

Utjecaj hidrokinona na promjene u proteomu stanica karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka (T24)

Gunjača, Marija

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:159:662170>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Marija Gunjača
1071/N

**UTJECAJ HIDROKINONA NA
PROMJENE U PROTEOMU
STANICA KARCINOMA
MOKRAĆNOG MJEHURA
ČOVJEKA (T24)**

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

ZAHVALA

Veliko hvala prof.dr.sc. Kseniji Durgo na izvrsnom mentorstvu, uloženom trudu i svakom danom savjetu. Hvala mag.ing. Ani Huđek na pomoći pri provođenju eksperimentalnog dijela te na strpljenju za brojna pitanja i napravljene pogreške. Velike zahvale i Biocentru te dr.sc. Ani Butorac, dipl. ing. na trudu, vremenu i strpljenju uloženom u proteomsku analizu uzoraka i na udijeljenom znanju u području proteomike. Od srca zahvaljujem i na izuzetno ugodnoj atmosferi i druženju zbog kojih je sama provedba eksperimentalnog dijela bila bezbolna i motivirajuća. Hvala poticanju interesa, ne samo za diplomski rad, već i za cijelo područje proteomike.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, ljubavi i razumijevanju. Hvala i mom dragom Antoniu na svoj pruženoj podršci, brizi i ohrabrenju tijekom izrade ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ HIDROKINONA NA PROMJENE U PROTEOMU STANICA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA ČOVJEKA (T24)

Marija Gunjača, 1071/N

Sažetak: Infekcije urinarnog trakta česta su pojava, osobito u ženskoj populaciji. Za liječenje infekcija urinarnog trakta koriste se pretežito antibiotici, no zbog pojave rezistencije često se pribjegava alternativnim metodama liječenja poput raznih biljnih pripravaka. Najčešće se koristi uvin-H čaja čijim se glavnim aktivnim sastojkom smatra arbutin, odnosno njegov metabolit hidrokinon. Hidrokinon uspješno eliminira brojne bakterije, poput *E. coli*, koje su najčešći uzrok infekcija urinarnog trakta. Cilj ovog rada bio je istražiti citotoksični i prooksidativni/antioksidativni učinak hidrokinona na stanice mokraćnog mjehura čovjeka T24. Također, istražen je i utjecaj hidrokinona na promjene u proteomu istim stanicama. Stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka su tretirane različitim koncentracijama hidrokinona tijekom 2 i 4 h u uvjetima bez oporavka i s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju. U ovom radu, dokazano je da je citotoksični učinak hidrokinona dozno ovisan. Isto tako, hidrokinon narušava integritet stanične membrane tretiranih stanica smanjujući zastupljenost proteina odgovornih za održavanje integriteta stanice. Oporavkom stanica u hranjivom mediju tijekom 24 h dolazi do obnove integriteta stanice.

Ključne riječi: arbutin, hidrokinon, mokraćni mjehur, T24, vimentin

Rad sadrži: 68 stranica, 21 sliku, 12 tablica, 59 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*

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Višnja Bačun-Družina*
2. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo*
3. Dr.sc. *Ana Butorac*, znan. sur.
4. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos* (zamjena)

Datum obrane: 20. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

HYDROQUINONE EFFECT ON PROTEOME CHANGES IN HUMAN URINARY BLADDER CANCER CELLS (T24)

Marija Gunjača, 1071/N

Abstract: Urinary tract infections are a common occurrence, especially in the female population. Antibiotics are mostly used to treat urinary tract infections, but due to the onset of resistance, alternative treatment methods such as various herbal preparations are often used. The most commonly used is *Uva Ursi* tea, whose the main active ingredient is hydroquinone, the metabolite of arbutine. Hydroquinone successfully eliminates many bacteria, such as *E. coli*, which are the most common cause of urinary tract infections. The aim of this study was to investigate the cytotoxic and prooxidative/antioxidative effects of hydroquinone on human urinary bladder cancer T24 cell line. The effect of hydroquinone on proteome of T24 cells was also investigated. The human urinary bladder cancer cells were treated with different concentrations of hydroquinone for 2 and 4 h under non-recovery conditions and with 24-hour recovery in culture medium. In this graduate thesis, the cytotoxic effect of hydroquinone has been shown to be dose-dependent. Likewise, hydroquinone impairs the cell membrane integrity of treated cells by reducing the amount of proteins responsible for maintaining cell integrity. Recovery of cells in the culture medium within 24 h results in the restoration of cell integrity.

Keywords: arbutine, bladder, hydroquinone, T24, vimentin

Thesis contains: 68 pages, 21 figures, 12 tables, 59 references, 0 supplements

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: *Ksenija Durgo, PhD*

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

Reviewers:

1. PhD. *Višnja Bačun-Družina*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Ana Butorac*, Research associate
4. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 20th September 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. INFEKCIJE URINARNOG TRAKTA ČOVJEKA	2
2.2. ZASTUPLJENOST ARBUTINA U BILJNIM VRSTAMA	3
2.3. ARBUTIN	6
2.3.1. Metabolizam arbutina	7
2.4. HIDROKINON	8
2.4.1. Metabolizam hidrokinona	10
2.4.2. Učinak hidrokinona na promjenu u proteomu izloženih stanica	10
2.5. PROTEOMIKA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Biološki test sustav	15
3.1.2. Hidrokinon	15
3.1.3. Laboratorijski uređaji	16
3.1.4. Laboratorijski pribor	17
3.1.5. Kemikalije	18
3.1.6. Otopine	19
3.1.7. Programi i baze podataka	20
3.2. METODE	21
3.2.1. Uzgoj stanica	21
3.2.2. Priprema suspenzije stanica	21
3.2.3. Utvrđivanje broja stanica	22
3.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka hidrokinona na T24 staničnu liniju metodom Neutral red	23
3.2.5. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka hidrokinona na T24 staničnu liniju DCFH-DA metodom	24
3.2.6. Uzgoj stanica za analizu proteina	25
3.2.7. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima Bradfordovom metodom	26
3.2.8. Neciljana analiza proteina	26
3.2.9. Ciljana analiza proteina	32
3.2.10. Statistička obrada rezultata	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. Određivanje citotoksičnog učinka hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom Neutral red	35
4.2. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom DCFH-DA	41
4.3. Rezultati proteomskih analiza	48
4.3.1. Utjecaj hidrokinona na promjene u proteomu stanica T24	49

4.3.2.	Utjecaj 24-satnog oporavka stanica T24 tretiranih hidrokinonom na zastupljenost proteina vimentina	58
5.	ZAKLJUČCI	62
6.	LITERATURA	63

1. UVOD

Infekcije urinarnog trakta česte su pojave koje se uglavnom lako liječe, no ukoliko dođe do komplikacija koje obično nastaju kao posljedica neliječenja, ovaj tip infekcija može biti i smrtonosan. Brojni biljni pripravci poput uvin-H čaja tradicionalno se koriste za liječenje blažih infekcija urinarnog trakta zbog antibakterijskog djelovanja. Za antibakterijsko djelovanje uvin-H čaja odgovoran je fenolni glikozid arbutin, ali i njegov metabolit hidrokinon. Mehanizam djelovanja arbutina i hidrokinona uključuje povećanje hidrofobnosti površine bakterijske stanice i posljedično tome inhibicije vezanja za stanice epitela mokraćnog mjehura. Prema tome, ne preporuča se kontinuirana upotreba uvin-H čaja duža od 14 dana. Navedeni podaci upućuju na traženje odgovora o potencijalnom štetnom učinku hidrokinona, biološki aktivne komponente iz uvin-H čaja, na stanice epitela mokraćnog mjehura kao ciljnog mjesta njegovog antibakterijskog djelovanja.

Ovaj diplomski rad dat će odgovore na pitanja o citotoksičnom učinku hidrokinona na stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka budući da on kao biološki aktivna komponenta uvin-H čaja tijekom alternativnog liječenja infekcije mokraćnog mjehura, uspješno eliminira najčešće glavnog uzročnika infekcije, bakteriju *Escherichia coli*. Također, cilj rada je usporediti proteinske profile netretiranih stanica, tretiranih stanica koje nisu prošle oporavak i tretiranih stanica koje su prošle proces 24-satnog oporavka u hranjivom mediju.

Citotoksično djelovanje hidrokinona ispitat će se Neutral red metodom, a ispitat će se i prooksidacijsko/antioksidacijsko djelovanje različitih koncentracija hidrokinona na stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka (T24) DCFH-DA metodom. Također, ciljanom i neciljanom analizom proteina ustanovit će se sintetiziraju li navedene stanice nakon tretmana hidrokinonom neke nove proteine u odnosu na kontrolu. Neciljana analiza provest će se separacijom peptida tekućinskom kromatografijom te analizom dobivenih peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF. Nakon obavljene neciljane analize proteina i odabira ciljanih proteina provest će se ciljana analiza kojom će se utvrditi koliko je određeni protein zastupljen u uzorku tretiranih stanica bez oporavka, uzorku tretiranih stanica s oporavkom te u kontrolnom uzorku stanica koje nisu bile tretirane.

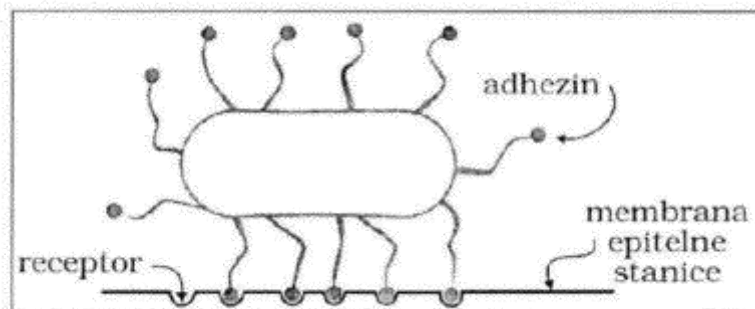
2. TEORIJSKI DIO

2.1. INFEKCIJE URINARNOG TRAKTA ČOVJEKA

Infekcije urinarnog trakta veoma su rasprostranjene, osobito u ženskoj populaciji. Oko 53 % ženske populacije je barem jednom tijekom života imalo neku vrstu infekcije urinarnog trakta, dok je taj postotak u muškaraca mnogo niži i iznosi 14 % (Locke, 2018). Razlog tome je razlika u duljini urinarnog trakta. Naime, žene imaju mnogo kraću mokraćnu cijev nego muškarci što omogućava lakšu adheziju i kolonizaciju patogenih bakterija na sluznicu mokraćne cijevi i njihovu migraciju do samoga mjehura. Uzročnici infekcija urinarnog trakta su patogeni mikroorganizmi poput gram-negativnih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*, ali i nekih gram-pozitivnih bakterija kao što su *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus saprophyticus*. Uzročnik 80 % svih infekcija urinarnog trakta je bakterija *Escherichia coli* (Flores-Mireles i sur., 2015). To je gram-negativna štapičasta bakterija koja je prirodno prisutna u probavnom traktu ljudi. Budući da se otvor mokraćne cijevi u žena nalazi blizu završnog dijela debelog crijeva, to uvelike olakšava prelazak bakterija prema mjehuru. Taj prijelaz bakterijama olakšavaju njihovi organi za pokretanje – flagele ili pili. Kako bi uspješno kolonizirale epitel mjehura bakterije se na njega vežu adhezin-receptor vezama prikazanim na slici 1. Adhezini su molekule na površini bakterijske stanice koje prepoznaju receptore koji se nalaze na epitelu mjehura (Vraneš, 1994). Tako vezane za epitel bakterije preživljavaju na način da ispuštaju toksine i proteaze kako bi si osigurale hranjive tvari. Daljnjim diobama i stjecanjem otpornosti na imuni sustav domaćina, bakterije mogu dospjeti i do bubrega te tamo opet pomoću adhezina kolonizirati renalni epitel. Otpuštanje toksina u renalni epitel može dovesti do mnogo većih komplikacija za bubrežno tkivo. Također postoji i mogućnost da bakterije prođu kroz tubularnu epitelnu barijeru i uđu u krvotok te izazovu sepsu koja može imati smrtni ishod (Flores-Mireles, 2015).

Simptomi infekcije urinarnog trakta su učestala potreba za mokrenjem, neugodan pritisak u zdjelici, bolno mokrenje, mutan urin te krv u urinu, a ukoliko dođe do vrućice, mučnine ili povraćanja, to je znak da su bakterije već dospjele do bubrega (Head, 2008).

Kako ne bi došlo do većih i kompliciranijih infekcija u organizmu, infekciju urinarnog trakta potrebno je liječiti.



Slika 1. Shematski prikaz adhezije bakterije na epitel mjehura (preuzeto i prilagođeno prema Vraneš, 1994)

Liječenje se provodi antibioticima poput ampicilina, trimetoprim sulfametoksazola ili ciprofloksacina (Flores-Mireles, 2015). Navedeni antibiotici djeluju na način da inhibiraju replikaciju DNA ili inhibiraju sintezu stanične stijenke bakterijske stanice (Bedenić, 2009).

Zbog sve češće upotrebe antibiotika dolazi do pojave rezistencije. Upravo zbog toga pribjegava se alternativnom liječenju infekcija urinarnog trakta pomoću raznih biljnih pripravaka poput čajeva ili šećera D-manoze (Head, 2008).

2.2. ZASTUPLJENOST ARBUTINA U BILJNIM VRSTAMA

Neke od biljaka koje su pokazale učinkovitost u liječenju infekcija urinarnog trakta su medvjетка (lat. *Arctostaphylos uva ursi*), brusnica (lat. *Vaccinium macrocarpon*), borovnica (*Vaccinium myrtillus*), Saw Palmetto ili Sabal palma (lat. *Sahal serrulata*) i kopriva (lat. *Urtica dioica*).

Sabal palma (lat. *Sahal serrulata*) i kopriva (lat. *Urtica dioica*) djeluju na način da povećavaju protok urina, dok je kod medvjette, brusnice i borovnice glavni farmakološki aktivan sastojak hidrokinon koji nastaje iz arbutina (Head, 2008).

Arbutin je u značajnim količinama prisutan u biljkama iz porodica *Lamiaceae*, *Ericaceae*, *Saxifragaceae* i *Rosaceae*. Prema istraživanju koje su proveli Rychlińska i Nowak 2012. godine, arbutin je prisutan u mažuranu (lat. *Majorana hortensis*), medvjetcu (lat. *Arctostaphylos uva-ursi*), brusnici (lat. *Vitis idaeae folium*), labradorskom čaju (lat. *Ledum palustre*), Slonovom uhu (lat. *Bergenia crassifolia*), srcolisnoj bergeniji (lat. *Bergenia cordifolia*), bergeniji (lat. *Bergenia ciliata*, *Bergenia purpurascens*) te u listu i plodu kruške (lat. *Pyrus*

communis). Količine arbutina i hidrokinona pronađene u navedenim biljkama prikazane su u tablici 1.

Medvjетка (lat. *Arctostaphylos uva ursi*) se koristi za liječenje infekcija mokraćnih puteva (najčešće u obliku uvin-H čaja) zbog diuretičkih, antiseptičkih, protuupalnih i antibakterijskih svojstava. Dokazano je da je glavni farmakološki sastojak uvin-H čaja hidrokinon, metabolit glikozida arbutina, koji većinom nastaje djelovanjem enzima β -glukozidaze u jetri. Koncentracija arbutina u listu uvin-H čaja varira ovisno o godišnjem dobu i geografskom području iz kojeg potječe. Mehanizam djelovanja uvin-H čaja je taj da mijenja svojstva površine mikrobne stanice, odnosno povećava njezinu hidrofobnost i time onemogućava prijanjanje mikrobne stanice na stijenku mokraćnog mjehura (Trill i sur., 2017).

Brusnica (lat. *Vaccinium macrocarpon*) se kao lijek protiv infekcija urinarnog trakta koristi u obliku soka, sirupa, čajeva, praha ili tableta. Iako se u prošlosti za brusnicu vjerovalo da djeluje antibakterijski na način da snižava pH vrijednost, novijim istraživanjima otkriven je mehanizam djelovanja. Proantocijanidini A-tipa koji su prirodno prisutni u brusnici sprječavaju adheziju bakterije *E. coli* za stanice epitela mjehura (Head, 2008).

Borovnica (lat. *Vaccinium myrtillus*) djeluje mehanizmom sličnim kao brusnica, ali je njezino djelovanje nešto slabijeg intenziteta.

Ljudi su najviše izloženi arbutinu i hidrokinonu, preko namirnica dobivenima iz pšenice, kave i čaja. Upravo su te namirnice veoma zastupljene u zapadnjačkoj prehrani, pa možemo reći da su ljudi svakodnevno izloženi određenim količinama ovih spojeva. Prosječno serviranje kave ili čaja iznosi 200-300 mL u kojima koncentracija hidrokinona varira od $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ do $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$. U skladu s time, jednim serviranjem kave ili čaja moguće je unijeti 20-90 μg hidrokinona. Uzmemo li u obzir da se takvi napici konzumiraju nekoliko puta dnevno možemo zaključiti da je izloženost hidrokinonu i arbutinu poprilično velika (Deisinger, 1996).

Tablica 1. Zastupljenost arbutina i hidrokinona u pojedinim biljnim vrstama (preuzeto i prilagođeno prema Rychlińska i Nowak, 2012)

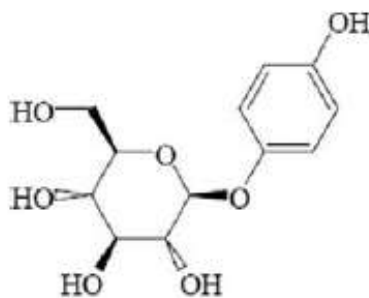
Vrsta (lat. naziv)	Dio biljke	Arbutin (mg g ⁻¹) ±	RSD (%)	Hidrokinon (mg g ⁻¹) ±	RSD (%)
<i>Majorana hortensis</i>	nadzemni dio biljke	17,24 ± 0,36	2,07	0,99 ± 0,012	1,09
<i>Thymus vulgaris</i>	nadzemni dio biljke	nema podataka	/	nema podataka	/
<i>Thymus serpyllum</i>	nadzemni dio biljke	nema podataka	/	nema podataka	/
<i>Origanum vulgare</i>	nadzemni dio biljke	nema podataka	/	nema podataka	/
<i>A. uva-ursi</i>	list	90,48 ± 1,98	2,18	1,93 ± 0,049	2,54
<i>V. vitis idaea</i>	list	51,68 ± 0,48	0,92	1,08 ± 0,016	1,48
<i>V. myrtillus</i>	list	nema podataka	/	nema podataka	/
<i>V. uliginosum</i>	list	nema podataka	/	nema podataka	/
<i>Calluna vulgaris</i>	cvijet	nema podataka	/	nema podataka	/
<i>Ledum palustre</i>	nadzemni dio biljke	1,56 ± 0,04	2,40	nema podataka	/
<i>B. crassifolia</i>	list	122,29 ± 2,23	1,82	nema podataka	/
<i>B. cordifolia</i>	list	23,46 ± 0,21	0,91	nema podataka	/
<i>B. ciliata</i>	list	13,57 ± 0,20	1,51	nema podataka	/
<i>B. purpurascens</i>	list	16,08 ± 0,76	4,75	nema podataka	/
<i>Pyrus communis</i>	list	24,89 ± 0,47	1,91	0,87 ± 0,02	2,41
<i>Pyrus communis</i>	cvijet	14,13 ± 0,28	2,02	3,73 ± 0,03	0,83

RSD - relativna standardna devijacija

SD - standardna devijacija

2.3. ARBUTIN

Arbutin (4-hidroksifenol- β -D-glukopiranozid) po kemijskoj je strukturi fenolni glikozid (slika 2) molekulske formule $C_{12}H_{16}O_7$ i molarne mase $272,251 \text{ g mol}^{-1}$. Pojavljuje se u formi praha bijele do sive boje i ima veoma visoku temperaturu tališta – 199°C . Stabilan je na sunčevoj svjetlosti i pri pH vrijednosti između 4 i 8. Topljiv je u vodi i alkoholu, slabije topljiv u etilnom eteru, a netopljiv je u benzenu, kloroformu i ugljikovom disulfidu (ToxNet, 2009). Prisutan je u biljkama iz porodica *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Lamiaceae* i *Apiaceae*. U biljkama može biti prisutan u slobodnom ili u esterificiranom obliku. Koncentracija arbutina u biljnim pripravcima varira, a ovisi o vrsti biljke, metodi sušenja i vegetacijskom razdoblju. Arbutin dolazi u obliku dva stereoizomera - α -arbutin i β -arbutin. α -arbutin se sintetizira iz acetobromglukoze u prisutnosti lužina, a β -arbutin je prirodno sadržan u biljkama (PubChem, 2019).



Slika 2. Strukturna formula arbutina (de Arriba i sur., 2013)

Arbutin pokazuje svojstvo da supresira biosintezu melanina u ljudskoj koži pa se kao takav koristi za tretiranje diskoloracija na koži poput hiperpigmentacija, pjegica i melasme. Mehanizam djelovanja uključuje inhibiciju aktivnosti tirozinaze bez utjecaja na tirozinaznu mRNA ili na sintezu enzima (Rychlińska i Nowak, 2012). Budući da je u brojnim animalnim studijama dokazano da arbutin i njegovi aglikoni imaju hepatotoksično, kancerogeno, nefrotoksično i mutageno djelovanje, potrebno je kontrolirati korištenje proizvoda koji ih sadrže (Rychlińska i Nowak, 2012).

Arbutin se u biljnom materijalu može određivati spektrofotometrijski, pomoću kapilarne elektroforeze, denzitometrijski, pomoću GC/MS-a (eng. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), a najpogodnijom kromatografskom metodom za separaciju arbutina pokazao se

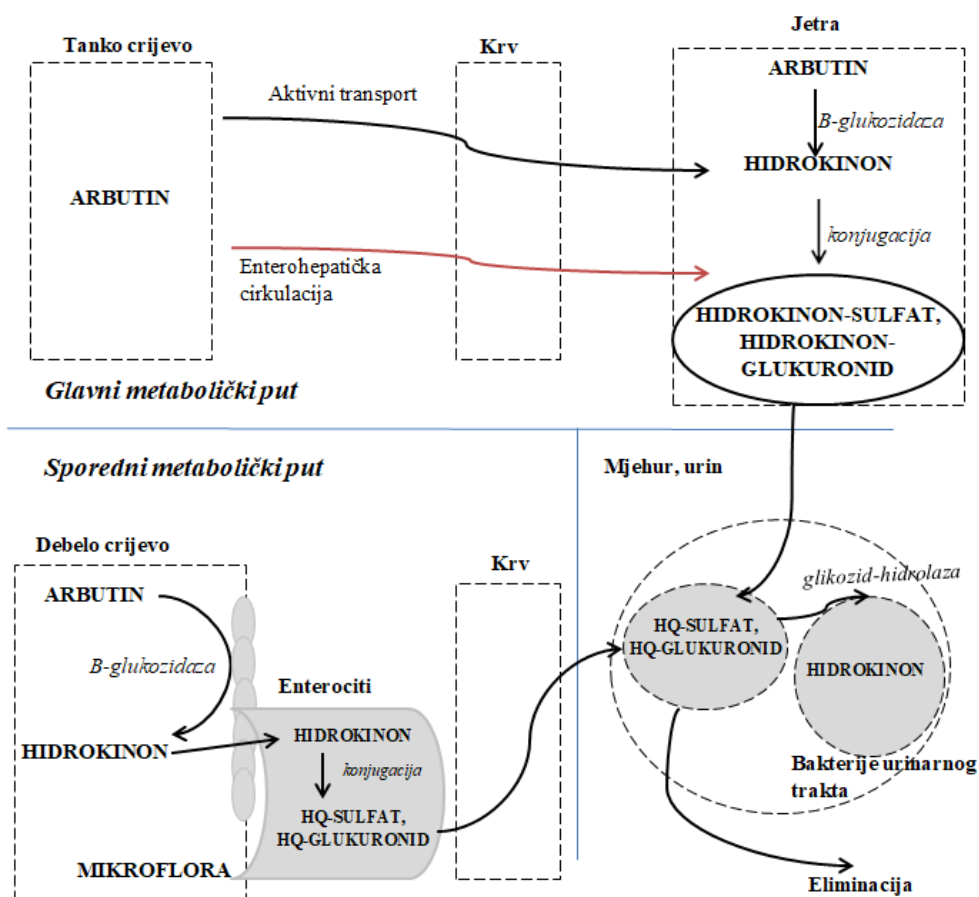
HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) obrnutih faza (Rychlińska i Nowak, 2012).

LD₅₀ za β-arbutin u miševa iznosi 9084 mg kg⁻¹ tjelesne težine, a u štakora iznosi 8715 mg kg⁻¹ tjelesne težine. Oba podatka odnose se na akutnu oralnu toksičnost (Drugbank, 2019).

Arbutin se koristi kao inhibitor oksidacije, inhibitor procesa polimerizacije, stabilizator boja u fotografiji i u kozmetici (ToxNet, 2019).

2.3.1. Metabolizam arbutina

Prilikom ulaska u organizam arbutin ostaje stabilan pri niskoj pH vrijednosti želuca te se u tankom crijevu preko Na⁺/glukoza transportera apsorbira i odlazi u jetru gdje se i odvija metabolička razgradnja većeg dijela arbutina (slika 3). Uz pomoć enzima β-glukozidaze većina arbutina se u jetri razgrađuje na hidrokinon i glukozu. Hidrokinon se dalje konjugira sa glukuronskom kiselinom ili sulfatom (oko 85 %) ili ostaje u slobodnom obliku (0,6 %). Ostatak arbutina, koji se nije apsorbirao iz tankog crijeva, dolazi u debelo crijevo gdje ga bakterije kao što su *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacteroides distasonis* i *Bifidobacterium adolescentis* svojom β-glukozidazom u vrlo maloj gotovo neprimjetnoj količini razgrađuju na hidrokinon i glukozu (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Potom se hidrokinon u enterocitima konjugira sa sulfatom ili glukuronskom kiselinom. Oba oblika, konjugirani i slobodni hidrokinon dopijevaju u mjehur. U mjehuru se, ukoliko prevladavaju lužnati uvjeti, konjugirani hidrokinon djelovanjem glikozid hidrolaze, koju proizvode bakterije urinarnog trakta, prevodi u slobodni hidrokinon (de Arriba i sur., 2013). Prema istraživanju Schindler i sur. iz 2002. godine, konzumacijom 945 mg lista medvjette, što odgovara 210 mg arbutina, urinom je izlučeno oko 66 %, računajući sva tri metabolita arbutina (slobodni hidrokinon, hidrokinon-sulfat i hidrokinon-glukuronid).



Slika 3. Metabolizam arbutina u gastrointestinalnom sustavu (preuzeto i prilagođeno prema de Arriba i sur., 2013)

2.4. HIDROKINON

Hidrokinon (1,4-dihidroksibenzen) je metabolit arbutina, molekulske formule $C_6H_6O_2$. Molarna masa mu iznosi $110,112 \text{ g mol}^{-1}$. Dolazi u obliku svijetlo obojenih kristala ili otopina. Bez mirisa je, a vodene otopine hidrokinona imaju blago gorak okus. Tali se pri $172 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a točka vrelišta mu je $287 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Topljiv je u ugljikovom tetrakloridu, etilnom eteru i vodi. Otopina hidrokinona u dodiru sa zrakom poprima smečkastu boju zbog oksidacije. Uz prisutnost lužine oksidacija se odvija veoma brzo (PubChem, 2019).

Hidrokinon se proizvodi u organizmu biotransformacijama benzena ili fenola. Benzen se metabolizira do fenola u jetri pomoću citokrom P-450 monooksigenaze. Fenol se uz pomoć istog enzima hidroksilira pri čemu nastaje hidrokinon koji se akumulira u koštanoj srži. Također, hidrokinon se može proizvesti i kemijski – oksidacijom fenola, oksidacijom anilina

sa manganovim dioksidom u kiselim uvjetima ili alkilacijom benzena sa propilenom (Enguita i Leita, 2013).

Isto kao i arbutin, hidrokinon se koristi za izbjeljivanje pigmentacija na koži. Ukoliko dolazi do smanjene produkcije melanina posljedica su diskoloracije poput vitiliga, a povećana produkcija melanina odgovorna je za hiperpigmentaciju. Melanini su heterogeni polifenolni polimeri čija boja varira od žute pa sve do smeđe. Biosinteza melanina ovisi o tirozinazi i UV zračenju. Tirozinaza prevodi tirozin u L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin). L-DOPA oksidira u dopakinon koji se daljnjim transformacijama prevodi u melanin. Hidrokinon i arbutin inhibiraju enzim tirozinazu i time onemogućuju nastajanje melanina (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).

Hidrokinon se također koristi i kao monomer u proizvodnji epoksidnih smola, kao intermedijer u proizvodnji boja, motornih goriva i ulja. Koristi se kao antioksidans i inhibitor (FDA, 2009).

Upravo je hidrokinon zaslužan za antibakterijska svojstva biljnih ekstrakata. Dokazano je da je razina slobodnog hidrokinona u urinu viša tijekom infekcija urinarnog trakta, što je rezultat aktivnosti patogenih bakterija. Bakterijska aktivnost za posljedicu ima alkalizaciju urina što je izuzetno povoljno budući da visoka pH vrijednost omogućava hidrolizu konjugata hidrokinona. Iz tog razloga se ne preporuča medvjtku kombinirati sa drugim pripravcima za liječenje infekcija urinarnog trakta, kao što su brusnica i L-askorbinska kiselina, jer one snižavaju pH urina i time otežavaju održavanje lužnatih uvjeta u mjehuru (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).

Dokazano je da hidrokinon inhibira proliferaciju limfocita supresirajući DNA sintezu i pokazujući citotoksično djelovanje prema neutrofilima, eozinofilima i limfocitima. Pokazuje i hepatotoksična svojstva, uzrokuje štetu na DNA i kromosomima. Prema istraživanju McDonald i sur. (2001) derivati fenola (hidrokinon, katehol i benzen-1,2,4-triol) uzrokuju lom kromosoma i aneuploidiju. Tretiranje humanih stanica uzgojenih *in vitro* navedenim fenolnim derivatima uzrokovalo je trisomiju kromosoma 8 i monosomiju kromosoma 5 i 7. Također, inhibitorno djeluju na topoizomerazu II i vežu se na proteine povezane s DNA te time uzrokuju stvaranje DNA-adukata i lom kromosoma. Dolazi do delecija i translokacija kromosoma 5q i 7q. Sve navedene promjene uočene su kod leukemije.

Kod radnika izloženih benzenu opažena je delecija kromosoma 5q i 7q te translokacija u krvnim stanicama, a kod miševa tretiranih hidrokinonom uočen je veći broj aneuploidija i loma kromosoma u koštanoj srži (McDonald i sur., 2001). Upravo zbog toga uvin-H čaj se preporuča

samo za liječenje infekcija urinarnog trakta, a ne i za prevenciju. Također, ne preporuča ga se koristiti duže od dva tjedna kako ne bi došlo do povećanog rizika od oštećenja jetre, problema s disanjem i vidom te konvulzija, pa čak i smrti (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).



Slika 4. Strukturna formula hidrokinona (preuzeto i preilagođeno prema de Arriba i sur., 2013)

Ingestija 1 g hidrokinona u ljudi može izazvati mučninu, vrtoglavicu, gušenje, grčenje mišića te glavobolju. Subakutna izloženost hidrokinonu povezana je sa povišenim razinama methemoglobina u krvi, anemijom, leukocitozom, retikulocitozom i hipoglikemijom. Letalne doze hidrokinona za čovjeka kreću se između 5 i 12 g (Gad, 2005).

2.4.1. Metabolizam hidrokinona

Oralnim unosom hidrokinona dolazi do njegove brze apsorpcije. Prema istraživanju Deisinger iz 1996. godine, u ljudi koji su konzumirali hranu sa visokom koncentracijom hidrokinona uočena je maksimalna koncentracija hidrokinona u plazmi i urinu 2-3 h nakon obroka. Prilikom ulaska u ljudski gastrointestinalni trakt hidrokinon se apsorbira u tankom crijevu i krvlju odlazi u jetru gdje se konjugira s glutationom ili sa sulfatom. U konjugiranom ili slobodnom obliku distribuira se do mjehura. Ukoliko je prisutan enzim glikozid hidrolaza, kojeg izlučuju uropatogene bakterije poput *E. coli*, konjugirani hidrokinon se prevodi u slobodni te se izlučuje urinom. U urinu su prisutna sva tri oblika hidrokinona – slobodni hidrokinon, hidrokinon-sulfat te hidrokinon-glukuronid (de Arriba i sur., 2013).

2.4.2. Učinak hidrokinona na promjenu u proteomu izloženih stanica

Zbog svih navedenih svojstava hidrokinon je veoma zanimljiv spoj za daljnja istraživanja. Hebeda i sur. 2011. godine proveli su istraživanje utjecaja hidrokinona na mikrovaskularne

endotelne stanice. U navedenom istraživanju dokazano je da su veće koncentracije hidrokinona (1101,1-11011 $\mu\text{g mL}^{-1}$) prouzročile povećanu ekskreciju IL-1 β i TNF- α . Također, uočen je i utjecaj na količinu adhezijskih molekula ICAM-1, PECAM-1 i VCAM-1 te aktivacija NF- κ B transkripcijskog faktora u stanicama tretiranim hidrokinonom.

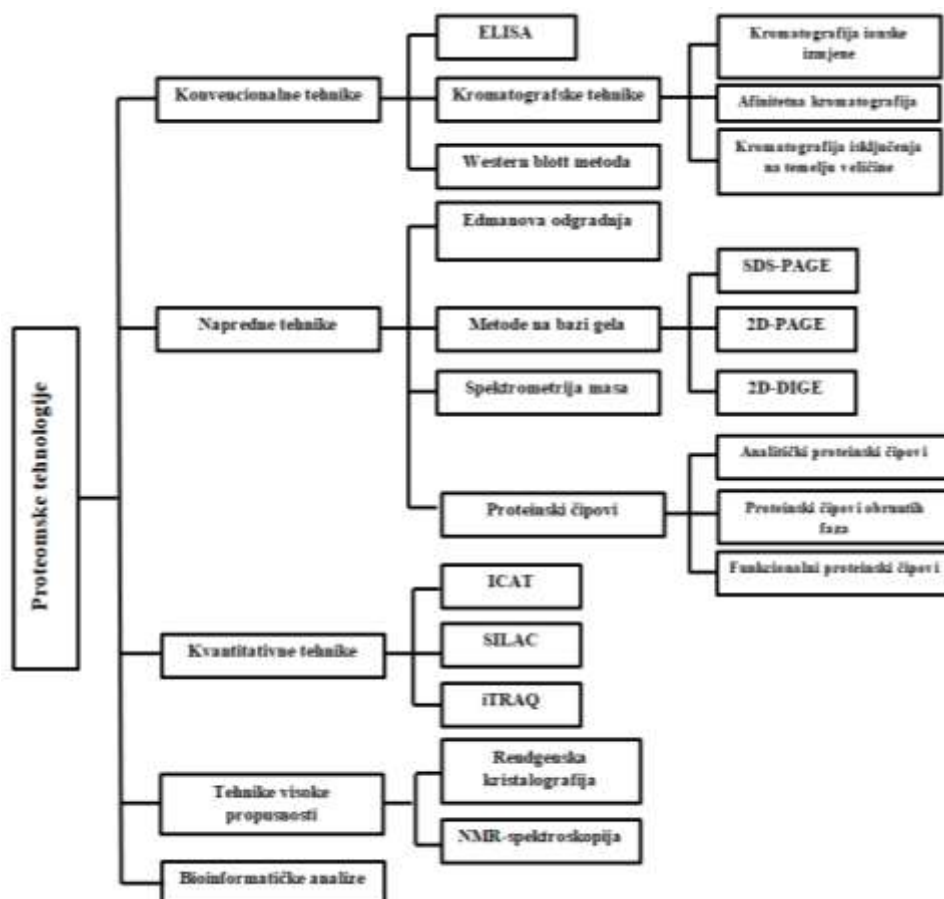
U znanstvenom radu Li i sur. (2006) ispitivao se utjecaj hidrokinona na ljudske embrionalne plućne fibroblaste. Koncentracije hidrokinona u rasponu od 11,011 do 110,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazale su citotoksično djelovanje. Također je uočena promjena na 11 proteina nakon tretmana hidrokinonom. Rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Proteini ljudskih embrionalnih plućnih fibroblasta koji su pokazali odgovor na tretman hidrokinonom (preuzeto i prilagođeno prema Li i sur., 2006)

Ime proteina	Relativna molekulska masa	Podudaranja peptida	Zastupljenost proteina
Lasp-1 protein	30185	7	Sintetiziran nakon tretmana
Neidentificirani protein	/	/	Nestao nakon tretmana
Neidentificirani protein	57496	7	Smanjena zastupljenost
Mutantni beta-aktin	41875	12	Sintetiziran nakon tretmana
Aktin, gama 1	42108	9	Smanjena zastupljenost
Transaldolaza	36531	7	Povećana zastupljenost
GRB2	18624	9	Povećana zastupljenost
Neidentificirani protein	72576	9	Povećana zastupljenost
TAR DNA vezajući protein	42657.9	/	Povećana zastupljenost
Protein sličan stanici neuralnog prekursora	44711.3	/	Smanjena zastupljenost
Hipotetski 33.4 KDa protein	33375.9	/	Povećana zastupljenost

2.5. PROTEOMIKA

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem i karakterizacijom proteoma određene stanice, organa ili organizma u određenom trenutku. Proteomske tehnike koriste se za profiliranje proteoma, usporednu analizu dva ili više uzoraka proteina, identifikaciju i lokalizaciju posttranslacijskih modifikacija te za proučavanje interakcija među proteinima (Chandramouli i Qian, 2009). Do danas je razvijen širok spektar proteomskih tehnika koje su prikazane na slici 5. Glavna podjela proteomskih tehnika odnosi se na konvencionalne tehnike, napredne, kvantitativne, tehnike visoke propusnosti i bioinformatičke analize (Aslam i sur., 2016). Konvencionalne tehnike pročišćavanja proteina obuhvaćaju kromatografske metode (kromatografija ionske izmjene, kromatografija isključenja na temelju veličine i afinitetna kromatografija), ELISA (imunoenzimska metoda) i Western blott metoda. U napredne tehnike spadaju metode na bazi gela (SDS-PAGE, 2D-PAGE i 2D-DIGE), spektrometrija masa (MS), Edmanova odgradnja i proteinski čipovi (analitički proteinski čipovi, funkcionalni proteinski čipovi i proteinski čipovi obrnutih faza). Kvantitativne tehnike su ICAT (obilježavanje izotopima), SILAC (obilježavanje stabilnim izotopima s aminokiselinama u staničnoj kulturi) i iTRAQ (izobarno označavanje za relativnu i apsolutnu kvantifikaciju). Nuklearna magnetska rezonancija i rendgenska kristalografija smatraju se tehnikama visoke propusnosti te omogućavaju određivanje trodimenzionalne strukture proteina. Bioinformatičkim analizama moguće je dobiti podatke o funkcionalnim i strukturnim svojstvima stanice, kao i podatke o mehanizmu staničnog odgovora na različite vrste stresa ili ksenobiotika (Aslam i sur., 2016).



Slika 5. Podjela proteomskih tehnika (preuzeto i prilagođeno prema Aslam i sur., 2016)

U proteomici baziranoj na metodi spektrometrije masa razlikujemo ciljanu i neciljanu analizu proteina. Ciljanom analizom proteina fokus je određen protein te se određuje njegova zastupljenost u uzorku. To je metoda visoke osjetljivosti, kvantitativne točnosti i reproducibilnosti. Ciljana analiza može se provesti na dva načina: koristeći metode MS koje se temelje na podacima o peptidnim ionima ili koristeći metode MS koje se temelje na podacima o fragmentnim ionima (Borràs i Sabidó, 2017).

U metode temeljene na podacima o peptidnim ionima ubraja se ciljano MS snimanje na razini peptidnih iona te obrada podataka na razini peptidnih iona. Ciljano snimanje na razini peptidnih iona odnosi se na praćenje odabranog ciljanog iona (eng. *Selected Ion Monitoring*, SIM) u spektrometru masa. Analizator masa postavljen je da filtrira određeni peptidni ion te se dobiveni signal tog peptidnog iona koristi za kvantifikaciju. Peptidni ioni ne moraju se snimati kontinuirano. Dovoljno je snimiti jedan peptidni ion nekoliko puta u sekundi, a ostatak vremena mogu se snimati ostali peptidni ioni. To omogućuje praćenje više peptidnih iona istovremeno.

Prednost ove metode je što ne snima cijeli raspon masa već se u kvadrupolnom masenom analizatoru filtriraju samo ciljani peptidni ioni te do analizatora masa dolazi samo mali raspon omjera masa i naboja (Borràs i Sabidó, 2017).

Snimanjem peptidnih iona dobije se ukupni ionski kromatogram (eng. *Total Ion Chromatogram*, TIC) koji sadrži podatke o omjeru mase i naboja, retencijskom vremenu i intenzitetu i to za svaki snimani peptidni ion. Računanjem površine ispod krivulje može se kvantificirati određeni peptidni ion (Borràs i Sabidó, 2017).

Metode ciljane analize na razini fragmentnih iona obuhvaćaju MS snimanje na razini fragmentnih peptidnih iona te analizu podataka na razini fragmentnih peptidnih iona. Snimanje na razini fragmentnih iona može biti praćenje odabrane reakcije (eng. *Single Reaction Monitoring*, SRM) ili paralelno praćenje reakcija (eng. *Parallel Reaction Monitoring*, PRM), poznato i pod nazivom praćenje višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM).

Praćenje odabrane reakcije može biti izvedeno pomoću spektrometra masa čiji je analizator masa trostruki kvadrupol (eng. *triple quadrupole*, QQQ). U ovakvoj analizi parametri prvog analizatora masa postavljaju se na način da filtriraju specifične ciljane peptidne prekursore. Zatim se ti filtrirani peptidi fragmentiraju u kolizijskoj ćeliji, a nastali fragmenti se propuštaju do drugog analizatora masa koji filtrira fragmentne ione sa određenim omjerom mase i naboja. Taj se proces naziva tranzicija. Ova metoda je veoma pouzdana jer su vrlo male šanse da dva peptidna fragmenta imaju istu masu, potječu od dva različita izobarna peptida ili imaju isto retencijsko vrijeme.

Paralelno praćenje reakcija također se izvodi pomoću kvadrupola. Kao i kod praćenja jedne reakcije, prvi analizator masa filtrira ciljane peptidne ione. Nakon toga, odabrani se peptidni ioni fragmentiraju i potom se simultano snima više fragmentnih iona, za razliku od SRM metode gdje se snima samo jedan fragmentni ion.

Za razliku od ciljane analize proteina, neciljanom analizom se ne može točno kvantificirati određeni protein, ali se mogu dobiti podatci koji su proteini prisutni u analiziranom uzorku. Za takvu vrstu analize nisu potrebni nikakvi unaprijed poznati podatci, već neovisno o njima moguće je odrediti proteinski profil odabranog uzorka. Također se može i usporediti jedan ili više uzoraka sa kontrolnim uzorkom te vidjeti da li je došlo do promjene u proteomu nakon tretiranja uzorka određenim kemijskim spojem, tj. napraviti relativnu kvantifikaciju (Meyer i Schilling, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

U ovom poglavlju prikazani su materijali potrebni za ispitivanje utjecaja hidrokinona na promjene u proteomu stanica T24. U podpoglavljima od 3.1.1. do 3.1.7. opisani su korišteni biološki test sustav i istraživani spoj te su navedene sve korištene kemikalije, laboratorijski uređaji, laboratorijski pribor i otopine.

3.1.1. Biološki test sustav

U ovom radu korištene su stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka, T24. Ova stanična linija potječe iz 1970. godine. Dobivena je iz karcinoma mjehura trećeg stupnja 82-godišnje švedske pacijentice (Bubeník 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. Za uzgoj stanične kulture korišten je tekući medij – 10 %-tna otopina fetalnog goveđeg seruma (FBS) u RPMI 1640 mediju. Stanice su uzgajane u T-bocama u monosloju pri 37 °C do konfluentnosti uz prisutnost 5 % CO₂.

3.1.2. Hidrokinon

Pripremljena je ishodišna otopina hidrokinona koncentracije 5 mg mL⁻¹ te su iz te otopine pripremljena odgovarajuća razrjeđenja čiji je citotoksični, prooksidacijski/antioksidacijski učinak te učinak na proteom stanica istraživan u ovom radu. Radne koncentracije su određene u odnosu na terapijske doze koje se primjenjuju u ljudi za liječenje blažih infekcija urinarnog trakta. Dnevna doza uvin-H čaja kreće se u rasponu od jedne do tri šalice. Jedna dnevna doza priprema se na način da se 3 g biljnog pripravka prelije sa 150 mL vruće vode. Pomoću HPLC metode određeno je da se u jednoj šalici svježeg pripremljenog uvin-H čaja nalazi 14,6 ± 0,319 µg mL⁻¹ hidrokinona, dok je ukupna koncentracija hidrokinona u tri šalice uvin-H čaja 37,22 ± 0,72 µg mL⁻¹. Iz literaturnih podataka je poznato da se 0,6 % od početne doze arbutina u pripremljenom čaju, renalno elimira u obliku slobodnog hidrokinona. Također je eksperimentalno utvrđeno da nakon 4 h od konzumacije čaja, 41% od početne doze arbutina se

nađe u urinu u obliku hidrokinon konjugata. S obzirom na sve navedeno prilagođene su nastavno navedene istraživane koncentracije hidrokinona:

- 1) **5 $\mu\text{g mL}^{-1}$** - predstavlja 0,6 % slobodnog hidrokinona metaboliziranog od početne doze arbutina koji se eliminira renalno; najmanja koncentracija koja bi u realnoj situaciji mogla doći u kontakt sa stanicama mjeruha prilikom konzumacije jedne preporučene šalice čaja
- 2) **20 $\mu\text{g mL}^{-1}$** - predstavlja količinu slobodnog hidrokinona iz koncentracije 1 uvećanu za hidrokinon koji je određen u pripremljenoj šalici čaja prije konzumacije
- 3) **50 $\mu\text{g mL}^{-1}$** - predstavlja istu situaciju kao i koncentracija 2 samo u preporučenoj dnevnoj dozi čaja (3 šalice)
- 4) **320 $\mu\text{g mL}^{-1}$** – predstavlja slučaj u kojem bi se svi hidrokinon konjugati dobiveni metabolizmom iz početne doze arbutina u pripremljenoj šalici čaja (41 %), preveli u slobodni hidrokinon u lužnatom urinu i došli u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura; najveća koncentracija hidrokinona koja bi u realnim uvjetima konzumacije jedne šalice čaja došla u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura kada bi se poklopili svi potrebni uvjeti za liječenje infekcije
- 5) **900 $\mu\text{g mL}^{-1}$** – predstavlja istu situaciju kao i koncentracija 4 samo u preporučenoj dnevnoj dozi čaja (3 šalice)

3.1.3. 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 miješać-Smart Vortex mixer SA8, Stuart, Velika Britanija
- Centrifuga-TecnicoCentric 2009, Slovenija
- Mini centrifuga-Boeco, Njemačka
- Uređaj za pročišćavanje vode-Synergy UV ultrapure Water (Type 1), Sigma, Njemačka

- Termo miješalica-Thermo Scientific, SAD
- HPLC 1260 Infinity sa sakupljačem frakcija-Agilent Technologies, SAD
- HPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC nano System, Thermo Scientific, SAD
- Sakupljač frakcija- PROTEINEER fcII, Bruker, Njemačka
- Autoflex Speed MALDI/TOF-TOF, Bruker, Njemačka
- Ultrasonična kupelj-FALC, Italija
- Termoblok s dušikom-Reacti Thermo III #TS18824, Thermo Scientific, SAD
- HPLC 1290 Infinity LC System-Agilent Technologies, SAD
- Kvadrupol-6460 Triple Quad LCMS-Agilent Technologies, SAD
- Kolona za HPLC 1290-ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1,7 µm, 2,1×50 mm, Waters, SAD
- Kolona za HPLC 1260-Aeris™ 1,7 µm, PEPTIDE XB-C₁₈ 10 LC Column, 150×2,1 mm, Phenomenex, SAD
- Predkolona za Dionex- Acclaim PepMap100 C₁₈, 5 µm, 100 Å, 300 µm i.d. × 5 mm, Thermo Scientific, SAD
- Kolona za HPLC Dionex-Acclaim PepMap100 C₁₈, 3 µm, 100 Å, 75 µm i.d. × 15 cm, Thermo Scientific, SAD

3.1.4. Laboratorijski pribor

- T-boce (5 mL, 25 mL, 200 mL)-FALCON, SAD
- Bürker-Türkova komorica-FALCON, SAD
- Mikrotitrarske 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 µL-Eppendorf Research plus, Njemačka
- Viale-Agilent Technologies, SAD
- Mikroviale-Agilent Technologies, SAD
- MALDI pločica-MTP Anchor Chip 384 BC, Bruker, Njemačka

- Pipetor (0,1-1000 μ L)-Gilson pipetman
- Tipsevi (0,1-1000 μ L)-FINNTIP, Thermo Electron Corporation
- Plastične i staklene ipete (5-25 mL)
- Kivete za spektrofotometar

3.1.5. 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
- TMTduplex (126 i 127) 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 M Ω cm⁻¹
- Coomasie blue-*Bio-Rad*, SAD
- Fosfatna kiselina- *Sigma*, Njemačka

3.1.6. Otopine

i. Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti:

1) 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

2) Ishodišna otopina Neutral red ($\gamma=5$ mg mL⁻¹)

- | | |
|---------------|-------|
| • Neutral red | 50 mg |
| • Etanol | 10 mL |

3) Radna otopina Neutral red

- Radna otopina Neutral red boje priprema se iz ishodišne otopine dodavanjem odgovarajuće količine hranjivog medija do koncentracije 0,05 mg mL⁻¹

4) Otopina za odbojavanje

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

ii. *Otopine korištene za ispitivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja:*

5) Ishodišna otopina DCFH-DA (c=2mM)

- DCFH-DA 1,5 mg
- DMSO 1,5 mL

6) 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:*

7) Bradford reagens

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

3.1.7. Programi i baze podataka

- WARP-LC software, verzija 1.3-software za automatizirano snimanje MS I MS/MS spektara, Bruker, Njemačka
- ProteinScape, verzija 3.0-program za pretragu baze podataka, Bruker, Njemačka
- SwissProt-baza podataka
- MASCOT-pretraživač baze podataka
- Skyline, verzija 4.2.0.-program za kreiranje metoda za ciljanu analizu proteina, MacCoss Lab Software, SAD
- UniProt-baza podataka
- Chromeleon Xpress-program za ispiranje i podešavanje instrumenata, Thermo Scientific, SAD

- HyStar, verzija 3.2.-program za upravljanje instrumentima, Bruker, Njemačka
- ChemStation Edition OpenLab CDS, Rev. C. 01. 07-program za upravljanje instrumentima, Agilent Technologies, SAD
- JASP 0.10.02-program za statističku obradu podataka
- MassHunter Workstation software, LC/MS Data Acquisition, verzija B.07.00, Agilent Technologies, SAD

3.2. METODE

U ovom poglavlju opisani su svi provedeni postupci potrebni za određivanje utjecaja hidrokinona na promjene u proteomu stanica T24. Opisani su svi koraci, od uzgoja stanica do statističke obrade podataka.

3.2.1. Uzgoj stanica

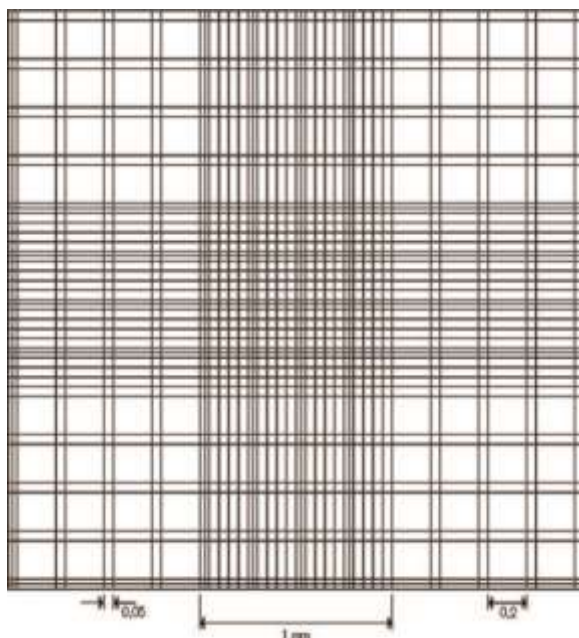
Stanice su čuvane na -80 °C u 10 % dimetilsulfoksidu (DMSO) koji služi kao krioprotektivno sredstvo. Stanice su odmrznute u vodenoj kupelji pri 37 °C te je centrifugiranjem odvojen supernatant od taloga. Talog je resuspendiran u 1 mL medija te su stanice nasađene u T-boce od 5 mL u koje je prethodno dodan medij za uzgoj (10 %-tna otopina FBS-a u RPMI). Stanice su uzgajane u CO₂ inkubatoru uz 95 % zraka i 5 % CO₂ pri temperaturi od 37 °C. Tijekom uzgoja stanica bilo je potrebno presaditi ih u T-boce većeg volumena te povremeno promijeniti medij kako bi se uklonile mrtve stanice i osigurale hranjive tvari. Stanice su uzgajane do konfluentnosti (Freshney, 2010).

3.2.2. Priprema suspenzije stanica

Nakon što su stanice došle do faze konfluentnosti odstranjen je medij iz T-boca te su stanice isprane puferom PBS. Nakon ispiranja na stanice je dodana otopina tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge te je dodatkom hranjivog medija pripremljena suspenzija stanica u koncentraciji 10⁵ stanica mL⁻¹. Točan broj stanica je potrebno utvrditi kako bi rezultati dobiveni eksperimentom bili reproducibilni i kako bi se dobivene vrijednosti mogle uspoređivati.

3.2.3. Utvrđivanje broja stanica

Točan broj stanica u određenom volumenu uzorka određuje se pomoću Bürker-Türkove komorice i mikroskopa. Volumen od 10 μL uzorka nakon tripsinizacije nanese se na Bürker-Türkovu komoricu koja se sastoji od 9 velikih kvadrata površine 1 mm^2 . Veliki kvadrat se sastoji od 16 malih kvadrata. Dubina ćelije (prostor između predmetnice i pokrovnog stakalca) iznosi 0,1 mm. Stanice se broje u četiri vanjska velika kvadrata, a konačni broj određuje se kao srednja vrijednost izbrojanih stanica u svakom velikom kvadratu zasebno (slika 6). Rezultat je izražen brojem stanica po 1 mL stanične suspenzije.



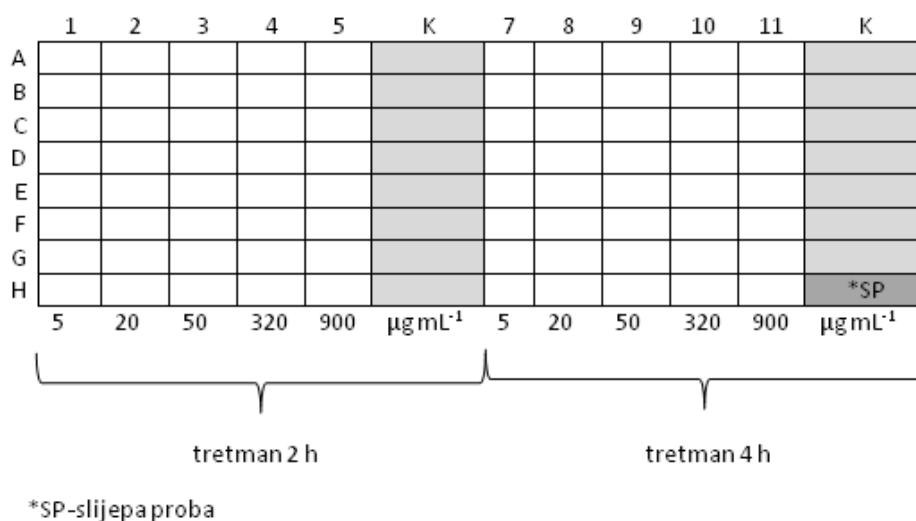
Slika 6. Izgled Bürker-Türkove komorice (preuzeto i prilagođeno prema FisherScientific, 2019)

Priprema stanica za određivanje citotoksičnog i antioksidacijskog/prooksidacijskog djelovanja hidrokinona:

U mikrotitarske ploče s 96 jažica naciepljuje se po 100 μL stanične suspenzije koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Nakon postizanja subkonfluentne kulture, odstranjen je hranjivi medij te su stanice tretirane određenim koncentracijama hidrokinona pripremljenih u hranjivom mediju. Kao negativna kontrola korištene su stanice koje nisu bile tretirane. Svi tretmani provedeni su u 4 replike i 2 nezavisna eksperimenta.

Budući da se urin u mjehuru zadržava između 2 i 4 h, stanice su tretirane hidrokinonom 2 i 4 h (slika 7).

Također, istraživao je i utjecaj oporavka na preživljenje stanica tako da je nakon provedenog tretmana hidrokinonom na stanice ponovo dodan hranjivi medij te se nastavilo s inkubacijom stanica pri 37 °C tijekom 24 h.



Slika 7. Shema tretmana stanica radnim otopinama hidrokinona

3.2.4. Određivanje citotoksičnog učinka hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom Neutral red

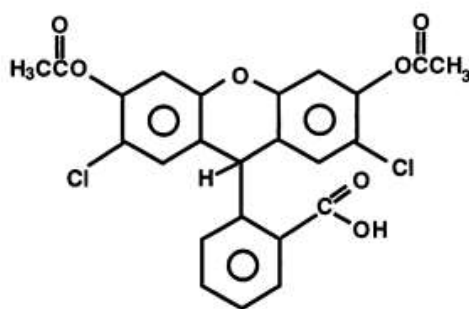
Neutral red metoda jedna je od često korištenih metoda za utvrđivanje citotoksičnog učinka raznih ksenobiotika. Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) boja prolazi kroz membranu stanica neionskom difuzijom i veže se za lizosomski matriks stanica. Intenzitet ulaska Neutral red boje u stanicu ovisi o sposobnosti stanice da održava pH gradijent pomoću stvaranja ATP-a. Fiziološki pH omogućava boji da prođe kroz staničnu membranu. Kada Neutral red boja prođe u citoplazmu stanice zbog pH gradijenta nastavlja prodirati prema lizosomu u kojemu je pH niži nego u citoplazmi. Kada uđe u lizosom, boja postaje nabijena te se zadržava unutra (Repetto i sur., 2008). Nakon ispiranja obojenih stanica otopinom za odbojavanje one se kvantificiraju spektrofotometrijski. Mrtve ili oštećene stanice ne mogu zadržati Neutral red boju nakon ispiranja, stoga je intenzitet obojenja, kao i vrijednost apsorbancije, linearno povezan sa koncentracijom preživjelih stanica (Babich i Borenfreund, 1991).

Nakon završenog tretmana i ispiranja stanica s puferom PBS (100 μL) određivan je citotoksični učinak hidrokinona na staničnu liniju T24 pomoću Neutral red metode. Stanice su tretirane Neutral red otopinom koncentracije 0,05 mg mL⁻¹. U svaku jažicu dodano je 100 μL radne otopine Neutral red. Mikrotitarske ploče su potom ostavljene u CO₂ inkubatoru pri 37 °C na 30-40 minuta. Boja koja je aktivnim transportom ušla u lizosome, ekstrahirana je otopinom za odbojavanje te je spektrofotometrijski određen intenzitet ekstrahirane boje u tretiranim i kontrolnim stanicama. Apsorbancija je mjerena pri 520 nm, a postotak preživljenja izračunat je na sljedeći način: $\% \text{ preživljenja} = (A_{520} \text{ tretiranih uzoraka} / A_{520} \text{ kontrole}) \times 100$

Isti postupak ponovljen je i sa stanicama T24 koje su nakon tretmana prošle 24-satni oporavak u hranjivom mediju kako bi se saznao utjecaj oporavka na preživljenje stanica.

3.2.5. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom DCFH-DA

Metoda DCFH-DA koristi se za određivanje nastalih reaktivnih kisikovih radikala. DCFH-DA (2',7'-diklorfluorescein diacetat) (slika 8) je nepolarna i nefluorescentna boja koja nakon tretmana stanica ksenobiotikom difuzijom ulazi u citoplazmu stanice gdje stanične esterase hidroliziraju acetatne skupine pri čemu nastaje polarni i također nefluorescentni spoj DCFH (2',7'-diklorfluorescein) koji se veže na nastale slobodne radikale. Opisana reakcija rezultira pojavom fluorescencije (Hempel i sur., 1999).



Slika 8. Kemijska struktura DCFH-DA (Hempel i sur., 1999)

Ishodišna otopina DCFH-DA pripremljena je otapanjem 1,5 mg DCFH-DA u 1,5 mL RPMI medija. Iz ishodišne otopine pripremljena je radna otopina DCFH-DA (0,05 mM).

Nakon tretmana, stanice su isprane PBS puferom (100 μ L). Potom je u svaku jažicu crne mikrotitarske ploče dodano po 100 μ L 0,05 mM otopine DCFH-DA te su stanice inkubirane u CO₂ inkubatoru na 37 °C 15 minuta. Fluorimetrijski je mjerena emisija pri 485 nm i ekscitacija pri 530 nm. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini slobodnih radikala u stanici.

3.2.6. Uzgoj stanica za analizu proteina

Stanice su uzgojene u T-bocama na način opisan u poglavlju 3.2.1. Potom je iz T-boca suspenzija stanica premještena u šest plastičnih sterilnih petrijevih zdjelica. U svaku petrijevu zdjelicu nasađeno je 10 mL suspenzije stanica koncentracije $1,5 \times 10^5$ stanica mL⁻¹. Petrijeve zdjelice sa uzorcima stavljene su u CO₂ inkubator (95 % zraka, 5 % CO₂) na temperaturu 37 °C da se inkubiraju tijekom 24 h. Stanice su tretirane otopinom hidrokinona koncentracije 20 mg mL⁻¹, a ta je koncentracija izabrana nakon analize citotoksičnog i prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja hidrokinona. Svi eksperimenti napravljeni su u dvije replike. Dakle, dva uzorka predstavljala su kontrolu, dva uzorka predstavljala su stanice tretirane hidrokinonom bez oporavka, a preostala dva stanice tretirane hidrokinonom koje su se nakon tretmana oporavljale 24 h u hranjivom mediju za uzgoj stanica (10 %-tna otopina FBS-a u RPMI-ju). Stanice su tretirane radnom otopinom hidrokinona tijekom 2 h, što je također izabrano na temelju rezultata dobivenih određivanjem citotoksičnosti i prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja.

Nakon tretmana stanice su isprane tri puta puferom PBS kako bi se uklonili ostaci medija i hidrokinona. Potom su stanice postrugane su i premještene u mikroepruvete, jednom isprane s PBS puferom, te su lizirane u puferu PBS koji je sadržavao 1 % SDS-a. Nakon lize, neotopljeni dijelovi stanice su centrifugirani te je u supernatantu određena koncentracija proteina metodom po Bradfordu.

3.2.7. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima Bradfordovom metodom

Metoda određivanja proteina po Bradfordu je široko rasprostranjena metoda zbog svoje jednostavnosti korištenja, brzine i osjetljivosti same metode. Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima prvo je potrebno odrediti baždarni pravac. Baždarni pravac određuje se na temelju otopina standarda koje se priređuju u kivetama. Standarde predstavljaju otopine BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) koncentracije od $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Otopine se nadopune destiliranom vodom do ukupnog volumena $200 \mu\text{L}$. Potom je u pripremljene otopine dodano po 2 mL Bradfordovog reagensa. Coomasie brilliant blue boja prisutna u Bradfordovom reagensu veže se za proteine stvarajući kompleks koji intenzivno apsorbira svjetlost valne duljine 594 nm (Zor i Sellinger, 1996). Na temelju dobivenih podataka nacrtan je baždarni dijagram i izračunata je jednadžba pravca. Apscisa je predstavljala vrijednosti koncentracije proteina, dok je ordinata predstavljala vrijednosti apsorbancija.

Iz proteinskih uzoraka izoliranih iz stanca izuzeta su $4 \mu\text{L}$ za provedbu Bradfordove metode određivanja proteina. Uzorci su nadopunjeni ultračistom vodom do ukupnog volumena od $200 \mu\text{L}$ te je potom dodano 2 mL Bradfordova reagensa u svaku kivetu s uzorkom. Apsorbancija je mjerena na 595 nm . Pomoću baždarnog dijagrama izračitate su koncentracije proteina u uzorcima.

3.2.8. Neciljana analiza proteina

U volumen uzoraka koji je sadržavao $100 \mu\text{g}$ proteina dodan je pufer 100 mM TEAB do ukupnog volumena $100 \mu\text{L}$. Dodano je $5 \mu\text{L}$ pufera TCEP te su uzorci inkubirani sat vremena na temperaturi od 55°C . Zatim je u svaki uzorak dodano po $5 \mu\text{L}$ 375 mM jodacetamida. Uzorci su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetla. Kako bi se istaložili proteini, u svaki uzorak je dodano $600 \mu\text{L}$ acetona (-20°C) te su uzorci ostavljeni u zamrzivaču (-20°C) preko noći.

Nakon taloženja uzorci su centrifugirani na $8000 \times g$ pri 4°C tijekom 10 minuta. Supernatanti (acetona) su potom odstranjeni. Talozi su resuspendirani u $100 \mu\text{L}$ pufera 50 mM TEAB . U svaki uzorak dodano je po $2,5 \mu\text{L}$ matične otopine tripsina. Digestija je provedena u termomiješalici na 37°C preko noći. Nakon digestije, peptidi su u uzorcima obilježeni s TMT reagensima. Kontrolni uzorak obilježen je TMT 127 izobarnim reagensom, a uzorak tretiranih stanica bez oporavka obilježen je TMT 126 izobarnim reagensom. Postupak obilježavanja je proveden na

način da je 100 μL uzorka pomiješano s 41 μL TMT reagensa. Reakcija se odvijala sat vremena na sobnoj temperaturi. Potom je u svaki uzorak dodano po 8 μL 5 %-tnog hidroksilamina te su uzorci ostavljeni tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se zaustavila reakcija. Jednaki volumeni oba uzorka su spojeni te je 50 μL pomiješanih uzoraka kromatografski separirano kako bi se peptidi frakcionirali prije daljnje analize uz pomoć instrumenta HPLC1260 Infinity (Agilent Technologies, SAD).

Metoda frakcioniranja peptida prikazana je na slici 9. Korištena je kolona Aeris™ 1,7 μm , PEPTIDE XB-C₁₈, 150×2,1 mm (Phenomenex, SAD). Sakupljanje frakcija prikazano je na slici 10.

Faza A: 95 % voda, 5 % acetonitril, 0,1 % TFA

Faza B: 5 %voda, 95 % acetonitril, 0,1 % TFA

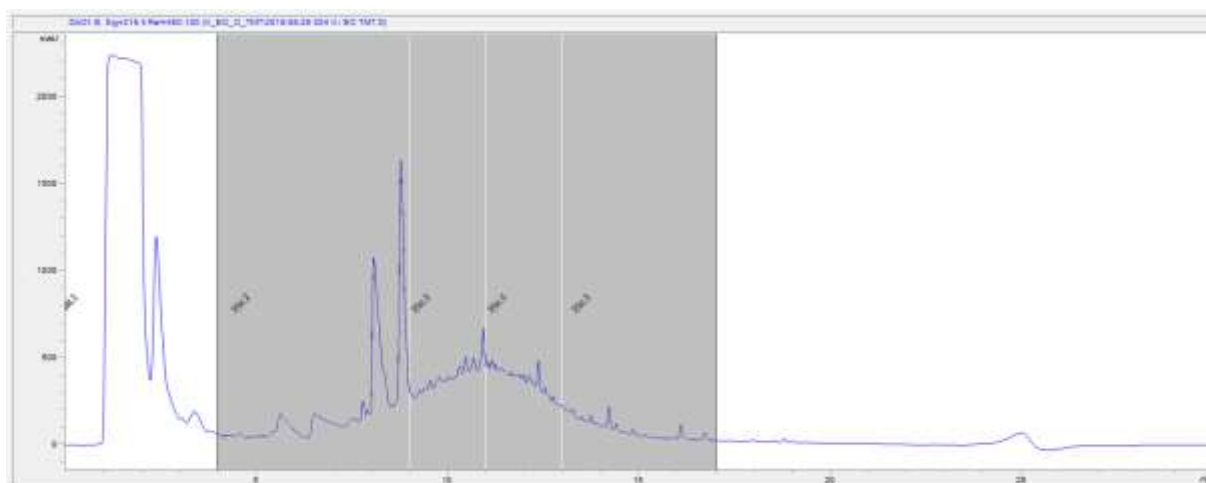
Vrijeme (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL min^{-1})	Maksimalni tlak (bar)
0,00	90	10	0,3	600
2,00	90	10	Frakcije:	
17,00	10	90	4.-9. minuta → 1. frakcija	
20,00	10	90	9.-11. minuta → 2. frakcija	
20,10	90	10	11.-13. minuta → 3. frakcija	
25,00	90	10	13.-17. minuta → 4. frakcija	

Volumen injektiranja: 50 μL

Valne duljine pri kojima je snimano: 215 nm i 280 nm

Temperatura kolone: 45 °C

Slika 9. Metoda frakcioniranja na uređaju HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, SAD)



Slika 10. Prikaz frakcija sakupljenih nakon kromatografske separacije na instrumentu HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, SAD)

Svaka frakcija skupljena je u posebnu vialu i posušena u struji dušika. Posušeni uzorci otopljeni su u 20 μL 0,1 %-tnoj TFA i preneseni su u mikroviale. Uzorci su potom analizirani s DionexUltimate 3000 RSLC nano sustavom uz UV/VIS detektor (Thermo Scientific, SAD) koji je direktno spregnut sa sakupljačem frakcija PROTEINEER fcIII. Navedeni sustav sadrži pokretni ventil s 10 otvora što omogućava istovremeno korištenje dvije različite kolone. U ovom slučaju korištene su kolona za pročišćavanje peptida te kolona za razdvajanje. Metoda pročišćavanja peptida izvedena je na koloni Acclaim PepMap 100 C₁₈, 5 μm , 100 Å, 300 μm i.d. $\times$ 5 mm, (Thermo Scientific, SAD) prema parametrima navedenim u tablici 3. Separacija je provedena na koloni Acclaim PepMap 100 C₁₈, 3 μm , 100 Å, 75 μm i.d. $\times$ 15 cm (Thermo Scientific, SAD) prema parametrima navedenim na slici 11. Separirane frakcije peptida potom su sakupljene uz pomoć sakupljača frakcija koji direktno sakuplja frakcije na MALDI pločicu prema parametrima opisanima u tablici 4.

Tablica 3. Parametri pročišćavanja peptida

Mobilna faza A	0,1%-tna vodena otopina TFA (v v⁻¹)
Mobilna faza B	Acetonitril
Volumen injektiranja	1 µL
Temperiranje predkolone	40°C
Ispiranje kolone	Izokratno, A/B = 98/2 (v v ⁻¹), 5 minuta
Protok	10 µL min ⁻¹

Faza A: 0,1 %-tna vodena otopina TFA (v v⁻¹)

Faza B: Acetonitril

Vrijeme (min)	B(%)	Protok (µL min⁻¹)
0	2,0	0,3
10	2,0	0,3
58	40,0	0,3
59	90,0	0,3
69	90,0	0,3
70	2,0	0,3
75	2,0	0,3

Temperatura kolone: 40 °C

Protok: 0,3 µL min⁻¹, gradijentno

Detekcija: UV/VIS detektor, valna duljina 215 nm

Slika 11. Metoda separacije peptida na Dionexu

Tablica 4. Parametri sakupljanja peptidnih frakcija

Protok matrice	100 $\mu\text{L h}^{-1}$
Vrijeme sakupljanja frakcija	15-63 min
Vrijeme sakupljanja /frakcija	15 s
Ukupan broj sakupljenih	192

Nakon sakupljanja frakcija na MALDI pločice, peptidi su analizirani koristeći spektrometar masa Autoflex Speed MALDI/TOF-TOF. Parametri analize MS prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Parametri snimanja spektara MS.

Tip analize	MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Ionsko zrcalo	Reflektron
Broj snimaka/spektar	1000
Raspon masa (Da)	700-4000
Kalibracija MS spektara	Algoritam krivulje četvrtog reda uz signale dobivene snimanjem standardnih peptida poznatih masa (minimalno 6)
Tolerancija mase pri kalibraciji	100 ppm

Kriteriji za odabir prekursora za analizu MS/MS prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Odabir prekursora za analizu MS/MS

Maksimalna tolerancija mase peptida unutar različitih frakcija	100 ppm
Maksimalan broj frakcija u kojima se dopušta ponavljanje istog peptida	6
Identifikacija pozadinskih signala	Ponavljjanje signala u 70 % frakcija
Minimalan s/n za snimanje MS/MS	50
Minimalna razlika između peptida koji koeluiraju (Da)	5
Maksimalan broj prekursora po frakciji	10

Snimanje spektara MS/MS određeno je parametrima navadenima u tablici 7.

Tablica 7. Parametri snimanja spektara MS/MS

Tip analize	MS/MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Ionsko zrcalo	Reflektron
Broj snimaka/spektar	1000
Vrsta fragmentacije	Inducirana laserom

Nakon snimanja spektara MS i MS/MS dobiveni podaci korišteni su za pretragu baze podataka. U ovom slučaju korišten je program ProteinScape, verzija 3.0 (Bruker, Njemačka). Podaci dobiveni analizama MS i MS/MS kombinirani su pri pretrazi baze kako bi se identificirali proteini uz parametre navedene u tablici 8.

Tablica 8. Parametri pretrage baze podataka

Baza podataka	SwissProt
Taksonomija	<i>Homo sapiens</i>
Pretraživač	MASCOT
Enzim	Trypsin, 1 preskočeno cijepanje
Varijabilne modifikacije	TMT-2plex, oksidacija metionina i deamidacija asparagina i glutamina
Tolerancija mase prekursora	100 ppm
Tolerancija mase fragmentnih iona	0,7 Da

3.2.9. Ciljana analiza proteina

Na temelju rezultata neciljane analize odabran je protein vimentin za daljnju ciljanu analizu. FASTA sekvenca ciljanog proteina preuzeta je iz UniProt baze podataka i unesena u Skyline program, verzija 4.2.0. Postavljen je pozadinski proteom koji sadrži informacije o cijelom setu proteina koji mogu biti prisutni u matriksu uzorka. Metoda MS koja je korištena za provedbu ciljane analize vimentina preuzeta je iz rada Wenke i sur. (2016), ali su optimizirani određeni parametri navedeni u tablici 9.

Tablica 9. Optimizirani parametri metode MRM

Prekursor ion (<i>m/z</i>)	Produkt ion (<i>m/z</i>)	Vrijeme zadržavanja (ms)	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (V)
547.26727	875.421735	15	130	15
547.26727	760.394792	15	130	24
547.26727	647.300728	15	130	15
547.26727	560.2987	15	130	24
476.908774	609.315487	15	130	16
476.908774	510.257073	15	130	9,4

Separacija peptida provedena je koristeći tekućinski kromatograf 1290 Infinity LC System u sprezi s 6460 Triple Quad MS (Agilent Technologies, SAD). Parametri separacije peptida navedeni su u tablici 10.

Tablica 10. Parametri separacije peptida

Mobila faza A	0,1 %-tna vodena otopina mravlje kiseline (v v ⁻¹)		
Mobilna faza B	Acetonitril		
Kolona	ACQUITY UPLC® BEH C ₁₈ 1,7 µm, 2,1×50 mm (Waters, SAD)		
Temperatura kolone	40 °C		
Protok	0,3 mL min ⁻¹		
Gradijent	Vrijeme (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	2	95	5
	16	60	40
	25	20	80
	26	20	80
	26,5	95	5
	35	95	5
Detekcija	MS, metoda MRM		

Postavke ionskog izvora nalaze se u tablici 11.

Tablica 11. Parametri MS analize

Detekcija iona	Pozitivna
Temperatura plina (°C)	300
Protok plina (L min⁻¹)	7
Tlak nebulizera (psi)	40
Temperatura sheath plina (°C)	300
Protok sheath plina (L min⁻¹)	9
Napon na kapilari (V)	3500

3.2.10. Statistička obrada rezultata

Rezultati ispitivanja citotoksičnog učinka te prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja hidrokinona na staničnu liniju T24 obrađeni su parametrijski u programu JASP 0.10.02 analizom varijance (ANOVA) korištenjem Scheffé-ovog *post hoc* testa uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$. Scheffé-ovim *post hoc* testom međusobno su uspoređene sve dobivene srednje vrijednosti preživljenja stanica tretiranih različitim koncentracijama hidrokinona i preživljenje netretiranih stanica kako bi se utvrdilo postoji li među njima statistički značajna razlika.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja citotoksičnog i prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka hidrokinona na stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka. U obzir su uzete različite koncentracije hidrokinona, kao i utjecaj 24-satnog oporavka stanica u hranjivom mediju na njihovo preživljenje. Citotoksičnost hidrokinona ispitana je Neutral red metodom, a njegovo prooksidacijsko/antioksidacijsko djelovanje DCFH-DA metodom. Također su provedene i neciljana te ciljana analiza proteina u uzorcima tretiranim odabranom koncentracijom hidrokinona kako bi se utvrdilo uzrokuje li tretman

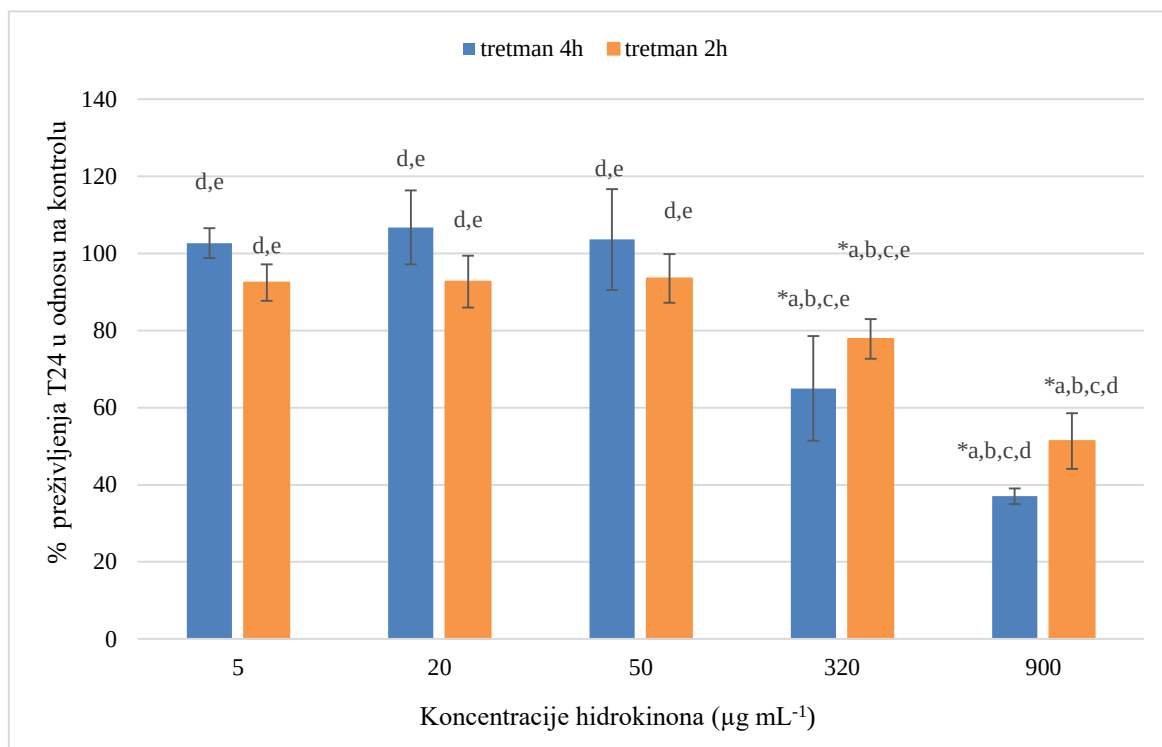
stanične linije T24 hidrokinonom promjenu u proteomu tretiranih stanica u odnosu na netretirani kontrolni uzorak stanica.

4.1. Određivanje citotoksičnog učinka hidrokinona na staničnu liniju T24 metodom Neutral red

Ispitan je citotoksični učinak različitih koncentracija hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) na staničnu liniju T24. Test citotoksičnosti proveden je Neutral red metodom opisanom u poglavlju 3.2.5. Stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka tretirane su navedenim koncentracijama hidrokinona u periodu 2 i 4 h, s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju i bez oporavka.

Preživljenje tretiranih stanica računato je u odnosu na kontrolu (netretirane stanice) pomoću vrijednosti dobivenih apsorbancija. Rezultati su izraženi grafički kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji hidrokinona kojom su tretirane. Grafički su prikazane srednje vrijednosti sa pripadajućim standardnim devijacijama.

Na slici 12 prikazan je citotoksični učinak različitih koncentracija hidrokinona na staničnu liniju T24 nakon 2 i 4 h izloženosti bez oporavka.



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

a-statistički značajno u odnosu na 5 µg mL⁻¹ ($p < 0,05$)

b-statistički značajno u odnosu na 20 µg mL⁻¹ ($p < 0,05$)

c-statistički značajno u odnosu na 50 µg mL⁻¹ ($p < 0,05$)

d-statistički značajno u odnosu na 320 µg mL⁻¹ ($p < 0,05$)

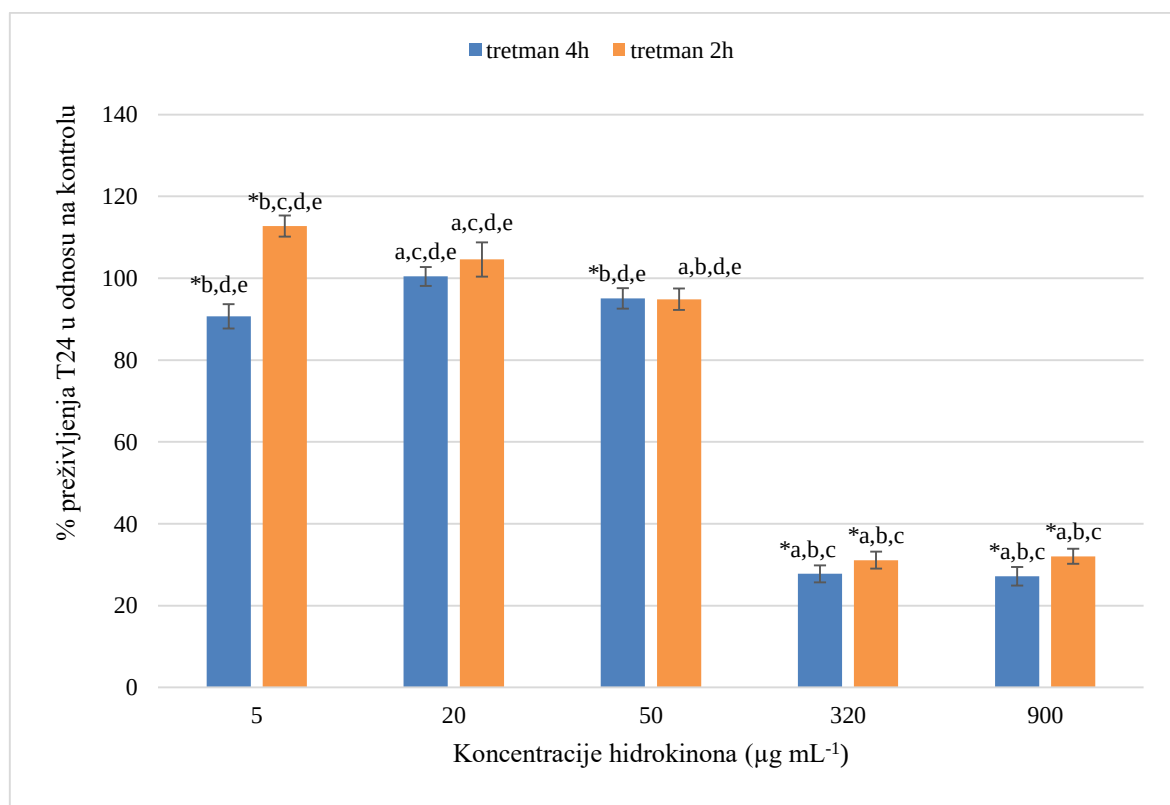
e-statistički značajno u odnosu na 900 µg mL⁻¹ ($p < 0,05$)

Slika 12. Preživljenje stanične linije T24 nakon 2 i 4 h tretmana različitim koncentracijama hidrokinona, bez oporavka

Obradom rezultata, na slici 12 vidljivo je da se preživljenje stanica T24 tretiranih višim koncentracijama (320 i 900 µg mL⁻¹) bez oporavka statistički značajno razlikuje u odnosu na kontrolu. Isto tako, kod tretmana višim koncentracijama hidrokinona (320 i 900 µg mL⁻¹) bez oporavka, vidljiva je dozna ovisnost, odnosno kod koncentracije 320 µg mL⁻¹ primjećujemo viši postotak preživljenja (60 – 80 %) stanica T24 u odnosu na tretman s koncentracijom 900 µg mL⁻¹ (30 – 50 %). Nadalje, više koncentracije hidrokinona (320 i 900 µg mL⁻¹) bez oporavka su pokazale statistički značajno niže preživljenje T24 stanica u odnosu na niže ispitivane koncentracije (5, 20 i 50 µg mL⁻¹) u oba vremenska tretmana. Nakon statističke obrade utvrđeno je da je samo kod stanica T24 izloženih hidrokinonu koncentracije 20 µg mL⁻¹ i 900 µg mL⁻¹ bez oporavka vrijeme izloženosti imalo bitnu ulogu. Koncentracija 20 µg mL⁻¹ pokazala je statistički značajno veći citotoksični efekt nakon dvosatne izloženosti stanica hidrokinonu u odnosu na 4 h. Suprotno tome, kod koncentracije 900 µg mL⁻¹ veći citotoksični učinak zapažen

je nakon četverosatne izloženosti. Manje preživljenje T24 stanica, a time i manja vrijednost apsorbancije pri višim koncentracijama hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) nije iznenađujuća budući da se sama Neutral red metoda temelji na aktivnom transportu boje u živu stanicu. Manja vrijednost apsorbancije, odnosno manji intenzitet obojenja rezultat je uništenja stanične membrane hidrokinonom. Budući da se proteinski nosači odgovorni za aktivni transport nalaze na membrani stanica, ukoliko dođe do uništenja membrane stanica više ne može provoditi aktivni transport. Stoga, bez funkcionalne membrane, odnosno ukoliko stanica nije živa, ne može ni doći do ulaska Neutral red boje u stanicu.

Na slici 13 prikazan je citotoksični učinak različitih koncentracija hidrokinona na staničnu liniju T24 nakon 2 i 4 h izloženosti s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju (10 %-tna otopina FBS-a u RPMI-ju).



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

a-statistički značajno u odnosu na $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

b-statistički značajno u odnosu na $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

c-statistički značajno u odnosu na $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

d-statistički značajno u odnosu na $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

e-statistički značajno u odnosu na $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

Slika 13. Preživljenje stanične linije T24 nakon 2 i 4 h tretmana različitim koncentracijama hidrokinona s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju

Što se tiče stanica koje su prošle 24-satni oporavak u hranjivom mediju nakon tretmana hidrokinonom, na slici 13 vidljivo je da visoke koncentracije hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$), kao i u slučaju bez oporavka, uzrokuju visoku smrtnost stanica ($< 40 \%$), ali ipak puno veću u odnosu na eksperiment bez oporavka ($40 - 80 \%$ ovisno o koncentraciji). Isto tako, kod tretmana s oporavkom vidljivo je da kod viših koncentracija hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) više nemamo dozno ovisni odgovor kao što je to kod eksperimenta bez oporavka, već je % preživljenja kod obje koncentracije podjednak. Što se tiče izloženost stanica nižim koncentracijama hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), nakon dvosatne izloženosti T24 stanica hidrokinonu koncentracije $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ došlo je do blage proliferacije stanica u odnosu na kontrolu. S druge strane, kod četverosatne izloženosti ista koncentracija pokazala je blago citotoksičan efekt te su zaključno tome oba vremena pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i vremenu izlaganja. Koncentracija $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ nije imala nikakav učinak na stanice, dok je koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon četverosatne inkubacije pokazala citotoksičan učinak u odnosu na kontrolu.

Što se tiče vremena izloženosti različitim koncentracijama hidrokinona, jedino se kod koncentracija 5 i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ s naknadnim oporavkom vrijeme izloženosti pokazalo statistički značajnim. Kod koncentracije $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ s oporavkom dolazi do potpuno suprotnih učinaka pri različitim vremenima izloženosti, dok je kod koncentracije $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ s oporavkom preživljenje stanica značajno veće nakon dvosatnog tretmana.

Kod stanica T24 tretiranih 4 h s oporavkom jedino se koncentracija hidrokinona $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazala statistički značajnom u odnosu na preživljenje stanica tretiranih 4 h bez oporavka. Preživljenje stanica tretiranih 4 h navedenom otopinom hidrokinona manje je nakon 24-satnog oporavka u hranjivom mediju. Isto tako ako uspoređujemo tretmane s oporavkom i bez oporavka, jedino kod najviše koncentracije hidrokinona ($900 \mu\text{g mL}^{-1}$) u oba slučaja imamo trend statistički značajno većeg preživljenja u kraćem vremenu izlaganja (2 h) u odnosu na duže vrijeme (4 h).

Razlike u preživljenju stanica T24 tretiranih hidrokinonom 2 h s oporavkom u odnosu na stanice tretirane 2 h bez oporavka vidljive su pri svim koncentracijama, osim $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. U tom vremenu izloženosti niže koncentracije hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) uzrokovale su veće preživljenje stanica nakon oporavka u hranjivom mediju, dok su više koncentracije ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri istom vremenu izloženosti (2 h) uzrokovale manje preživljenje stanica nakon 24-satnog oporavka.

Na temelju takvih rezultata moguće je zaključiti da kod kraćeg vremena izloženosti nižim koncentracijama hidrokinona dolazi do reverzibilnih oštećenja stanica T24 te se one tijekom 24-satnog oporavka mogu regenerirati. Kod viših koncentracija hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) može se pretpostaviti da je došlo do težih oštećenja stanične membrane koja se tijekom oporavka nisu mogla sanirati već su ta oštećenja uzrokovala smrt stanica. Isto tako, 2-satno izlaganje spomenutim većim koncentracijama hidrokinona nije bilo dovoljno da se ispolji maksimalan letalni efekt na stanice T24 već je on bio vidljiv nakon obrade rezultata s oporavkom stanica. Ovime je i dokazano da hidrokinon ulazi u stanicu gdje uzrokuje oštećenja tijekom određenog vremena jer fizičkim uklanjanjem hidrokinona i ponovno stavljanje hranjivog medija nije (tretman s oporavkom) smanjilo smrtnost stanica T24.

Do sličnog zaključka došli su Pyatt i sur. (1998) proučavajući utjecaj hidrokinona na primarne humane CD4 T-limfocite. Njihovi rezultati pokazali su da tretman primarnih humanih CD4 T-limfocita hidrokinonom koncentracije $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ djeluje inhibitorno na aktivaciju NF- κB koja je inducirana sa TNF- α (eng. *Tumor Necrosis Factor α*). Takva inhibicija nije praćena smanjenjem preživljenja stanica budući da CD4 T-limfociti zadržavaju neke od signalnih puteva tijekom izloženosti hidrokinonu. Time se može zaključiti da je inhibicija NF- κB nižim koncentracijama hidrokinona reverzibilna, a Pyatt i sur. potvrdili su to i eksperimentalnim rezultatima. Naime, stanice tretirane $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ otopinom hidrokinona su nakon 72 h oporavka u RPMI hranjivom mediju pokazale obnovljenu sposobnost odgovora na TNF- α . Najmanja ispitivana koncentracija u ovom radu ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) također nije smanjila preživljenje T24 stanica sa i bez oporavka te je na taj način također potvrđeno da vrlo niske koncentracije koje odgovaraju 0,6 % početne koncentracije arbutina u jednoj šalici čaja i dolaze u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura uzrokuju reverzibilna oštećenja.

Prema dobivenim rezultatima moguće je zaključiti kako stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka nisu osjetljive na djelovanje hidrokinona u nižim ispitivanim koncentracijama ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Te koncentracije odgovaraju količini slobodnog hidrokinona koji dolazi u doticaj sa stanicama mokraćnog mjehura nakon konzumacije jedne do tri šalice uvin-H čaja dnevno, ali u te koncentracije nisu uračunati konjugati hidrokinona koji se u lužnatom mediju cijepaju na slobodni hidrokinon. Značajniji citotoksični učinak hidrokinona na T24 staničnu liniju vidljiv je tek pri koncentracijama $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$, osobito nakon 24-satnog oporavka u hranjivom mediju. Koncentracija $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ predstavlja maksimalnu koncentraciju slobodnog hidrokinona u mokraćnom mjehuru nakon konzumacije jedne šalice uvin-H čaja u slučaju da se poklope uvjeti lužnatog medija i da se svi hidrokinon

konjugati hidroliziraju do slobodnog hidrokinona te dođu u kontakt sa stanicama T24. S druge strane, koncentracija $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ predstavlja maksimalnu koncentraciju slobodnog hidrokinona u mokraćnom mjehuru nakon konzumacije preporučene dnevne doze uvin-H čaja (3 šalice) u istim uvjetima koji su navedeni za koncentracija $320 \mu\text{g mL}^{-1}$. Prema radu de Arriba i sur. (2013) konjugati hidrokinona nisu toksični, dok slobodni oblik hidrokinona predstavlja potencijalnu prijetnju ljudskom zdravlju. No, ukoliko u mjehuru prevladavaju lužnati uvjeti aktivira se glikozid hidrolaza koju proizvode uropatogene bakterije. Taj enzim odgovoran je za dekonjugaciju hidrokinon-sulfata i hidrokinon-glukuronida čime nastaje slobodni hidrokinon. Ovi eksperimentalno dobiveni podatci navode na pretpostavku da preporučena doza uvin-H čaja (jedna do tri šalice dnevno) može imati citotoksičan efekt na stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka ukoliko prevladavaju lužnati uvjeti u mjehuru, odnosno ukoliko se svi konjugati hidrokinona iz konzumirane doze uvin-H čaja prevedu u slobodni oblik hidrokinona.

Citotoksičnost je definirana kao interferencija ksenobiotika sa strukturama tj. funkcijama bitnim za preživljavanje i razmnožavanje stanica. Na temelju poznatih podataka o citotoksičnosti određenih spojeva moguće je predvidjeti štetne učinke njima sličnih spojeva. Iako se vrijednosti LD_{50} i IC_{50} *in vitro* i *in vivo* često uspoređuju, toksičnost ksenobiotika za cijeli organizam ovisi o mnogo više faktora. Neki od tih faktora su način unosa, apsorpcija, raspodjela ksenobiotika u organizmu i eliminacija (Zapor, 2004). Mehanizam djelovanja hidrokinona na bakterije urinarnog trakta temelji se na promjeni sastava bakterijske membrane čime se povećava njihova hidrofobnost i onemogućuje njihovo prijanjanje za stanice epitela mjehura (Siegers i sur., 2003). Nakon izloženosti stanica sisavaca hidrokinonu u njima se stvara povećan broj DNA lomova, razmjena sestrinskih kromatida i kromosomskih aberacija. Također, hidrokinon ima utjecaj i na imunosni odgovor stanica. Izaziva alergijske reakcije zbog povećane zastupljenosti interleukina 4 (IL-4) i razine imunoglobulina E (IgE) (Enguita i Leitao, 2013). U ljudskim stanicama hidrokinon izaziva DNA lomove u prisutnosti bakrovih (II) iona koji posreduju u proizvodnji reaktivnih kisikovih radikala. Bakar se pojavljuje u jezgri stanica sisavaca i može pridonijeti kromatinskim strukturama visokog reda. Ioni bakra vežu se sa nehistonskim proteinima i uzrokuju mnogo jača oštećenja DNA posredovana askorbatom nego željezo. Izlaganje ljudskih stanica hidrokinonu uzrokovalo je lomove u DNA što pripisuju proizvodnji peroksida u samim tretiranim stanicama što dovodi do apoptoze. Upravo se izazivanje oksidacijskog stresa u stanicama smatra jednim od razloga citotoksičnog djelovanja hidrokinona (Hiraku i Kawanishi, 1996).

Chang i sur. (2017) proveli su istraživanje na Detroit 551 stanicama (stanice humanog fibroblasta) tretirajući ih hidrokinonom u rasponu koncentracija $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $55 \mu\text{g mL}^{-1}$ u tajanju od 0 do 6 sati. Rezultati upućuju na činjenicu da koncentracije hidrokinona veće od $11 \mu\text{g mL}^{-1}$ uzrokuju smanjenje preživljenja stanica za 60 % u odnosu na kontrolu (netretirane stanice) na način da aktiviraju kapsazu 3 i potiču apoptozu stanice. Ukoliko uspoređujemo s rezultatima u ovom radu, ispitivane koncentracije 5 – $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (jedna šalice i dnevna doza uvin-H čaja) nisu pokazale smanjenje preživljenja T24 stanične linije što možemo objasniti kraćim vremenom izlaganja (2 i 4 h). Također, moguće je da je utvrđena razlika s obzirom da se radi o drugoj vrsti stanica.

Pereira i sur. (2014) istraživali su utjecaj hidrokinona na humanim fibroblastima i stanicama karcinoma debelog crijeva (HCT116). Njihovi rezultati upućuju na to da visoke koncentracije hidrokinona ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) nakon 24-satne izloženosti značajno smanjuju preživljenje stanica u odnosu na kontrolu (netretirane stanice). Pereira i sur. (2014) takav rezultat objašnjavaju lomovima DNA uzrokovanih reaktivnim kisikovim radikalima nastalim u stanicama uslijed tretmana hidrokinonom. U ovom diplomskom radu, niže koncentracije ($5 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) nisu pokazale smanjenje preživljenja T24 stanica što se razlikuje od rada Pereira i sur. (2014). Ova razlika može se objasniti kraćim vremenom tretmana hidrokinonom te zaključujemo da slobodni hidrokinon iz jedne šalice i dnevne doze uvin-H čaja ne uzrokuju lomove DNA uzrokovane reaktivnim kisikovim radikalima ukoliko se radi o kraćem vremenu izlaganja. S druge strane, koncentracije 320 i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ (maksimalne koncentracije slobodnog hidrokinona iz jedne i tri šalice uvin-H čaja koja dolazi u doticaj sa stanicama mokraćnog mjehura pri povišenoj vrijednosti pH urina što uzrokuje hidrolizu konjugata hidrokinona) su pokazale citotoksično djelovanje i u kraćem vremenu izlaganja što potvrđuje oštećenja unutar DNA tretiranih stanica.

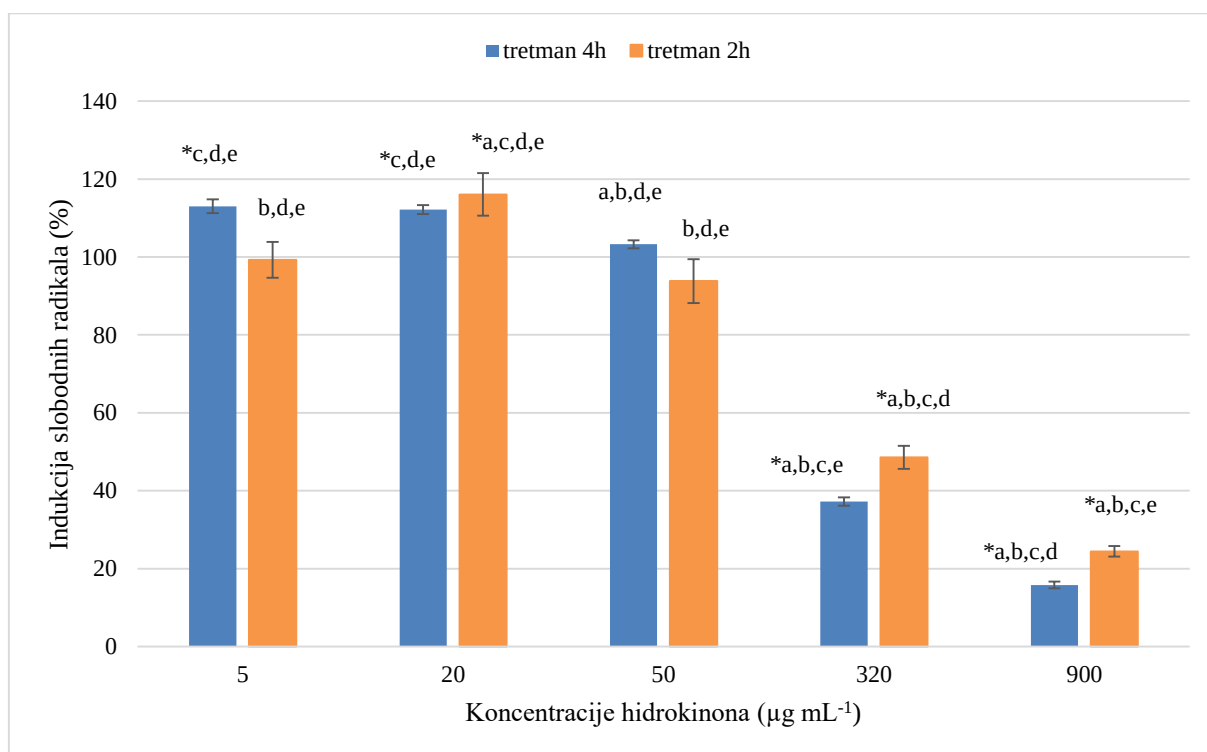
4.2. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka hidrokinona na T24 staničnu liniju DCFH-DA metodom

Ispitivanje prooksidativnog/antioksidativnog djelovanja hidrokinona provedeno je DCFH-DA metodom opisanom u poglavlju 3.2.6. Ispitivane koncentracije hidrokinona iste su onima kod ispitivanja citotoksičnosti te iznose $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$. Određivan je prooksidacijski/antioksidacijski učinak na stanicama tretiranim

hidrokinonom 2 i 4 h, s oporavkom i bez oporavka. Indukcija slobodnih kisikovih radikala pojedine koncentracije hidrokinona računata je u odnosu na kontrolu (netretirane stanice).

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost intenziteta fluorescencije, koji je korigiran s obzirom na preživljenje stanica, o koncentraciji hidrokinona. Grafički su prikazane srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na slici 14 prikazan je postotak indukcije slobodnih kisikovih radikala uzrokovan nakon izloženosti T24 stanica različitim koncentracijama hidrokinona 2 i 4 h bez oporavka.



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

a-statistički značajno u odnosu na $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

b-statistički značajno u odnosu na $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

c-statistički značajno u odnosu na $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

d-statistički značajno u odnosu na $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

e-statistički značajno u odnosu na $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

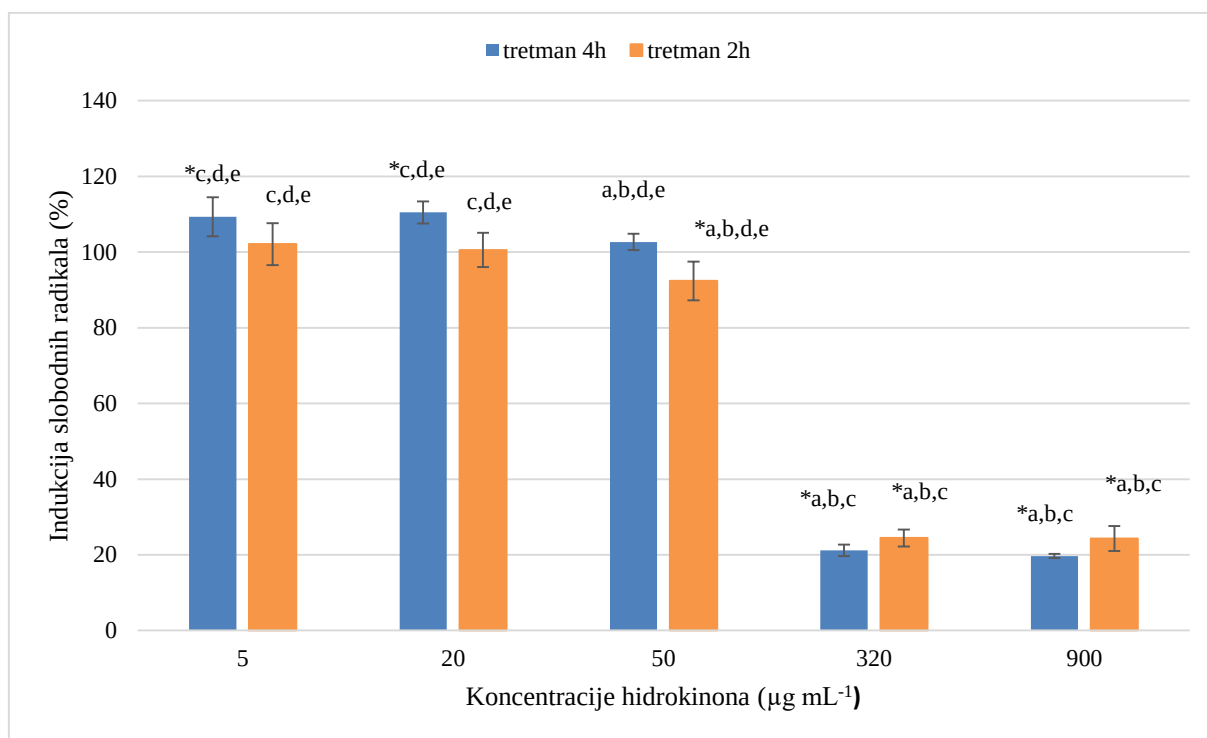
Slika 14. Indukcija slobodnih kisikovih radikala stanične linije T24 nakon 2 i 4 h izloženosti različitim koncentracijama hidrokinona bez oporavka

Da bi se rezultati na slici 14 mogli pravilo protumačiti potrebno je uzeti u obzir preživljenje stanica pri istim uvjetima (slika 12). Kako je već poznato da stvaranje veće količine slobodnih radikala može izazvati staničnu smrt, očekivano je da će manje preživljenje biti u onih stanica u kojima je nastala veća količina reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*,

ROS). Povezivanjem rezultata na slici 12 i 14 vidljivo je da se kod nižih koncentracija hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) preživljenje statistički značajno ne razlikuje u odnosu na negativnu kontrolu, ali eksperimentalni rezultati pokazuju da se kod stanica tretiranih hidrokinonom koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, bez oporavka, količina nastalih slobodnih kisikovih radikala statistički značajno razlikuje u odnosu na kontrolu, kako nakon dvosatnog, tako i nakon četverosatnog tretmana. To nam pokazuje da nam terapijska doza od jedne šalice uvin-H čaja iako je netoksična, diže razinu slobodnih kisikovih radikala u oba vremenska tretmana. Značajna količina ROS-ova inducirana je i u T24 stanicama tretiranim hidrokinonom koncentracije $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon četverosatne izloženosti. Kod stanica tretiranih hidrokinonom koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ nije došlo ni do kakve značajne produkcije slobodnih radikala u odnosu na negativnu kontrolu, kako ni nakon dvosatne izloženosti, tako ni nakon četverosatne. Kod viših koncentracija hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) došlo je do znatno manje produkcije slobodnih kisikovih radikala, no također je i preživljenje T24 stanica pri tim istim uvjetima bilo znatno niže. Pretpostavlja se da je tijekom djelovanja viših koncentracija hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) u preostalim preživjelim stanicama došlo do oštećenja membrane pa ne može doći ni do aktivacije molekule DCFH-DA kako bi bilo moguće mjerenje fluorescencije odnosno količine slobodnih kisikovih radikala. Time se objašnjava znatno manja izmjerena produkcija radikala.

Utjecaj na indukciju slobodnih radikala u T24 stanicama ima i vrijeme njihove izloženosti hidrokinonu. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da se kod tretmana bez oporavka sve korištene koncentracije hidrokinona, osim $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, statistički značajno razlikuju s obzirom na vrijeme izloženosti. Dakle, jedino kod T24 stanica tretiranih hidrokinonom koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ vrijeme izloženosti nije imalo nikakvu ulogu na količinu nastalih slobodnih radikala, iako se preživljenje stanica tretiranih istom koncentracijom hidrokinona statistički značajno razlikuje kod tretmana 2 i 4 h.

Na slici 15 prikazan je postotak indukcije slobodnih kisikovih radikala uzrokovan izloženosti T24 stanica različitim koncentracijama 2 i 4 h s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da se kod nižih koncentracija hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) s naknadnim oporavkom, kao i u uvjetima bez oporavka, inducira relativno velika količina ROS-ova, dok se pri višim koncentracijama ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) inducira mnogo manja količina kisikovih radikala.



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

a-statistički značajno u odnosu na $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

b-statistički značajno u odnosu na $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

c-statistički značajno u odnosu na $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

d-statistički značajno u odnosu na $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

e-statistički značajno u odnosu na $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$)

Slika 15. Indukcija slobodnih kisikovih radikala stanične linije T24 nakon 2 i 4 h izloženosti različitim koncentracijama hidrokinona s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju

Kako bismo protumačili rezultate sa slike 15 potrebno je u obzir uzeti rezultate prikazane na slici 13. Indukcija ROS-ova pri nižim koncentracijama hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) se statistički značajno razlikuje s obzirom na trajanje tretmana. Nakon tretmana T24 stanica hidrokinonom koncentracije $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 4 h te s naknadnim oporavkom preživljenje stanica iznosi oko 90 % dok se vrijednosti nastalih ROS-ova pri istim uvjetima kreću oko 110 % u odnosu na negativnu kontrolu. U slučaju dvosatnog tretmana, ista koncentracija i isti uvjeti oporavka pokazuju blagi proliferativni učinak na stanice T24, dok se količina nastalih slobodnih kisikovih radikala ne razlikuje značajno s obzirom na kontrolu. Kod koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ u uvjetima s oporavkom preživljenje stanica se ni u dvosatnom ni u četverosatnom tretmanu nije razlikovalo s obzirom na kontrolu, ali je tijekom dvosatnog tretmana nastala značajna količina ROS-ova. Što se tiče učinka hidrokinona koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ na T24 stanice nakon oporavka, preživljenje stanica nakon oba tretmana (2 i 4 h) iznosilo je oko 95 %, no pri dvosatnom tretmanu inducirano je manje ROS-ova u odnosu na kontrolu. Količina nastalih slobodnih kisikovih vrsta nakon 4 h tretiranja T24 stanica

hidrokinonom koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ te nakon 24-satnog oporavka nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolu.

Koncentracija $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon četverosatnog tretmana i 24-satnog oporavka pokazala je izrazito citotoksičan učinak na T24 stanice. Identičan efekt ista koncentracija pokazala je i nakon dvosatnog tretmana i naknadnog oporavka. Količina nastalih ROS-ova pri toj koncentraciji i istim uvjetima u oba tretmana (2 i 4 h) također je niska. Koncentracija $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ je u dvosatnom i četverosatnom tretmanu s naknadnim 24-satnim oporavkom pokazala gotovo iste rezultate u citotoksičnosti i indukciji ROS-ova kao i koncentracija $320 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da se samo koncentracija hidrokinona $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ statistički značajno razlikuje pri izloženosti stanica tijekom 4 h, dok su se kod dvosatne inkubacije stanica u hidrokinonu koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazale statistički značajnima. Dakle, kod četverosatnog tretmana stanica hidrokinonom koncentracije $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ veću indukciju ROS-ova pokazale su T24 stanice koje nisu prošle oporavak nego one koje su ga prošle. Što se tiče dvosatnog tretmana, koncentracije hidrokinona $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ također su pokazale veću indukciju ROS-ova u stanica koje nisu prošle 24-satni oporavak u hranjivom mediju.

Reaktivne kisikove vrste su vrste kisikovih spojeva koje su u mnogo reaktivnijem stanju od samog molekularnog kisika. Superoksid, peroksinitrit, vodikov peroksid i hidroksilni radikali su reaktivni kisikovi spojevi koji ubrzavaju procese oksidacije unutar stanica (Hancock i sur., 2001).

Ubrzavanje oksidacijskih procesa utječe na redoks status stanice, odnosno ravnotežu svih redoks reakcija koje se odvijaju u stanici. Narušavanje redoks statusa stanice može uzrokovati lipidne peroksidacije te oštećenje DNA ili enzima prisutnih u stanici, a potom i smrt stanice (León-González i sur., 2015).

Uzimajući u obzir rezultate Neutral red metode, DCFH-DA metode te sam njihov princip djelovanja moguće je doći do određenih pretpostavki. Iako je na početku postavljena hipoteza da se kod većeg preživljenja stanica očekuje manja indukcija ROS-ova, dobiveni rezultati potpuno su oprečni. Više koncentracije hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) uzrokovale su veću smrtnost stanica, ali i manju indukciju ROS-ova, dok su niže koncentracije hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) uzrokovale manju smrtnost stanica, ali je indukcija ROS-ova bila veća. Takvi se rezultati mogu objasniti na slijedeći način: Neutral red metoda temelji na aktivnom transportu boje u živu stanicu te je intenzitet obojenja i izmjerene apsorbancije proporcionalan broju živih stanica. Ukoliko se naruši integritet stanične membrane, proteinski nosači zaduženi za aktivni transport ne mogu više biti aktivni pa neće doći ni do ulaska Neutral

red boje u samu stanicu. Nadalje, DCFH-DA metoda temelji na oksidaciji nefluorescentnog 2',7'-diklorofluoresceina u prisutnosti ROS-ova, pri čemu zahvaljujući staničnim esterezama prilikom transporta 2',7'-diklorofluorescein diacetata dolazi do hidrolize acetatnih grupa te nastaje 2',7'-diklorofluorescein koji nakon reakcije sa slobodnim radikalima prelazi u jako fluorescirajuće molekule te je intenzitet fluorescencije proporcionalan prisutnosti slobodnih radikala u stanici. Ukoliko je narušen integritet stanice, kao i stanična membrana, tada esteraze neće biti aktivne pa se 2',7'-diklorofluorescein-diacetat neće moći oksidirati u 2',7'-diklorofluorescein. Bez te reakcije ne dolazi do pojave fluorescencije.

Dakle, kod visokih koncentracija hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) preživljenje T24 stanica kreće se ispod 80 %, a takvo preživljenje nije dovoljno za vjerodostojnu detekciju induciranih reaktivnih kisikovih vrsta. Razlog malog postotka indukcije ROS-ova pri navedenim visokim koncentracijama može biti različit. Jedna pretpostavka je da je zbog narušenog integriteta stanične membrane dio ROS-ova (ukoliko su uopće nastali u većoj količini od detektirane) migrirao izvan stanice, a kada su izvan stanice nije ih moguće detektirati DCFH-DA metodom. Druga pretpostavka je da u T24 stanicama izloženima visokim koncentracijama hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) uslijed oštećenja membrane nije došlo do inicijalne transformacije DCFH-DA molekule ili ona uopće nije ušla u stanicu.

Prema radu Trachootham i sur. (2009) stanice raka pokazuju povećanu razinu reaktivnih kisikovih radikala koja može promovirati proliferaciju stanica, ali imaju i mogućnost adaptirati se na povišenu koncentraciju ROS-ova na način da povećaju vlastiti antioksidacijski kapacitet i time razviti otpornost na određene ksenobiotike. Također, kancerogene stanice aktivno proizvode visoke količine ROS-ova izlažući se time endogenom oksidativnom stresu, stoga je i očekivano da postoji mogućnost njihove prilagodbe na oksidativni stres.

Niže koncentracije hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) nisu imale velik utjecaj na preživljenje T24 stanica, osim u slučaju četverosatnog tretmana s oporavkom gdje je koncentracija $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ izazvala blago citotoksičan učinak, a u slučaju dvosatnog tretmana s oporavkom ista ta koncentracija izazvala je blago proliferativni učinak. Sličan blago citotoksični učinak na iste stanice pokazala je otopina hidrokinona $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon četverosatnog tretmana i oporavka. S druge strane, dio stanica tretiran nižim koncentracijama hidrokinona inducira je povećane razine ROS-ova u odnosu na kontrolu. To se može objasniti činjenicom da te koncentracije hidrokinona ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) nisu bile dovoljne za narušavanje integriteta stanične membrane, stoga su svi ROS-ovi, nastali tretmanom hidrokinonom, zadržani u stanici gdje su i detektirani pomoću DCFH-DA metode.

Luo i sur. (2001) proučavali su utjecaj hidrokinona na stanice HepG2 (stanice hepatocelularnog karcinoma jetre) tretirajući ih otopinama hidrokinona u rasponu koncentracija $0,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. U svom radu uočili su da koncentracije hidrokinona $2,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ uzrokuju povećanu produkciju slobodnih kisikovih radikala u stanicama. To ukazuje na činjenicu da slobodni kisikovi radikali mogu oštetiti DNA te djelovati genotoksično. Također, utvrđeno je da hidrokinon pospješuje oksidativni stres iscrpljujući razine glutaciona u stanicama HepG2. Glutacion vrši nekoliko važnih bioloških funkcija, uključujući neutraliziranje ROS-a i zaštitu stanica od toksičnih spojeva. On se smatra glavnim unutarstaničnim antioksidansom koji služi kao supstrat za glutacion peroksidazu koja razgrađuje vodikov peroksid na vodu te ima i ulogu u uklanjanju slobodnih radikala. Rezultati Luo i sur. (2001) slažu se sa rezultatima ovog diplomskog rada jer je koncentracija hidrokinona od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ iako bez utjecaja na preživljenje uzrokovala povišenu indukciju ROS-ova u oba vremena tretmana i slučaja s i bez oporavka T24 stanica.

Yang i sur. (2011) proučavali su utjecaj hidrokinona na apoptozu ljudskih neutrofila i eozinofila. Neutrofili i eozinofili izolirani su iz krvi zdravog ljudskog donora te su tretirani hidrokinonom u rasponu koncentracija $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 12, 24 i 48 h. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da hidrokinon povećava konstitutivnu apoptozu neutrofila i eozinofila na način da smanjuje količinu pro-apoptotičkih signalnih proteina prokaspaze 3 i prokaspaze 9 proporcionalno s vremenom izloženosti. Uzrok smanjene količine prokaspaze 3 i prokaspaze 9 je upravo njihovo cijepanje čime nastaju aktivni oblici (kaspaza 3 i kaspaza 9) koji pokreću kaskadu kaspaza i razgradnju stanica putem apoptoze. Budući da su neutrofili i eozinofili važni u imunološkom odgovoru, odgođena ili pojačana apoptoza ovih stanica dovodi do neravnoteže imunološkog sustava. Yang i sur. (2011) također su potvrdili pomoću metode DCFH-DA da navedene koncentracije hidrokinona uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih radikala u tretiranim neutrofilima i eozinofilima. Time je moguće zaključiti da je sama indukcija ROS-ova primarni uzrok apoptoze mnogih vrsta stanica. No, rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu pokazuju da većem preživljenju odgovara i veća indukcija ROS-ova. Stoga, kao glavni uzrok smrtnosti stanica T24 u ovom slučaju se ne može smatrati povećana indukcija ROS-ova, već narušeni integritet stanične membrane, što je potvrđeno i Neutral red metodom.

Sažimanjem svih navedenih činjenica moguće je pretpostaviti mehanizam djelovanja hidrokinona na stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka T24. Izlaganjem navedenih stanica visokim koncentracijama hidrokinona ($320 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) u njima se inducira

velik broj reaktivnih kisikovih radikala koji mogu djelovati na način da oštećuju staničnu membranu, izazivaju lomove u DNA, ali također mogu biti okidač za apoptozu stanice. Do apoptoze stanice uzrokovane ROS-ovima može doći na razne načine poput promjene permeabilnosti membrane ili aktivacijom pro-apoptotičkih kaspaza (Žlender, 2003).

Budući da su različite koncentracije hidrokinona pokazale različite učinke, kao što se i različiti učinci hidrokinona primjećuju na različitim staničnim linijama, potrebno je daljnjim istraživanjima utvrditi točan mehanizam djelovanja hidrokinona na stanice karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka.

4.3. Rezultati proteomskih analiza

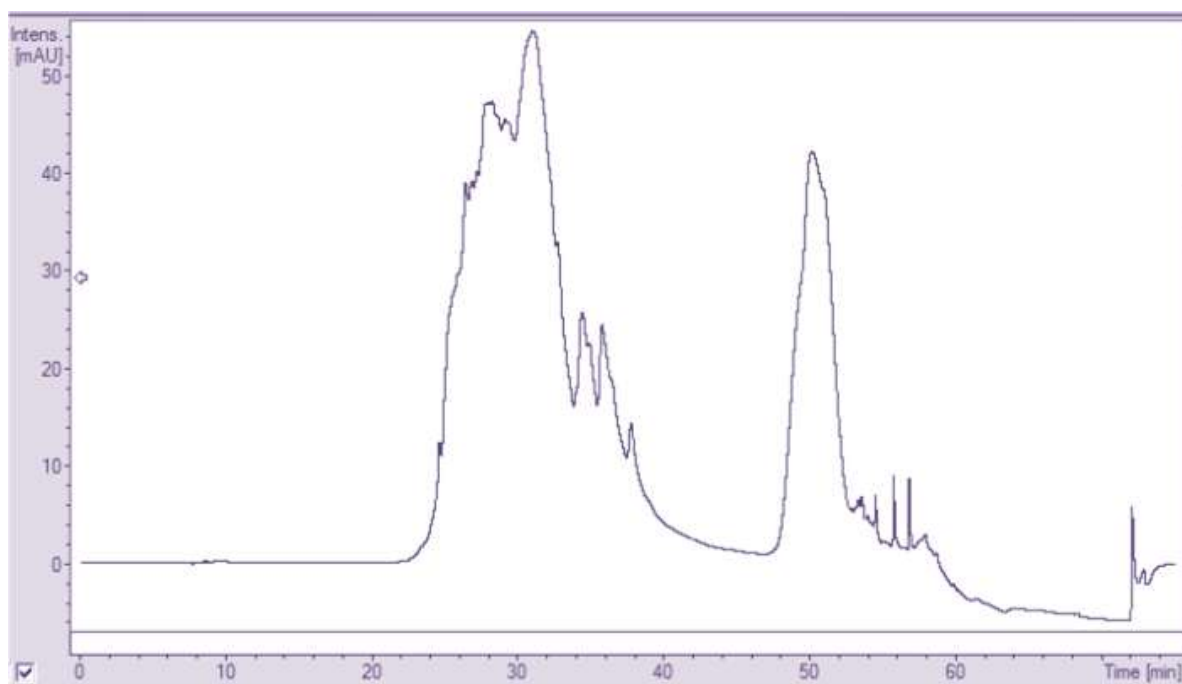
Neciljana i ciljana analiza proteina provedena je u Bioanalitičkom laboratoriju II (proteomika) u Biocentru. Na temelju rezultata metoda Neutral red i DCFH-DA te nakon statističke obrade podataka, za neciljanu analizu proteina odabran je uzorak stanica T24 tretiranih otopinom hidrokinona koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 2 h i bez oporavka. Koncentracija otopine hidrokinona $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ odgovara količini slobodnog hidrokinona za koji se pretpostavlja da dolazi u kontakt sa stanicama mokraćnog mjehura nakon konzumacije jedne preporučene šalice uvin-H čaja.

Ovaj uzorak odabran je iz razloga što se kod njega oporavak pokazao statistički značajno različitim u postotku induciranih reaktivnih kisikovih radikala u odnosu na stanice bez oporavka. Stanice tretirane otopinom hidrokinona koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 2 h bez oporavka pokazale su blago proliferativni učinak ($\sim 116\%$ u odnosu na netretirane stanice) u odnosu na T24 stanice tretirane istom koncentracijom hidrokinona u jednakom vremenskom periodu s naknadnim 24-satnim oporavkom ($\sim 100,5\%$ u odnosu na netretirane stanice). Budući da je u uvjetima bez oporavka integritet stanica tretiranih s hidrokinonom koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ gotovo očuvan (preživljenje pri toj koncentraciji iznosi $\sim 93\%$ u odnosu na netretirane stanice), a količina induciranih ROS-ova iznosi $\sim 116\%$ u odnosu na negativnu kontrolu, moguće je govoriti o prooksidacijskom učinku. Kako bi se otkrile moguće posljedice prooksidacijskog učinka hidrokinona na promjene u proteomu T24 stanične linije provedena je neciljana analiza proteina.

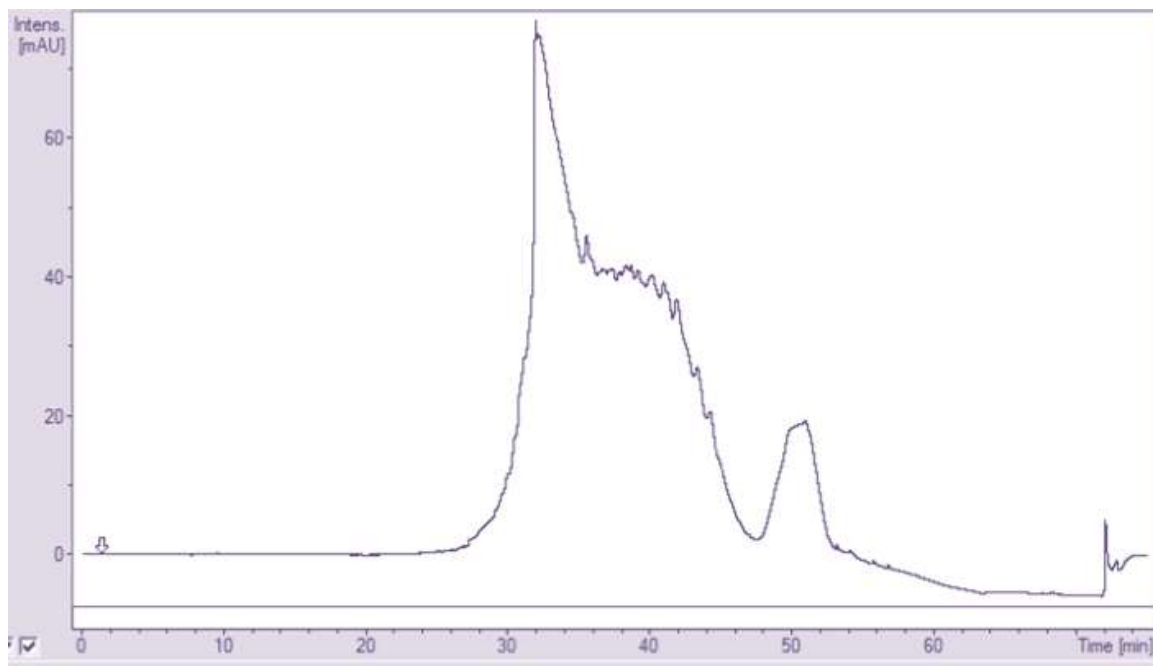
4.3.1. Utjecaj hidrokinona na promjene u proteomu stanica T24

Kako bi se utvrdio utjecaj hidrokinona na promjene u proteomu tretiranih stanica T24 u odnosu na netretirane uzet je uzorak netretiranih stanica karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka te uzorak istih stanica tretiranih s otopinom hidrokinona koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 2 h sa i bez oporavka. Nakon toga, proteini oba uzorka su digestirani koristeći specifične proteaze. Dobiveni peptidi su označeni izobarnim obilježivačem TMT duplex (126 i 127) te su uzorci pomiješani. Pomiješani uzorak potom je frakcioniran prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.9. Dobivene su četiri frakcije uzorka. Sve četiri frakcije podvrgnute su separaciji peptida tekućinskim kromatografom (također opisano u poglavlju 3.2.9.). Dobivene frakcije peptida prikazane su na slikama od 16 do 19.

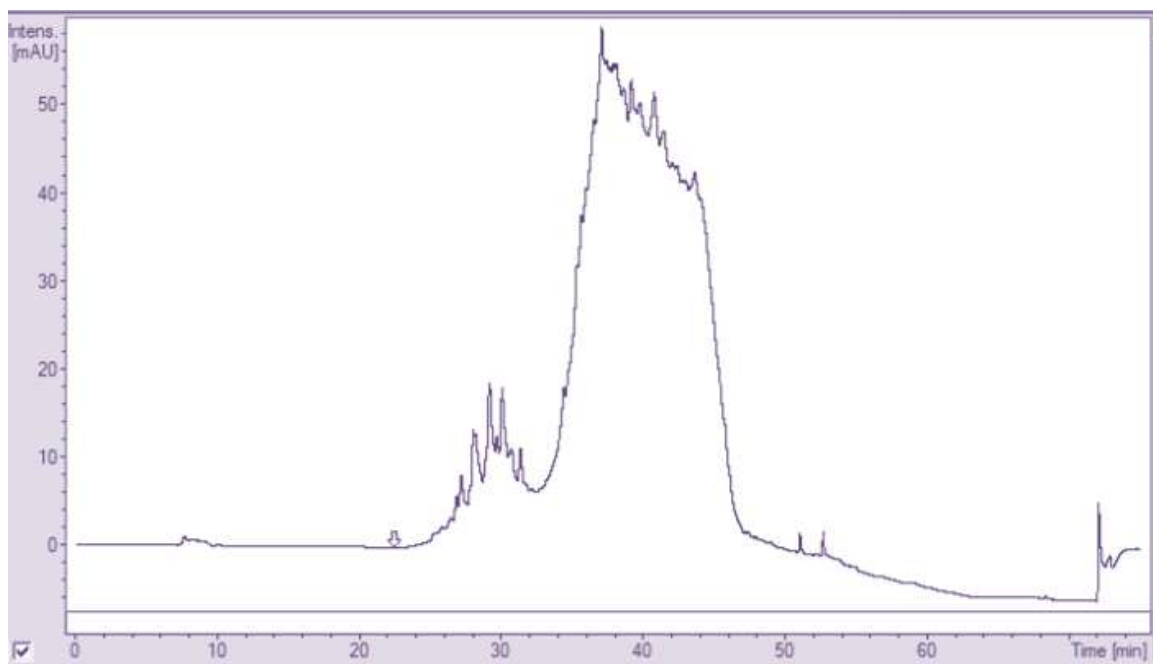
Nadalje, peptidi iz dobivenih frakcija analizirani su pomoću spektrometra masa MALDI/TOF-TOF. Nakon snimljenih spektara MS i MS/MS identificirani su proteini iz uzorka uz pomoć pretraživača MASCOT i baze podataka SwissProt. U uzorku je identificirano 36 proteina. Identificirani proteini u analiziranom uzorku prikazani su u tablici 12.



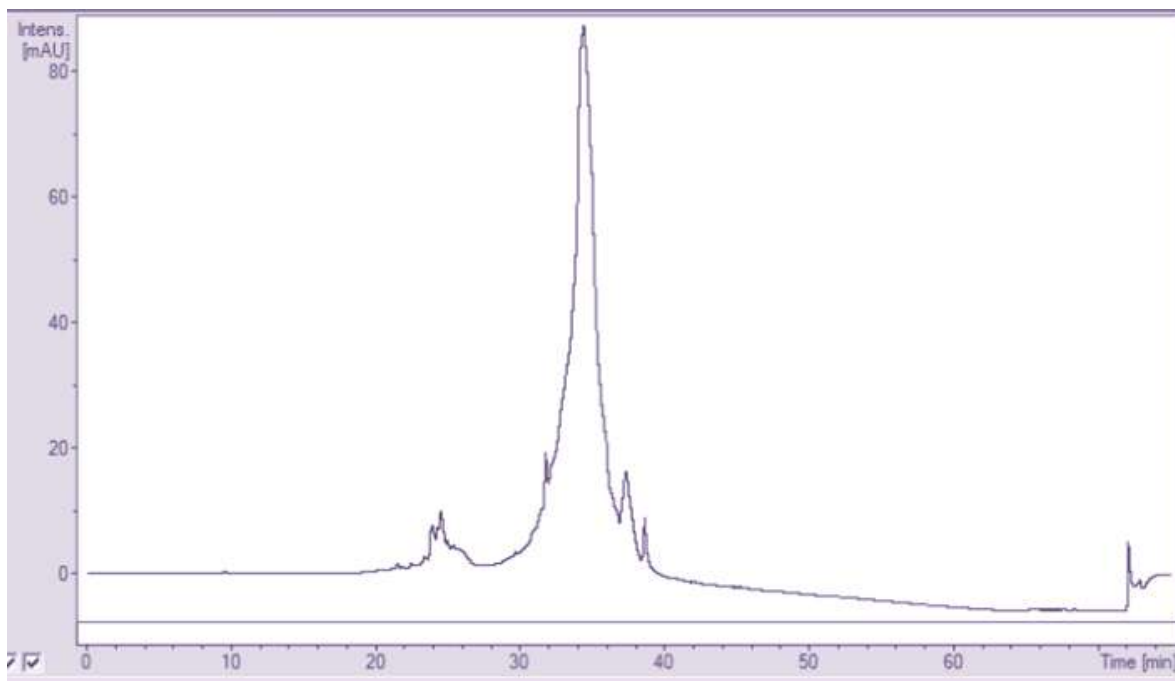
Slika 16. Frakcija 1 Dionex



Slika 17. Frakcija 2 Dionex



Slika 18. Frakcija 3 Dionex



Slika 19. Frakcija 4 Dionex

Tablica 12. Identificirani proteini analiziranog uzorka tretiranih i netretiranih T24 stanica

Omjer 127/126	Pristupna oznaka	Masa (Da)	Opis proteina, eng.
5,951	VIME_HUMAN	58798	Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM PE=1 SV=4
2,073	K2C7_HUMAN	57208	Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT7 PE=1 SV=5
10,986	H2A1B_HUMAN	17279	Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2
1,9415	CALX_HUMAN	80135	Calnexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CANX PE=1 SV=2
3,306	H4_HUMAN	14062	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H4A PE=1 SV=2

2,688	LDHA_HUMAN	43195	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA PE=1 SV=2
5,145	ANXA1_HUMAN	46120	Annexin A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA1 PE=1 SV=2
3,384	ACTB_HUMAN	46213	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1
2,806	ACTA_HUMAN	46485	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTA2 PE=1 SV=1
4,021	ANXA5_HUMAN	41093	Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA5 PE=1 SV=2
2,034	NPM_HUMAN	40210	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2
3,561	ACTN1_HUMAN	115376	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2
2,356	H14_HUMAN	36037	Histone H1.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H1E PE=1 SV=2
2,315	H15_HUMAN	37427	Histone H1.5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H1B PE=1 SV=3
2,315	H12_HUMAN	34861	Histone H1.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H1C PE=1 SV=2
2,152	CALR_HUMAN	57794	Calreticulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALR PE=1 SV=1
3,361	G3P_HUMAN	42110	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3
3,405	TBA1A_HUMAN	54607	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1A PE=1 SV=1

2,095	EZRI_HUMAN	81978	Ezrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EZR PE=1 SV=4
0,999	YBOX1_HUMAN	39730	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YBX1 PE=1 SV=3
1,639	ROA2_HUMAN	41910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
5,508	DPYL5_HUMAN	68812	Dihydropyrimidinase-related protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYSL5 PE=1 SV=1
2,572	EF1A1_HUMAN	60917	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1
0,99	TOR2X_HUMAN	29172	Prosalusin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOR2A PE=1 SV=1
2,448	DDX5_HUMAN	76985	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1
1,918	HS90A_HUMAN	102844	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5
4,892	ATPB_HUMAN	61928	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3
3,974	ATPA_HUMAN	66693	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1A PE=1 SV=1
3,483	CH60_HUMAN	73175	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2

2,768	RPN2_HUMAN	75996	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPN2 PE=1 SV=3
0,094	MYH9_HUMAN	273224	Myosin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH9 PE=1 SV=4
3,729	ENOA_HUMAN	55920	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=2
3,173	PPIA_HUMAN	21378	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIA PE=1 SV=2
1,768	MBB1A_HUMAN	171728	Myb-binding protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYBBP1A PE=1 SV=2
1,147	NONO_HUMAN	60502	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4
1,046	GOT1B_HUMAN	16992	Vesicle transport protein GOT1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLT1B PE=1 SV=1

Budući da je uzorak s netretiranim stanicama za neciljanu analizu proteina označen s TMT izobarnim obilježivačem 127, a uzorak s tretiranim stanicama obilježen s TMT izobarnim obilježivačem 126, prvi stupac tablice 12 (omjer 127/126) prikazuje omjer identificiranog proteina prisutnog u uzorku netretiranih T24 stanica i u uzorku tretiranih T24 stanica. Značajnim omjerom 127/126 smatran je 5 ili više. Također, značajnim omjerom 127/126 smatran je manji od 0,25. Takav omjer, u ovom slučaju, upućuje da je određeni protein znatno više zastupljen u uzorku tretiranih stanica u odnosu na netretirane stanice.

Iz tablice 12 vidljivo je da su u netretiranim stanicama u odnosu na one tretirane hidrokinonom izraženiji slijedeći proteini: vimentin, histon H2A tip 1-B/E, aneksin A1, dihidropirimidinaza-srodni protein 5 i ATP sintaza podjedinice β .

Vimentin je protein prisutan u citoplazmi, citoskeletu i jezgri ljudskih mezenhimskih stanica. Vezan je na jezgru, endoplazmatski retikulum i mitohondrije. Zajedno sa LARP6 proteinom

sudjeluje u stabilizaciji kolagenskih mRNA tipa I (alfa-1 i alfa-2 mRNA). Neke od molekularnih funkcija vimentina su dvolančano vezanje RNA, vezanje identičnih proteina, vezanje keratinskih filamenata, specifično vezanje za proteinske domene, strukturni konstituent citoskeleta, strukturni konstituent očnih leća.

Vimentin ima višestruke biološke funkcije: sudjeluje u diferencijaciji Bergmannovih glijalnih stanica, promjeni aktivnosti SMAD proteina (grupa intracelularnih proteina koji imaju indirektan utjecaj na rast i diobu stanica), razvoju astrocita, staničnom odgovoru na interferon-gama, staničnom odgovoru na lipopolisaharide, staničnom odgovoru na muramil-dipeptide, sudjeluje u signalnom putu posredovanom citokinima, filamentnoj organizaciji, razvoju vlaknastih stanica leće, klizanju mišićnih niti, negativnoj regulaciji razvoja neuronske projekcije, pozitivnoj regulaciji biosinteze kolagena, pozitivnoj regulaciji translacije, regulaciji mRNA stabilnosti i viralnim procesima. Vimentin je izrazito zastupljen u fibroblastima, manje zastupljen u T-limfocitima i B-limfocitima, te vrlo malo zastupljen (ili ga uopće nema) u Burkittovim limfomskim staničnim linijama. Vimentin se često nalazi u hormonski nezavisnim stanicama karcinoma u sisavaca (UniProt, 2019).

Histon H2A tip 1-B/E je osnovna komponenta nukleosoma. Nukleosomi omataju i pakiraju DNA u kromatin. Time je ograničena raspoloživost DNA lanca staničnim procesima koji trebaju DNA kao predložak. Modifikacija histona ima središnju ulogu u regulaciji transkripcije, popravku DNA, replikaciji DNA i kromosomskoj kondenziranosti. Pristupačnost DNA regulirana je nizom posttranslacijskih modifikacija histona i nukleosomskim pregradnjama. Molekularne funkcije Histon H2A tip 1-B/E proteina uključuju vezanje za DNA i formiranje heterodimera, dok su biološke funkcije navedenog proteina organizacija kromatina i negativna regulacija stanične proliferacije (UniProt, 2019).

Aneksin A1 je protein koji ima važnu ulogu u urođenom imunološkom odgovoru kao efektor reakcija posredovanim glukokortikoidima i regulator upalnog procesa. Potiče zacjeljivanje rana i smanjuje upale. Potiče kemotaksiju granulocita i monocita aktiviranjem receptora formil peptida. Doprinosi adaptivnom imunološkom odgovoru poboljšavajući signalne kaskade koje se pokreću aktivacijom T-stanica te regulira diferencijaciju i proliferaciju aktiviranih T-stanica. Potiče diferencijaciju T-stanica u Th1 stanice i negativno regulira diferencijaciju u Th2 stanice. Promiče preuređivanje citoskeleta aktina, polarizaciju stanica i migraciju stanica. Negativno regulira egzocitozu hormona aktivacijom formil peptidnih receptora i reorganizacijom citoskeleta aktina. Ima visoki afinitet za kalcijeve ione i može vezati do osam kalcijevih iona.

Igra ulogu u stvaranju fagosoma. Igra ulogu u fagocitozi posredovanjem interakcije ovisne o kalciju između fagosoma i citoskeleta aktina (UniProt, 2019).

Dihidropirimidinaza-srodni protein 5 je protein za kojeg se smatra da ima ulogu u diferencijaciji neurona i/ili rastu aksona. Njegove molekularne funkcije uključuju utjecaj na aktivnost hidrolaze djelujući na nepeptidne veze između ugljika i dušika te utjecaj na vezanje mikrotubula. Biološke funkcije uključuju razvoj živčanog sustava i provedbu signala. Dihidropirimidinaza-srodni protein 5 nalazi se u citoplazmi stanica (UniProt, 2019).

ATP sintaza podjedinice β je protein koji se nalazi na membrani mitohondrija. Formira ATP iz ADP-a u prisutnosti protonskog gradijenta koji se stvara preko transporta elektrona u respiratornom lancu. ATP-aze F-tipa sastoje se od dvije strukturne domene – F_1 i F_0 . F_1 domena sadrži ekstramembransko katalitičko mjesto, a F_0 sadrži membranski kanal za prolaz protona. ATP sintaza podjedinice β sudjeluje u vezanju angiotatina, transmembranskom transportu, ATP-aznoj aktivnosti transporta proteina i veže se nekovalentno na MHC (eng. *Major Histocompatibility Complex*) klase I koji su odgovorni za prepoznavanje limfocita (UniProt, 2019).

Protein koji je količina izraženija u tretiranim nego u netretiranim stanicama je miozin-9.

Miozin-9 je protein koji ima ulogu u citokinezi, formiranju stanica i specijalnim funkcijama poput izlučivanja i ograđivanja. Tijekom rasta stanice ima važnu ulogu u reorganizaciji citoskeleta. Sudjeluje u vezanju ATP-a i ADP-a, ATP-aznoj aktivnosti, vezanju RNA, aktina i aktinskog filameta. Sudjeluje u aktivnosti ATP-aze ovisnoj o aktinu, vezanju kadherina, kalmodulina i integrina. Miozin-9 sudjeluje u vezanju specifičnom za domen proteina, homodimerizaciji proteina. Njegove biološke funkcije obuhvaćaju organizaciju aktomiozinske strukture, sudjelovanje u angiogenezi, migraciji endotelih stanica krvnih žila, migraciji leukocita, diferencijaciji monocita, oporavku stanične membrane te transportu proteina (UniProt, 2019). Miozin 9, poznat i pod nazivom nemišićni miozin, ima utjecaj na angiogenetsku funkciju proteina nukleolina. Smanjena količina miozina-9 ili pretjerana zastupljenost nefunkcionalnog miozina-9 narušavaju organizaciju nukleolina koji se nalazi na površini stanice i inhibiraju njegovu angiogenetsku sposobnost (Huang i sur., 2006).

Budući da se **vimentin** smatra proteinom odgovornim za održavanje staničnog oblika, integritet stanice i citoskeletalne interakcije (Goldman i sur., 1996), povećana zastupljenost ovog proteina u netretiranim stanicama nego u onima tretiranim hidrokinonom upućuje na pretpostavku da se izlaganjem T24 stanica hidrokinonu citotoksični učinak ostvaruje upravo narušavanjem

integriteta stanične membrane. Rezultati Neutral red metode i DCFH-DA metode provedene u ovom radu potvrđuju ovu pretpostavku. Također, u radu Eckes i sur. (2000) u kojem je proučavan utjecaj vimentina na zarastanje rana u miševa potvrđeno je da je kod miševa sa manjim brojem gena za vimentin zarastanje rana bilo sporije. Te činjenice upućuju na zaključak da hidrokinon može ozbiljno narušiti integritet stanice te da je vimentin zaslužan i za oporavak oštećenih stanica.

Veća zastupljenost **histona H2A tipa 1-B/E** i **ATP sintaza podjedinice β** u netretiranim stanicama u odnosu na tretirane ide u prilog gore navedenom zaključku budući da je taj proteini odgovoran za transkripciju, popravak i replikaciju DNA te kromosomsku stabilnost i transport proteina, kao i za ATP-aznu aktivnost. Utjecaj hidrokinona na smanjenu količinu histona H2A tipa 1-B/E u tretiranim stanicama daje naslutiti da hidrokinon ima i genotoksični učinak na T24 staničnu liniju. Nadalje, tretman hidrokinonom uzrokovao je smanjenu zastupljenost ATP sintaze podjedinice β u T24 staničnoj liniji što upućuje na činjenicu da je u tretiranim T24 stanicama smanjena sinteza ATP-a i transport proteina. Ova činjenica potkrijepljena je i rezultatima Neutral red metode gdje sama boja zbog narušenosti integriteta stanične membrane, a time i inaktivnosti proteinskih nosača za aktivni transport, nije mogla migrirati u tretirane stanice u jednakoj mjeri kao u netretirane T24 stanice.

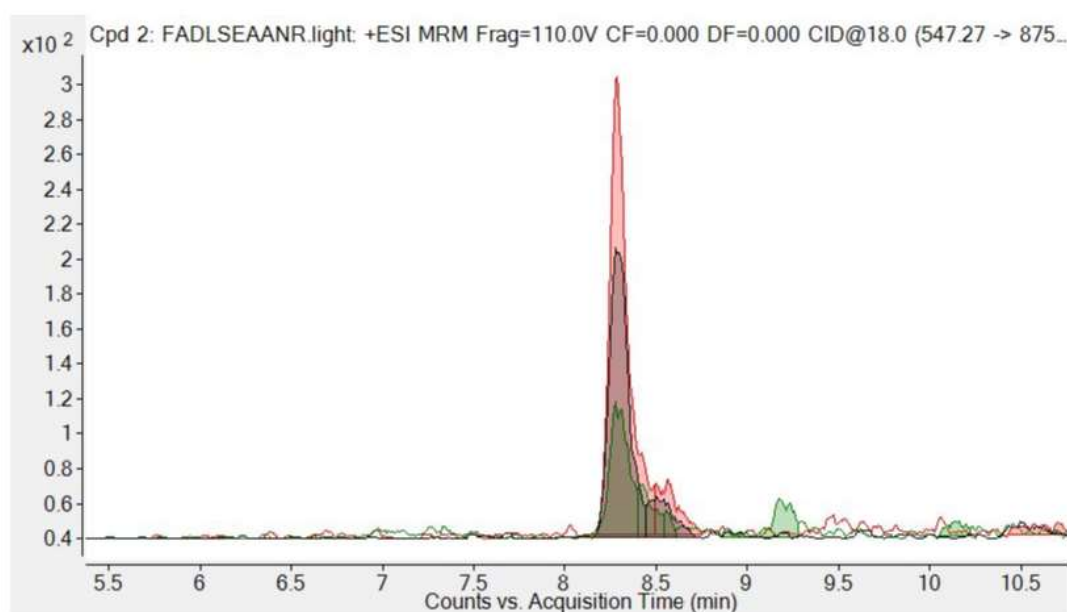
Aneksin A1 ima svojstvo inhibiranja NF- κ B signalnog puta koji je aktivan u kancerogenim stanicama i time se održava proliferacija takvih stanica i sprječava njihova apoptoza. Vežući se za p65 podjedinicu aneksin A1 inhibira NF- κ B signalni put. Upravo zbog tog svojstva aneksin A1 smatra se potencijalnim antikancerogenim lijekom (Zhang i sur., 2010). Navedene činjenice, kao i rezultati dobiveni neciljanom analizom, upućuju na pretpostavku da hidrokinon može smanjiti količinu aneksin A1 proteina u stanicama karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka.

Razvoj živčanog sustava bazira se na visokospecifičnom raspoređivanju brojnih morfološki različitih neurona. Novonastali neuroni moraju migrirati na određenu lokaciju i povezati se s odgovarajućim partnerskim stanicama. Ti procesi, u koje je uključen **dihidropirimidinaza-srodni protein 5**, osjetljivi su na izvanstanične, kao i na unutarstanične podražaje (Aravidou i sur., 2013). Povećana zastupljenost dihidropirimidinaza-srodnog proteina 5 u netretiranim T24 stanicama u odnosu na tretirane upućuje na činjenicu da hidrokinon može smanjiti količinu navedenog proteina i time prekinuti provedbu živčanih signala unutar stanice, što za posljedicu može imati gubitak stanične funkcije ili staničnu smrt.

4.3.2. Utjecaj 24-satnog oporavka stanica T24 tretiranih hidrokinonom na zastupljenost proteina vimentina

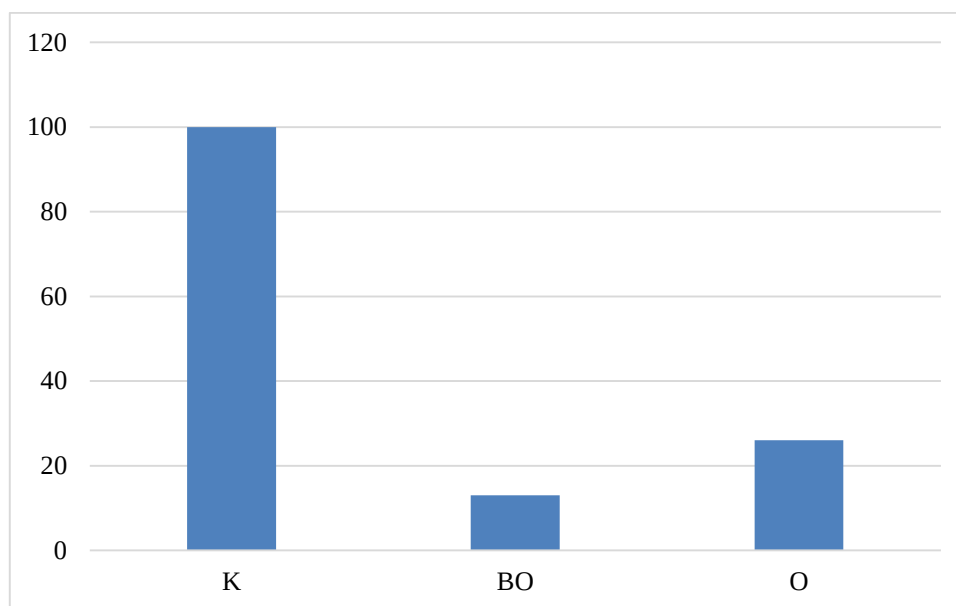
Na temelju rezultata neciljane analize proteina prisutnih u stanicama karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka, za ciljanu analizu odabran je protein vimentin. Kriteriji za odabir bio je statistički rezultat povećane zastupljenosti upravo tog proteina u netretiranim T24 stanicama u odnosu na one tretirane hidrokinonom. Cilj ove analize bio je odrediti utjecaj 24-satnog oporavka na količinu proteina vimentina.

Za ciljanu analizu korištena su tri uzorka: netretirane stanice T24, stanice T24 tretirane hidrokinonom koncentracije $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 2 h bez oporavka te stanice T24 tretirane također 2 h istom radnom otopinom hidrokinona s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju. Ciljana analiza provedena je metodom opisanom u poglavlju 3.2.9. Nakon separacije peptida tekućinskom kromatografijom i analize metodom MRM dobiven je spektar tranzicija odabranog peptida prikazan na slici 20.



Slika 20. Spektar tranzicija peptida FADLSEAANR (*različite boje predstavljaju različite tranzicije tog peptida*)

Na slici 21. prikazan je odnos zastupljenosti vimentina u tretiranim stanicama u odnosu na kontrolu (netretirane stanice).



K-kontrola (netretirane stanice)

BO-stanice tretirane hidrokinonom ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) tijekom 2 h bez oporavka

O-stanice tretirane hidrokinonom ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) tijekom 2 h s 24-satnim oporavkom u hranjivom mediju

Slika 21. Odnos zastupljenosti vimentina u pojedinom uzorku

Zastupljenost vimentina u kontrolnom uzorku predstavlja referentnu vrijednost. Iz grafičkog prikaza slike 21. vidljivo je da razina vimentina u tretiranim stanicama T24 koje nisu prošle oporavak iznosi približno 13 %, dok se razine vimentina u tretiranim stanicama T24, koje su prošle fazu oporavka, iznosi približno 26 %. Prema istraživanju koje su proveli Gallanti i sur. (1992) o zastupljenosti vimentina i desmina tijekom mišićnog oporavka, vimentin može biti izraženije zastupljen u mišićnim stanicama tijekom njihove regeneracije. Glavnim razlogom te pojave smatra se upravo uloga vimentina u organizaciji stanične strukture. Također i istraživanje koje su proveli Pan i sur. (2019) o utjecaju hipotoničnog stresa na vimentin COS-7 stanica (stanice slične fibroblastima dobivene iz bubrežnog tkiva majmuna) pokazalo je slične rezultate. Naime, nakon petominutnog tretmana COS-7 stanica 50 %-tnim HBSS (eng. *Hank's Balanced Salt Solution*) puferom uočeno je da su se filament vimentina razlomili na segmente dugačke svega nekoliko mikrometara. Nakon tretmana iste su stanice prošle fazu jednosatnog oporavka u hranjivom mediju za uzgoj stanica. Mikrometarski segmenti vimentina ponovno su se spojili formirajući dugačke filamente vimentina identične onima u netretiranim COS-7 stanicama.

Rezultati dobiveni ovim radom, kao i navedene činjenice, upućuju na to kako je oporavak imao utjecaj na razinu vimentina u stanicama karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka. Tijekom oporavka došlo je do statistički izraženije zastupljenosti vimentina naspram tretiranog uzorka

koji nije prošao oporavak, najvjerojatnije kako bi se ponovo pokušala uspostaviti funkcionalna stanična struktura.

Sažimanjem svih rezultata i činjenica navedenih u ovome radu moguće je doći do zaključka kako visoke koncentracije hidrokinona uzrokuju visoku smrtnost stanica narušavajući integritet stanične membrane. Uzrok smrtnosti stanica izazvane visokim koncentracijama hidrokinona potvrđen je metodama Neutral red i DCFH-DA te neciljanom analizom proteina. Zbog narušavanja integriteta stanične membrane visokim koncentracijama hidrokinona nije mogao biti ostvaren aktivni transport boje Neutral red u stanice T24 budući da su za to potrebni proteinski nosači koji se nalaze na staničnoj membrani. Narušavanjem integriteta stanične membrane funkcionalnost nisu izgubili samo proteinski nosači već i stanične esterase koje nisu mogle hidrolizirati DCFH-DA u DCFH. Budući da nije nastao DCFH, koji u prisutnosti ROS-ova induciranih hidrokinonom uzrokuje pojavu fluorescencije, izmjerena vrijednost intenziteta fluorescencije stanica tretiranih visokim koncentracijama hidrokinona bio je vrlo mala. Stoga je moguće da nije došlo do inicijalne transformacije molekule DCFH-DA ili ona uopće nije ušla u stanicu, ili da je jedan dio ROS-ova, ukoliko su uopće inducirani, migrirao izvan stanice uslijed oštećenja membrane.

Neciljanom analizom identificirano je ukupno 36 proteina prisutnih u uzorcima tretiranih i netretiranih stanica T24, od kojih se posebno ističe 5 proteina čija je zastupljenost znatno veća u netretiranim stanicama u odnosu na stanice tretirane hidrokinonom. Od tih 5 proteina najveća razlika u zastupljenosti vidi se kod vimentina. Vimentin je protein zadužen za održavanje integriteta stanice, staničnog oblika i citoskeletalne interakcije, a u netretiranim stanicama T24 njegova je zastupljenost 6 puta veća u odnosu na tretirane stanice T24. Ostali proteini koji su znatno više zastupljeni u netretiranim stanicama u odnosu na tretirane su histon H2A tip 1-B/E, aneksin A1, dihidropirimidinaza-srodni protein 5 i ATP sintaza podjedinice β . Njihova je uloga također usko vezana uz održavanje integriteta stanice i održavanje normalnih staničnih funkcija.

Ciljanom analizom vimentina u netretiranim stanicama T24, tretiranim stanicama T24 koje nisu prošle oporavak i tretiranim stanicama T24 koje su prošle 24-satni oporavak utvrđeno je da oporavak stanica u hranjivom mediju uzrokuje regeneraciju vimentina. Takav rezultat navodi na zaključak da su promjene na stanicama T24 uzrokovane hidrokinonom reverzibilne te da oporavkom stanice mogu vratiti svoje određene funkcije. Ciljanom analizom ostalih proteina (histon H2A tip 1-B/E, aneksin A1, dihidropirimidinaza-srodni protein 5 i ATP sintaza podjedinice β) čija je zastupljenost povećana u netretiranim u odnosu na tretirane stanice moglo

bi se utvrditi postoji li mogućnost njihove regeneracije oporavkom T24 stanica u hranjivom mediju, odnosno može li se u potpunosti povratiti normalna stanična funkcija.

5. ZAKLJUČCI

1. Dokazano je da se kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura čovjeka T24 citotoksičnost hidrokinona ostvaruje narušavanjem integriteta stanične membrane i da je ovisna o koncentraciji.
2. Uočeno je da preživljenje stanica T24 ne ovisi o vremenu izloženosti hidrokinonu osim kod najveće ispitivane koncentracije $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ gdje je u oba slučaja sa i bez oporavka statistički značajno veće preživljenje kod 2-satnog tretmana.
3. Uočeno je da je količina ROS-ova induciranih višim koncentracijama hidrokinona (320 i $900 \mu\text{g mL}^{-1}$) proporcionalna s preživljenjem stanica T24. Takav rezultat daje naslutiti da se zbog narušenog integriteta stanične membrane nije mogla odviti inicijalna transformacija molekule DCFH-DA ili ona uopće nije ušla u stanicu, ili da je jedan dio ROS-ova, ukoliko su uopće inducirani, migrirao izvan stanice uslijed oštećenja membrane.
4. Preživljenje stanica tretiranih nižim koncentracijama ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) hidrokinona ne razlikuje se značajno u odnosu na kontrolu, ali je razina induciranih ROS-ova pri istim koncentracijama povišena.
5. Dokazano je da hidrokinon uzrokuje smanjenu količinu proteina vimentina, histona H2A tipa 1-B/E, aneksina A1, dihidropirimidinaza-srodnog proteina 5 i ATP sintaze podjedinice β u stanicama T24 čime se narušava integritet stanice.
6. Oporavkom stanica T24 u hranjivom mediju u trajanju od 24 h dolazi do povećanja količine vimentina što upućuje na reverzibilnost štetnog utjecaja hidrokinona na stanice T24 te da oporavkom stanice mogu vratiti svoju normalnu funkciju.

6. LITERATURA

- Aravidou, E., Tsangaris, G., Samara, A., Dontas, I., Botsis, D., Aravidis, C., Chrousos, G. P., Malamitsi-Puchner, A. (2013) Aberrant expression of collapsin response mediator proteins-1, -2 and -5 in the brain of intrauterine growth restricted rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **31**, 53-60.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., Rasool, M. H. (2016) Proteomics: Technologies and Their Applications. *J. Chromatogr. Sci.* **55**, 182-196.
- Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. *Appl. Environ. Microb.* **57**, 2101-2103.
- Bedenić, B. (2009) Antibakterijski lijekovi. U: Medicinska mikrobiologija, (Uzunović-Kamberović, S., ured.), Štamparija Fojnica d.o.o, Zenica, str. 221-252.
- Borràs, E., Sabidó, E. (2017) What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. *Proteomics* **17**, 17-18.
- Bubeník, J., Barešová, M. B., 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.
- Chandramouli, K., Qian, P. (2009) Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Hum. Genomics Proteomics* **2009**, 22.
- Chang, N., Chen, Y., Lin, Y., Tai, T., Chen, A., Huang, C., Lin, C. (2017) Study of Hydroquinone Mediated Cytotoxicity and Hypopigmentation Effects from UVB-Irradiated Arbutin and DeoxyArbutin. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 969-979.
- De Arriba, S. G., Naser, B., Nolte, K. (2013) Risk Assessment of Free Hydroquinone Derived from *Arctostaphylos Uva-ursi* folium Herbal Preparations. *Int. J. Toxicol.* **32**, 442-453.
- Desiniger, P. J. (1996) Human Exposure To Naturally Occurring Hydroquinone. *J. Toxicol. Env. Health.* **47**, 31-46.
- Drugbank (2019) Arbutin, <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB11217>>. Pristupljeno 27. lipnja 2019.

- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., Martin, P. (2000) Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.* **113**, 2455-2462.
- Enguita, F. J., Leitão, A. L. (2013) Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 14-29.
- FisherScientific (2019) Brand™ Bürker-Türk Counting Chambers, <<https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/10297390>>.
- Pristupljeno 17. kolovoza 2019.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., Hultgren, S. J. (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 269-284.
- Freshney, R. I. (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gad, S. C. (2005) Hydroquinone. U: Encyclopedia of Toxicology, (Anderson, B., de Peyster, A., Gad, S. C., Hakkinen, P. J., Kamrin, M., Locey, B., Mehendale, H., Pope, C., Shugart, L., ured.), Elsevier, San Diego, str. 979-982.
- Gallanti, A., Prella, A., Moggio, M., Ciscato, P., Checcarelli, N., Sciacco, M., Comini, A., Scarlato, G. (1992) Desmin and Vimentin as markers of regeneration in muscle diseases. *Acta Neuropathol.* **85**, 88-92.
- Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., Steinert, P. M. (1996) The Function of Intermediate Filaments in Cell Shape and Cytoskeletal Integrity. *J. Cell Biol.* **134**, 971-983.
- Hancock, J. T., Desikan, R., Neil, S. J. (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 345-350.
- Head, K. A. (2008) Natural Approaches to Prevention and Treatment of Infections of the Lower Urinary Tract. *Altern. Med. Rev.* **13**, 227-244.
- Hebeda, C. B., Pinedo, F. J., Ramirez Vinolo, M. A., Curi, R., Poliselli Farsky, S. H. (2011) Hydroquinone Stimulates Inflammatory Functions in Microvascular Endothelial Cells via NF- κ B Nuclear Activation. *Basic Clin. Pharmacol.* **109**, 372-380.

- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'malley, Y. Q., Wessels, D. A., Flaherty, D. M. (1999) Dihydrofluorescein Diacetate Is Superior For Detecting Intracellular Oxidants: Comparison With 29,79-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, 5(And 6)-Carboxy-29,79-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, And Dihydrorhodamine 123. *Free. Radic. Biol. Med.* **27**, 146–159.
- Hiraku, Y., Kawanishi, S. (1996) Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Benzene Metabolites. *Cancer Res.* **56**, 5172-5178.
- Huang, Y., Shi, H., Zhou, H., Song, X., Yuan, S., Luo, Y. (2006) The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood.* **107**, 3564-3571.
- León-González, A. J., Auger, C., Schini-Kerth, V. B. (2015) Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **98**, 371-380.
- Li, X., Zhuang, Z., Liu, J., Huang, H., Wei, Q., Yang, X. (2006) Proteomic Analysis to Identify the Cellular Responses Induced by Hydroquinone in Human Embryonic Lung Fibroblasts. *Toxicol. Mech. Method.* **16**, 1-6.
- Locke, A. B. (2018) Urinary Tract Infection. U: Integrative Medicine, (Rakel, D., ured.), Elsevier, Philadelphia, str. 211-217.
- Luo, L., Jiang, L., Gengb, C., Caoa, J., Zhonga, L. (2001) Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem. Biol. Interact.* **173**,1-8.
- McDonald, T. A., Holland, N. T., Skibola, C., Duramad, P., Smith, M. T. (2001) Hypothesis: Phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia* **15**, 10-20.
- Meyer, J. G., Schilling, B. (2017) Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev. Proteomics* **14**, 419-429.
- Migas, P., Krauze-Baranowska, M. (2015) The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochem. Lett.* **13**, 35-40.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database (2019) Arbutin, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arbutin>>. Pristupljeno 26. lipnja 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database (2019) Hydroquinone, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroquinone#section=Stability-Shelf-Life>>.

Pristupljeno 27. lipnja 2019.

Nomination Profile: Hydroquinone. Supporting Information for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program (2009) U.S. Food & Drug Administration, Department of Health and Human Services, Washington.

Pan, L., Zhang, P., Hu, F., Yan, R., He, M., Li, W., Xu, J., Xu, K. (2019) Hypotonic stress induces fast, reversible degradation of the vimentin cytoskeleton via intracellular calcium release. *Adv.Sci.* 1900865.

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.

Pyatt, D. W., Stillman, W. S., Irons, R. D. (1998) Hydroquinone, a Reactive Metabolite of Benzene, Inhibits NF- κ B in Primary Human CD4 T Lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharm.* **149**, 178-184.

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

Rychlińska, I., Nowak, S. (2012) Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* **40**, 109-113.

Schindler, G., Patzak, U., Brinkhaus, B., von Nieciecki, A., Wittig, J., Krämer, N., Glöckl, I., Veit, M. (2002) Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of *Arctostaphylos uva-ursi* Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *J. Clin. Pharmacol.* **42**, 920-927.

Siegers, C., Bodinet, C., Ali, S. S., Siegers, C. P. (2003) Bacterial deconjugation of Arbutin by *Escherichia coli*. *Phytomedicine* **10**, 58-60.

ToxNet-Toxicology Data Network (2009) Arbutin, <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7661>>. Pristupljeno 26. lipnja 2019.

Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579-591.

Trill, J., Simpson, C., Webley, F., Radford, M., Stanton, L., Maishman, T., Galanopoulou, A., Flower, A., Eyles, C., Willcox, M., Hay, A., Griffiths, G., Little, P., Lewith, G., Moore, M. (2017) Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments of adult female urinary tract infection (ATAFUTI): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. **18**, 421.

UniProt (2019) UniProtKB - P04083 (ANXA1_HUMAN), <<https://www.uniprot.org/uniprot/P04083>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2019.

UniProt (2019) UniProtKB - P04908 (H2A1B_HUMAN), <<https://www.uniprot.org/uniprot/P04908>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2019.

UniProt (2019) UniProtKB - P06576 (ATPB_HUMAN), <<https://www.uniprot.org/uniprot/P06576>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2019.

UniProt (2019) UniProtKB - P08670 (VIME_HUMAN), <<https://www.uniprot.org/uniprot/P08670>>. Pristupljeno 17. kolovoza 2019.

UniProt (2019) UniProtKB - P35579 (MYH9_HUMAN), <<https://www.uniprot.org/uniprot/P35579>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2019.

UniProt (2019) UniProtKB - Q9BPU6 (DPYL5_HUMAN), <<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BPU6>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2019.

Vraneš, J. (1994) Adhezini uropatogenih sojeva *Escherichia coli* i njihovo značenje u patogenezi infekcija mokraćnog sustava. *Med. Vjesn.* **26**, 51-58.

Wenke, J. L., McDonald, W. H., Schey, K. L. (2016) Spatially Directed Proteomics of the Human Lens Outer Cortex Reveals an Intermediate Filament Switch Associated With the Remodeling Zone. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 4108-4114.

Yang, E. Y., Lee, J., Yun, C., Kim, I. S. (2011) The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. *Toxicol. In Vitro.* **25**, 131-137.

Zapor, L. (2004) Toxicity of Some Phenolic Derivatives-In Vitro Studies. *Int. J. Occup. Saf. Ergo.* **10**, 319-331.

Zhang, Z., Huang, L., Zhao, W., Rigas, B. (2010) Annexin 1 Induced by Anti-Inflammatory Drugs Binds to NF- κ B and Inhibits Its Activation: Anticancer Effects In vitro and In vivo. *Cancer Res.* **70**, 2379-2388.

Zor, T., Selinger, Z (1996) Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302-308.

Žlender, V. (2003) Apoptosis – Programmed Cell Death. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **54**, 267-274.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta