 12. simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Varaždin, Hrvatska, 121-126.

**Jurič, A.**, Fuchs, N., Brčić Karačonji, I., Lucić Vrdoljak, A., Micek, V., Kopjar, N. (2019) Application of the alkaline comet assay to assess DNA instability in different cell types of Wistar rats exposed to irinotecan. The International Comet Assay Workshops. Pushchino, Rusija.

Prester, Lj., Mikolić, A., **Jurič, A.**, Fuchs, N., Neuberg, M., Lucić Vrdoljak, A., Brčić Karačonji, I. (2018) Irinotecan-induced leucopenia in rats: effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol co-treatment. Book of Abstracts of the Frontiers in Immunology Research – 2018 International Conference, Lugano, Švicarska, 45.

**Jurič, A.**, Gašić, U., Brčić Karačonji, I., Jurica, K., Milojković Opsenica, D. (2018) Phenolic “fingerprint” of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. Programme & Book of Abstracts of the UNIFood Conference, Beograd, Srbija, 238.

Lucić Vrdoljak, A., Fuchs, N., Mikolić, A., Žunec, S., Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.**, Micek, V., Fuchs, R., Kopjar, N. (2018) Combined toxic effects of irinotecan and delta-9-tetrahydrocannabinol in rat liver: an introductory study using DNA integrity and oxidative stress markers. Proceedings of 18<sup>th</sup> Annual Pharmaceutical and Chemical Analysis Congress, Madrid, Španjolska, 58.

Fuchs, N., Lucić Vrdoljak, A., Kukin, D., Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.**, Micek, V., Kopjar, N. (2018) Assessment of the DNA damaging effects of irinotecan and delta-9-tetrahydrocannabinol in Wistar rat brain cells: A pilot study. Proceedings of 18<sup>th</sup> Annual Pharmaceutical and Chemical Analysis Congress, Madrid, Španjolska, 51.

Živković Semren, T., Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.**, Brajenović, N., Tariba Lovaković, B., Pizent A. (2018) Tools for the identification of unknown compounds after gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) analysis of urinary volatile organic metabolites (VOMs). Book of Abstracts of the 10<sup>th</sup> Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) & 12<sup>th</sup> Congress of the Serbian Society of Toxicology (12<sup>th</sup> SCT), Beograd, Srbija, 94-94.

**Jurič, A.**, Mladinić, M., Želježić, D., Pezer, M., Turkalj, M., Jurica, K., Kopjar, N., Brčić Karačonji, I. (2018) Human intervention trial with strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Impact on DNA stability and haematological parameters. Book of Abstracts of the 10<sup>th</sup> Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) & 12<sup>th</sup> Congress of the Serbian Society of Toxicology (12<sup>th</sup> SCT), Beograd, Srbija, 112.

Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.**, Brajenović, N. (2018) Drugs of abuse: Trends in Croatia. Book of Abstracts of the 10<sup>th</sup> Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) & 12<sup>th</sup> Congress of the Serbian Society of Toxicology (12<sup>th</sup> SCT), Beograd, Srbija, 40.

Brčić Karačonji, I., **Jurič, A.**, Brajenović, N., Klinčić, D., Herceg Romanić, S., Matek Sarić, M. (2017) Optimisation of headspace solid phase microextraction for the analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk samples, Book of Abstracts of the 53<sup>rd</sup> of Congress of the European Societies of Toxicology, Bratislava, Slovačka, 293.