

Učinak hidrokinona na bakteriju E. coli u mokraćnom mjeheru

Čolak, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:582532>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU PREHRAMBENO-
BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2019.

Katarina Čolak

976 /USH

**UČINAK HIDROKINONA NA
BAKTERIJU *E. coli* U
MOKRAĆNOM MJEHURU**

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UČINAK HIDROKINONA NA BAKTERIJU *E. coli* U MOKRAĆNOM MJEHURU

Katarina Čolak, 976 / USH

Sažetak: Ljekovita biljka medvjетка se od davnina koristi za liječenje i ublažavanje tegoba izazvanih urinarnim infekcijama. Budući da još nisu utvrđene interakcije između bakterija i epitela mokraćnog mjehura kada su izloženi djelovanju aktivnih tvari iz medvjette, cilj ovog rada bio je utvrditi citotoksični i antioksidacijski učinak hidrokinona na bakteriju *Escherichia coli* i humane stanice raka mokraćnog mjehura (T24). U radu je istražen i utjecaj hidrokinona na promjenu adhezije ove bakterije na stanične linije T24. Rezultati su pokazali toksični učinak hidrokinona na bakteriju u koncentraciji koja odgovara sadržaju hidrokinona u jednoj šalici napitka pripremljenog od medvjette, pri čemu je dokazana veća citotoksičnost hidrokinona kada su bakterije tretirane 1h u odnosu na 2h. Utvrđen je učinak iste koncentracije hidrokinona na smanjenje adhezije *E. coli* na stanice T24 kao i visok antioksidativni učinak. Doza hidrokinona u šalici napitka, uz pretpostavku da sav arbutin tijekom konzumacije metabolizira u hidrokinon, predstavlja izrazito citotoksičnu koncentraciju za T24 stanice gdje u uvjetima s 24-satnim oporavkom smanjuje njihovo preživljenje ispod 20% u odnosu na kontrolu.

Ključne riječi: hidrokinon, humane stanice raka mokraćnog mjehura T24, citotoksičnost, adhezija, antioksidacijski učinak

Rad sadrži: 39 stranica, 14 slika, 11 tablica, 62 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Durgo

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 1. travnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and genetics of microorganisms

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

EFFECT OF HYDROQUINONE ON *E. coli* BACTERIUM IN THE URINARY BLADDER

Katarina Čolak, 976 / USH

Abstract: The medical plant bearberry has been used for healing and alleviating the problems caused by urinary infections since distant past. Since interaction between bacteria and bladder epithelium when exposed to activity of active substance from bearberry has not been established yet, the aim of this study was to determine the cytotoxic and antioxidant effect of hydroquinone on *E. coli* and human bladder cancer cells (T24). Also, ability of hydroquinone to alter the adhesion of *E. coli* to T24 cells was investigated. The results showed the toxicity of the hydroquinone to the bacterium at a concentration corresponding to the hydroquinone content in a single cup of beverage, whereby was demonstrated the higher cytotoxicity of the hydroquinone when the bacteria were treated for 1 h over 2 h. The effect of the same hydroquinone concentration on the reduction of *E. coli* adhesion to T24 cells and the high antioxidant effect were determined. The dosage of hydroquinone in a cup of beverage assuming that all the arbutin during metabolism is metabolised into hydroquinone, is a highly cytotoxic for T24 cells where 24-hour recovery conditions reduce their survival below 20 %.

Keywords: hydroquinone, human bladder carcinoma cell line T24, cytotoxicity, adhesion, antioxidant effect

Thesis contains: 39 pages, 14 pictures, 11 tables, 62 literary citations

Original in: Croatian

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

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Durgo

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

Reviewers:

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

Thesis defended: April 1, 2019

Sadržaj

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 3 |
| 2.1. MEDVJETKA..... | 3 |
| 2.2. ARBUTIN..... | 4 |
| 2.2.1. Biokonverzacija arbutina..... | 5 |
| 2.3. HIDROKINON..... | 6 |
| 2.3.1. Mehanizam djelovanja hidrokinona..... | 7 |
| 2.4. BAKTERIJSKA KULTURA <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 11 |
| 3.1. MATERIJAL..... | 11 |
| 3.1.1. Uzgoj i priprema mikroorganizama..... | 11 |
| 3.1.2. Priprema i uzgoj humanih stanica..... | 11 |
| 3.1.3 Standard hidrokinona..... | 11 |
| 3.1.4. Priprema hranjivih podloga i fosfatnog pufera..... | 11 |
| 3.1.5. Priprema otopina za eksperimente..... | 13 |
| 3.1.6. Pribor..... | 14 |
| 3.1.7. Aparature..... | 15 |
| 3.1.8. Kemikalije..... | 15 |
| 3.2. METODE RADA..... | 16 |
| 3.2.1. Testiranje citotoksičnosti hidrokinona na bakteriju <i>E. coli</i> | 16 |
| 3.2.2. Testiranje citotoksičnog učinka hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura (T24)..... | 19 |
| 3.2.3. Testiranje prooksidativnog učinka hidrokinona DCFH-DA metodom..... | 20 |
| 3.2.4. Testiranje utjecaja hidrokinona na vezanje bakterija za humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura (T24)..... | 20 |
| 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA..... | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 22 |
| 4.1. CITOTOKSIČNOST HIDROKINONA NA BAKTERIJU <i>E. coli</i> | 22 |
| 4.2. CITOTOKSIČNOST HIDROKINONA NA HUMANU STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA (T24)..... | 25 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4. UTJECAJ HIDROKINONA NA VEZANJE BAKTERIJA ZA STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA (T24) | 32 |
| 5. ZAKLJUČAK | 34 |
| 6. LITERATURA..... | 35 |

1. UVOD

Kako kroz povijest tako i danas, uporaba ljekovitog bilja i biljnih pripravaka ima važnu ulogu kod ublažavanja simptoma raznih oboljenja i očuvanja zdravlja ljudi. Nepovoljni životni uvjeti, klima ili manjak hranjivih tvari u tlu pogodovale su razvoju određenih prilagodbi kod biljaka koje u borbi za opstanak stvaraju određene bioaktivne spojeve koji mogu imati i zaštitni učinak na ljudski organizam jer sadrže snažne prirodne antimikrobne supstance.

Uporaba medvjeteke u narodnoj medicini u terapijske svrhe datira još iz 2. stoljeća, a sami trend uporabe ove biljke kroz zadnjih nekoliko desetljeća sve više dobiva na značenju. Zbog značajno smanjene učinkovitosti antibiotske terapije pri liječenju urinarnih infekcija sve se češće potpuno koristi i liječenje pomoću pripravaka od ljekovitog bilja (Jurica i sur., 2018).

Medvjeteka u našem podneblju raste pretežito u planinskom području u obliku puzećeg grma s ovalnim ili jajolikim listovima zaobljenim na vrhu. Za pripremu napitka od medvjeteke koriste se listovi koji se beru za vrijeme cvatnje. Ova biljka je komercijalno dostupna pod nazivom "uvin čaj". Farmakološki značajni sastojak medvjeteke jest upravo arbutin, fenolni glikozid koji se u ekstraktu od suhog lista medvjeteke nalazi u rasponu koncentracija od 4 % - 12 % (Schindler i sur., 2002). Dio arbutina se djelomično, gotovo zanemarujuće razgrađuje u enterocitima crijevnih resica probavnog sustava pod utjecajem bakterija crijevne mikroflore (Blaut i sur., 2006), odakle se preko nosača Na^+ /glukoza apsorbira u krv i dalje prenosi do jetre. U jetri se 65-75 % arbutina koji je u organizam unesen oralno metabolizira u dvije faze (Blaut i sur., 2006) (Garcia de Aribba i sur., 2013). U prvoj fazi se arbutin deglikolizira, a u drugoj konjugira s glukuronskom kiselinom i sulfatom. Nastali metaboliti: 85% hidrokinon sulfata i hidrokinon glukuronida, te 0,6% slobodnog hidrokinona se dalje izlučuju iz organizma putem bubrega i urina (Garcia de Aribba i sur., 2013). Ukoliko je urin alkaln, konjugati hidrokinona se hidroliziraju i prevode u slobodni hidrokinon (Yarnell, 2002), spoj čije će se djelovanje i učinak na stanicama mokraćnog mjehura ispitati u ovom radu.

Bakterija koja će se koristiti u ovom radu je prirodno prisutna bakterija crijevne mikroflore čovjeka, *Escherichia coli*. Ovo istraživanje ispitat će citotoksičnost hidrokinona na *E. coli* kao i utjecaj hidrokinona na adheziju spomenutih bakterijskih stanica za humane stanice karcinoma mokraćnog mjehura (T24). Nadalje, ovo istraživanje provesti će se s ciljem procjene citotoksičnog učinka hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura, procjene učinka na indukciju slobodnih radikala u spomenutim stanicama te moguće antioksidacijsko djelovanje.

Sva ispitivanja provest će se sa svježe pripremljenom otopinom hidrokinona.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MEDVJETKA

Medvjetka ili mlivnjak (lat. *Arctostaphylos*) je biljni rod iz porodice vriesova (lat. *Ericaceae*). U flori Hrvatske, pretežito u pretplaninskim crnogoričnim šumama, raste borealna zimzelena medvjetka ili medvjede grožđe (lat *A. uva-ursi*; slika 1.). To je nizak, polegli, vazdazeleni grm s kožastim, duguljasto jajastim, s objiju strana golim i sjajnim listovima i bijelim ili ružičastim cvjetovima u malim visećim grozdovima. Medvjetka je od davnina poznata kao ljekovita biljka. Sadrži bioaktivne fenole, tanine i flavonoide te se zbog toga listovi koriste u liječenju upala urinarnog trakta i kao adstringens (Parejo i sur., 2001).

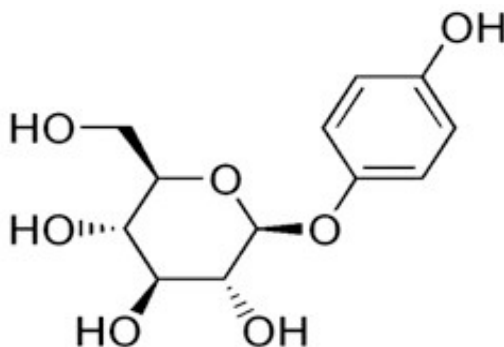


Slika 1. Medvjede grožđe

Pripravci medvjetke najpoznatiji su prirodni lijekovi za suzbijanje infekcija urinarnog trakta zbog visokog sadržaja arbutina u listovima ove biljke. Smatra se da je upravo arbutin taj fenolni spoj koji je odgovoran za antimikrobno djelovanje ekstrakta lista medvjetke (Pavlović i sur., 2014). Konzumira se u obliku zdrobljenog lišća, praha ili vodenog ekstrakta, izlažući pri tom potrošače dozi od 400 do 840 mg arbutina po danu (Deisinger i sur., 1996).

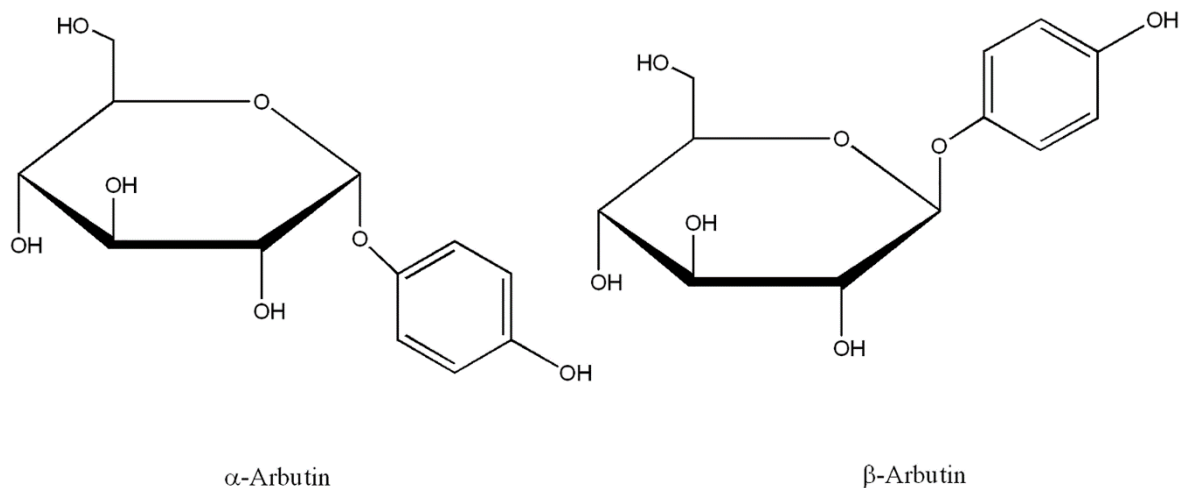
2.2. ARBUTIN

Arbutin (hidrokinon- β -D-glukopiranozid) (slika 2.) je derivat hidrokinona kojeg po kemijskoj građi svrstavamo u skupinu fenolnih glukozida. Glavni je sastojak ekstrakta medvjete, a pronađen je i u plodovima brusnice, borovnice i kruške (Deisinger i sur., 1996). Ovaj prirodni spoj kojeg sintetiziraju biljke iz porodice *Ericaceae*, *Betulaceae* i *Rosaceae* biljkama omogućuje esencijalne funkcije kao što su razmnožavanje i rast te pomaže u obrani od patogena i parazita (Baidez i sur., 2007).



Slika 2. Kemijska struktura arbutina

Biljke arbutin formiraju kao sekundarni metabolit u obrani protiv infekcija i pri stresnim situacijama kao što su iznimno visoke ili niske temperature (Lukas i sur., 2010). Arbutin tvori dva diastereoizomera, alfa i beta (slika 3.). Beta arbutin je prirodno sadržan u biljkama dok se alfa arbutin dobiva kemijskom sintezom (Nycz i sur., 2010). Sinteza se odvija uz djelovanje brojnih enzima, iz acetobromglukoze i hidrokinona ili reakcijom β -D-glukoze pentaacetata i hidrokinon monobenzila u prisutnosti fosfornog oksiklorida (Kitao i Sekine, 1994). Arbutin pokazuje antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje (Nycz i sur., 2010), pa zbog svojih antioksidacijskih svojstava sprječava nastanak slobodnih radikala i umanjuje oksidacijski stres (Jurica, 2016). Inducira aktivnost enzima koji su važni za borbu protiv reaktivnih kisikovih vrsta (katalaza, dismutaza, glutathion peroksidaza) (Tsao, 2010). U biljkama je prisutan u kombinaciji s metil-arbutinom, što je posebno karakteristično za porodicu *Ericaceae* (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).



Slika 3. Kemijska struktura Alfa i Beta arbutina

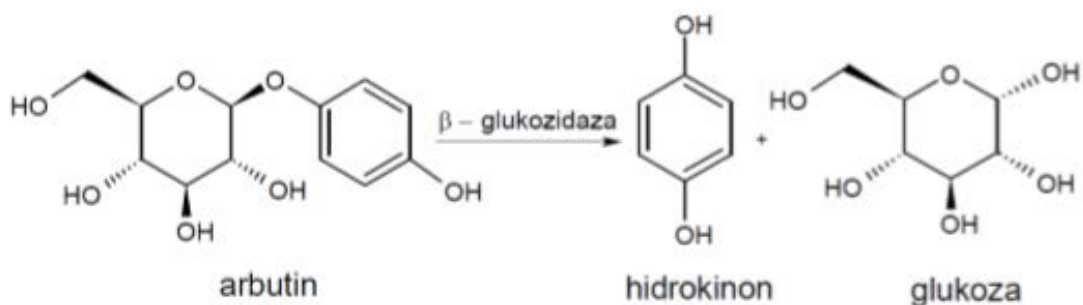
Već duži niz godina arbutin se u narodnoj medicini koristi za liječenje infekcija mokraćnog sustava, a zbog svoje niske citotoksičnosti koristi se i u nekim proizvodima koji služe za izbjeljivanje kože, kao pomoćna terapija kod hiperpigmentacije (Liang i sur., 2016; Hu i sur., 2009). Međutim, problem kod upotrebe arbutina u ove svrhe je taj što može izazvati kontaktni dermatitis te rjeđe ohronozu, rezultirajući hiperpigmentacijom na tretiranom području koju je poslije teško izliječiti (Dahiya i Romano, 2006).

Nadalje, koristi se i kao stabilizator za boje za fotografije, a spominje se i u brojnim studijama kao fenol djelotvoran protiv starenja, UVB/UV-C zračenja i za ublažavanje bolova, kao i za zacjeljivanje rana bez ožiljaka (Nycz i sur., 2010).

2.2.1. Biokonverzacija arbutina

Smatra se da arbutin već u biljkama prelazi u aktivni oblik hidrokinon (Hildebrand i sur., 1969), spoj koji pokazuje i antimikrobna svojstva, a poznat je kao antioksidans i antimutagen te kao učinkovit inhibitor lipidne peroksidacije (Souček i sur., 2000; Blaut i sur., 2006).

Enzim koji katalizira pretvorbu arbutina u hidrokinon naziva se β -glukozidaza (slika 4.). Dokazano je da i bakterije kože, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* mogu biokonvertirati arbutin u hidrokinon (Bang i sur., 2008), te da biljke koje sadrže enzim glikoziltransferazu mogu biosintetski uz UDP glukozu aktivirati određene biokemijske putove pri čemu dolazi do konverzije, odnosno pretvaranja hidrokinona u arbutin (Skrzypczak-Pietraszek i sur., 2017)

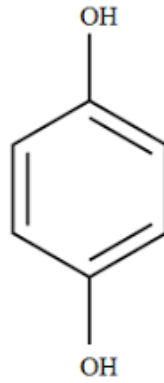


Slika 4. Bioaktivacija arbutina u hidrokinon (Preuzeto od: Jurica, 2016)

Sličan postupak se odvija i kod čovjeka, u enterocitima crijevnih resica probavnog sustava (Blaut i sur., 2006) pod djelovanjem bakterije crijevne mikroflore: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliflavus* i *Bacteroides distasonis* (Kang i sur., 2011) uz odvajanje ugljikohidratne skupine s fenola. Čitav proces razgradnje potpomognut je alkalnim uvjetima i djelovanjem enzima β -glukozidaze. Smatra se da je razgradnja arbutina u tankom crijevu djelovanjem crijevne mikroflore i epitelnih β -glukozidaza (Blaut i sur., 2006) zanemariva u odnosu na razgradnju ovog spoja u jetri. Metabolizam 65-75% arbutina unesenog oralno odvija se u jetri u dvije faze. U prvoj fazi se deglikolizira, a u drugoj fazi konjugira, te se nastali metaboliti izlučuju iz organizma putem bubrega i urina (Garcia de Aribba i sur., 2013).

2.3. HIDROKINON

Hidrokinon (4-hidroksifenil- β -glukopiranozid) je organski spoj koji se u prirodi može naći u mnogim biljkama kao i u kavi, čaju, pivi i vinu. Ovaj spoj poznat i pod nazivom β -arbutin u biljkama se najčešće pojavljuje u svojoj glikozilarnoj formi hidrokinon- β -D-glukopiranozid gdje ima protektivnu ulogu protiv brojnih patogena. Po kemijskoj strukturi je fenol, aromatski organski spoj (slika 5.). Baktericidna aktivnost pripravaka koji sadrže arbutin pripisuje se hidrokinonu, a smatra se da bi zbog prisustva dvije hidroksilne skupine na benzenskom prstenu hidrokinon trebao imati veći antioksidacijski kapacitet od arbutina koji sadrži samo jednu takvu skupinu (Takebayashi i sur., 2010).



Slika 5. Kemijska struktura hidrokinon

U biljnim pripravcima koji se koriste za inhibiciju rasta patogenih organizama, upravo je hidrokinon ta aktivna supstanca koja u urinarnom traktu djeluje antimikrobno gdje mu za potpuni učinak odgovara alkalni medij (Jahodár i sur., 1985, Schindler i sur., 2002), te je stoga ovaj aktivni spoj ključan za terapijsku aktivnost medvjete. S obzirom na to da hidrokinon djeluje antiseptički u lužnatom urinu, tijekom terapije medvjekom ne preporučuje se konzumacija kiselih namirnica (Schultz i sur., 2001).

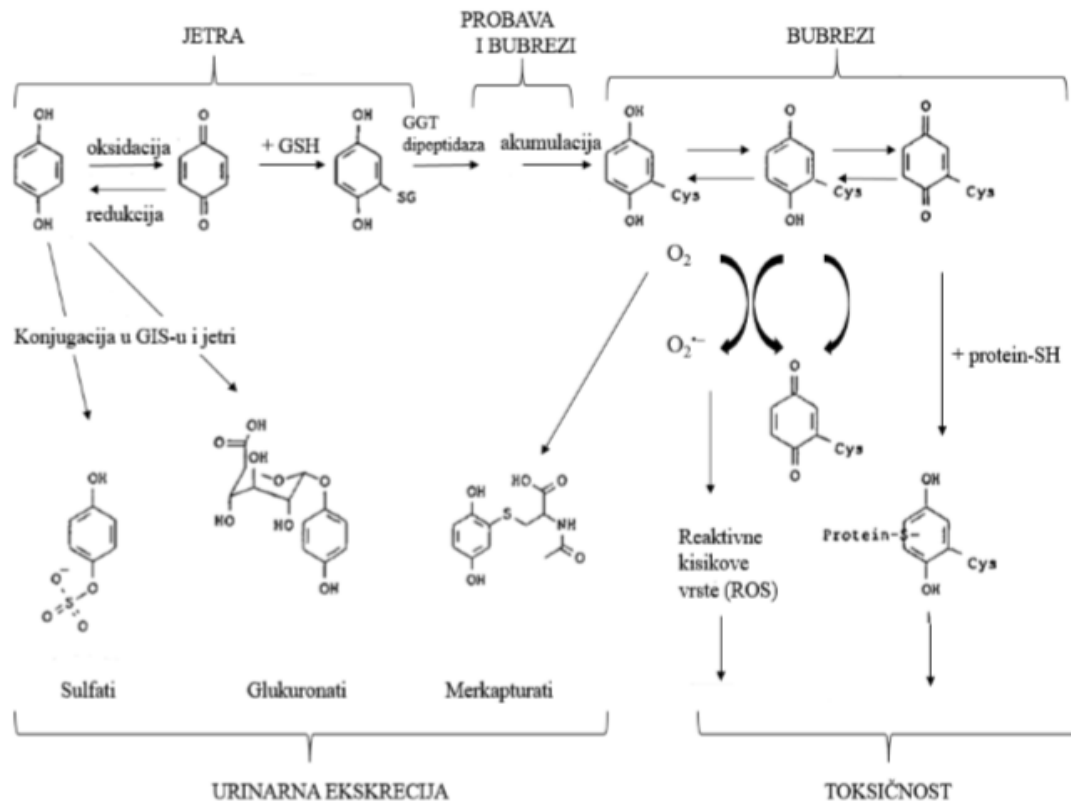
No osim ovih pozitivnih svojstava utvrđeno je da oksidacijom hidrokinona nastaje *p*-benzokinon, spoj koji je pokazao kancerogeni učinak kod štakora te leukemogeni kod ljudi. Dokazano je da potiče nastanak benignih tumora jetre i bubrega u glodavaca (Roza i sur., 2003).

2.3.1. Mehanizam djelovanja hidrokinona

Hidrokinon se nakon brze apsorpcije u gastrointestinalnom traktu dalje širi tkivima. Nakon oralne primjene metabolizira se konjugacijom u glukuronoidne i sulfatne estere te se izlučuje mokraćom (English i Deisinger, 2004; English i sur., 1994). Hidrokinon iz arbutina mogu stvoriti i pojedine bakterije koje uzrokuju upalu u mokraćnom sustavu te dolazi do potencijalnog autocidnog učinka, budući da hidrokinon pokazuje dobar antimikrobni učinak na bakterije uzročnike upala (Blaut i sur., 2006.).

U svojoj kemijskoj strukturi hidrokinon ima 2 hidroksilne skupine koje su nositelji antioksidativnih svojstava. Ipak, neka istraživanja u uvjetima *in vitro* na eritrocitima i fibroblastima pokazala su da arbutin ima dugotrajniji antioksidativni učinak od hidrokinona (Kivcak i sur., 2009).

Manje poznatim metaboličkim putem hidrokinon u jetri stvara konjugate glutationa, smanjujući koncentraciju glutationa te time povećava uvjete u stanici za nastanak oksidativnog stresa. Sekundarnom transformacijom konjugata hidrokinona u urinarnom traktu nastaje N-acetil-S-(2,5-dihidroksifenil) cistein (slika 6.) za kojeg je dokazano da uzrokuje nekrozu proksimalnih kanalića bubrega (English i sur., 1994).



Slika 6. Putevi biotransformacije hidrokinona (preuzeto i prilagođeno od: English i sur., 1994)

2.4. BAKTERIJSKA KULTURA *Escherichia coli*

Escherichia coli je nesporogena, gram negativna, štapičasta bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriaceae* (enterobakterije). Enterobakterije ili crijevne bakterije se nalaze u normalnoj mikroflori probavnog sustava ljudi i toplokrvnih životinja gdje pridonose obrani organizma od patogenih mikroorganizama (Marinculić i sur., 2009). Ove bakterije najčešći su uzročnici infekcija mokraćnog sustava, poglavito *E. coli*. U posebnim uvjetima infekcije

mokraćnog sustava mogu izazvati i druge gram-negativne i gram-pozitivne bakterije (Andrašević i sur., 2006), ali kod prvih akutnih infekcija mokraćnog sustava daleko najčešći uzročnik je *E. coli* (Ronald, 2002). Kod kompliciranih infekcija mokraćnog sustava s većom učestalošću javljaju i druge enterobakterije poput *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. te nefermentirajuće bakterije *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp.

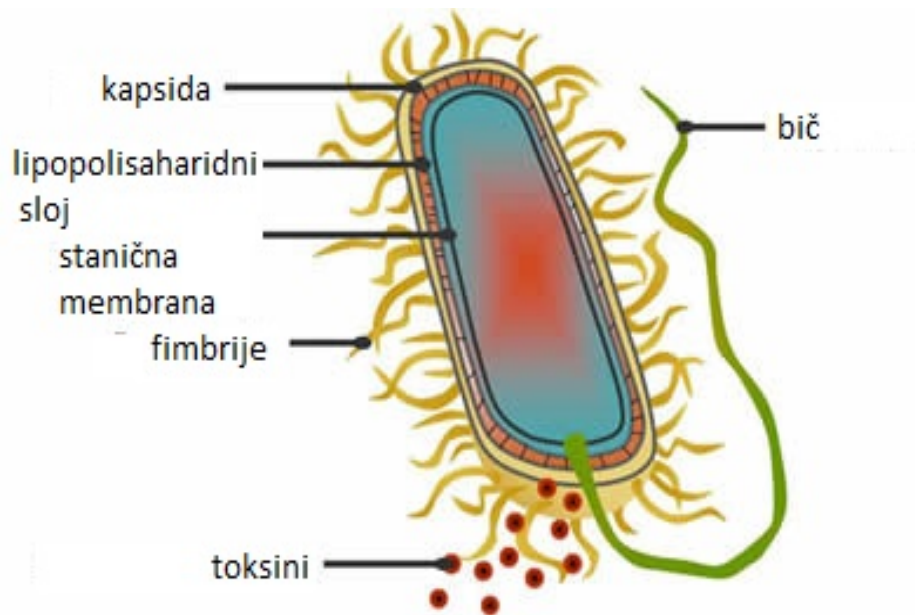
Bakterija *E. coli* je fakultativni anaerob i kemoorganoheterotrofni mikroorganizam koji koristi mješovito-kiselu fermentaciju u anaerobnim uvjetima čiji su produkti laktat, etanol, acetat, sukcinat i ugljikov dioksid (Madigan i Martinko, 2006). Tipična je mezofilna bakterija čija je minimalna temperatura rasta od 7 do 10°C, optimalna temperatura rasta oko 37°C, a maksimalna od 45 do 49°C (Adams, 2000). Iako ne podnosi uvjete na niskim temperaturama, ova bakterija može tjednima preživjeti na 4°C, a u nekim slučajevima i na -20°C.

E. coli se može klasificirati u četiri različite filogenetičke skupine: A, B1, B2 i D. Filogenetičke skupine B2 i D najčešće nose virulencijski vezane gene (VGs) koje se povezuju s bolestima izvan crijevnog trakta. Virulencijski vezani geni su oni geni koji omogućuju bakteriji *E. coli* da preživi nepovoljne okolišne uvjete i uzrokuje bolest kod domaćina. Bakterije ovih dviju filogenetičkih skupina uzrokuju različite crijevne i druge infekcije kao što je infekcija urinarnog trakta, septikemija i neonatalni meningitis (Clermont i sur., 2000). Filogenetičke skupine A i B1 se sastoje od sojeva prirodno prisutnih u probavnom sustavu ljudi i toplokrvnih životinja, te nekih sojeva iz okoliša (Rijavec i sur., 2008). Bakterije ovog soja obično nemaju nikakve virulencijske faktore (Johnson i sur., 2001). Bezopasni sojevi *E. coli* koji žive u ljudskom organizmu sudjeluju u sintezi vitamina K i B-kompleksa te za sprečavanje rasta i razmnožavanja određenih patogenih mikroorganizama u korist domaćina (Hudault i sur., 2001)

Većina bakterijskih infekcija započinje adhezijom patogenih bakterija na stanice napadnutog organizma. Posljedice mogu biti različite: od otpuštanja toksina do prodora bakterija u stanice tkiva (Goldhar i sur., 1987).

Urinarne infekcije su među najčešćim bakterijskim infekcijama kod odraslih osoba i čine 40 – 60 % svih bolničkih infekcija (Škerk V., 2002). Prijanjanje bakterija na uroepitelne stanice je prvi korak u nastanku infekcije. Adhezini su smješteni na specijalnim izdancima fimbrijama ili pilima (slika 7.). Fimbrije su vlasaste organele izgrađene od bjelančevina (Kučišec Tepeš N., 1994) i uz pomoć njih *E. coli* se veže na površinu biljnog ili životinjskog tkiva (Hagberg i

sur., 1981), posebice urinarnog trakta (Svanborg i sur., 1978). Osim pila, bakterijska stanica može adherirati na domaćina putem elektrostatskih i hidrofobnih sila (Türi i sur., 1997). Biljni ekstrakti koji posjeduju antioksidativni potencijal, među kojima je i ekstrakt medvjete, mogu smanjiti ili povećati patogeni potencijal bakterije, odnosno smanjiti ili povećati površinsku hidrofobnost te na taj način utjecati na adheziju bakterije (Dykes i sur., 2003).



Slika 7. Građa bakterije *E. coli*

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzgoj i priprema mikroorganizama

Mikroorganizam korišten u ovom radu je bakterija *E. coli* iz Zbirke mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzgoj bakterije *E. coli* proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37°C.

3.1.2. Priprema i uzgoj humanih stanica

U ovom radu istraživao se biološki učinak hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura (T24). Stanice su kultivirane u T-boci u RPMI 1640 mediju na temperaturi od 37 °C u atmosferi CO₂. Obilježja ove stanične linije prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Obilježja T24 stanične linije

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Organizam | <i>Homo sapiens</i> , čovjek |
| Tkivo | Mokraćni mjehur |
| Forma proizvoda | Smrznuto |
| Morfologija | Epitelna |
| Obilježje kulture | Adherentna |
| Bolest | Karcinom prijelaznih stanica |

3.1.3 Standard hidrokinona

U eksperimentalnom dijelu ovog rada, za pripremu vodene otopine hidrokinona koristio se komercijalno dostupan hidrokinon (ReagentPlus®, ≥99%, Merck).

3.1.4. Priprema hranjivih podloga i fosfatnog pufera

Za uzgoj bakterije *E. coli* u ovom radu korištene su krute i tekuće LB hranjive podloge te M9 - minimalna podloga s laktozom. Podloge su pripremljene prema uputama proizvođača, te sterilizirane prije korištenja u autoklavu pri tlaku 1,01 x 10⁵ Pa i temperaturi 121 °C u vremenu od 15 min. Sastav LB i M9 podloge prikazan je u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Sastav kompletne LB hranjive podloge

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

+ 15 g agara za krutu LB hranjivu podlogu

Tablica 3. Sastav M9-minimalne podloge s laktozom

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|------------------------------------------------|-------------------|
| Na_2HPO_4 | 6 g |
| KH_2PO_4 | 3 g |
| NaCl | 5 g |
| NH_4Cl | 1 g |
| Agar | 15 g |
| 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 2 mL |
| 1 M CaCl_2 | 100 μL |
| 20% laktoza | 10 mL |
| Tiamin (2 mg mL ⁻¹) | 200 μL |

Tablica 4. Sastav fosfatnog pufera (PBS)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|------------------------------------------------------|----------|
| NaCl | 8 g |
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 1, 15 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g |
| Destilirana voda | 1000 mL |

3.1.5. Priprema otopina za eksperimente

Tablica 5. Ishodišna otopina Neutral red boje (g = 5 mg mL⁻¹)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|------------------|----------|
| Neutral red boja | 50 mg |
| Etanol | 10 mL |

Tablica 6. Radna otopina Neutral red boje (g = 0,05 mg mL⁻¹)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|-----------------------------------------------------------------|----------|
| Ishodišna otopina Neutral red boje (g = 5 mg mL ⁻¹) | 0,1 mL |
| RPMI medij za uzgoj stanica | 9,9 mL |

Tablica 7. Otopina za odbojavanje

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

Tablica 8. Triton X-100 (w = 0,01 %)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|----------------|------------|
| Triton X-100 | 10 μ L |
| Fosfatni pufer | 10 mL |

Tablica 9. Ishodišna otopina 2, 7 – diklorofluoresceindiacetata (DCHF-DA; c = 2 mM)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|----------|----------|
| DHCF-DA | 0,0015 g |
| DMSO | 1,5 ml |

Tablica 10. Radna otopina 2, 7 – diklorofluoresceindiacetata (DCHF-DA; c = 0,05 mM)

| SASTOJAK | KOLIČINA |
|-----------------------------------|----------|
| Ishodišna otopina DHCF-DA (c=2mM) | 0,25 ml |
| Fosfatni pufer | 9,75 ml |

3.1.6. Pribor

- Markeri za pisanje
- Papir za vaganje
- Petrijeve zdjelice

- Automatske pipete (20, 200 i 1000 μ L)
- Propipete
- Nastavci za pipete
- Epruvete
- Kivete za spektrofotometar
- Kivete po Ependorfu
- Erlenmayerove tikvice
- Laboratorijske staklene čaše
- Žlice
- Vata
- T- boce, Falcon (BD Company, SAD)
- Türken-Bürkova komora
- Mikrotitarske pločice s 96 bunarića
- Mikrotitarske pločice s 24 bunarića
- Staklene i plastične menzure
- Špatule
- Mikroepuvete
- Stakleni lijevak

3.1.7. Aparature

- Analitička vaga (1712 Mp8, Siver Edition, Sartorius, Velika Britanija)
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC- 240, Tehnica- Železniki, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ (Forma Scientific, SAD)
- Komora za sterilni rad, Iskra (Slovenija)
- Spektrofotometar, Cecil Instruments Ltd, Tehnical Centre Cambrige, Engleska
- Vaga (Sartorius, Engleska)
- Vibromikser EV-202, Tehnica- Železniki, Slovenija

3.1.8. Kemikalije

- Bacto-tripton, Biolife, Italija
- Kvašček ekstrakt, Biolife, Italija

- Natrijev klorid (NaCl), Carlo Erba Reagents, Francuska
- Natrijev hidrogenfosfat, Gram-mol d.o.o, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat, Riedel- De Hean, Njemačka
- Agar, Biolife, Italija
- Magnezijev sulfat, Merck, Njemačka
- Kalcijev klorid, Kemika, Hrvatska
- Laktoza Kemika, Hrvatska
- Tiamin, Fluka, Njemačka
- RPMI 1640 medij, Capricorn Scientific, GmbH, Njemačka
- Triton X-100, Acros Organics, Belgija
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), Feinchemie K.-H. Kallies KG, Njemačka
- Diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA), Sigma Aldrich, Canada

3.2. METODE RADA

3.2.1. Testiranje citotoksičnosti hidrokinona na bakteriju *E. coli*

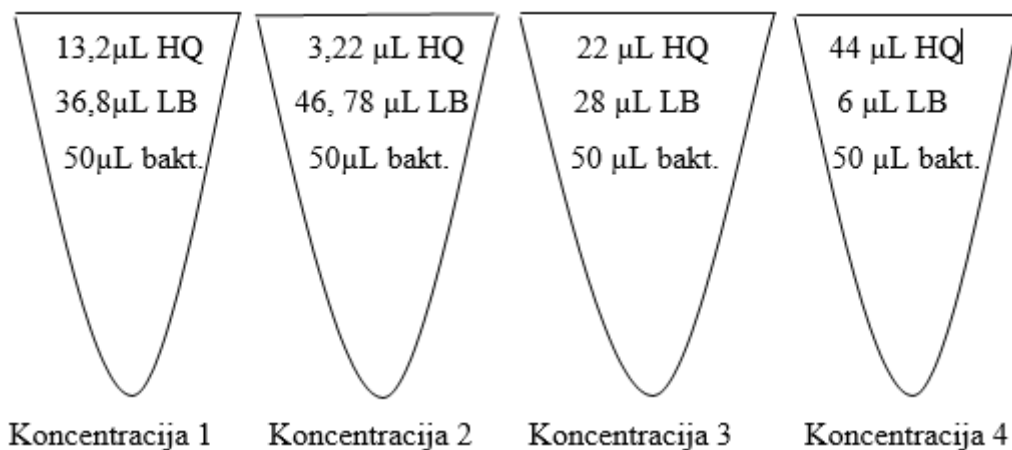
Bakterijska kultura *E. coli* uzgojena je u tekućoj LB kompletnoj hranjivoj podlozi te je nakon 24 h uzgoja podešena optička gustoća bakterijske suspenzije na 0,05 (OD_{600} , *optical density*) nakon čega je takva bakterijska suspenzija inkubirana na 37 °C u vremenskom intervalu od 22 h. Izradom krivulje rasta ispitivane bakterijske kulture, određeno je da je 22 h uzgoja ovom metodom vrhunac eksponencijalne faze rasta što je potrebno za eksperiment ispitivanja citotoksičnosti. Koncentracije hidrokinona koje su korištene u radu navedene su u tablici 11. Koncentracija 1 predstavlja teorijsku vrijednost hidrokinona kojemu su izložene bakterije nakon konzumacije jedne šalice čaja (Sieggers, C. P., 1997) (Garcia de Aribba i sur., 2013). Koncentracija 2 predstavlja koncentraciju hidrokinona koja je izmjerena HPLC (*engl.* High performance liquid chromatography) analitičkom metodom nakon hidrolize uzorka ekstrakta medvjete (3g suhih listića medvjete ekstrahiranih u 150 ml kipuće vode – 1 dnevni napitak čaja) 2 h pri 80 °C na način da je u 600 μ L uzorka dodano 68 μ L 1.2M HCl. Koncentracija 3 je koncentracija arbutina izmjerena HPLC analitičkom metodom u 1 dnevnom napitku čaja, a

koncentracija 4 u dnevnoj dozi napitka čaja (3 šalice) pa su ove koncentracije uzete kako bi se ispitalo djelovanje ukoliko se sav arbutin tijekom konzumacije metabolizira u hidrokinon.

Tablica 11. Koncentracije hidrokinona korištene u ispitivanju njegovog citotoksičnog djelovanja na bakterijsku kulturu *E. coli*:

| | |
|------------------------|----------------------------|
| <i>Koncentracija 1</i> | 1,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <i>Koncentracija 2</i> | 32,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <i>Koncentracija 3</i> | 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <i>Koncentracija 4</i> | 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |

Na slici 8. prikazan je postupak pripreme koncentracija hidrokinona korištenih u radu. U 4 Eppendorf epruvete otpipetirana je određena koncentracija LB tekuće podloge, bakterijska suspenzija *E. coli* te alikvoti uzeti iz ishodišne otopine hidrokinona koju smo pripremili otapanjem 1 mg hidrokinona u 1 mL LB tekuće hranjive podloge za koncentracije 2, 3 i 4 dok je za pripremu koncentracije 1 korištena ishodišna otopina od 0,01 mg mL^{-1} . Ukupni volumen u svakoj Eppendorf epruveti je iznosio 100 μL . Kontrola je pripremljena na način da je 50 μL tekuće podloge LB pomiješano s 50 μL bakterijske suspenzije.



Slika 8. Postupak pripreme odgovarajućih koncentracija hidrokinona (HQ) korištenih u ispitivanju citotoksičnosti na bakterijsku kulturu *E. coli* (Koncentracija 1 - 1,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Koncentracija 2 - 32,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Koncentracija 3 - 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Koncentracija 4 - 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Ovaj eksperiment proveden je u dva različita uvjeta tretmana. U prvom slučaju bakterijske stanice su tretirane različitim koncentracijama hidrokinona (1,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 32,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$), te su inkubirane u termostatu pri uvjetima temperature 37°C u vremenskom razdoblju 1 h i 2 h. U drugom slučaju su suspenzije bakterijskih stanica i hidrokinona inkubirane na 37 °C uz aeraciju (100 o min^{-1}) 1 h i 2 h tretmana.

Broj živih stanica određen je na način da su naciepljivana odgovarajuća razrjeđenja na kompletne LB hranjive podloge i selektivne M9 minimalne podloge s laktozom u obliku kapljica i to po tri replike pojedinog razrjeđenja. Prvo razrjeđenje dobiveno je naciepljivanjem 10 μL originalne bakterijske suspenzije u 90 μL fosfatnog pufera (PBS). Nakon toga je prenesen volumen od 10 μL prvog razrjeđenja u 90 μL fosfatnog pufera (PBS) čime je dobiveno drugo razrjeđenje. Uzastopnim ponavljanjem opisanog postupka pripremljena je serija takvih razrjeđenja, maksimalno do šestog.

Hranjive podloge naciepljene razrjeđenjima priređenih prethodno opisanim postupkom inkubirane su 24 h (LB kompletna hranjiva podloga) odnosno 48 h (selektivna hranjiva podloga s laktozom) u termostatu na 37 °C. Nakon isteka vremena inkubacije, izrasle kolonije su izbrojane te je izračunat postotak preživljenja prema sljedećoj formuli:

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

3.2.2. Testiranje citotoksičnog učinka hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura (T24)

Testiranje citotoksičnog učinka hidrokinona na tumorske stanice mokraćnog mjehura provedeno je Neutral red metodom. Princip ove metode je da slaba kationska boja „neutral red“ neionskom difuzijom ulazi u žive stanice gdje se veže na lizosomski matriks. Stanice čija je plazma odnosno lizosomalna membrana oštećena uslijed djelovanja određenog ispitivanog ksenobiotika ne mogu zadržati boju te stoga boju veže samo žive stanice. Uslijed toga, količina vezane, a potom ponovno oslobođene boje Neutral red, proporcionalna je količini živih stanica koje su preživjele tretman određenim ksenobiotikom (Babich i sur., 1991).

Nakon naglog odmrzavanja, stanice su uzgojene u T-boci u RPMI 1640 mediju na temperaturi od 37 °C u atmosferi CO₂. Nakon inkubacije, stanice su presađene u 2 mikrotitarske ploče od 96 jažica. U svaku jažicu naciepljeno je 100 µL stanica koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹, dodan je RPMI medij te je sve ostavljeno 24 h da stanice adheriraju za dno jažica. Pripremljena je otopina hidrokinona koncentracije 1 mg mL⁻¹ u RPMI 1640 mediju koja je onda korištena kao ishodišna otopina za pripremu radnih koncentracija hidrokinona (1,32 µg mL⁻¹, 32,2 µg mL⁻¹, 220 µg mL⁻¹, 880 µg mL⁻¹). Nakon 24 h uklonjen je medij, a u svaku jažicu u mikrotitarskoj ploči naciepljeno je po 100 µL prethodno pripremljene otopine hidrokinona određene koncentracije.

Tretman stanica hidrokinonom trajao je 2 h, 1 h i 20 min. Nakon prolaska vremena tretmana hidrokinon je uklonjen, te su stanice isprane sa 100 µL fosfatnog pufera. Potom je u svaku jažicu dodano po 100 µL u mediju pripremljena Neutral red boje koncentracija 0,5 mg mL⁻¹ te su ploče inkubirane 45 min u CO₂ inkubatoru. Radna otopina Neutral red boje pripremljena je iz ishodišne otopine Neutral red boje (tablica 4 i tablica 5). Nakon isteka vremena boja je izvađena, stanice su ponovno isprane fosfatnim puferom, te je potom u svaku jažicu dodana otopina za odbojavanje.

Ispitivanja citotoksičnosti hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura (T24) rađena su sa i bez oporavka. Tretman bez oporavka podrazumijeva mjerenje rezultata neposredno nakon tretmana hidrokinonom, dok su kod tretmana s oporavkom stanice nakon tretmana hidrokinonom inkubirane ponovno u mediju 24h u CO₂ inkubatoru te su tek tada

napravljena potrebna mjerenja. Na spektrofotometru je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 520 nm. Postotak preživljenja izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} = (A_{520\text{nm}} \text{hidrokinona} / A_{520\text{nm}} \text{kontrola}) * 100$$

3.2.3. Testiranje prooksidativnog učinka hidrokinona DCFH-DA metodom

Prooksidativni učinak hidrokinona određivali smo DCFH-DA fluorimetrijskim testom. Ovaj test se često koristi za otkrivanje reaktivnih kisikovih međuprodukata i za procjenu ukupnog oksidativnog stresa. DCFH-DA lako prolazi kroz staničnu membranu, nakon čega ga unutarstanične esterase deacetiliraju. Dobiveni 2',7'diklorodihidrofluorescein (DCFH) reagira sa slobodnim radikalima koji potječu od vodikovog peroksida (ili nekog drugog oksidirajućeg kisikovog spoja) u stanici i oksidira se u fluorescentni 2',7' diklorofluorescein (DCF) (Afri i sur., 2004).

U crne mikrotitarske pločice od 96 jažica naciijepljeno je 100 μL stanica koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Potom je stanicama dodan RPMI medij, i sve je ostavljeno 24h da stanice adheriraju za dno jažica. Nakon vezanja stanica za dno medij je uklonjen, a stanice su tretirane sa 100 μL otopine hidrokinona određene koncentracije. Pločice su ostavljene u CO_2 inkubatoru pri temperaturi od 37°C na tretman od 2h, 1h te 20 min. Nakon tretmana iz jažica je uklonjen hidrokinon, stanice su isprane sa 100 μL fosfatnog pufera te tretirane sa 100 μL 0,05 mM otopine DCFH-DA (tablica 8) i ostavljene 45 minuta u CO_2 inkubatoru. Nakon isteka vremena mjeri se intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini $\lambda_{\text{em}}=485$ i $\lambda_{\text{ex}}= 530$ nm. Indukcija slobodnih radikala izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Indukcija slobodnih radikala (\% u odnosu na kontrolu)} = (\text{intenzitet flouescencije tretiranih stanica} / \% \text{ preživljenja}) / \text{intenzitet flouescencije kontrole} * 100$$

3.2.4. Testiranje utjecaja hidrokinona na vezanje bakterija za humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura (T24)

U mikrotitarske ploče s 24 bunarića naciijepljen je volumen od 1 mL stanične suspenzije koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice sa RPMI medijem su ostavljene 24 h u CO_2 inkubatoru, te su potom tretirane otopinom hidrokinona i stavljene na tretman od 2h i 1 h.

Nakon uklanjanja otopine hidrokinona stanice su isprane fosfatnim puferom, te je u svaku jažicu nacijepljeno 500 μ L ranije pripremljene bakterijske suspenzije čija je optička gustoća podešena na 0,3 (OD₆₀₀, Optical density). Nakon 30 min, s humanih stanica je uklonjena bakterijska suspenzija te su stanice isprane fosfatnim puferom. Potom je u svaku jažicu dodano 100 μ L 0,01 % Triton X-100 otopine (tablica 7.) i pločice su odstajale 15 min u termostatu na 37 °C.

Mikrorazrijeđenja stanica pripremljena su u mikrotitarskoj pločici, do milijuntog razrjeđenja. Bakterije su zatim nacijepljene na LB i M9-minimalne hranjive podloge s laktozom te su stavljene u termostat na vremenski tretman od 48 h. Nakon isteka vremena izbrojane su porasle bakterije, te je postotak adhezije u odnosu na kontrolu koja nije bila tretirana hidrokinonom izračunat prema sljedećoj formuli:

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

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je u statističkom programu SPSS 17.0 (IBM, Chicago, SAD). Podaci su obrađeni korištenjem *one way* ANOVA testa uz statističku značajnost od 95%.

4. REZULTATI I RASPRAVA

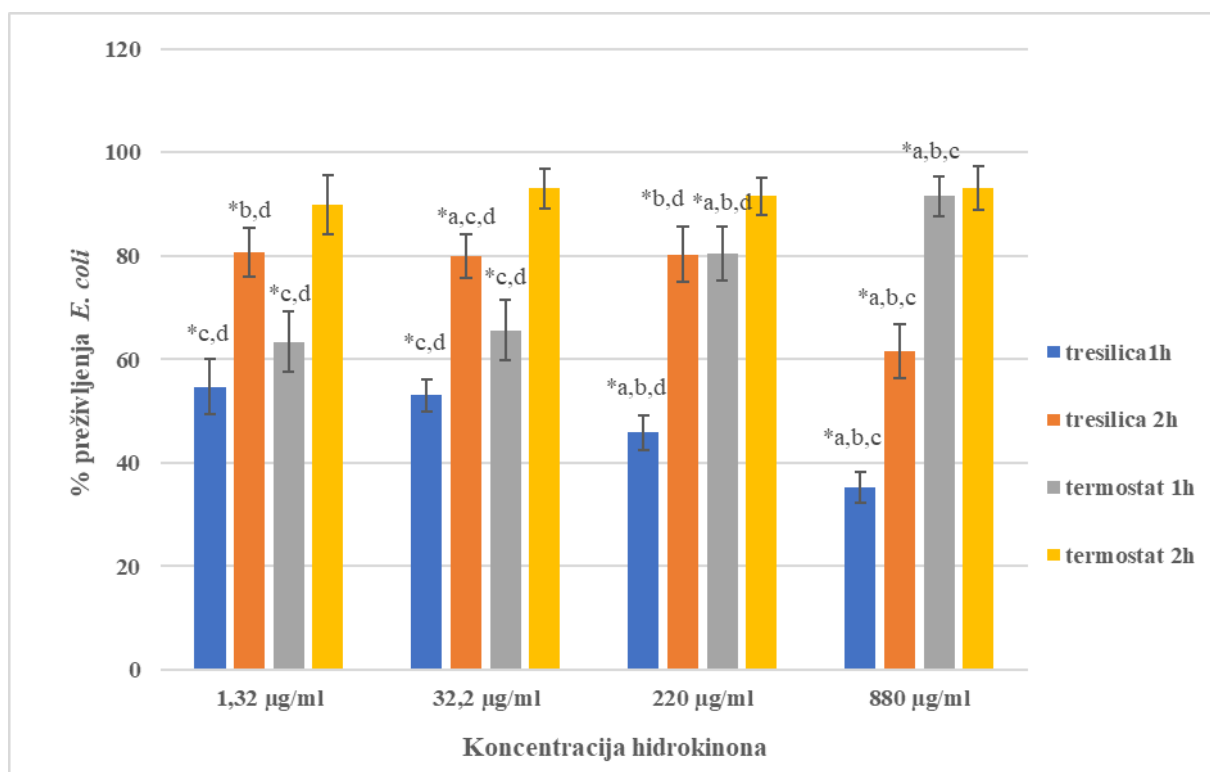
Zbog svojih ljekovitih svojstava napitci pripremljeni od lišća medvjete već se dugi niz godina koriste kod liječenja infekcija mokraćnog mjehura. Baktericidna aktivnost pripravka se pripisuje hidrokinonu koji je u ovom radu upotrijebljen kao svježi ekstrakt u koncentracijama koje su uobičajene za dnevnu konzumaciju napitka pripremljenog od navedene biljke.

Ispitivanje citotoksičnog učinka hidrokinona na ove stanice napravljen je Neutral red metodom. Također, testiran je i prooksidativni učinak ekstrakta hidrokinona DCFH-DA metodom. Svi dobiveni podaci su statistički obrađeni i prikazani grafički.

4.1. CITOTOKSIČNOST HIDROKINONA NA BAKTERIJU *E. coli*

Ispitivanje citotoksičnosti hidrokinona na bakterijsku kulturu *E. coli* provedeno je u dva različita uvjeta tretmana (sa i bez aeracije) kako bi se utvrdilo da li uvjeti pod kojima se vrši ispitivanje citotoksičnosti utječe na krajnji rezultat.

Oba tretmana pod različitim uvjetima trajala su 2 h, odnosno 1 h, i korištene su iste koncentracije hidrokinona ($1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $880 \mu\text{g mL}^{-1}$).



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja bakterijske kulture *E. coli* o koncentraciji hidrokinona

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-d) – statistički značajna razlika u odnosu na koncentracije ($\mu\text{g/mL}$) a (1,32), b (32,2), c (220), d (880)

Rezultati ovog eksperimenta su statistički obrađeni i prikazani grafički (slika 9.) te jasno pokazuju citotoksično djelovanje hidrokinona na bakteriju *E. coli*. Iz grafičkog prikaza se vidi kako vrijeme izlaganja bakterijskih stanica hidrokinonu ima utjecaj na preživljenje bakterijskih stanica. Produženjem tretmana s 1 h na 2 h vidljiv je porast preživljenja kod koncentracija $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $880 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Iz grafičkog prikaza se dalje može zaključiti kako najveću citotoksičnost pokazuje koncentracija od $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ kod suspenzije tretirane na tresilici u vremenu od 1 h, a najmanju ali i dalje statistički značajnu citotoksičnost u odnosu na kontrolu pokazuje koncentracija od $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ čuvana u termostatu u vremenskom tretmanu od 2 h.

Jasno se može uočiti da je trend preživljenja bakterije znatno veći kod bakterijske suspenzije koja je tretirana u termostatu, čime je dokazana pretpostavka kako se toksični učinak

hidrokinona na bakteriju pojačava ukoliko je tijekom tretiranja bakterije hidrokinonom suspenzija izložena stalnoj homogenizaciji, jer se na taj način stanice ne talože na dno čime se postiže ujednačeniji tretman hidrokinonom.

Antimikrobni učinak biljnih ekstrakata definira se kao MIK vrijednost odnosno kao najniža antimikrobna koncentracija ispitivane tvari koja će spriječiti vidljivi rast mikroorganizma (Taguri i sur., 2006). Najčešći mehanizmi djelovanja antimikrobnih tvari na bakterijsku stanicu su: poremećaj transmembranskog staničnog transporta i inhibicija aktivnog transporta kroz staničnu membranu, inhibicija kataboličkih/anaboličkih reakcija, poremećaji replikacije, gubitak integriteta stanične membrane što dovodi do gubitka esencijalnih unutarstaničnih sastojaka i direktna liza stanice (Denyer i Stewart, 1998).

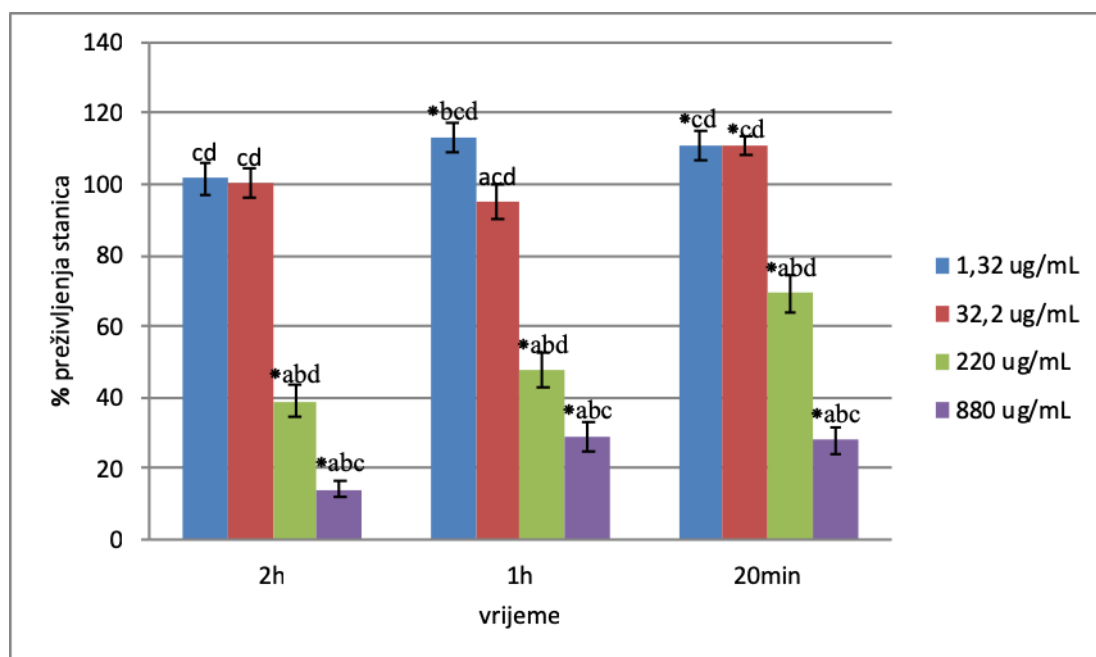
Jurica (2016) je u svom radu istraživao antimikrobno djelovanje ekstrakta obične planike (*Arbutus unedo* L.) i glavnih sastavnica lista obične planike: arbutina i njegovog metabolita hidrokinona. Za istraživanje antibakterijskog učinka korišteni su standardni laboratorijski sojevi bakterija *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *K. pneumoniae ESBL* i *E. faecalis* i dvije gljivice *C. albicans* i *C. Parapsilosis*. Budući da u lužnatom urinu biotransformacijom iz arbutina nastaje antimikrobno aktivan hidrokinon, ispitane su i vrijednosti MIK-ova hidrokinona. U istraživanju je korištena vodena i metanolna otopina hidrokinona koncentracije 256 mg mL⁻¹. Hidrokinon je pokazao najjači učinak na ispitivane mikroorganizme u usporedbi s ekstraktima lista i arbutinom. Za hidrokinon (vodena otopina i 20 %-tna metanolna otopina) dokazan je snažan antimikrobni učinak za *E. faecalis* ATCC 29212 i 39997 (MIK 0,2 mg mL⁻¹), a umjeren antibakterijski učinak za sve ostale ispitivane sojeve bakterija. Hidrokinon je pokazao snažan antifungalni učinak na kliničke sojeve *C. albicans* i *C. parapsilosis* s vrijednostima MIK-a od 0,2 mg mL⁻¹ bez obzira na vrstu otapala, a na standardni soj *C. albicans* bio je djelotvoran samo u metanolnoj otopini s vrijednosti MIK-a od 0,2 mg mL⁻¹. Kod vodene otopine hidrokinona unatoč nedostatku inhibicijskog učinka u orijentacijskom testu kod *K. pneumoniae ESBL* 39772 uočena je niska vrijednost MIK-a koja ukazuje na umjeren antimikrobni učinak (0,8 mg mL⁻¹). Istraživanje Jurice (2016) potvrdilo je pretpostavku da je za antimikrobni učinak lista obične planike direktno odgovoran hidrokinon, a indirektno arbutin. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima ovog istraživanja, gdje se također vidi umjeren antimikrobni učinak hidrokinona na *E.coli* kod tretmana približno istom koncentracijom od 220 µg mL⁻¹, uz iznimku tretmana u tresilici od 1 h gdje je postotak preživljenja manji od 50 %.

4.2. CITOTOKSIČNOST HIDROKINONA NA HUMANU STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA (T24)

Citotoksičnost hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura određena je Neutral red metodom. Neutral red test pruža kvantitativnu procjenu broja živih stanica u kulturi. Jedan je od najčešće korištenih testova citotoksičnosti, a bazira se na prolasku i akumulaciji boje „neutral red“ u lizosome živih stanica. Uslijed oštećenja membrane lizosoma ili smrti stanica, boja se ne nakuplja u lizosomima (Babich i sur., 1991).

Stanice su tretirane s 4 koncentracije hidrokinona: $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $220 \mu\text{g mL}^{-1}$, $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ a tretman je trajao 2h, 1h odnosno 20 min u uvjetima tretmana sa i bez oporavka.

Koncentracije od $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazale su visoku citotoksičnost na stanice u oba slučaja, a vrijeme izlaganja T24 stanica hidrokinonu nije značajno utjecalo na postotak preživljenja. Rezultati citotoksičnosti hidrokinona na stanice raka mokraćnog mjehura koje su tretirane bez oporavka prikazani su na slici 10.

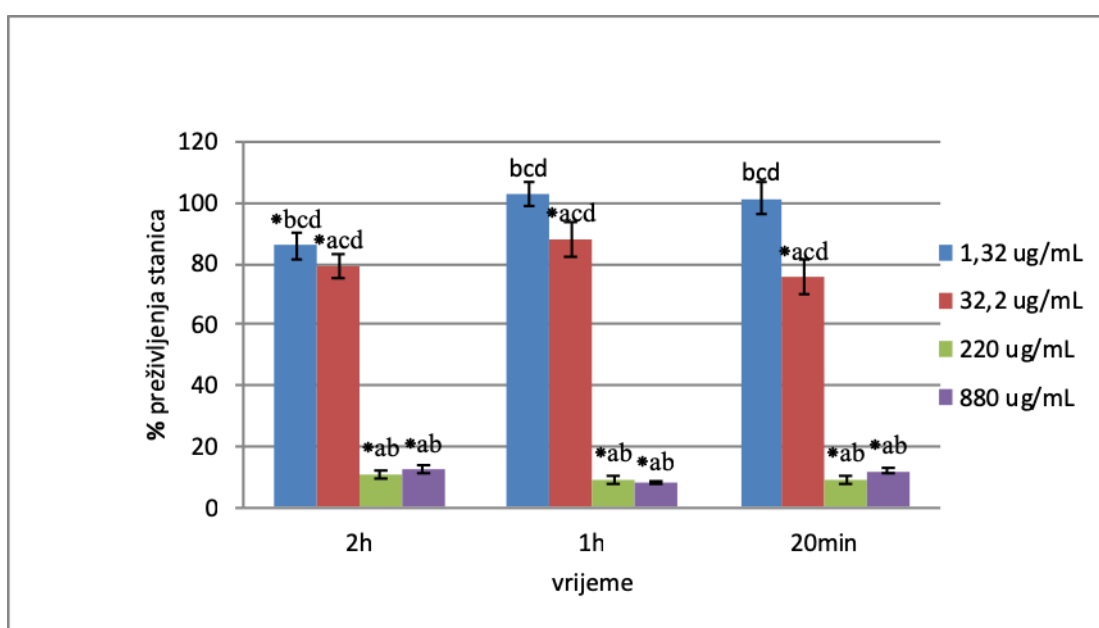


Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja T24 stanica o koncentraciji hidrokinona i vremenu izlaganja stanica ekstraktu bez oporavka

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-d) – statistički značajna razlika u odnosu na koncentracije ($\mu\text{g/mL}$) a (1,32), b (32,2), c (220), d (880)

Iz grafičkog prikaza na slici 10. vidljivo je kako najniža koncentracija ekstrakta od 1,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod sva tri vremenska tretmana nema ni citotoksično ni proliferativno djelovanje na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura T24 u odnosu na kontrolu. Kod koncentracija od 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koja odgovara količini arbutina u jednoj šalici napitka odnosno dnevnoj dozi napitka pripremljenog od medvjete uočen je jako citotoksičan učinak s obzirom na to da je preživljenje manje od 60% u sva tri vremenska razdoblja tretmana (osim koncentracije 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koja kod tretmana od 20 min pokazuje više od 60% preživljenje). Produženjem vremenskog tretmana primjećuje se o porast citotoksičnog učinka hidrokinona na T24 staničnu liniju.



Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti postotka (%) preživljenja T24 stanica o koncentraciji hidrokinona i vremenu izlaganja stanica ekstraktu s oporavkom

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-d) – statistički značajna razlika u odnosu na koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) a (1,32), b (32,2), c (220), d (880)

Iz grafičkog prikaza na slici 11. koja pokazuje rezultate citotoksičnosti hidrokinona na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura T24 koje su podvrgnute tretmanu 24-satnog oporavka vidi se da kod sva tri vremenska tretmana koncentracije od 32,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$ imaju statistički značajan citotoksični učinak na T24 stanice. Koncentracija od 1,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koja predstavlja teorijsku vrijednost hidrokinona u jednoj šalici napitka pripremljenog iz ekstrakta medvjete ne pokazuje citotoksičan efekt na T24

stanice kod tretmana hidrokinonom 20 min i 1 h već samo kod produljenog djelovanja od 2 h (oko 80 % preživljenje). Prema tome možemo zaključiti da sve četiri ispitivane koncentracije hidrokinona imaju određeni citotoksičan učinak na T24 staničnu liniju prilikom 2-satnog tretmana. Dvije najveće koncentracije (220 i 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$) imaju izrazito visok stupanj citotoksičnog utjecaja jer je preživljenje stanica nakon 24 satnog oporavka manji od 20%.

Rezultati citotoksičnosti hidrokinona na T24 staničnu liniju s oporavkom i bez oporavka pokazuju da kod sva tri vremenska tretmana koncentracije hidrokinona od 220 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 880 $\mu\text{g mL}^{-1}$ imaju značajan citotoksični učinak na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura s time da je u slučaju s oporavkom taj učinak puno drastičniji. U konačnici, može se zaključiti kako koncentracija hidrokinona koja odgovara količini hidrokinona koja se unese konzumacijom jedne doze (šalice) napitka pripremljenog od medvjete (uz pretpostavku da sav arbutin tijekom konzumacije metabolizira u hidrokinon) rezultira značajnom citotoksičnošću na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura.

Rezultati koje su De Arriba i sur. (2013) dobili testiranjem u uvjetima *in vitro* također potvrđuju genotoksični rizik od izlaganja višim koncentracijama hidrokinona, ali navode kako je genotoksični rizik izlaganja koncentraciji hidrokinona od 11 $\mu\text{g kg}^{-1}$, koja bi ujedno odgovarala količini hidrokinona stvorenoj metabolizmom maksimalne dnevno dopuštene koncentracije arbutina (420 mg), relativno nizak. Williams i sur., (2007) u svom istraživanju *in vivo* govore o pozitivnom učinku hidrokinona kod mužjaka Fischer 344 štakora pri dozama 25-100 mg kg^{-1} gdje nije uočena hepatotoksičnost, već je naprotiv, hidrokinon pokazao antikancerogeni učinak.

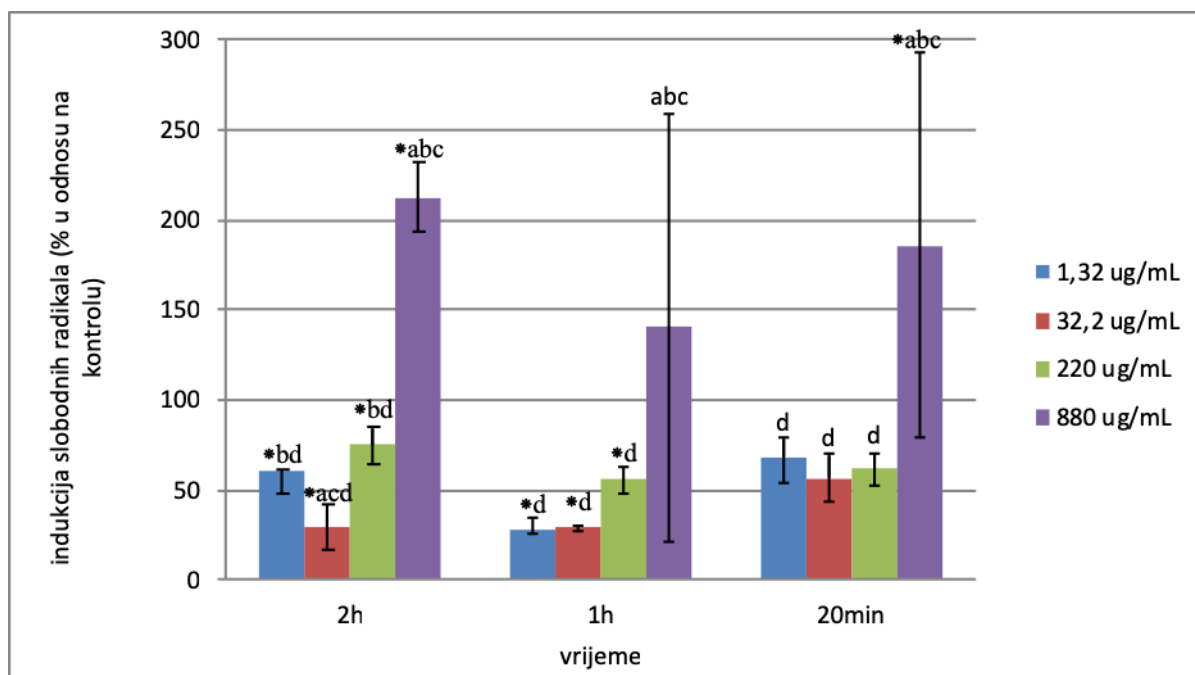
Jurica i sur. (2017) u istraživanju su proučavali mehanizme toksičnosti hidrokinona i odnose između njegovih citotoksičnih, genotoksičnih i citogenetičkih učinaka na ljudskim limfocitima periferne krvi. Tretman hidrokinonom trajao je 24 h, a korištene koncentracije hidrokinona bile su 8, 140 i 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posljedice izlaganja testiranom spoju istražene su primjenom testa za otkrivanje stanica u apoptozi i nekrozi, komet-testa u alkalnim uvjetima i tzv. cytome inačice citohalazinom blokiranog mikronukleus-testa. Sve korištene koncentracije hidrokinona izazvale su relativno nisku citotoksičnost u limfocitima, koji većinom ugibaju apoptozom. Međutim, pri istim koncentracijama primjenom komet-testa uočene su značajne promjene u razinama primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu.

Prema European Medicines Agency (2012) arbutin, odnosno njegov metabolit hidrokinon pri koncentraciji koja odgovara maksimalnom dopuštenom dnevnom unosu arbutina, je pokazao vrlo nizak potencijal za izazivanje stanične smrti što dovodi do zaključka kako hidrokinon u ovome obliku nije toksičan za organizam, već služi kao antiseptik mukoznih membrana u bubrezima. Može se pretpostaviti da je razlog kontradiktornosti spomenutih radova s ovim istraživanjem činjenica koju su Peng i sur. (2013) iznijeli u svom radu, a koja kaže kako postoje jasne razlike utjecaja hidrokinona na određeni tip stanica, što upućuje na selektivnu citotoksičnost hidrokinona.

Pereira i sur. (2014) su istraživali učinak hidrokinona na stanicama karcinoma debelog crijeva (HCT116) i stanicama fibroblasta. Pokazalo se da tretman hidrokinonom ima dozno ovisan citotoksičan učinak na preživljenje HCT116 stanica i fibroblasta. Koncentracije hidrokinona od 227 μM , 454 μM , 908 μM , 2270 μM i 4541 μM značajno su smanjile preživljenje stanica. U usporedbi s kontrolom, metabolička aktivnost drastično se smanjila nakon izlaganja bilo kojoj koncentraciji jednakoj ili većoj od 227 μM hidrokinona. Ovaj negativan učinak na metaboličku aktivnost bio je učinkovitiji kod HCT116 stanica (11,25 %) nego kod stanica fibroblasta (43,22 %). Vrijeme trajanja tretmana iznosilo je 24 h, znatno duže od trajanja tretmana ovog rada što treba uzeti u obzir prilikom tumačenja i usporedbe rezultata rada Pereira i sur. (2014) u kojem je najniža koncentracija hidrokinona od 227 μM pokazala citotoksičan učinak na stanice HCT116, za razliku od koncentracije hidrokinona korištene u ovom radu od 293 μM ($32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) koja nije pokazala značajnu citotoksičnost na humanu staničnu liniju raka mokraćnog mjehura. U konačnici sintezom rezultata ovog rada i rada Pereira i sur. (2014) proizlazi kako izlaganje određenih staničnih linija koncentraciji hidrokinona koja odgovara koncentraciji hidrokinona u jednoj šalici napitka pripremljenog od medvjete (uz pretpostavku da sav arbutin tijekom konzumacije metabolizira u hidrokinon) rezultira značajnom citotoksičnošću na ispitivane stanične linije.

4.3. PROOKSIDATIVNI/ANTIOKSIDATIVNI UČINAK HIDROKINONA NA HUMANU STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA (T24)

Prooksidativni učinak hidrokinona određen je DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat) fluorimetrijskim testom. Korištene su 4 koncentracije hidrokinona, a vremensko trajanje tretmana iznosilo je 2h, 1 h te 20 min. Rezultati prooksidativnog učinka hidrokinona prikazani su grafički na slikama 12 i 13.



Slika 12. Grafički prikaz utjecaja hidrokinona na indukciju slobodnih radikala na T24 stanice bez oporavka

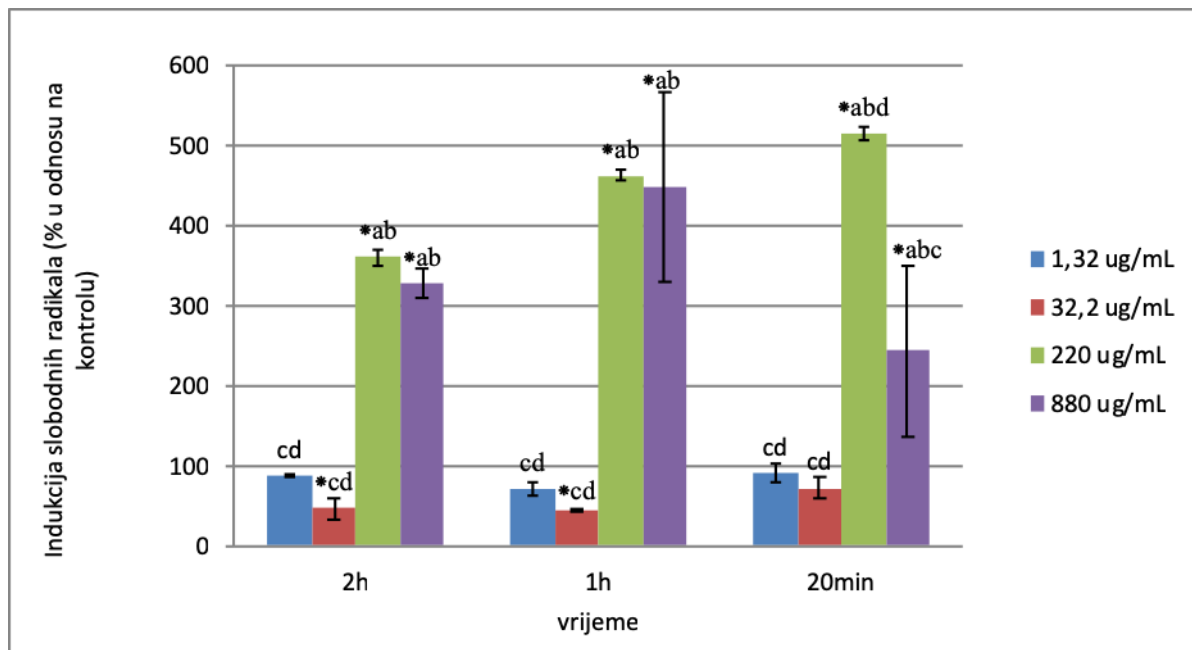
*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-d) – statistički značajna razlika u odnosu na koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) a (1,32), b (32,2), c (220), d (880)

Iz grafičkog prikaza na slici 12. vidljivo je značajno antioksidacijsko djelovanje tri koncentracije hidrokinona: $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ kod sva tri vremenska tretmana. Ove tri koncentracije hidrokinona najznačajniji antioksidacijski kapacitet pokazale su prilikom tretmana od 1 h .

Koncentracija od $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ najznačajniji antioksidacijski kapacitet pokazala je pri vremenu izlaganja od 20 min, a kod ostala dva vremenska tretmana pokazuje približno isti oksidacijski kapacitet. Prilikom sva tri vremenska tretmana koncentracija hidrokinona od $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ djelovala je prooksidativno. Ista koncentracija kod tretmana od 2 h i 20 min

statistički je značajna u odnosu na kontrolu, što znači da izaziva indukciju slobodnih radikala u stanicama raka mokraćnog mjehura.



Slika 13. Grafički prikaz utjecaja hidrokinona na indukciju slobodnih radikala na T24 stanice s oporavkom

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-d) – statistički značajna razlika u odnosu na koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) a (1,32), b (32,2), c (220), d (880)

Iz grafičkog prikaza na slici 13. vidljivo je da je statistički značajno antioksidacijsko djelovanje na stanice raka mokraćnog mjehura koje su podvrgnute tretmanu oporavka (T24) kod vremena tretiranja od 2 h i 1 h pokazala koncentracija hidrokinona od $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Kod koncentracija hidrokinona od $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ povećavanjem vremena izlaganja uočava se snižavanje prooksidativnog potencijala.

Najjači antioksidacijski potencijal pokazala je koncentracija od $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri vremenu izlaganja od 1 h. Koncentracije $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ kod sva tri vremena izlaganja pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu što znači da iste koncentracije potiču indukciju slobodnih radikala u stanicama raka mokraćnog mjehura.

U konačnici iz dobivenih rezultata ispitivanja prooksidativnog učinka hidrokinona na humanoj staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura proizlazi da hidrokinon u koncentraciji od $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ koja odgovara količini hidrokinona u jednoj šalici napitka pripremljenog od medvjeteke pri vremenskom tretmanu od 2 h i 1 h pokazuje antioksidacijsko djelovanje, ali pri

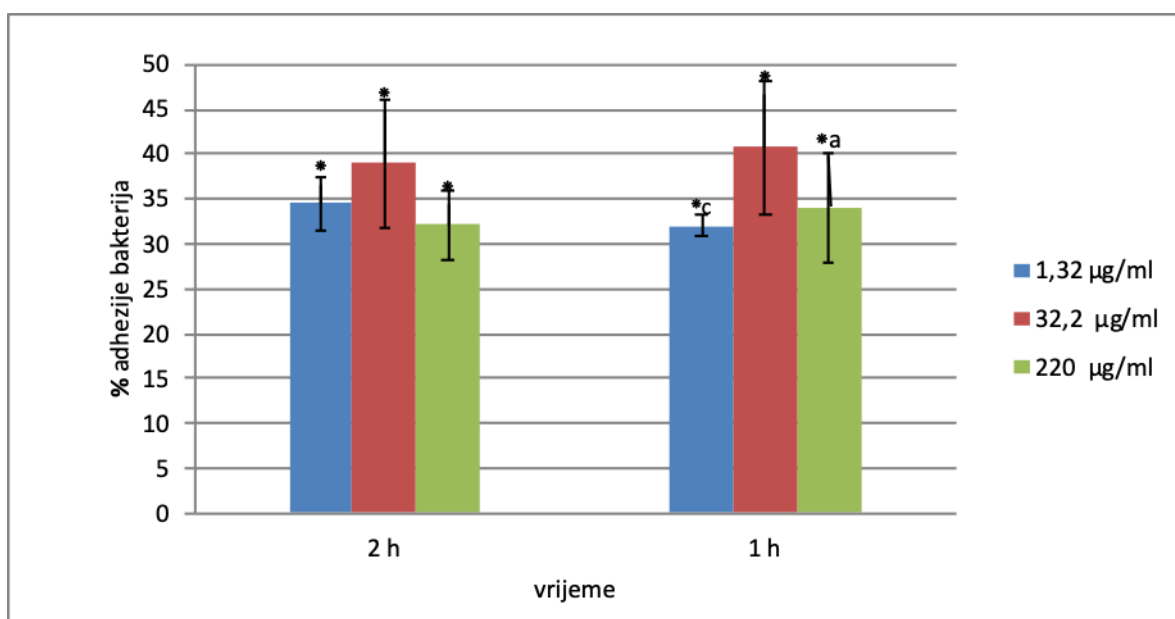
koncentraciji koje predstavljaju količinu hidrokinona koja se unese konzumacijom dnevno preporučene doze napitka pripravljenog od medvjette hidrokinon pokazuje prooksidativno djelovanje.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su ranija zapažanja o antioksidacijskom ali ujedno i prooksidativnom djelovanju polifenolnih spojeva biljaka. Halliwell (2008) u svom istraživanju iznosi kako reaktivne kisikove vrste dovode do starenja stanica, mutageneze, kancerogeneze te uzrokuju oksidaciju lipoproteina niske gustoće, te da prehrana bogata polifenolnim spojevima utječe na smanjenje rizika od bolesti povezanih sa starenjem. U *in vitro* uvjetima dokazao je antioksidacijski učinak polifenolnih spojeva, čemu pripisuje njihovo zaštitno djelovanje. Međutim, Halliwell iznosi kako polifenolni spojevi u određenim uvjetima i koncentracijama mogu djelovati i prooksidativno.

Jurica i sur. (2017) u istraživanju toksičnosti hidrokinona koncentracija 8, 140 i 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u vremenskom tretmanu od 2 h na ljudskim limfocitima periferne krvi primjenom komet testa uočili su značajne promjene u razinama primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu. Statistički značajno snižene vrijednosti svih parametara komet-testa u odnosu na kontrolne stanice upućuju na specifične mehanizme međudjelovanja hidrokinona i DNA, odnosno nastanka ukriženih veza u molekuli DNA i nastanak adukata u DNA nakon izloženosti dvjema višim koncentracijama hidrokinona. Povišene vrijednosti lomova u DNA, uočene nakon izlaganja najnižoj ispitanoj koncentraciji, upućuju na veći značaj oksidacijskih oštećenja i utjecaj mehanizama povezanih s inhibicijom enzima topoizomeraze. Kontroverze koje nastaju usporedbom rezultata ovog rada koji pokazuje antioksidacijska svojstva hidrokinona u koncentraciji od 1,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 32,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i rada Jurice i sur. koji pokazuje oksidacijsko djelovanje koncentracije hidrokinona od 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ možemo protumačiti kroz značajnu razliku u duljini trajanja tretmana i dokazanu tvrdnju kako se fenolni antioksidansi počinju ponašati kao prooksidansi u određenim uvjetima koji omogućuju njihovu autooksidaciju (Hagerman i sur., 1998).

4.4. UTJECAJ HIDROKINONA NA VEZANJE BAKTERIJA ZA STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA (T24)

Kod ispitivanja utjecaja hidrokinona na vezanje bakterija za stanice T24 korištena je bakterija *E. coli*. Stanična linija raka mokraćnog mjehura tretirane je vodenom otopinom hidrokinona koncentracije $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$, $32,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ u trajanju od 2 h i 1 h. Potom su stanice 30 min tretirane bakterijskom suspenzijom. Mikrorazrjeđenja su nacijepljena na hranjive podloge, te je nakon 24 h izračunat postotak adhezije bakterija koji je prikazan na slici 14.



Slika 14. Grafički prikaz utjecaja hidrokinona na adheziju bakterija na T24 stanice

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

(a-d) – statistički značajna razlika u odnosu na koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) a (1,32), b (32,2), c (220), d (880)

Na grafičkom prikazu vidljivo je značajno smanjenje postotka adhezije *E. coli* kod svih koncentracija neovisno o vremenskom tretmanu. Najjači efekt na adheziju bakterije hidrokinon postiže pri vremenskom tretmanu od 1 h u koncentraciji od $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$, a približno isti efekt ima i koncentracija hidrokinona od $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ kod tretmana od 2 h. Statistički značajna razlika u djelovanju javlja se među koncentracijama od $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri vremenskom tretmanu od 1 h.

Türi i sur, (1997) istraživali su učinak ekstrakta medvjetteke na promjenu površinske hidrofobnosti i adheziju na stanice domaćina SAT testom (*Salt aggregation test*). Test je urađen sa 155 sojeva *E. coli*, a tretman bakterija ekstraktom medvjetteke trajalo je 15 min.

Istraživanje je pokazalo kako ovaj ekstrakt znatno poboljšava hidrofobnost bakterije *E. coli* i njezina agregacijska svojstva. Iako točan spoj u ekstraktu medvjetke koji uzrokuje promjenu hidrofobnosti nije poznat autori navode kako dokazani efekt ekstrakta medvjetke može dovesti do smanjenja sposobnosti bakterije za vezanje na stanice domaćina što posljedično dovodi do lakšeg izlučivanja ovih bakterija iz organizma prirodnim putem.

Iz gore navedenog istraživanja dolazimo do zaključka kako su biološki aktivne tvari medvjetke značajni inhibitori adhezije bakterijskih kultura za stanične linije, što u konačnici potvrđuju rezultati i ovog rada u kojem je dokazana inhibitorna uloga hidrokinona prilikom vezanja bakterije *E. coli* za staničnu liniju raka mokraćnog mjehura.

5. ZAKLJUČAK

1. Hidrokinon pokazuje značajno citotoksično djelovanje na bakteriju *E. coli*.
Produženjem vremena izlaganja bakterijskih stanica hidrokinonu toksični učinak se smanjuje.
2. Toksični učinak hidrokinona na bakteriju jače je izražen kod suspenzije koja je tijekom tretiranja izložena stalnoj homogenizaciji čime se postiže ujednačeniji tretman.
3. Koncentracije hidrokinona od $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $880 \mu\text{g mL}^{-1}$ djeluju citotoksično na humane stanice raka mokraćnog mjehura, neovisno o duljini vremena tretmana.
4. Najviša koncentracija hidrokinona djeluje prooksidativno na stanice raka mokraćnog mjehura, dok najniže korištene koncentracije hidrokinona imaju antioksidacijsko djelovanje na stanice raka mokraćnog mjehura.
5. Hidrokinon u korištenim koncentracijama inhibira vezanje bakterije *E. coli* na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura smanjujući adhezivni učinak.

6. LITERATURA

Adams, M. R., Moss, M. O. (2000) Food Microbiology, 2. izd., Royal Society of Chemistry, London.

Afri, M., Frimer, A. A., Cohen, Y. (2004) Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids* **131**, 133-143.

Andrašević, S., Tambić Andrašević, A. (2006) Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus* **15**, 245-250.

Anonymous (2013) Alpha Arbutin, <<https://www.complexi-light.com/alpha-arbutin/>>. Pristupljeno 8. siječnja 2019.

ATCC, The global bioresource center (2017) <<http://www.lgcstandards-atcc.org>>. Pristupljeno 2. veljače 2019.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity Of T-2 Toxin And Its Metabolites Determined With The Neutral Red Cell Viability Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2101-2103.

Báidez, A. G., Gómez, P., Del Río, J. A., Ortuño, A. (2007) Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3373-3377.

Bang, S. H., Han, S. J., Kim, D. H. (2008) Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity. *J. Cosmet. Dermatol.* **7**, 189-193.

Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., Loukil, C., Barraud, D., Bingen, E. (2002) Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* **70**, 3216-3226.

Blaut, M., Braune, A., Wunderlich, S., Sauer, P., Schneider, H., Glatt, H. (2006) Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1940-1947.

Dahiya, A., Romano, J. F. (2006) A review of their use for aging and photoaged skin. *J. Cosmet. Dermatol.* **19**, 479-484.

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

- Deisinger, P. J. (1996) Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J. Toxicol. Environ. Health.* **47**, 31-46.
- Denyer, S. P, Stewart, G. S. A. B. (1998) Mechanisms of action of disinfectans. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **41**, 261–268.
- English, J. C., Deisinger, P.J., (2004) Metabolism and disposition of hydroquinone in Fischer 344 rats after oral or dermal administration. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 483–493.
- English, J. C., Perry, L. G., Vlaovic, M., Moyer, C., O'Donoghue, J. L. (1994) Measurement of cell proliferation in the kidneys of Fischer 344 and Sprague-Dawley rats after gavage administration of hydroquinone. *Fundam. Appl. Toxicol.* **23**, 397-406.
- Goldhar, J., Perry, R., Golecki, J. R., Hoschutzky, H., Jann, B., Jann, K. (1987) Nonfimbrial, mannose-resistant adhesins from uropathogenic *Escherichia coli* O83: K1: H4 and O14: K?: H11. *Infect. Immun.* **55**, 1837-1842.
- Hagberg, L., Jodal, U., Korhonen, T. K., Lidin-Janson, G., Lindberg, U., Eden, C. S. (1981) Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect. Immun.* **31**, 564-570.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Reichel TL (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887–1892.
- Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 107-112.
- Hildebrand D.C., Powell C.C., Schroth M.N. (1969) Fire blight resistance in Pyrus: localization of arbutin and beta-glucosidase. *Phytopathology* **59**, 1534-1539.
- Holopainen, M., Jabordar, L., Seppanen-Laukso, T., Laakso, I., Kauppinen, V. (1988) Antimicrobial activity of some Finnish ericaceous plants. *Acta Pharm.* **97**, 197-202.
- Hu, Z. M., Zhou, Q., Lei, T. C., Ding, S. F., Xu, S. Z. (2009) Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *J. Dermatol. Sci.* **55**, 179-184.
- Hudault, S., Guignot, J., Servin, A.L. (2001) *Escherichia coli* strains colonizing thegastrointestinal tract protect gerfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* **49**, 47-55.
- Jahodár L., Jílek P., Páktová M., Dvoráková V. (1985) Antimicrobial effect of arbutin and an extract of the leaves of *Arctostaphylos uva-ursi* *in vitro*. *Ceska Slov Farm.* **34**, 174-178.
- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A. L. (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **183**, 78–88.

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

Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Benković, V., Kopjar, N. (2017) *In vitro* assessment of the cytotoxic, DNA damaging, and cytogenetic effects of hydroquinone in human peripheral blood lymphocytes. *Arh. Hig. rada toksikol.* **68**, 322-335.

Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Mikolić, A., Milojković-Opsenica, D., Benković, V., Kopjar, N. (2018) *In vitro* safety assessment of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology* **70**, 1261-1278.

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

Kitao, S., Sekine, H. (1994) α -D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 38-42.

Kivçak B., Mert T., Ertabaklar H., Balcioglu IC., Ozensoy Töz S. (2009) *In vitro* activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Turkiye Parasitol. Derg.* **33**, 114–115.

Kučišec Tepeš N. (1994) Specijalna bakterijologija i odabrana poglavlja iz opće i specijalne mikologije, Školska knjiga, Zagreb, str. 67-71.

Liang, K., Xu, K., Bessarab, D., Obaje, J., Xu, C. (2016) Arbutin encapsulated micelles improved transdermal delivery and suppression of cellular melanin production. *BMC Res. Notes* **9**, 254.

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

Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006) Brock Biology of microorganisms, 11. izd., Pearson, New Jersey.

Marinculić, A., Habrun, B., Barbić, Lj., Beck, R. (2009) Biološke opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek.

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

Nycz, J. E., Malecki, G., Morag, M., Nowak, G., Ponikiewski, L., Kusz, J., Switlicka, A. (2010) Arbutin: Isolation, X-ray structure and computational studies. *J. Mol. Struct.* **980**, 13-17.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2001) A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Anal. Inte.* **12**, 336-339.

Pavlović, D., Lakušić, B., Kitić, D., Milutinović, M., Kostić, M., Miladinović, B., Kovačević, N. (2014) Antimicrobial activity of selected plant species of Genera *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* salisb. and *Erica* l.(Ericaceae). *Acta Fac. Med. Naiss.* **31**, 81-85.

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

Pereira, P., Enguita, F. J., Ferreira, J., Leitão, A. L. (2014) DNA damage induced by hydroquinone can be prevented by fungal detoxification. *Toxicol. Rep.* **1**, 1096-1105.

PLOS (2017) Action of tyrosinase on alpha and beta- arbutin: A kinetic study <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177330>>. Pristupljeno 23. siječnja 2019.

Prirodadar (2014) Medvjede grozde ili medvjетка <<https://www.prirodar.com/medvjede-grozde-ili-medvjетка>>. Pristupljeno 4. siječnja 2019.

Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B., Žgur-Bertok, D. (2008) Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1329–1334.

Ronald, A. (2002) The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am. J. Med*, **113**, 14-19.

Roza, L., De Vogel, N., Van Delft, J. H. M. (2003) Lack of clastogenic effects in cultured human lymphocytes treated with hydroquinone. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1299-1305.

Schindler G., Patzak U., Brinkhaus B., von Nieciecki A., Wittig J., Krähmer N., Glöckl I., Veit M. (2002) Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uvae ursi* extract as film-coated tablets. *J. Clin. Pharmacol* **42**, 920–927.

Schulz, V., Hänsel, R., Tyler, V. E. (2001) Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine, Psychology Press, Berlin.

Siegers, C. P., Siegers, J. P., Pentz, R., Budinet, C., Freudenstein, J. (1997) Metabolism of arbutin from *Uvae Ursi*-extracts in humans. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **7**, 90-92.

Skrzypczak-Pietraszek, E., Kwiecień, I., Gołdyn, A., Pietraszek, J. (2017) HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture. *Phytochem. Lett.* **20**, 443-448.

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

- Svanborg Edén, C., Hansson, H. A. (1978) *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.* **21**, 229-237.
- Škerk, V., Schönwald, S., Krhen, I., Markovinović, L., Beus, A., Kuzmanović, N. Š., Vince, A. (2002) Aetiology of chronic prostatitis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **19**, 471-474.
- Taguri T, Tanaka T, Kouno I (2006) Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol. Pharm. Bull* **29**, 2226–2235.
- Takebayashi, J., Ishii, R., Chen, J., Matsumoto, T., Ishimi, Y., Tai, A. (2010) Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic. Res.* **44**, 473-478.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
- Turi, M., Turi, E., Koljalg, S., Mikelsaar, M. (1997) Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. *Apmis* **105**, 956-962.
- University of Montreal (2004) Pathogenic *E. coli* <<http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>>. Pristupljeno 1. veljače 2019.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., Jeffrey, A. M., Duan, J. D. (2007) Inhibition by dietary hydroquinone of acetylaminofluorene induction of initiation of rat liver carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1620-1625.
- Yarnell E (2002) Botanical medicines for the urinary tract. *World J. Urol.* **20**, 285–293.