

Biološki učinak nitrofurantoina i hidrokinona na stanične linije jetre (HEP-G2) i mokraćnog mjehura (T24)

Gagić, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:492650>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad, 2022.

Antonio Gagić

**BIOLOŠKI UČINAK
NITROFURANTOINA I
HIDROKINONA NA STANIČNE
LINIJE JETRE (Hep-G2) I
MOKRAĆNOG MJEHURA (T24)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo te uz pomoć Ane Huđek Turković, mag. ing. biotechn. i u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti – BICRO BIOCentar d.o.o. pod komentorstvom i stručnim vodstvom dr. sc. Ane Butorac, više znanstvene suradnice.

ZAHVALA

Hvala prof. dr. sc. Kseniji Durgo na susretljivosti, mentorstvu, strpljivosti i omogućavanju ugodnog radnog ambijenta. Hvala mag. ing. Ani Huđek Turković na predanosti, savjetima i vremenu uloženom u ostvarenje ovog diplomskog rada kroz edukaciju o efikasnijim pristupima za postizanje boljih eksperimentalnih rezultata. Veliko hvala dr. sc. Ani Butorac na stručnosti i mentorstvu tijekom svih provedenih postupaka te ponajviše na dodatnoj motivaciji stečenoj radom u predivnom ambijentu.

Hvala članovima moje obitelji zbog čijih sam razgovora, savjeta, molitve, neiscrpne strpljivosti i vjere kroz čitavo studiranje bio nošen i ohrabren da ostvarim željene ciljeve neovisno o tome koliko su životne okolnosti bile teške ili lagane. Posebno hvala mojem pokojnome bratu Juri, koji nas je napustio tijekom moje treće godine studija, a čija me je borba i snaga u tim najtežim trenucima, te njegova predanost Bogu i ljubav prema životu dok je bio s nama, naučila neizmjereno.

Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama, koji su zadnjih pet godina studiranja učinili divnom pričom kroz mnogobrojna zajednička druženja koja su stvorila čitavu zbirku sjećanja vrijednih prisjećanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOLOŠKI UČINAK NITROFURANTOINA I HIDROKINONA NA STANIČNE LINIJE JETRE
(HEP-G2) I MOKRAČNOG MJEHURA (T24)

Antonio Gagić, univ. bacc. ing. biotechn., 6039178

Sažetak: Infekcije urinarnog trakta su čest zdravstveni problem koji pogađa veliki broj ljudi, a najčešće su uzrokovane djelovanjem bakterija. Učestalom pojavom bakterijske rezistencije na antibiotike, naglašava se važnost pronalaska novih baktericidnih spojeva ili spojeva koji mogu poboljšati djelovanje antibiotika paralelnom terapijom. U ovom radu je ispitan citotoksični i oksidativni učinak antibiotika nitrofurantoina na stanice hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), hidrokinona-spoja iz biljnog izvora tenjihove smjese na stanice karcinoma mokraćnog mjehura (T24) u tretmanu bez oporavka i s 24-satnim oporavkom stanica. Također, istražen je i utjecaj nitrofurantoina i hidrokinona na promjene u proteomu T24 stanica tijekom tretmana od 8 h kao prosječnog vremena spavanja pa time i direktne izloženosti ispitivanim terapeutima. U ovom radu dokazan je antioksidativni učinak istovremenog tretmana T24 stanica nitrofurantoinom i hidrokinonom, a proteomskom analizom dokazan je njihov utjecaj na biosintezu nezasićenih masnih kiselina, održavanje stanične homeostaze te regulaciju polimerizacije i depolimerizacije aktina. Samostalno djelovanje nitrofurantoina utjecalo je na održavanje homeostaze proteina, transkripciju i vezikularni transport u T24 stanicama.

Glavne riječi: *nitrofurantoin, hidrokinon, citotoksičnost, oksidacijski učinak, proteom*

Rad sadrži: 63 stranice, 8 slika, 8 tablica, 90 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Komentor: dr. sc. Ana Butorac, viši znanstveni suradnik, Centralni laboratorij Inkubacijskog centra za bio-znanosti – BICRO BIOCentar d.o.o.

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. dr. sc. Ana Butorac, viši znanstveni suradnik (komentor, BIOCENTAR)
4. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

Datum obrane: 2. studenog 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOLOGICAL EFFECT OF NITROFURANTOIN AND HYDROQUINONE ON LIVER (HEP-G2)
AND BLADDER CELL LINES (T24)

Antonio Gagić, univ. bacc.ing. biotechn., 6039178

Abstract: Urinary tract infections are a common health problem that affects a large number of people, and are most often caused by bacteria. The frequent appearance of bacterial resistance to antibiotics emphasizes the importance of finding new bactericidal compounds or compounds that can improve the effect of antibiotics with parallel therapy. In this work, the cytotoxic and oxidative effect of the antibiotic nitrofurantoin, naturally occurring compound hydroquinone and the mixture of these two compounds were investigated. As biological test system hepatocellular liver cancer cells (HepG2), bladder cancer cells (T24) were used and treated without and with 24-hour cell recovery, respectively. Also, the influence of nitrofurantoin and hydroquinone on changes in the proteome of T24 cells during treatment of 8 h as an average sleep time was determined. The antioxidant effect of the simultaneous treatment of T24 cells with nitrofurantoin and hydroquinone was proven, and their influence on the biosynthesis of unsaturated fatty acids, the maintenance of cellular homeostasis, and the regulation of polymerization and depolymerization of actin was proven by proteomic analysis. The independent action of nitrofurantoin affected the maintenance of protein homeostasis, transcription and vesicular transport in T24 cells.

Keywords: *nitrofurantoin, hydroquinone, cytotoxicity, oxidative effect, proteome*

Thesis contains: 63 pages, 8 figures, 8 tables, 90 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ksenija Durgo, PhD, Full professor

Co-mentor: Ana Butorac, PhD, senior research associate, Central Laboratory of the Incubation Center for bio – sciences – BICRO BIOCentar d.o.o.

Technical support and assistance: Ana Huđek Turković, mag.ing.biotechn., assistant

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (mentor)
3. Ana Butorac, PhD, senior research associate (Co-mentor, BIOCENTAR)
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD (substitute)

Thesis defended: November 2nd, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO:	2
2.1. URINARNE INFEKCIJE	2
2.2. LIJEČENJE URINARNIH INFEKCIJA	3
2.2.1. Antibiotici	3
2.2.2. Spojevi biljnog porijekla	3
2.3. METABOLIZAM ARBUTINA	4
2.4. HIDROKINON	5
2.5. NITROFURANTOIN	6
2.5.1. Mehanizam djelovanja nitrofurantoina	7
2.5.2. Citotoksičnost nitrofurantoina	7
2.5.3. Utjecaj nitrofurantoina u ovisnosti o pH vrijednosti	8
2.6. SINERGISTIČKI UČINAK NITROFURANTOINA I HIDROKINONA	9
2.7. REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE I P450 SUSTAV	11
2.8. PROTEOMIKA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Biološki test sustav	14
3.1.2. Nitrofurantoin	14
3.1.3. Hidrokinon	15
3.1.4. Laboratorijski uređaji	17
3.1.5. Laboratorijski pribor	18
3.1.6. Kemikalije	19
3.1.7. Otopine	20
3.2. METODE	22
3.2.1. Uzgoj stanica	22

3.2.2. Priprema i utvrđivanje koncentracije suspenzije stanica	22
3.2.3. Priprema stanica za određivanje citotoksičnog i oksidacijskog učinka	23
3.2.4. Određivanje citotoksičnosti nitrofurantoina i hidrokinona na stanične linije T24 i Hep-G2 metodom Neutral red	23
3.2.5. Određivanje oksidacijskog učinka nitrofurantoina na stanične linije Hep-G2 i T24 te hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom DCFH-DA	24
3.2.6. Uzgoj T24 stanica za proteinsku analizu	24
3.2.7. Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu	25
3.2.8. Analiza proteina tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa	26
3.2.9. Identifikacija i relativna kvantifikacija proteina	27
3.2.10. Statistička obrada podataka.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. CITOTOKSIČNI I OKSIDACIJSKI UČINAK HIDROKINONA I NITROFURANTOINA	29
4.2. UČINAK HIDROKINONA I NITROFURANTOINA NA PROTEOM STANICA ..	37
4.2.1 Promjene u proteomu nakon tretmana hidrokinonom	37
4.2.2 Promjene u proteomu stanica nakon tretmana nitrofurantoinom.....	42
4.2.3 Promjene u proteomu stanica nakon kombiniranog tretmana nitrofurantoina i hidrokinona	45
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURA:.....	53

1. UVOD

U novije vrijeme uporaba antibiotika u širokom spektru ljudskih djelatnosti je u ekspanzionalnom porastu, što posljedično dovodi do duljih vremenskih intervala izloženosti patogenih bakterija antibioticima i porasta udjela patogenih bakterija sa stečenom antibiotskom rezistencijom. Dakle, zapaža se sve veći broj bakterija otpornih na djelovanje antibiotika što predstavlja izrazit izazov u pronalaženju alternativnih pristupa u sprječavanju i liječenju sve rasprostranjenijih infekcija uzrokovanih patogenim bakterijama. Traženje rješenja za sprječavanje porasta antibiotske rezistencije svoj cilj često pronalazi u paralelnoj terapiji antibiotika i biljnih ekstrakata, zbog dokazanog antibakterijskog i antiseptičnog učinka mnogobrojnih spojeva biljnog podrijetla (Stefanović, 2018). Naime, antibakterijski učinak biljnih tvari potencijalno može smanjiti potrebnu količinu antibiotika korištenog tijekom terapije, zbog svog direktnog ili indirektnog utjecaja na ciljane bakterijske uzročnike infekcija. Zanimljiva je i pojava da biljni spojevi tijekom paralelne terapije mogu umanjiti oksidativnu štetu, odnosno udio reaktivnih kisikovih vrsta, nastalih u stanicama domaćina djelovanjem antibiotika. Urinarne infekcije predstavljaju područje od velike važnosti te zahtijevaju daljnja istraživanja s ciljem pronalaska optimalnih terapija za njihovo suzbijanje (Stamm i Norrby, 2001). U ovom radu ispitivan je učinak spoja biljnog podrijetla hidrokinona, antibiotika nitrofurantoina te njihov zajednički učinak tijekom istovremene primjene na stanicama mokraćnog mjehura T24 stanične linije. Također, promatran je i učinak nitrofurantoina na stanice jetre Hep-G2, tijekom različitih vremenskih perioda, sa i bez 24 satnog oporavka, za praćenje naknadnih staničnih promjena. Ispitana je i povezanost tretmana T24 stanica nitrofurantoinom i hidrokinonom s promjenama na razini ekspresije proteina unutar stanica. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati oksidacijski i citotoksični učinak nitrofurantoina, hidrokinona i njihove zajedničke primjene; te pronalazak promjena proteomskog profila s ciljem stjecanja novih saznanja i objašnjenja dobivenih rezultata na staničnoj razini.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. URINARNE INFEKCIJE

Urinarne infekcije su rezultat djelovanja patogenih bakterija u urinarnom traktu i najučestaliji su upalni procesi, a pogađaju oko 150 milijuna ljudi godišnje diljem svijeta (Stamm i Norrby, 2001). Najučestaliji uzročnih urinarnih infekcija je bakterija *Escherichia coli* što ju čini fokalnom točkom u istraživanjima antibakterijskih tvari koje bi mogle suzbiti njeno razmnožavanje u urinarnom traktu. Patogena bakterija *E. coli* posjeduje adhezine, molekule koje su kompatibilne s receptorima stanica koje izgrađuju epitel mokraćnog mjehura. Ulazak patogena unutar epitela mokraćnog mjehura pruža mogućnost bakterijama da formiraju strukturu biofilma koji im omogućava rast u širokom spektru nepovoljnih uvjeta. Posljedično tome, rastom broja bakterija, dolazi do porasta koncentracije bakterijskih toksina te do destruktivnog učinka na stanice domaćina što može dovesti čak i do ulaska bakterija u krvotok. Urinarne infekcije se klinički dijele na: kompleksne i nekompleksne. Kompleksne urinarne infekcije su povezane sa zadržavanjem ili opstrukcijom urina, zatajenjem ili transplantacijom bubrega, imunodeficijencijom ili trudnoćom. Nekompleksne urinarne infekcije su okarakterizirane nepostojanjem tkivnih ili strukturnih oštećenja u urinarnom traktu inače zdravog pacijenta, a mogu se podijeliti na cistitis i pijelonefritis (Gray i Robinson, 2010). Cistitis je infekcija mokraćnog mjehura koju karakterizira učestalo mokrenje, pojava krvi u urinu te bol tijekom mokrenja, dok je pijelonefritis za razliku od cistitisa, bubrežna infekcija koju uz sve dosad spomenute simptome karakterizira i temperatura, mučnina, povraćanje i bolovi (Flores-Mireles i sur., 2015).

Problem kod urinarnih infekcija je njihovo učestalo ponavljanje kod velikog broja pacijenata, pri čemu se kao rješenje pripisuju dugotrajne terapije antibiotika. S druge strane, dugotrajno uzimanje antibiotika može dovesti do ozbiljnijih problema, pri čemu se antibioticima dugoročno izloženi patogeni prilagođavaju i razvijaju rezistentnost (Neu, 1992).

2.2. LIJEČENJE URINARNIH INFEKCIJA

2.2.1. Antibiotici

S ciljem suzbijanja akutnih urinarnih infekcija, pacijentima se već nekoliko desetljeća pripisuje antibiotska terapija, no zbog sve učestalije pojave antibiotske rezistencije izražene u bakterije *E. coli*, istraživanja alternativnih kemijskih spojeva sa mogućnošću suzbijanja rasta i razvoja uzročnika urinarnih infekcija su i danas aktualna (Gupta i sur., 2001). Za spojeve za koje se utvrdi da imaju potencijalni antibiotski i bakteriostatski učinak, mora se utvrditi farmakokinetički učinak, spektar inhibicije različitih uzročnika, minimalne inhibitorne koncentracije, potrebne duljine terapije te potencijalne nuspojave nastale primjenom takvih spojeva. Beta laktamski antibiotici koriste se u slučaju infekcija uzrokovanih Gram pozitivnim bakterijama, no u provedenim istraživanjima pokazana je antibiotska rezistencija na amoksicilin kod 33 % bakterijskih uzročnika cistitisa i pijelonefritisa. U suzbijanju urinarnih infekcija, koriste se i cefalosporini. Na predstavnike cefalosporina, poput cefaleksina i cefiksima, uočen je postepen razvoj antibiotske rezistencije, no i dalje se koriste zbog mogućnosti njihove primjene u trudnoći. Nitrofurantoin se koristi za tretiranje urinarnih infekcija još od pedesetih godina dvadesetog stoljeća, a karakterizira ga niska stopa rezistencije uropatogena te bakteriostatske efikasnosti. Tijekom korištenja nitrofurantoina, nužan je oprez zbog pokazane toksičnosti na jetru i pluća, kod viših doza i produljenog perioda uzimanja (Hooton i sur., 1997).

2.2.2. Spojevi biljnog porijekla

Biljke proizvode čitav niz tvari, koje nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma, u svrhu prilagodbe i prevladavanja nepovoljnih abiotičkih i biotičkih okolišnih čimbenika. Sekundarni metaboliti pritom mogu djelovati kao odgovor na patogene mikroorganizme, inhibirajući njihov rast i razvoj, a dijele se na: fenolne spojeve, terpene i alkaloide. Među spojevima korištenima za liječenje infekcija lokaliziranih u mokraćnom sustavu, često se primjenjuju i različiti biljni ekstrakti. Antimikrobna i antiseptična svojstva određenih biljaka ispoljavaju se na način da ili sprečavaju vezanje patogena za epitel mokraćnog mjehura ili utječu na smanjenje broja patogena urinarnog trakta. Na primjer, biljna vrsta *Vaccinium macrocarpon* (brusnica) inhibira adheziju bakterija na mukoznu barijeru čime smanjuje broj vezanih bakterija i utječe na njihovu

diobu (Lynch, 2004). Također, biljke poput *Arctostaphylos uva ursi* i *Chimaphila umbellata* sadrže spoj arbutin, čijim metabolizmom nastaje hidrokinon, koji djeluje antibakterijski i antiseptično.

Biljka *A. uva-ursi*, poznata je još i pod nazivom medvjetka je samonikli grm iz roda *Arctostaphylos*. Ova ljekovita biljka raste u Aziji, Europi i Sjevernoj Americi (Naczk i sur., 2011). Tijekom posljednjih godina mnoga su istraživanja pokazala da ekstrakt biljke *Arctostaphylos uva-ursi* posjeduje izvanredna antioksidativna, antimikrobna i protuupalna svojstva, a poseban značaj biljke medvjetke je u liječenju urinarnih infekcija. Često se antioksidativni učinak listova medvjetke pripisuje arbutinu, (hidrokinon β -D-glukopiranozidu) koji je prirodno prisutan u medvjetci, dudu, brusnici, kruškama i pšenici (Carmen i sur., 2009). Song i sur. (2021) istraživali su sastavne dijelove lišća medvjetke te su identificirali 88 fenolnih komponenata, među kojima je bilo 14 derivata arbutina, 26 flavonola, 6 flavanola, 33 različita tanina i 9 preostalih spojeva. Kao najzastupljenije komponente lišća medvjetke utvrđeni su galotanini i glikozidi kvercetina. Arbutin kao najzastupljeniji spoj u lišću medvjetke se pokazao kao najvažniji nositelj antioksidativnog i antibakterijskog učinka među spojevima izoliranim i analiziranim iz lišća medvjetke, te je također dokazano da dovodi do inhibicije biosinteze pigmenta melanina. Mehanizam djelovanja arbutina u ovom slučaju vezan je za inhibiciju enzima tirozinaze koje koriste tirozin kao supstrat u procesu stvaranja melanina. Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta listova medvjetke osim arbutinu pripisuje se i spojevima kvercetin 3-glukozidu, galnoj kiselini i elaginskoj kiselini.

2.3. METABOLIZAM ARBUTINA

Nakon ulaska u jetru, glikozidna veza u strukturi arbutina se hidrolizira te kao produkti hidrolize nastaju glukoza i aglikon hidrokinon (slika 1) koji se odmah većim dijelom konjugira sa glukuronskom kiselinom, a zanemariva količina preostalog hidrokinona ostaje u slobodnoj formi (de Arriba i sur., 2013).

djelovanjem hidrokinona (Ma i sur., 2019). Mjerenjem električne vodljivosti medija unutar kojeg su uzgajane bakterije, uočena je promjena koncentracije K^+ i Na^+ iona, što je indikator narušenog integriteta bakterijske stanične membrane djelovanjem hidrokinona. Dobiveni rezultati zajedno s povećanjem koncentracije proteina u izvanstaničnom prostoru, potvrđeni su skenirajućom elektronskom mikroskopijom (Ma i sur., 2019). Ispitivanjem učinka hidrokinona na Gram – negativnu bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 741, također je postignut efekt narušenog integriteta i depolarizacije stanične membrane (Jeyanthi i sur., 2021). Prema rezultatima dobivenim u prethodno navedenim istraživanjima, hidrokinon predstavlja potencijalno rješenje za ublažavanje urinarnih infekcija, samostalno ili kroz sinergistički pristup primjene s antibioticima.

2.5. NITROFURANTOIN

Lijekovi temeljeni na nitrofuranskim spojevima čine obitelj heterocikličkih spojeva s dušikom. Nitrofurantoin je antibiotik širokog spektra djelovanja, djelotvoran na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, koji se koristi u svrhu liječenja urinarnih infekcija (Huttner i sur., 2015). Njegovo djelovanje i učinak na bakterijske uzročnike upala istražuje se posljednjih pedesetak godina. Međutim, unatoč svojoj efikasnosti u sprječavanju rasta i razvoja mnogobrojnih bakterija koje mogu nastaniti urinarni trakt važno je napomenuti kako je u slučaju *P. aeruginosa*, kao i kod brojnih vrsta roda *Proteus*, dokazana određena razina rezistencije na nitrofurantoin (Grayson i Whitby, 2010). Kontinuirana uporaba antibiotika mnogim tipovima industrija, u svrhu povećanja produktivnosti i zarade, dovodi do pojave problema izloženosti okoliša visokim koncentracijama antibiotika. Izlaganje sve većeg broja organizama i mikroorganizama antibioticima te povećanje antibiotskih doza, dovodi do eksponencijalnog porasta antibiotske rezistencije i do sve većih problema u pronalasku djelotvornih spojeva protiv uzročnika infekcija i bolesti. Jedan od spojeva čija baktericidna aktivnost i dalje pokazuje značajan učinak je nitrofurantoin (Munoz-Davila, 2014). Nitrofurantoin se nakon oralne primjene brzo apsorbira putem gastrointestinalnog trakta, ali se i vrlo brzo izlučuje iz organizma putem urina, u kojem se nalazi u najvećoj koncentraciji. Brzina apsorpcije ovisi o obliku u kojem se uzima, pri čemu se makrokristalični oblik sporije apsorbira i izlučuje od mikrokristaličnog. Zbog brze gastrointestinalne apsorpcije nitrofurantoin nema značajan citotoksični učinak na autohtone bakterijske kulture koje formiraju intestinalnu mikrofloru (Vervoort i sur., 2015).

2.5.1. Mehanizam djelovanja nitrofurantoina

Unatoč tome što se istražuje posljednjih pedesetak godina, mehanizam djelovanja nitrofurantoina nije potpuno razjašnjen. Antibakterijsko djelovanje nitrofurantoina temelji se na interakciji s više procesa u bakterijskim stanicama; ovaj spoj djeluje na proces izgradnje stanične stijenke, na bakterijske enzime te na metabolizam ugljikohidrata u bakterija. Nitrofurantoin ulazi u interakciju s bakterijskim enzimima nitroreduktazama. Vezanjem nitrofurantoina za aktivno mjesto bakterijskih nitroreduktaza dolazi do razgradnje nitrofurantoina pri čemu može nastati mnoštvo različitih reaktivnih spojeva. Bakterijske stanice enzimima metaboliziraju nitrofurantoin reduciranjem nitro grupe, pri čemu nastaju različiti derivati i naposljetku hidroksilamin. Nastali visoko reaktivni spojevi unutar bakterijske stanice ulaze u interakciju s ribosomima i DNA. Djelujući na DNA, nastali elektrofilni spojevi, uzrokuju nastanak jednolančanih DNA lomova što dovodi do nastanka mutacija. U interakciji s ribosomima dolazi do inhibitornog učinka procesa translacije, pri čemu je sinteza proteina onemogućena te dolazi do stanične smrti bakterija (McOsker i Fitzpatrick, 1994). Utjecaj nitrofurantoina na metabolizam ugljikohidrata temelji se na tome što on ima mogućnost ulaska u Krebsov ciklus odnosno ciklus limunske kiseline (Cunha, 1989).

2.5.2. Citotoksičnost nitrofurantoina

Istraživanjima je dokazan citotoksični i mutageni učinak nitrofurantoina (Sargin i sur., 2012). Ciljni organi u kojima ovaj spoj pokazuje neželjene učinke su jetra i pluća. Povezanost štetnog djelovanja na stanice jetre i pluća s uporabom nitrofurantoina temelji se na povećanoj koncentraciji visoko reaktivnih metabolita nitrofurantoina te povećanoj koncentraciji reaktivnih kisikovih vrsta koji nastaju njegovim metabolizmom. Nuspojave korištenja nitrofurantoina mogu sezati od akutnog hepatitisa do kroničnog aktivnog hepatitisa i kolestaze. Točni uzroci toksičnosti i kumulativne štete koju je nitrofurantoin uzrokovao kod ljudi koji su ga koristili kao terapiju protiv urinarnih infekcija do danas nisu u potpunosti razjašnjeni (Sakaan i sur., 2014). Prema jednoj od teorija glavni razlog štetnog učinka je upravo nitro-reduktivni metabolizam kojeg provode enzimi citosolna ksantin oksidaza te P450 reduktaza. Spomenuti enzimi koriste nitrofurantoin kao supstrat, pri čemu dolazi do njegove redukcije. Redukcijom nitrofurantoina dolazi do nastanka anionskih radikala, koji potom reagiraju sa molekulskim kisikom stvarajući superoksidi i druge slobodne radikale. Nastale visoko reaktivne čestice

moгу dovesti do oksidativnog oštećenja stanica jetre (Minchin i sur., 1985). Sargin i sur. (2012) su dokazali da se nitrofurantoin metabolizira unutar jetre djelovanjem enzima glutathion S reduktaze. Sargin i sur. (2012) također govore o povezanosti hepatotoksičnosti i respiratornih poteškoća kod pacijenata, nakon jedne doze nitrofurantoina. Navodi se kako nitrofurantoin može biti uzročnik toksičnosti jetre i pluća, no kako se nitrofurantoin ne može izolirati kao isključivi uzrok nastalih nuspojava. Nije dokazana povezanost između toksičnosti i primjenjene doze nitrofurantoina, a pri dugotrajnoj primjeni niske doze nitrofurantoina od 100 mg dnevno, tijekom 16 mjeseci dokazan je toksični učinak nitrofurantoina na jetru i pluća (Koulaouzidis i sur., 2007). Oštećenja jetre mogu nastati putem povišenja jetrenih enzima iznad poželjnih vrijednosti, ali i putem aktivacije citotoksičnih T-limfocita, uzrokovane djelovanjem nitrofurantoina i nusprodukata njegovog metabolizma (Kelly i sur., 1998). Kod bilo kakvih oštećenja uzrokovanih terapijom nitrofurantoinom prvenstveno je nužno prekinuti terapiju, no prema potrebi može se pripisati i uzimanje kortikosteroida.

2.5.3. Utjecaj nitrofurantoina u ovisnosti o pH vrijednosti

Utjecaj nitrofurantoina ovisi o mnogobrojnim čimbenicima, od samog bakterijskog soja na čiji se rast i razvoj utječe primjenom nitrofurantoina, korištene doze pa do fizikalno kemijskih čimbenika unutar organizma pacijenta tretiranog nitrofurantoinom. Naime, poznato je kako je unutar ljudskog organizma jedan od vodećih ciljeva održavanje homeostaze, odnosno unutarnjih uvjeta i parametara konstantnima (Hamm i sur., 2015). U slučaju urinarnih infekcija pa tako i primjene antibiotika za iste, presudna je važnost pH vrijednosti urina. Vrijednost pH kod urina može varirati u intervalu od 4,5 do 8,5, pri čemu je najučestalija pojava blage kiselosti urina, pH vrijednosti 6 (Meng i sur., 2016). Yang i sur. (2014) pokazali su pojačano djelovanje i smanjenu minimalnu inhibitornu koncentraciju nitrofurantoina pri $\text{pH} \leq 6$. Fransen i sur. (2016) pratili su utjecaj raspona pH vrijednosti (5,5; 6,5; 7,5; 8,5) tijekom 24 h na bakterijski rast bez prisutnog nitrofurantoina i baktericidno djelovanje nitrofurantoina. U kontrolnoj grupi se, unatoč različitim brzinama rasta, maksimalna postignuta koncentracija bakterijskih stanica pri sve četiri pH vrijednosti pokazala podjednako. Tijekom korištenja nitrofurantoina pri različitim pH vrijednostima, minimalna inhibitorna koncentracija se povećavala porastom pH vrijednosti, odnosno baktericidni utjecaj nitrofurantoina na bakterije *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* smanjivao se u lužnatijim uvjetima. Pri pH vrijednosti od 8,5 samo su najviše koncentracije nitrofurantoina pokazale baktericidni učinak, uz što je dolazilo do ponovnog

razvoja bakterijskih sojeva nakon smanjenja koncentracije antibiotika. Ertan i sur. (1993) navode kako su mogući razlozi pada aktivnosti nitrofurantoina u lužnatim uvjetima smanjena stabilnost nitrofurantoina pri višim pH vrijednostima.

2.6. SINERGISTIČKI UČINAK NITROFURANTOINA I HIDROKINONA

Spojevi biljnog podrijetla uz direktno antimikrobno djelovanje mogu i posredni učinak, pospešujući pritom djelotvornost antibiotika tijekom paralelne terapije. Biljni spojevi često djeluju na patogene bakterije mijenjanjem ili potpunom inhibicijom njihovog mehanizma rezistencije, čineći ih osjetljivijima na učinak antibiotika (Stefanović, 2018). Postizanjem veće osjetljivosti bakterija na antibiotik, minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika i štetan učinak na pacijenta se smanjuju, a efikasnost terapije raste. Dokazano je da biljni ekstrakti onemogućavaju formiranje bakterijskog biofilma, *quorum sensing* i sposobnost adhezije bakterija (Huber i sur., 2003). Hidrokinon narušava integritet stanične stijenke i stanične membrane patogena, što potencijalno može omogućiti nitrofurantoinu olakšano djelovanje i učinak pri nižim koncentracijama.

Djelovanje biljnih spojeva na efikasnost antibiotskih terapija može se, osim kroz smanjenje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika, promatrati i kroz smanjenje štetnog oksidativnog učinka antibiotika. Unatoč tome što točan mehanizam antioksidativnog učinka hidrokinona na terapiju nitrofurantoinom još nije poznat, postoje mnogobrojni dokazi o antioksidativnom učinku biljnih spojeva na antibiotsku terapiju. Letelier i sur. (2017) su proveli eksperiment na izoliranim mikrosomima jetre štakora, sa svrhom utvrđivanja učinka biljnih spojeva na terapiju nitrofurantoinom. Prvotno se analizirao oksidativni stres nastao tretmanom mikrosoma jetre štakora nitrofurantoinom, uz prisutnost kofaktora NADPH za enzime CYP450 sustava. Uz praćenje promjena unutar CYP450 enzimskog sustava, praćene su i promjene aktivnosti glutathion S transferaza, obitelji enzima visoko specifičnih za hidrofobne i elektrofilne supstrate (Masella i Mazza, 2009). Glutathion S transferaze su skupina enzima od izuzetnog antioksidativnog značaja, zbog svog potencijala da smanjuju koncentraciju elektrofilnih metabolita, čime umanjuju oksidativni učinak metaboliziranog spoja. Prilikom izlaganja mikrosoma nitrofurantoinu, pokazalo se kako je aktivnost glutathion S transferaza smanjena, zbog reverzibilnog i ireverzibilnog vezanja elektrofilnih metabolita nastalih metabolizmom nitrofurantoina, na enzime ove skupine. Nitrofurantoin je uzrokovao lipidnu peroksidaciju, što ukazuje na činjenicu da njegovim metabolizmom nastaju metaboliti i/ili

slobodni radikali koji imaju oksidativni učinak na mikrosome jetre štakora.

Letelier i sur. (2017) su u eksperimentu koristili biljne ekstrakte biljnih vrsta: ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), artičoka (*Cynara scolymus*), ehinacea (*Echinacea purpurea*) i bršljan (*Hedera helix*), od kojih je najveći udio polifenola pokazao *R. officinalis*, a najmanji udio polifenola *E. purpurea*. Rezultati su pokazali učinkovitost biljnih spojeva u smanjivanju oksidacije. Smanjenje oksidativnog učinka nitrofurantoina iskazano je kroz smanjenje lipidne peroksidacije uzrokovane metabolizmom nitrofurantoina. Biljni ekstrakt *E. purpurea* nije pokazao značajan učinak, ekstrakt *C. scolymus* je smanjio prooksidativno djelovanje nitrofurantoina za 18 %, dok su biljni ekstrakti *R. officinalis* i *H. helix* pokazali smanjenje oksidativnog učinka od 50 %. Iz dobivenih rezultata antioksidativnog učinka, vidljiva je povezanost između udjela polifenola unutar biljnih ekstrakata i njihovog antioksidacijskog učinka.

2.7. REAKTIVNE KISI KOVE VRSTE I P450 SUSTAV

Enzimski sustav citokrom P450 obuhvaća specifičnu skupinu enzima koja u svom fokusu djelovanja ima konverziju molekulskog kisika u visoko reaktivne kisikove vrste, koje zatim oksidiraju ciljani supstrat. Enzimi citokrom P450 sustava vežu supstrat čiji elektroni zatim reduciraju željezov kation u aktivnom mjestu enzima. Redukcija željezovog kationa omogućuje vezanje molekulskog kisika i formiranje željezovog dioksid kompleksa (de Montellano, 2005). Slijedi vezanje protona na terminalni kisik, što omogućava nastanak željezovog hidroperoksidnog kompleksa. Zbog nastalih promjena dolazi do pucanja veze između dva atoma kisika, pri čemu nastaje feril povezan sa porfirinom, radikalnim kationom. U završnom koraku dolazi do oksidacije supstrata pomoću reaktivnih kisikovih vrsta te u konačnici do disocijacije produkta (oksidiranog supstrata) i povratka enzima u izvorno stanje. Za potpunu oksidaciju supstrata, enzimu P450 je potrebna prisutnost molekulskog kisika i dva elektrona čiji je donor kofaktor NADPH.

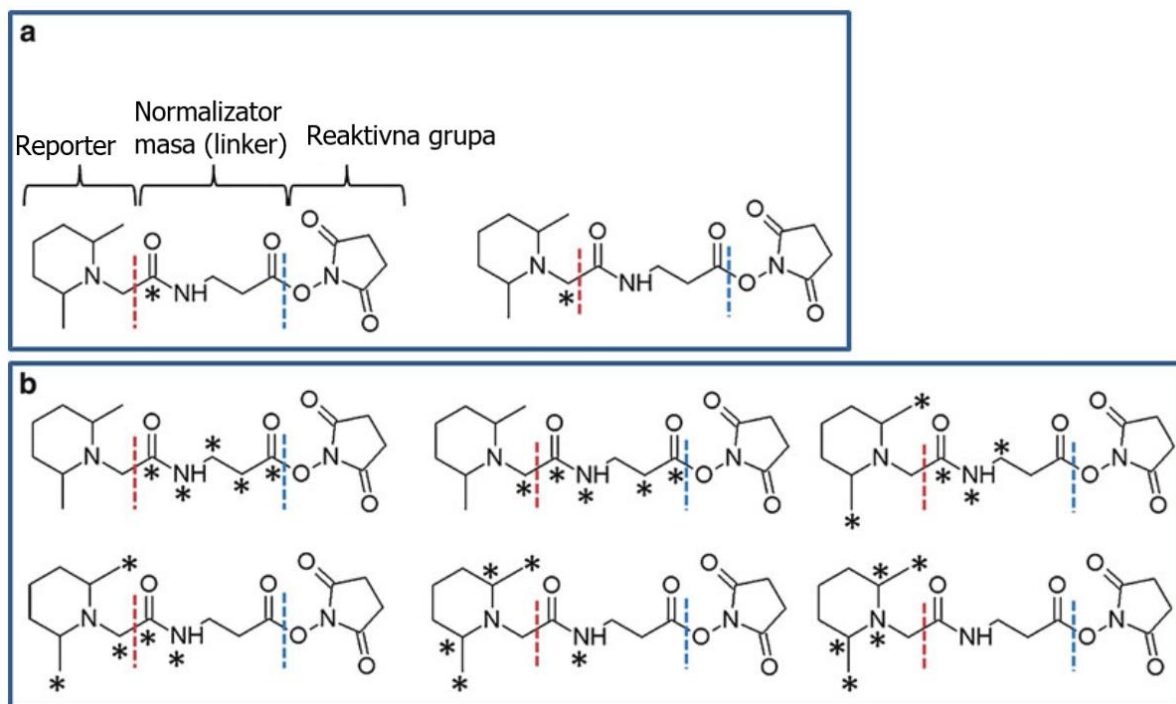
U stanica sisavaca, postoji veći broj reduktaza koje reduciraju nitrofurantoin, a prisustvo i aktivnost reduktaza će u ljudi izazvati različite učinke nitrofurantoina, od onih bez neželjenih nuspojava do porasta koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta, uzrokovanog nastankom slobodnih radikala tijekom metabolizma nitrofurantoina. P450 reduktaza stvara derivat nitrofurantoina koji može reagirati s kisikom i stvoriti superoksidni anion (Zenser i sur., 1981). Nitrofurantoin uzrokuje oksidacijski stres nitroredukcijom koju kataliziraju različite reduktaze, a kao rezultat se stvaraju negativno nabijeni nitro radikali. Nitrofurantoin se redukcijom prevodi u derivate koji zatim mogu formirati superoksidne anione, u reakciji s molekulama kisika. Također unutar organizma, nitrofurantoin u nizu reakcija može biti reduciran na amine i hidroksilamine. U cilju smanjivanja štetnog utjecaja nitrofurantoina, ponekad se koriste biljni terapeutici bogati antioksidacijskim spojevima kao paralelna terapija čime bi se trebao smanjiti oksidacijski učinak nitrofurantoina bez smanjivanja njegovog antimikrobnog učinka (Tache i sur., 2022).

2.8. PROTEOMIKA

Proteomika je interdisciplinarna znanost koja se bavi proučavanjem i usporedbom funkcije i strukture proteina te njihovom kvalitativnom i kvantitativnom analizom unutar zadanih uzoraka čime omogućava stjecanje spoznaja o interakcijama, djelovanju i ekspresiji proteina unutar stanice u datom trenutku, ovisno o različitim uvjetima i čimbenicima. Proteomika se dijeli na ekspresijsku, strukturalnu i funkcionalnu proteomiku (Hanash, 2003). Ekspresijska proteomika kvantitativno i kvalitativno analizira proteine unutar određene stanice ili tkiva, te uspoređuje dobivene rezultate s proteomom stanica ili tkiva koji su podvrgnuti drugačijim uvjetima ili stanjima (Banks i sur., 2000). Strukturna proteomika temelji se na istraživanju proteina kristalografskim metodama i nuklearnom magnetskom rezonancijom, što donosi spoznaju o strukturi proteina i povezanosti strukture i funkcije proteina (Yee i sur., 2009). Funkcionalna proteomika proučava prvenstveno funkciju, mehanizme i interakciju proteina te služi otkrivanju uloge datog proteina u njegovom unutarstaničnom okruženju.

Tijekom posljednjeg desetljeća razvijene su i uvedene metode relativne kvantifikacije proteina, označavanjem višestrukih uzoraka, pri čemu se svaki različito tretirani uzorak označava sebi karakterističnom oznakom. Među kvantitativne metode ubrajaju se iTRAQ, kojim se uzorci označavaju tagovima sa specifičnim masenim reporterima, ICAT koji se služi obilježavanjem ciljanih proteina te SILAC koji se koristi za označavanje unutar staničnih kultura pomoću stabilnih izotopa. iTRAQ je metoda koja se koristi izobaričnim oznakama za relativnu i apsolutnu kvantifikaciju, a temelji se na vezanju specifičnih oznaka na tretirane proteine. Prilikom iTRAQ metode, nakon obrade uzoraka te digestije proteina, dolazi do interakcije peptid vezujuće domene s fragmentima proteina određenog uzorka. iTRAQ oznake također posjeduju linker te reporter mase, koji je različit za svaki različito tretirani uzorak. Srodno iTRAQ metodi, TMT (engl. *Tandem Mass Tag*) označavanje se temelji na istom principu (Lynn Zieske, 2006). Kod TMT označavanja također postoje tri segmenta koja čine oznaku, a to su grupa koja se veže na peptide, linker koji ima ulogu normalizatora masa te reporter masa (slika 2). Normalizator masa zajedno s reporterom masa ima konstantnu ukupnu masu, kod svih uzoraka. Naime, povećanjem mase reportera, linker ima manju masu, kako bi zbroj masa bio jednak kod svih izobaričnih oznaka. Svaka oznaka sadrži jednak broj ugljikovih ili dušikovih izotopa, no njihov raspored u strukturi oznake razlikuje se ovisno o tipu oznake. Tijekom analize u spektrometru masa, dolazi do cijepanja veze između *spacera* i reportera mase, pri

čemu se reporteri mase kvantificiraju i shodno tome dobivaju informaciju o nivou ekspresije proteina analiziranog uzorka.



Slika 2. Struktura tandem mass oznake (TMT): a) 2-pleksni TMT, b) 6-pleksni TMT (prema Dayon i Sanchez, 2012)

Spektrometrija masa jedna je od ključnih metoda koja omogućava analizu proteomike kroz kvalitativnu i kvantitativnu analizu proteina. Spektrometrija masa omogućava određivanje molekularne mase proteina, ali i njihovo sekvencioniranje (Martin i Nelson, 2001). Temelj ove metode je u ioniziranju proteina, koje se može provesti metodom MALDI (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) ili ESI (engl. *electrospray ionisation*), pri čemu se masa proteina dobiva iz omjera mase i naboja. MALDI je metoda ionizacije u kojoj se analit miješa s matricom, koji pospješuje ionizaciju prijenosom protona na analit. Nastali ioni se zatim analiziraju analizatorom masa. Kod ESI ionizacije, analit se pod utjecajem visokog napona pretvara u nabijene, raspršene kapljice iz kojih se potom oslobađaju ionizirane čestice koje se analiziraju. Prema primjeni, spektrometrija masa pri analizi proteina dijeli se na dvije vrste analitičkih pristupa: ciljanu analizu proteina, čija svrha je određivanje udjela ciljanog proteina u nekom uzorku; te neciljanu analizu koja daje odgovor o tome koji proteini čine sastav analiziranog uzorka (Krishnankutty i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Unutar ovog poglavlja sadržani su materijali korišteni u svrhu ispitivanja učinka nitrofurantoina na Hep-G2 stanice, zasebnog i sinergističkog učinka nitrofurantoina i hidrokinona na T24 stanice, te njihovog utjecaja na promjene ekspresijskog profila proteina.

3.1.1. Biološki test sustav

Stanice korištene prilikom provođenja eksperimentalnog rada su tumorske stanice epitela mokraćnog mjehura čovjeka, T24 i stanice hepatocelularnog karcinoma čovjeka, HepG2. Stanična linija HepG2, izolirana je iz tumorskog tkiva jetre petnaestogodišnjeg pacijenta, izoliranog od strane Barbare Knowles i njenih suradnika 1979. godine, a danas pripada ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) repozitoriju (Knowles i sur., 1980). Stanična linija T24, izolirana je 1970. godine iz karcinoma mokraćnog mjehura trećeg stupnja ženske osobe u dobi od 82 godine (Bubenik i sur., 1973).

Stanice su uzgojene i tretirane u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Stanice su uzgajane u tekućem mediju, pri čemu je korištena 10 %-tna otopina fetalnog goveđeg seruma u RPMI 1640 mediju. Stanične kulture uzgajane su u monosloju do konfluentnosti, unutar T-boca, pri temperaturi od 37 °C, uz prisutnost 5 % CO₂.

3.1.2. Nitrofurantoin

Ishodišna otopina dobivena je otapanjem nitrofurantoina u dimetil sulfoksidu (DMSO) iz koje su pripremljene otopine nitrofurantoina koje odgovaraju profilaktičkoj dozi i dvjema terapijskim dozama preračunate na volumen mokraćnog mjehura čovjeka od 300 mL. Nadalje, dobivene su otopine čija koncentracija odgovara profilaktičkoj dozi pri vrijednosti od 0,167 mg mL⁻¹ i dvije otopine koje odgovaraju terapijskim dozama nitrofurantoina, u vrijednostima od 0,33 mg mL⁻¹ te 0,67 mg mL⁻¹.

3.1.3. Hidrokinon

Korištene radne koncentracije hidrokinona (Tablica 1) određene su na temelju dnevnih terapijskih doza ekstrakta medvjete koje sežu od jedne do tri šalice, pri čemu je sadržaj jedne šalice dobiven korištenjem 3 g biljnog pripravka i 150 mL vruće vode. U sadržaju jedne šalice terapijskog napitka, pripremljene na prethodno opisani način, HPLC metodom je određena koncentracija hidrokinona od $14,6 \pm 0,319 \mu\text{g mL}^{-1}$. HPLC analizom ukupne koncentracije hidrokinona unutar dnevne doze (tri terapijska napitka) čaja određena je koncentracija od $37,22 \pm 0,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. Prema literaturi, utvrđeno je kako se nakon 4 sata od konzumacije čaja, 41 % početne doze arbutina nalazi kao konjugati hidrokinona unutar urina, dok slobodni hidrokinon koji se renalno eliminira, čini 0,6 % početne doze arbutina, prisutnog unutar pripremljenog čaja (Glöckl i sur., 2001; Siegers i sur., 1997). Zbog navedenih parametara u eksperimentu su korištene koncentracije hidrokinona od 5, 20, 50, 320 te $900 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tablica 1. Korištene koncentracije hidrokinona i njihov značaj

Koncentracija hidrokinona ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Opis doze
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Najmanja koncentracija hidrokinona koja nakon konzumacije jednog terapijskog napitka ekstrakta medvjette može doći u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura; odgovara renalno eliminiranom hidrokinonu.
20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Koncentracija hidrokinona u mokraćnom mjehuru određena nakon provedene <i>in vitro</i> probave ekstrakta medvjette (jedan terapijski napitak).
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Koncentracija hidrokinona u mokraćnom mjehuru određena nakon provedene <i>in vitro</i> probave ekstrakta medvjette (tri terapijska napitka, preporučena dnevna doza).
320 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Najveća koncentracija hidrokinona koja može doći u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura nakon konzumacije jednog terapijskog napitka medvjette; pretpostavlja pretvorbu svih konjugata hidrokinona u slobodni hidrokinon u uvjetima lužnatog urina.
900 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Najveća koncentracija hidrokinona koja može doći u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura nakon konzumacije tri terapijska napitka medvjette; pretpostavlja pretvorbu svih konjugata hidrokinona u slobodni hidrokinon u uvjetima lužnatog urina.

3.1.4. Laboratorijski uređaji

- Inkubator - Brouwer AGSA CH-Luzern MODEL 35-48, Water-Jacketed incubator, Švicarska
- Mikroskop - OPTIKA microscopes XDS-1, Italija
- Spektrofotometar sa utorom za mikrotitarske pločice - New Brunswick, SAD
- Centrifuga - HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Analitička vaga - model 1712 MP8, Silver edition, Sartorius, Njemačka
- Vortex miješač - Smart Vortex mixer SA8, Stuart, Velika Britanija
- Centrifuga - TehnicoCentric 2009, Slovenija
- Mini centrifuga - Boeco, Njemačka
- Uređaj za pročišćavanje vode - Synergy UV ultrapure Water (Type 1), Sigma, Njemačka
- Termo miješalica - Thermo Scientific, SAD
- Ultrasonična kupelj - FALC, Italija
- Termoblok s dušikom-Reacti Thermo III #TS18824 - Thermo Scientific, SAD
- HPLC 1290 Infinity LC System - Agilent Technologies, SAD
- TripleTOF 6600+ system, SCIEX, SAD
- Phenomenex Micro Trap C18, 10 x 0,3 mm pretkolona
- Phenomenex Luna Omega Polar Capillary, C18, 3 µm, 150 X 0,3 mm kolona

3.1.5. Laboratorijski pribor

- T-boce (5 mL, 25 mL, 200 mL) - FALCON, SAD
- Bürker-Türkova komorica - FALCON, SAD
- Mikrotitarske ploče (96 jažica) - FALCON, SAD
- Erlenmeyerove tikvice (50 mL, 100 mL) - KIMAX Kimble, Velika Britanija
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice - FALCON, SAD
- Pipetor - Easypet 3 - Eppendorf, Njemačka
- Višekanalni pipetor (12 kanala) - Eppendorf Research plus, Njemačka
- Mikroeprovete (1,5 mL)
- Pipetori, 0,1-1000 μ L - Eppendorf Research plus, Njemačka
- Viale - Agilent Technologies, SAD
- Mikroviale - Agilent Technologies, SAD
- Pipetor (0,1-1000 μ L) - Gilson automatska propipeta
- Plastični nastavci za pipetore (0,1-1000 μ L) - FINNTIP, Thermo Electron Corporation
- Plastične i staklene pipete (5-25 mL)
- Kivete za spektrofotometar

3.1.6. Kemikalije

- Dimetilsulfoksid - Kemika, Zagreb
- Fetalni goveđi serum - Capricorn Scientific, Njemačka
- Medij za uzgoj stanica - RPMI 1640, Capricorn Scientific, Njemačka
- Hidrokinon - Sigma, Njemačka
- Natrijev klorid - Kemika, Zagreb
- Kalijev klorid - Kemika, Zagreb
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat - Sigma, Njemačka
- Kalijev dihidrogenfosfat - Sigma, Njemačka
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) - Sigma, Njemačka
- 2,7-diklorfluorescein diacetat - Sigma, Njemačka
- Etanol - Sigma, Njemačka
- Ledena octena kiselina - Sigma, Njemačka
- SDS (natrijev dodecil sulfat) - Sigma, Njemačka
- Aceton - Merck, Njemačka
- Tripsin - Merck, Njemačka
- TCEP (Tris (2-karboksietil) fosfin) - Thermo Scientific, SAD
- Hidroksilamin (50 %-tni) - Thermo Scientific, SAD
- Amonijev bikarbonat - Sigma, SAD
- Izopropanol - Merck, Njemačka
- HCCA (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina) stock otopina matrice - Sigma, SAD
- TFA (trifluoroctena kiselina) - Merck, Njemačka
- TEAB pufer (triethyl amonijev bikarbonatni pufer) - Thermo Scientific, SAD
- TMTtetraplex (126, 127, 128 i 129) reagens za označavanje peptidnih uzoraka - Thermo Scientific, SAD
- Kalibrant za MALDI/TOF-TOF - Sigma, SAD
- Acetonitril - VWR Chemicals, SAD
- Jodoacetamid - Sigma, SAD
- Milli-q-voda, $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$
- Coomassie brilliant blue boja - Bio-Rad, SAD
- Fosfatna kiselina - Sigma, Njemačka

3.1.7. Otopine

i. Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti:

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

- Neutral red 50 mg
- Etanol 10 mL

2) Radna otopina Neutral red

- Radna otopina Neutral red boje priprema se iz ishodišne otopine dodavanjem odgovarajuće količine hranjivog medija do koncentracije $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$.

3) PBS pufer

- natrijev klorid 8,00 g
- kalijev klorid 0,20 g
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat 1,15 g
- kalijev dihidrogenfosfat 0,20 g
- destilirana voda 1000 mL

Autoklavira se 20 minuta na 121°C i pri tlaku od 101 325 Pa

4) Otopina za odbojavanje

- ledena octena kiselina 1 mL
- etanol 50 mL
- destilirana voda 49 mL

ii. Otopine korištene za ispitivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja:

1) Ishodišna otopina diklorfluorescein diacetata ($c = 2\text{mM}$)

- DCFH-DA 1,5 mg
- DMSO (dimetil sulfoksid) 1,5 mL

2) Radna otopina DCFH-DA

- Radna otopina DCFH-DA priprema se iz ishodišne otopine DCFH-DA dodavanjem određene količine PBS pufera do koncentracije 0,05 mM

iii. Otopine korištene za određivanje koncentracije proteina u uzorcima:

1) Bradford reagens

- Coomasie brilliant blue boja 10 mg
- etanol (96 %-tni) 5 mL
- fosfatna kiselina 10 mL
- destilirana voda 100 mL

3.1.8. Programi i baze podataka

- JASP 0.10.02 - program za statističku obradu podataka
- UniProt-baza podataka
- MASCOT - pretraživač baze podataka
- ProteinPilot Software 5.0.2., AB Sciex, SAD
- Schaffold Q+S, SAD

3.2. METODE

Ovo poglavlje obuhvaća postupke koji su provedeni s ciljem određivanja utjecaja nitrofurantoina na HepG2 i T24 stanice, hidrokinona na T24 stanice te s ciljem određivanja njihovog zasebnog i potencijalnog sinergističkog učinka na promjene proteinskog profila T24 stanica.

3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice su čuvane u krioprotektivnom sredstvu (10 % dimetilsulfoksidu) na temperaturi od 80 °C. Odmrzavanje stanica provedeno je unutar vodene kupelji temperature 37 °C, a potom je provedeno centrifugiranje. Talog je resuspendiran u 1 mL hranjivog medija, a stanice su nasađene u T-bocu volumena 5 mL prethodno ispunjenu medijem za uzgoj (10 %-tna otopina FBS, u RPMI). T-boce sa stanicama prenesene su u CO₂ inkubator, gdje su stanice uzgajane u uvjetima 5 % CO₂ i 95 % zraka. S ciljem održavanja stanica u eksponencijalnoj fazi rasta, postupak je obuhvaćao presađivanje stanica u T-boce većeg volumena uz dodatak svježeg hranjivog medija. Stanice su uzgajane do konfluentnosti (Freshney, 2010).

3.2.2. Priprema i utvrđivanje koncentracije suspenzije stanica

Nakon što su stanice stvorile subkonfluentni sloj, iz T-boca je uklonjen medij, stanice su isprane PBS puferom te je na njih stavljen tripsin, s ciljem odvajanja stanica od podloge. Broj stanica određen je nanošenjem 10 µL stanične suspenzije dobivene nakon odvajanja stanica od podloge unutar Bürker-Türkove komorice te brojanjem pod mikroskopom. Bürker-Türkova komorica sastoji se od 9 velikih kvadrata površine 1 mm², od čega 4 velika vanjska kvadrata služe za brojanje stanica, a svaki od velikih kvadrata sastavljen je od 16 malih kvadrata. Prostor između predmetnog i pokrovnog stakalca ima dubinu od 0,1 mm. Konačan broj stanica unutar zadanog volumena komorice dobiven je kao srednja vrijednost stanica izbrojenih u 4 vanjska velika kvadrata, a koncentracija stanica izražena je kao broj stanica po 1 mL stanične suspenzije.

Dodatkom izračunatog volumena hranjivog medija u ishodišnu suspenziju stanica postignuta je suspenzija stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} , čija je točnost važna zbog omogućivanja eksperimentalne ponovljivosti (Phelan, 2007).

3.2.3. Priprema stanica za određivanje citotoksičnog i oksidacijskog učinka

Pripremljena suspenzija stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} naciepljena je u mikrotitarske ploče s 96 jažica, u volumenu 100 μL po jažici. Hranjivi medij je uklonjen nakon postizanja subkonfluentnosti staničnih kultura, a potom su stanice tretirane prethodno navedenim koncentracijama hidrokinona i nitrofurantoina otopljenom u hranjivom mediju. T24 stanice tretirane su hidrokinonom i nitrofurantoinom u trajanju od 1, 2, 4 i 8 h, dok su HepG2 stanice tretirane nitrofurantoinom 1, 2 i 4 h. Negativnu kontrolu predstavljaju netretirane stanice. Tretmani su provedeni u 4 replike i 3 nezavisna eksperimenta.

Kako bi se ispitivao naknadni učinak tretmana stanica nitrofurantoinom, proveden je tretman stanica s oporavkom u trajanju od 24 h. Nakon tretmana nitrofurantoinom, djelatna tvar je uklonjena, a stanicama je ponovno dodan hranjivi medij te su stanice inkubirane pri 37°C tijekom 24 h (Elliot i Jiang, 2019).

3.2.4. Određivanje citotoksičnosti nitrofurantoina i hidrokinona na stanične linije T24 i HepG2 metodom Neutral red

Ova metoda se temelji na sposobnosti vijabilne stanice da veže boju Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) unutar lizosoma. Boja u uvjetima fiziološkog pH, difuzijom prodire kroz membranu stanica u citoplazmu, gdje zbog postojanja pH gradijenta prelazi u lizosom, kao područje nižeg pH. Repetto i sur. (2008) navode kako boja biva zadržana unutar lizosoma zbog toga što ulaskom u lizosome postaje nabijenom.

Nakon provedenog tretmana stanica nitrofurantoinom ili hidrokinonom (sa i bez oporavka), stanice su isprane fosfatnim puferom PBS (100 μL) te je u svrhu ispitivanja citotoksičnog učinka, stanicama u svaku jažicu dodano po 100 μL otopine boje Neutral red, koncentracije $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$.

Tretman stanica s Neutral red bojom proveden je u mikrotitarskim pločama tijekom 40 – 45 min, u CO_2 inkubatoru, pri temperaturi od 37°C .

Nakon tretmana stanica bojom Neutral red, višak nevezane boje sa stanica se ispiru PBS puferom. U svaku jažicu se dodaje 100 μ L otopine za odbojavanje kako bi se boja vezana u lizosomima ekstrahirala u otopinu što omogućava spektrofotometrijsko mjerenje udjela vijabilnih stanica, uz mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 520 nm. Postotak preživljenja izračunat je formulom: $\% \text{ preživljenja} = (A_{520} \text{ tretiranih uzoraka} / A_{520} \text{ kontrole}) \times 100$ (Barile, 1997).

3.2.5. Određivanje oksidacijskog učinka nitrofurantoina na stanične linije Hep-G2 i T24 te hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom DCFH-DA

DCFH-DA (2',7'- diklorfluorescein diacetat) hidrofobna je i nefluorescentna boja koja ulazi stanicu procesom difuzije te unutar citoplazme biva hidroliziran pomoću unutarstaničnih enzima esteraza. Djelovanjem esteraza dolazi do hidrolize acetatnih skupina, pri čemu nastaje 2',7'-diklorfluorescein (DCFH), koji unutar stanice veže slobodne radikale, a navedena je reakcija popraćena fluorescencijom (Hempel i sur., 1999). Ishodišna otopina DCFH-DA (2 mM) pripremljena je otapanjem DCFH-DA u dimetilsulfoksidu. Nakon tretmana stanice su ispirane PBS-om (100 μ L), a potom se na stanice dodaje 100 μ L radne otopine DCFH-DA, koncentracije 0,05 mM. Tretman 2',7'-diklorfluorescein diacetatom proveden je tijekom 15 minuta, u atmosferi 5 % CO₂, na temperaturi od 37°C. Izmjerene vrijednosti fluorescencije, proporcionalne su količini nastalih reaktivnih kisikovih čestica unutar stanice (Wang i Joseph, 1999).

3.2.6. Uzgoj T24 stanica za proteinsku analizu

Stanice T24 uzgojene su u T-bocama, nasađene u sterilne Petrijeve zdjelice za uzgoj staničnih kultura, u koncentraciji 10⁵ stanica mL⁻¹ te su uzgajane u CO₂ inkubatoru pri 37°C do subkonfluentnosti. Netretirane stanice predstavljale su negativnu kontrolu, a tretirane stanice bile su izložene otopini nitrofurantoina koncentracije 0,167 mg mL⁻¹, otopini hidrokinona koncentracije 20 μ g mL⁻¹ ili kombinaciji otopina nitrofurantoina (0,167 mg mL⁻¹) i hidrokinona (20 μ g mL⁻¹) u hranjivom mediju. Stanice su tretirane navedenim koncentracijama nitrofurantoina i hidrokinona tijekom 8h u 4 nezavisna eksperimenta i po 3 replike za svaki uzorak u jednom eksperimentu.

Višak istraživanih tvari je sa stanica nakon tretmana ispiran PBS, a zatim su stanice mehanički uklonjene iz Petrijevih zdjelica i premještene u odgovarajuće mikroepruvete. Stanice su ispirane

PBS puferom, a nakon ispiranja provedeno je liziranje stanica u PBS puferu sa 1 % SDS-om, uz naknadnu sonifikaciju (uz hlađenje) i centrifugiranje. Dobivenom supernatantu ispitana je koncentracija proteina metodom po Bradfordu.

3.2.7. Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu je jedan od najčešćih načina određivanja koncentracije proteina zbog svoje izrazite jednostavnosti i osjetljivosti. Metoda po Bradfordu zahtjeva izradu baždarnog pravca, a isti se dobiva korištenjem standardnih otopina goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) u koncentracijama 2 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i Bradford reagensa. Coomasie brilliant blue boja, koja se nalazi u Bradfordovom reagensu, s proteinima stvara kompleks koji apsorbira svjetlost pri 595 nm. Baždarni pravac određen je izmjerenim vrijednostima apsorbancija i poznatim koncentracijama proteina (Kruger, 2009). Koncentracija proteina određuje se u 4 μL alikvota izuzetih iz lizirane i sonificirane suspenzije T24 stanica koji se miješa s 196 μL ultračiste (MiliQ) vode i 2 mL Bradfordovog reagensa. Mjerenjem apsorbancije uzoraka pri 595 nm i pomoću baždarnog pravca određene su koncentracije proteina u uzorcima.

3.2.8. Analiza proteina tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa

Separacija peptida i spektrometrija masa provedena je uz pomoć instrumenta SCIEX TripleTOF 6600+ system. U Tablicama 2 i 3 navedeni su parametri analize.

Tablica 2. Parametri LC separacije

Pokretna faza A	milli-Q voda, 0,1 % vodena otopina mravlje kiseline (v/v)	
Pokretna faza B	0,1 % otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (v/v)	
Trap kolona	Phenomenex Micro Trap C18, 10 x 0,3 mm	
Analitička kolona	Phenomenex Luna Omega Polar Capillary, C18, 3 µm, 150 X 0,3 mm	
Temperiranje kolone	27 °C	
Volumen injektiranja	2 µL	
Protok	7 µL min ⁻¹	
	Retencijsko vrijeme (min)	B (%)
	0	3
	68	30
	73	40
	75	80
	78	80
	73	3
	87	3

Tablica 3. Parametri MS analize

Izvor iona	Optiflow 1-50 μ L Micro	
Uvjeti ionskog izvora	Ion Source Gas 1	30 psi
	Ion Source Gas 2	35 psi
	Curtain Gas	30 psi
	Declustering Potential	80 V
	Ions spray voltage	4500 V
Raspon m/z	400-1500 Da	
Tip kolizijske energije	Rolling	
Vrsta analize	Podatkovno ovisna analiza	

3.2.9. Identifikacija i relativna kvantifikacija proteina

Nakon snimanja MS i MS/MS spektara, dobiveni podaci su korišteni za pretragu baze podataka. Baza podataka je pretražena uz pomoć programa ProteinPilot Software 5.0.2 (AB Sciex). Parametri pretrage baze prikazani su u Tablici 4. Podaci dobiveni pretragom baze podataka korišteni su za kvantitativnu analizu. Relativna kvantifikacija napravljena je uz pomoć signala reporter iona koristeći Schaffold Q+S program uz parametre navedene u Tablici 5.

Tablica 4. Parametri pretrage baze podataka

Baza podataka	Uniprot; <i>Homo sapiens</i> – broj unosa 26610; revidirane sekvence SwissProt; Pristupljeno 01.08.2022.
Enzim	Tripsin, 1 preskočeno mjesto cijepanja
Tolerancija pogreške	Prekursor ion 0,05Da, Fragmentni ioni 0,100Da
Modifikacije	Alkilacija cisteina, TMT6plex
Minimalan broj identificiranih peptida	2
Algoritam	Paragon
Decoy	Uključeni, Reverzne sekvence

Tablica 5. Parametri komparativne analize

Normalizacija	Median
Statistički test	Permutation Test, Benjamini-Hochberg korekcija, $p < 0,05$
Razina usporedbe	Jedinstveni peptidi
Kvantifikacija	Na razini reporter iona

3.2.10. Statistička obrada podataka

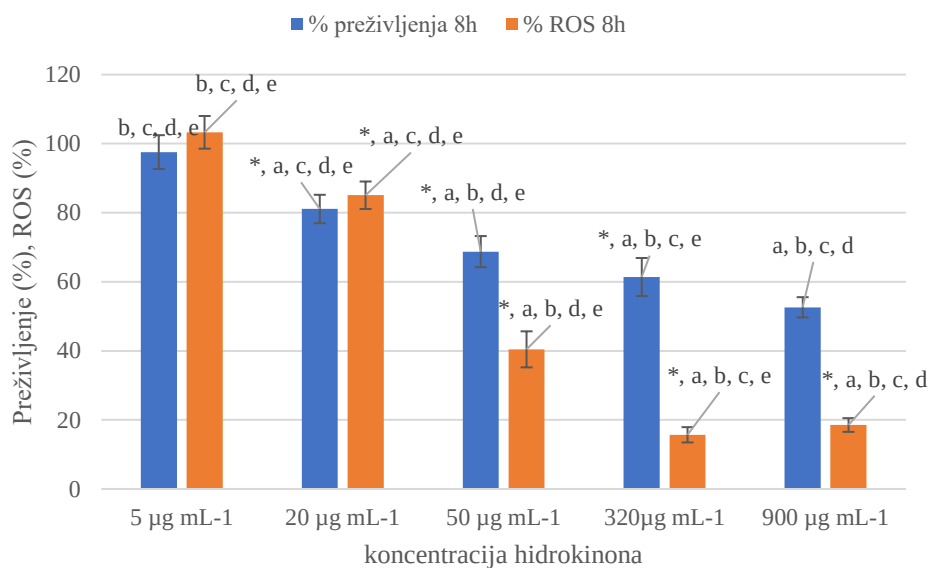
Rezultati ispitivanja citotoksičnog učinka te prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja hidrokinona i nitrofuranotina na Hep-G2 i T24 stanične linije obrađeni su u statističkom programu JASP (Verzija 0.16.3) analizom varijance (ANOVA) te korištenjem Tukey HSD *post hoc* testa uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$ (JASP Team, 2022).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dobiveni analizom citotoksičnog i oksidacijskog učinka hidrokinona na T24 stanice te nitrofurantoina na T24 i Hep-G2 stanice. Također ispitan je sinergistički učinak hidrokinona i nitrofurantoina na T24 stanice. Uz navedene analize, za bolje razumijevanje unutarstaničnih procesa, provedena je i analiza proteoma T24 stanica prethodno tretiranih hidrokinonom, nitrofurantoinom i njihovom kombinacijom.

4.1. CITOTOKSIČNI I OKSIDACIJSKI UČINAK HIDROKINONA I NITROFURANTOINA

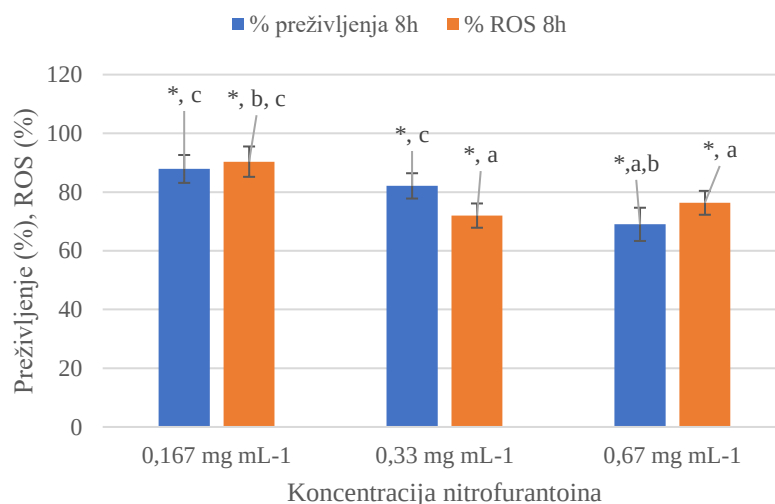
Pri koncentraciji hidrokinona od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ uočava se maksimalan postotak preživljenja T24 stanica. Ova koncentracija ne izaziva nastanak slobodnih kisikovih radikala te je ista kao i ona izmjerena u netretiranim stanicama (slika 3). Povećanjem koncentracije hidrokinona, uočeno je smanjenje postotka preživljenja T24 stanica i statistički značajno smanjenje postotka reaktivnih kisikovih čestica. Najzapaženija razlika između postotka preživljenja i nastalih reaktivnih kisikovih vrsta uočava se pri koncentraciji hidrokinona od $320 \mu\text{g mL}^{-1}$, gdje postotak reaktivnih kisikovih vrsta bilježi vrijednost manju od 20 %, a postotak preživljenja pri istoj koncentraciji korištenog hidrokinona iznosi više od 60 % (slika 3). Važno je napomenuti da pri vrijednosti preživljenja manjoj od 60 % potencijalno ne dolazi do aktivacije DCFH-DA zbog narušene funkcionalnosti membranskog sustava i esteraza, što negativno utječe na ispravnost izmjerenog udjela reaktivnih kisikovih vrsta.



Statistički značajna razlika u odnosu na: *kontrolu, ^akoncentraciju 5 µg mL⁻¹, ^bkoncentraciju 20 µg mL⁻¹, ^ckoncentraciju 50 µg mL⁻¹, ^dkoncentraciju 320 µg mL⁻¹, ^ekoncentraciju 900 µg mL⁻¹ (p < 0,05)

Slika 3. Citotoksični i prooksidativni učinak hidrokinona na T24 stanice nakon 8h tretmana

Luo i sur. (2008) u svom radu proučavali su oksidacijski stres uzrokovan izrazito visokim koncentracijama hidrokinona na Hep-G2 stanice. Pri koncentracijama hidrokinona od 2752,75 µg mL⁻¹ (25 mM) i 5505,5 µg mL⁻¹ (50 mM) zapažen je značajan porast reaktivnih kisikovih vrsta. Također je došlo do smanjenja koncentracije enzima glutathion S transferaze prilikom tretmana Hep-G2 stanica hidrokinonom, čime je dokazano prooksidativno djelovanje izuzetno visokih koncentracija hidrokinona na Hep-G2 stanice, opisano u radu (Luo i sur., 2008).



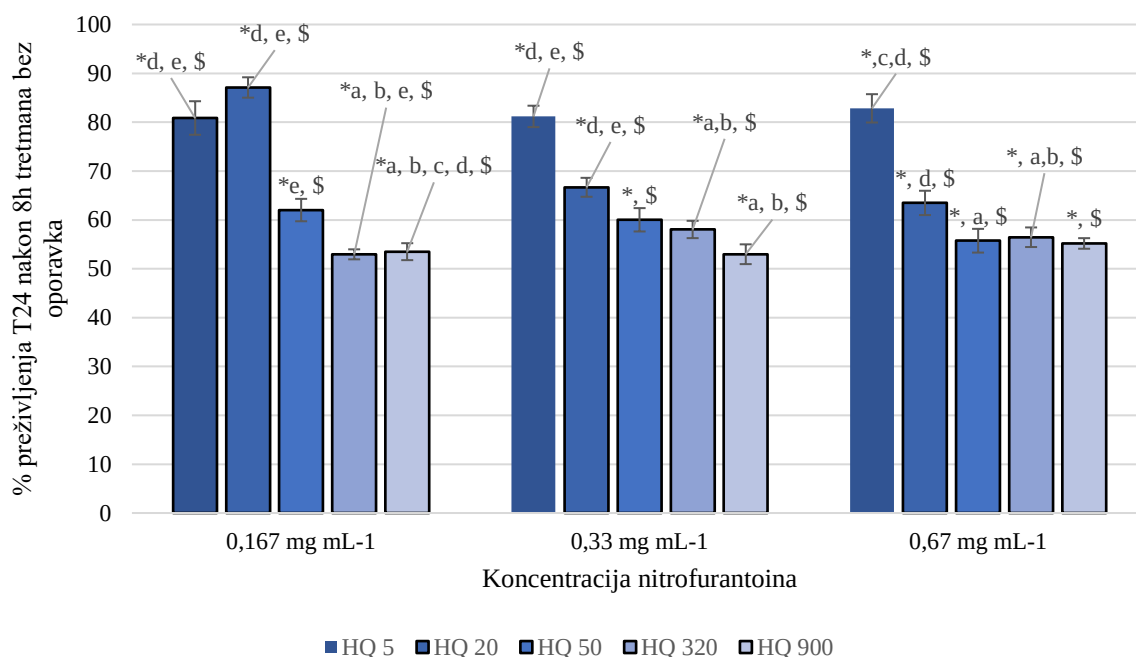
Statistički značajna razlika u odnosu na: *kontrolu, ^akoncentraciju 0,167 mg mL⁻¹, ^bkoncentraciju 0,33 mg mL⁻¹, ^ckoncentraciju 0,67 mg mL⁻¹ (p < 0,05)

Slika 4. Citotoksični i prooksidacijski učinak nitrofurantoina na T24 stanice nakon 8 h tretmana

Sve tri istraživane koncentracije nitrofurantoina (0,167 mg mL⁻¹, 0,33 mg mL⁻¹, 0,67 mg mL⁻¹) uzrokuju smanjenje postotka preživljenja u koncentracijskoj ovisnosti.

Najveća koncentracija nitrofurantoina smanjila je postotak preživljenja za 30 %. U sva tri slučaja uočen je antioksidativan učinak nitrofurantoina, s najizraženijim antioksidativnim učinkom pri koncentraciji od 0,33 mg mL⁻¹, gdje je zabilježena vrijednost postotka reaktivnih kisikovih vrsta bila oko 70 %, uz postotak preživljenja veći od 80 % (slika 4). Kamat i Lamm (2004) istraživali su citotoksičnost četiri antibiotika na stanice stanične linije T24, tijekom 96 h. Među ispitivanim antibioticima bili su ciprofloksacin, trimetoprim-sulfametoksazol, cefazolin i nitrofurantoin. U slučaju ciprofloksacina najniža koncentracija pri kojoj je pokazana značajna citotoksičnost iznosila je 50 µg mL⁻¹, dok je za trimetoprim-sulfametoksazol izraženija citotoksična koncentracija iznosila 62,5 µg mL⁻¹. Cefazolin je pokazao citotoksičnost prema T24 stanicama tek pri koncentraciji od 156,3 µg mL⁻¹, dok je kod nitrofurantoina već pri koncentraciji 7,8 µg mL⁻¹ uočen citotoksičan učinak srednje vrijednosti od 10 % T24 stanica.

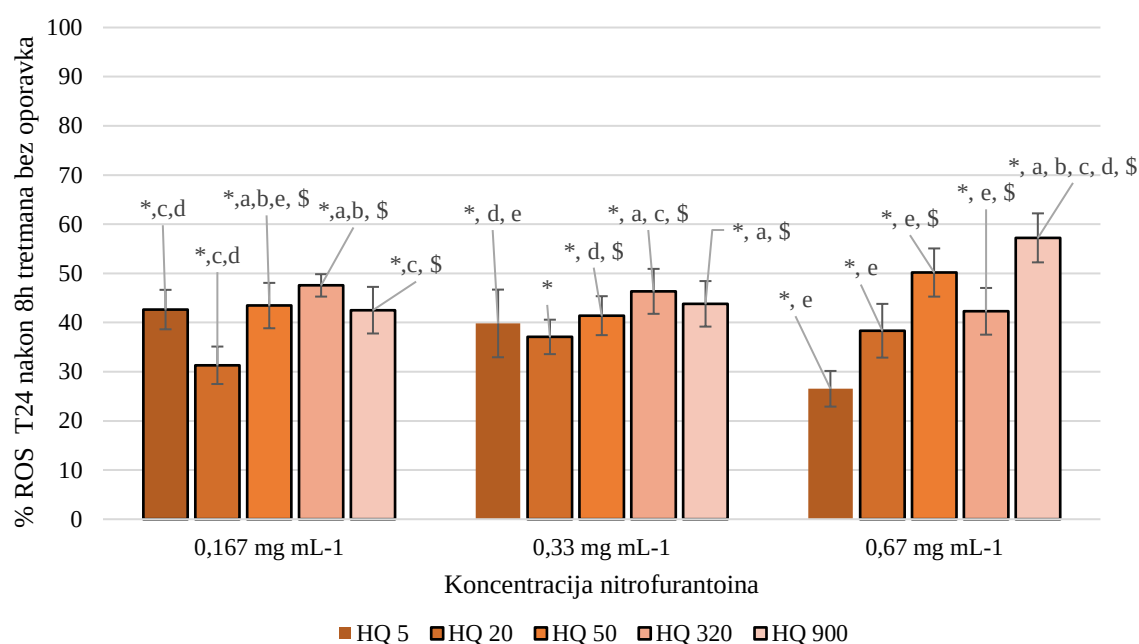
Kamat i Lamm (2004) su u svom radu pokazali da je nitrofurantoin pri koncentraciji od 0,167 mg mL⁻¹ smanjio postotak preživljenja T24 stanica za 40 %, dok je pri koncentraciji od 0,33 mg mL⁻¹ postotak preživjelih stanica pao na 20 %. Naposljetku, pri koncentraciji od 0,67 mg mL⁻¹, ostvaren je postotak preživljenja od samo 10 %.



Statistički značajna razlika u odnosu na: *kontrolu, ^akoncentraciju HQ 5 μg mL⁻¹, ^bkoncentraciju HQ 20 μg mL⁻¹, ^ckoncentraciju HQ 50 μg mL⁻¹, ^dkoncentraciju HQ 320 μg mL⁻¹, ^ekoncentraciju HQ 900 μg mL⁻¹, \$između uzoraka s istom koncentracijom hidrokinona, a različitom nitrofurantoina (p < 0,05)

Slika 5. Citotoksični učinak nitrofurantoina i hidrokinona na T24 stanice nakon 8 h tretmana

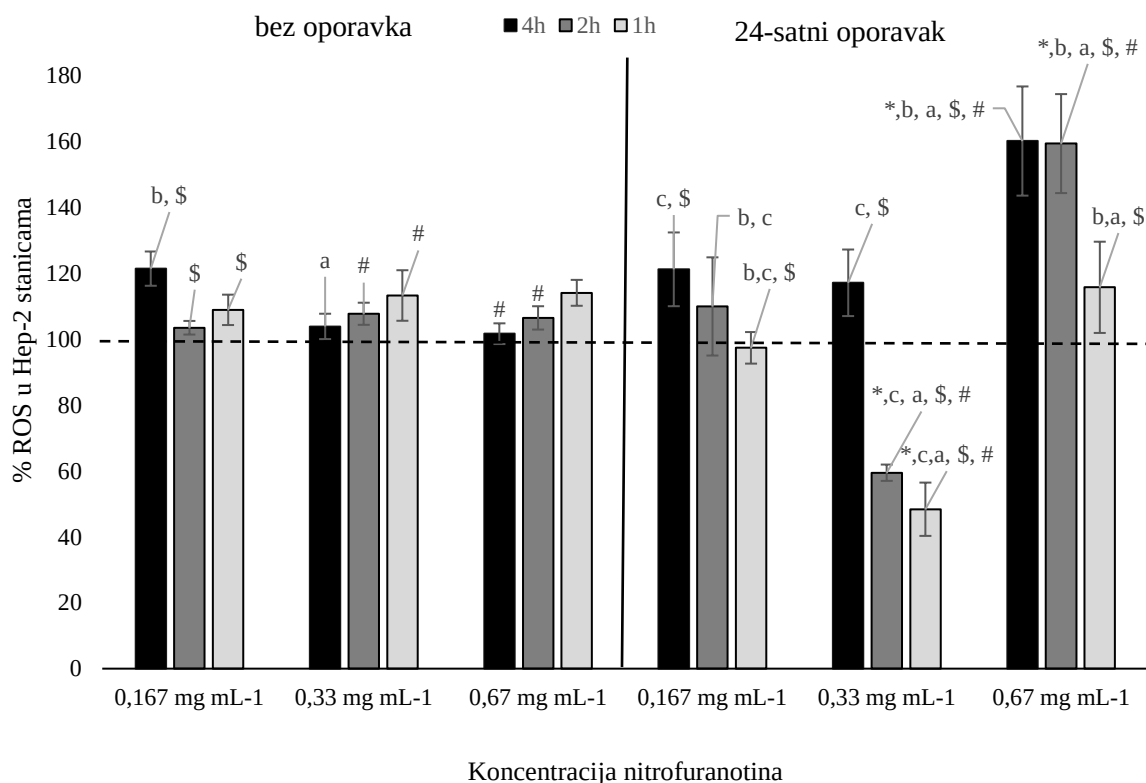
Sve tri korištene koncentracije nitrofurantoina, uzrokuju smanjenje preživljenja stanica u doznoj ovisnosti. Najveći postotak preživljenja iznosio je oko 80 %, a uočen je pri koncentraciji hidrokinona od 5 μg mL⁻¹. Povećanjem koncentracije hidrokinona pri koncentracijama hidrokinona od 320 i 900 μg mL⁻¹, uočen je postotak preživljenja manji od 60 %, u sva tri slučaja (slika 5).



Statistički značajna razlika u odnosu na: *kontrolu, ^akoncentraciju HQ 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^bkoncentraciju HQ 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^ckoncentraciju HQ 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^dkoncentraciju HQ 320 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^ekoncentraciju HQ 900 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ^{\$}između uzoraka s istom koncentracijom hidrokinona, a različitom nitrofurantoina ($p < 0,05$)

Slika 6. Antioksidacijski učinak nitrofurantoina i hidrokinona na T24 stanice nakon 8 sati tretmana

Mjerenjem reaktivnih kisikovih vrsta, nastalih tijekom tretmana stanica kombinacijom različitih koncentracija hidrokinona i nitrofurantoina uočava se antioksidativan učinak (slika 6). Povećanjem koncentracije hidrokinona i nitrofurantoina smanjuje se antioksidacijski učinak zabilježen pri nižim koncentracijama te se može primjetiti da se pri koncentraciji nitrofurantoina od 0,67 mg mL^{-1} , porastom koncentracije hidrokinona, smanjuje ukupni antioksidacijski učinak u koncentracijskoj ovisnosti. Važno je napomenuti da je postotak preživljenja T24 stanica pri sve tri koncentracije nitrofurantoina, u slučaju koncentracija hidrokinona viših od 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bio $\leq 60\%$ (slika 5), zbog čega izmjerene niže vrijednosti reaktivnih kisikovih vrsta mogu biti rezultat narušenog integriteta membranskog sustava stanica, a ne pokazatelj antioksidacijskog učinka nitrofurantoina i hidrokinona.



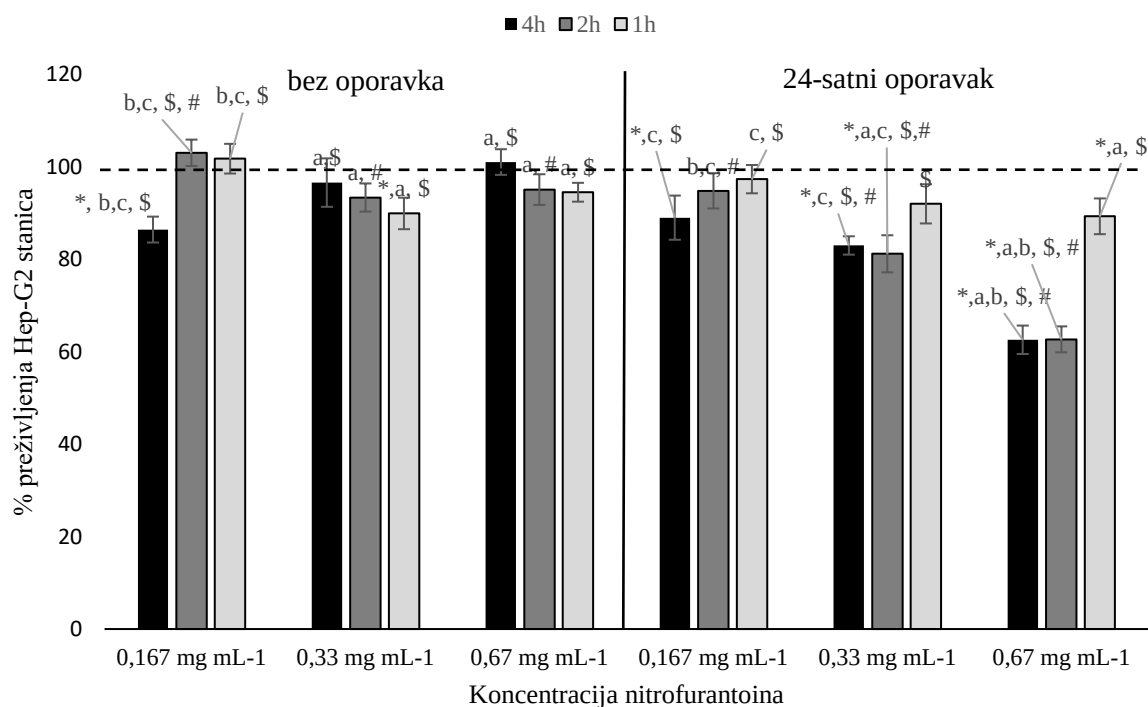
Statistički značajna razlika u odnosu na: *kontrolu, ^akoncentraciju 0,167 mg mL⁻¹, ^bkoncentraciju 0,33 mg mL⁻¹, ^ckoncentraciju 0,67 mg mL⁻¹, #između grupa oporavak/bez oporavka, ista koncentracija i vrijeme, \$između grupa s obzirom na različito vrijeme izlaganja (ista koncentracija) (p < 0,05)

Slika 7. Učinak nitrofurantoina na indukciju slobodnih radikala u Hep-G2 stanicama nakon 1, 2 i 4 h, s i bez oporavka

Na slici 7 je prikazan tretman stanica trima koncentracijama nitrofurantoina, bez oporavka (lijevo), te tretman stanica s oporavkom od 24 h (desno). Rezultati tretmana stanica bez oporavka pokazuju statistički značajno povećanje slobodnih radikala u slučaju kada su stanice tretirane s profilaktičkom koncentracijom nitrofurantoina u sva tri istraživana vremena. Sve tri koncentracije nitrofurantoina su djelovale prooksidativno nakon 4 h tretmana i oporavka stanica, dok su profilaktička i niža terapijska doza tijekom dva i jednog sata tretmana nakon oporavka stanica pokazale antioksidacijsko djelovanje u koncentracijskoj ovisnosti. Nakon oporavka, tretman u trajanju od 4 h.

Letelier i sur. (2017) su u svom radu ispitivali zajednički učinak terapije nitrofurantoina i biljnih ekstrakata: ružmarina (*R. officinalis*), bršljana (*H. helix*), artičoke (*Cynara scolymus*) i ljetnog jorgovana (*Buddleja globosa*). Antioksidacijski učinak ispitivan je korištenjem 20 µg biljnih ekstrakata po mg mikrosomalnih proteina, u kombinaciji s koncentracijom nitrofurantoina od

2,38 mg mL⁻¹ (10 mM). Kao kontrola korišten je uzorak tretiran isključivo nitrofurantoinom, kod kojeg se ostvaruje maksimalna lipidna peroksidacija, smanjenje udjela tiola te maksimalna inhibicija aktivnosti mikrosomalne glutathion S transferaze u vrijednosti od 47,1 %. Dodatkom biljnih ekstrakata zabilježen je porast aktivnosti mikrosomalne glutathion S transferaze, smanjenjem inhibicije uzrokovane nitrofurantoinom. U slučaju *R. officinalis* uočeno je smanjenje inhibicije mikrosomalne glutathion S transferaze nitrofurantoinom, sa 47,1 % na 18 %, dok je u slučaju *H. helix* inhibicija smanjena na 19,4 %. *C. scolymus* i *E. purpurea* umanjili su inhibicijski učinak nitrofurantoina za 8 %, dok je najmanji antioksidativni učinak pokazao biljni ekstrakt *B. globosa* smanjenjem inhibicije u iznosu od 5 %.



Statistički značajna razlika u odnosu na: *kontrolu, ^akoncentraciju 0,167 mg mL⁻¹, ^bkoncentraciju 0,33 mg mL⁻¹, ^ckoncentraciju 0,67 mg mL⁻¹, #između grupa oporavak/bez oporavka, ista koncentracija i vrijeme, \$između grupa s obzirom na različito vrijeme izlaganja (ista koncentracija) (p < 0,05)

Slika 8. Učinak tretmana Hep-G2 stanica nitrofurantoinom na udio preživljenja stanica; tijekom 1, 2 i 4 h, sa i bez oporavka

Tretman Hep-G2 stanica nitrofurantoinom bez oporavka, rezultirao je blagim smanjenjem preživljenja tijekom kraćeg vremena izlaganja stanica. Nakon 24 satnog oporavka, dolazi do koncentracijski i vremenski ovisnog smanjenja preživljenja (slika 8). Najviše vrijednosti postotka preživljenja uočene su prilikom tretmana stanica najnižom koncentracijom nitrofurantoina (0,167 mg mL⁻¹), a najmanje tijekom tretmana koncentracijom od 0,67 mg mL⁻¹, najvećom korištenom koncentracijom nitrofurantoina. Važno je reći kako je kod tretmana stanica najvećom koncentracijom nitrofurantoina izražen 20 - 25 % veći postotak preživljenja, u slučaju tretmana u trajanju od 1 h, u odnosu na tretmane trajanja od 2 i 4 h.

4.2. UČINAK HIDROKINONA I NITROFURANTOINA NA PROTEOM STANICA

Ispitan je utjecaj djelovanja hidrokinona i nitrofurantoina te njihove kombinacije na promjene u proteomu stanica T24. Kao kontrolni uzorak korištene su stanice T24 na kojima nije izvršen nikakav tretman. Eksperimenti su provedeni u triplicatu, a statistički prihvatljive promjene (pri $p < 0,05$) smatrale su se promjene u količini proteina minimalno 1,5 puta naspram kontrolnog uzorka.

4.2.1 Promjene u proteomu nakon tretmana hidrokinonom

Rezultati testa citotoksičnosti metodom Neutral red nakon tretmana hidrokinonom pri koncentraciji $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i tretmanu u trajanju od 8 sati pokazali su da 80 % stanica preživi tretman. Također, ispitivanjem udjela reaktivnih kisikovih čestica metodom DCFH-DA tijekom osmosatnog tretmana T24 stanica hidrokinonom ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) uočen je blagi antioksidativan učinak. Usporedbom proteoma stanica T24 tretiranih otopinom hidrokinona ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) s kontrolom uočena je promjena u razini ekspresije 28 proteina (tablica 6).

Tablica 6. Usporedba proteoma stanica T24 tretiranih hidrokinonom (20 µg mL⁻¹) s kontrolom

#	Ime proteina ^a	Accession Number ^b	Alternate ID ^c	MW ^d	p-value	Fold change ^e	MIN ^f	MAX ^g	stdev ^h	cv ⁱ
1	Albumin	A0A0C4DGB6	ALB	69 kDa	< 0.0001	0.30	0.20	0.40	0.10	0.33
2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	A0A7I2V5R6	GNAS	111 kDa	0.0010	0.35	0.30	0.40	0.07	0.20
3	Sideroflexin-1	Q9H9B4	SFXN1	36 kDa	0.0037	0.50	0.40	0.60	0.14	0.28
4	THO complex subunit 4	E9PB61	ALYREF	28 kDa	< 0.0001	0.35	0.20	0.50	0.21	0.61
5	CD44 antigen	P16070	CD44	82 kDa	< 0.0001	0.50	0.50	0.50	0.00	0.00
6	Tropomyosin alpha-3 chain	A0A087WWU8	TPM3	26 kDa	0.0028	0.50	0.50	0.50	0.00	0.00
7	Zinc transporter ZIP3	F5H385	SLC39A3	35 kDa	0.0030	0.27	0.10	0.60	0.29	1.08
8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	A0A1W2PPS1	HNRNPU	88 kDa	0.0024	0.45	0.30	0.60	0.21	0.47
9	Cathepsin B	A0A7P0NGZ6	CTSB	38 kDa	0.0022	0.50	0.40	0.60	0.10	0.20

Tablica 6. Usporedba proteoma stanica T24 tretiranih hidrokinonom (20 µg mL⁻¹) s kontrolom - *nastavak*

10	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	P53597	SUCLG1	36 kDa	0.0010	0.55	0.50	0.60	0.07	0.13
11	Non-histone chromosomal protein HMG-17	P05204	HMGN2	9 kDa	0.0028	0.55	0.50	0.60	0.07	0.13
12	Procollagen-lysine,2- oxoglutarate 5-dioxygenase 2	O00469	PLOD2	85 kDa	< 0.0001	1.53	1.50	1.60	0.06	0.04
13	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q99536	VAT1	42 kDa	0.0030	1.70	1.60	1.80	0.14	0.08
14	Filamin-C OS=Homo sapiens	Q14315	FLNC	291 kDa	0.0009	1.70	1.60	1.90	0.17	0.10
15	Mesencephalic astrocyte- derived neurotrophic factor	P55145	MANF	21 kDa	0.0040	1.65	1.50	1.80	0.21	0.13
16	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	P18031	PTPN1	50 kDa	0.0003	2.30	2.00	2.50	0.26	0.12
17	Delta-1-pyrroline-5- carboxylate synthase	P54886	ALDH18A1	87 kDa	< 0.0001	1.85	1.50	2.20	0.49	0.27
18	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	Q9NYU2	UGGT1	177 kDa	< 0.0001	2.00	1.70	2.40	0.36	0.18
19	Histone H1.4	P10412	H1-4	22 kDa	0.0017	2.35	2.00	2.70	0.49	0.21
20	Lysophospholipid acyltransferase 7	Q96N66	MBOAT7	53 kDa	0.0010	4.23	3.10	5.10	1.03	0.24
21	ATP-dependent 6- phosphofructokinase, platelet type	Q01813	PFKP	86 kDa	0.0006	4.35	3.10	5.60	1.77	0.41

Tablica 6. Usporedba proteoma stanica T24 tretiranih hidrokinonom (20 µg mL⁻¹) s kontrolom - *nastavak*

22	LIM domain only protein 7	F8WD26	LMO7	186 kDa	0.0010	3.30	2.00	4.40	1.21	0.37
23	MARCKS-related protein	P49006	MARCKSL1	20 kDa	0.0020	8.07	4.00	13.00	4.56	0.57
24	Aminoacyl-tRNA hydrolase	J3KQ48	PTRH2	19 kDa	0.0001	5.60	3.90	7.70	1.93	0.34
25	A-kinase anchor protein 12	Q02952	AKAP12	191 kDa	< 0.0001	Prisutan u 127, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
26	Fascin	Q16658	FSCN1	55 kDa	< 0.0001	Prisutan u 127, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
27	ATP-dependent RNA helicase DDX24	Q9GZR7	DDX24	96 kDa	0.0002	Prisutan u 127, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
28	Aladin	Q9NRG9	AAAS	60 kDa	0.0012	Prisutan u 127, nije prisutan u kontrolnom uzorku				

a - ime proteina u bazi podataka (UniProt)

b - pristupni broj u bazi podataka (UniProt)

c - često označava i ime gena

d - molekulska masa prema bazi podataka

e- omjer srednje vrijednosti signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak

f- minimalna vrijednost omjera signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak

g- maksimalna vrijednost omjera signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak

h - standardna devijacija

cv - koeficijent varijacije izračunat iz dobivenih vrijednosti

Rezultati proteomske analize pokazuju da su se u stanicama nakon tretmana T24 stanica hidrokinonom pri koncentraciji od $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 8 h vjerojatno dogodile promjene u proteinskom sastavu citoskeleta i kromatina te da su se aktivirali mehanizmi staničnog odgovora na nesmotane proteine i stres-inducirane stanične smrti.

Tezu o promjenama u sastavu citoskeleta potvrđuje smanjena ekspresija proteina TPM3 koji je uključen u stabilizaciju citoskeleta (UniProt baza podataka, pristupljeno 2022.) te povećana ekspresija proteina FLNC i MARCKSL1. Protein FLNC ima ulogu u reorganiziranju citoskeleta kao odgovora na signalne podražaje, a protein MARCKSL1 je uključen u kontrolu homeostaze citoskeleta i staničnu pokretljivost (Bjorkblom i sur., 2012). U stanicama nakon tretmana hidrokinonom potvrđena je i pojačana ekspresija proteina FSCN1 koji također ima ulogu u staničnoj pokretljivosti, ali i u organizaciji filamenata i formaciji mikrošiljaka, nabora membrane i stresnih vlakana (Deinhardt i sur., 2011).

Na promjene u sastavu kromatina upućuju povećana ekspresija proteina HIST1H1E te smanjena ekspresija proteina HNRNPU i HMG2. Protein HIST1H1E ima ulogu u vezanju linker DNA između nukleosoma pri formiranju kromatina (UniProt baza podataka, pristupljeno 2022.), a protein HNRNPU je uključen u nekoliko staničnih procesa kao što su organizacija kromatina, regulacija duljine telomera, transkripcije i dr. (UniProt baza podataka, pristupljeno 2022.). HMG2 je ne-histonski protein koji se veže s unutarnje strane nukleosomalne DNA te na taj način mijenja interakciju između DNA i histona (UniProt baza podataka, pristupljeno 2022.).

Akumulacija nesmotanih/neispravno smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu (ER) izaziva stanični stres koji inicira mehanizam staničnog odgovora na nesmotane proteine (engl. *Unfolded Protein Response*, UPR) (Apostolou i sur., 2008). Aktivaciju odgovora UPR potvrđuje povećana ekspresija proteina PTPN1, UGGT1 i MANF. Protein PTPN1 djeluje kao regulator odgovora endoplazmatskog retikuluma na povećanje nesmotanih proteina (Sangwan i sur., 2008), protein UGGT1 prepoznaje glikoproteine s defektima u smatanju te osigurava kontrolu kvalitete smatanja proteina u endoplazmatskom retikulumu (Arnold i sur., 2000). Naposljetku, pojačana ekspresija proteina MANF upućuje i na moguću aktivaciju mehanizma stres-inducirane stanične smrti.

4.2.2 Promjene u proteomu stanica nakon tretmana nitrofurantoinom

Tretiranjem stanica T24 nitrofurantoinom ($0,167 \text{ mg mL}^{-1}$) postotak preživljenja određen metodom Neutral red iznosio je 85 % u odnosu na kontrolni uzorak. Udio reaktivnih kisikovih čestica, izmjeren DCFH-DA metodom, iznosio je 90 %. Dobiveni rezultati upućuju na antioksidativan učinak profilaktičke doze nitrofurantoina. Rezultati proteomske analize stanica T24 nakon tretmana s nitrofurantoinom ($0,167 \text{ mg mL}^{-1}$) ukazuju na promjenu razine ekspresije 15 proteina, pri $p < 0,05$ (tablica 7).

Promjena u ekspresiji proteina pokazuje da tretman nitrofurantoinom utječe na proces biosinteze proteina, održavanje homeostaze proteina, proces transkripcije i alternativni *splicing* te vezikularni transport. Povećana ekspresija proteina PTRH2, DKC1, RPS15 i NOP2 nakon tretmana stanica T24 nitrofurantoinom upućuje da nitrofurantoin utječe na proces biosinteze proteina. Protein PTRH2 sudjeluje u otpuštanju ribosoma tijekom sinteze proteina (de Pereda i sur., 2004) te ima ulogu u regulaciji staničnog preživljavanja i smrti, protein RPS15 čini malu S15 podjedinicu ribosoma (Ban i sur., 2014), protein DKC1 je uključen u biogenezu ribosoma (Schwartz i sur., 2014), a protein NOP2 je uključen u sastavljanje velike 28S podjedinice ribosoma (Sloan i sur., 2013). Protein PSMB3 čini podjedinicu proteasoma, kompleks proteaza koji provodi selektivnu i efikasnu proteolitičku degradaciju ubikvitiniranih proteina (Yano i sur., 2004.). Povećana ekspresija PSMB3 proteina u stanicama nakon tretmana nitrofurantoinom upućuje na povećane potrebe stanice za održavanjem homeostaze proteina kroz uklanjanje nesmotanih ili oštećenih proteina koji bi mogli narušiti funkcioniranje stanice. Povećana ekspresija proteina SMU1 i SRSF1 upućuje na promjene u procesu translacije i alternativni *splicing*. Protein SRSF1 ima ulogu u sprečavanju preskakanja eksona, što omogućava točnost *splicing*-a te regulaciju alternativnog *splicing*-a (Kohtz i sur., 1994). Protein SMU1 je regulator DNA replikacije i spliceosomalni factor (Bertram i sur., 2017). Protein SCFD1 omogućava vezikularni transport između Golgijevog aparata i endoplazmatskog retikuluma, a koji nastaje kao odgovor na toksične tvari. Prema Huang i sur. (2021) protein SCFD1 također je od naglašene važnosti za fuziju autofagosoma i lizosoma. Protein VAT1, pripada integralnim membranskim proteinima uključenim u vezikularni transport sa svrhom regulacije primanja i otpuštanje neurotransmitera na nervnim završecima. Ovaj protein pripada porodici kinonskih oksidoreduktaza, a smatra se i kako je uključen u mitohondrijsku fuziju, transport fosfolipida i staničnu migraciju.

Tablica 7. Usporedba proteoma T24 stanica tretiranih nitrofurantoinom (0,167 mg mL⁻¹) i kontrole

#	Ime proteina ^a	Accession Number ^b	Alternate ID _c	MW ^d	(p-value)	Fold change ^e	MIN ^f	MAX ^g	stdev ^h	cv ⁱ
1	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	P46087	NOP2	89 kDa	0.0018	9.50	1.50	17.50	11.31	1.19
2	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	Q9NVI7	ATAD3A	71 kDa	0.0003	4.50	1.60	4.50	4.10	0.91
3	Proteasome subunit beta type-3	P49720	PSMB3	23 kDa	0.0020	4.75	1.60	4.75	4.45	0.94
4	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1	O60832	DKC1	58 kDa	0.0024	4.85	1.60	4.85	4.60	0.95
5	40S ribosomal protein S15	K7ELC2 (+1)	RPS15	18 kDa	0.0004	2.60	1.80	3.40	1.13	0.44
6	Integrin alpha-6	A0A8C8KBL6	ITGA6	118 kDa	< 0.0001	5.50	2.00	5.50	4.95	0.90
7	Serine/arginine-rich splicing factor 1	J3KTL2 (+1)	SRSF1	28 kDa	0.0010	3.65	2.00	5.30	2.33	0.64
8	Caveolae-associated protein 3	E9PIE3	CAVIN3	31 kDa	0.0022	6.40	2.10	6.40	6.08	0.95
9	Membrane-associated progesterone receptor component 1	O00264	PGRMC1	22 kDa	0.0013	9.30	2.30	16.30	9.90	1.06
10	WD40 repeat-containing protein SMU1	Q2TAY7	SMU1	58 kDa	0.0003	16.23	3.30	16.23	17.70	1.09
11	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	P36551	CPOX	50 kDa	0.0035	42.25	4.10	80.40	53.95	1.28

Tablica 7. Usporedba proteoma T24 stanica tretiranih nitrofurantoinom (0,167 mg mL⁻¹) i kontrole - *nastavak*

12	MARCKS-related protein	P49006	MARCKSL1	20 kDa	0.0020	11.60	4.70	11.60	9.76	0.84
13	Aminoacyl-tRNA hydrolase	J3KQ48 (+1)	PTRH2	19 kDa	0.0001	16.00	5.40	21.00	9.18	0.57
14	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q99536	VAT1	42 kDa	0.0030	6.75	3.40	10.10	4.74	0.70
15	Sec1 family domain-containing protein 1	A0A7I2V3G4 (+6)	SCFD1	68 kDa	0.0001	35.00	15.00	55.00	28.28	0.81

a - ime proteina u bazi podataka (UniProt)

b - pristupni broj u bazi podataka (UniProt)

c - često označava i ime gena

d - molekulska masa prema bazi podataka

e - omjer srednje vrijednosti signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak

f - minimalna vrijednost omjera signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak

g - maksimalna vrijednost omjera signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak

h - standardna devijacija

cv - koeficijent varijacije izračunat iz dobivenih vrijednosti

4.2.3 Promjene u proteomu stanica nakon kombiniranog tretmana nitrofurantoina i hidrokinona

Nakon istovremenog tretmana stanica T24 nitrofurantoinom ($0,167 \text{ mg mL}^{-1}$) i hidrokinonom ($20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) tijekom 8 h izmjeren je postotak preživljenja stanica metodom Neutral red od $87 \% \pm 2 \%$. Nadalje, mjerenjem količine reaktivnih kisikovih čestica metodom DCFH-DA, uočen je naglašen antioksidativan učinak, vrijednosti udjela reaktivnih kisikovih čestica iznosile su 30 %.

Nakon tretmana stanica T24 nitrofurantoinom ($0,167 \text{ mg mL}^{-1}$) i hidrokinonom ($20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) uočena je promjena u razini ekspresije 45 proteina (tablica 8).

Tablica 8. Proteom stanica tretiranih nitrofurantoinom (0,167 mg mL⁻¹) i hidrokinonom (20 µg mL⁻¹) u usporedbi s kontrolom

#	Ime proteina ^a	Accession Number ^b	Alternate ID ^c	MW ^d	(p-value)	Fold change ^e	MIN ^f	MAX ^g	stdev ^h	cv ⁱ
1	Integrator complex subunit 1	Q8N201	INTS1	244 kDa	0.0003	0.20	0.00	0.50	0.26	1.32
2	Proteasome subunit beta type-3	P49720	PSMB3	23 kDa	0.0020	0.35	0.30	0.40	0.07	0.20
3	Protein disulfide-isomerase TMX3	Q96JJ7	TMX3	52 kDa	0.0040	0.40	0.30	0.60	0.17	0.43
4	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2	Q6Y1H2	HACD2	28 kDa	< 0.0001	0.53	0.40	0.60	0.12	0.22
5	Cathepsin B	A0A7P0NGZ6	CTSB	38 kDa	0.0022	0.53	0.40	0.60	0.12	0.22
6	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	A0A7I2V5R6	GNAS	111 kDa	0.0010	0.37	0.30	0.40	0.06	0.16
7	Albumin	A0A0C4DGB6	ALB	69 kDa	< 0.0001	0.30	0.20	0.40	0.10	0.33
8	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	Q9UJZ1	STOML2	39 kDa	0.0007	0.45	0.30	0.60	0.21	0.47
9	PC4 and SFRS1-interacting protein	O75475	PSIP1	60 kDa	0.0013	0.60	0.50	0.70	0.10	0.17
10	60S acidic ribosomal protein P0	P05388	RPLP0	34 kDa	< 0.0001	0.53	0.40	0.60	0.12	0.22
11	Sideroflexin-1	Q9H9B4	SFXN1	36 kDa	0.0037	0.43	0.30	0.60	0.15	0.35
12	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	Q9NYU2	UGGT1	177 kDa	< 0.0001	2.70	1.50	3.70	1.11	0.41

Tablica 8. Proteom stanica tretiranih nitrofurantoinom (0,167 mg mL⁻¹) i hidrokinonom (20 µg mL⁻¹) u usporedbi s kontrolom - *nastavak*

13	Protein disulfide-isomerase A4	P13667	PDIA4	73 kDa	< 0.0001	1.87	1.50	2.60	0.64	0.34
14	Endoplasmin	P14625	HSP90B1	92 kDa	< 0.0001	1.77	1.50	2.00	0.25	0.14
15	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	P54886	ALDH18A1	87 kDa	< 0.0001	1.70	1.50	1.80	0.17	0.10
16	Calreticulin	P27797	CALR	48 kDa	< 0.0001	1.57	1.50	1.70	0.12	0.07
17	Protein disulfide-isomerase A3	A0A8I5KT88	PDIA3	58 kDa	< 0.0001	1.60	1.50	1.70	0.10	0.06
18	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	O43390	HNRNPR	71 kDa	< 0.0001	1.70	1.50	2.10	0.35	0.20
19	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	O94925	GLS	73 kDa	< 0.0001	1.87	1.60	2.20	0.31	0.16
20	Histone H1.5	P16401	H1-5	23 kDa	0.0038	1.93	1.60	2.10	0.29	0.15
21	Thioredoxin domain-containing protein 5	Q8NBS9	TXNDC5	48 kDa	< 0.0001	1.83	1.60	2.20	0.32	0.18
22	Coactosin-like protein	Q14019	COTL1	16 kDa	0.0008	2.10	1.60	3.00	0.78	0.37
23	T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	CCT5	60 kDa	0.0007	2.03	1.80	2.40	0.32	0.16
24	Lysophospholipid acyltransferase 7	Q96N66	MBOAT7	53 kDa	0.0010	1.93	1.70	2.20	0.25	0.13
25	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	P26368	U2AF2	54 kDa	0.0016	2.33	2.00	2.80	0.42	0.18
26	Lamin-B1	P20700	LMNB1	66 kDa	< 0.0001	2.03	1.90	2.20	0.15	0.08
27	LIM domain and actin-binding protein 1	Q9UHB6	LIMA1	85 kDa	0.0004	2.23	2.10	2.40	0.15	0.07
28	CD44 antigen	P16070	CD44	82 kDa	< 0.0001	2.07	1.60	2.30	0.40	0.20

Tablica 8. Proteom stanica tretiranih nitrofurantoinom (0,167 mg mL⁻¹) i hidrokinonom (20 µg mL⁻¹) u usporedbi s kontrolom - *nastavak*

29	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	P18031	PTPN1	50 kDa	0.0003	1.80	1.30	2.30	0.50	0.28
30	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	O94826	TOMM70	67 kDa	0.0009	3.20	2.40	3.70	0.70	0.22
31	Histone H1.4	P10412	H1-4	22 kDa	0.0017	3.40	2.70	4.60	1.04	0.31
32	Thymosin beta-10	P63313	TMSB10	5 kDa	0.0031	2.73	2.20	3.00	0.46	0.17
33	Aminoacyl-tRNA hydrolase	J3KQ48	PTRH2	19 kDa	0.0001	4.90	3.20	6.00	1.49	0.30
34	Brain acid soluble protein 1	P80723	BASP1	23 kDa	0.0005	3.00	2.60	3.30	0.36	0.12
35	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	Q53GQ0	HSD17B12	34 kDa	0.0001	3.10	2.80	3.60	0.44	0.14
36	MARCKS-related protein	P49006	MARCKSL1	20 kDa	0.0020	4.57	4.40	4.90	0.29	0.06
37	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	Q01813	PFKP	86 kDa	0.0006	4.80	2.80	6.40	1.83	0.38
38	Podocalyxin	O00592	PODXL	59 kDa	< 0.0001	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
39	Ras-related protein Ral-A	P11233	RALA	24 kDa	< 0.0001	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
40	F-actin-capping protein subunit beta	B1AK88	CAPZB	34 kDa	< 0.0001	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
41	CCN family member 1	O00622	CCN1	42 kDa	0.0001	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
42	ATP-dependent RNA helicase DDX24	Q9GZR7	DDX24	96 kDa	0.0002	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
43	Purine nucleoside phosphorylase	P00491	PNP	32 kDa	0.0006	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				
44	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	ACAA1	44 kDa	0.0010	Prisutan u 128, nije prisutan u kontrolnom uzorku				

- a - ime proteina u bazi podataka (UniProt)*
- b - pristupni broj u bazi podataka (UniProt)*
- c - često označava i ime gena*
- d - molekulska masa prema bazi podataka*
- e- omjer srednje vrijednosti signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak*
- f- minimalna vrijednost omjera signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak*
- g- maksimalna vrijednost omjera signala reporter iona tretman / kontrolni uzorak*
- h - standardna devijacija*
- cv - koeficijent varijacije izračunat iz dobivenih vrijednosti*

Od navedenih 45 proteina, 31 protein je razlikovno eksprimiran nakon kombiniranog tretmana, stoga se ti proteini mogu pripisati sinergijskom djelovanju nitrofurantoida i hidrokinona. Promjena u ekspresiji proteina pokazuje da sinergijsko djelovanje nitrofurantoida i hidrokinona utječe na biosintezu nezasićenih masnih kiselina, održavanje stanične homeostaze te regulaciju polimerizacije i depolimerizacije aktina.

Pojačana ekspresija proteina ACAA1 i HSD17B12 ukazuje da sinergijsko djelovanje nitrofurantoida i hidrokinona utječe na promjene u biosintezi nezasićenih masnih kiselina. Protein ACAA1 ima važnu ulogu u peroksimalnoj beta-oksidaciji masnih kiselina te ulogu u katalizi cijepanje malih, srednjih, dugih i vrlo dugih ravnih lanaca različitih molekula 3-oksoacil-CoA (UniProt baza podataka, pristupljeno 2022.) dok protein HSD17B12 katalizira prvu od četiri reakcija koje čine elongacijski ciklus dugih masnih kiselina (UniProt baza podataka, pristupljeno 2022.).

Proteini s izmjenjenom ekspresijom nakon kombiniranog tretmana, a čija je uloga u održavanju stanične homeostaze mogu se podijeliti na proteine iz porodice tioredoksina (PDIA3, PDIA4 i TXNDC5) te na molekularne šaperone (HSP90B1 i CALR). Proteini PDIA3 i PDIA4 spadaju u enzime iz obitelji tioredoksina koji kataliziraju oksidaciju, redukciju i izomerizaciju tiol-disulfida, neophodni su za ispravno formiranje disulfidnih mostova te rearanžiranje nepravilno formiranih veza (Hartley i sur. 2013). Prema UniProt bazi podataka (pristupljeno 2022.) protein TXNDC5 je disulfid izomeraza koja se nalazi u lumenu endoplazmatskog retikuluma te je također uključena u formiranje disulfidnih veza unutar proteina. Proteini HSP90B1 i CALR spadaju u skupinu molekularnih šaperona. Protein HSP90B1 ima funkciju molekularnog šaperona koji sudjeluje u procesiranju i transportu sekrecijskih proteina (UniProt baza podataka, 2022.), dok je protein CALR šaperon koji potiče smatanje proteina, sklapanje oligomera te kontrolu kvalitete u endoplazmatskom retikulumu kroz cikluse kalretikulin/kalneksin (Nauseef i sur., 1995). Nadalje, povećana ekspresija TOMM70 također potvrđuje promjene u homeostazi stanice. TOM je translokaza koja se nalazi na vanjskoj membrani mitohondrija te ima ulogu kontrole kvalitete mitohondrija. TOMM70 je podjedinica TOM translokaze koja posreduje unos novosintetiziranih proteina u mitohondrije. TOMM70 je također dokazano nositelj anti-oksidativnog i anti-apoptotičkog učinka (Kim i sur., 2022).

Sinergijsko djelovanje nitrofurantoida i hidrokinona na regulaciju, polimerizaciju i depolimerizacije aktina potvrđuje promjena u ekspresiji proteina LIMA1, CAPZB i COTL1. Protein LIMA1 je protein koji veže aktin uključen, a u regulaciju i dinamiku citoskeletona. Povećava broj i veličinu stresnih vlakana aktina te inhibira nabiranje membrane, također

uključen je u inhibiciju depolarizacije aktinskih filamenata (Maul i sur., 2003). Protein CAPZB je F-aktin-kapirajući protein koji se veže za brzorastuće krajeve aktinskih filamenata te na taj način blokira izmjene podjedinica na krajevima. Također, ima ulogu u regulaciji stanične morfologije i organizacije citoskeleta (Bai i sur., 2011). Protein COTL1 se također veže za F-aktin, no nema direktan utjecaj na depolarizaciju aktina (Provost i sur., 2001).

Usporedbom razine ekspresije proteina između uzoraka tretiranih samo hidrokinonom i onih uzoraka tretiranih hidrokinonom i nitrofurantoinom može se uočiti sljedeće: uzorku tretiranom kombinacijom nitrofurantoina i hidrokinona zapažen je porast ekspresije histona 1-4 (3,4 : 2,35), površinskog glikoproteina CD44 (2,07 : 0,5), zaslužnog za međustanične interakcije, adheziju i staničnu migraciju te heterolognih ribonukleoproteina (HNRNPR) koji sudjeluju u interakcijama i procesiranju RNA (1,7 : 0,5) (Chaudhury i sur., 2010).

U uzorku tretiranom hidrokinonom usporedno s uzorkom tretiranim kombinacijom hidrokinona i nitrofurantoina uočen je i porast ekspresije: lizofosfatidil-inozitol aciltransferaze (LCLT1) proteina iz obitelji O-aciltransferaza vezanih za membranu koji služi kao donor acilne skupine (4,23 : 1,93) te MARCKSL1 proteina (8,07 : 4,57) koji sudjeluje u regulaciji citoskeleta, signalizaciji protein kinaza C te signalizaciji kalmodulina MARCKSL1 protein pokazao je najveću razinu ekspresije u uzorku tretiranom isključivo nitrofurantoinom (11,6) (Tuladhar i Lum, 2015). U uzorku tretiranom nitrofurantoinom, povećana razina ekspresije u odnosu na uzorak tretiran kombinacijom nitrofurantoina i hidrokinona, uočena je u proteinima: proteasome 20S subunit beta 3 (PSMB3) (4,75 : 0,35), koji formira proteosome, multikatalitički kompleks proteaza peptidil-tRNA hidrolaza 2 (PTRH2) (16,00 : 4,90) (Kopp i sur., 1997).

U ovom radu ispitan je zaseban i sinergijski učinak hidrokinona i nitrofurantoina na T24 stanice. Ispitan je i učinak nitrofurantoina na Hep-G2 stanice tijekom tretmana s i bez oporavka. Unatoč smanjenom postotku preživljenja T24 stanica nakon tretmana smjesom nitrofurantoina i hidrokinona, u odnosu na preživljenje T24 stanica nakon tretmana nitrofurantoinom, provedeno istraživanje dokazalo je mogućnost primjene niske koncentracije hidrokinona u svrhu smanjivanja prooksidativnog učinka nitrofurantoina. Radi boljeg razumijevanja stečenih saznanja provedena je analiza proteoma T24 stanica nakon tretmana nitrofurantoinom, hidrokinonom te njihovom zajedničkom primjenom. Sinergijski učinak nitrofurantoina i hidrokinona odražen je kroz promjenu ekspresije proteina s utjecajem na biosintezu nezasićenih masnih kiselina, održavanje stanične homeostaze te regulaciju polimerizacije i depolimerizacije aktina.

5. ZAKLJUČCI

1. Nitrofurantoin pokazuje koncentracijski ovisnu toksičnost na Hep-G2 stanice nakon 24 sata oporavka nakon tretmana.
2. Nitrofurantoin pokazuje antioksidacijsko djelovanje na Hep-G2 stanice tijekom 1 i 2 sata tretmana.
3. Nitrofurantoin i hidrokinon u smjesi smanjuju postotak preživljenja T24 stanica u odnosu na sam nitrofurantoin.
4. Niska koncentracija hidrokinona smanjuje prooksidacijsko djelovanje profilaktičkih i terapijskih koncentracija nitrofurantoina tijekom 8 sati inkubacije te se na taj način ispoljava antioksidacijsko djelovanje hidrokinona u smjesi.
5. Rezultati proteomske analize u T24 stanicama pokazuju da je hidrokinon pri koncentraciji od $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 8 sati vjerojatno uzrokovao promjene u proteinskom sastavu citoskeleta i kromatina te da su se pod njegovim utjecajem aktivirali mehanizmi staničnog odgovora na nesmotane proteine i stres-induciranu staničnu smrt.
6. Tretman nitrofurantoinom utjecao je na proces biosinteze proteina, održavanje homeostaze proteina, proces transkripcije i alternativni splicing te vezikularni transport u T24 stanicama.
7. Sinergijsko djelovanje nitrofurantoina i hidrokinona u T24 stanicama djeluje na promjenu ekspresije proteina, a utječe na biosintezu nezasićenih masnih kiselina, održavanje stanične homeostaze te regulaciju polimerizacije i depolimerizacije aktina.

6. LITERATURA

Agarwal N, Rai AK, Singh SP (2021) Biotransformation of hydroquinone into α -arbutin by transglucosylation activity of a metagenomic amylosucrase. *Biotech* **11**, 362. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02909-2>

Apostolou A, Shen Y, Liang Y, Luo J, Fang S (2008) Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp Cell Research* **314**, 2454–2467. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.05.00>

Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM (2017) Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Methods Mol Biol* **1601**, 19-26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2

Bai SW, Herrera-Abreu MT, Rohn JL, Racine V, Tajadura V, Suryavanshi N, i sur.(2011) Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biol* **9**, 2–18. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-54>

Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ (2000) Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* **356**, 1749-1756. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03214-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03214-1)

Barile FA (1997) *In vitro* methods in pharmaceutical research. U: Castell JV, Gómez-Lechón MJ (ured.) Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment, Academic Press, San Diego, str: 33-54.

Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, i sur.(2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* **24**, 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.002>

Bertram K, Agafonov DE, Dybkov O, Haselbach D, Leelaram MN, Will CL, i sur. (2017) Cryo-EM structure of a pre-catalytic human spliceosome primed for activation. *Cell* **170**, 704-713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.011>

Björkblom B, Padzik A, Mohammad H, Westerlund N, Komulainen E, Hollos P, i sur. (2012) c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells. *Mol Cell Biol* **32**, 3513–3526. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00713-12>

Bubeník J, Barešová MB, Viklický V, Jakoubková J, Sainerová H, Donner J (1973) Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer* **11**, 765-773. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910110327>

Carmen P, Vlase L, Tamas M (2009) Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L) Fritsch acclimated in Romania. *Not Bot Horti Agrobo Cluj Napoca* **37**, 129–132. <https://doi.org/10.15835/nbha3713108>

Chaudhury A, Chander P, Howe PH (2010) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*. **16**, 1449-1462. <https://doi.org/10.1261/rna.2254110>

Cowan MC (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiol Rev* **12**, 564-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

Cunha BA (1989) Nitrofurantoin: An update. *Obstet Gynecol Surv* **44**, 399-406.

Dayon L, Sanchez JC (2012) Relative protein quantification by MS/MS using the tandem mass tag technology. *Methods Mol Biol* **893**, 115-127. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-885-6_9

de Arriba GS, Naser B, Nolte KU (2013) Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi folium* herbal preparations. *Int J Toxicology* **32**, 442-453. <https://doi.org/10.1177/1091581813507721>

de Montellano PRO (2005) Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, 3. izd., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, i sur. (2011) Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal* **4**, 82-88. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002060>

de Pereda JM, Waas WF, Jan Y, Ruoslahti E, Schimmel P, Pascual J (2004) Crystal structure of a human peptidyl-tRNA hydrolase reveals a new fold and suggests basis for a bifunctional activity. *J Biol Chem* **279**, 8111-8115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311449200>

DiPasquale R (2008) Effective use of herbal medicine in urinary tract infections. *J. Diet Suppl* **5**, 219-228. <https://doi.org/10.1080/19390210802414220>

Elliott RL, Jiang XP (2019) The adverse effect of gentamicin on cell metabolism in three cultured mammary cell lines: "Are cell culture data skewed?". *PloS one* **14**, 3–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214586>

Ertan G, Karasulu Y, Guneri T (1993) Degradation and gastrointestinal stability of nitrofurantoin in acidic and alkaline media. *Int J Pharm* **96**, 243–248. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90233-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90233-6)

Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* **13**, 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>

Fransen F, Melchers MJ, Meletiadiis J (2016) Pharmacodynamics and differential activity of nitrofurantoin against ESBL-positive pathogens involved in urinary tract infections. *J. Antimicrob Chemother* **71**, 2883–2889. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw212>

Freshney RI (2010) Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications, 6. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey. Glöckl I, Blaschke G, Vei M (2001) Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr Biomed Sci Appl* **761**, 261-266. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00322-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00322-x)

Gray J, Robinson D (2010) Textbook of female urology and urogynecology. U: Cardozo L, Staskin D (ured.) Lower Urinary Tract Infections - Simple and Complex, 3. izd., CRC Press, London, str. 1042-1056.

Grayson ML, Whitby M (2010) Kucers' the use of antibiotics. U: Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS (ured.) Nitrofurans: nitrofurazone, furazolidone, and nitrofurantoin, 6. izd., Hodder Arnold, London, str. 1195–1204.

Gupta K, Hooton TM, Stamm WE (2001) Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* **135**, 41-50. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-135-1-200107030-00012>

Hanash S (2003) Disease proteomics. *Nature* **422**, 226-232. <https://doi.org/10.1038/nature01514>

Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS (2015) Acid-base homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 2232-2242. <https://doi.org/10.2215/CJN.07400715>

Hartley CL, Edwards S, Mullan L, Bell PA, Fresquet M, Boot-Handford RP, i sur. (2013) Armet/Manf and Creld2 are components of a specialized ER stress response provoked by inappropriate formation of disulphide bonds: implications for genetic skeletal diseases. *Hum Mol Genet* **22**, 5262–5275. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt383>

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein

diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **27**, 146-159. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00061-1)

Hooton TM, Stamm WE (1997) Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North America* **11**, 551-581. [https://doi.org/10.1016/s0891-5520\(05\)70373-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70373-1)

Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J (2003) Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and *quorum-sensing*. *Z Naturforsch C* **58**, 879-884. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1224>

Huttner A, Verhaegh EM, Harbarth S (2015) Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *J Antimicrob Chemother* **70**, 2456-2464. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv147>

JASP Team (2022). JASP (Verzija 0.16.3). <https://jasp-stats.org/> Pristupljeno 27. kolovoza 2022.

Jeyanthi V, Velusamy P, Kumar GV, Kiruba K (2021) Effect of naturally isolated hydroquinone in disturbing the cell membrane integrity of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 741 and *Staphylococcus aureus* MTCC 740. *Heliyon* **7**, e07021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07021>

Jing YJ, Hao YJ, Qu H, Shan Y, Li DS, Du RQ (2006) Preliminary studies on antibacterial mechanism and analysis of antibacterial activity of chitosans. *Chinese J Antibiot* **31**, 361-365. <https://doi.org/10.1556/ABiol.57.2007.1.7>

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

Kamat A, Lamm D (2004) Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer. *Urology* **63**, 457-460. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2003.10.038>

Kedzia B, Wrocinski T, Mrugasiewicz K, Gorecki P, Grzewinska H (1975) Antibacterial action of urine containing arbutin metabolic products. *Med Dosw Microbiology* **27**, 305-314.

Kelly BD, Heneghan MA, Bennani F, Connolly CE, O'Gorman TA (1998): Nitrofurantoin induced hepatotoxicity mediated by CD8+ T cells, *American J Gastroenterol* **93**, 819-821. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.232_a.x

Kim SJ, Zhou C, Coutavas E, Lee, PJ (2022) Mitochondrial tom70 in hyperoxia-induced acute lung injury. *The FASEB Journal* **36**, 144-153. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.L7461>

Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-499. <https://doi.org/10.1126/science.6248960>

Kopp F, Hendil KB, Dahlmann B, Kristensen P, Sobek A, Uerkvitz W (1997) Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 2939–2944. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.2939>

Kohtz J, Jamison S, Will C (1994) Protein–protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119–124. <https://doi.org/10.1038/368119a0>.

Koulaouzidis A, Bhat S, Moschos J, Tan C, De Ramon A (2007) Nitrofurantoin-induced lung- and hepatotoxicity. *Annals of Hepatol* **6**, 119-121. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31944-1](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31944-1)

Krishnankutty R, Bhat A, Azmi A, Souchelnytskyi S, Uddin S (2016) An overview of proteomics techniques and its application as a tool in biomarker and drug discovery. *J Proteomics Enzymol* **2**, 2. <https://doi.org/10.4172/2470-1289.1000129>

Kruger NJ (2009) The protein protocols handbook. U: Walker JM (ured.) The bradford method for protein quantitation, Humana Press, Totowa, str. 17-24.

Letelier ME, Iturra - Montecinos PA, Gallardo – Garrido CA, (2017) Herbal extracts differentially inhibit oxidative effects caused by the biotransformation of nifurtimox, nitrofurantoin and acetaminophen on rat liver microsomes. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromát* **16**, 88-98.

Luo L, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L (2008) Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem-Biol Interact* **173**, 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.02.002>

Lynch DM (2004) Cranberry for prevention of urinary tract infections. *Am Fam Physician* **70**, 2175-2177. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(06\)18](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(06)18)

Lynn Zieske R (2006) A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Botany* **57**, 1501-1507.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj168>

Ma C, He N, Zhao Y, Xia D, Wei J, Kang W (2019) Antimicrobial mechanism of hydroquinone. *Appl Biochem Biotech* **189**, 1291–1303. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03067-1>

Martin DB i Nelson PS (2001) From genomics to proteomics: techniques and applications in cancer research. *Trends Cell Biol* **11**, 60-65. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02123-7](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02123-7)

Masella R, Mazza G (2009) Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

Maul RS, Song Y, Amann KJ, Gerbin SC, Pollard TD, Chang DD (2003) EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J Cell Biol* **160**, 399-407.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200212057>

McOsker CC, Fitzpatrick PM (1994) Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother* **33**, 23-30.
https://doi.org/10.1093/jac/33.suppl_a.23

Meng MV, Walsh TJ, Chi T (2016) Current medical diagnosis and treatment. U: Papadakis MA, McPhee SJ (ured.) Urologic disorders, McGraw Hill, New York, str. 905-927.

Minchin RF, Ho PC, Boyd MR (1985) Reductive metabolism of nitrofurantoin by rat lung and liver *in vitro*. *Biochem Pharmacol* **35**, 612-616. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90350-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90350-3)

Munoz-Davila MJ (2014) Role of old antibiotics in the era of antibiotic resistance. Highlighted nitrofurantoin for the treatment of lower urinary tract infections. *Antibiotics (Basel)* **3**, 39-48. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3010039>

Naczki M, Pegg RB, Amarowicz R (2011) Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics. *Food Chem* **124**, 1507-1513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.003>

Nauseef WM, McCormick SJ, Clark RA (1995) Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem* **270**, 4741-4747. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4741>

Neu HC (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064-1073. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064>

Phelan MC (2007) Techniques for mammalian cell tissue culture. *Current Protoc Neurosci* **38**, 4–16. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cya03bs36>

Pop C, Vlase L, Tamas M (2009) Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Not Bot Horti Agrobot* **37**, 129-132. <https://doi.org/10.15835/nbha3713108>

Provost P, Johanne D, Alexander S, Gunther G, Bengt S, Olof R (2001) Coactosin-like protein, a human F-actin-binding protein: critical role of lysine-75. *Biochem J* **359**, 255–263. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590255>

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* **3**, 1125-1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Sakaan SA, Twilla JD, Usery JB, Winton JC, Self TH (2014) Nitrofurantoin-induced hepatotoxicity: a rare yet serious complication. *South Med J* **107**, 107-113. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0000000000000059>

Sangwan V, Paliouras GN, Abella JV, Dubé N, Monast A, Tremblay ML sur. (2008) Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *J Biol Chemistry* **283**, 34374-34383. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805916200>

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* **3**, 1125-1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Sakaan SA, Twilla JD, Usery JB, Winton JC, Self TH (2014) Nitrofurantoin-induced hepatotoxicity: a rare yet serious complication. *South Med J* **107**, 107-113. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0000000000000059>

Sargin G, Elbek O, Balantekin C (2012) Acute respiratory distress syndrome and hepatotoxicity associated with single dose nitrofurantoin. *Case Rep Pulmonol* **2012**, 465389. <https://doi.org/10.1155/2012/465389>

Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, Jovanovic M, Herbst RH, León-Ricardo BX, i sur. (2014) Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell* **159**, 148-162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.028>

Siegers C, Bodinet C, Sawar SA, Siegers CP (2003) Bacterial deconjugation of arbutin by *Escherichia coli*. *Phytomed* **10**, 58-60. <https://doi.org/10.1078/1433-187x-00301>

Siegers CP, Siegers JP, Pentz R, Bodinet C, Freudenstein J (1997) Metabolism of arbutin from *Uva ursi*-extracts in humans. *Pharm Pharmacol Lett* **7**, 90-92.

Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ (2013) The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep* **5**, 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.049>

Song XC, Canellas E, Dreolin N, Nerin C, Goshawk J (2021) Discovery and characterization of phenolic compounds in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves using liquid chromatography–ion mobility–high-resolution mass spectrometry. *J Agricult Food Chem* **69**, 10856-10868. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02845>

Stamm WE, Norrby SR (2001) Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis* **183**, 1-4. <https://doi.org/10.1086/318850>

Stefanović OD (2018) Synergistic activity of antibiotics and bioactive plant extracts: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Bact Pathogen Antibact Control* **23**, 23–48. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72026>

Tache AM, Dinu LD, Vamanu E (2022) Novel insights on plant extracts to prevent and treat recurrent urinary tract infections. *Appl Sciences* **12**, 2635. <https://doi.org/10.3390/app12052635>

Tuladhar R, Lum L (2015) Fatty acyl donor selectivity in membrane bound O-acyltransferases and communal cell fate decision-making. *Biochem Soc Trans* **43**, 235-239. <https://doi.org/10.1042/BST20140282>

Vervoort J, Xavier BB, Stewardson A, Coenen S, Godycki-Cwirko M, Adriaenssens N, i sur. (2015) Metagenomic analysis of the impact of nitrofurantoin treatment on the human faecal microbiota. *J Antimicrob Chemother* **70**, 1989-1992. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv062>

Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**, 612-616. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00107-0)

Yang L, Wang K, Li H (2014) The influence of urinary pH on antibiotic efficacy against bacterial uropathogens. *Urology* **84**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.04.048>

Yano T, De Quinto SL, Matsui Y, Shevchenko A, Shevchenko A, Ephrussi A (2004) Hrp48, a *Drosophila* hnRNPA/B homolog, binds and regulates translation of *oskar* mRNA. *Dev Cell* **6**, 637-648. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00132-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00132-7)

Yee AA, Savchenko A, Ignachenko A, Lukin J, Xu X, Skarina T, et al. (2005) NMR and X-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins. *J Am Chem Soc* **127**, 16512–16517. <https://doi.org/10.1021/ja053565a028>

Zenser TV, Mattammal MB, Palmier MO, Davis BB (1981) Microsomal nitroreductase activity of rabbit kidney and bladder: implications in 5-nitrofurantoin-induced toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **219**, 735-740.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Antonio Gagić, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Antonio Gagić, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonio Gagić

Vlastoručni potpis