

Biološka aktivnost hidrokinaona i nitrofurantoina i njihov utjecaj na proteomski profil stanične linije mokraćnoga mjehura T24

Huđek Turković, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:159:914920>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ana Huđek Turković

**BIOLOŠKA AKTIVNOST HIDROKINONA
I NITROFURANTOINA I NJIHOV
UTJECAJ NA PROTEOMSKI PROFIL
STANIČNE LINIJE MOKRAĆNOGA
MJEHURA T24**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ana Huđek Turković

**BIOLOŠKA AKTIVNOST HIDROKINONA
I NITROFURANTOINA I NJIHOV
UTJECAJ NA PROTEOMSKI PROFIL
STANIČNE LINIJE MOKRAĆNOGA
MJEHURA T24**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Ksenija Durgo, redoviti profesor u trajnom zvanju
dr. sc. Gordana Rusak, redoviti profesor u trajnom zvanju

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ana Huđek Turković

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF
HYDROQUINONE AND
NITROFURANTOIN AND THEIR
INFLUENCE ON THE PROTEOMIC
PROFILE OF THE T24 BLADDER CELL
LINE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

PhD Ksenija Durgo, Full Professor
PhD Gordana Rusak, Full Professor

Zagreb, 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

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

UDK: 547.565.2:57.085:582.688.3:620.193.8(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST HIDROKINONA I NITROFURANTOINA I NJIHOV UTJECAJ NA PROTEOMSKI PROFIL STANIČNE LINIJE MOKRAĆNOGA MJEHURA T24

Ana Huđek Turković, mag. ing. biotechn.

Rad je izrađen u Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu i Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti – BICRO BIOCentar d.o.o.

Mentori: dr. sc. Ksenija Durgo, redoviti profesor u trajnom zvanju i dr. sc. Gordana Rusak, redoviti profesor u trajnom zvanju

Sažetak: U ovom radu provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza vodenog ekstrakta lišća medvjette (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) koji se često samoinicijativno koristi u zajedničkoj terapiji s antibiotikom nitrofurantoinom za liječenje urinarnih infekcija. Ukupni fenolni sastav i antioksidacijski potencijal ekstrakta određeni su spektrofotometrijski, a pojedinačni spojevi arbutin i hidrokinon tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Metodom simulirane *in vitro* probave određena je stabilnost uzoraka. Biološki učinci ekstrakta istraženi su spektrofotometrijskim metodama na staničnim linijama probavnog sustava (CAL 27, AGS, Caco-2) i jetre (HepG2) u uvjetima *in vitro*. Stanična linija karcinoma mokraćnog mjehura (T24) korištena je kao modelni sustav ispitivanja citotoksičnog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka hidrokinona, nitrofurantoina i njihove smjese pomoću metoda *Neutral Red*, DCFH-DA i mikronukleus *cytome* testa. Također, razlika u ekspresiji proteina u T24 stanicama nakon tretmana spomenutim spojevima, određena je spektrometrijom masa. Glavni rezultati ovog rada pokazuju sinergističko djelovanje hidrokinona i antibiotika nitrofurantoina na T24 stanice mokraćnog mjehura u vidu smanjenja preživljenja, povećanja prooksidacijskog učinka i genotoksičnog djelovanja te promjene ekspresije proteina. Prema tome, može se zaključiti da biljne spojeve treba tretirati kao kemijske spojeve koji, ovisno o uvjetima, mogu pokazati sinergistička, antagonistička i potencirajuća svojstva u kombinaciji s drugim terapeutcima te negativno utjecati na ljudsko zdravlje.

Broj stranica: 192

Broj slika: 28

Broj tablica: 29

Broj literaturnih navoda: 293

Broj priloga: 1

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biološko djelovanje, hidrokinon, *in vitro*, nitrofurantoin, smjesa spojeva, vodeni ekstrakt lišća medvjette

Datum obrane: 01. prosinca 2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Draženka Komes, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. dr. sc. Nevenka Kopjar, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju
3. dr. sc. Ana Butorac, viša znanstvena suradnica

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

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

UDK: 547.565.2:57.085:582.688.3:620.193.8(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF HYDROQUINONE AND NITROFURANTOIN AND THEIR INFLUENCE ON THE PROTEOMIC PROFILE OF THE T24 BLADDER CELL LINE

Ana Hudek Turković, MSc

Thesis performed at the Faculty of Food and Biotechnology and the Faculty of Science, University of Zagreb, the Institute for Medical Research and Occupational Health and the Central Laboratory of the Incubation Center for Bio-Sciences - BICRO BIOCentar d.o.o.

Supervisors: PhD Ksenija Durgo, Full Professor and PhD Gordana Rusak, Full Professor

Abstract: In this study, the aqueous extract of bearberry leaves (*Arctostaphylos uva-ursi* L.), which is frequently self-administered in combination therapy with the antibiotic nitrofurantoin for the treatment of urinary infections, was subjected to a qualitative and quantitative analysis. The total polyphenol composition and antioxidant potential of the extract were determined spectrophotometrically, and the individual compounds arbutin and hydroquinone were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The *in vitro* biological effect of the extract on the cell lines of the gastrointestinal tract (CAL 27, AGS, Caco-2) and liver (HepG2) were assessed by spectrophotometric techniques. *In vitro* digestion was used to determine the stability of the extract during intake. Using the *Neutral Red*, DCFH-DA, and micronucleus *cytome* assays, the bladder cancer cell line (T24) was utilised as a model system to examine the cytotoxic, prooxidative, and genotoxic effects of hydroquinone, nitrofurantoin, and their combination. Additionally, mass spectrometry was used to identify the differences in protein expression in T24 cells following treatment with the abovementioned substances. The major findings of this study demonstrate the synergistic effects of hydroquinone and the antibiotic nitrofurantoin on human urinary bladder cancer cells (T24), including decreased survival, increased pro-oxidative effect and genotoxic effect, and altered protein expression. It follows that herbal compounds should be viewed as chemical substances that, depending on how they are used, may exhibit synergistic, antagonistic, and potentiating effects when combined with other therapies, and may have a negative influence on human health.

Number of pages: 192

Number of figures: 28

Number of tables: 29

Number of references: 293

Number of supplements: 1

Original in: Croatian

Key words: biological activity, hydroquinone, *in vitro*, nitrofurantoin, mixture of compounds, aqueous bearberry leaf extract

Date of the thesis defense: 01 December 2023

Reviewers:

1. PhD Draženka Komes, Full Professor
2. PhD Nevenka Kopjar, Permanent Scientific Advisor
3. PhD Ana Butorac, Research associate

Thesis deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Biološka aktivnost hidrokinona i nitrofurantoina i njihov utjecaj na proteomski profil stanične linije mokraćnoga mjehura T24“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanjem mentora na sjednici održanoj 15. srpnja 2022., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktora znanosti na sjednici održanoj 25. listopada 2022.

Informacije o mentorima

dr. sc. Ksenija Durgo, redoviti profesor u trajnom zvanju

Ksenija Durgo, rođena je 19. prosinca 1974. godine u Zagrebu. Diplomirala je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biokemijsko inženjerstvo 1997. godine. Godine 1998. zapošljava se kao znanstveni novak u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Iste godine upisuje poslijediplomski studij, smjer Bioproceno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu te brani doktorsku disertaciju 2006. godine.

Nastavne obaveze uključuju predavanja, seminare i praktični rad sa studentima. Također, mentor je studentima pri izradi diplomskih radova, pri čemu sudjeluje u samom eksperimentalnom radu, osiguravajući i tehničku pomoć.

Ksenija Durgo bila je predsjednica organizacijskog odbora Hrvatskog toksikološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, član organizacijskog odbora Kongresa europskog društva za okolišnu mutagenезu te član organizacijskog odbora kongresa Hrvatskog genetičkog društva. Član je nekoliko nacionalnih i internacionalnih društava. Za svoja znanstvena postignuća primila je Godišnju nagradu Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu 2002. godine, Godišnju nagradu Biotehničke zaklade 1998. godine, Nagradu Hrvatske akademije tehničkih znanosti 2005. godine, Državnu nagradu za znanost za radove na području toksikologije 2005. godine te Nagradu fakulteta za najbolji rad u 2020. godini.

Znanstveni i istraživački interes vezan je za utvrđivanje mehanizama genotoksičnosti kontaminanata iz okoliša te bioaktivnih spojeva prisutnih u hrani. Bavi se određivanjem antioksidacijskog, prooksidacijskog djelovanja te mehanizmima uključenim u antioksidacijski/prooksidacijski odgovor fitokemikalija koristeći različite biološke test-sustave. Ima veliko iskustvo u radu s mikroorganizmima i staničnim kulturama. Koautor je 50 znanstvenih radova citiranih u bazama Current Contents i Science Citation Index, a rezultate rada predstavila je na 40 nacionalnih i međunarodnih kongresa u obliku postera, usmenih priopćenja i pozvanih predavanja.

dr. sc. Gordana Rusak, redoviti profesor u trajnom zvanju

Gordana Rusak (rođ. Horvat), rođena je u Čakovcu gdje je završila srednju školu, a na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu 1987. godine diplomirala je na dva smjera: diplomirani inženjer eksperimentalne biologije i profesor biologije. Od 1988. godine zapošljava se u svojstvu asistenta u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a. Godine 1991. stekla je magisterij prirodnih znanosti (molekularna biologija), a 1995. doktorat prirodnih znanosti (molekularna i stanična biologija) na PMF-u. Teme magistarskog i doktorskog rada bile su vezane za anatomsku i fitokemijsku karakterizaciju i biološku aktivnost flavonoida hrvatske endemične biljne vrste *Centaurea rupestris*. Od početka prosinca 1995. do kraja rujna 1999., znanstvena karijera joj je bila u prekidu zbog produženog porodiljinog dopusta s blizancima.

Jednogodišnje postdoktorsko usavršavanje (2001. - 2002.) iz botanike, animalne fiziologije i molekularne biologije odradila je na Institutu za botaniku Tehničkog Sveučilišta u Dresdenu (Njemačka) na projektu „Molekularni mehanizmi antitumorske aktivnosti bioaktivnih tvari iz biljaka; njihova izolacija i karakterizacija iz biljnih izvora“. U svojoj znanstvenoj karijeri ukupno se usavršavala na istom Institutu više od 2 godine u području biljne fiziologije, biokemije i molekularne biologije.

Godine 2004. birana je u znanstveno-nastavno zvanje docentice, 2009. izvanredne profesorice, 2013. u zvanje redovite profesorice, a 2018. u zvanje redovite profesorice u trajnom zvanju na Biološkom odsjeku PMF-a u polju biologije iz područja botanike, molekularne biologije i prehrambenih znanosti. Njena nastavna aktivnost obuhvaća predavanja na preddiplomskom „Uvod u botaniku“ i „Morfologija i anatomija biljaka“, diplomskom „Biljne bioaktivne tvari“, „Biljke u fitoterapiji“ i „Molekularna biologija biljaka“ te na poslijediplomskom studiju „Uloga fenolnih tvari u obrambenom odgovoru biljke“.

Na PMF-u je bila mentor 20 diplomskih radova, jednog magistarskog rada i pet doktorskih disertacija. Bila je voditeljica 8 bilateralnih njemačko-hrvatskih projekata, jednog projekta financiranog od Hrvatske zaklade za znanost, dva projekta financirana od Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti te jednog projekta financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta. Bila je i suradnik i na četiri druga znanstvena projekta i suradnica je na dva HRZZ projekta.

Uvela je novo područje istraživanja na PMF vezano uz istraživanje kemizma biljaka i biološke učinke kemijskih spojeva iz biljaka i njihove moguće primjene u fitoterapiji. Godine

2009. bila je idejna je začetnica i voditeljica projekta za popularizaciju znanosti „Noć biologije“. Godine 2016. dobila je priznanje Dekana PMF-a za višegodišnji trud i angažman u organizaciji „Noći biologije“ te za promociju nastavne, znanstvene i stručne djelatnosti Biološkog odsjeka i Fakulteta. Godine 2016. je dobila i posebno priznanje Rektora Sveučilišta u Zagrebu za dugogodišnji predan rad u sveučilišnim tijelima, osobito za doprinos radu Odbora za upravljanje kvalitetom i unapređenju sustava kvalitete na Sveučilištu u Zagrebu. Od 2010. do 2016. obavljala je niz dužnosti na Fakultetu među kojima su: pomoćnica Dekana PMF-a za studijske programe, ECTS koordinator, predsjednica Povjerenstva za osiguranje kvalitete te je bila je predstojnica Botaničkog zavoda. Bila je članica Vijeća prirodoslovnog područja i članica Odbora za upravljanje kvalitetom Sveučilišta. Članica je i potpredsjednica Matičnog odbora za polje Biologija. Bila je i članica Upravnog vijeća Agencije za znanost i visoko obrazovanje. Od 2014. do 2019. bila je područna urednica znanstvenog časopisa *Acta Botanica Croatica*. Bila je članica u brojnim znanstvenim povjerenstvima i odborima na Sveučilištu u Zagrebu, u radnim tijelima Gradske skupštine grada Zagreba i Hrvatskog sabora te u Hrvatskoj agenciji za hranu. Bila je i zastupnica u Hrvatskom saboru i trenutno je zastupnica u Skupštini Grada Zagreba.

Do sada je objavila ukupno 55 znanstvenih radova, a od toga gotovo polovica radova objavljena je u časopisima koji pripadaju u Q1 i Q2 najbolje rangiranih znanstvenih časopisa. Objavila je 77 priopćenja na znanstvenim skupovima.

SAŽETAK

Medvjетка (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) je biljka koja se tradicionalno koristi u terapijske svrhe za liječenje akutnih urinarnih infekcija, a njezina antiseptička svojstva mogu se pripisati hidrokinonu koji nastaje primarno hidrolizom arbutina. S obzirom da pacijenti oboljeli od urinarne infekcije vrlo često uz antibiotik nitrofurantoin koriste i biljne pripravke na bazi medvjette, važno je poznavati postoji li i kakvo je međudjelovanje hidrokinona kao aktivne tvari medvjette i nitrofurantoina.

Ciljevi ovog rada bili su: utvrditi biološki učinak širokog raspona koncentracija aktivnih tvari vodenog ekstrakta medvjette na stanice probavnog sustava (CAL 27, AGS, Caco-2, HepG2) i mokraćnog mjehura (T24) te na prirodnu humanu mikrobiotu nakon konzumacije terapijskih napitaka; utvrditi utjecaj hidrokinona, nitrofurantoina i njihove kombinacije na promjenu profila ekspresije proteina T24 stanica, kao i njihov potencijalni genotoksični učinak.

Ukupni fenolni sastav i antioksidacijski potencijal ekstrakta određeni su spektrofotometrijski, a pojedinačni spojevi arbutin i hidrokinon tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Provedena je *in vitro* probava kako bi se odredila stabilnost ekstrakta prilikom konzumacije te su spektrofotometrijskim metodama određeni biološki učinci ekstrakta na stanične linije probavnog sustava (CAL 27, AGS, Caco-2) i jetre (HepG2) u uvjetima *in vitro*. Stanična linija karcinoma mokraćnog mjehura (T24) korištena je kao modelni sustav ispitivanja citotoksičnog, prooksidacijskog i genotoksičnog učinka hidrokinona, nitrofurantoina i njihove smjese pomoću metoda *Neutral Red*, DCFH-DA i mikronukleus *cytome* testa. Također, razlika u ekspresiji proteina u T24 stanicama nakon tretmana spomenutim spojevima, određena je koristeći spektrometriju masa (MALDI/TOF-TOF, ESI-QQQ i ESI-Q-TOF).

Glavni rezultati ovog rada pokazuju da je potrebna veća kontrola sastava proizvoda na bazi lišća medvjette kako bi se osigurala kvaliteta i pouzdanost terapijskog tretmana. Hidrokinon kao glavni biološki aktivni spoj ekstrakta medvjette u smjesi s antibiotikom nitrofurantoinom ima sinergističko djelovanje na T24 stanice mokraćnog mjehura u vidu smanjenja preživljenja, povećanja prooksidacijskog učinka i genotoksičnog djelovanja te promjene ekspresije proteina usmjereno na organizaciju citoskeleta preko regulacije polimerizacije aktinskih filamenata, biosintezu nezasićenih masnih kiselina, procesiranje mRNA i proteina te održavanje narušene stanične homeostaze.

Ključne riječi: biološko djelovanje, hidrokinon, *in vitro*, nitrofurantoin, smjesa spojeva, vodeni ekstrakt lišća medvjette

SUMMARY

Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L.), is a plant traditionally used to treat acute urinary infections. Its antiseptic properties can be attributed to hydroquinone, which is formed primarily by the hydrolysis of arbutin. It is crucial to understand if the active ingredient in bearberry, hydroquinone, interacts with nitrofurantoin because patients with urinary infections frequently utilise herbal remedies based on bearberry in addition to the antibiotic.

The aim of this study was to determine the biological effect of a wide range of concentrations of the aqueous extract of bearberry. Biological effects were investigated on the cell lines originated from the digestive system (CAL 27, AGS, Caco-2, HepG2), the urinary bladder (T24), and the human microflora after the consumption of therapeutic drinks. Additionally, to identify the impact of hydroquinone, nitrofurantoin, and their combination on the modification of the protein expression profile in T24 cells as well as their possible genotoxic effects.

Total polyphenol content and antioxidant capacity of the extract were assessed spectrophotometrically. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to identify the separate components, arbutin and hydroquinone. The stability of the extract during consumption was assessed using *in vitro* digestion model, and spectrophotometric techniques were used to investigate the biological effects of the extract on human cell lines. The hydroquinone, nitrofurantoin, and their mixes were tested for their cytotoxic, prooxidative, and genotoxic effects using the *Neutral Red*, DCFH-DA, and micronucleus *cytome* assays on the bladder cancer cell line (T24). Additionally, mass spectrometry (MALDI/TOF-TOF, ESI-QQQ and ESI-Q-TOF) were used to identify the differences in protein expression in T24 cells following treatment with the aforementioned drugs.

The primary findings of this study indicate that stricter control of the ingredients in the products made from bearberry leaves is required to guarantee the safety and effectiveness of their use in supportive therapy. In combination with the antibiotic nitrofurantoin, the biologically active compound in bearberry extract, hydroquinone, has a synergistic effect on T24 cells in the urinary bladder by reducing survival, increasing pro-oxidative effects and genotoxic effects, and by altering the expression of proteins that organise the cytoskeleton by controlling the polymerization of actin filaments and the biosynthesis of unsaturated fatty acids.

Keywords: biological activity, hydroquinone, *in vitro*, nitrofurantoin, mixture of compounds, aqueous bearberry leaf extract

Mentorice, prof. dr. sc. Ksenija Durgo, hvala Vam na pruženoj prilici i savjetima te uvijek pozitivnom stavu za vrijeme izrade ovog rada. Hvala na velikom povjerenju zbog kojeg sam neizmjereno puno naučila i napredovala. Prvenstveno hvala što ste veliki čovjek!

Mentorice, prof. dr. sc. Gordana Rusak, hvala Vam na svakoj upućenoj riječi podrške, razgovoru i savjetima. Uvijek je bilo ugodno u Vašem društvu.

Prof. dr. sc. Draženka Komes te kolegice Danijela Šeremet, mag. ing., doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin i Ana Mandura Jarić, mag. ing., hvala na uvijek otvorenim vratima i lijepoj suradnji.

Dr. sc. Nevenka Kopjar, vaše znanje i stav prema znanosti fascinira. Hvala vam na velikoj nesebičnoj pomoći, strpljenju i trudu.

Dr. sc. Ana Butorac, stvarno je bio užitak raditi s tobom. Hvala na pruženoj prilici da učim od tebe.

Profesorice Višnja Bačun-Družina, hvala Vam što ste uvijek vjerovali u mene.

Dr. sc. Dubravka Rašić, imaš ogromno srce i hvala ti na tome!

Izv. prof. dr. sc. Ivana Šola i dr. sc. Valerija Vujčić Bok, hvala Vam što ste nesebično podijelile svoje ogromno znanje i što sam iz Laboratorija uvijek odlazila umorna od posla, ali zadovoljnog osmijeha.

Vanr. prof. Marijana Ćurčić, hvala što si mi pokazala sve ljepote statistike. Tvoj stav prema životu je čudesan!

Dr. sc. Andreja Jurič, hvala ti na svim prijateljskim savjetima i bodrenju. Moj si anđeo!

Dr. sc. Marija Lovrić, Matea Zelenika, mag. ing., Rea Bertoša, mag. ing., Marija Ivić, mag. nutr., dr. sc. Marko Marjanović i dr. sc. Maja Marinović iz BICRO BIOCentra d.o.o., uvijek je bilo lijepo doći kod vas. Hvala vam na svemu!

Dr.sc. Vilena Kašuba, hvala Vam što ste unatoč brojnim eksperimentalnim preprekama uvijek bili pozitivni i vjerovali u uspješnost ovog rada!

Kolege i prijatelji iz Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama, hvala na ugodnoj radnoj atmosferi i što sam u laboratorij uvijek dolazila s veseljem.

Jelena, Jasminka, Iva, Zrinka, Dora i prof. Zorana, hvala Vam na velikoj podršci i veselim trenucima. Ne bih uspjela bez vas!

Moja Luce, zajedno smo prolazile sve čari studenta doktoranda. Hvala ti na pozitivnom stavu koji me držao na površini.

Mama Ružica i tata Josip, braća Kristijan i Hrvoje i sestra Renata, vi ste stup ovog rada! Hvala vam na bezuvjetnoj podršci na ovom dugom putu.

Matija, ti si osjetio sve padove i uspjehe na ovom putu, hvala ti što si uvijek bio tu!

Ovaj rad posvećujem svojoj djevojčici Beati! Pokazala si mi da je biti majka najljepši posao na svijetu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	4
2.1. Fitokemikalije	4
2.2. Fenolni spojevi	5
2.3. Urinarne infekcije i uropatogeni	6
2.4. Biljka medvjетка [Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng.]	8
2.4.1. Zakonska regulativa o upotrebi biljnih proizvoda	10
2.5. Biološki aktivni spojevi lišća medvjette	10
2.5.1. Arbutin	10
2.5.2. Metabolizam arbutina	11
2.5.3. Hidrokinon	14
2.6. Antibiotik nitrofurantoin	15
2.7. Biološki učinak spojeva na stanicu	18
2.7.1. Nastanak slobodnih radikala	19
2.7.2. Stanična apoptoza	21
2.7.3. Antioksidacijski i prooksidacijski spojevi	22
2.7.4. Genotoksični učinak.....	23
2.8. Djelovanje smjesa spojeva	24
2.9. Biodostupnost biološki aktivnih tvari - in vitro probava	26
2.10. Proteomika	29
2.10.1. Podjela i načela proteomskih analiza	30
2.10.2. Metode relativne kvantifikacije proteina	32
3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. Materijali	34
3.1.1. Kemikalije i uređaji.....	34
3.1.2. Priprema otopina, pufera i hranjivih podloga	38
3.1.3. Biljni materijal	42
3.2. Eksperimentalni test-sustavi	42
3.2.1. Humane stanične linije.....	42
3.2.2. Bakterijske kulture	42
3.3. Priprema ekstrakta medvjette	43
3.3.1. Određivanje sastava ekstrakta	44
3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta	45

3.3.3. Određivanje biološki aktivnih komponenti u ekstraktu – kvalitativna i kvantitativna analiza	46
3.4. <i>In vitro</i> probava.....	47
3.5. Biološki učinci na humane tumorske stanične linije u uvjetima <i>in vitro</i>	49
3.5.1. Uzgoj staničnih linija	49
3.5.2. Određivanje biodostupnosti na staničnom modelu	50
3.5.3. Biološka aktivnost hidrokinona i nitrofurantoina	51
3.6. Antimikrobno djelovanje	58
3.6.1. Uzgoj bakterijskih kultura.....	58
3.6.2. Ispitivanje toksičnosti na bakterijskim kulturama	59
3.6.3. Utjecaj ekstrakta na promjenu adhezije bakterija za humane stanice.....	60
3.7. Proteomska analiza.....	61
3.7.1. Uzgoj stanica.....	61
3.7.2. Izolacija proteina i priprema uzorka za analizu	61
3.7.3. Analiza proteina nakon tretmana hidrokinonom od 2 h.....	62
3.7.4. Analiza proteina nakon tretmana hidrokinon i nitrofurantoinom od 8 h	65
3.8. Statistička obrada podataka	67
4. REZULTATI	70
4.1. Određivanje fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta medvjjetke te njihova promjena tijekom faza <i>in vitro</i> probave.....	70
4.2. Određivanje biološki aktivnih tvari u ekstraktu medvjjetke, <i>in vitro</i> probava te određivanje njihove <i>in vitro</i> biodostupnosti kroz probavni sustav	72
4.3. Biološka aktivnost ekstrakta medvjjetke i arbutina na stanice probavnog sustava i jetre... ..	76
4.4. Biološka aktivnost nitrofurantoina	81
4.5. Biološka aktivnost hidrokinona i njegove kombinacije s antibiotikom nitrofurantoinom na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24	85
4.6. Antimikrobna i anti-adhezivna svojstva ekstrakta medvjjetke.....	90
4.7. Utvrđivanje zaštitnog učinka na molekulu DNA uslijed oštećenja uzrokovanih djelovanjem reaktivnih kisikovih radikala	93
4.8. Genotoksični učinak – mikronukleus <i>cytome</i> test.....	96
4.9. Proteomska analiza T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura	106
5. RASPRAVA	124
5.1. Fenolni sastav i antioksidacijski potencijal ekstrakta medvjjetke prije i nakon <i>in vitro</i> probave.....	125
5.2. Identifikacija i kvantifikacija biološki aktivnih tvari u ekstraktu medvjjetke i njihova stabilnost tijekom <i>in vitro</i> probave te biodostupnost.....	127

5.3. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakta medvjetke i arbutina na stanice sustava i jetre	129
5.4. Određivanje biološke aktivnosti antibiotika nitrofurantoina i biološki aktivnog spoja iz ekstrakta medvjetke - hidrokinona te njegove smjese na stanice mokraćnog mjehura.....	131
5.5. Određivanje antimikrobnog i anti-adhezivnog učinka ekstrakta medvjetke i njezinih biološki aktivnih spojeva arbutina i hidrokinona.....	136
5.6. Genotoksični učinak uslijed oštećenja izazvanih djelovanjem ROS-ova i ispitivanje zaštitnog učinka na DNA.....	140
5.7. Proteomska analiza stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 nakon tretmana hidrokinonom i nitrofurantoinom.....	143
6. ZAKLJUČCI	152
7. POPIS LITERATURE.....	153

1. UVOD

Infekcije mokraćnog sustava su u većini slučajeva uzrokovane bakterijama, a najčešće izolirani uropatogen je *Escherichia coli* (75 – 90 % izolata; Sheerin i Glover, 2019). Uzročni soj bakterije *E. coli* često se može naći u crijevnoj mikrobioti žene u vrijeme urinarne infekcije. Ova činjenica potvrđuje hipotezu prema kojoj je vlastita fekalna flora domaćina najčešći izvor *E. coli* koja uzrokuje infekciju (Yamamoto i sur., 1997). Uz dobro poznat uzrok crijevnih infekcija preko kontaminirane vode za piće, kao i u vode za rekreaciju, provedeno je mnogo manje istraživanja koja bi mogla potvrditi može li prisutnost *E. coli* u zalihama vode ili okolišu u kojem se ljudi izlažu (npr. rekreacijska izloženost vodi poput plivanja) povećati rizik od izvancrijevnih infekcija, uključujući urinarne infekcije (Graham i sur., 2021). Nadalje, procijenjeno je da je približno 8 % ljudskih izvancrijevnih patogenih sojeva *E. coli* koje su uzrokovale infekcije mokraćnog sustava potječe iz hrane životinjskog porijekla (Liu i sur., 2023). Uropatogene bakterije se vežu na glikolipide i glikoproteine epitelne površine mokraćnog mjehura pa ne mogu biti isprane mlazom urina i proizvode toksine koji ometaju epitelni integritet čime omogućavaju bakterijsku invaziju te povećavaju rizik infekcije (Behzadi, 2020). U terapiji liječenja urinarnih infekcija koriste se različiti antibiotici koji u većini slučajeva dovode do uspješnog liječenja, ali njihova prekomjerna uporaba rezultirala je selekcijom bakterijskih patogena rezistentnih na antibiotike što dovodi do širenja antibiotske rezistencije (Fair i Tor, 2014). Zbog kronične prirode infekcija urinarnog trakta i potencijalne rezistencije na antibiotike, obećavajući pristup prevenciji i liječenju je uporaba ljekovitog bilja, odnosno izoliranih biološki aktivnih tvari iz biljaka. Biljni medicinski pripravci mogu biti učinkoviti pri pojavi prvih znakova infekcije, a također se primjenjuju i za kratkotrajnu profilaksu te bi mogli smanjiti otpornost bakterija na antibiotike (Fazly Bazzaz i sur., 2018). Budući da nekoliko poznatih biljnih antimikrobnih spojeva u svojoj strukturi sadrži različite funkcionalne skupine, za antimikrobno djelovanje biološki aktivnih tvari odgovorno je više različitih mehanizama (Khameneh i sur., 2019). Određeni biološki aktivni spojevi u biljkama prisutni su kako bi zaštitili biljku od patogenih mikroorganizama te se najčešće aktiviraju prilikom okolišnih stresnih uvjeta u kojima se biljka nađe. Prema tome, takvi spojevi našli su primjenu kod prevencije i liječenja bakterijskih infekcija u životinja i ljudi. Mnogi od ovih spojeva izlučuju se preko urina i koriste se kao urinarni antiseptički agensi.

Biljni ljekoviti proizvodi koji sadrže ekstrakte lišća medvjete [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel] koriste se često u individualnoj terapiji nekomplikiranih infekcija urinarnog trakta (Glöckl i sur., 2001). Medvjeta je biljka koja nastanjuje planinske predjele sjeverne

hemisfere s dugom poviješću korištenja u zapadnoj biljnoj medicini (Trill i sur., 2017). Listovi sadrže glikozid arbutozid (arbutin) koji se najprije apsorbira u crijevima (Yarnell, 2002). U prijašnjim istraživanjima većinska razgradnja arbutina povezivala se s crijevnim bakterijama koje enzimski cijepaju arbutin na slobodni hidrokinon izravno u crijevnom lumenu. Danas se zna da je gustoća bakterija u tankom ljudskom čovjeka vrlo niska te je doprinos bakterija hidrolizi arbutina u crijevima vrlo mali (de Arriba i sur., 2013). Stoga glavnu ulogu u nastanku hidrokinona ima jetra. U jetri se arbutin deglikozilira na glukozu i aglikon hidrokinon koji se nakon toga konjugira sa sulfatnim i glukuronidnim derivatima. Konjugati koji nastaju su prekursori slobodnog hidrokinona koji se izlučuje preko urina te se u bazičnim uvjetima razgrađuje do slobodnog hidrokinona (Yarnell, 2002). Nadalje, konjugati hidrokinona nisu reaktivni ili toksični i uklanjaju se urinom bez interakcije s bilo kojim organom ili tkivom (Quintus i sur., 2005). Hidrokinon se također može naći u lišću biljke u slobodnom obliku, ali u zanemarivoj količini (< 0,3 %; Braga i sur., 2020). Ostali spojevi opisani u kemijskom profilu medvjete su ursolična kiselina, taninska kiselina, galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, siringična kiselina, galoil arbutin, galotanini (do 20 %), a iz skupine flavonoida dominiraju glikozidi kvercetina, kempferola i miricetina (Ștefanescu i sur., 2019). Do danas nije istražena *in vitro* probavna stabilnost arbutina i hidrokinona nakon konzumacije ekstrakta medvjete, već je samo utvrđeno da se arbutin ne hidrolizira u tretmanu 0,1 M HCl pri sobnoj temperaturi i 40 °C nakon 72 h (Braga i sur., 2020). Nadalje, konjugati hidrokinona mogu se hidrolizirati u alkalnim uvjetima urina, tvoreći slobodni hidrokinon koji ima antimikrobni učinak na bakterije koje uzrokuju infekcije mokraćnog mjehura (Yarnell, 2002). Dugotrajna izloženost slobodnom hidrokinonu povezana je s indukcijom toksičnosti u različitim organima, poput jetre i bubrega, ali mu se ne pripisuju genotoksični i kancerogeni učinci (McGregor, 2007).

Jedan od antibiotika koji je koristi zadnjih tridesetak godina, a na koji bakterije nisu razvile rezistenciju je nitrofurantoin. Upotrebljava se za prevenciju i liječenje infekcija bubrega, mokraćnog mjehura i drugih infekcija mokraćnog sustava. U znanstvenoj literaturi dostupno je malo podataka o njegovom toksičnom djelovanju prilikom dugotrajne izloženosti s obzirom da se kao profilaksa ovaj antibiotik može uzimati mjesecima ili godinama. Gotovo svi opisi toksičnosti nalaze se u izvješćima sastavljenim na temelju rezultata dobivenih tijekom akutne izloženosti nitrofurantoinu (≤ 14 dana) i to u pojedinačnim slučajevima što iziskuje dodatna istraživanja (Muller i sur., 2017). Njegov jedinstveni mehanizam djelovanja, specifičnost mjesta djelovanja, postizanje visokih razina u urinu i niske koncentracije u serumu, te njegova bakteriostatska učinkovitost protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija pružaju mnoge prednosti u terapiji urinarnih infekcija koje mnogi noviji lijekovi nemaju (Mendoza-

Valdes i sur., 2010). S obzirom da pacijenti oboljeli od urinarne infekcije vrlo često uz propisanu antibiotsku terapiju koriste i biljne pripravke na bazi medvjeteke važno je poznavati postoji li i kakvo je međudjelovanje hidrokinona kao aktivne tvari medvjeteke i nitrofurantoina. Pregledom dosadašnje literature nisu pronađeni podaci o citotoksičnosti i antioksidacijskom/prooksidacijskom učinku hidrokinona i nitrofurantoina na stanice karcinoma mokraćnog mjehura (T24) kao pojedinačnih spojeva, a ni u smjesi.

Unatoč prirodnom podrijetlu, biljne spojeve treba tretirati kao kemijske spojeve ili mješavinu spojeva koji, ovisno o uvjetima, mogu pokazati sinergistička, antagonistička i potencirajuća svojstva ili mogu utjecati na promjenu proteomskog profila izloženih staničnih linija (Hashiguchi i sur., 2017). S obzirom da se nitrofurantoin i medvjeteke koriste u prevenciji urinarnih infekcija, potrebno je ispitati njihov toksikološki profil i potencijalno toksično sinergističko djelovanje. Nadalje, Gágyor i sur. (2021) pokazali su da je početno liječenje nekompliciranih urinarnih infekcija ekstraktom medvjeteke rezultiralo smanjenom potrebom za liječenje antibioticima, ali je dovelo do zabrinutosti za sigurnu primjenu zbog učestale pojave pijelonefritisa i povišene tjelesne temperature.

Ciljevi istraživanja u ovom radu su:

1. provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu standardno pripremljenih napitaka ekstrakta medvjeteke i produkata nakon *in vitro* probave te utvrditi toksični i antioksidacijski/prooksidacijski učinak širokog raspona koncentracija aktivnih tvari na stanice probavnog sustava i ciljnog organa djelovanja koji je očekivan nakon prekomjerne konzumirane količine napitka tijekom dana;
2. utvrditi učinak biološki aktivnih tvari i metabolita ekstrakta medvjeteke na prirodnu humanu mikrobiotu;
3. utvrditi utjecaj hidrokinona, nitrofurantoina i njihove smjese na promjenu profila ekspresije proteina stanica mokraćnog mjehura T24 te istražiti njihov genotoksični učinak.

Rezultati istraživanja upotpuniti će saznanja o citotoksičnom te antioksidacijskom djelovanju arbutina i hidrokinona na stanice probavnog sustava, jetre i mokraćnog mjehura kao i o njihovoj biodostupnosti tijekom *in vitro* probave. Utvrdit će se antimikrobno djelovanje na predstavnike normalne mikrobiote te urinarnog patogena *E. coli*. Očekivani znanstveni doprinos bit će u određivanju genotoksičnog učinka i promjene proteomskog profila u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura nakon djelovanja hidrokinona kao pojedinačnog spoja te smjese u kombinaciji s nitrofurantoinom.

2. OPĆI DIO

2.1. Fitokemikalije

Fitokemikalije su sekundarni metaboliti male molekulske mase koji se prirodno nalaze u biljkama. Razlikuju se od primarnih biljnih tvari jer nisu esencijalne za opstanak biljke. Ove biološki aktivne molekule su uključene u interakciju između biljke i njezine okoline. Dugi niz godina fitokemikalije su smatrane prirodnim toksikantima koji su potencijalno štetni, no posljednjih desetljeća sve su više prepoznate zdravstvene dobrobiti prehrane bogate biljnim prirodnim spojevima. Fitokemikalije mogu ograničiti dostupnost hranjivih tvari i povećati propusnost crijevne stijenke. Nalaze se u biljkama u niskim koncentracijama i obično imaju neki farmakološki učinak. One biljci služe kao obrana od insekata, gljivica i drugih mikroorganizama; kao regulatori rasta, pigmenti i daju aromu. Još od davnina se koriste u obliku ljekovitog bilja, začina, čajeva ili hrane. S razvojem vrlo osjetljivih analitičkih metoda, veliki dio takvih spojeva sada je moguće identificirati. Fitokemikalije mogu imati zdravstvene prednosti ili štetne učinke, ovisno o kemijskoj strukturi i primijenjenoj dozi (Leitzmann, 2016).

Do danas nije poznat točan broj fitokemikalija, a procjene prelaze sto tisuća tvari. Vrsta spoja i koncentracija u biljkama vrlo često varira i ovisna je o okolišnim uvjetima (podneblje, sastav tla, postotak vlage, jačina UV zračenja te broj sunčanih dana). Mješovitom zapadnjačkom prehranom, dnevno se unosi 1,5 g fitokemikalija pri čemu vegetarijanci i vegani mogu imati puno veći unos sekundarnih biljnih metabolita. Trenutno ne postoje preporučene doze unosa fitokemikalija. Još uvijek je potreban odgovarajući okvir za utvrđivanje preporučenih doza unosa jer njihove priznate zdravstvene dobrobiti nije lako definirati u kontekstu nutritivne važnosti (Wallace i sur., 2015). Klasifikacija fitokemikalija temelji se na njihovom kemijskom sastavu i strukturi te dokazanim funkcionalnim karakteristikama. Glavne skupine fitokemikalija navedene su u **tablici 1**.

Dosadašnja saznanja o učincima fitokemikalija pokazuju da mogu imati pozitivne zdravstvene učinke. Najjači zaštitni učinak je uočen kada se veliki broj različitih fitokemikalija konzumira s hranom biljnog podrijetla što vjerojatno ima kumulativni ili sinergistički učinak. Toksični potencijal fitokemikalija je zanemariv sve dok se prehrambene navike ograničene na cjelovitu hranu, a ekstrakti ili izolati se izbjegavaju (Leitzmann, 2016).

Tablica 1. Klasifikacija fitokemikalija i njihov glavni učinak na zdravlje (prema Leitzmann, 2016).

Fitokemikalija	Dokazani zdravstveni učinci fitokemikalija								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Karotenoidi	x		x		x			x	
Fitosteroli	x							x	
Saponini	x	x			x			x	
Glukozinolati	x	x						x	
Fenoli	x	x	x	x	x	x	x		x
Inhibitori proteaze	x		x						x
Monoterpeni	x	x						x	
Fitoestrogeni	x		x		x				
Sulfidi	x	x	x	x	x	x	x	x	

A = antikancerogeni; B = antimikrobni; C = antioksidacijski; D = antitrombocitni; E = imunomodulatorna svojstva; F = protuupalni; G = utjecaj na krvni tlak; H = utjecaj na smanjenje kolesterola; I = utjecaj na razinu glukoze u krvi

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su najzastupljenije fitokemikalije u prehrani čovjeka. Različitih su kemijskih struktura i imaju različita biološka svojstva. Pozitivni zdravstveni učinci fenolnih spojeva ispoljit će se ovisno o prehranbenim navikama te o njihovoj stabilnosti koja pak ovisi o temperaturi, pH, dostupnosti kisika, enzimima te drugim sastojcima hrane. Metode obrade prehranbenih proizvoda poput pasterizacije pozitivno utječu na mikrobiološku stabilnost te produljenje roka trajanja, ali također mogu utjecati na degradaciju fenolnih spojeva i drugih biološki aktivnih tvari jer su to često termolabilni spojevi (Brownmiller i sur., 2008). Posljedično tome, sve više se istražuje liofilizacija kojom se nastoje očuvati izvorna svojstva željenih proizvoda (Adetoro i sur., 2020). Fenolne spojeve nalazimo u svim biljnim tkivima, a bitni su biljkama jer ih štite od insekata, mikrobnih infekcija, UV zračenja te za privlačenje oprašivača (Rodriguez-Mateos i sur., 2014). U voću i povrću ih nalazimo vezane za šećere u obliku glikozida, a dijele se u dvije velike skupine: flavonoidi i ne-flavonoidi. Razlikujemo ih prema položaju OH skupina, stupnju oksidacije aromatskog prstena te stupnju nezasićenosti (Del Rio i sur., 2013).

Fenolni spojevi kao antimikrobni agensi utječu na promjenu propusnosti stanične membrane mikroorganizama, a dokazana je i visoka korelacija između toksičnosti i hidrofobnosti različitih fenolnih spojeva. Vezanjem hidrofobnih dijelova molekule fenola za staničnu membranu, propusnost membrane se povećava te dolazi do istjecanja staničnog sadržaja ili ometanja funkcije membranskih proteina što dovodi do poremećaja bakterijske strukture (Coppo i Marchese, 2014). Osim učinka na staničnu membranu, flavonoidi također inhibiraju sintezu nukleinske kiseline (uzrokovanu inhibicijom topoizomerase) i energetski metabolizam (uzrokuju inhibiciju NADH-citokrom c reduktaze ili ATP sintaze) kao i prekid sinteze stanične stijenke i stanične membrane (Cushnie i Lamb, 2011). Kinoni imaju potencijal za stvaranje ireverzibilnih kompleksa s nukleofilnim aminokiselinama u proteinima. Prema tome, vjerojatna ciljna mjesta u bakterijskoj stijenci su na površini izloženi adhezini, polipeptidi i enzimi vezani na membranu (Cowan, 1999). Proantocijanidini posjeduju nekoliko mehanizama djelovanja kao što su destabilizacija stanične membrane, inhibicija izvanstaničnih enzima ili direktno djelovanje na mikrobn metabolizam (Daglia, 2012). Djelovanje galotanina može se pripisati njihovom afinitetu prema željezu, a također je povezano s inaktivacijom proteina vezanih za membranu. Željezo je potrebno u nizu bitnih bioloških procesa, a samo nekoliko vrsta bakterija raste u nedostatku željeza. Kako bi izdvojile željezo iz hranjivog supstrata, mnoge bakterije izlučuju siderofore, nosače niske molekularne težine s visokim afinitetom za Fe^{3+} . Antimikrobno djelovanje galotanina prepoznato je u vidu njihovog afiniteta za Fe^{2+} i Fe^{3+} te se mogu smatrati strukturnim i funkcionalnim analogima sideroforima (Engels i sur., 2011). Kumarini uzrokuju redukciju staničnog disanja, a terpeni zbog svoje lipofilne prirode uzrokuju poremećaje strukture stanične membrane. Konačno, alkaloidi, jedni od najranije izoliranih bioaktivnih komponenti iz biljaka, često interkaliraju u DNA, a mogu uzrokovati poremećaj aktivnosti enzima kao što su esteraze, DNA- i RNA-polimeraze te poremećaj staničnog disanja (Stefanović, 2018).

2.3. Urinarne infekcije i uropatogeni

Infekcije mokraćnog sustava godišnje pogađaju oko 150 milijuna ljudi pa se prema tome ubrajaju u najčešće bakterijske infekcije (McLellan i Hunstad, 2016). Iako su infekcije zastupljene i kod muškaraca i kod žena, općenito ih se smatra bolešću koja pogađa primarno žene. To potvrđuje i podatak da 50 % žena najmanje jednom u životu ima infekciju mokraćnog sustava, dok je kod muškaraca taj postotak mnogo niži te iznosi 14 % (Locke, 2022). Glavni razlog spomenute razlike je u duljini urinarnog trakta. U žena je mokraćna cijev anatomski

mnogo kraća pa je zbog toga omogućena lakša adhezija i kolonizacija patogenih bakterija te konačno njihova migracija do mokraćnog mjehura.

Crijevna (intestinalna) mikrobiota je mikrobna zajednica koja naseljava probavni trakt čovjeka (Novak i Kos, 2022). Crijevne bakterije uzrokuju infekciju kada prođu iz probavnog sustava, koloniziraju periuretralno područje, te prođu u uretru različitim mehanizmima (McLellan i Hunstad, 2016). Infekcije mokraćnog sustava mogu se podijeliti na simptomatske, asimptomatske, kronične, akutne (prve ili pojedinačne), rekurentne, komplicirane i nekomplirane (Gray i Robinson, 2010). Primjenom antimikrobnog lijeka u dovoljno dugom razdoblju, potrebno je liječiti sve simptomatske infekcije. Nekomplirane infekcije se liječe najčešće kroz sustav primarne zdravstvene skrbi, a u cilju sprječavanja ponavljanja uroinfekcija, ali i prilikom liječenja pacijenti često primjenjuju različite biljne pripravke i to najčešće u obliku čaja da tako spriječe ili olakšaju simptome bolesti.

U 80 % slučajeva infekcija mokraćnog sustava, uzročnik je bakterija *E. coli* (Flores-Mireles i sur., 2015). Ova Gram-negativna štapičasta bakterija je dio normalne crijevne mikrobiote čovjeka. *E. coli* ima potencijal izazvati tri široke kategorije infekcija: crijevne infekcije, urogenitalne infekcije i meningitis. Prema tome, patogena bakterija *E. coli* se može kategorizirati kao crijevna patogena *E. coli* i izvancrijevna patogena *E. coli*, koje uključuje uropatogenu *E. coli* i *E. coli* povezanu s meningitisom. Uropatogena *E. coli* je najčešći etiološki uzročnik urinarnih infekcija i uzrokuje 68 – 77 % ponovljenih infekcija mokraćnog sustava. Bakterije imaju organe za pokretanje (flagele ili pili), a u kolonizaciji epitela mokraćnog mjehura pomažu im adhezini odnosno površinske molekule na bakterijskim stanicama koje prepoznaju receptore na epitelu mjehura (Vraneš, 1994). Prilikom kolonizacije, bakterije ispuštaju toksine i proteaze koje razgrađuju proteine prisutne u okolnim stanicama te si tako osiguravaju hranjive tvari.

Uropatogeni sojevi bakterije *E. coli* imaju sposobnost ulaska u epitelne stanice mokraćnog mjehura putem procesa ovisnog o aktinu i mikrotubulima koji je posredovan pilijima tipa 1, filamentoznim ljepljivim organelima koje kodiraju gotovo svi izolati. Adhezin FimH povezan s distalnim vrhovima pila tipa 1 veže receptore domaćina glikoproteina koji sadrže manozu, a koji uključuju uroplakin (posebno UP1a) i komplekse integrina $\alpha 3\beta 1$. Jednom internalizirana unutar stanice, uropatogena bakterija *E. coli* se može ili translocirati natrag iz stanica domaćina ili prenijeti u kasne endosomske odjeljke gdje mogu dugo opstati u latentnom stanju, često vezani mrežom aktinskih filamenata. Alternativno, unutar površinskih stanica mjehura gdje su aktinski filamenti obično rijetki, *E. coli* se može probiti u citosol domaćina i

brzo se razmnožavati, tvoreći velike inkluzije nalik na biofilm u bliskoj povezanosti s intermedijarnim filamentima domaćina. Inkluzije su unutarstanične bakterijske zajednice (IBC), odnosno privremena mikrobna žarišta u kojima se broj bakterijskih stanica povećava prije širenja na okolne površine, a karakteristične su za akutni stadij infekcije te je raspršenje bakterijskih stanica iz inkluzija ključno za daljnji put infekcije. Formiranje unutarstaničnih bakterijskih zajednica specifično je samo kod urinarnih infekcija Gram-negativnim bakterijama koje eksprimiraju fimbrije tipa 1. Također, IBC sa strukturama sličnim biofilmu zaštićeni su od komponenti imunološkog odgovora domaćina, uključujući neutrofile, ali i od antibiotika (Anderson i sur., 2004). Ulazak bakterija u epitelne stanice i unutarstanično perzistiranje definirani su međusobnom komunikacijom domaćina i patogena. Poremećaj tih procesa mogao bi predstavljati glavno ciljno mjesto djelovanja novih sredstava za prevenciju u liječenje kroničnih infekcija unutar urinarnog trakta (Dhokal i sur., 2008).

Ekstrakt medvjete se najčešće koristi u liječenju nefritisa, bubrežnih kamenaca i bakterijskih infekcija nižeg urinarnog trakta uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama kao što su *E. coli* i *Proteus vulgaris* (Nile i Park, 2013) te *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* (Naffati i sur., 2017). Koristi se za liječenje akutnih infekcija pri kojima je broj uropatogena $<10^5$ stanica/mL (Schindler i sur., 2002)

2.4. Biljka medvjeta [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.]

Medvjeta ili medvjede grožđe je grmolika, zimzelena biljka iz porodice vriješova (*Ericaceae*). Naziv vrste potječe od latinskog *uva* (grožđe) i *ursus* (medvjed) jer medvjedi navodno rado jedu plodove medvjete. Naraste do 30 cm visine, ali do 1 m u širinu te prekriva tlo poput tepiha. Listovi su ovalni ili jajoliki te zaobljeni na vrhovima bez mirisa te gorkog i trpkog okusa (**slika 1**). Cvjetovi su dvospolni zvonolikog oblika, a plodovi okrugle crvene bobice promjera 6 – 8 cm te dozrijevaju u kolovozu i rujnu (Naffati i sur., 2017). Raste uglavnom na neplodnim i kiselim područjima, a manjim dijelom u šumskim predjelima. Nalazimo je u gorskim i pretplaninskim područjima južne Europe, Azije i Sjeverne Amerike (Asensio i sur., 2020). U Hrvatskoj je zastupljena na Velebitu i u Gorskom kotaru do 2000 m nadmorske visine. Životni vijek joj je više od 100 godina i ugrožena je biljna vrsta u Europi te je uvrštena na crvenu listu (eng. *European Red List*) ljekovitog bilja (Bilz i sur., 2011). U komercijalnom obliku najčešće se koriste listovi koji se konzumiraju u obliku napitka čaja. Lišće medvjete se stoljećima koristi u narodnoj medicini kao bogat izvor sekundarnih metabolita (Ștefanescu i sur., 2019).



Slika 1. Biljka medvjетка (*Arctostaphylos uva-ursi* L.): (A) populacija vrištine (B) populacija borove šume, (C) plodna jedinka (D) jednogodišnji izboji (E) suhi materijal; bijele linije predstavljaju duljinu 1 cm zbog lakše percepcije realne veličine (prema Sugier i sur., 2021).

Posljednjih desetljeća upotreba biljaka u ljekovite svrhe naglo raste zbog sve veće potražnje za prirodnim ljekovitim proizvodima, biljnim lijekovima i sekundarnim metabolitima biljaka (Chen i sur., 2016). Proizvodi biljnog podrijetla i njihovi derivati su važan izvor novih terapijskih spojeva pa je i sve veći pritisak za skupljanje biljnog materijala iz njihovih prirodnih staništa što je često ograničeno zakonskim regulativama s ciljem očuvanja i održivog korištenja ljekovitog bilja (Larsen i Olsen, 2007). Dosadašnja istraživanja su pokazala da žetva zračne biomase u nezaštićenim područjima smanjuje sposobnost regeneracije populacije medvjette. Prema tome, u sklopu održivog upravljanja populacijom, formulirane su preporuke i smjernice za berbu ove vrste iz njezinog prirodnog staništa (Recasens i sur., 2008).

Listovi medvjette su visoko cijenjeni i traženi od strane farmaceutske i kozmetičke industrije u Europi. Posljednjih nekoliko godina, intenzivno je istraživana kemijski sastav listova medvjette i pronađeno je da su listovi bogat izvor fitokemikalija, posebice fenolnih spojeva (Kurkin i sur., 2018). Glavna biološki aktivna komponenta medvjette je fenolni glikozid arbutin. Arbutin je prirodni sastojak vrsta porodice *Ericaceae* među kojima medvjетка sadrži

najviše ovog spoja (Ștefanescu i sur., 2019). Također, utvrđeno je kako lišće brano u jesen ima veći sadržaj arbutina, u odnosu na ono koje se skuplja u proljeće (Parejo i sur., 2001). Visoka razina arbutina u biljkama je povezana s prilagodbom na uvjete stresa kao što su niske temperature ili uvjeti suše (Pop i sur., 2009). Kemijski profil lišća medvjetke je okarakteriziran prisutnošću ursolične, taninske, galne, *p*-kumarinske i siringične kiseline, galoil arbutina, galotanina i glikozidnih forma flavonoida kao što su kvercetin, kempferol i miricetin (Ștefanescu i sur., 2019). S obzirom na bogat fenolni sastav listova, upravo navedeni spojevi su zaslužni za terapijska svojstva biljke medvjetke s antimikrobnim, protuupalnim i diuretskim učinkom te snažnim antioksidacijskim svojstvima (Naffati i sur., 2017).

2.4.1. Zakonska regulativa o upotrebi biljnih proizvoda

U Hrvatskoj, na temelju članka 19. stavka 7. Zakona o lijekovima (»Narodne novine«, br. 71/07 i 45/09) donesen je „Pravilnik o stavljanju u promet te o označavanju i oglašavanju tradicionalnih biljnih lijekova“ propisan od strane Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi. Ovim pravilnikom definirano je Povjerenstvo za biljne lijekove (eng. *Committee for Herbal Medicinal Products*, HMPC) pri Europskoj agenciji za lijekove sastavljeno od stručnjaka na području biljnih lijekova koji pripremaju prijedlog popisa biljnih tvari, pripravaka i njihovih kombinacija koje se primjenjuju kao tradicionalni biljni lijek, s podacima o indikacijama, jačini, dozi, putu primjene i drugim podacima potrebnim za sigurnu primjenu tradicionalnog biljnog lijeka (eng. *draft Community list of herbal substances, preparations and combinations thereof for use in traditional herbal medicinal products*).

2.5. Biološki aktivni spojevi lišća medvjetke

2.5.1. Arbutin

Arbutin, poznat i kao β -arbutin, je glukozid hidrokinona. Prvi put je identificiran u lišću obične planike (*Arbutus unedo* L.). Strukturno se razlikuje od izomera α -arbutina po prisutnosti β -glukoze umjesto α -glukoze. Nakon otkrića i prve identifikacije ovog spoja, pronađen je još u otprilike 50 drugih biljnih porodica. Arbutin se koristi kao sredstvo za izbjeljivanje kože (depigmentacija) te je sastojak komercijalno dostupnih kozmetičkih proizvoda jer inhibira proizvodnju melanina inhibicijom enzima tirozinaze, koji ima ključnu ulogu u melanogenezi (Liu i sur., 2022). Dok je lišće glavni izvor arbutina kod većine biljaka, on je prisutan i u drugim dijelovima biljke, npr. nadzemnim dijelovima, cvjetovima, plodovima, stabljici i grančicama. Prisutnost arbutina u korijenu zabilježena je samo kod biljke *Picrorhiza scrophulariiflora* (Yin i sur., 2010).

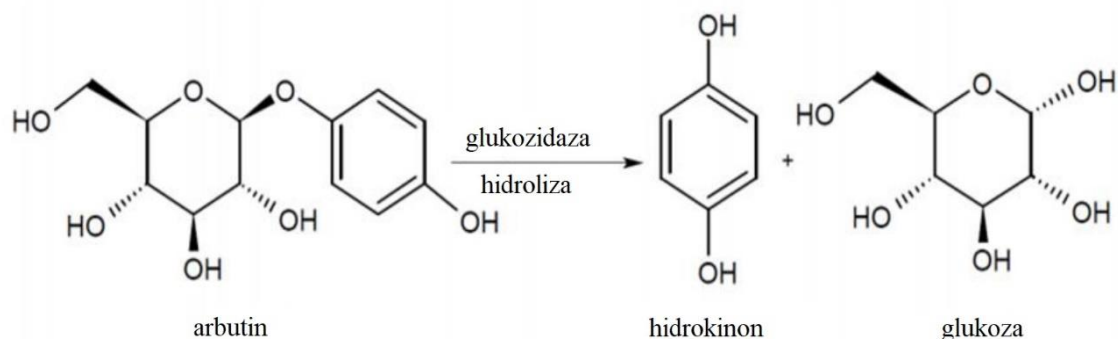
Osim svojstva izbjeljivanja kože, arbutin je pokazao i druga terapijska svojstva kao što su antioksidacijska, antimikrobna i protuupalna (Xu i sur., 2022) te ima potencijal kao antitumorski agens (Yang i sur., 2021; Zeng i sur., 2022). Informacije dobivene iz objavljene literature o arbutinu pokazuju da ovaj spoj posjeduje citotoksična svojstva kod nekoliko tumorskih staničnih linija uključujući tumore mokraćnog mjehura, kostiju, mozga, dojke, vrata maternice, debelog crijeva, želuca, jetre, prostate i kože (Wang i sur., 2021a; Hazman i sur., 2022).

Općenito, arbutin se smatra sigurnim za vanjsku primjenu, osobito u koncentracijama u kojima se koristi u kozmetičkim proizvodima. Prema mišljenju znanstvenog odbora za sigurnost potrošača (eng. *Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS), pojedinačna izloženost α -arbutinu (2 % u kremi za lice i 0,5 % u losionu za tijelo) i β -arbutina (7 % u kremi za lice) smatra se sigurnom kao i njihova smjesa u istim koncentracijama (SCCS Scientific Committee on Consumer Safety, 2023). Međutim, neke su studije pokazale određene razine toksičnosti arbutina pri različitim koncentracijama u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Lukas i sur., 2010). Kang i sur. (2012) su pokazali u svojem istraživanju sposobnost arbutina da inducira imunotoksičnost u kulturama splenocita (stanice slezene) izolirane iz miša. Uočen je i genotoksični učinak arbutina na profiliranje diferencijalne ekspresije gena u stanicama humanog melanoma A375 kroz njegov utjecaj na tumorogenezu i povezane nuspojave (Cheng i sur., 2007). Također, pronađeno je da razina toksičnosti arbutina ovisi o načinu izlaganja, spolu, vrsti i soju glodavaca te da je subkronična i kronična toksičnost na životinjskim modelima ograničena na nefrotoksičnost (O'Donoghue, 2006). Informacije dostupne u literaturi upućuju na nisku razinu toksičnosti arbutina nakon njegove oralne primjene u visokim dozama u miševima ($LD_{50} = 9804$ mg/kg) i štakorima ($LD_{50} = 8715$ mg/kg) (Seyfizadeh i sur., 2012), kao i dermalnu toksičnost u štakora i miša ($LD_{50} = 928$ mg/kg). Međutim, daleko više objavljenih radova istaknulo je različite zaštitne i pozitivne zdravstvene učinke arbutina, npr. citoprotektivne i hepatoprotektivne učinke (Pečivová i sur., 2014; Mir i sur., 2021), čije dobrobiti vjerojatno nadmašuju minimalni toksični učinak ovog spoja.

2.5.2. Metabolizam arbutina

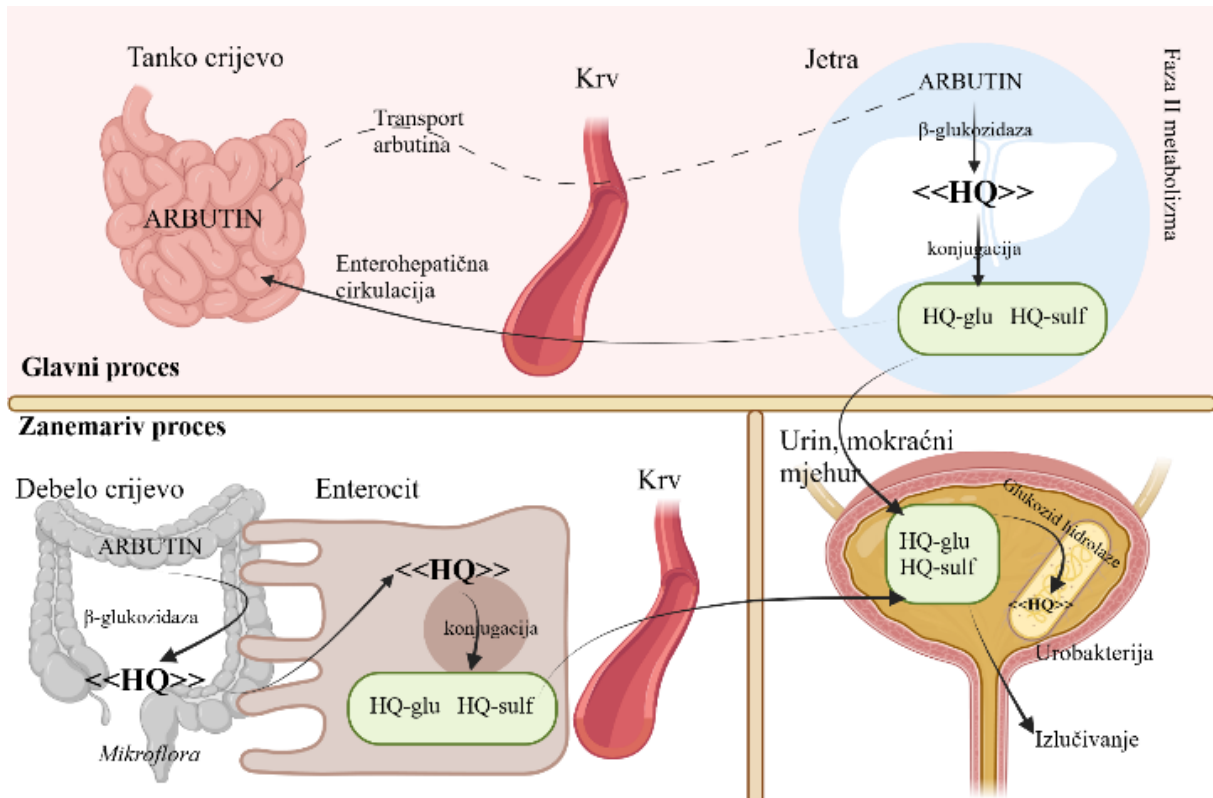
Prvotno su se crijevne bakterije smatrale odgovornima za glavnu razgradnju arbutina na slobodni hidrokinon i glukozu direktno u lumenu crijeva (**slika 2**). Nakon apsorpcije, hidrokinon se metabolizira u jetri stvarajući konjugate hidrokinona koji se dalje uklanjaju urinom. Međutim, danas se zna da je doprinos crijevnih bakterija u hidrolizi arbutina vrlo mali

budući da je gustoća bakterija u tankom crijevu niska te bi se stoga arbutin morao hidrolizirati u debelom crijevu gdje je prisutan veći broj bakterija kako bi njihov utjecaj bio značajniji (Williamson i sur., 2000). U radu autora English i Deisinger (2005) pokazano je da se određena koncentracija hidrokinona pojavi u krvi već nakon 20 min nakon konzumacije kod štakora soja F344. U istom radu dokazano je da se 87 – 94 % hidrokinona uklanja putem urina, dok je samo 1 – 3 % hidrokinona nađeno u fecesu nakon 48 h. Zaključno, crijevne bakterije ne mogu biti odgovorne za glavni metabolizam arbutina. Arbutin je stabilan u kiselim uvjetima želuca te se nepromijenjen prenosi do tankog crijeva. Studije na štakorima i miševima u uvjetima *in vitro* i *in vivo* su pokazale da se arbutin u tankom crijevu apsorbira preko Na^+ /glukoza nosača (de Arriba i sur., 2013).



Slika 2. Cijepanje glukozyda arbutina na hidrokinon i šećer glukozu (prema Jurica, 2016).

U ljudskom organizmu, arbutin se brzo apsorbira u tankom crijevu i kasnije metaboliizira u jetri (**slika 3**). U jetri prvo slijedi deglikozilacija te odmah nakon toga konjugacija s glukuronskom kiselinom ili sulfatom. Svi nastali metaboliti hidrokinona i slobodni hidrokinon uklanjaju se iz organizma pomoću bubrega putem urina, no istraživanjima provedenim na ljudima, kod većine ispitanika nisu pronađeni tragovi slobodnog hidrokinona u urinu (Quintus i sur., 2005). Dokazano je da se preko 85 % arbutina uklanja u obliku konjugata hidrokinona (hidrokinon-glukuronid i hidrokinon-sulfat), a samo 0,6 % kao slobodni hidrokinon, dok sam arbutin nije pronađen u urinu čovjeka (English i Deisinger, 2005). Također, dokazano je da hidrokinon nema sposobnost akumulacije u organizmu. Količina slobodnog hidrokinona nađena u tkivima, organima i kostima je bila manja od 2 % ukupne primijenjene doze arbutina/hidrokinona.



Slika 3. Prikaz farmakokinetičkog profila arbutina i hidrokinona (HQ). HQ-glu i HQ-sulf predstavljaju konjugate hidrokinona, hidrokinon-glukuronid i hidrokinon-sulfat (prema de Arriba i sur., 2013). Napravljeno pomoću BioRender.com.

S obzirom na opsežnu konjugaciju i brzo izlučivanje, prvenstveno preko urina, smatra se da je slobodni hidrokin učinkovito detoksificiran (NTP - National Toxicology Program, 2009). Prema tome, od ukupne konzumirane doze ekstrakta medvjete, u obzir treba uzeti samo udio slobodnog hidrokinona koji nastaje nakon metabolizma u jetri i uklanjanja putem urina. Konjugati hidrokinona koji nastaju u jetri nakon oralne primjene ekstrakta medvjete nisu toksični (de Arriba i sur., 2013). Preporučena dnevna doza arbutina je 400 - 800 mg raspodijeljena u prosječno tri doze (terapeutskog napitka) i maksimalnim vremenom tretmana od 2 tjedna (WHO - World Health Organization, 2004). Siegers i sur. pokazali su da se 70 % konzumiranog arbutina uklanja nakon 36 h u obliku konjugata hidrokinona preko urina (n = 11). Uzevši u obzir da je volumen urina tijekom 36 h preko 1500 mL, koncentracija slobodnog hidrokinona, čijem su djelovanju izloženi jetra, bubrezi i mokraćni mjehur procijenjena je na približno 0,66 µg/mL urina. Dakle, iz terapijske doze od 420 mg arbutina, samo 0,99 mg slobodnog hidrokinona cirkulira i prisutno je u urinu te i na taj način u kontaktu s ljudskim organizmom. Ova koncentracija slobodnog hidrokinona odgovara razini izloženosti od 11

$\mu\text{g/kg}$ tjelesne težine čovjeka u danu gdje je prilikom izračuna kao prosječna težina čovjeka korištena vrijednost od 60 kg (Siegers i sur., 1997).

2.5.3. Hidrokinon

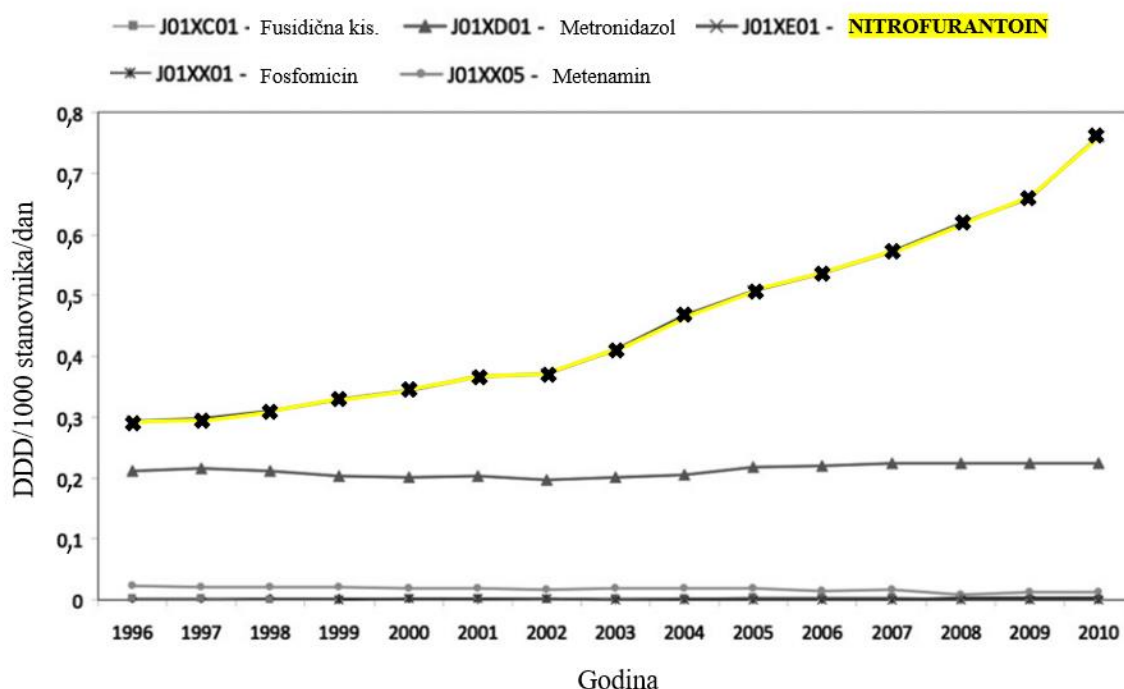
Hidrokinon (benzen-1,4-diol, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$) je bioaktivna fitokemikalija prisutna u mnogim biljkama. Hidrokinon i njegovi derivati su prisutni u mnogim prehrambenim proizvodima poput pšeničnog kruha, voća, čaja, piva, crvenog vina i duhana te u mikroorganizmima (McGregor, 2007). Najveća razina slobodnog hidrokinona (0,02 – 0,05 $\mu\text{g/g}$) je pronađena u kruškama. Isto tako, najveća izloženost čovjeka slobodnom hidrokinonu putem hrane nastaje konzumacijom namirnica podrijetlom iz pšenice (0,2 $\mu\text{g/g}$) koje su prisutne u većini obroka. Jedna šalica (300 mL) napitka kave ili čaja sadrži 20 – 90 μg , a jedna čaša crnog vina (250 mL) 562 μg slobodnog hidrokinona. Također, dim cigarete bez filtera sadrži 110 – 300 μg slobodnog hidrokinona. Budući da dnevni prosjek u Europi iznosi 18 popušanih cigareta dnevno, pušači su izloženi masenim udjelima hidrokinona u rasponu 33 – 90 $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase po danu (NTP - National Toxicology Program, 2009)

Izloženost hidrokinonu potiče stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, a samim time i oksidacijski stres te mogućnost oštećenja DNA, a moguća je putem svakodnevnih i industrijskih aktivnosti poput izloženosti putem hrane, iz okoliša ili profesionalna izloženost (Enguita i Leitão, 2013). Hidrokinon je glavni metabolit benzena i poznato je da je hepatotoksičan i kancerogen, a neka istraživanja pokazuju da može potaknuti rast tumorskih stanica i potisnuti imunološki odgovor (Peng i sur., 2013). Koristi se prilikom razvijanja fotografija, a prisutan je u bojama, lakovima, uljima i motornim gorivima. U svom oksidiranom obliku otrovniji je i manje razgradiv. Često se koristi kao kemijski sastojak dermatoloških krema (2 – 10 %) za dugotrajno tretiranje postupalne hiperpigmentacije i za izbjeljivanje kože (McGregor, 2007). Pokazuje visoku toksičnost za vodene organizme i glodavce, a može izazvati leukemiju, tumor bubrežnih tubularnih stanica i rak jetre. Također je utvrđeno da utječe na odgovor imunoloških stanica i uzrokuje nastanak alergijske reakcije povećanjem proizvodnje interleukina-4 i razine imunoglobulina (Enguita i Leitão, 2013).

Budući da metaboličkom razgradnjom arbutina nastaju slobodni hidrokinon i glukoza, zabrinutost u vezi sa sigurnošću slobodnog hidrokinona je potaknula pitanja o sigurnosti biljnih pripravaka od lišća medvjete (Adesunloye, 2003).

2.6. Antibiotik nitrofurantoin

Nitriranje heterocikličkih spojeva 1940-tih godina dovelo je do stvaranja na tisuće nitrofurana, među kojima je i klinički najpoznatiji antibiotik nitrofurantoin koji je 1953. godine odobren od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (eng. *The United States Food and Drug Administration*, FDA) za liječenje infekcija donjeg urinarnog trakta. Njegova primjena je oslabila pojavom trimetoprima/sulfametoksazola i β -laktamskih antibiotika 70-tih godina prošlog stoljeća. No, sve veća otpornost na spomenute antibiotike zajedno s nedostatkom novih oralnih antibiotika u antiinfektivnoj paleti dovela je do ponovne upotrebe ovog „starog lijeka“ (slika 4). Prema tome, 2011. godine nitrofurantoin je ponovno preporučen kao prva linija terapije za infekcije donjeg urinarnog trakta zbog sve veće otpornosti na novije antibiotike, poput fluorokinolona (Gupta i sur., 2011). Podaci na razini populacije ukazuju na značajni porast propisivanja nitrofurantoina čak i u skupinama pacijenata (muškarci i starije osobe) kojima se ovaj lijek u prošlosti nije preporučivao (Daneman i sur., 2011).



Slika 4. Trendovi u potrošnji različitih antibiotika u definiranoj dnevnoj dozi (eng. *Defined Daily Dose*, DDD) na 1000 stanovnika u danu (prema Huttner i sur., 2015).

Kontinuirana primjena antibiotika u medicini te u različitim industrijama kako bi se povećala produktivnost i zarada stvara sve veći problem izloženosti okoliša visokim koncentracijama antibiotika. Prema tome, okolišni organizmi i mikroorganizmi su izloženi akumuliranim dozama različitih antibiotika što dovodi do rastućeg broja pojave antibiotske

rezistencije, ali i do problema pronalaska djelotvornih spojeva koji će imati antibiotsko djelovanje na različite patogene. Jedan od spojeva čija baktericidna aktivnost i dalje pokazuje značajan učinak je nitrofurantoin (Munoz-Davila, 2014).

Lijekovi temeljeni na nitrofuranskim spojevima čine obitelj heterocikličkih spojeva s dušikom. Nitrofurantoin je antibiotik širokog spektra djelovanja te je time djelotvoran na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, a posjeduje nekoliko mehanizama djelovanja od kojih niti jedan nije u potpunosti razjašnjen (Huttner i sur., 2015). Antibakterijsko djelovanje nitrofurantoina temelji se na utjecaju na više različitih procesa u bakterijskim stanicama kao što su izgradnja stanične stijenke, aktivnost određenih bakterijskih enzima te metabolizam ugljikohidrata. Utjecaj na metabolizam ugljikohidrata temelji se na sposobnosti ulaska nitrofurantoina u Krebsov ciklus te inhibicije nastanka ATP-a (Cunha, 1988). Poznato je da bakterijske unutarstanične nitroreduktaze proizvode aktivni oblik nitrofurantoina preko redukcije nitro skupine. Nastali međuspojevi su vrlo aktivni te se vežu na bakterijske ribosome i inhibiraju nekoliko bakterijskih enzima uključenih u sintezu DNA, RNA i druge metaboličke enzime. U interakciji s ribosomima nastupa inhibicija procesa translacije, pri čemu dolazi do ometanja sinteze proteina što uzrokuje staničnu smrt bakterija (McOsker i Fitzpatrick, 1994). Trenutno farmakokinetičko znanje o nitrofurantoinu kod zdravih osoba i pacijenata s urinarnim infekcijama se temelji na desetljećima starim istraživanjima u kojima su korištene relativno zastarjele laboratorijske i analitičke tehnike.

Nitrofurantoin se nakon oralne primjene brzo apsorbira putem probavnog trakta te se izlučuje iz organizma putem urina, u kojem se nalazi u najvećoj koncentraciji. Upravo zbog tako brzog metabolizma, nitrofurantoin nema toksičan učinak na prirodnu crijevnu mikrobiotu (Vervoort i sur., 2015). Izlučivanje je potpuno unutar 6 sati nakon uzimanja, a koncentracije u urinu od 200 – 400 µg/mL postižu se nakon doze od 100 mg. Vrijeme polu-života ($t_{1/2}$) nitrofurantoina u plazmi ili vrijeme za koje se količina lijeka u tijelu smanji na pola je 20 min u pacijenata s normalnom bubrežnom funkcijom. Bioraspoloživost nitrofurantoina je 80 %, osim u bolesnika s teškim zatajenjem bubrega kod kojih su koncentracije gotovo nemjerljive u koncentraciji od 1 mg/L (Cunha, 2006). Nitrofurantoin postiže terapijski aktivne koncentracije samo u donjem dijelu urinarnog trakta gdje mu je i glavno mjesto djelovanja, a terapijske koncentracije lijeka u urinu povećavaju za 40 % ako se nitrofurantoin uzima s hranom (Cunha, 1988). Stjecanje rezistencije na nitrofurantoin još uvijek je relativno rijetko, iako će se vjerojatno povećati s obzirom na njegovu čestu upotrebu. Trenutno je rezistencija pokazana u slučaju bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, kao i kod brojnih vrsta roda *Proteus* (Grayson i

Whitby, 2010). Treba napomenuti da trajanje liječenja od najmanje 5 dana optimizira učinkovitost antibiotskog djelovanja ovog lijeka. Pokazano je da je toksičnost nitrofurantoina nakon preporučenog doziranja u trajanju manjem od 14 dana blaga i pretežno ograničena na probavni sustav (Huttner i sur., 2015). Komplikacije, osobito jetrene i plućne, povezane su s kratkotrajnom i dugotrajnom uporabom i češće su u žena (Claussen i sur., 2017). Simptomi se odnose na spektar plućnih promjena, od akutne reakcije preosjetljivosti (unutar 1 – 2 tjedna) do kronične plućne reakcije koja uključuje fibrozu (mjeseci do godina izloženosti). Prevalencija teških nuspojava procijenjena je na 0,2 % u kontroliranim ispitivanjima i 0,02 – 1,5 događaja na 1000 korisnika nitrofurantoina u opservacijskim studijama (Muller i sur., 2017). Dokumentirano je i da terapiju nitrofurantoinom treba propisivati s oprezom pacijentima s poznatom osjetljivošću na lijekove s oksidacijskim svojstvima, osobito s nedostatkom glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), kod kojih može uzrokovati hemolitičku anemiju. Razlog tome je svojstvo nitrofurantoina da izazove oksidacijski stres nitroredukcijom gdje nastaje nitro anionski radikal (reagira s molekularnim superoksidnim anionom koji stvara kisik i posljedično oksidacijski stres), a katalizirana je različitim reduktazama, primjerice CYP450 reduktazom. Nedostatak G6PD povećava osjetljivost pojedinca na oksidacijski stres uzrokovan ne samo lijekovima već i istodobnim bolestima (kao što je infekcija) i prehrambenim stresorima. Ova pojava tipična je za tropsku regiju gdje postoji puno slučajeva antimikrobne rezistencije, a nedostatak G6PD je učestao (Recht i sur., 2022).

U slučaju primjene antibiotika u liječenju urinarnih infekcija, presudna je pH vrijednost urina koja može varirati u rasponu 4,5 – 8,5, pri čemu je najučestalija pojava blage kiselosti urina, pH vrijednosti 6 (Meng i sur., 2016). Yang i sur. (2014) pokazali su pojačano djelovanje i smanjenu minimalnu inhibitornu koncentraciju nitrofurantoina pri $\text{pH} \leq 6$. Fransen i sur. (2016) su pokazali da je baktericidni utjecaj nitrofurantoina manji na bakterije *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* ukoliko je urin lužnatiji. Mogući razlozi pada aktivnosti nitrofurantoina u lužnatim uvjetima je smanjena stabilnost nitrofurantoina pri višim pH vrijednostima.

Izvanredna sposobnost bakterija da se prilagode nepovoljnim uvjetima okoline čini ih sposobnima preživjeti pri klinički relevantnim koncentracijama postojećih antibiotika što rezultira selekcijom rezistentnih sojeva. Antibiotik, kao selektivni agens, izaziva promjene u genomu bakterija, pridonoseći razvoju, selekciji i širenju rezistentnih sojeva (Barbosa i Levy, 2000). Ovaj proces stečene rezistencije rezultat je brzih mutacija i horizontalnog prijenosa gena odgovornih za rezistenciju. Horizontalni prijenos gena najčešće se odvija putem plazmida i transpozona između jedinki istog ili srodnih bakterijskih vrsta, između članova komezalne ili

patogene mikrobiote te između pripadnika različitih okolišnih staništa, čime se širi otpornost. Štoviše, postoje dokazi da neki klinički relevantni geni za rezistenciju imaju okolišno podrijetlo (Wright, 2010).

2.7. Biološki učinak spojeva na stanicu

Biološka aktivnost se definira kao sposobnost specifičnog molekularnog entiteta da postigne definirani biološki učinak na određenom cilju, a mjeri se aktivnošću ili koncentracijom molekule koja je potrebna da izazove tu aktivnost (Jackson i sur., 2007). Postoje mnoge vrste biološke aktivnosti, a izloženost određenoj kemikaliji ili smjesi spojeva može imati metabolički ili fiziološki odgovor. Biološka aktivnost ispitivanih spojeva provodi se pomoću niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama stanica (*in vitro*) te se na taj način procjenjuje učinak na zdravlje ljudi. Apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje glavni su procesi koji se koriste za mjerenje biološke aktivnosti.

Spojevi koji dolaze u kontakt sa stanicom mogu pokazati toksični učinak putem oštećenja stanice što dovodi do niza složenih procesa. Odgovor stanice na oštećenje može biti reverzibilan ili ireverzibilan što nužno izaziva staničnu smrt. Nakon izlaganja stanice toksičnim spojevima ili njihovim aktivnim metabolitima, događaji koji slijede mogu se podijeliti u primarne, sekundarne i tercijarne. U primarne događaje ubrajaju se prve promjene unutar stanice nakon izlaganja toksičnom spoju te uključuju lipidnu peroksidaciju, kovalentno vezanje makromolekula, enzimsku inhibiciju, ishemiju i promjene u razinama tiola. Primarne promjene su uglavnom reverzibilne te se uklanjanjem uzroka nastala oštećenja popravljaju vraćajući stanicu u homeostatsko stanje. U većini slučajeva glavni inicijator primarnih događaja su slobodni radikali. Nakon primarnog oštećenja stanice dolazi do sekundarnih promjena koje uključuju gubitak stanične kontrole te nemogućnost popravka oštećenja. Sekundarni događaji su promjene u strukturi i propusnosti stanične membrane, oštećenje i inhibicija rada mitohondrija, promjene u citoskeletu, razgradnja ATP-a, destabilizacija lizosoma, stimulacija apoptoze i oštećenje endoplazmatskog retikuluma. Konačno, tercijarne promjene su steatoza kod koje dolazi do uklapanja masnih naslaga u tkiva i stanice, nakupljanje vode u stanicama zbog poremećaja transporta iona kroz membranu (hidropična degeneracija) te stanična smrt (apoptoza i nekroza) (Barba-Ostria i sur., 2022).

2.7.1. Nastanak slobodnih radikala

Postoji više oblika reaktivnih vrsta spojeva, a naziv su dobili ovisno o prirodi reaktivnog atoma koji može biti kisik, dušik ili sumpor te prema tome razlikujemo kisikove reaktivne vrste (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS), dušikove reaktivne vrste i reaktivne vrste sumpora. ROS-ovi obuhvaćaju skupinu molekula dobivenih iz molekularnog kisika redukcija-oksidacija (redoks) reakcijom ili elektronskom ekscitacijom. Mogu se podijeliti na neradikalne (eng. *non-radical*; dva elektrona) i slobodni-radikal (eng. *free radical*; s barem jednim slobodnim elektronom) vrste (Zhang i sur., 2019). U neradikalne ROS-ove ubrajamo vodikov peroksid (H_2O_2), organski hidroperoksid (ROOH), singlet molekularni kisik (1O_2), elektronski pobuđeni karbonil, ozon (O_3) te hipoklornu i hipobromnu kiselinu (HOCl i HOBr). Slobodni radikal vrste uključuju superoksidni anionski radikal ($\bullet O_2^-$), hidroksilni radikal ($\bullet OH$), peroksidni radikal (ROO \bullet) i alkoksilni radikal (RO \bullet). Najreaktivniji oblik ROS-ova je $\bullet OH$ oblikovan iz vodikovog peroksida redukcijom u metal-kataliziranoj Fenton reakciji uključujući slobodno željezo (Fe^{2+}) koje se prevodi u Fe^{3+} . S obzirom na snažnu reaktivnost $\bullet OH$ na mjestu proizvodnje, njegova toksičnost je definirana lokacijom Fe^{2+} . Također, $\bullet OH$ je inicijator lipidne peroksidacije (Sies i Jones, 2020). Stvaranje ROS-ova može biti egzogeno, iz izvora kao što su UV zračenje, otrovne kemikalije, cigarete, lijekovi, zagađivači, alkohol, fiziološke promjene (starenje, ozljede i upale) i tjelovježba ili endogeno, iz unutarstaničnih izvora uključujući peroksisome, mitohondrijski metabolizam i NADPH oksidazni kompleks te mijeloperoksidaze, koji imaju temeljnu ulogu u održavanju uravnoteženog staničnog metabolizma (Morry i sur., 2017).

Reaktivne kisikove vrste (ROS) nastaju kao prirodni nusproizvodi normalne stanične aktivnosti poput urođene imunosti te sudjeluju u staničnoj signalizaciji, ali točna funkcija ROS-ova unutar složene metaboličke mreže nije još uvijek jasna. Oksidacijski stres je stanje uzrokovano neravnotežom između oksidansa i antioksidansa u biološkom sustavu. Neravnoteža nastaje kao posljedica prekomjerne razine ROS-ova ili nepravilnog funkcioniranja antioksidacijskog sustava (Chiurchiù i sur., 2016). Biomolekule (lipidi, proteini i nukleinske kiseline) vrlo su osjetljive na djelovanje ROS-ova, pa se promjene i modifikacije ovih biomolekula koje se javljaju u uvjetima stresa mogu koristiti kao markeri za oksidacijski stres. ATP je neophodan za funkcioniranje, signalizaciju i sveukupne aktivnosti stanice i prepoznat je kao energetska valuta stanice. Mitohondriji su odgovorni za proizvodnju ATP-a kroz transportni lanac elektrona i oksidacijsku fosforilaciju. Oni su također uključeni u proizvodnju molekula za prevladavanje oksidacijskog stresa zajedno s programiranom staničnom smrću i

drugim respiratornim funkcijama u stanici. Pretpostavlja se da su obogaćivanje mitohondrija raznim redoks enzimima i mitohondrijska disfunkcija odgovorni za proizvodnju ROS-ova u staničnom okruženju. Unutarstanično smanjenje ROS-ova regulirano je antioksidacijskim enzimima kao što su glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze. Međutim, u nekim slučajevima antioksidacijski obrambeni mehanizmi možda neće biti dovoljni za održavanje redoks ravnoteže i mogu se lako zasititi, uzrokujući trajno oštećenje genoma i toksičnost (Parvez i sur., 2018). U staničnim linijama tumorskog podrijetla, visoke razine ROS-ova su potrebne za održavanje brze stope proliferacije. Stanice nekih vrsta raka poput melanoma, neuroblastoma, karcinoma debelog crijeva i karcinoma jajnika stvaraju velike količine vodikovog peroksida (Szatrowski i Nathan, 1991). Nadalje, prisutnost ROS-ova utječe na nekoliko onkogenih i supresora tumora, a kemoterapija i tretmani zračenjem povećavaju unutarstaničnu količinu ROS-ova kako bi se uklonile stanice raka, ali proizvodnja ROS-ova također utječe na okolne normalne stanice, stvarajući zauzvrat oštećenje DNA i nekoliko drugih biomolekula. Na staničnoj razini učinci proizvodnje ROS-a ovise o primijenjenoj dozi lijeka ili zračenja. Međutim, sveobuhvatno razumijevanje složene mreže ROS-ova, putova citotoksičnosti i uključenih molekularnih metaboličkih mehanizama u cjelini zahtijeva opsežnu analizu i eksperimentalne dokaze.

2.7.1.1. Utjecaj ROS-ova na lipide, proteine i nukleinske kiseline

Lipidi kao glavne sastavnice stanične membrane u sklopu fosfolipidnog dvosloja podliježu djelovanju ROS-ova u procesu lipidne peroksidacije. Tijekom tog procesa dolazi do vezanja ROS-ova za dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina koje grade mnoge stanične dijelove, a ponajprije membranski sustav. Nakon vezanja dolazi do aktivacije lančane reakcije u kojoj nastaju novi oblici slobodnih radikala te produkti oksidacije. U toj lančanoj reakciji dolazi do razgradnje lipida i struktura građenih od lipida što uzrokuje promjenu fluidnosti membrana (Ayala i sur., 2014). Osim s membranskim lipidima, ROS-ovi mogu reagirati i s membranskim proteinima čime se također narušava struktura i fluidnost membrane. Posljedica ovih događaja je veća propusnost stanične membrane i gubitak hidrolitičkih enzima iz lizosoma čime dolazi do razgradnje staničnog sadržaja. Kao rezultat veće propusnosti stanične membrane dolazi do pojačanog ulaska (npr. K^+ , Ca^{2+} i laktat-dehidrogenaze) i izlaza pojedinih iona i endogenih spojeva koje obično ne mogu prijeći barijeru osim kroz specifične kanale, te do bubrenja stanice zbog ireverzibilne promjene ulaska vode u stanicu. Laktat-dehidrogenaza je enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju oksidacije laktat-iona u piruvat-ion uz redukciju NAD^+ u $NADH$ te je ta reakcija bitna u metabolizmu ugljikohidrata pri čemu nastaje ATP.

Zastupljena je u gotovo svim tkivima te se koristi kao marker za toksikološke učinke pojedinih tvari na sekundarne promjene unutar stanice. Sve više dokaza ukazuje na to da oksidacijski stres utječe na strukturu kromatina, metilaciju DNA, enzimske i neenzimske posttranslacijske modifikacije histona i proteina koji vežu DNA. Učinci oksidacijskog stresa na ove promjene kromatina posreduju u nizu staničnih promjena, uključujući modulaciju ekspresije gena, staničnu smrt, stanično preživljavanje i mutagenezu, što su mehanizmi pokretanja bolesti. Oksidacijski stres može stimulirati cjelokupni gubitak heterokromatina i tako potencijalno utjecati na procese pravilne transkripcije, mitoze i mejoze te održavanja stabilnosti genoma. ROS-ovi također utječu na smatanje i stabilnost histona, kao i na njihovu sposobnost posttranslacijske modifikacije. Budući da su histoni najčešći proteini kromatina, svaka promjena u njihovoj zastupljenosti, strukturi ili posttranslacijskim modifikacijama (PTM) imat će ozbiljan utjecaj na cjelokupnu strukturu kromatina, utječući na ekspresiju gena, stabilnost genoma i replikaciju (Kreuz i Fischle, 2016). ROS-ovi mogu stvoriti adukte s DNA koji ometaju sparivanje baza i/ili blokirati DNA replikaciju i transkripciju, gubitak baza, ili DNA jednolančane lomove. Još su opasniji dvostruki lomovi DNA koji se teško popravljaju (Jackson i Bartek, 2009). Osim izravne modifikacije DNA, ROS-ovi također mogu utjecati na metilaciju DNA, koja je općenito povezana s represijom transkripcije. Kod sisavaca, primarni ciljevi metilacije su citozini u CpG dinukleotidima. Dok su CpG obično metilirani na cijelom genomu, regije s visokom gustoćom CpG dinukleotida (CpG otoci) uglavnom su hipometilirane. U mnogim patološkim stanjima, poput Alzheimerove bolesti, dijabetesa ili raka, opisana je cjelokupna hipometilacija DNA. Međutim, neki specifični CpG otoci su hipermetilirani kod dijabetesa ili raka i sugerirano je da se i cjelokupna hipometilacija i specifična hipermetilacija mogu povezati s oksidacijskim stresom (Gravina i sur., 2013). ROS-ovi također imaju štetan učinak na mitohondrijsku DNA, a taj učinak je izravno povezan s inaktivacijom promotora i nižom regulacijom ekspresije mitohondrijskih gena. Stoga se pretpostavlja da povišene razine proizvodnje ROS-a u mitohondrijima, koji imaju dulji poluživot kao što je H₂O₂, mogu uzrokovati disfunkciju mitohondrija i u konačnici spriječiti biološke procese koji dovode do raznih bolesti.

2.7.2. Stanična apoptoza

Stanična apoptoza, poznata i kao programirana stanična smrt, prirodni je fenomen koji se javlja kao spontano reguliran proces u biološkom sustavu, a čine ga morfološke promjene koje se događaju prije stanične smrti aktivirane uslijed letalnog oštećenja stanice. Apoptoza može biti izazvana određenim vanjskim čimbenikom, ali i predstavlja mehanizam kojim se

reguliraju normalni procesi u organizmu kao što su obnova tkiva i embrionalni razvoj. Proces apoptoze obuhvaća gubitak adhezivnih svojstava, kondenzaciju kromatina, fragmentaciju jezge, zgrušavanje citoplazme, degradaciju mitohondrija, izlazak citokroma c u citoplazmu kao i nastajanje apoptotičkih tjelešaca te konačno fagocitozu. Fagocitoza je razgradnja stanice i izlučivanje spojeva citokina koji sprječavaju nastanak upale. S druge strane, nekroza je pasivna stanična smrt gdje dolazi do bubrenja citoplazme, raspadanja organela i stanične membrane te do gubitka unutarstaničnog sadržaja i upale uslijed velikog oštećenja stanice (Fink i Cookson, 2005). ROS-ovi igraju važnu ulogu u pokretanju procesa apoptoze utječući na različite signalne kaskade i izravno oksidirajući stanične proteine, lipide ili nukleinske kiseline i uzrokujući opće oštećenje i disfunkciju. ROS-ovi također mogu utjecati na različite ključne nekrotične putove koji također mogu dovesti do određene količine nekrotične stanične smrti, što je brži i manje ovisan o energiji događaj u usporedbi s apoptozom (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016).

U procesu apoptotskih promjena važnu ulogu imaju cisteinske proteaze u citoplazmi stanica. Apoptoza se može aktivirati zbog primanja negativnih signala ili zbog izostanka pozitivnih signala za preživljenje stanica. Pozitivni signali pokreću diobu stanice, sintezu biokemijskih spojeva, faktora rasta, citokina i mnogih drugih spojeva važnih za normalno funkcioniranje stanice. U slučaju da stanica počne primati negativne signale koje nazivamo apogonim, kreće u apoptozu. Važnu ulogu u pokretanju apoptoze može imati i oštećenje DNA stanice te ROS-ovi koji također mogu biti uzročnici oštećenja DNA, ali i mogu utjecati na promjenu propusnosti membrane mitohondrija te otpuštanje citokroma c. Razlikuju se vanjski i unutarnji put apoptoze. U procesu vanjskog puta apoptoze vrlo su bitni takozvani receptori smrti kao što su TNF, TRAIL ili Fas/CD95. Vezanjem specifičnih liganada dolazi do grupiranja receptora i nastajanje DISC (eng. *Death Inducing Signaling Complex*) signalnog kompleksa za indukciju stanične smrti. Unutrašnji put apoptoze se još naziva i mitohondrijski put, a aktivira se uslijed poremećene unutarstanične ravnoteže. Neovisno o načinu pokretanja apoptoze, najbitniji enzimi u cijelom procesu stanične smrti su kaspaze čija aktivacija dovodi do fragmentacije DNA, kondenzacije kromatina i bubrenja stanične membrane (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016).

2.7.3. Antioksidacijski i prooksidacijski spojevi

Biljke s terapeutskim djelovanjem i biološki aktivne tvari iz biljaka mogu djelovati kao zaštitni agensi protiv oksidacijskog stresa i stoga bi njihov potencijal za upotrebu u takvim bolestima mogao biti vrijedan istraživanja (Vallejo i sur., 2017). Biljke su razvile molekule antioksidansâ koje im pomažu izdržati stresove iz okoliša. Ljudi također mogu imati koristi od

ovih obrambenih molekula kroz njihovu konzumaciju u voću i povrću. Biljni fenoli spadaju u glavnu klasu antioksidansa identificiranih u biljkama. Vjeruje se da prehrambeni antioksidansi doista igraju vrlo važnu ulogu u obrambenom sustavu ljudskog tijela, štiteći, kao i kod biljaka, od oksidacijskog oštećenja izazvanog reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), za koje se zna da sudjeluju u patogenezi starenja i mnogih degenerativnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti i karcinomi.

Osim egzogenih i endogenih izvora ROS-ova, utvrđeno je da različiti prooksidansi imaju značajnu ulogu u oksidacijskom stresu. Prooksidansi su tvari koje izazivaju oksidacijski stres stvaranje reaktivnih skupina spojeva te na taj način inhibiraju funkcioniranje antioksidacijskog sustava u stanicama i tkivima. Mogu biti egzogeni i endogeni pri čemu u egzogene prooksidanse ubrajamo patogene, lijekove, otrovne tvari i prehrambene sastojke, a u endogene tjeskobu, protok iona, klimu, okolišno zagađenje i metabolite lijekova (Singh i sur., 2019).

Određeni spojevi mogu se ponašati i kao antioksidansi i prooksidansi ovisno o uvjetima u kojima djeluju. Na primjer, flavonoidna struktura je ta koja uvelike doprinosi antioksidacijskim svojstvima, no oni se u prisutnosti prijelaznih metala poput bakra ponašaju kao prooksidansi. Isto tako, askorbinska kiselina također je sklona ponašati se kao antioksidans i prooksidans, ovisno o dozi. Askorbinska kiselina također može imati toksični učinak zbog svoje autooksidacije, što dovodi do utjecaja na ekspresiju gena (Seo i Lee, 2002).

2.7.4. Genotoksični učinak

Genotoksičnost je pojam koji opisuje štetan utjecaj ispitivane kemikalije na cjeloviti genetski materijal stanice. Dokazano je da genotoksične tvari potiču mutagenezu i kancerogenezu. Pri tome, moramo razlikovati genotoksičnost i mutagenost koja se odnosi na trajne prenosive varijacije u količini i strukturi genetskog materijala stanica ili organizama koje mogu povećati učestalost mutacija. Pri tome, genotoksičnost obuhvaća mutagenost, ali nisu sve genotoksične tvari mutagene, jer ne moraju uzrokovati genetske promjene u sekvencama DNA. Posebice je opasno kada genotoksične tvari utječu na reproduktivne stanice te se na taj način genetičke promjene prenose iz generacije u generaciju. Kao evolucijski proces, organizmi su razvili mehanizme za samouništaivanje oštećenih ili njihovih dijelova oštećenih djelovanjem genotoksičnih agenasa. Razvijen je niz metoda za procjenu genotoksičnosti u uvjetima *in vitro* ili *in vivo*. Genotoksične kemikalije su one koje mogu izazvati oštećenja DNA ili kromosoma. Oštećenja u molekuli DNA mogu nastati izravno, cijepanjem kemijskih veza u molekuli ili

neizravno preko nastanka slobodnih radikala. Dnevno u svakoj od 10^{13} stanica u ljudskom tijelu mogu nastati na deseci tisuća oštećenja. Ta oštećenja mogu blokirati replikaciju i transkripciju genoma, a ako se ne poprave ili se poprave pogrešno, dovode do mutacija ili aberacija genoma širih razmjera koje ugrožavaju stanicu i održivost organizma. Pogreške tijekom replikacije, popravka i rekombinacije DNA mogu rezultirati mutacijama DNA poput točkastih mutacija i genskih mutacija (uključujući supstitucije parova baza i supstituciju/deleciju baze), kromosomske aberacije (strukturne i numeričke) i mutacije genoma. Međutim, točni molekularni mehanizmi genotoksičnih tvari koje induciraju te mutacije genetskog materijala većinom su nejasni. Općenito, genotoksične tvari mogu igrati važnu ulogu u kancerogenezi izravno i neizravno inducirajući mnoge vrste genetskih oštećenja. Međutim, ni jedan pojedinačni test ne može otkriti sve relevantne pokazatelje genotoksičnosti i stoga bi se trebala koristiti kombinacija različitih metoda. Primjerice, ograničenje metoda na mikroorganizmima koji se koriste u Amesovom testu odnosi se na jednostavnost njihovih genoma i sustava za popravak DNA u usporedbi sa genomima sisavaca. Nadalje, komet-test može pokazati veliku varijabilnosti zbog različitih čimbenika i uvjeta pod kojima se testiranja provode (Menz i sur., 2023).

2.8. Djelovanje smjesa spojeva

U svakodnevnom okruženju svi pripadnici nekog ekosustava su izloženi istodobnom djelovanju velikog broja kemikalija što ukazuje na potrebu da se izloženost i procjena rizika određuje za smjese spojeva, a ne samo za pojedinačne kemikalije. Već dugi niz godina poznata je podjela smjesa na jednostavne (manje od 10 spojeva) i složene (kompleksne; desetine ili stotine kemikalija čiji sastav nije u potpunosti poznat). Primjer jednostavnih smjesa su mješavine različitih pesticida ili kombinacije lijekova dok su složene smjese pare koje nastaju prilikom zavarivanja, voda za piće ili radna atmosfera (Feron i sur., 1998). Također, smjese se mogu podijeliti prema mehanizmu djelovanja njihovih glavnih komponenti te na taj način razlikujemo smjese čije komponente imaju sličan način djelovanja i smjese čije komponente ispoljavaju različite mehanizme djelovanja. Loewe i Muischnek su 1962. predložili koncept adicije doza ili koncentracija gdje koncept dozne aditivnosti ukazuje na to da svi toksični agensi unutar smjese doprinose ukupnoj toksičnosti smjese bez obzira na svoju koncentraciju pa čak i ako su prisutni u koncentracijama nižim od njihove NOAEL vrijednosti (eng. *No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) pri kojoj izvan smjese ne ispoljavaju toksični učinak (Feron i Groten, 2002). Literaturni podaci pokazuju da izloženost smjesama koje sadrže niske koncentracije kemikalija (niže od NOAEL koncentracije) može rezultirati toksičnim

odgovorom bez obzira na sličan ili različit mehanizam djelovanja spojeva unutar smjese (Kortenkamp i sur., 2007). U novije vrijeme, uz navedene skupine smjesa, uvodi se treća kategorija koja se naziva interakcije, a definira se kao svi oblici zajedničkog učinka pojedinačnih spojeva smjesa koji odstupaju od prethodno opisane dvije skupine odnosno ukazuje na kombinirano djelovanje dvije kemikalije koje može biti jače (sinergizam, potenciranje, supra-aditivnost) ili slabije (antagonizam, inhibicija, sub-aditivnost i infra-aditivnost) u odnosu na učinak aditivnosti (**tablica 2**). Smjese odnosno komponente smjese u kontaktu s organizmom mogu djelovati nezavisno jedna od druge odnosno bez utjecaja jedna na drugu pri čemu se njihove doze i učinci zbrajaju, a s druge strane, komponente smjese mogu stupati u interakciju, a mogući mehanizmi podrazumijevaju kemijske, toksikokinetičke i tokiskodinamičke interakcije (Hertzberg i MacDonell, 2002).

Tablica 2. Terminologija koja se koristi za kombinirano djelovanje dvije kemikalije unutar smjese u odnosu na učinak aditivnosti (*prema* Hertzberg i MacDonell, 2002).

Djelovanje	Definicija
Interakcije	Učinak smjese je različit od aditivnosti bazirano na uspostavljenom doza-odgovor odnosu pojedinačnih komponenti smjese.
Aditivnost	Učinak smjese se može procijeniti na osnovi zbroja razina izloženosti ili učinaka pojedinačnih komponenti smjese.
Bez očiglednog utjecaja	Komponenta smjese koja ne ispoljava toksični učinak na određeni sustav nema utjecaj na toksičnost druge komponente na isti sustav.
Sinergizam	Učinak smjese je veći nego što se procjenjuje za aditivnost na bazi toksičnosti pojedinačnih komponenata smjese.
Potencijacija	Komponenta smjese koja ne ispoljava toksični učinak na određeni sustav pojačava toksičnost druge smjese na taj isti sustav.
Antagonizam	Učinak smjese je manji nego što se procjenjuje za aditivnost na bazu toksičnosti pojedinačnih komponenti smjese.
Inhibicija	Komponenta smjese koja ne ispoljava toksični učinak na određeni sustav smanjuje toksičnost druge komponente na taj isti sustav.
Maskiranje	Komponenta smjese ima suprotne ili kompetitivne učinka u odnosu na drugu komponentu smjese na istom sustavu, pri čemu komponente jedna drugoj smanjuju učinak ili pak jedna komponenta nadjačava učinak druge.

Toksikološka procjena rizika smjesa je vrlo složena ukoliko se želi napraviti realna projekcija izloženosti s obzirom da su organizmi svakodnevno izloženi višekomponentnim smjesama kemikalija prisutnim u vodi, zraku, tlu i hrani. Problem postaje još složeniji ukoliko za smjese za koje se procjenjuje izloženost i rizik sastav nije u potpunosti definiran. Procjena rizika za ljudsko zdravlje je proces analize podataka kako bi se utvrdilo može li kemikalija dovesti do štetnih učinaka kod izloženih pojedinaca. To uključuje karakterizaciju i kvantifikaciju mogućih štetnih učinaka na ljudsko zdravlje povezana s izloženošću kemikalijama. Jedan od glavnih ciljeva procjene rizika je utvrditi prihvatljive razine izloženosti ljudi, takozvane „sigurne“ vrijednosti. Ključni korak u procesu određivanja sigurne vrijednosti je određivanje najniže doze odnosno koncentracije koja uzrokuje odgovor u eksperimentu (eng. *point of departure*, POD) i predstavlja toksikološku važnost. Za procjenu POD, mogu se koristiti dva pristupa, razina bez vidljivog učinka (NOAEL) i pristup referentnoj dozi (eng. *benchmark dose*, BMD). BMD se smatra dozom koja rezultira malom promjenom odgovora ili učinka (5 – 10 %) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Oberger, 2010). Varijabilnost podataka je uzeta u obzir određivanjem statističke gornje i donje granice pouzdanosti. Donja granica pouzdanosti se ranije nazivala referentna doza, ali je ubrzo postala prepoznata kao BMD donja granica (eng. *lower confidence limit*, BMDL) (Crump, 1984). Ova metodologija se smatra zamjenom za NOAEL pristup ili najnižu promatranu razinu štetnog učinka (eng. *lowest observed adverse effect level*, LOAEL). U BMD pristupu, koriste se statističke metode za izdvajanje informacija iz cijelog skupa podataka umjesto usporedbe podskupina podataka. Također, BMD pristup može interpolirati među primijenjenim dozama dok je NOAEL ograničen na raspon doza ili koncentracija odabranih u pripremi eksperimenta (Haber i sur., 2018). Primjer programskog paketa za određivanje BMDL u smjesama kemikalija je PROAST dizajniran od strane Nacionalnog instituta za javno zdravstvo i okoliš Kraljevine Nizozemske (RIVM). Radi se o programskom paketu za statističku analizu i modeliranje doze-odgovora toksikoloških podataka te izvođenje referentne doze (BMDL) u procjeni rizika za ljude (ili u procjeni ekotoksikološkog rizika). Općenitije, može se koristiti za obradu podataka pomoću (nelinearne) regresije (s kovarijantama).

2.9. Biodostupnost biološki aktivnih tvari - *in vitro* probava

Ljudski probavni sustav se smatra važnim elementom bioraspodjelivosti konzumiranih tvari. Nadalje, međudjelovanje hrane i ljudskog organizma je iznimno složen proces te uključuje različite fiziološke i fizikalno-kemijske procese, a oni ovise o strukturi i sastavu hrane koju konzumiramo, karakteristikama pojedinca koji konzumira te raznim drugim čimbenicima

poput vremena konzumacije i vrsti hrane koja je prethodno konzumirana (McClements i Li, 2010). Da bi biološki aktivne tvari iz hrane bile učinkovite za ljudsko zdravlje, bitno je da budu dostupne te da određena količina istih bude apsorbirana u probavnom traktu prilikom probave. Bioraspoloživost ili udio tvari iz hrane koja se prenosi u krvotok je puno važnija od ukupne količine biološki aktivne tvari u izvornoj namirnici (Parada i Aguilera, 2007).

Hranjive i biološki aktivne tvari se nalaze u različitim dijelovima biljne stanice uključujući i biljne organele kao što su primjerice plastidi u kojima se nalaze karotenoidi u mrkvi. Prirodni matriks hrane ili onaj nastao tijekom obrade hrane može uvelike utjecati na oslobađanje određenih komponenti hrane tijekom probave. Na primjer, ulja u orašastim plodovima se možda neće potpuno apsorbirati u probavnom traktu zbog čvrste stanične stijenke koja neće biti razgrađena. Povećanje sadržaja ulja i razaranje prirodnog matriksa hrane povećava apsorpciju karotena u tijelu (Vásquez-Caicedo i sur., 2007). Bioapsorpcija karotena je veća u tabletama suplemenata nego onih u prirodnom matriksu voća i povrća. Beta karoteni brže ulaze u plazmu ako se konzumira sok od mrkve ili kuhana mrkva jer mehanička obrada mrkve žvakanjem i probavni enzimi možda neće biti dovoljni da razbiju snažnu staničnu strukturu mrkve i oslobode beta karoten. Samo antioksidansi oslobođeni iz matriksa konzumirane hrane djelovanjem probavnih enzima (tanko crijevo) i bakterijske mikrobiote (debelo crijevo) su biodostupni u crijevima i posljedično tome i potencijalno bioraspoloživi (Saura-Calixto i sur., 2007).

Najveća koncentracija aktivnih metabolita u ciljanom tkivu ne potječe nužno od antioksidansâ čija je bila najveća koncentracija u progutanoj hrani pa su prema tome biodostupnost i bioraspoloživost antioksidansâ različite. Antioksidansi iz voća su najčešće povezani s ugljikohidratima, lipidima i proteinima s kojima formiraju matriks izvornog ploda (Palafox-Carlos i sur., 2011).

Metode u uvjetima *in vitro* koje simuliraju probavne procese koriste se za ispitivanje ponašanja hrane i farmaceutika tijekom procesa probave. Iako su nutricionistička ispitivanja još uvijek „zlatni standard“ za rješavanje problema u vezi prehrane, metode u uvjetima *in vitro* imaju prednosti zbog svoje brzine, manjih troškova izvedbe i bez etičkih restrikcija. To omogućava velik broj analiziranih uzoraka i dobru ponovljivost zbog moguće kontrole uvjeta i lako uzorkovanje na mjestu od interesa. Probava podrazumijeva miješanje hrane s probavnim sokovima, njezino kretanje kroz probavni trakt te razgradnja velikih molekula hrane u manje molekule. Ritmične kontrakcije stijenki organa zbog sloja mišića mogu pokretati hranu i tekućinu kroz probavni sustav, a također služe za miješanje sadržaja unutar svakog organa zbog

bolje učinkovitosti probave. Simulirana probava obično sadržava oralnu, želučanu i fazu tankog crijeva te povremeno fermentaciju u debelom crijevu. Usta i želudac su glavni dijelovi gdje se hrana usitnjava na male komadiće, s druge strane, tanko crijevo je glavno mjesto za apsorpciju hranjivih tvari gdje se hrana otapa u sokove iz gušterače, jetre i crijeva (Kong i Singh, 2008). U ovoj metodi se oponašaju fiziološki uvjeti *in vivo* uzimajući u obzir enzime, njihove koncentracije, pH vrijednosti, vrijeme probave u pojedinoj fazi te koncentracije soli. Postoje dva modela *in vitro* probave, a to su statički i dinamički. Statički modeli obično uključuju peptičku hidrolizu homogenizirane hrane na pH 1,5 tijekom 1 – 2 h i uz miješanje na 37 °C. Dinamički modeli simuliraju fizičke i fiziološke probavne događaje uključujući promjene pH, temperaturu, peristaltiku, izlučivanje probavnih enzima, žuči i pankreasnih sokova te apsorpciju probavljenih uzoraka (Kong i Singh, 2008). Dinamički modeli su posebice korisni kada se fizičko stanje poput veličine čestica i viskoznost probave mijenjaju tijekom vremena te se uzimaju u obzir učinci poput miješanja, difuzije i stvaranje koloidnih faza (Parada i Aguilera, 2007). Važno je predvidjeti otpuštanje hranjivih tvari iz prehrambenog matriksa kako bi se pod simuliranim uvjetima probave moglo definirati koji je prehrambeni matriks najprikladniji za koju hranjivu tvar.

Većina probavljenih molekula hrane, kao što su voda i minerali, apsorbiraju se kroz tanko crijevo, a monomeri nastali tijekom probave prenose se preko stijenke tankog crijeva u krv i limfu u procesu apsorpcije. Tijekom procesa probave aromatski spojevi otpuštaju se u nosnu šupljinu. Vrijeme potpune probave ovisi o strukturi hrane, a tekućine se probavljaju brže nego polukrutine ili stanične strukture (Norton i sur., 2007), a najveći dio fenolnih spojeva se oslobađa u želucu. Primjerice, ukupno 65 % fenolnih spojeva se oslobađa tijekom procesa probave jabuke u želucu, a 10 % u tankom crijevu (Bouayed i sur., 2011). Fenoli mogu djelovati i kao inhibitori enzima probave te visoke koncentracije fenolnih spojeva mogu smanjiti razgradnju ostalih sastojaka hrane poput lipida i ugljikohidrata čim se povećava udio neprobavljene hrane i fenola koji prelaze u debelo crijevo. Mikrobiološka fermentacija smanjuje bioraspoloživost izvornih fenolnih spojeva što stvara metabolite s potencijalno većom biološkom aktivnosti od izvornih fenolnih spojeva (Karaš i sur., 2017). Probavljivost i biodostupnost (količina spoja koja se oslobađa iz matriksa i smatra dostupnom za apsorpciju kroz stijenku crijeva) lijekova, mikotoksina, makronutrijenata kao što su proteini, ugljikohidrati i lipidi određuje se primjenom statičkih modela humane probave (Larsson i sur., 2012). Iako su iz protokola do sada provedenih eksperimenata proizašle mnoge metode *in vitro*, postoje značajne varijacije u parametrima između modela opisanih u literaturi (McClements i Li, 2010;

Williams i sur., 2012) te se time dovodi u pitanje mogućnost usporedbe rezultata među istraživačkim skupinama.

Probava fitokemikalija je složen proces te biodostupnost fitokemikalija ovisi o karakteristikama matriksa hrane te fiziološkim uvjetima koji su prisutni u različitim fazama probavnog trakta (uključujući koncentracije enzima i pH). Primjerice, ravnoteža hidrofilnosti/hidrofobnosti je ključna u pokretanju otapanja hidrofilnih fenolnih spojeva u vodenoj fazi probave u crijevima. Također, fizikalno-kemijska svojstva samih fitokemikalija su vrlo važni parametri u probavi. Na stabilnost fitokemikalija tijekom probave mogu utjecati prisutnost mikronutrijenata i prehrambenih vlakana, enzimi koji sudjeluju u probavi kao i mikrobiota. Biodostupnost se definira kao količina unesene hranjive tvari koja je dostupna za apsorpciju u crijevima nakon probave (Colle i sur., 2010). Bioraspoloživost se definira kao udio unesenih hranjivih tvari koji je dostupan za korištenje u normalnim fiziološkim funkcijama ili skladištenje u tijelu i uključuje dostupnost hranjivih tvari (Palafox-Carlos i sur., 2011).

Jedan od glavnih čimbenika koji utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva je matriks hrane zbog međusobnih interakcija. Primjerice, fenolni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže velik broj hidroksilnih skupina imaju velik afinitet vezanja na proteine što potencijalno utječe na smanjenje njihove bioraspoloživosti. To je uočeno u istraživanju na voćnim sokovima s dodatkom sojinog mlijeka kao modelu za provjeru biodostupnosti fenolnih spojeva (Rodriguez-Mateos i sur., 2014). Nadalje, fenolni spojevi mogu se vezati na sastojke stanične stijenke poput celuloze ili pektina te na prehrambena vlakna što može utjecati na njihovu bioraspoloživost u negativnom kontekstu (Jakobek, 2015).

2.10. Proteomika

Proteomika je interdisciplinarna znanost koja povezuje kemiju, biologiju i računarstvo, a bavi se analizom cjelokupnog proteinskog komplementa stanice, tkiva ili organizma pod točno određenim uvjetima. Skup svih proteina u organizmu naziva se proteom, a proteomika prati status proteoma prema vrsti stanice ili tkiva tijekom različitih razvojnih faza organizma (Pappa i sur., 2020). Analiza ukupnih proteina u stanici je vrlo složen proces jer je funkcija proteina definirana različitim čimbenicima poput razine ekspresije, posttranslacijskih modifikacija, interakcije s drugim proteinima ili molekulama DNA/RNA te mehanizmi aktivacije i represije (Kraljević Pavelić i Saban, 2007). Isto tako, sama ekspresija proteina se mijenja pod utjecajem okolišnih uvjeta. U stanici dolazi do promjene aktivnosti i razine pojedinih proteina pod utjecajem specifičnih unutarnjih ili vanjskih čimbenika. Analizom

promjene proteoma koja uključuje kvalitativna i/ili kvantitativna mjerenja dobivamo uvid u aktivnosti stanice. Utvrđeno je da u eukariotskoj stanici istovremeno može biti prisutno oko 50 000 proteina (Hanash, 2000), a raspon njihove ekspresije (povećanje ili smanjenje) iznosi sedam ili osam redova veličine. Prema tome, spomenuta varijabilnost statusa proteina i njihova složena priroda zahtijevaju osjetljivu i selektivnu tehnologiju sposobnu istovremeno analizirati na tisuće nepoznatih proteina u jednom sustavu. Glavne zadaće proteomike podrazumijevaju otkrivanje eksprimiranih proteina pri različitim uvjetima, ali i opisivanje interakcija, njihove strukturne građe i modifikacije. Rezultati dobiveni proteomskom analizom daju nam lepezu informacija koje predstavljaju temelj za razumijevanje funkcija i modifikacija gena te bioloških mehanizama što olakšava uspostavljanje dijagnoza, liječenje i formulaciju potencijalnih lijekova (Hixon i sur., 2017).

2.10.1. Podjela i načela proteomskih analiza

Proteomiku dijelimo na proteomiku ekspresije proteina, funkcionalnu proteomiku i strukturalnu proteomiku. Za određivanje kvalitativne i kvantitativne ekspresije proteina normalne stanice i stanice pod određenim stresom (bolesno stanje ili utjecaj lijekova) primjenjuje se proteomika ekspresije proteina (Liebler, 2002). Primjer primjene proteomike ekspresije proteina je istraživanje stanica tumora gdje se uspoređuju tkiva tumora donora s uzorcima zdravog tkiva. Koriste se metode 2D gel elektroforeze i spektrometrija masa. Strukturna proteomika se koristi za karakterizaciju trodimenzionalnih struktura proteina i proteinskih kompleksa. Također, ovom metodom detektiraju se svi prisutni proteini u kompleksu, određuju se njihove lokacije te se objašnjavaju interakcije između proteina. Određivanje strukture staničnih proteina provodi se najčešće nuklearnom magnetskom rezonancijom ili rendgenskom kristalografijom. Na kraju, funkcionalna proteomika se primjenjuje za definiranje uloge proteina, objašnjavanju pojedinih mehanizama stanice u kojima sudjeluju identificirani proteini te karakterizaciju interakcija između proteina. Ne postoji točna definicija funkcionalne proteomike, već se ona koristi kao općeniti termin za širok spektar metoda proteomike (Chandrasekhar i sur., 2014).

Posljednjih nekoliko godina, značajna poboljšanja u tehnikama i identifikaciji proteina te bolje razumijevanje građe, strukture i funkcije genoma dovela su do porasta primjene proteomskih metoda. Za sve proteomske analize, kritičan korak je čistoća uzorka pa je postupak pročišćavanja proteina od primarne važnosti i trebao bi obuhvatiti najopsežniji mogući set proteina uz njihovu minimalnu degradaciju i kontaminaciju. S obzirom na različita biokemijska svojstva staničnih proteina, uključujući njihov naboj, veličinu, hidrofobnost, osjetljivost na

proteolizu, interakcije liganada i subcelularnu lokalizaciju, niti jedan protokol pročišćavanja proteina ne može obuhvatiti cijeli proteom (Isaacson i sur., 2006). Za razliku od DNA gdje su fragmenti biokemijski slični, proteini posjeduju jedinstvena svojstva i takva individualnost stvara ogromnu prepreku metodologijama koje nastoje dodijeliti aktivnosti setovima proteina koji se mogu brojiti u tisućama. Metode za razdvajanje proteina na temelju naboja i molekulske mase su jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrijevog dodecilsulfata (eng. *Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) te metoda izolektričnog fokusiranja (eng. *preparative isoelectric focusing*, IEF) koja prethodi SDS-PAGE-u. Za razdvajanje proteina može se koristiti i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ovisno o složenosti proteinske smjese koja se analizira te ovisno i broju frakcija na koje se može podijeliti uzorak proteina (Liebler, 2002).

Za preciznu analizu proteina neophodna je njihova digestija kojom se dobiva slijed od 6 – 20 aminokiselinskih ostataka (peptid) što ga čini idealnim uzorkom za analize primjenom spektrometrije masa i računalne analize. Za digestiju proteina koriste se enzimi proteaze koje specifično cijepaju peptidne veze u proteinima, a dijele se na serinske, serin-karboksi, cisteinske, aspartatske, metalo-proteaze te proteaze glutaminske kiseline (Ramos i Malcata, 2011). Najčešće se koriste tripsin (cijepanje na aminokiselinskom ostatku lizin i arginin), kimotripsin (fenilalanin, tirozin, triptofan), V8 proteaza (aspartat, glutamat), Lys-C proteaza (lizin) i Asp-N proteaza (aspartat). U znanstvene svrhe najčešće se primjenjuje tripsin, serinska proteaza koja se izolira i pročišćava iz goveđe ili svinjske gušterače. Ona cijepa proteine na lizinskom i argininskom aminokiselinskom ostatku ako iza njih ne slijedi prolin na C-terminalnom kraju, a pogodna je za pripremu uzorka koji će se analizirati spektrometrijom masa. Tripsin učinkovito cijepa proteine dajući u 95 % slučajeva tzv. „savršeni peptidni fragment“ (6 – 20 aminokiselinskih ostataka) te je stabilan u otopinama i gelovima (Lindon i sur., 2017).

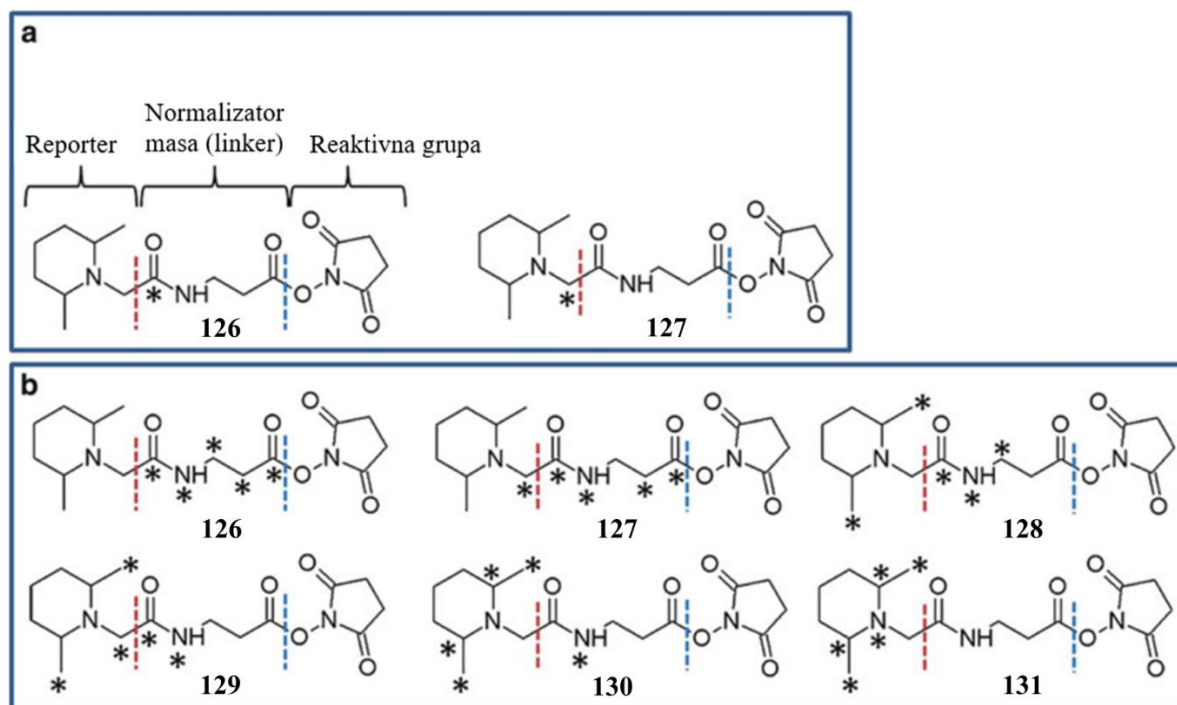
Nakon razdvajanja proteina/peptida slijedi njihova identifikacija i kvantifikacija proteina na spektrometru masa. Spektrometrija masa analitička je metoda koja omogućuje određivanje točnog omjera mase i naboja (m/z) različitih tipova molekula uključujući peptide i proteine s visokom preciznošću. S obzirom na primjenu spektrometrije masa, razlikujemo ciljanu (eng. *target analysis*) i neciljanu analizu (eng. *non-target analysis*) proteina. Neciljanom analizom se određuje sastav uzorka odnosno kvalificiraju se proteini u analiziranom uzorku dok se ciljanom analizom kvantificiraju točno određeni proteini od interesa. Za analizu se koriste

dva tipa spektrometrije masa: tzv. MALDI-TOF spektrometrija koja koristi matricom potpomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) i analizatorom vremena leta (eng. *time of flight*, TOF; Chandrasekhar i sur., 2014) te spektrometrija masa koja koristi ionizaciju elektroraspršivanjem (eng. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*, ESI-MS) (Ho i sur., 2003). MALDI je metoda ionizacije u kojoj se uzorak miješa s matricom, a matrica pospješuje ionizaciju prijenosom protona na sastavnice uzorka dok se dobiveni ioni zatim analiziraju analizatorom masa. Kod metode ESI, dolazi do pretvorbe spojeva u nabijene, raspršene kapljice u obliku spreja pod utjecajem visokog napona, a iz raspršenih kapljica se oslobađaju ionizirane čestice koje se analiziraju u analizatoru masa.

2.10.2. Metode relativne kvantifikacije proteina

Unazad nekoliko godina u proteomska istraživanja uvedene su metode relativne kvantifikacije proteina kao što su iTRAQ (eng. *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*), TMT (eng. *Tandem Mass Tag*), SILAC (eng. *Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture*) i ICAT (eng. *The Isotope-Coded Affinity Tag*). One se temelje na višestrukome označavanju uzoraka koji se žele usporediti na razini proteinskog sastava pri čemu se svaki uzorak označava karakterističnom probom. Metoda iTRAQ se temelji na kovalentnom označavanju slobodnih amina na N-terminalnom kraju peptida i na bočnim lancima lizinskih ostataka. Označeni uzorci se zatim skupljaju i analiziraju istovremeno. Budući da se radi o izobaričnim oznakama, označeni peptidi ne pokazuju pomak m/z u spektru masa, umjesto toga signal istog peptida iz svih uzoraka se zbraja, pružajući umjereno povećanje osjetljivosti. Međutim, raspodjela izotopa u različitim oznakama je takva da kada se oznake fragmentiraju, oslobađa se specifičan 'reporter' ion za oznaku. Omjer intenziteta signala iz navedenih oznaka služi kao pokazatelj relativnih udjela peptida između različitih označenih uzoraka (Unwin, 2010). Srodno metodi iTRAQ, TMT označavanje se temelji na istom principu (Zieske, 2006). Kod metode TMT, postoje tri dijela koja čine oznaku, a to su grupa koja se veže na peptide, linker koji ima ulogu normalizatora masa te reporter masa (**slika 5**). Normalizator i reporter masa imaju konstantnu masu, ali povećanjem mase reportera, linker sa svojom manjom masom normalizira ukupnu masu kako bi zbroj masa kod svih izobaričnih oznaka bio jednak. Oznake imaju jednak broj ugljikovih (^{13}C) ili dušikovih (^{15}N) izotopa, a ono što se razlikuje je njihov raspored u strukturi ovisno o tipu oznake (**slika 5**). Tijekom analize spektrometrijom masa, cijepa se veza između normalizatora i reportera mase, pri čemu se reporteri mase kvantificiraju i shodno tome dobivaju informaciju o razini ekspresije proteina analiziranog uzorka. Metoda

SILAC se temelji na izravnom dodavanju odabranih stabilnih izotopa aminokiselina u medij stanične kulture, što omogućuje vrhunsku kvantitativnu analizu staničnog proteoma u usporedbi s drugim metodama označavanja. Prednost metode SILAC je u jednostavnoj implementaciji, točnosti i ponovljivosti u odnosu na kemijsko označavanje ili strategije kvantifikacije bez označavanja, što daje prednost korištenju ove metode u proteomskim istraživanjima (Chen i sur., 2015). Na kraju, metoda ICAT primjenjuje se za mjerenje promjena u ekspresiji proteina između paralelnih uzoraka putem diferencijalnog stabilnog izotopskog označavanja proteina ili peptida nakon čega slijedi identifikacija i kvantifikacija koristeći spektrometriju masa. Ovaj pristup omogućava istodobnu usporedbu ekspresije mnogih proteina između dva različita biološka stanja (npr. kvasac uzgojen na podlozi s galaktozom u odnosu na podlogu s glukozom ili zdrave u odnosu na stanice raka) (Chan i sur., 2015).



Slika 5. Struktura oznake kod TMTduplex (a) i TMTsixplex (b) reagensa (eng. *Tandem Mass Tag*) za označavanje peptidnih uzoraka. *TMT reagensi su označeni izotopima ugljika (^{13}C) i dušika (^{15}N) na različitim pozicijama. Ukupan broj izotopa je konstantan za sve reagense, ali je distribucija između reportera i normalizatora različita (prema Dayon i Sanchez, 2012).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i uređaji

Standardi

- arbutin, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Njemačka
- galna kiselina, Sigma-Aldrich, Njemačka
- hidrokinon, Sigma-Aldrich, Njemačka
- kvercetin, Sigma-Aldrich, Njemačka
- nitrofurantoin, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI), Indija
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), $\geq 97\%$, Acros Organics, SAD
- željezov (II) sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Kemika, Hrvatska

Enzimi

- lipaza iz svinjske gušterače, Sigma-Aldrich, SAD
- pankreatin iz svinjske gušterače, Sigma-Aldrich, SAD
- pepsin iz svinjske želučane sluznice, Sigma-Aldrich, SAD
- tripsin (2,5 %) u DPBS-u (10 \times), Capricorn Scientific, Njemačka
- α -amilaza iz ljudske sline, Sigma-Aldrich, SAD

Ostale kemikalije

- ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), BioChemica, AppliChem, Njemačka
- aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), Merck, Njemačka
- acetonitril (CH_3CN), VWR International GmbH, Njemačka
- agar za mikrobiologiju, Merck, Njemačka
- aluminijev klorid (AlCl_3), Sigma-Aldrich, Njemačka
- amonijev formijat (NH_4HCO_2), Carl Roth GmbH & Co., Njemačka
- amonijev klorid (NH_4Cl), Alkaloid - Skopje, Makedonija
- bakto-tripton, Biolife, Italija

- bezvodni natrijev acetat bezvodni (CH_3COONa), Kemika, Hrvatska
- bromtimol plavo, Sigma-Aldrich, Njemačka
- citohalazin B iz *Drechslera dematioidea*, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad Laboratories, UAE
- DCFH-DA (2',7'-diklorfluoroscein-diacetat), Sigma-Aldrich, Njemačka
- di-kalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4), J. T. Baker, Nizozemska
- dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Gram-Mol, Hrvatska
- dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline (Na_2EDTA), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DNA plazmid $\phi\text{X174 RF1}$, Promega Corporation, SAD
- DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikal), Sigma-Aldrich, Njemačka
- etanol (96 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etidijev bromid (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$), Merck, Njemačka
- fetalni goveđi serum (FBS), Capricorn Scientific, Njemačka
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Hrvatska
- fosfatna kiselinu (H_3PO_4), Sigma-Aldrich, Njemačka
- gentamicin sulfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Giemsa boja, Merck, Njemačka
- glicerol, Gram-Mol, Hrvatska
- goveđi serum albumin (BSA) Sigma-Aldrich, Njemačka
- HCCA (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina) ishodišna otopina matrice, Sigma-Aldrich, Njemačka
- imerzijsko ulje za mikroskopsku analizu, BioGnost, Hrvatska
- jodoacetamid ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$), Sigma-Aldrich, Njemačka
- kalcijev klorid (CaCl_2), Kemika, Hrvatska
- kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), Kemika, Hrvatska
- kalijev peroksodisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), VWR International GmbH, Njemačka
- klorovodična kiselina (HCl, 36,5 %), Kemika, Hrvatska
- kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija
- laktoza monohidrat ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \times \text{H}_2\text{O}$), Kemika, Hrvatska
- ledena octena kiselina (CH_3COOH , 99,9 %), Kemika, Hrvatska

- magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Kemika, Hrvatska
- medij za uzgoj staničnih linija Ham's F-12 s L-glutaminom, Capricorn Scientific, Njemačka
- metanol (99,9 %), Merck, Darmstadt, Njemačka
- MRS Broth with tween 80, Biolife, Italija
- nalidiksinska kiselina, 99,5 %, Acros Organics, SAD
- natrijev acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), Kemika, Hrvatska
- natrijev dodecil sulfat, SDS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), PlusOne, VWR International, SAD
- natrijev hidroksid (NaOH), Kemika, Hrvatska
- natrijev karbonat (Na_2CO_3), Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev karbonat bezvodni (Na_2CO_3), Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev karbonat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$), Alkaloid - Skopje, Makedonija
- natrijev klorid (NaCl), Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev nitrit (NaNO_2), Kemika, Hrvatska
- *Neutral Red* (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid boja), Sigma-Aldrich, Njemačka
- octena kiselina (CH_3COOH), J.T.Baker, Nizozemska
- SeaKem[®] LE agarozza za gel elektroforezu, Lonza, SAD
- sredstvo niskog viskoziteta za prekrivanje mikroskopskih preparata BioMount DPX Low, BioGnost, Hrvatska
- TCEP HCl (Tris (2-karboksietil) fosfin hidroklorid), Thermo Fisher Scientific, SAD
- TEAB pufer 1 M (trietil amonijev bikarbonatni pufer), Thermo Fisher Scientific, SAD
- tiamin hidroklorid, ≥ 99 % (HPLC), Merck, Njemačka
- TMTduplex reagens za označavanje peptidnih uzoraka, Thermo Fisher Scientific, SAD
- TMTsixplex reagens za označavanje peptidnih uzoraka, Thermo Fisher Scientific, SAD
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin), Alfa Aesar GmbH & Co KG, Njemačka
- trifluoroctena kiselina, TFA ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$), Merck, Njemačka
- Tris baza (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Triton[®] X-100, Acros Organics, SAD
- ultračista voda, $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$
- vodikov peroksid (H_2O_2), 3 %, Merck, Njemačka
- željezo (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Gram-Mol, Hrvatska

- željezo (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Kemika, Hrvatska
- žučne soli za mikrobiologiju, Merck, Njemačka

Popis uređaja

- analitička vaga 1712 Mp8, SilverEdition, UK
- čitač mikrotitarskih pločica FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Njemačka
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2 , Brouwer CH, Švicarska
- invertni biološki mikroskop XDS-1, OPTIKA Microscopes, Italija
- komora za sterilni rad IBK 1 V2, Iskra, Slovenija
- laboratorijska centrifuga Hettich Mikro 220R, Njemačka
- laboratorijska centrifuga Microspin 12, Biosan, Ltd., Latvija
- laboratorijska vaga, Engleska
- laboratorijski inkubator TH 15, Edmund Bühler GmbH, Njemačka
- magnetna miješalica EV-100, Tehnica-Železniki, Slovenija
- PTFE filteri (0,45 μm), ISOLAB, Njemačka
- rotacioni vakuum uparivač, Heidolph, Njemačka
- Sonopuls HD 3200 homogenizator, Bandelin, Njemačka
- spektrometar masa MALDI/TOF-TOF Autoflex Speed, Bruker, Njemačka
- spektrofotometar za mikrovolumene NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, SAD
- spektrometar masa TripleTOF 6600+, SCIEX, SAD
- sustav tekućinske kromatografije s nano- protokom NanoLC Dionex Ultimate 3000 RSLCnano uz UV/VIS detektor (Thermo Fisher Scientific, Njemačka) direktno spregnut sa sakupljačem frakcija Proteineer fcII, Bruker, Njemačka
- sustav za horizontalnu elektroforezu Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories, UAE
- sustav za proizvodnju ultračiste vode, Smart2pure 3 UV/UF, Thermo Scientific, Njemačka
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies, SAD
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti HPLC, Shimadzu Corporation, Japan
- uređaj za liofilizaciju Alpha 1-2, Christ, Njemačka
- UV traniluminator UVIpure BXT-F26 MX UVITEC Cambridge, UK

- vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC/MS) 6460 TripleQuad koji koristi ionizaciju elektroraspršivanjem (ESI), Agilent Technologies, SAD
- vibromikser EV-202 i EV-100, Tehnica-Železniki, Slovenija
- vodena kupelj VK2, INKOLAB, Hrvatska
- zamrzivač Ultralow temperature freezer, New Brunswick scientific Co., SAD

3.1.2. Priprema otopina, pufera i hranjivih podloga

Puferi i reagensi

Fosfatni pufer (PBS)	
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
ultračista voda	do 1000 mL

TE (Tris-EDTA) pufer (10×), pH = 8,0	
Na ₂ EDTA	2,92 g
Tris baza	15,75 g
ultračista voda	do 1000 mL

*korekcija pH vrši se klorovodičnom kiselinom (HCl)

TAE (Tris baza, octena kiselina i EDTA) pufer (10×), pH = 8,3	
Tris baza	48,4 g
ledena octena kiselina	11,4 mL
Na ₂ EDTA	3,7 g
ultračista voda	do 1000 mL

*korekcija pH vrši se klorovodičnom kiselinom (HCl)

100 mM TEAB (Trietilamonijev bikarbonat) pufer	
1 M TEAB	100 mL
ultračista voda	do 1000 mL

20 mM kalij fosfatni pufer, pH = 7	
1 M otopina K ₂ HPO ₄	61,5 mL
1 M otopina KH ₂ PO ₄	38,5 mL
ultračista voda	do 1000 mL

300 mM acetatni pufer, pH = 3,6	
CH ₃ COONa × 3H ₂ O	0,2 g
ledena octena kiselina	6 mL
ultračista voda	4 mL

Boja za nanošenje uzoraka na gel (eng. loading buffer) (6×)	
Bromtimol plavo	0,2 g
50 % glicerol	6 mL
ultračista voda	4 mL

Brädfordov reagens	
Coomassie Brilliant Blue G-250	50 mg
metanol	50 mL
85 % fosforna kiselina (H ₃ PO ₄)*	100 µL

*ovu kiselu otopinu dodati u 850 mL ultračiste vode i miješati dok se boja skroz ne otopi

FRAP (eng. Ferric Reducing/Antioxidant Power) reagens	
10 mM otopina TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin)	5 mL
300 mM acetatni pufer (pH 3,6)	50 mL
20 mM otopina FeCl ₃	5 mL

*prije korištenja svježe pripremljeni reagens zagrijati 10 min pri 37 °C

Priprema otopina enzima

Amilaza (0,48 mg/mL)	Pepsin (3 mg/mL)	Pankreasni sokovi (2,4 mg/mL žučnih soli, 0,3 mg/mL lipaze, 0,4 mg/mL pankreatina)	Tripsin (0,25 %)
0,59 mg amilaze (100 U) otopimo u 1,23 mL 20 mM otopine kalij fosfatnog pufera (pH = 7)	otopimo 60 mg pepsina u 20 mL 0,1 M otopine HCl uz pomoć magnetne miješalice	otopimo 120 mg žučnih soli, 10 mg lipaze i 20 mg pankreatina u 30 mL 20 mM kalij fosfatnog pufera uz pomoć magnetne miješalice	pomiješamo 10 mL 2,5 %-tne otopine tripsina (komercijalno dostupne) i 90 mL PBS pufera

Ostale otopine

- **0,1 M otopina HCl** - 0,84 mL HCl (36,5 %), ultračista voda (do 100 mL)
- **0,1 mM otopina DPPH** - 0,0394 g DPPH, 96 %-tni etanol (do 1000 mL)
- **0,5 M TCEP** - 143,325 g TCEP HCl, ultračista voda (do 1000 mL)
- **1 M otopina K₂HPO₄** - 17,4 g K₂HPO₄, ultračista voda (do 100 mL)
- **1 M otopina KH₂PO₄** - 13,6 g KH₂PO₄, ultračista voda (do 100 mL)
- **1 M otopina NaHCO₃** - 8,4 g NaHCO₃, ultračista voda (do 100 mL)
- **1 M otopina NaOH** - 4 g NaOH, ultračista voda (do 100 mL)
- **1,88 M otopina Na₂CO₃** - 19,92 g Na₂CO₃, ultračista voda (do 100 mL)
- **10 % (w/v) AlCl₃** - 10 g AlCl₃, ultračista voda (do 100 mL)
- **10 mM otopina TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-S-triazin)** - 312,34 mg TPTZ, 40 mM otopine HCl (do 100 mL)
- **140 mM otopina kalijevog peroksodisulfata** - 3,784 g kalijevog peroksodisulfata, ultračista voda (do 100 mL)
- **20 mM otopina FeCl₃** - 27,8 mg FeCl₃ × 6 H₂O, 40 mM HCl (do 100 mL)
- **200 mM TCEP** - 35 μL 0,5 M TCEP, 35 μL ultračiste vode, 17,5 μL 1 M TEAB
- **375 mM jodoacetamida** - 9 mg jodoacetamid, 132 μL 100 mM TEAB
- **40 mM otopina HCL** - 3,39 mL HCl (36,5 %), ultračista voda (do 1000 mL)
- **5 % otopina Giemsa boje** - 5 mL Giemsa boje, ultračista voda (do 100 mL)
- **5 % otopina NaNO₂** - 5 g NaNO₂, ultračista voda (do 100 mL)
- **7 mM otopina ABTS** - 0,384 g ABTS reagensa, ultračista voda (do 100 mL; fotolabilno)
- **citohalazin B (0,5 mg/mL)** - 50 mg citohalazina, 10 mL DMSO-a, medij za uzgoj stanica (do 100 mL)
- **citohalazin B (3 μg/mL)** - 600 μL citohalazin B (0,5 mg/mL), medij za uzgoj stanica (do 100 mL)
- **doksorubicin (0,4 μg/mL)** - 20 mL koncentrirane otopine doksorubicina (2 mg/mL u PBS-u), 80 mL medija za uzgoj stanica
- **etidijev bromid (0,5 μg/mL)** - 50 μL koncentrirane otopine etidijevog bromida (10 mg/mL u vodi), ultračista voda (do 1000 mL)
- **otopina DCFH-DA (0,05 mM)** - 2,5 mL koncentrirane otopine DCFH-DA (2 mM u DMSO-u) i 97,5 mL PBS-a

- otopina *Neutral Red* (0,05 mg/mL) - 1 mL koncentrirane otopine *Neutral Red* (5 mg/mL u 96 %-tnom etanolu), 99 mL kompletiranog medija za uzgoj staničnih linija
- otopina za fiksiranje (test CBMN) - ledena octena kiselina : metanola = 1 : 3
- otopina za odbojavanje (test *Neutral Red*) - 96 %-tni etanol : ultračista voda : ledena octena kiselina = 50 : 49 : 1
- radna otopina ABTS+ radikala - 1,76 mL otopine kalijevog peroksodisulfata (140 mM), 7 mM otopina ABTS-a (do 100 mL) (konačna koncentracije kalijevog peroksodisulfata iznosi 2,45 mM); na dan analize otopinu razrijediti 96 %-tnim etanolom - 99 mL 96 %-tnog etanola i 1 mL ABTS reagensa (konačna koncentracija ABTS+ radikala 1 %, A (734 nm) = 0,7 ± 0,02)
- Triton X-100 otopina (0,01 %) - 100 µL Triton X-100, PBS (do 100 mL)

Hranjive podloge za uzgoj bakterijskih kultura

LB (Luria-Bertani) hranjiva podloga	
bakto-tripton	10 g
kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
ultračista voda	do 1000 mL

MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) hranjiva podloga	
MRS Broth	27,6 g
ultračista voda	do 1000 mL
*nalidiksinska kiselina 100 mg/mL	300 µL

*dodaje se nakon sterilizacije u ohlađenu hranjivu podlogu

M9-minimalna podloga s laktozom	
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
ultračista voda	do 1000 mL
* 1 M otopina MgSO ₄ × 7 H ₂ O	2 mL
* 1 M otopina CaCl ₂	100 µL
* 20 % laktoza	10 mL
* tiamin (2 mg/mL)	1 mL

*prethodno pripremljene sterilne otopine (filter, 0,45 µm) u tekućem obliku u ultračistoj vodi koje se dodaju nakon sterilizacije u ohlađenu hranjivu podlogu

3.1.3. Biljni materijal

Za izradu ekstrakata korišteni su osušeni listovi medvjete [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.] Suban d.o.o. (Samobor, Hrvatska; broj serije: 1730, godina proizvodnje: 2016, zemlja podrijetla: Albanija).

3.2. Eksperimentalni test-sustavi

3.2.1. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su stanične linije probavnog sustava, jetre i mokraćnog mjehura: humani epitelni karcinom jezika (CAL 27; ATCC CRL-2095), humani adenokarcinom želuca (AGS, ATCC CRL-1739), humani epitelni kolorektalni adenokarcinom (Caco-2; ATCC HTB-37), humani hepatocelularni karcinom (HepG2; ATCC HB-8065) i humani karcinom mokraćnog mjehura (T24; ATCC HTB-4).

3.2.2. Bakterijske kulture

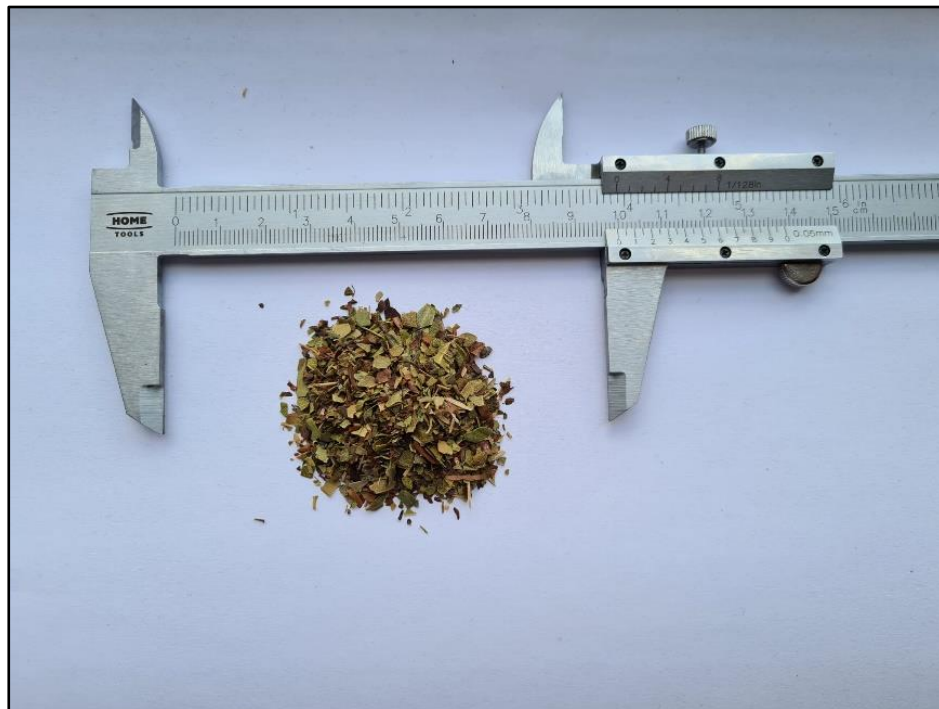
U ovom radu su kao eksperimentalni organizmi za ispitivanje antimikrobnog djelovanja i utjecaja na adheziju korišteni bakterijski sojevi opisani u **tablici 3**. U daljnjem tekstu koji se odnosi na eksperimente provedene u ovom radu te rezultate i raspravu, sve navedene bakterijske kulture navode se bez specifičnih oznaka.

Tablica 3. Bakterije korištene u ovom radu.

Bakterija	Izvor	Mjesto čuvanja	Opis
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DSM 20231 ^T	izolirana i identificirana u slini čovjeka (Huđek i sur., 2018)	kolekcija mikroorganizama, Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska, -80 °C	Gram-pozitivna
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	Genetic Stock Center, Yale University, SAD (Bačun-Družina i sur., 2007)		uropatogena, Gram-negativna
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSM 1055	izolirana i identificirana u slini čovjeka (Huđek i sur., 2018)		bakterije mliječne kiseline (eng. <i>lactic acid bacteria</i> , LAB), Gram-pozitivne
<i>Lactiplantibacillus fermentum</i> 21_PG_1 ZZMK	izolirana i identificirana u slini čovjeka (Huđek i sur., 2018)		

3.3. Priprema ekstrakta medvjjetke

Prema uputama proizvođača, svježi ekstrakt lista medvjjetke pripremljen je na način da je 3 g osušenih i prethodno samljevenih listova (pomoću tarionika, **slika 6**) preliveno sa 150 mL (ili 50 mL) ultračiste vode (zagrijane na 80 °C). Postupak ekstrakcije trajao je 15 min kako bi se u uzorcima dobio sadržaj biološki aktivnih tvari koji odgovara jednom terapeutskom napitku, odnosno dnevnoj preporučenoj dozi (3 terapeutska napitka; Yarnell, 2002). Ekstrakt je filtriran kroz Whatman filter papir s porama od 20 – 25 µm (razred 4, Sigma-Aldrich, Njemačka), nakon čega je volumen korigiran do 150 mL (ili 50 mL) prokuhanom ultračistom vodom, a filtrat je pohranjen na -20 °C. Prije upotrebe smrznuti filtrati su otopljeni i centrifugirani 5 min na $20\,000 \times g$, a supernatanti korišteni za daljnje analize.



Slika 6. Uzorak osušenih i samljevenih listova medvjjetke korištenih u pripremi ekstrakata (*vlastita fotografija*).

S obzirom na sve pozitivne zdravstvene učinke fenolnih spojeva, jako je bitno sačuvati njihovu stabilnost u namirnicama namijenjenih konzumaciji. Vrlo veliku ulogu u održavanju stabilnosti ima način obrade i uvjeti čuvanja (Michalska i Łysiak, 2015). Prema tome, danas se intenzivno istražuju metode koje održavaju fenole i druge biološki aktivne spojeve stabilnim, a jedna od njih je liofilizacija.

Za pripremu liofiliziranog uzorka medvjette proveden je isti postupak ekstrakcije koji je prethodno opisan, s time da je za liofilizaciju pripremljen 5× koncentrirani uzorak na način da je 15 g usitnjenih listića u tarioniku preliveno sa 150 mL ultračiste vode (zagrijane na 80 °C). Sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija je proces sušenja materijala sastavljen od tri koraka: smrzavanje, primarno sušenje ili sublimacija i sekundarno sušenje ili desorpcija. Glavni razlog širokog uspjeha ove tehnike je niska temperatura koja se koristi tijekom procesa sušenja što smanjuje rizik razgradnje tvari osjetljivih na toplinu i poboljšava stabilnost samog uzorka (Arsiccio i sur., 2019). Ekstrakt je uparen pomoću rotacionog vakuuma uparivača do volumena 25 mL pri uvjetima 90 o/min, 45 min, 60 °C (prvih 15 min na 150 mbar, a sljedećih 30 min na 100 mbar kako bi se spriječilo stvaranje pjene). Preostali volumen ekstrakta raspodijeljen je u plastične Petrijeve zdjelice prekrivene parafilmom te smrznut na -80 °C barem 2 h prije liofilizacije koja je provedena tijekom 24 h. Iz dobivene mase liofilizata preračunata je koncentracija za pripremu potrebnih terapijskih doza liofiliziranih ekstrakata.

3.3.1. Određivanje sastava ekstrakta

U pripremljenim vodenim ekstraktima medvjette određen je ukupni udio fenola i flavonoida te je određena antioksidacijska aktivnosti spektrofotometrijskim metodama DPPH•, FRAP i ABTS. Spektrofotometrijska mjerenja su napravljena u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

Napravljena je kvalitativna i kvantitativna analiza biološki aktivnih spojeva arbutina i hidrokinona u ekstraktu metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) na Shimadzu HPLC sustavu, a probavna stabilnost navedenih spojeva određena je simuliranom *in vitro* probavom.

3.3.1.1. Ukupni fenoli

Ukupni fenoli u vodenom ekstraktu medvjette i u uzorcima podvrgnutim *in vitro* probavi određeni su spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu pri valnoj duljini 765 nm. Ova kolorimetrijska metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je sastavljen od smjese fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Pri oksidaciji fenolnih spojeva navedene kiseline reduciraju se u plavo obojene volfram- i molibden-oksidi (Ough i Amerine, 1988). Metoda je prilagođena za male volumene pa je 20 µL uzorka pomiješano sa 100 µL Folin-Ciocalteu reagensom i 300 µL 1,88 M Na₂CO₃ te je volumen nadopunjen ultračistom vodom do 2 mL. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 45°C u tami te je nakon toga izmjerena apsorbancija pri 765 nm. Za izradu baždarne krivulje korištena je vodena otopina galne kiseline u rasponu koncentracija 0,1 – 2 mg/mL.

3.3.1.2. Ukupni flavonoidi

Ukupni flavonoidi u vodenom ekstraktu medvjete i uzorcima *in vitro* probave određeni su metodom pomoću aluminijevog klorida (AlCl_3) koja se temelji na svojstvu flavonoida da tvore kompleks s aluminijevim kloridom. Nastalo obojenje mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 510 nm, a intenzitet obojenja je proporcionalan količini prisutnih flavonoida u uzorku (Zhishen i sur., 1999). Volumen uzorka od 20 μL pomiješan je s 880 μL ultračiste vode i 60 μL NaNO_2 (5 % w/v) te je smjesa inkubirana 5 min pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, dodano je 60 μL AlCl_3 (10 % w/v) te je inkubacija smjese trajala 6 min, a odmah nakon inkubacije dodano je 400 μL 1 M otopine NaOH i ultračiste vode do ukupnog volumena od 2 mL te je izmjerena apsorbancija pri 510 nm. Mjerenjem apsorbancije rastućih koncentracija otopina kvercetina u etanolu (0,1 – 2,5 mg/mL), izrađena je baždarna krivulja.

3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta

Antioksidacijska aktivnost uzoraka vodenog ekstrakta medvjete (u koncentraciji jednog i tri terapeutska napitka) i svih faza *in vitro* probave određena je spektrofotometrijski metodama DPPH•, FRAP i ABTS čiji princip je opisan u sljedećim poglavljima.

3.3.2.1. Metoda DPPH•

Metoda DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) ili metoda hvatanja slobodnih DPPH• radikala jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Temelji se na redukciji slobodnih DPPH• radikala antioksidansom odnosno antioksidans donira radikal atom vodika ili elektrona pri čemu se radikal reducira. Redukcijom radikala dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu koju detektiramo spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm. Metoda je prilagođena prema radu Brkanac i sur. (2015) pa je volumen od 25 μL uzorka pomiješan s 475 μL 0,1 mM otopine DPPH u etanolu. Provedena je inkubacija od 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 517 nm. Kontrolni uzorak pripremljen je na način da je umjesto uzorka korišteno otapalo. Mjerenjem apsorbancije rastućih koncentracija otopina Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina; 0,039 – 1,25 mM), izrađena je baždarna krivulja. Pretvorbom radikala DPPH• u neradikalni oblik uslijed reakcije s antioksidansom, dolazi do smanjenja apsorbancije. Smanjenje apsorbancije je proporcionalno aktivnosti zadanog antioksidansa te se iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije izračunat postotak inhibicije radikala DPPH•.

3.3.2.2. Metoda FRAP

Metoda FRAP (eng. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) temelji se na redukciji oksidansa (kompleks željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom – Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃) pomoću reducensa u redoks-kolorimetrijskoj reakciji (Benzie i Strain, 1999). Pri niskim vrijednostima pH, ioni Fe³⁺ se reduciraju do iona Fe²⁺ koji pokazuju maksimalnu apsorbanciju pri valnoj duljini od 593 nm. Volumen od 50 µL uzorka je pomiješan s 950 µL reagensa FRAP te je izmjerena apsorbancija nakon 4 min inkubacije. Kao standard korišten je FeSO₄ × 7 H₂O u koncentracijskom rasponu 100 – 1000 µmol/L. Rezultati su izraženi kao postotak redukcije Fe³⁺.

3.3.2.3. Metoda ABTS

U metodi ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), prilikom oksidacije otopine ABTS formira se plavo-zelena obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline. Dodatkom antioksidansâ dolazi do gubitka boje, a ta promjena se detektira pri valnoj duljini 736 nm. Volumen od 10 µL uzorka pomiješan je s 1 mL otopine radikala ABTS⁺ te je smjesa inkubirana 6 min prije mjerenja apsorbancije pri 736 nm (Re i sur., 1999). Neposredno prije izvođenja analize, pripremljena je radna otopina radikala ABTS⁺ razrjeđenjem prethodno pripremljene otopine ABTS-a i kalijevog peroksodisulfata (ABTS⁺) pomoću etanolom do apsorbancije 0,7 ± 0,02 mjerene pri valnoj duljini 734 nm uz pomoć spektrofotometra za mikrovolumene. Kontrolni uzorak pripremljen je uz pomoć otapala umjesto uzorka, a slijepa proba miješanjem 1 mL 96 %-tnog etanola i 10 µL otapala. Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina Trolox-a (0,039 – 1,25 mM), a rezultati su izraženi kao postotak inhibicije radikala ABTS.

3.3.3. Određivanje biološki aktivnih komponenti u ekstraktu – kvalitativna i kvantitativna analiza

Kvalitativna i kvantitativna analiza arbutina i hidrokinona (u ekstraktima i uzorcima *in vitro* probave) te njihova biodostupnost na staničnom modelu provedena je uz pomoć Shimadzu HPLC sustava s UV-VIS detektorom prema metodi iz rada Rychlińska i Nowak (2012) koju je bilo potrebno prethodno prilagoditi uzorcima i koloni korištenim u ovom radu.

Razdvajanje analiziranih spojeva provedeno je pomoću kolone LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) s predkolonom LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 s veličinom čestica 5 µm. U kolonu je injektirano 20 µL uzorka, a protok mobilne faze bio je 1 mL/min. Temperatura kolone bila je 25 °C, a koncentracija ispitivanih spojeva u uzorcima

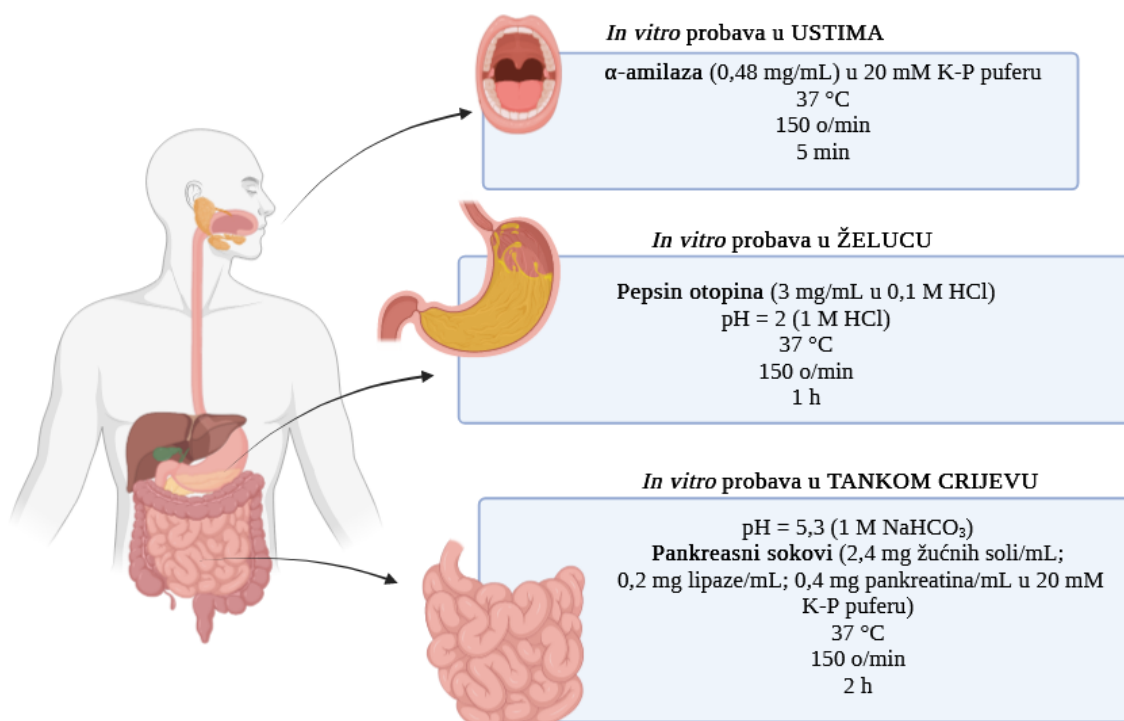
mjerena je UV-VIS detektorom pri valnoj duljini od 289 nm. Koncentracije arbutina i hidrokinona u uzorcima izračunate su pomoću jednadžbe baždarnog pravca poznatih koncentracija standardnih otopina istih spojeva, pomnožene s faktorom razrjeđenja i izražene u $\mu\text{g/mL}$. Za kalibraciju je korišteno šest serijskih razrjeđenja arbutina (raspon 0,0005 – 0,2 mg/mL) i hidrokinona (raspon 0,0005 – 0,2 mg/mL) u vodi. Mobilna faza je sadržavala 0,5 % vodenu otopinu octene kiseline (A) i 100 % metanol (B). Profil ispiranja: 0 – 2 min: 0 – 2 % metanola, 2,01 – 6 min: 15 % metanola, 6,01 – 8 min: 15 – 25 % metanola, 8,01 – 14 min: 70 % metanol, 14,01 – 20 min: 95 % metanol, 20,01 – 23 min: 2 – 0 % metanol (Huđek Turković i sur., 2022). Prije same HPLC analize, svi uzorci su centrifugirani tri puta ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\ 000 \times g$, 5 min; Hettich centrifuga). Koncentracije analiziranih uzoraka izračunate su pomoću softvera LC Solution (Shimadzu Corporation, Japan) iz kalibracijskih krivulja. Sve analize ponovljene su tri puta sa zasebno pripremljenim uzorcima.

3.4. *In vitro* probava

Model *in vitro* probave koji simulira ljudski probavni sustav uključujući usta, želudac i tanko crijevo koristio se za određivanje probavne stabilnosti biološki aktivnih spojeva arbutina i hidrokinona iz ekstrakta medvjete pomoću metode HPLC. Također se pratila promjena u antioksidacijskoj aktivnosti u različitim fazama probave pomoću metoda DPPH•, FRAP i ABTS. Nadalje, određeni su ukupni fenoli i flavonoidi spektrofotometrijskim metodama. Eksperimentalno dobivene koncentracije u kombinaciji s dostupnom literaturom korištene su u daljnjim eksperimentima na humanim staničnim linijama spomenutih sustava u uvjetima *in vitro* kao i u proteomskoj analizi.

Metoda *in vitro* probave provedena je prema protokolu iz rada Shim i sur. (2012). Inicijalnu fazu probave čine uzorci prethodno pripremljenih ekstrakata (jedna - terapijski napitak i dnevna doza koju čine tri terapijska napitka; 0,3 mL) u 20 mM kalij fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7$) ukupnog volumena 2 mL. Za fazu simulacije probave u ustima, u prethodno pripremljene ekstrakte medvjete (0,3 mL) dodano je 10 μL α -amilaze iz ljudske sline (0,48 mg/mL u 20 mM kalij fosfatnom puferu, $\text{pH} = 7$) i 0,3 mL kalij fosfatnog pufera. Uzorci su inkubirani u laboratorijskom inkubatoru 5 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i brzini trešnje 150 o/min. Želučana faza probave započinje dodatkom 0,4 mL pepsina izoliranog iz svinjskog želuca (3 mg/mL u 0,1 M HCl) i provjerom vrijednosti pH vrijednosti koja mora iznositi 2. Tako pripremljeni uzorci se inkubiraju 60 min u laboratorijskom inkubatoru na 150 o/min i pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za simulaciju probave u tankom crijevu, pH svakog uzorka neutralizira se na vrijednosti 5,3

pomoću 1 M otopine NaHCO_3 . Nadalje, u svaki uzorak dodaje se 0,9 mL pankreasnih sokova (žučne soli = 2,4 mg/mL, pankreatin = 0,4 mg/mL i svinjska lipaza = 0,2 mg/mL u 20 mM kalij fosfatnom puferu) i pH se podešava na vrijednost 7,0 pomoću otopine NaOH (1 M). *In vitro* probava po pojedinačnim fazama prikazana je na **slici 7**. Uzorci su nadopunjeni do 2 mL pomoću 20 mM kalij fosfatnog pufera i inkubirani pri 150 o/min i 37 °C tijekom 120 min. U kontrolnim uzorcima svake faze simulirane probave umjesto ekstrakta medvjjetke dodano je 0,3 mL ultračiste vode. Na kraju se supernatanti iz probave centrifugiraju ($20\,000 \times g$, 4°C, 10 min; Hettich centrifuga) i čuvaju na -20 °C do daljnjih analiza.

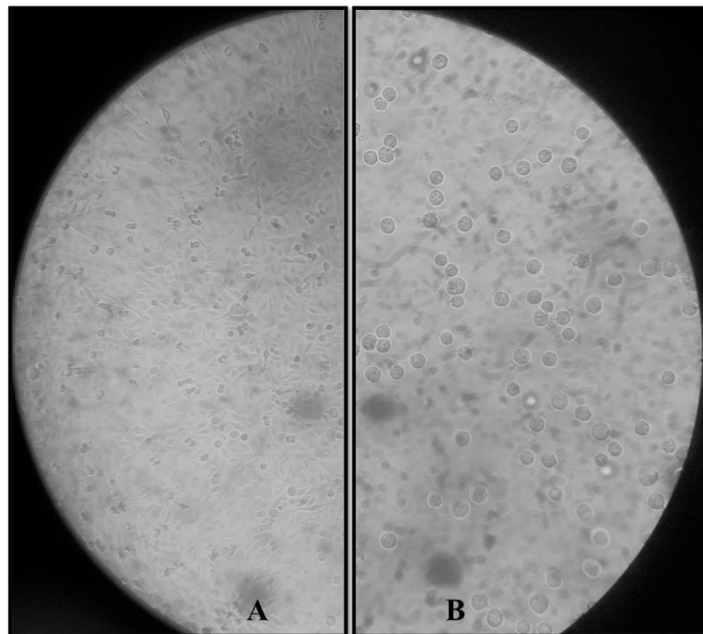


Slika 7. Uvjeti *in vitro* probave po fazama. K-P pufer predstavlja kalij-fosfatni pufer. Napravljeno pomoću BioRender.com.

3.5. Biološki učinci na humane tumorske stanične linije u uvjetima *in vitro*

3.5.1. Uzgoj staničnih linija

Stanične linije su čuvane na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u 10 % dimetilsulfoksidu (DMSO) koji služi kao krioprotektivno sredstvo. Kao priprema za eksperimente, stanice je bilo potrebno odmrznuti u vodenoj kupelji pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ te centrifugiranjem odvojiti talog sa stanicama od medija s DMSO-om u supernatantu. Talog je resuspendiran u 1 mL hranjivog medija te su stanice nasađene u T-bocice od 5 mL u koje je prethodno dodan medij za uzgoj. Za uzgoj stanica korišten je tekući hranjivi medij Ham's F-12 kompletiran pomoću fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal bovine serum*, FBS) u konačnoj koncentraciji kao 10 %-tna otopina. Stanice su uzgajane u T-bocama u monosloju do konfluentnosti u CO_2 inkubatoru (95 % zraka i 5 % CO_2) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Freshney, 2010). Kako bi se stanice nasadile u određenoj koncentraciji koju zahtijeva protokol eksperimenta, stanice su iz subkonfluentnog monosloja prevedene u suspenziju korištenjem 0,25 %-tne otopine tripsina u fosfatnom puferu (eng. *Phosphate Buffer Saline*, PBS) pripremljene iz komercijalno dostupne 2,5 %-tne otopine tripsina (**slika 8**). PBS je prije upotrebe steriliziran pri uvjetima temperature $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ i tlaka 1 bar, tijekom 15 min. Kako bi dobiveni rezultati bili ponovljivi i usporedivi s rezultatima drugih autora, bilo je potrebno utvrditi točan broj stanica.



Slika 8. Mikroskopska slika T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura: (A) subkonfluentna kultura i (B) pojedinačne stanice odvojene od podloge tripsinom (invertni mikroskop; povećanje: $250\times$; *vlastita fotografija*).

Broj stanica u uzorku određuje se pomoću Bürker-Türkove komorice i invertnog mikroskopa. Nakon tripsinizacije, 10 μ L uzorka stanica otpipetira se na komoricu koja se sastoji od 9 velikih kvadrata površine 1 mm². Svaki veliki kvadrat se sastoji od 16 malih kvadrata, a prostor između pokrovnog i predmetnog stakla je visine 0,1 mm. Broj stanica se određuje u četiri vanjska velika kvadrata, a konačnu koncentraciju stanica predstavlja srednja vrijednost stanica korigirana na volumen velikog kvadrata (0,1 mm³). Konačni rezultat izražava se kao broj stanica po 1 mL stanične suspenzije.

3.5.2. Određivanje biodostupnosti na staničnom modelu

Kako bi odredili kapacitet stanične apsorpcije bioaktivnih spojeva arbutina i hidrokinona iz ekstrakta medvjete prilikom oralne konzumacije, korištene su laringealne, kolorektalne i stanične linije mokraćnog mjehura (CAL 27, Caco-2, HepG2 i T24). CAL 27 i Caco-2 stanice tretirane su ekstraktom medvjete (jedan terapijski napitak), dok su druge stanične linije tretirane mješavinom arbutina i hidrokinona u koncentracijama koje su izmjerene nakon faze simulirane probave u ustima (CAL 27; arbutin = 121,62 mg, hidrokinon = 2,19 mg; izmjerene početne doze) i simulirane probave u tankom crijevu (CaCo-2, HepG2, T24; arbutin = 121,62 mg, hidrokinon = 3,62 mg). Metoda je provedena prema protokolu iz rada Lei i sur. (2011) uz određene modifikacije. Prije provedbe eksperimenta određivanja biodostupnosti, provjerena je stabilnost arbutina i hidrokinona u 10 % hranjivom mediju s FBS-om tijekom 2 h. Stanice su nasadene u mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji 10⁵ stanica/mL, a nakon postizanja konfluentnosti, hranjivi medij je uklonjen i stanice su isprane otopinom PBS-a (pH = 7,4). Stanice karcinoma debelog crijeva Caco-2, jetre HepG2 i mokraćnog mjehura T24 tretirane su prethodno navedenim koncentracijama uzoraka tijekom 2 h, a CAL 27 stanice karcinoma epitela jezika tijekom 30 min (procijenjeno vrijeme kontakta u stvarnim uvjetima ljudske probave) pri 37 °C. Kao kontrola korištena je testna otopina prije provedene apsorpcije od strane stanica (0 h). Koncentracije arbutina i hidrokinona u mediju prije i nakon tretmana na staničnim linijama u uvjetima *in vitro* određene su HPLC analizom pri uvjetima opisanim u prethodnom **poglavlju 3.3.3**. Rezultati su izraženi kao postotak stanične apsorpcije (%) u odnosu na kontrolni uzorak.

Za mjerenje biodostupnosti arbutina i hidrokinona te njihove apsorpcije od strane ispitivanih stanica probavnog sustava u uvjetima *in vitro*, uzorke je bilo potrebno pripremiti u hranjivom mediju za rast staničnih linija (10 % FBS-a). S obzirom na složen sastav hranjivog medija i seruma, uzorke smo pokušali pročistiti taloženjem proteina kako ne bi smetali u HPLC

analizi. Postupak pročišćavanja proveden je prema radu Poujol i sur. (2003) na način da je na 0,5 mL uzorka dodan 1 mL smjese metanola i ACN (1 : 1). Tako pripremljen uzorak je pomiješan vibromikserom u trajanju od 15 s i centrifugiran na $10\,000 \times g$ tijekom 4 min, te je postupak ponovljen dva puta. Prilikom analize supernatanta, uočeno je da ovaj način pročišćavanja nije učinkovit s obzirom da je uzorak prerazrijeđen i nije bilo moguće detektirati arbutina i hidrokinon. Uzorci su konačno analizirani bez pročišćavanja te je na taj način HPLC analiza uspješno provedena.

3.5.3. Biološka aktivnost hidrokinona i nitrofurantoina

Za određivanje citotoksičnog i pro(anti)oksidacijskog djelovanja ispitivanih uzoraka na stanice karcinoma probavnog sustava (CAL 27, AGS, Caco-2), jetre (HepG2) i mokraćnog mjehura (T24), bilo je potrebno stanice nasaditi u mikrotitarske pločice s 96 jažica na način da se u svaku jažicu otpipetira 100 μ L stanične suspenzije koncentracije 10^5 stanica/mL. Za test citotoksičnosti korištene su prozirne pločice, a za određivanje pro(antioksidacijskog) djelovanja crne pločice zbog propisanih protokola samih metoda koji će biti objašnjeni u sljedećim poglavljima. Nakon postizanja subkonfluentne kulture (24 h od nasađivanja), sa stanica je odstranjen hranjivi medij i one su tretirane prethodno pripremljenim koncentracijama ekstrakta medvjette, arbutina, hidrokinona, nitrofurantoina ili mješavine hidrokinona i nitrofurantoina u hranjivom mediju. Kao negativna kontrola korištene su stanice u hranjivom mediju bez testiranih spojeva. Svi tretmani provedeni su u minimalno 4 replike i 3 nezavisna eksperimenta. Također, istraživana je i utjecaj 24-satnog oporavka na preživljenje stanica na način da su stanice nakon provedenog tretmana ispitivanim spojem isprane PBS-om. Zatim je na stanice dodan svježiji hranjivi medij te je nastavljena inkubacija pri 37 °C tijekom 24 h.

Stanice karcinoma epitela jezika (CAL 27) tretirane su 15 min ekstraktom medvjette ($0,5 - 5\times$) i otopinom arbutina u hranjivom mediju u koncentracijama prethodno određenim u ekstraktu ($0,4 - 4$ mg/mL). Koncentracija $1\times$ ekstrakta (1 terapijski napitak) predstavlja 0,4 mg/mL arbutina. Stanice adenokarcinoma želuca (AGS) su tretirane 1 h također ekstraktom medvjette i otopinama arbutina u hranjivom mediju. Stanična linije adenokarcinoma debelog crijeva Caco-2 tretirana je u vremenu od 2 i 4 h, ekstraktom medvjette ($0,5 - 5\times$) i otopinom arbutina ($0,4 - 4$ mg/mL) u hranjivom mediju, dok su stanice hepatocelularni karcinoma HepG2 tretirane 1, 2 i 4 h otopinama arbutina ($0,4 - 4$ mg/mL) i nitrofurantoina ($0,167 - 0,67$ mg/mL). Budući da su u ovom istraživanju trebali biti provjereni uvjeti kakvi se postižu u osoba s urinarnim infekcijama, tretman T24 stanica mokraćnog mjehura proveden je 2, 4 i 8 h

hidrokinonom, nitrofurantoinom te njihovim kombinacijama. Vremena 2 i 4 h predstavljaju realne uvjete zadržavanja mokraće prilikom urinarnih infekcija dok je 8 h prosječno vrijeme spavanja.

Radne koncentracije hidrokinona korištene u ovom radu, definirane su na temelju dnevnih terapijskih doza ekstrakta medvjetke u suzbijanju simptoma urinarnih infekcija, a temelje se na jednoj do tri šalice terapijskog napitka. U sadržaju jedne šalice terapijskog napitka, pripremljene na prethodno opisani način, metodom HPLC određena je koncentracija hidrokinona od $14,6 \pm 0,319 \mu\text{g/mL}$. HPLC analizom ukupne koncentracije hidrokinona unutar dnevne doze (tri terapijska napitka) čaja određena je koncentracija od $37,22 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$. Pregledom literature utvrđeno je da se 41 % početne doze arbutina nalazi kao konjugati hidrokinona unutar urina 4 h nakon konzumacije 1 šalice terapijskog napitka, a slobodni hidrokinon koji se uklanja putem urina, čini 0,6 % početne doze arbutina u ekstraktu (Sieggers i sur., 1997; Glöckl i sur., 2001). Prema navedenim parametrima, u eksperimentima su korištene koncentracije hidrokinona od 5, 20, 50, 320 te 900 $\mu\text{g/mL}$ (**tablica 4**).

Tablica 4. Korištene koncentracije hidrokinona i njihov značaj.

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

S obzirom na nisku topljivost nitrofurantoina u vodi, ishodišna otopina nitrofurantoina najprije je pripravljena u DMSO-u (topljivost 25 mg/mL), a zatim su radne otopine pripravljene u hranjivom mediju. U ovom radu korištene su otopine nitrofurantoina koje odgovaraju profilaktičkoj dozi i dvjema terapijskim dozama preračunate na volumen mokraćnog mjehura čovjeka od 300 mL. Koncentracija koja odgovara profilaktičkoj dozi je 0,167 mg/mL urina dok su terapijske doze 0,33 mg/mL i 0,67 mg/mL urina. Udio DMSO-a u otopinama nitrofurantoina korištenim u ovom radu bila je u rasponu od 0,16 – 0,6 % (v/v). Prema tome, prije ispitivanja toksičnosti nitrofurantoina, provjerena je toksičnost 0,16 – 6 % otopina DMSO-a u hranjivom mediju.

Mješavine hidrokinona i nitrofurantoina pripravljene su kombinacijom svih pojedinačnih koncentracija spojeva u hranjivom mediju kako bi se ispitalo pokazuju li spojevi aditivno, sinergističko, antagonističko ili djelovanje bez očiglednog međusobnog utjecaja.

3.5.3.1. Test citotoksičnosti – metoda *Neutral Red*

Za utvrđivanje citotoksičnog učinka spojeva na humane stanične linije u uvjetima *in vitro* opisane u **poglavlju 3.2.1.**, korištena je metoda *Neutral Red*. Radi se o 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid boji koja kroz membranu stanica prolazi neionskom difuzijom te se veže na lizosomski matriks stanica. Ulazak boje u stanicu ovisi o sposobnosti stanice da održava pH gradijent stvaranjem ATP-a pri čemu fiziološki pH omogućava boji da prođe kroz staničnu membranu. Kada se boja nađe u citoplazmi stanice, pH gradijent joj omogućava daljnji prodor prema lizosomu gdje je vrijednost pH niža u usporedbi s citoplazmom. Unutar lizosoma boja biva nabijena te se tu i zadržava (Repetto i sur., 2008).

Nakon tretmana stanica ispitivanim koncentracijama uzoraka, stanice se ispiru PBS-om te se na njih stavlja otopina boje *Neutral Red* u hranjivom mediju (0,05 mg/mL) na način da se u svaku jažicu mikrotitrantske pločice otpipetira 100 μ L radne otopine boje te se pločica stavlja u CO₂ inkubator pri 37 °C tijekom 2 h. Radna otopina boje *Neutral Red* priprema se miješanjem koncentrirane otopine boje *Neutral Red* u etanolu (5 mg/mL) i kompletiranog hranjivog medija. Nakon ispiranja obojenih stanica PBS-om da se ukloni višak boje *Neutral Red*, dodaje se otopina za odbojavanje u kojoj se otapa samo boja koju su vijabilne stanice apsorbirale. Kvantifikacija vijabilnih stanica vrši se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 540 nm. Mrtve ili stanice s oštećenom staničnom membranom ne mogu zadržati boju *Neutral Red* te je stoga intenzitet obojenja linearno proporcionalan s koncentracijom vijabilnih stanica (Babich i Borenfreund, 1991). Postotak preživljenja stanica računa se u odnosu na negativnu kontrolu

pomoću formule: $\% \text{ preživljenja} = (A_{540} \text{ tretiranog uzorka} / A_{540} \text{ kontrole}) \times 100$ gdje A_{kontrola} označava srednju vrijednost apsorbancije u kontrolnim stanicama, a $A_{\text{tretiranog uzorka}}$ označava srednju vrijednost apsorbancije u tretiranim stanicama (stanice izložene djelovanju ispitivanih ekstrakta, spojeva i mješavine spojeva). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti postotka preživljenja s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistička obrada podataka opisana je u **poglavlju 3.8.**

3.5.3.2. Određivanje pro(anti)oksidacijskog djelovanja – metoda DCFH-DA

Za određivanje nastalih reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) unutar stanice korištena je metoda DCFH-DA (2',7'-diklorfluorescein diacetat). DCFH-DA je nefluorescentna i nepolarna boja koja difuzijom ulazi u citoplazmu stanice gdje dolazi do hidrolize acetatnih skupina boje od strane staničnih esteraza. Pri tome se oslobađa DCFH (2',7'-diklorfluorescein) čije vezanje na ROS-ove rezultira pojavom fluorescencije (Hempel i sur., 1999).

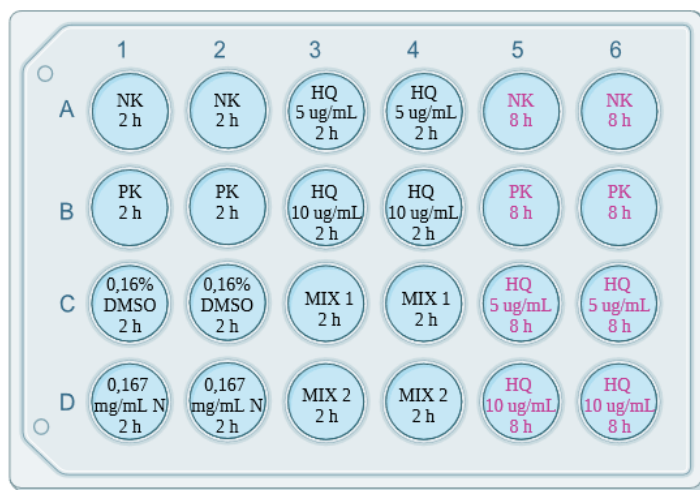
Nakon tretmana stanica ispitivanim uzorcima, slijedi ispiranje PBS-om te se na njih dodaje volumen od 100 μL boje DCFH-DA u PBS-u (0,05 mM) korištene direktno na stanicama tijekom 15 min u CO_2 inkubatoru pri 37 °C. Intenzitet fluorescencije mjeri se pri valnoj duljini emisije od 485 nm i ekscitacije 530 nm, a proporcionalan je količini ROS-ova u stanici. Indukcija slobodnih radikala izražava se kao % ROS-ova u odnosu na kontrolu uz korekciju preživljenja stanica u pojedinom tretmanu. Statistička obrada podataka opisana je u **poglavlju 3.8.**

3.5.3.3. Određivanje genotoksičnog učinka – Mikronukleus test sa zaustavljenom citokinezom u tzv. cytome inačici

Mikronukleus test predstavlja standardni test za procjenu genotoksičnosti te se koristi za mjerenje oštećenja pogrešnog popravka DNA, mitotičkih nepravilnosti, nestabilnosti kromosoma, apoptoze, nekroze, citostaze i nerazdvajanja kromosoma. Između nekoliko poznatih vrsta mikronukleus testa, najčešće se primjenjuje test sa zaustavljenom citokinezom u tzv. *cytome* inačici (eng. *Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome assay*, CBMN cyt) koja dovodi do nastajanja binuklearnih stanica u kojima se mogu analizirati mikronukleusi. Kao agens za zaustavljanje citokineze koristi se citohalazin B, inhibitor polimerizacije aktina potrebnog za stvaranje mikrofilamentnoga prstena koji sužava citoplazmu između jezgara stanica kćeri tijekom citokineze (Cheong i sur., 2013). Pod svjetlosnim mikroskopom, mikronukleus u interfazi izgleda kao dodatna jezgra stanice, ali je puno manji i odvojen od

glavne jezge ($1/16 - 1/3$ promjera glavne jezgre). Osim mikronukleusa, u binuklearnim stanicama mogu nastati i druge morfološke promjene poput nukleoplazmatskih mostova (eng. *Nucleoplasmic Bridges*, NPB) i pupova jezgre (eng. *Nuclear Buds*, NB). Pupovi se razlikuju od mikronukleusa po tome što su povezani s jezgrom pomoću uske ili široke linije nukleoplazmatskog materijala. S druge strane, nukleoplazmatski mostovi su nukleoplazmatska veza između dvije jezgre unutar binuklearne stanice čija širina obično ne prelazi četvrtinu promjera jezgre stanice. Indeks diobe jezgara (eng. *Nuclear Division Index*, NDI) je pokazatelj proliferacije stanica te se zbog toga smatra mjerom citotoksičnosti. Vrijednost NDI = 1,0 se smatra najnižom i pokazatelj je da nije došlo do podjele stanica tijekom zaustavljanja citokineze te takve stanice ostaju mononuklearne. Maksimalna vrijednost NDI-a je 2,0 i označava da su sve stanice u staničnoj kulturi završile jednu diobu te su binuklearne (Ionescu i sur., 2011). Učestalost stanica s jednom, dvije, tri ili više glavnih jezgri može se upotrebljavati za opisivanje napretka staničnog ciklusa nakon stimulacije mitogenom, a podatak o tome vidljiv je iz vrijednosti NDI. Mikronukleus *cytome* test dodatno mjeri proliferaciju stanica u uvjetima *in vitro* uz pomoć proliferacijskog indeksa u stanicama sa zaustavljenom citokinezom (eng. *Cytokinesis-Block Proliferation Index*, CBPI) (Lorge i sur., 2008; OECD/OCDE, 2016).

Za provedbu mikronukleus *cytome* testa bilo je potrebno T24 staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura nasaditi u mikrotitarsku pločicu s 24 jažice u koncentraciji 10^4 stanica/mL. Na dno jažica mikrotitarske pločice su prije nasađivanja stanica u sterilnim uvjetima položena okrugla predmetna stakalca ($2r = 14$ mm). Stakalca su prije upotrebe oprana u 70 %-tnom etanolu i sterilizirana (121 °C, 1 bar, 15 min). Mikronukleus *cytome* test proveden je prema protokolu Savio i sur. (2014) s određenim modifikacijama. Nakon 24 h uzgoja u mikrotitarskim pločicama na okruglim predmetnim stakalcima, T24 stanice su tretirane doksorubicinom kao pozitivnom kontrolom ($0,4$ µg/mL), nitrofurantinom ($0,167$ mg/mL), 0,16 %-tnom otopinom DMSO-a, hidrokinonom (5 i 10 µg/mL) i smjesom nitrofurantoina i hidrokinona u kombinacijama prikazanim na **slici 9** tijekom 2 i 8 h. Radne otopine svih testiranih spojeva pripremljene su u hranjivom mediju za stanični uzgoj bez dodatka seruma.



Slika 9. Shema tretmana stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (T24) u mikrotitarskoj pločici s 24 jažice za provedbu mikronukleus testa sa zaustavljenom citokinezom u tzv. *cytome* inačici (mikronukleus *cytome* test). NK – negativna kontrola; PK – pozitivna kontrola (0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doksorubicina); MIX 1 – 0,167 mg/mL nitrofurantoina i 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hidrokinona; MIX 2 - 0,167 mg/mL nitrofurantoina i 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hidrokinona. Napravljeno pomoću BioRender.com.

Nakon provedenog tretmana, stanice su isprane PBS-om (0,5 mL) te je na stanice stavljena otopina citohalazina B (eng. *Cytochalasin B* iz *Drechslera dematioidea*, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pripremljena u hranjivom mediju s dodatkom FBS-a (10 %). Stanice su kultivirane u mediju s dodanim citohalazinom B ukupno 24 h, uključujući i vrijeme tretmana ispitivanim spojevima, nakon čega su isprane PBS-om te inkubirane u fiziološkoj otopini (0,9 % NaCl) pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min. Fiksiranje stanica na pokrovna stakalca provedena je dodatkom smjese za fiksiranje (1 : 3 = octena kiselina : metanol) tijekom 5 min. Ukoliko smjesa za fiksiranje ne ispari u predviđenom vremenu inkubacije, višak se uklanja te se stakalca suše u digestoru. Bojenje je provedeno dodatkom 5 %-tne otopina Giemsa boje (eng. *Giemsa's Azur Eosin Methylene Blue Solution*) u vremenu od 15 min. Radna otopina Giemsa boje pripremljena je u vodovodnoj vodi i profiltrirana kroz Whatman filter papir s porama od 20 – 25 μm (razred 4, Sigma-Aldrich, Njemačka). Boja je sa stanica isprana ultračistom vodom, a stakalca s fiksnim i obojanim stanicama izvađena su iz jažica i osušena u digestoru te zalijepljena na predmetna stakalca sa stanicama u „sendviču“ između pokrovnog i predmetnog stakla. Prije analize pripremljenih preparata pomoću svjetlosnog mikroskopa, potrebno je 1 – 2 h da se ljepilo osuši. Na povećanju 100 – 400 \times određuje se ima li dovoljno binuklearnih stanica s očuvanom citoplazmom za analizu. Promjenom objektiva za veća povećanja (1000 \times) uz

dodatak imerzijskog ulja analiziraju se preparati sa stanicama pogodnim za analizu. Na svakom stakalcu analizira se 1000 binuklearnih stanica te se određuje proliferacijski indeks. Formula za izračun proliferacijskog indeksa (eng. *Cytokinesis Block Proliferation Index*, CBPI) preuzeta je iz rada Gonzalez i sur. (2011), gdje $CBPI = 1$ ekvivalentno odgovara 100 %-tnom učinku citotoksičnosti. Napravljena su 3 zasebna eksperimenta s po dva paralelna uzorka za svaki tretman.

3.5.3.4. Utvrđivanje zaštitnog učinka na molekulu DNA uslijed oštećenja uzrokovanih djelovanjem reaktivnih kisikovih radikala

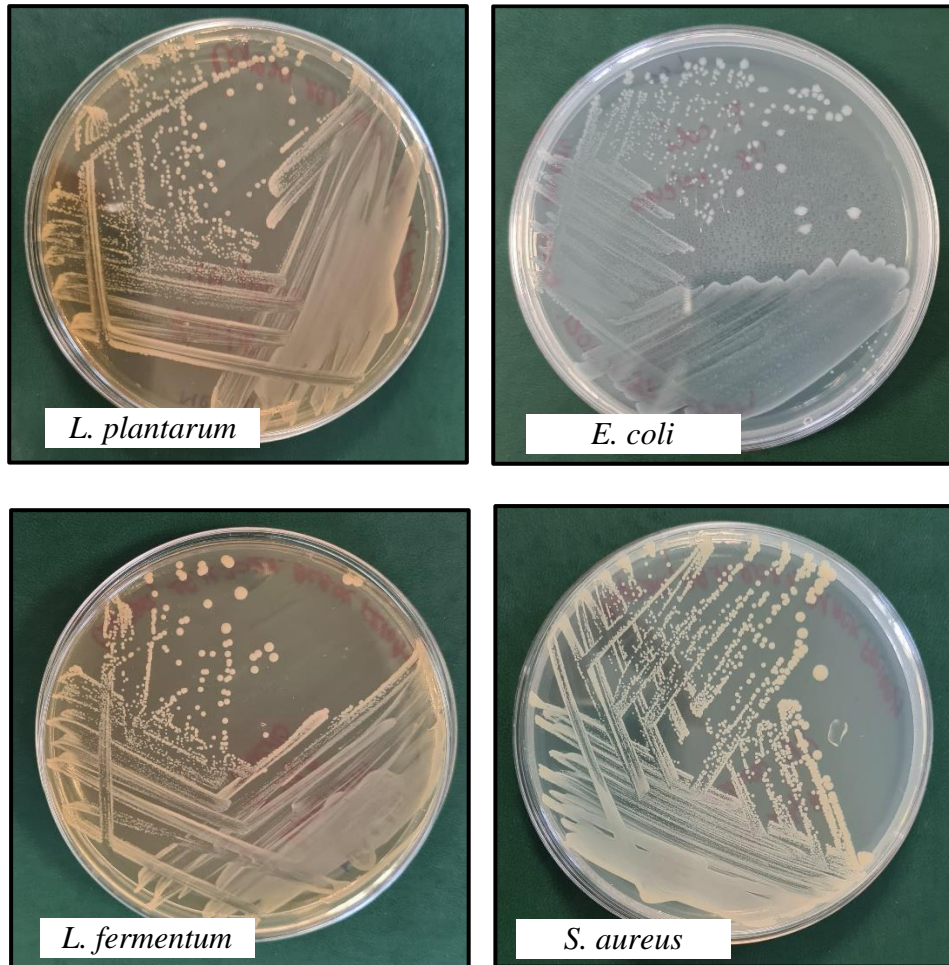
Ova metoda temelji se na namjerno izazvanom oštećenju cirkularne DNA (plazmida) kombinacijom UV zračenja i vodikovog peroksida (H_2O_2) u uzorcima sa i bez dodatka ekstrakta medvjete, arbutina, hidrokinona, nitrofuranotina te smjese hidrokinona i nitrofuranotina. Eksperiment je napravljen na modelu $\phi X174$ RF1 plazmida DNA. Prilikom izloženosti plazmida kombinaciji H_2O_2 i UV zračenja dolazi do stvaranja hidroksilnog radikala koji razmotava plazmidnu DNA te ona prelazi iz superzavijene u relaksiranu formu. Takva promjena se može pratiti metodom elektorforeze u agaroznom gelu. Metoda je provedena prema protokolu iz rada Keum i sur. (2000) uz male modifikacije. Reakcijska smjesa (20 μL) sastojala se od $1\times$ TE (Tris-EDTA) pufera, $\phi X174$ RF1 plazmida DNA (0,3 μg), H_2O_2 (0,03 M) i finalne koncentracije ekstrakta medvjete (0,5 – $5\times$), arbutina (0,4 – 4 mg/mL), hidrokinona (5 – 900 $\mu g/mL$), nitrofuranotina (0,167 mg/mL i 0,33 mg/mL; profilaktička i terapijska doza) te smjesa hidrokinona (5, 20 i 50 $\mu g/mL$) i nitrofuranotina (0,167 mg/mL i 0,33 mg/mL) opisanih u **poglavlju 3.5.3**. Koncentracije istraživanih spojeva i smjesa podešene su na ukupni volumen reakcijske smjese. Uzorci su izloženi UV zračenju tijekom 5 min, na udaljenosti 50 cm, a vrijeme izlaganja UV zračenju (germicidna UV lampa, 30 W, Philips, Nizozemska) određeno je prethodnom optimizacijom. Nakon 30 min inkubacije pri sobnoj temperaturi u svaki uzorak dodan je 1 μL pufera za nanošenje uzoraka na gel (eng. *loading buffer*, $6\times$ koncentrirani), a produkti su provjereni elektroforezom u agaroznom gelu (1 %, pripremljen u $1\times$ TAE (eng. *Tris-acetate-EDTA*) puferu) te vizualizirani transiluminatorom nakon bojanja u otopini etidijevog bromida (0,5 $\mu g/mL$). Gel elektroforeza uzoraka provedena je pri 60 V tijekom 2 h. Rezultati dobiveni u obliku slike gela obrađeni su u programu GelAnalyzer 19.1. i izraženi kao omjer površine vrpce superzavijene i relaksirane forme plazmida te statistički obrađeni u odnosu na kontrolni uzorak (samo plazmid). U aslučaju zaštitnog učinka na DNA, otvaranje DNA plazmida će biti spriječeno, a rezultati se neće razlikovati od negativne kontrole.

3.6. Antimikrobno djelovanje

3.6.1. Uzgoj bakterijskih kultura

Za uzgoj bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* korištene su kompletne tekuće LB (Luria-Bertani) hranjive podloge, a MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) selektivna tekuća hranjive podloga korištena je za rast bakterija *Lactiplantibacillus plantarum* i *Lactiplantibacillus fermentum*. MRS hranjiva podloga je namijenjena povoljnom rastu laktobacila, a sadrži i natrijev acetat koji inhibira rast mnogih drugih bakterija. Kao krute hranjive selektivne podloge u ovom radu, korištene su M9-minimalna podloga s laktozom (*E. coli*) i MRS podloga s nalidiksinskom kiselinom za uzgoj bakterija mliječne kiseline (*L. plantarum* i *L. fermentum*). Podloge su pripravljene prema uputama proizvođača i prije korištenja sterilizirane u autoklavu pri temperaturi 121 °C i tlaku 1 bar tijekom 15 min. Krute podloge dobivene su dodatkom 15 g/L agaru prije postupka sterilizacije.

U sklopu ovog rada napravljene su krivulje rasta za svaku od bakterijskih kultura te je određeno optimalno vrijeme uzgoja u kojem bakterije postižu eksponencijalnu fazu rasta. Uzorci bakterija spremljeni u glicerolu (15 %) na -80 °C su odmrznuti te je 10 µL suspenzije naciepljeno na krute hranjive podloge metodom iscrpljenja (eng. *streaking*) i uzgajano u inkubatoru pri 37 °C (**slika 10**). Nakon 24 h, jedna porasla kolonija sa krute hranjive podloge naciepljena je u 20 mL tekućeg hranjivog medija te je svakih 1 h tijekom 24 h izuziman uzorak kako bi se odredio broj stanica. Za određivanje broja bakterijskih stanica u ovisnosti o vremenu korištena je metoda decimalnih razrjeđenja u mikrovolumenima na način da su naciepljivana odgovarajuća razrjeđenja u rasponu od 10^{-1} – 10^{-6} na krute hranjive podloge. Obradom dobivenih eksperimentalnih podataka nacrtane su krivulje rasta za svaku bakterijsku kulturu zasebno te je određeno optimalno vrijeme uzgoja bakterija u postavljenim uvjetima za daljnje eksperimente u radu. Bakterije *L. plantarum* i *L. fermentum* uzgajane su u anaerobnim uvjetima dok su bakterije *E. coli* i *S. aureus* rasle u aerobnim uvjetima.



Slika 10. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu nasadeni metodom iscrpljenja (eng. *streaking*) na krute hranjive podloge (*vlastita fotografija*).

3.6.2. Ispitivanje toksičnosti na bakterijskim kulturama

Bakterijske kulture korištene u ovom radu uzgojene su do eksponencijalne faze rasta određene prema krivuljama rasta. Istraživana je toksičnost ekstrakta medvjete (0,5 – 5×) i arbutina (0,4 – 4 mg/mL) na predstavnike mikrobiote probavnog sustava *L. fermentum*, *L. plantarum*, *S. aureus* i *E. coli* tijekom 1 h tretmana, a hidrokinona (5 – 900 µg/mL; 1, 2 i 4 h tretman) i nitrofurantoina (0,167 – 0,67 mg/mL; 2 i 4 h tretman) na uropatogenu *E. coli* s obzirom na njihovo ciljno mjesto djelovanja – mokraćni mjehur.

Ukupni volumen testiranog uzorka i bakterijske kulture iznosio je 200 µL u hranjivom mediju, a tretman je trajao ovisno o testiranom uzorku pri 37°C. Nakon provedenog tretmana, iz uzoraka su pripremljena decimalna razrjeđenja u mikrovolumenima te nasadena na krute selektivne hranjive podloge. Nacijepljene podloge uzgajane su u inkubatoru 24 ili 48 h pri 37 °C. Metoda je provedena u dvije replike za svaki uzorak u 3 zasebna eksperimenta. Rezultati

su izraženi kao % preživljenja bakterija nakon tretmana u odnosu na kontrolni uzorak samih bakterija u hranjivom mediju (100 % preživljenje) (da Silva i sur., 2019). Kao pozitivna kontrola korišten je antibiotik gentamicin tijekom 30 min tretmana (1 mg).

3.6.3. Utjecaj ekstrakta na promjenu adhezije bakterija za humane stanice

Kako bi utvrdili utjecaj ispitivanih spojeva na adheziju bakterija za humane stanice karcinoma epitela jezika CAL 27 i karcinoma debelog crijeva Caco-2, korištene su netoksične koncentracije testiranih spojeva (preživljenje nakon tretmana > 80 % u odnosu na negativnu kontrolu). Bakterijske kulture uzgojene su do eksponencijalne faze rasta, a stanične suspenzije su nasadene u mikrotitarske pločice s 24 jažice u koncentraciji 10^5 stanica/mL te uzgajane do subkonfluentnosti u CO₂ inkubatoru pri 37 °C. CAL 27 stanice su tretirane ispitivanim uzorcima 15 min, a Caco-2 tijekom 2 h. U međuvremenu, bakterijske kulture su centrifugirane i 2 puta isprane PBS-om te je pripravljena bakterijska kultura u hranjivom mediju za uzgoj staničnih linija optičke gustoće 0,2 – 0,3 (OD₆₀₀, eng. *optical density*). Nakon tretmana od 15 min odnosno 2 h, na stanične kulture dodano je 0,5 mL pripravljene bakterijske suspenzije. Tretman je trajao 30 min pri 37 °C te su nakon toga bakterijske stanice isprane PBS-om i na stanične kulture dodano je 100 µL Triton X-100 otopine u PBS-u (0,01 %) te je provedena inkubacija 15 min pri 37 °C. Uzorci su dobro resuspendirani te su pripravljena decimalna razrjeđenja u mikrovolumenima i nasadjeni na krute hranjive podloge. Nakon 24 h uzgoja, porasle bakterijske kolonije su izbrojane te su rezultati izraženi kao % adhezije u odnosu na netretirane kontrolne stanice (100 % adheriranih stanica) (Cravioto i sur., 1991).

3.7. Proteomska analiza

Analiza proteina provedena je na modelu stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 prvotno nakon tretmana hidrokinonom u koncentracijama 20 µg/mL i 320 µg/mL tijekom 2 h. Nakon toga, produženo je vrijeme tretmana na 8 h te su stanice tretirane nitrofurantinom u koncentraciji 0,167 mg/mL, hidrokinonom u koncentraciji 20 µg/mL i smjesom istih koncentracija nitrofurantina i hidrokinona. Koncentracije za tretman odabrane su nakon analize citotoksičnog i prooksidacijskog/antioksidacijskog djelovanja ispitivanih spojeva na T24 staničnu kulturu. Konačni rezultati dobiveni su obradom podataka minimalno dva paralelna uzorka iz tri zasebna eksperimenta.

3.7.1. Uzgoj stanica

Stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 uzgojene su u T-bocama na način opisan u **poglavlju 3.5.1**. Nakon toga, stanice su tripsinizirane te nasadene u plastične sterilne Petrijeve zdjelice za uzgoj staničnih kultura u koncentraciji 10^5 stanica/mL i volumenu 10 mL. Stanice su uzgajane u CO₂ inkubatoru tijekom 24 h do subkonfluentnosti te su nakon toga tretirane prethodno opisanim otopinama hidrokinona i nitrofurantina. Nakon tretmana, stanice su isprane PBS-om te su mehanički odvojene od dna pomoću gumene strugalice (eng. *Policeman, cell scraper*; Sarstedt, Njemačka) i premještene u mikroepruvete. Stanice su centrifugirane pri brzini $< 1000 \times g$ kako bi se spriječila preuranjena liza stanica te su dva puta isprane u PBS-u. Nakon ispiranja, na talog je stavljeno 5 volumena pufera za lizu (1 % natrij dodecil-sulfata; eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) u 100 mM trietil amonijevom bikarbonat-u (TEAB). Na primjer, ukoliko je bilo 20 µL taloga, na njega je stavljeno 100 µL 1 % SDS-a. Tako pripremljeni uzorci pohranjeni su na -20 °C do analize.

3.7.2. Izolacija proteina i priprema uzorka za analizu

Stanice su homogenizirane na ledu korištenjem ultrazvučnog homogenizatora na amplitudi od 30 % i ponovljenim ciklusima tijekom 3 min: 10 s homogeniziranje s naizmjeničnom pauzom od 20 s. Nakon homogenizacije, uzorci su centrifugirani ($10000 \times g$, 10 min, 4 °C). U supernatantu je određena koncentracija proteina pomoću metode po Brädfordu. Prema ovoj metodi, koncentracija proteina određuje se iz formule baždarnog pravac napravljenog iz otopina proteinskog standarda BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) koncentracija 1 – 10 µg/mL. Otopine su nadopunjene ultračistom vodom do ukupnog volumena 200 µL te je naknadno dodano 2 mL Brädfordovog reagensa. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 595 nm.

Prema izmjerenim koncentracijama proteina, svi uzorci su podešeni na 100 µg proteina u 100 µL 100 mM TEAB (1 mg/mL). Dodano je 5 µL 200 mM TCEP-a te su uzorci inkubirani 1 h pri temperaturi od 55 °C. Nakon inkubacije u uzorke je dodano 5 µL 375 mM jodoacetamida te su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 30 min zaštićeni od svjetla. U sadašnjih 110 µL uzorka dodano je 6 volumena (660 µL) acetona te su proteini taloženi preko noći pri temperaturi od -20 °C. Sljedeći dan, uzorci su centrifugirani pri 4 °C, 8000 × g, 10 min te je supernatant odbačen, a talog je ostavljen da se potpuno osuši. Talog je resuspendiran u 100 µL 50 mM TEAB te je u svaki uzorak dodano po 2,5 µL tripsina (1 mg/ml). Tripsinoliza je provedena preko noći na miješalici s temperaturnom kontrolom od 37 °C. Prekonoćni uzorci su centrifugirani pri brzini 10000 × g, 10 min.

3.7.3. Analiza proteina nakon tretmana hidrokinonom od 2 h

Neciljana analiza

Neciljana analiza proteina provodi se sa svrhom određivanja proteina koji se u ispitivanim uzorcima razlikuju, a ciljana analiza u svrhu kvantifikacije te razlike. Označavanje proteina provedeno je prema protokolu TMTduplex reagensa za označavanje peptidnih uzoraka. Kontrolni uzorak obilježen je TMT 127 probom, a uzorak sa tretiranim stanicama hidrokinonom bez oporavka tijekom 2 h obilježen je probom TMT 126.

Frakcioniranje peptida provedeno je tekućinskom kromatografijom u dva koraka kao što je opisano u radu (Dekić Rozman i sur., 2021). Prvi korak proveden je korištenjem 1260 Infinity HPLC sustava spojenog na kolektor frakcija pomoću UHPLC (eng. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*) kolone Aeris™ 1,7 µm, PEPTIDE XB-C₁₈ 10 LC Column, 150×2,1 mm (Phenomenex, SAD). Sastav mobilnih faza bio je (A) 95 % 20 mM amonijevog formijata (pH = 8,5) i 5 % acetonitrila (v/v) te (B) 5 % 20 mM amonijevog formijata (pH = 8,5) i 95 % acetonitrila (v/v). Profil eluiranja: 0 – 2 min: 2 % B; 2–17 min: 2 – 75 % B; 17 – 27 min: 75% B; 27,1 min: 2 % B sve do 35 min. Volumen injektiranja uzorka u sustav bio je 50 µL, a brzina protoka mobilne faze 0,25 mL/min. Analiza je provedena pri valnoj duljini 215 i 280 nm i temperaturi kolone od 40 °C. Frakcije su skupljane u intervalima od 1,5 min i sušene u struji dušika, a zatim otopljene u 20 µL 0,1 %-tne otopine trifluoroctene kiseline (TFA) i prenesene u mikrovijale.

Ovako pripremljeni uzorci su korišteni za drugi korak frakcioniranja pomoću NanoLC sustava uz UV/VIS detektor direktno spregnut sa sakupljačem frakcija. Navedeni sustav sadrži pokretni ventil s 10 otvora što omogućava istovremeno korištenje dvije različite kolone. U

ovom koraku korištene su kolona za pročišćavanje peptida te kolona za razdvajanje. Kolona za pročišćavanje peptida bila je Acclaim PepMap 100 C18, 5 μm , 100 \AA , 300 μm i.d. \times 5 mm (Thermo Fisher Scientific, SAD) s uvjetima pročišćavanja navedenim u **tablici 5**.

Tablica 5. Uvjeti pročišćavanja peptida.

Mobilna faza A	0,1 %-tna vodena otopina TFA (v/v)
Mobilna faza B	acetonitril
Volumen injektiranja	1 μL
Temperiranje predkolone	40°C
Ispiranje kolone	izokratno, A/B = 98/2 (v/v), 5 min
Protok	10 $\mu\text{L}/\text{min}$

Za razdvajanje peptida korištena je kolona Acclaim PepMap 100 C18, 3 μm , 100 \AA , 75 μm i.d. \times 15 cm (Thermo Fisher Scientific, SAD). Sastav mobilne faze za razdvajanje peptida bio je: (A) 97,9 % vode/0,1 % TFA/2 % ACN (v/v/v), (B) 98 % ACN/0,1 % TFA/1,9 % voda (v/v/v), a profil eluiranja: 0 – 10 min: 5 % B, 10 – 58 min: 5 – 90 % B, 58 – 63 min 90 % B i zatim ekvilibracija na 5 % B do 75 min. Korišten je gradijentni protok od 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$, temperatura kolone 40 °C te UV-VIS detektor pri valnoj duljini 215 nm. Separirane frakcije peptida sakupljene su uz pomoć sakupljača frakcija direktno na MALDI pločicu MTP AnchorChip 384 (Bruker, Njemačka) prema parametrima navedenim u **tablici 6**.

Tablica 6. Parametri podešeni za sakupljanje frakcija peptida na MALDI pločicu.

Matrica	1,4 mg α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 1 mL ACN (50 % vodena otopina)
Protok matrice	100 $\mu\text{L}/\text{h}$
Vrijeme sakupljanja frakcija	15 – 63 min
Vrijeme sakupljanja /frakcija	15 s
Ukupan broj sakupljenih frakcija	192

Spektri mase su dobiveni analizom MALDI/TOF-TOF spektrometrom masa u rasponu mase m/z 700 – 4000 Da i akumulaciji od 1000 snimaka/spektra. Prekursori za MS/MS analizu odabrani su pomoću sljedećih kriterija: 10 kao minimalni omjer signala i šuma (S/N), 100 ppm maksimalne tolerancije mase peptida unutar različitih frakcija i 5,0 Da kao minimalna razlika u masi između peptida koji koeluiraju. Nakon snimanja MS i MS/MS spektara dobiveni podaci

korišteni su za pretragu baze podataka. Proteini su identificirani koristeći softver ProteinScape verzija 3.0 (Bruker, Njemačka) s tražilicom MASCOT. Podaci dobiveni MS i MS/MS analizama kombinirani su prilikom pretrage baze kako bi se identificirali proteini prema parametrima pretraživanja baze podataka prikazanim u **tablici 7**.

Tablica 7. Parametri korišteni u pretraživanju baze podataka.

Baza podataka	SwissProt
Taksonomija	<i>Homo sapiens</i>
Pretraživač	MASCOT
Enzim	tripsin, 1 preskočeno cijepanje
Varijabilne modifikacije	TMTduplex, oksidacija metionina i deaminacija asparagina i glutamina
Tolerancija mase prekursora	50 ppm
Tolerancija mase fragmentnih iona	0,7 Da

Ciljana analiza

Ciljana analiza obuhvaća MS analizu na razini fragmentnih peptidnih iona. Za relativnu kvantifikaciju proteina kreirana je metoda za praćenje višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) pomoću Skyline verzije 4.2.0.19072 (MacLean i sur., 2010). Iz UniProt baze podatak preuzete su sekvence ciljanih proteina u FASTA (eng. *Fast-All*) zapisu i unesene u Skyline program. Informacija o preteomu s cijelim setom proteina koji mogu biti dio matriksa uzorka dobiveni su postavljanjem pozadinskog proteoma. Za razvoj metode i analizu uzoraka korišten je 6460 TripleQuad LC/MS sustav opremljen ESI izvorom ionizacije kao što je opisano u radu Dekić Rozman i sur. (2021). MS je radio u načinu pozitivne ionizaciju elektroraspršivanjem. Korištena je kolona Aerisu PEPTIDE XB-C18 1,7 μ m, 150 mm \times 2,1 mm (Phenomenex, Torrance, SAD), a protok je podešen na konstantnu brzinu od 0,3 mL/min. Mobilnu fazu činila je 0,1 % mravlja kiselina u vodi (v/v) (A) i 0,1 % mravlja kiselina u ACN (v/v), a profil eluiranja je prikazan u **tablici 8**. Volumen injektiranja je bio 5 μ L, a parametri MS analize, odnosno postavke ionskog izvora navedeni su u **tablici 9**. Spektri masa su analizirani pomoću softvera Agilent MassHunter Workstation. MRM tranzicijska lista korištena za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju ciljanih proteina nalazi se u **Prilogu 1**.

Tablica 8. Gradijentni profil eluiranja peptida prilikom ciljane analize proteina.

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

Tablica 9. Parametri ionskog izvora.

Detekcija iona	pozitivna
Temperatura plina (°C)	300
Protok plina (L/min)	7
Tlak nebulizera (psi)	40
Temperatura pomoćnog plina (eng. <i>Sheath gas</i>) (°C)	300
Protok pomoćnog plina (L/min)	9
Napon na kapilari (kV)	3,5

3.7.4. Analiza proteina nakon tretmana hidrokinon i nitrofurantoinom od 8 h

Označavanje proteina provedeno je prema protokolu TMTsixplex reagensa za označavanje peptidnih uzoraka. Kontrolni uzorak obilježen je TMT 126 probom, a uzorci tretirani hidrokinonom, nitrofurantoinom te smjesom hidrokinona i nitrofurantoina TMT 127-129 probama.

Uz pomoć instrumenta SCIEX TripleTOF 6600+ system provedena je separacija peptida i spektrometrija masa. Parametri tekućinske kromatografije (LC) navedeni su u **tablici 10**, a parametri provedene analize spektrometrijom masa u **tablici 11**.

Tablica 10. Parametri korišteni za separaciju peptida tekućinskom kromatografijom (LC).

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

Tablica 11. Parametri ionskog izvora.

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

Nakon snimanja MS i MS/MS spektara, provedena je identifikacija i relativna kvantifikacija proteina. Uz pomoć programa ProteinPilot Software 5.0.2 (AB Sciex) pretražena je baza podataka, a parametri korišteni prilikom pretrage navedeni su u **tablici 12**. Svi dobiveni podaci dobiveni iz baze podataka korišteni su za daljnju kvantitativnu analizu.

Tablica 12. Parametri korišteni prilikom identifikacije proteina pretraživanjem baze podataka.

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

3.8. Statistička obrada podataka

Za procjenu rizika pojedinačnih spojeva te njihovih smjesa na sustave staničnih linija u uvjetima *in vitro* korišten je programski paket PROAST (RIVM; <https://proastweb.rivm.nl/>). Za izbor optimalnog modela unutar eksponencijalnog i/ili Hill modela napravljen je primjenom Akaike informacijskih kriterija (AIC) odnosno, model s najmanjom AIC vrijednošću najbolje odgovora za prikaz rezultata (Davis i sur., 2011). Ovisnost o dozi je potvrđena u slučaju kada je vrijednost AIC najboljeg modela niža od AIC vrijednosti nultog modela za više od dvije jedinice ($AIC_{min} < AIC_{null} - 2$). U slučaju nultog modela, krivulja doza-odgovor predstavlja vodoravnu krivulju te odgovor nema ovisnost o dozi ($y = a$). Nadalje, najniža vrijednost modela AIC ne smije premašiti vrijednost AIC-a specifični puni model za više od dvije jedinice ($AIC_{min} < AIC_{full} + 2$) (Slob, 2014). U matematičkoj jednadžbi modela, y predstavlja intenzitet učinka, x predstavlja dozu ili koncentraciju, dok su konstante var , a , b , c i d parametri dobivene krivulje prilagođavanjem modela podacima o dozi i učinku. Parametar var predstavlja varijancu unutar grupa. Parametar a predstavlja učinak pri nultoj dozi takozvanog pozadinskog učinka (parametar položaja okomite krivulje), dok parametar b predstavlja kemijsku snagu

(parametar položaja vodoravne krivulje). Parametar c predstavlja maksimalni intenzitet učinka ($M = c$ za uzlazne krivulje, $M = 1/c$ za silazne krivulje) u odnosu na pozadinu razina učinka (parametar oblika krivulje), dok d predstavlja nagib krivulje (Hardy i sur., 2017). Ispitivani učinak smjese ili kemikalije se potvrđuje ukoliko je omjer BMD (eng. *benchmark dose*) i BMDL (eng. *lower confidence limit*) manji od 10. Kao vrijednost BMR (eng. *benchmark response*) uzeta je vrijednost 0,1 (10 %-tna promjena odgovora ili učinka u odnosu na kontrolnu vrijednost).

Za procjenu djelovanja pojedinačnih kemikalije (hidrokinon i nitrofurantoin) i njihovih interakcija u smjesi na T24 staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura korišten je faktorski regresijski model unutar STATISTICA programskog paketa (ver. 7.0, StatSoft, SAD). Faktorski dizajn je vrlo učinkovit za proučavanje dva ili više faktora. Učinak čimbenika može se definirati kao promjena u odgovoru uzrokovana promjenom razine čimbenika te se to naziva glavni učinak. U nekim eksperimentima može se ustanoviti da razlika u odgovoru između razina jednog čimbenika nije ista na svim razinama drugih čimbenika te se to naziva učinak interakcije između čimbenika. Zajedno, glavni učinci i učinci međudjelovanja nazivaju se čimbenički učinci. Potpuni faktorski dizajn može procijeniti sve glavne učinke i interakcije višeg reda (Jaynes i sur., 2013). S obzirom da je u eksperimentu u ovom radu korišten hidrokinon u rasponu od 5 koncentracija, a nitrofurantoin u 3 koncentracije uz kontrolne uzorke radi se o 24 tretmana ili razina kombinacija. Uobičajeni regresijski model za proučavanje glavnih učinaka i interakcija između dvije kemikalije je:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 \dots + \epsilon \quad [1]$$

gdje y predstavlja odgovor, β nepoznate parametre, a x korištene kemikalije hidrokinon (1) i nitrofurantoin (2). Interakcija između kemikalija definirana je umnoškom x_1x_2 . Koristeći faktorski dizajn s 24 tretmana može se procijeniti 15 interakcija dva faktora, 8 pojedinačnih učinaka te kontrolni uzorak. U slučaju da je faktor β_{12} negativna vrijednost uz statistički značajnu vrijednost $p < 0,05$ zaključujemo da kemikalije unutar smjese djeluju antagonistički. Ukoliko je β_{12} pozitivna vrijednost ($p < 0,05$) djelovanje je sinergističko.

Sve druge statističke obrade podataka provedene su uz pomoć programa SPSS Statistics (ver. 22, IBM Corp., New York, SAD). Normalnost raspodjele podataka utvrđena je Kolmogorov-Smirnov (KS) testom koji se prilagođava obliku podataka i koristi za provjeru slijede li dva različita uzorka istu raspodjelu ($p > 0,05$, normalna raspodjela). Jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD (eng. *Honest Significant Difference*) test višestrukih usporedbi korišteni su za usporedbu tretmana provedenih u ovom

radu (pojedinačno i međusobno). Vrijednosti za koje je određen koeficijent $p < 0,05$, smatrane su statistički značajnim. Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije i koeficijent determinacije za parametre fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti. Svi rezultati u ovom radu prikazani su kao aritmetička sredina određenog broja replika iz tri nezavisno provedena eksperimenta. χ^2 - test (hi-kvadrat) korišten je za određivanje statistički značajne razlike u rezultatima mikroukleus *cytome* testa.

Relativna kvantifikacija proteina je napravljena uz pomoć signala reporter iona koristeći Schaffold Q+S program uz parametre navedene u **tablici 13**. Nakon pretraživanja baze podataka, za ciljanu analizu kod tretmana T24 stanica hidrokinonom tijekom 2 h uzeti su proteini kod kojih je omjer tretman/kontrola bio veći ili jednak 1,3 (eng. *cut-off*) ili manji ili jednak 0,769 s obzirom da su eksperimenti provedeni u pet replika. Kod tretmana hidrokinonom, nitrofurantoinom i njihovom smjesom, eksperimenti su provedeni u triplikatu, a statistički prihvatljive promjene (pri $p < 0,05$) smatrale su se promjene u količini proteina $\geq 1,5$ puta ili $\leq 0,667$ puta u odnosu na kontrolni uzorak.

Tablica 13. Parametri komparativne analize.

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

4. REZULTATI

4.1. Određivanje fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta medvjeteke te njihova promjena tijekom faza *in vitro* probave

Sastav ukupnih fenola u ekstraktu izražen je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) i bio je u rasponu od 155,19 – 205,30 mg GAE/100 mL analiziranog ekstrakta (**tablica 14**). Ako izražavamo po gramu suhe tvari (eng. *dry weight*, DW) taj raspon bio bi od 35,27 – 77,08 mg GAE/g suhe tvari. Maseni udio flavonoida izražen je kao ekvivalent kvercetina i bio je u rasponu 91,14 – 282,199 mg QE/100 mL ekstrakta odnosno 0,47 – 0,59 mg QE/g suhe tvari. Svježi ekstrakt medvjeteke ima statistički značajno više ukupnih fenola i flavonoida u odnosu na liofilizirani ekstrakt.

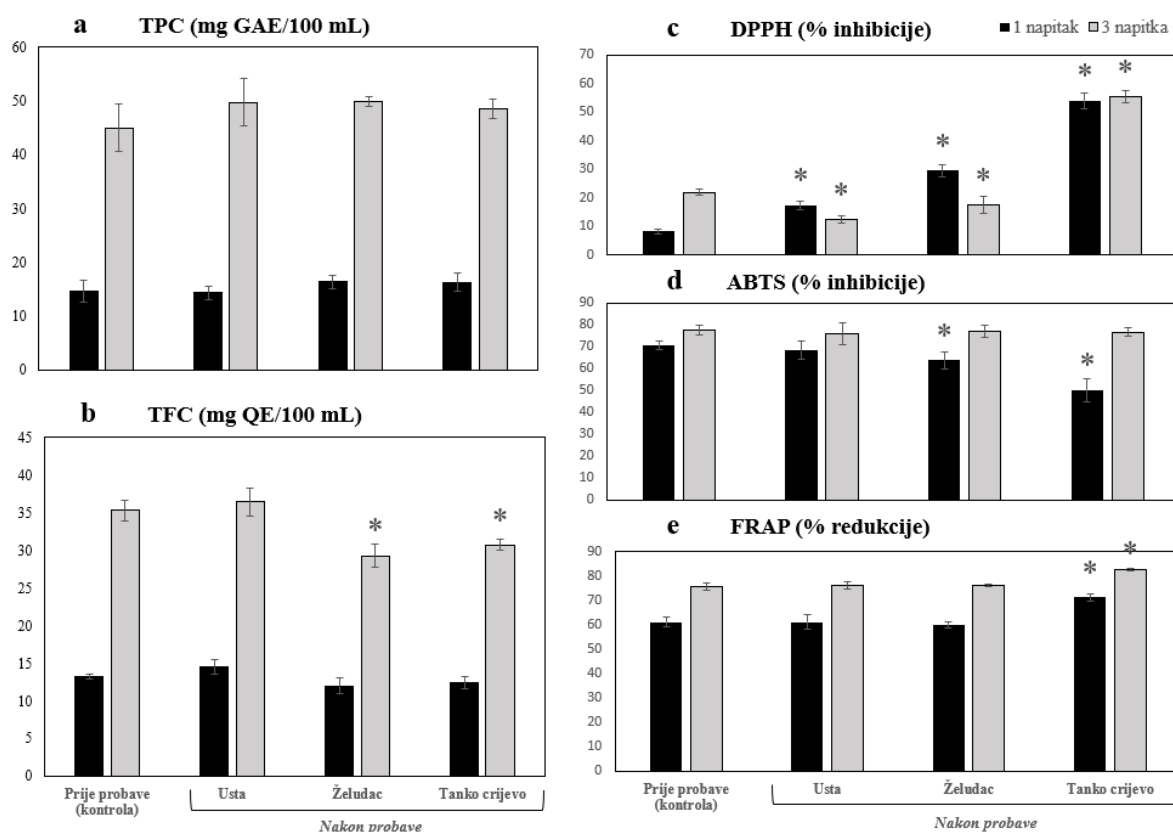
Antioksidacijski kapacitet ekstrakta medvjeteke određena je metodama DPPH•, ABTS i FRAP. Rezultati za metode DPPH• i ABTS izraženi su kao % inhibicije, a za metodu FRAP kao % redukcije. Statističkom obradom utvrđeno je da nema razlike ($p < 0,05$) u antioksidacijskom kapacitetu između svježeg i liofiliziranog ekstrakta medvjeteke te da je on neovisan o koncentraciji ekstrakta (**tablica 14**).

Tablica 14. Razina ukupnog sadržaja fenola (TPC), ukupnog sadržaja flavonoida (TFC), radikala DPPH•, radikala ABTS i kapaciteta redukcije željeza (FRAP) ekstrakta medvjeteke.

Ekstrakt	TPC	TFC	DPPH•	ABTS	FRAP
	(mg GAE/100 mL)	(mg QE/100 mL)	% inhibicije	% inhibicije	% redukcije
Svježe pripremljen (1 napitak)	155,19 ± 8,68 *	122,49 ± 8,14 *	78,08 ± 0,71	79,76 ± 1,64	95,78 ± 0,08
Svježe pripremljen (3 napitka)	205,30 ± 20,28 *	282,199 ± 16,37	75,16 ± 1,6	78,59 ± 1,91	95,29 ± 0,1
Liofiliziran (1 napitak)	112,998 ± 8,49	91,14 ± 5,00	76,26 ± 1,49	79,38 ± 2,67	95,73 ± 0,09
Liofiliziran (3 napitka)	183,65 ± 5,50	275,16 ± 4,72	76,19 ± 0,71	77,72 ± 1,64	94,97 ± 0,33

*Statistički značajno veće vrijednosti u odnosu na liofilizirani uzorak ekstrakta medvjeteke u istim koncentracijama (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD iz 3 nezavisna eksperimenta.

Na **slici 11** prikazana je promjena u fenolnom sastavu i antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta medvjete izloženom uvjetima *in vitro* probave. Može se vidjeti da nema statistički značajne razlike u masenom udjelu ukupnih fenola dok se količina flavonoida statistički značajno smanjila u fazi želuca i tankog crijeva u odnosu na inicijalni uzorak te fazu usta. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta medvjete mjerena metodama DPPH• i FRAP statistički se značajno povećala do konačne faze *in vitro* probave u tankom crijevu dok je kod metode ABTS zamijećen statistički značajan pad % inhibicije u fazama želuca i tankog crijeva.



Slika 11. Fenolni sastav (TPC, ukupni fenoli izraženi preko ekvivalenta galne kiseline (GAE); TFC, ukupni flavonoidi izraženi preko ekvivalenta kvercetina (QE)) i antioksidacijska aktivnost (DPPH•, ABTS i FRAP) ekstrakta medvjete (1 i 3 terapijska napitka) prije i nakon *in vitro* probave. *statistički značajna razlika u odnosu na inicijalni uzorak prije *in vitro* probave (kontrola; jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$).

Na temelju rezultata fenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta uzoraka tijekom *in vitro* probave, proveden je statistički postupak korelacije za izračunavanje povezanosti dviju varijabli. Vrijednost korelacije brojčano je iskazana Pearsonovim koeficijentom korelacije, a statistička značajnost koeficijenta iskazana je kriterijem $p < 0,05$. Ukupni fenolni sastav ekstrakta medvjete pozitivno korelira s ukupnim sastavom flavonoida te ispitivanim parametrima antioksidacijske aktivnosti (**tablica 15**). DPPH• (% inhibicije) i FRAP (% redukcije) pozitivno koreliraju (vrlo jaka korelacija) dok je između vrijednosti ABTS i FRAP utvrđena umjerena pozitivna korelacija iako statistički značajna ($p < 0,001$).

Tablica 15. Prikaz korelacije između sastava ukupnih fenola (TPC, mg GAE/100 mL) i flavonoida (TFC, mg QE/100 mL) s antioksidacijskom aktivnošću ekstrakta medvjete (metode DPPH• i ABTS, % inhibicije te FRAP, % redukcije) tijekom faza *in vitro* probave na temelju Pearsonovog koeficijenta korelacije (r).

Varijabla	Pearsonov koeficijent korelacije (r)			
	TPC	TFC	DPPH•	ABTS
TFC	0,992 ***			
DPPH•	0,845 ***	0,256 ^{ns}		
ABTS	0,659 ***	0,127 ^{ns}	0,256 ^{ns}	
FRAP	0,949 ***	0,045 ^{ns}	0,915 ***	0,536 ***

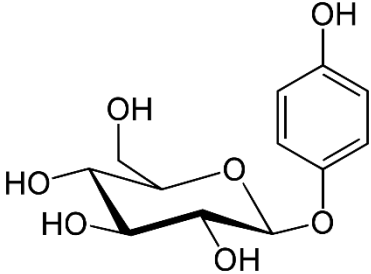
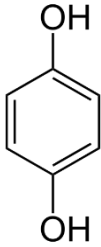
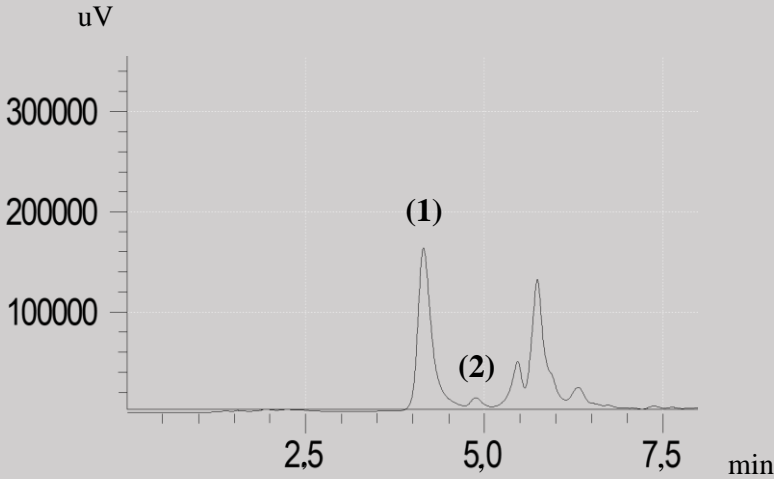
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ^{ns} – nije statistički značajno

Pearsonov koeficijent korelacije (r): 0,00 – 0,19, vrlo slaba; 0,20 – 0,39, slaba; 0,40 – 0,59, umjerena; 0,60 – 0,79, jaka; 0,80 – 1,0, vrlo jaka korelacija (Evans, 1996).

4.2. Određivanje biološki aktivnih tvari u ekstraktu medvjete, *in vitro* probava te određivanje njihove *in vitro* biodostupnosti kroz probavni sustav

Biološki aktivne tvari u ekstraktu medvjete identificirane su i kvantificirane metodom HPLC korištenjem dva oblika ekstrakta – svježe pripremljenog i liofiliziranog ekstrakta u istim koncentracijama. **Tablica 16** prikazuje molekularnu strukturu arbutina i hidrokinona, njihove nazive po IUPAC-u te HPLC kromatogram arbutina i hidrokinona u jednom napitku svježe pripremljenog ekstrakta medvjete. Pod postavljenim uvjetima optimizirane HPLC analize, vrijeme zadržavanja (eng. *retention time*, t_R) arbutina bilo je 4,5 min, a hidrokinona 5,0 min.

Tablica 16. Strukturne formule identificiranih biološki aktivnih spojeva arbutina i hidrokinona u ekstraktu medvjete i njihovi nazivi prema IUPAC-u te HPLC kromatogram.

ARBUTIN (1)	HIDROKINON (2)
	
<p>(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>R</i>,6<i>S</i>)-2-(hidroksimetil)-6-(4-hidroksifenoksi)oksan-3,4,5-triol</p>	<p>benzen-1,4-diol</p>
	

Najveća koncentracija arbutina od 4 % (w/w) izmjerena je u svježe pripremljenom ekstraktu (jedan terapijski napitak) kao i najveća koncentracija hidrokinona (0,07 % w/w; **tablica 17A**). U svježe pripremljenom ekstraktu kvantificirano je 24,1 % više arbutina ($p < 0,05$) i 39,5 % više hidrokinona ($p < 0,01$) u odnosu na liofilizirani ekstrakt. Osim kvantifikacije arbutina i hidrokinona, u ekstraktu su detektirani L-askorbinska kiselina (t_R oko 1,5 min, $\lambda = 254$ nm), galna kiselina (t_R oko 6 min, $\lambda = 289$ nm), *p*-kumarinska kiselina ($t_R=11,964$ min, $\lambda = 310$ nm), ferulinska kiselina ($t_R=11,983$ min, $\lambda = 310$ nm), miricentin i kvercetin (prvi i drugi signal između minute 12 i 13, $\lambda = 360$ nm) te katehin (oko 11 min, $\lambda = 289$ nm). Svi spojevi analizirani su u nehidroliziranom uzorku. Rezultati HPLC analize nisu se razlikovali ovisno o

načinu predobrade - centrifugiranjem ili filtracijom kroz sterilni filter 0,45 µm. Svi standardi pripremljeni su u ultračistoj vodi te dodavani u uzorak ekstrakta radi usporedbe s originalnim kromatogramom osim miricetina i kvercetina pripremljenih u 96 %-tnom etanolu jer se oni u vodi talože te takav uzorak nije bio pogodan za HPLC analizu.

Tablica 17. Koncentracije biološki aktivnih sastavnica u ekstraktu medvjete kvantificirane metodom HPLC (A) i rezultati *in vitro* probave (B).

A)		Koncentracije određene u ekstraktu medvjete (mg/g suhe tvari ± SD)	
Vrsta ekstrakta	Identificirani spoj	ARBUTIN	HIDROKINON
	Svježe pripremljen (1 napitak)		40,54 ± 0,47 *
Liofiliziran (1 napitak)		30,79 ± 0,59	0,44 ± 0,01
Svježe pripremljen (3 napitka)		37,17 ± 0,67 *	0,62 ± 0,01 *
Liofiliziran (3 napitka)		30,42 ± 0,63	0,46 ± 0,01

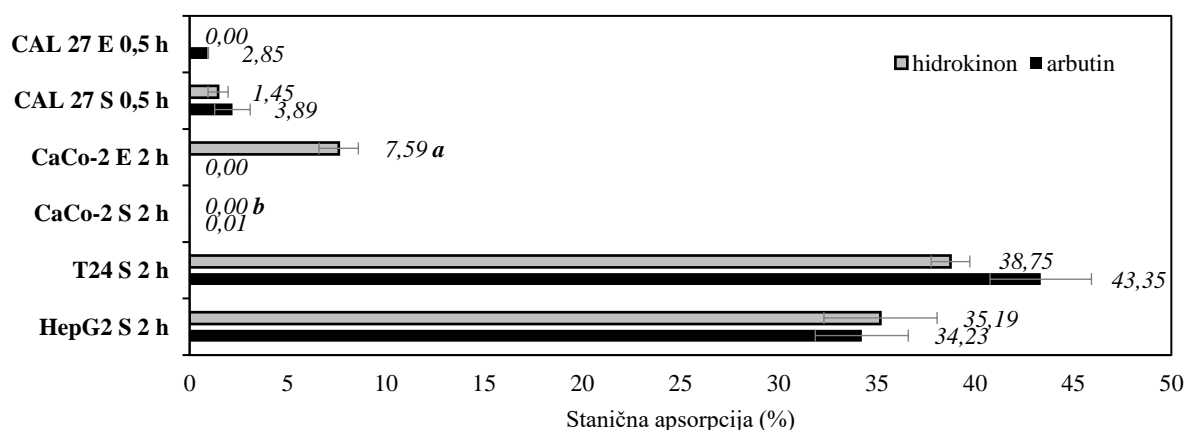
N= 3 za svaki uzorak. A – arbutin, HQ – hidrokinon. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost arbutina i hidrokinona u ekstraktu medvjete ± SD. *p < 0,01 u usporedbi s liofiliziranim ekstraktom u istoj koncentraciji (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc Tukeyev HSD*).

B)		Nakon <i>in vitro</i> probave (µg/mL)			% varijacije ³		
I (µg/mL) ²	I (µg/mL) ²	U ²	Ž	TC	U	Ž	TC
		A ¹	141,30 ± 6,77	152,41 ± 4,39	141,97 ± 1,30	144,69 ± 5,53	7,9 (+)
HQ	0,52 ± 0,08 b,c	0,50 ± 0,01 b,c	1,09 ± 0,02 *,a,c	0,86 ± 0,03 *,a,b	3,9 (-)	109,6 (+)	65,4 (+)

¹A – arbutin, HQ – hidrokinon. ²I – inicijalna faza prije probave; U – nakon faze probave u ustima; Ž – nakon faze probave u želucu; TC – nakon faze probave u tankom crijevu. ³ % varijacije u odnosu na inicijalnu fazu probave. Svi podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (N = 3 nezavisna eksperimenta). # p < 0,05 u usporedbi s: *kontrolom (inicijalna faza prije probave) ^a *in vitro* probavom u ustima (U), ^b *in vitro* probavom u želucu (Ž), ^c *in vitro* probavom u tankom crijevu (TC; jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc Tukeyev HSD*, p < 0,05).

Metoda *in vitro* probave koristi se za proučavanje metabolizma tvari kroz probavni sustav, bio-dostupnost tvari u pojedinoj fazi probave te procjenu promjene profila stanične apsorpcije spojeva od interesa. Rezultati ovog rada pokazuju veliku stabilnost arbutina tijekom *in vitro* probavnog procesa (**tablica 17B**; $p < 0,05$ prilikom usporedbe između koncentracije arbutina u pojedinim fazama *in vitro* probave). Povećanje koncentracije hidrokinona nakon simulirane probave u želucu u razdoblju od 60 min bilo je 109,62 % ($p < 0,01$ u usporedbi s oralnom fazom) i 65,38 % ($p < 0,01$ u usporedbi s oralnom i želučanom fazom) u simuliranim uvjetima tankog crijeva (pankreasni sokovi, 120 min, **tablica 17B**).

Arbutin i hidrokinon su bili vrlo stabilni u hranjivom mediju (s 10 % FBS-a) tijekom 2 h (arbutin, $p = 0,3063$; hidrokinon, $p = 0,9968$). Nadalje, stanična apsorpcija arbutina i hidrokinona ovisi o vrsti stanica. U ovom radu korištene su stanične linije koje dolaze u kontakt s arbutinom i hidrokinonom tijekom konzumacije i metabolizma ekstrakta medvjette. Nije pokazana statistički značajna razlika između apsorpcije arbutina i hidrokinona iz ekstrakta i mješavine pojedinačnih spojeva arbutina i hidrokinona od strane CAL 27 stanica karcinoma epitela jezika tijekom 30 min. Također, Caco-2 stanice karcinoma debelog crijeva su u intervalu od 2 h apsorbirale 7,59 % hidrokinona iz ekstrakta medvjette dok u slučaju arbutin-hidrokinon smjese to nije bio slučaj. T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura su apsorbirale 38,75 % hidrokinona i 43,35 % arbutina što je statistički značajno više u usporedbi s Caco-2 stanicama, a neznatno više u usporedbi s HepG2 stanicama karcinoma jetre u istom vremenskom razdoblju od 2 h (**slika 12**).

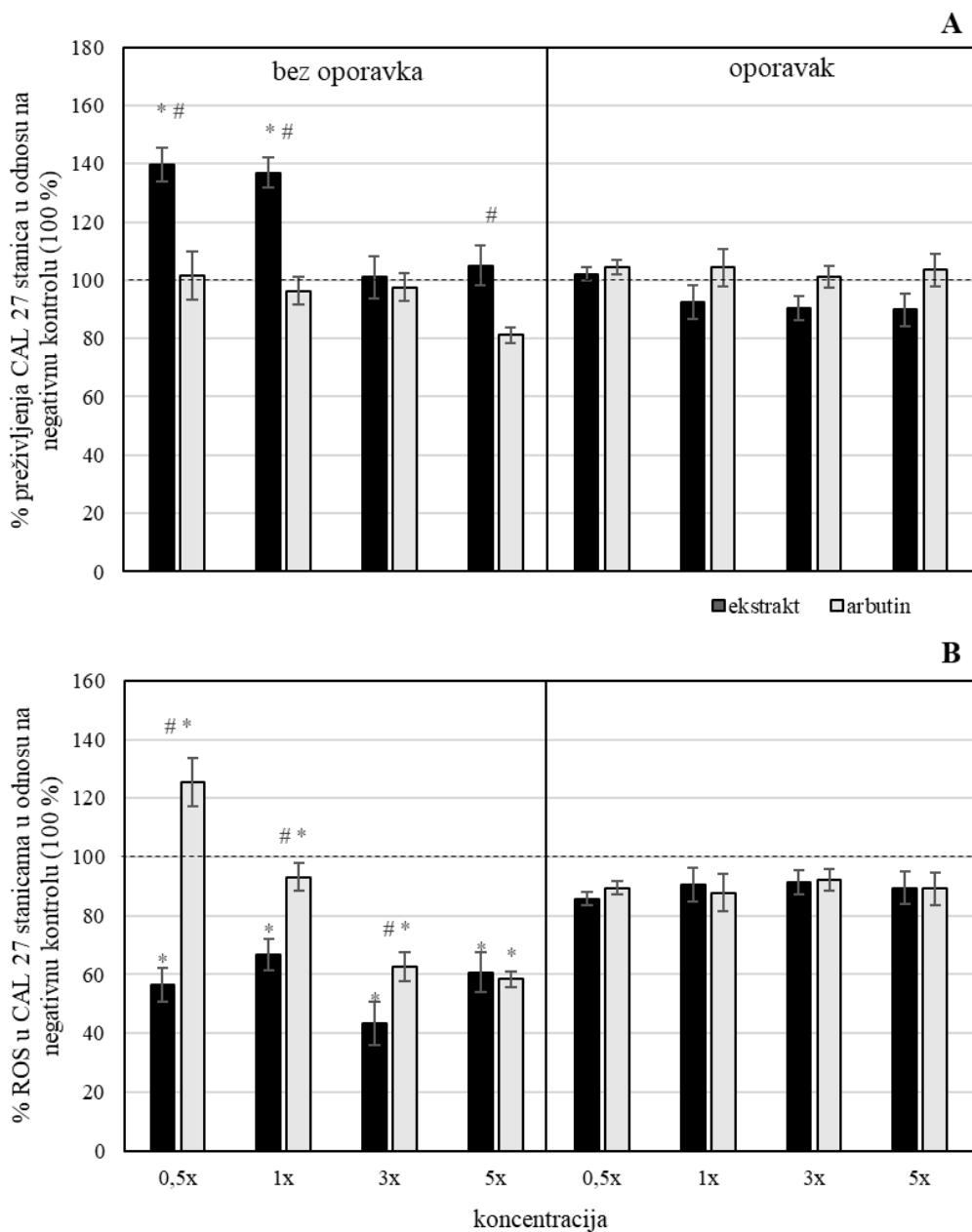


Slika 12. Stanična apsorpcija arbutina i hidrokinona (%) od strane staničnih kultura karcinoma epitela jezika (CAL 27), debelog crijeva (Caco-2), jetre (HepG2) i mokraćnog mjehura (T24). ^a $p < 0,05$ u usporedbi s Caco-2_S; ^b $p < 0,05$ u usporedbi s Caco-2_E (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD). S – arbutin-hidrokinon smjesa pojedinačnih spojeva; E – ekstrakt medvjette.

4.3. Biološka aktivnost ekstrakta medvjetke i arbutina na stanice probavnog sustava i jetre

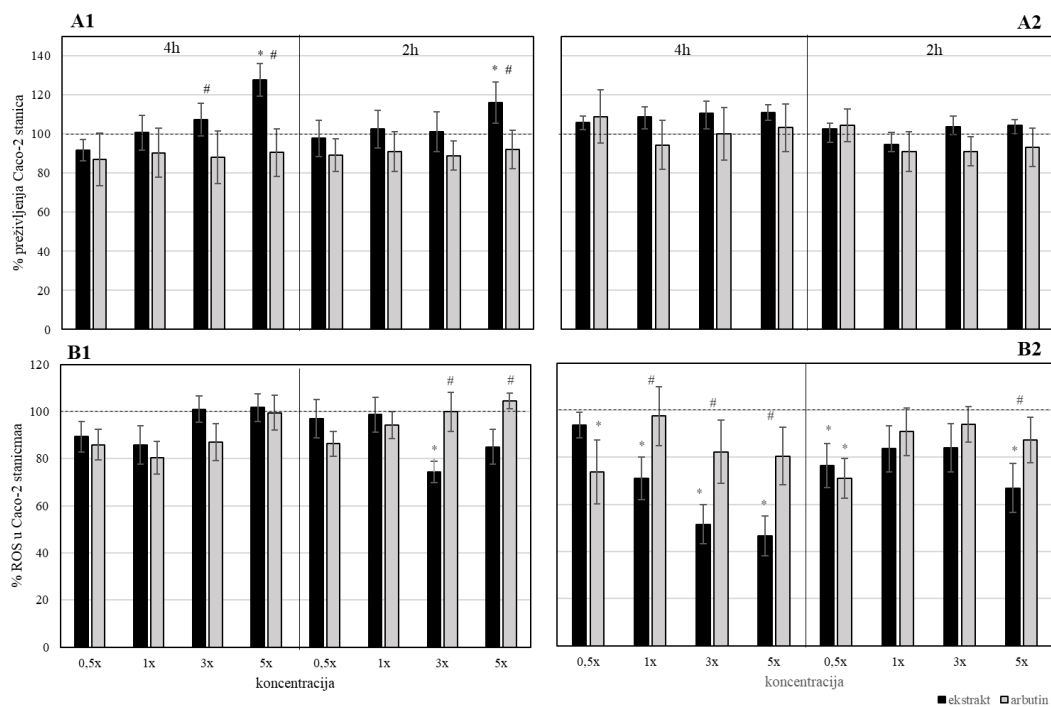
S obzirom da tijekom konzumacije i metabolizma, ekstrakt medvjetke dolazi u kontakt sa stanicama probavnog sustava i jetre, u ovom radu određen je biološki učinak ekstrakta medvjetke i koncentracija arbutina koje odgovaraju onima u ekstraktu (1 napitak i dnevna doza od tri napitka) na stanične linije karcinoma epitela jezika (CAL 27), želuca (AGS), debelog crijeva (Caco-2) i jetre (HepG2). Biološki učinak određen je metodama *Neutral Red* i DCFH-DA, a rezultati su izraženi kao % preživljena i % indukcije ROS-ova u odnosu na negativnu kontrolu (100 %).

Iz rezultata na stanicama karcinoma epitela jezika (CAL 27) vidljivo je da je trenutni učinak ekstrakta medvjetke (bez staničnog oporavka) u vidu proliferativnog učinka na stanice kod jednog terapijskog napitka dok arbutin nije pokazao proliferativni učinak čime se može zaključiti da on nije glavni uzročnik spomenutog djelovanja ekstrakta medvjetke (**slika 13A**). U tretmanu bez oporavka CAL 27 stanica, ekstrakt medvjetke u vremenu izlaganja 15 min izazvao je značajno smanjenje indukcije ROS-ova (~50 – 60 %) u cijelom rasponu koncentracija. S druge strane, arbutin pokazuje o dozi ovisnu promjenu % ROS-ova gdje koncentracija 0,4 mg/mL ima prooksidacijsko djelovanje, a 2,4 mg/mL (dnevna doza) i 4 mg/mL antioksidacijsko djelovanje. Nakon oporavka indukcija ROS-ova u CAL 27 stanicama ne razlikuje se u odnosu na negativnu kontrolu (**slika 13B**). Može se zaključiti da je učinak ekstrakta i arbutina na stanice epitela jezika trenutno te da nema prolongiranog učinka na daljnji rast i razvoj CAL 27 stanica.



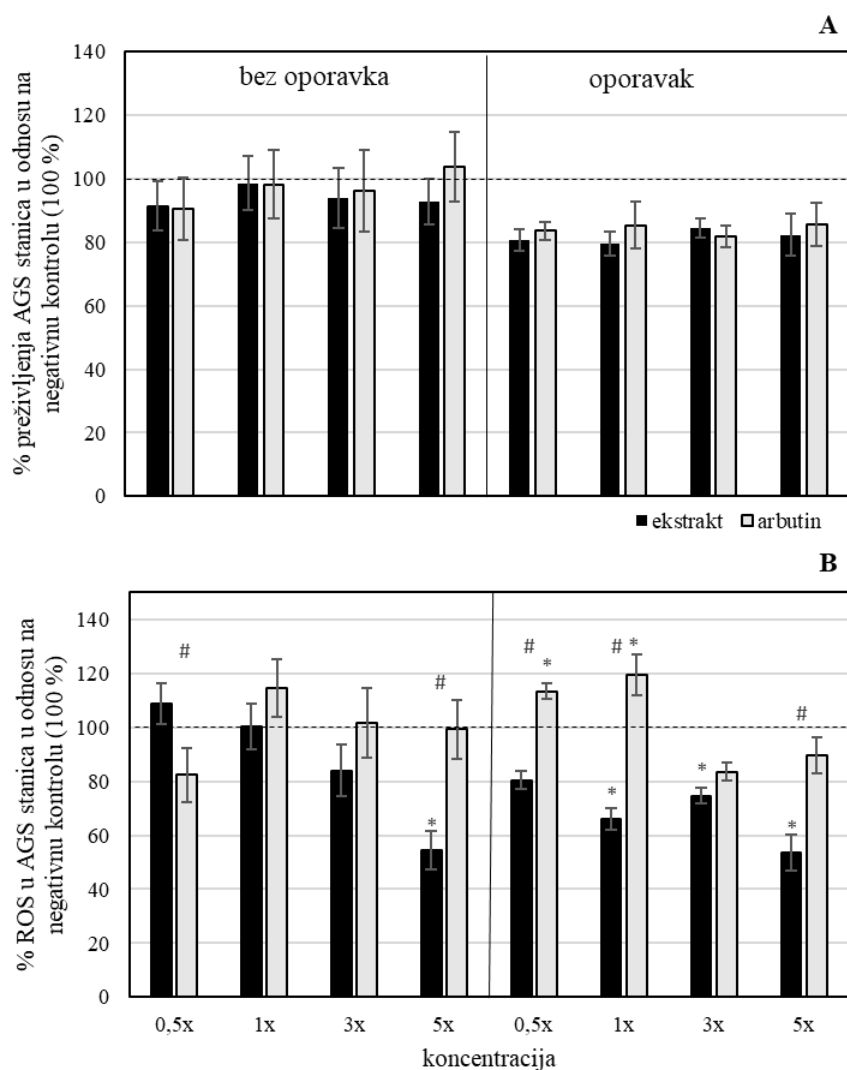
Slika 13. Prikaz preživljenja stanične linije karcinoma epitela jezika CAL 27 (**A**) i indukcije ROS-ova (**B**) nakon tretmana ekstraktom medvjjetke i arbutinom tijekom 15 min (0,5 – 5×) bez i s 24-satnim oporavkom stanica. Statistički značajna razlika u odnosu na *negativnu kontrolu (100 %), #između ekstrakta i arbutina u istim uvjetima (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$). Koncentracija 1× ekstrakta (1 terapijski napitak) predstavlja 0,4 mg/mL arbutina.

Trenutni proliferativni učinak ekstrakta medvjjetke pokazan je i na modelu stanica karcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 gdje nakon 2 i 4 h tretmana bez oporavka, ekstrakt medvjjetke u 5× većoj koncentraciji od 1 terapijskog napitka izaziva proliferativno djelovanje (~120 %; **slika 14A1**). Kao i u slučaju epitela jezika, proliferativni učinak nije detektiran nakon oporavka stanica (**slika 14A2**). Arbutin u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija (0,4 – 4 mg/mL) nije pokazao učinak na preživljenje Caco-2 stanica neovisno o obliku tretmana (s i bez oporavka stanica). U tretmanu bez oporavka Caco-2 stanica kod oba ispitivana uzorka (ekstrakt medvjjetke, arbutin) nema učinka na indukciju ROS-ova (**slika 14B1**). Ekstrakt medvjjetke ima antioksidacijsko djelovanje u cijelom ispitivanom koncentracijskom rasponu na Caco-2 stanice tijekom 4 h tretmana s oporavkom stanica pri čemu je zamijećen o dozi ovisan odgovor dok je kraće izlaganje ekstraktu medvjjetke (2 h) izazvalo antioksidacijski učinak samo kod najmanje i najveće ispitivane koncentracije ekstrakta medvjjetke (0,5 i 5×; **slika 14B2**).

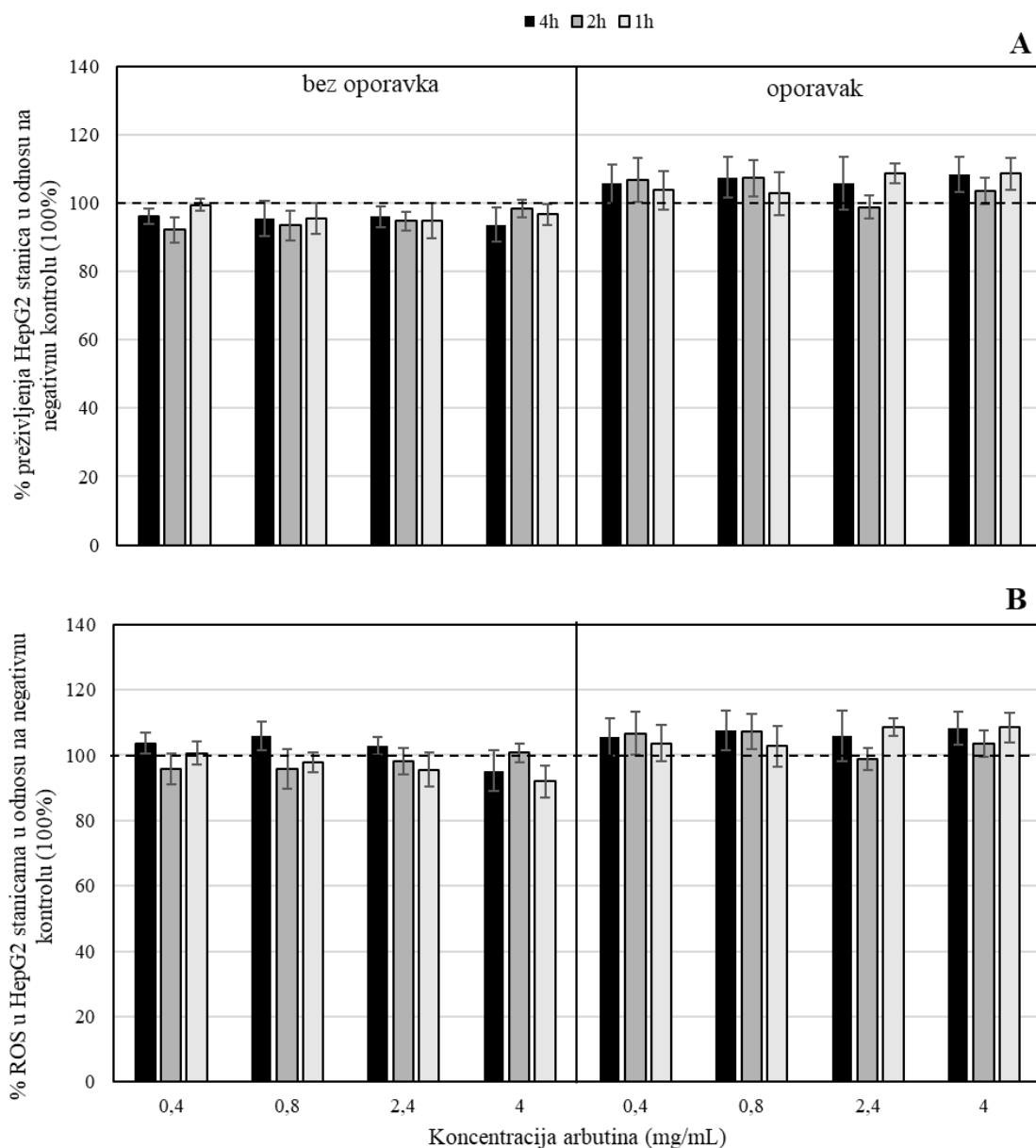


Slika 14. Prikaz preživljenja stanične linije epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma Caco-2 nakon 2 i 4 h tretmana ekstraktom i arbutinom (0,5 – 5×) bez oporavka (**A1**) i s 24-satnim oporavkom stanica (**A2**) te indukcije slobodnih kisikovih radikala bez oporavka (**B1**) i s 24-satnim oporavkom stanica (**B2**). Statistički značajna razlika u odnosu na *negativnu kontrolu (100 %), #između ekstrakta i arbutina u istim uvjetima (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$). Koncentracija 1× ekstrakta (1 terapijski napitak) predstavlja 0,4 mg/mL arbutina.

Kod epitelnih stanica karcinoma želuca AGS i jetre HepG2 nije vidljiva promjena u preživljenju u odnosu na negativnu kontrolu (100 %) u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija ekstrakta i arbutina (0,5 – 5×). Također vrijeme izlaganja i oporavak stanica nije utjecao na promjenu preživljenja (slike 15A i 16A). Kod stanica karcinoma želuca (AGS), u tretmanu s oporavkom vidljivo je da 1 napitak i dnevna doza arbutina imaju antioksidacijsko djelovanje dok sam ekstrakt medvjete u 0,5 i 1× dozi ima blago prooksidacijsko djelovanje (slika 15B). % indukcije ROS-ova u HepG2 staničnoj liniji ne razlikuje se u odnosu na netretirani uzorak bez obzira na oporavak stanica (negativna kontrola, 100 %) (slika 16B).



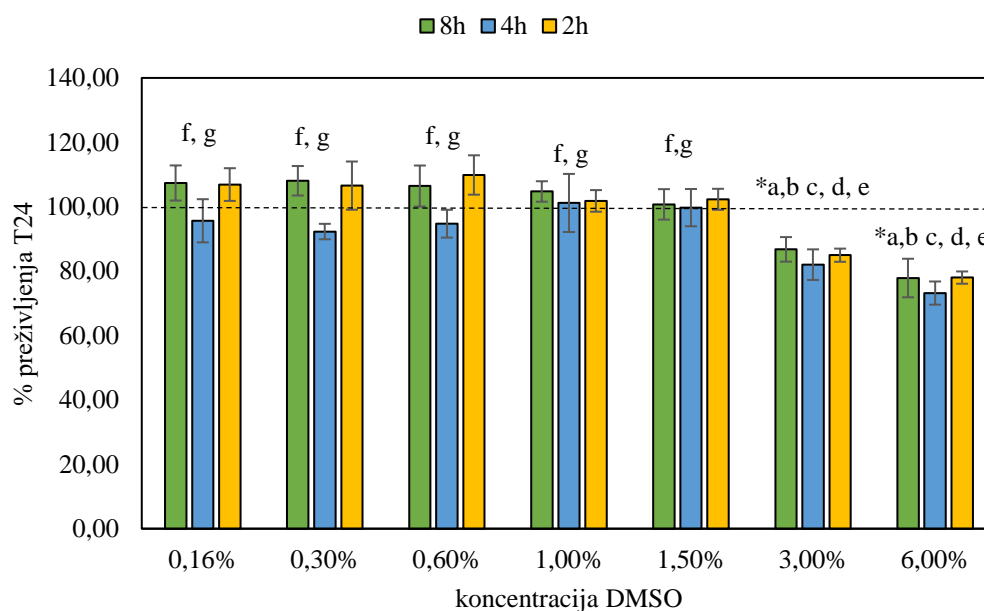
Slika 15. Prikaz preživljenja stanične linije karcinoma želuca AGS (A) i indukcije ROS-ova (B) nakon tretmana ekstraktom medvjete i arbutinom tijekom 1 h (0,5 – 5×) bez i s 24-satnim oporavkom stanica. Statistički značajna razlika u odnosu na *negativnu kontrolu (100 %), #između ekstrakta i arbutina u istim uvjetima (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$). Koncentracija 1× ekstrakta (1 terapijski napitak) predstavlja 0,4 mg/mL arbutina.



Slika 16. Prikaz preživljenja stanične linije hepatokarcinoma HepG2 (A) i indukcije ROS-ova (B) nakon tretmana arbutinom tijekom 1, 2 i 4 h (0,4 – 4 mg/mL) bez i s 24-satnim oporavkom stanica. Statistički značajna razlika u odnosu na *negativnu kontrolu (100 %; jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$). Koncentracija 1× ekstrakta (1 terapijski napitak) predstavlja 0,4 mg/mL arbutina.

4.4. Biološka aktivnost nitrofurantoina

Nitrofurantotin je topljiv samo u organskim otapalima poput etanola i DMSO-a, a ishodišna otopina pripremljena je u DMSO-u te je prvotno bilo potrebno ispitati toksičnost korištenih koncentracija DMSO-a na izabrane stanične linije. Test toksičnosti otopina DMSO-a u hranjivom mediju (0,16 – 6,00 %) pokazao je da koncentracije prisutne u test-otopinama nitrofurantoina (0,16 – 0,60 %) ne pokazuju nikakav utjecaj na preživljenje stanica karcinoma jetre (HepG2) i mokraćnog mjehura (T24) (slika 17). Kao granica tolerancije određena je 1,5 %-tna otopina DMSO-a. Pri koncentracijama 3,00 % i 6,00 % DMSO-a preživljenje stanica se znatno smanjilo (ispod 80 %) te je pokazana statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0.05$).



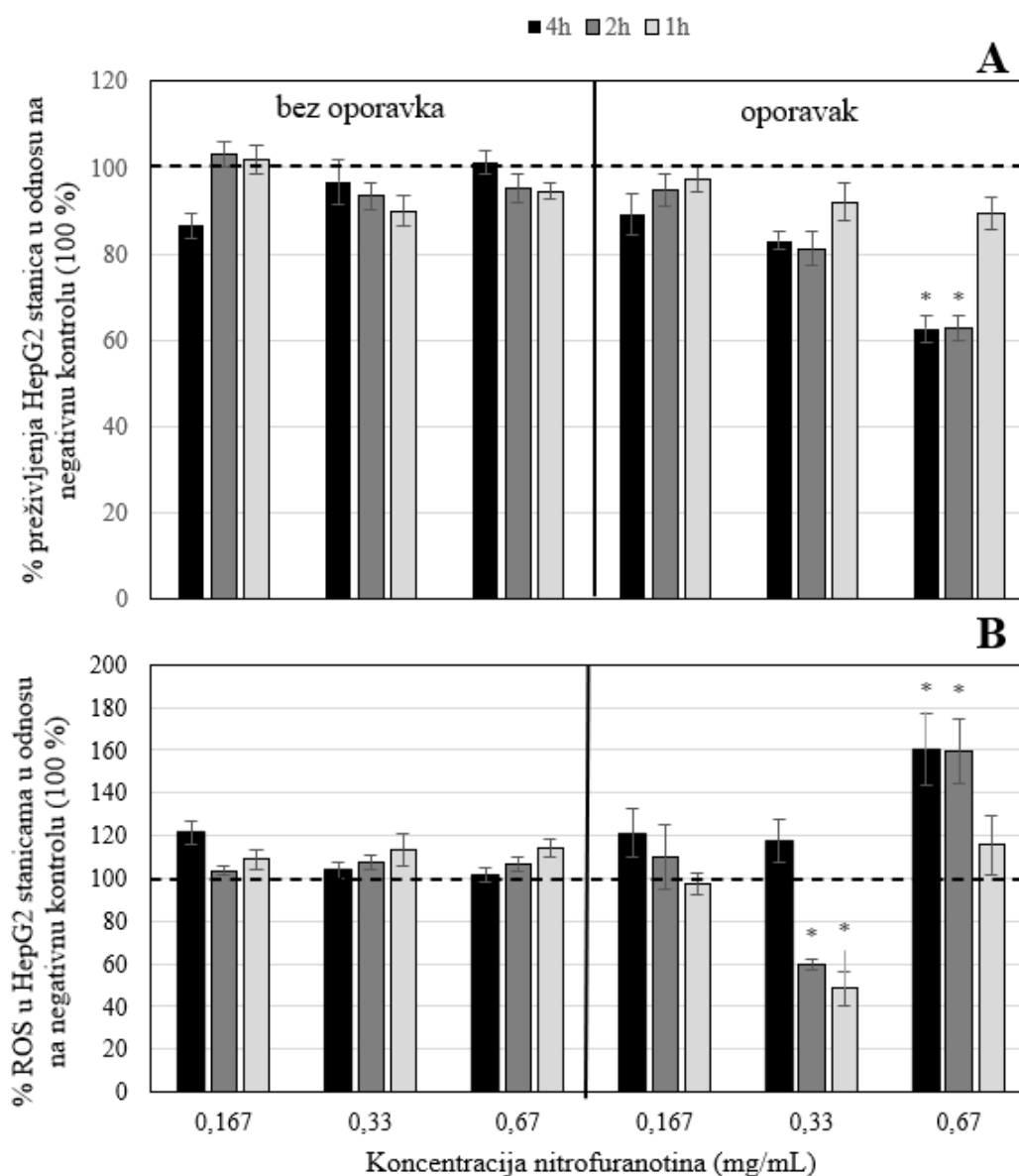
Slika 17. Preživljenje stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (T24) nakon tretmana različitim koncentracijama otopine DMSO (0,16 – 6,00 %) tijekom 2, 4 i 8 h. Statistički značajna razlika u odnosu na: *negativnu kontrolu (100 %), ^a - 0,16 %, ^b - 0,30 %, ^c - 0,60 %, ^d - 1,00 %, ^e - 1,50 %, ^f - 3,00 %, ^g - 6,00 % (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$).

S obzirom da je vrijeme eliminacije nitrofurantoina iz organizma putem urina 6 h nakon konzumacije, glavna mjesta ispitivanja biološke aktivnosti u ovom radu bile su stanične linije karcinoma jetre (HepG2) i mokraćnog mjehura (T24).

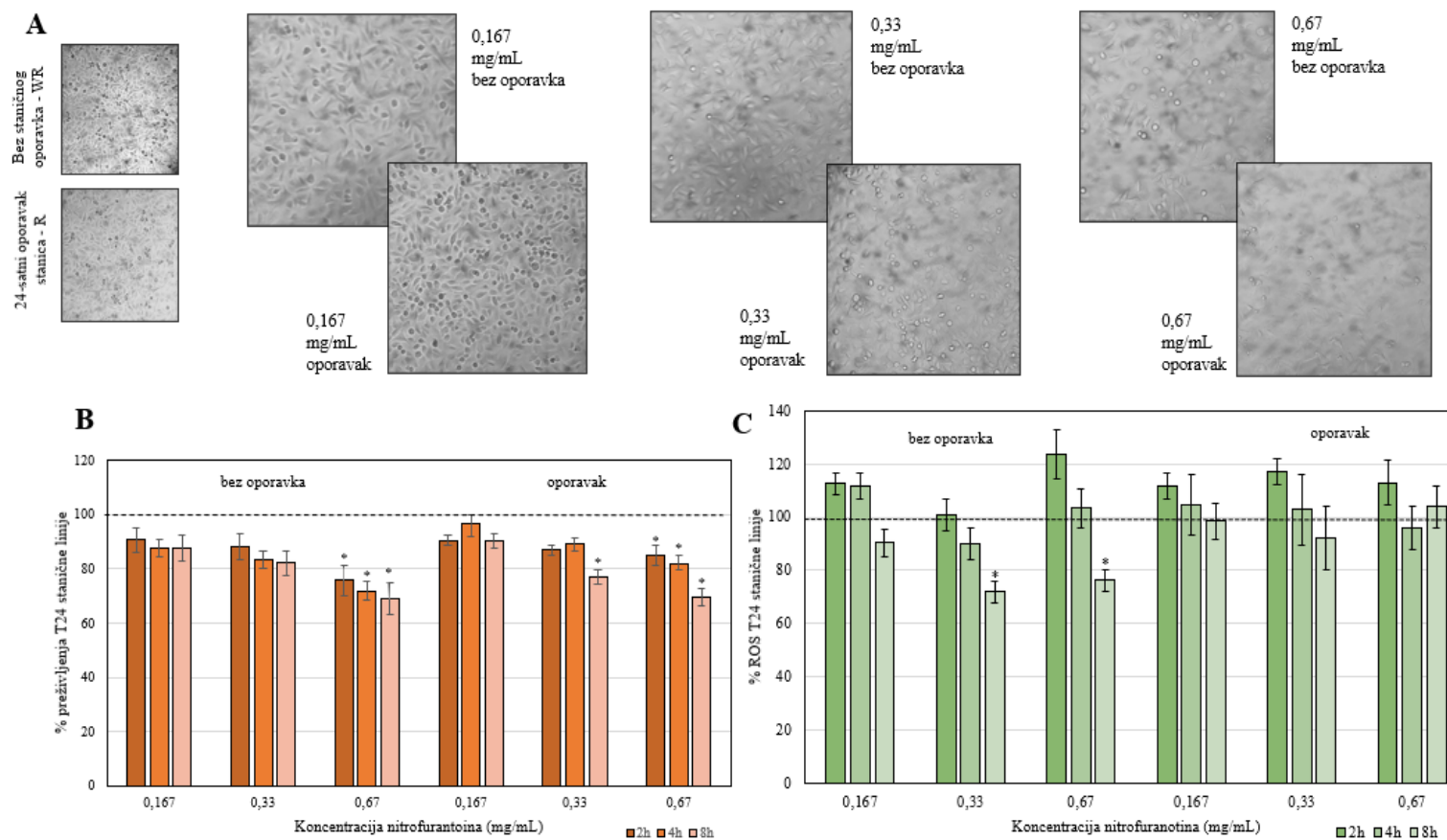
Iz grafičkog prikaza vidljivo je da maksimalna terapijska doza antibiotika nitrofurantoina (0,67 mg/mL) statistički značajno smanjuje preživljenje stanične linije jetre tijekom 2 i 4 h djelovanja (~60 %, **slika 18A**) uz izrazito prooksidacijsko djelovanje (~160 %, **slika 18B**) nakon 24-satnog oporavka stanica. Nadalje, minimalna terapijska doza nitrofurantoina (0,33 mg/mL) pokazala je antioksidacijsko djelovanje na HepG2 staničnu liniju karcinoma jetre tijekom 1 i 2 h izlaganja nakon 24-satnog oporavka stanica. Prilikom tretmana nitrofurantoinom u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija (0,167 - 0,67 mg/mL), bez oporavka HepG2 stanica, učinak na % preživljenja i % ROS-ova nije se razlikovao od učinka u negativnoj kontroli.

Iz ovih rezultata vidljivo je da je štetan učinak maksimalne terapijske doze nitrofurantoina vidljiv tek nakon 24-satnog oporavka stanica od tretmana odnosno daljnjom reprodukcijom stanica. Procjena reverzibilnosti staničnog oštećenja važna je u procjeni rizika povezanog s izlaganjem određenim kemikalijama.

Što se tiče glavnog terapijskog mjesta djelovanja u organizmu čovjeka, antibiotik nitrofurantoin u koncentraciji koja odgovara maksimalnoj terapijskoj dozi (0,67 mg/mL) smanjuje preživljenje stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 ispod 80 % u sva tri vremena izlaganja (2, 4 i 8 h), a manji broj preživjelih stanica može se vidjeti i na mikroskopskoj slici (**slika 19A**). Isti učinak uočen je i nakon 24-satnog oporavka stanica čime se može zaključiti da su oštećenja na staničnoj razini trajna (**slika 19B**). Niže ispitivane koncentracije nitrofurantoina (0,167 i 0,33 mg/mL) nisu pokazale utjecaj na promjenu preživljenja i indukciju slobodnih radikala u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura bez obzira na oporavak stanica. Nakon 2 h tretmana vidljivo je prooksidacijsko djelovanje nitrofurantoina na T24 stanice u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija bez obzira na oporavak stanica. Produženo vrijeme tretmana nije utjecalo na indukciju ROS-ova u T24 stanicama mokraćnog mjehura već minimalna i maksimalna terapijska doza prilikom 8-satnog tretmana bez staničnog oporavka pokazuju antioksidacijsko djelovanje koje može biti posljedica smanjenog preživljenja T24 stanica (**slika 19C**).



Slika 18. Prikaz preživljenja stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 (A) i indukcije ROS-ova (B) nakon tretmana antibiotikom nitrofurantoinom tijekom 1, 2 i 4 h (0,167 – 0,66 mg/mL gdje najmanja koncentracija predstavlja profilaktičku dozu, a ostale minimalnu i maksimalnu terapijsku dozu) bez i s 24-satnim oporavkom stanica. Statistički značajna razlika u odnosu na *negativnu kontrolu (100 %), (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$).

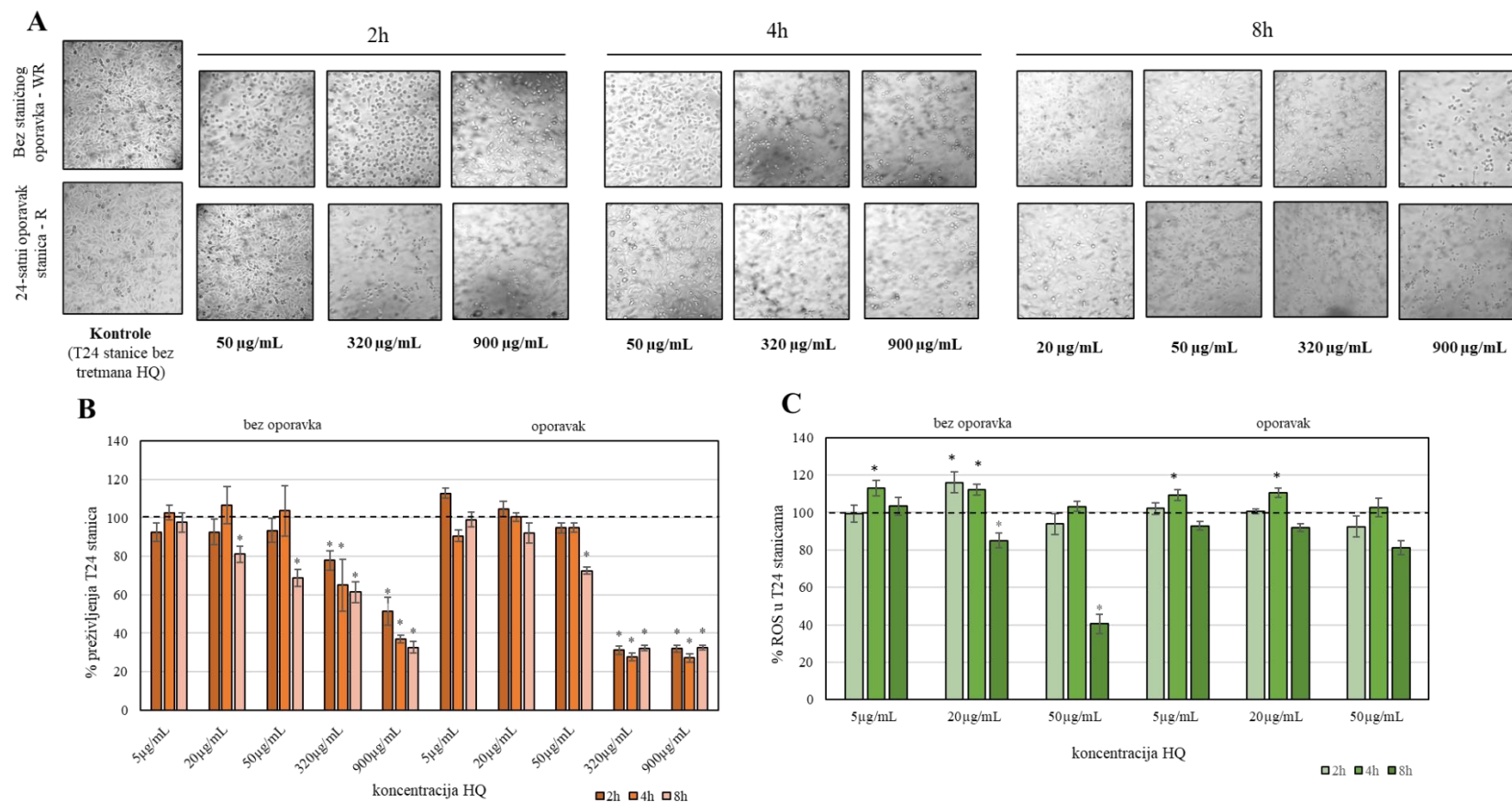


Slika 19. Rezultati tretmana nitrofurantoinom (0,167 – 0,67 mg/mL; 2, 4 i 8 h) na T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura bez i s 24-satnim oporavkom stanica: **(A)** fotografije stanica nakon tretmana 8 h na svjetlosnom inverznom mikroskopu snimljene pod povećanjem 400×; **(B)** rezultati metode *Neutral Red*; **(C)** indukcija slobodnih kisikovih radikala. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (3 zasebna eksperimenta). *statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, $p < 0,05$ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc Tukeyev HSD*).

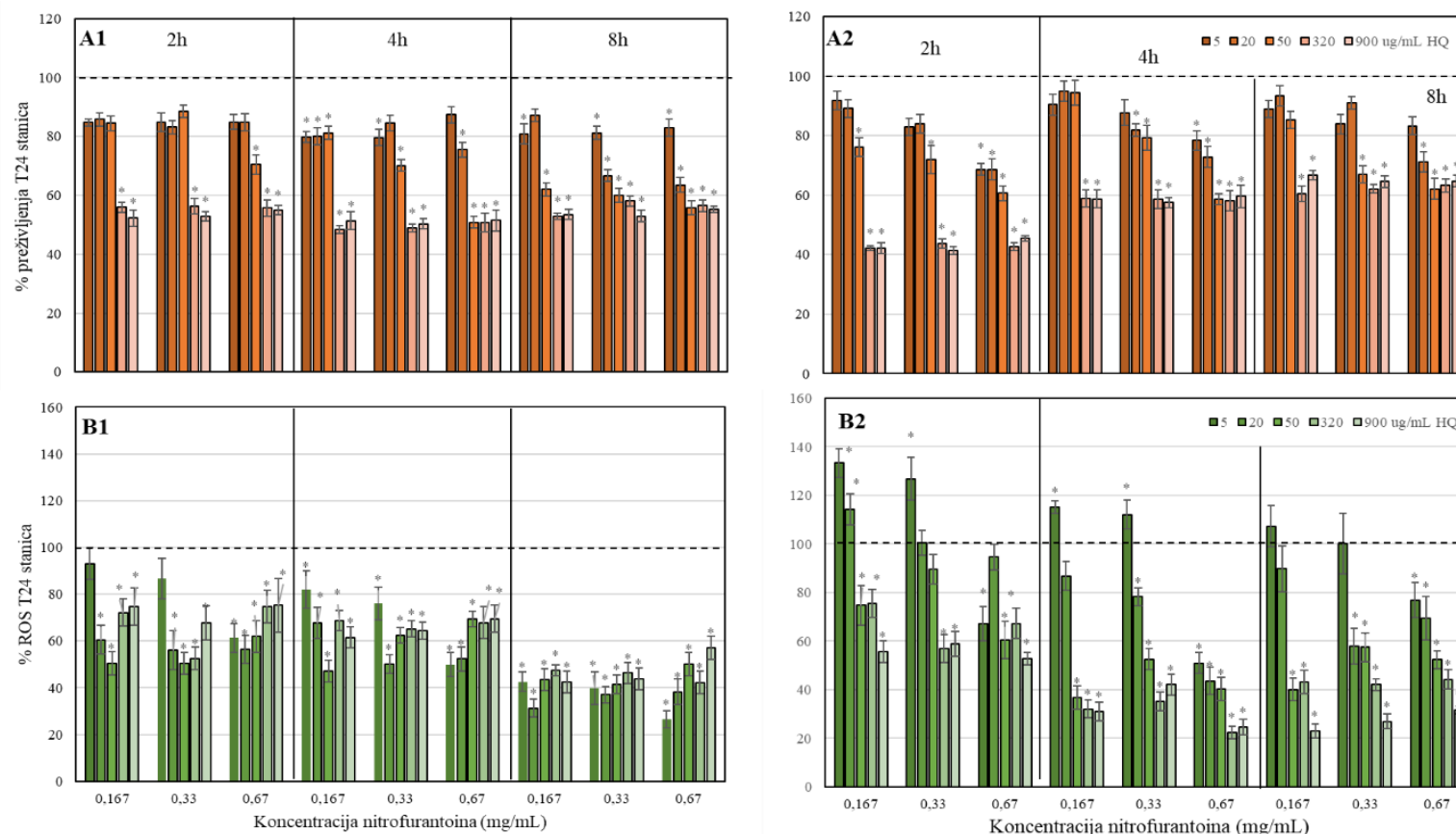
4.5. Biološka aktivnost hidrokinona i njegove kombinacije s antibiotikom nitrofurantoinom na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24

Iz rezultata citotoksičnosti hidrokinona na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 može se zaključiti da je njegovo djelovanje ovisno o dozi te da se povećava s duljinom tretmana kod stanica bez oporavka (**slika 20B**). Odnosno, koncentracija hidrokinona u mokraćnom mjehuru nakon konzumacije jednog terapijskog napitka ekstrakta medvjette i koncentracije koja odgovara dnevnoj dozi (20 i 50 $\mu\text{g/mL}$ urina) pokazuje citotoksično i antioksidacijsko djelovanje na T24 stanice samo u maksimalnom vremenu izlaganja od 8 h bez oporavka (**slike 20B i 20C**). Nakon 24-satnog oporavka stanica, citotoksični učinak ostaje vidljiv samo nakon konzumacije dnevne doze (50 $\mu\text{g/mL}$ urina), a % ROS-ova ne razlikuje se od negativne kontrole u obje koncentracije (100 %). Maksimalne moguće koncentracije hidrokinona prisutne u mjehuru (320 i 900 $\mu\text{g/mL}$ urina) izazivaju izrazito jak citotoksični učinak ovisan o dozi na stanice mokraćnog mjehura u sva tri vremena izlaganja (2, 4 i 8 h) bez oporavka. U tretmanu s 24-satnim oporavkom pokazano je da koncentracije hidrokinona 320 i 900 $\mu\text{g/mL}$ izazivaju trajna stanična oštećenja s obzirom da se preživljenje smanjilo na ~30 % bez obzira na vrijeme i dozu izlaganja. Osim što je na mikroskopskim fotografijama vidljiv manji broj stanica, uočljive su i morfološke promjene u odnosu na negativnu kontrolu (**slika 20A**). Niže ispitivane koncentracije hidrokinona (5 i 20 $\mu\text{g/mL}$) pokazale su prooksidacijsko djelovanje u tretmanima sa i bez staničnog oporavka nakon 4 h izlaganja (**slika 20C**).

Rezultati djelovanja smjesa hidrokinona (5 – 900 $\mu\text{g/mL}$) i antibiotika nitrofurantoina (0,167 – 0,67 mg/mL) na preživljenje i indukciju ROS-ova u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura prikazani su na **slici 21**. Obradom dobivenih podataka u PROAST softverskom paketu potvrđen je učinak doza-odgovor smjese u T24 stanice na sve ispitivane parametrima osim indukcije ROS-ova tijekom tretmana 8 h s 24-satnim oporavkom jer je omjer BMD i BMDL veći od 10 (**tablica 18**). U STATISTICA softverskom paketu uz uvjet $p < 0,05$ potvrđeni su svi postavljeni modeli te je pokazano sinergističko djelovanje smjese (pozitivna vrijednost faktora β_{12}) hidrokinona i nitrofurantoina prilikom mjerenja % preživljenja T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura samo u tretmanu s oporavkom u svim ispitivanim duljinama tretmana (2 – 8 h) te mjerenja indukcije ROS-ova osim prilikom najdužeg tretmana od 8 h s oporavkom (**tablica 18**). Statistička značajnost faktora β_{12} potvrđena je uz uvjet $p < 0,05$. Iako je tehnički potvrđeno sinergističko djelovanje smjesa hidrokinona i nitrofurantoina, vrlo niske vrijednosti faktora β_{12} ostavljaju otvoreno pitanje interakcije ovih spojeva u vidu sinergizma ukoliko se koristi drugi koncentracijski raspon i odnos u smjesi.

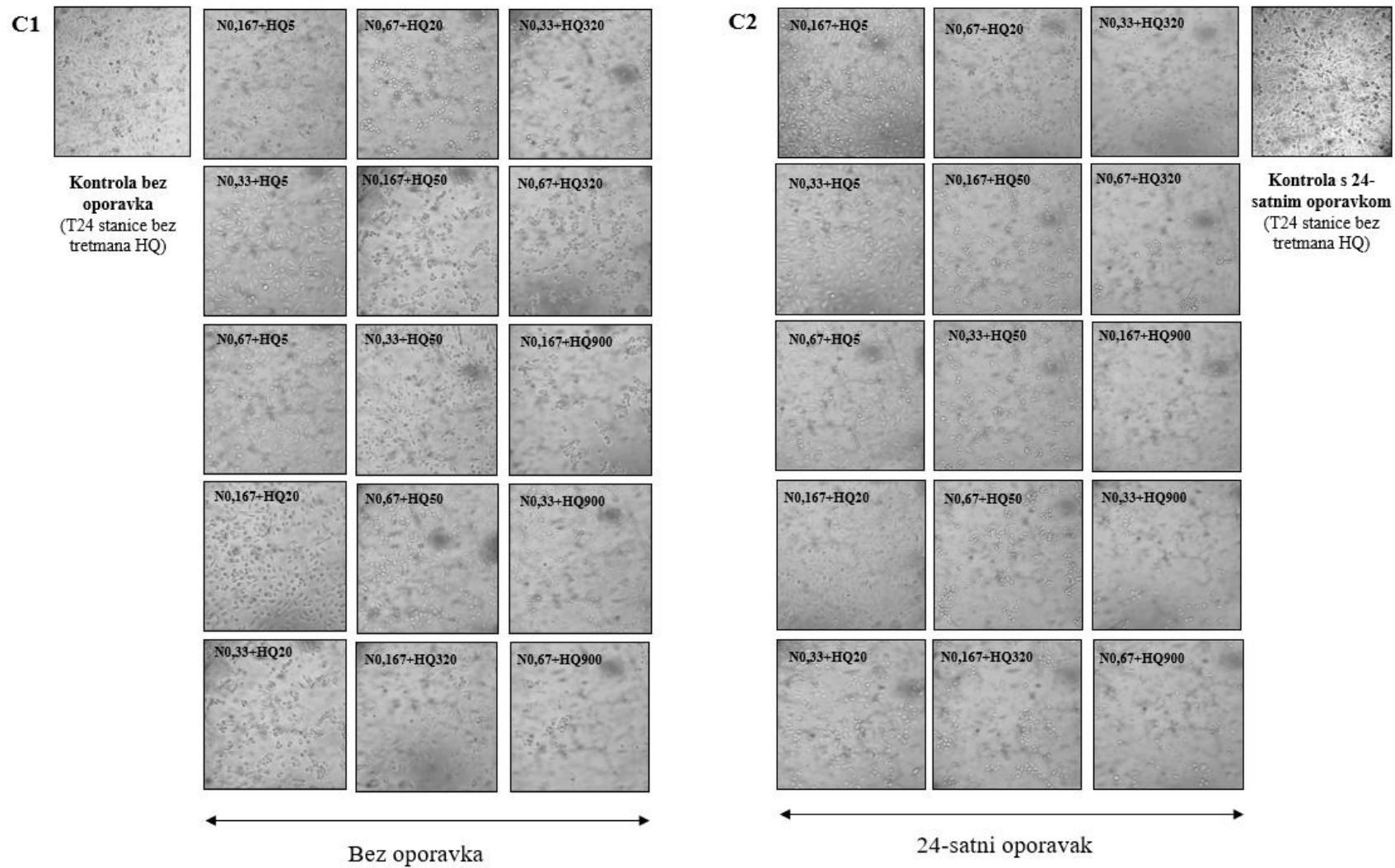


Slika 20. Rezultati tretmana hidrokinonom (5 – 900 µg/mL; 2, 4 i 8 h) na T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura bez i s 24-satnim oporavkom stanica: **(A)** fotografije stanica na svjetlosnom inverznom mikroskopu snimljene pod povećanjem 400×; **(B)** rezultati metode *Neutral Red*; **(C)** indukcija slobodnih kisikovih radikala. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (3 zasebna eksperimenta). *statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, $p < 0,05$ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc* Tukeyev HSD).



Slika 21. Rezultati tretmana smjesom hidrokinona (5 – 900 µg/mL) i nitrofurantoina (0,167 – 0,67 mg/mL) tijekom 2, 4 i 8 h na T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura: **(A1)** rezultati metode *Neutral Red* bez oporavka stanica; **(A2)** rezultati metode *Neutral Red* s 24-satnim oporavkom stanica; **(B1)** indukcija slobodnih radikala u stanicama bez oporavka; **(B2)** indukcija slobodnih radikala u stanicama s 24-satnim oporavkom stanica; fotografije stanica na svjetlosnom inverznom mikroskopu snimljene pod povećanjem 400× bez oporavka **(C1)** i s 24-satnim oporavkom **(C2)** nakon tretmana 8 h. *statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, $p < 0,05$ (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way ANOVA* i *post-hoc Tukeyev HSD*).

Nastavak slike 21



Tablica 18. Prikaz rezultata iz PROAST softvera za statističku analizu doza-odgovor podataka i faktorskog regresijskog modela (STATISTICA softver) u cilju utvrđivanja djelovanja smjese hidrokinona i antibiotika nitrofurantoina na preživljenje i indukciju ROS-ova u T24 stanicama karcinoma mokraćnog sustava.

Vrsta tretmana	Parametar praćenja	Vrijeme tretmana	PROAST softver [#]		STATISTICA softver*				Djelovanje
			BMD/BMDL	učinak	Multiple R (testiranje modela)	p-vrijednost	β_{12}	p-vrijednost	
BO	Preživljenje T24 stanica	2 h	2,31	da	0,81	< 0,01	+2,07*10 ⁻⁵	0,08	/
		4 h	2,18	da	0,78	< 0,01	+5,59*10 ⁻⁵	<0,01	sinergističko
		8 h	1,85	da	0,64	< 0,01	+2,21*10 ⁻⁵	0,11	/
O	Preživljenje T24 stanica	2 h	1,32	da	0,84	< 0,01	+7,54*10 ⁻⁵	<0,01	sinergističko
		4 h	1,51	da	0,81	< 0,01	+5,45*10 ⁻⁵	<0,01	sinergističko
		8 h	1,57	da	0,72	< 0,01	+9,38*10 ⁻⁵	<0,01	sinergističko
BO	Indukcija ROS-ova u T24 stanicama	2 h	1,36	da	0,53	< 0,01	+0,0001	<0,01	sinergističko
		4 h	1,47	da	0,64	< 0,01	+0,0001	<0,01	sinergističko
		8 h	1,18	da	0,53	< 0,01	+0,0001	<0,01	sinergističko
O	Indukcija ROS-ova u T24 stanicama	2 h	1,54	da	0,72	< 0,01	+8,66*10 ⁻⁵	<0,01	sinergističko
		4 h	1,27	da	0,73	< 0,01	+8,30*10 ⁻⁵	<0,01	sinergističko
		8 h	28,46	ne	0,62	< 0,01	-1,55*10 ⁻⁵	0,48	/

BO - bez oporavka; O – 24-satni oporavak stanica; [#]BMD – eng. *benchmark dose*; BMDL – eng. *lower confidence limit*; BMD/BMDL < 10 za potvrdu učinka; *faktorski regresijski model, ukoliko je faktor β_{12} za smjesu spojeva (hidrokinon i nitrofurantoin) pozitivan (+) radi se o sinergijskom djelovanju, a ukoliko je negativan (-) o antagonističkom djelovanju samo uz uvjet statističke značajnosti $p < 0,05$.

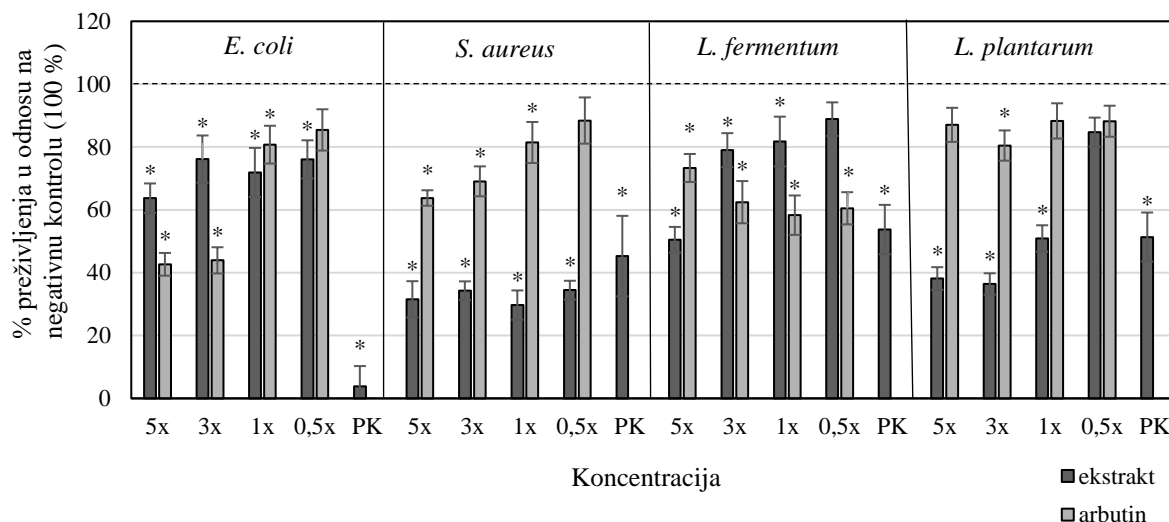
4.6. Antimikrobna i anti-adhezivna svojstva ekstrakta medvjete

Citotoksični učinak

Prema rezultatima krivulja rasta, određeno je da su u uvjetima nasađivanja jedne bakterijske kolonije u 20 mL hranjive podloge nakon 22 h aerobnog uzgoja bakterijske kulture *E. coli* i *S. aureus* u eksponencijalnoj fazi rasta pogodnoj za ispitivanje toksičnosti. Također, logaritamsku fazu rasta *L. fermentum* postiže za 18 h, a *L. plantarum* za 24 h uzgoja pri 37 °C u anaerobnim uvjetima rasta.

Nadalje, određena je IC₅₀ vrijednost (eng. *half-maximal inhibitory concentration*) u svakom provedenom eksperimentu ili kvantitativna mjera koja pokazuje koliko je određene inhibitorne tvari potrebno za inhibiciju, u uvjetima *in vitro*, određenog biološkog procesa ili biološke komponente za 50 %. Vrijednost IC₅₀ arbutina za *L. fermentum* iznosila je 0,4 mg/mL dok za bakterije *E. coli* i *S. aureus* te vrijednosti bile su 2,4 mg/mL i 4 mg/mL arbutina nakon 1 h tretmana. Za *L. plantarum* nije određena IC₅₀ vrijednost unutar ispitivanog raspona koncentracija arbutina. Što se tiče ekstrakta medvjete, IC₅₀ vrijednost za *S. aureus* iznosila je 0,5×, *L. plantarum* 1×, a za *E. coli* i *L. fermentum* 5× nakon 1 h tretmana. S druge strane, IC₅₀ vrijednost hidrokinona za *E. coli* nakon 1 h tretmana iznosila je 320 µg/mL, a nakon 4 h tretmana 5 µg/mL.

U sklopu ovog rada ispitan je učinak ekstrakta medvjete i arbutina kao glavnog biološki aktivnog spoja u lišću medvjete na predstavnike mikrobiote probavnog sustava. Na **slici 22** vidljivo je da ekstrakt medvjete ima najveći citotoksični učinak na bakterije *S. aureus* i *L. plantarum* na način da pojedinačna i dnevna doza ekstrakta smanjuje njihovo preživljenje na manje od 50 %. Statistički značajni pad vijabilnosti, iako manji od prethodno dvije spomenute bakterije, vidljiv je i kod *E. coli* te *L. fermentum* bakterija (pad preživljenja nakon tretmana ~20 %). Arbutin u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija nije utjecao na preživljenje bakterije *L. plantarum*. Kod *E. coli* i *S. aureus* vidljiv je o dozi ovisan učinak arbutina pri čemu koncentracija 2,4 mg/mL (odgovara onoj izmjerenoj u dnevnoj dozi ekstrakta) smanjuje preživljenje *E. coli* na manje od 50 % dok *S. aureus* na ~70 %. Koncentracija arbutina izmjerena u jednom napitku ekstrakta (0,8 mg/mL) smanjuje preživljenje bakterija *E. coli*, *L. fermentum* i *S. aureus* za ~20 %.



Slika 22. Utjecaj ekstrakta medvjete (0,5 – 5×) i arbutina (0,4 – 4 mg/mL) na preživljenje bakterija *Escherichia coli* K-12 MG1655, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DSM 20231^T, *Lactiplantibacillus fermentum* 21_PG_1 ZZMK i *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 1055 nakon tretmana 1 h. Koncentracija 1× predstavlja jedan terapijski napitak, a 3× dnevnu dozu ekstrakta od tri terapijska napitka. Koncentracija 0,8 mg/mL arbutina odgovara onoj izmjerenoj u jednom terapijskom napitku ekstrakta medvjete (1×). *Statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu (100 %; jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$). PK - pozitivna kontrola (gentamicin, 1 mg).

Iz dobivenih rezultata ispitivanja citotoksičnosti hidrokinona na uropatogenu *E. coli* vidljivo je da koncentracija hidrokinona koja se nađe u mokraćnom mjehuru nakon konzumacije jednog terapijskog napitka ekstrakta medvjete (20 µg/mL) i dnevne doze (50 µg/mL) statistički značajno smanjuje preživljenje *E. coli* već nakon 2 i 4 h tretmana dok nakon 1 h nema učinka (**tablica 19**). Najmanja ispitana koncentracija hidrokinona (5 µg/mL) smanjuje preživljenje bakterije *E. coli* nakon 4 h djelovanje na ~65 % dok kraće vrijeme izlaganja (1 i 2 h) istoj koncentraciji nije imalo toksični učinak. Koncentracije hidrokinona od 320 i 900 µg/mL smanjile su preživljenje bakterije *E. coli* na ~60 % već nakon 1 h tretmana. Antibiotik nitrofurantoin drastično je smanjio rast uropatogene *E. coli* (ispod 5 %) već nakon 2 h tretmana u obje ispitivane doze (profilaktička i terapijska) dok je nakon 4 h djelovanja preživljenje *E. coli* ispod 1 % (**tablica 19**).

Tablica 19. % preživljenja uropatogene bakterije *E. coli* K-12 MG1655 nakon tretmana hidrokinonom i nitrofurantoinom.

Vrijeme tretmana		Hidrokinon (µg/mL)				
		5	20	50	320	900
1 h	% prež.	100,53	90,00	82,46	58,31*	60,75*
	st. dev.	4,27	3,55	3,53	4,24	4,77
2 h	% prež.	103,74	73,25*	72,69*		
	st. dev.	2,00	3,91	2,70		
4 h	% prež.	65,23*	56,99*	66,00*		
	st. dev.	5,88	5,11	5,08		
		Nitrofurantoin (mg/mL)				
		0,167	0,33			
2 h	% prež.	3,23*	4,60*			
	st. dev.	1,64	2,46			
4 h	% prež.	0,47*	0,30*			
	st. dev.	0,18	0,16			

% prež. – postotak preživjelih bakterija *E. coli* K-12 MG1655 nakon tretmana hidrokinonom i nitrofurantoinom u odnosu na negativnu kontrolu (100 %); st.dev. – standardna devijacija. *Statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu (jednosmjerna analiza varijance, eng. *one-way* ANOVA i *post-hoc* Tukeyev HSD, $p < 0,05$).

Učinak na adheziju

Kao granicu % preživljenja za određivanje anti-adhezivnog učinka ispitivanih uzoraka na stanice karcinoma debelog crijeva Caco-2 i epitela jezika CAL 27 uzimali smo 80 %. Prema tome, na bakterijama *E. coli*, *L. plantarum* i *S. aureus* ispitana je doza arbutina u jednom terapijskom napitku (0,8 mg/mL) tijekom 1 h tretmana dok na *L. fermentum* doza jednog terapijskog napitka ekstrakta medvjete i dnevne doze ekstrakta medvjete. Također, ispitana su potencijalna anti-adhezivna svojstva hidrokinona u koncentracijama od 20 i 50 µg/mL na uropatogenu *E. coli* nakon 1 h tretmana.

Dobiveni rezultati pokazuju da 0,8 mg/mL arbutina (jedan terapijski napitak ekstrakta medvjete) smanjuje adheziju bakterije *L. plantarum* u odnosu na negativnu kontrolu (100 %) na $74,41 \pm 6,71$ % (Caco-2, $p = 0,014$) i $86,75 \pm 4,06$ % (CAL 27, $p = 0,072$), bakterije *E. coli* na $81,09 \pm 5,39$ % (Caco-2, $p = 0,028$) i $83,94 \pm 3,16$ % (CAL 27, $p = 0,098$) dok na adheziju bakterije *S. aureus* nije imala značajan utjecaj s obzirom na negativnu kontrolu ($98,15 \pm 6,39$ % za CAL 27 i $99,76 \pm 5,14$ % za Caco-2).

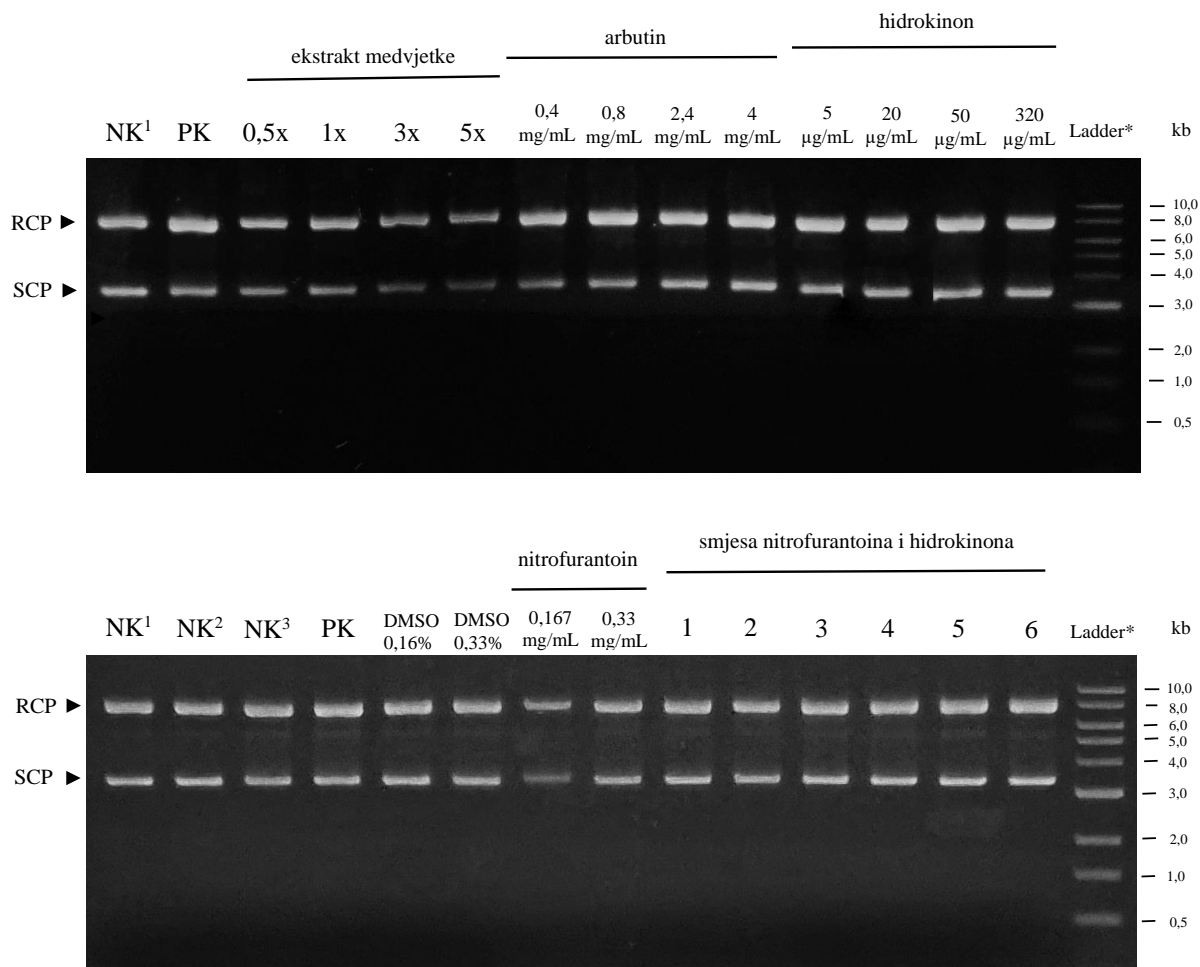
Ekstrakt medvjeteke neovisno o dozi smanjio je vezanje *L. fermentum* na stanice karcinoma epitela jezika (CAL 27) za ~40 % ($1\times - 63,92 \pm 7,48$ %, $p = 0,019$; $3\times - 58,78 \pm 10,16$ %, $p = 0,007$). S druge strane, vezanje na Caco-2 stanice bilo je uvjetovano dozom pri čemu jedan terapijski napitak ekstrakta medvjeteke ne utječe na adhezivna svojstva *L. fermentum* ($96,49 \pm 9,21$ %) dok je dnevna doza smanjila vezanje na $75,19 \pm 8,42$ % u odnosu na negativnu kontrolu (100 %, $p = 0,017$).

Koncentracija 20 $\mu\text{g/mL}$ hidrokinona nije imala utjecaj na adheziju *E. coli* na T24 staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura nakon 1 h tretmana ($89,73 \pm 5,01$ %). S druge strane, 50 $\mu\text{g/mL}$ hidrokinona smanjilo je % adhezije *E. coli* na $27,37 \pm 3,92$ % ($p < 0,001$).

4.7. Utvrđivanje zaštitnog učinka na molekulu DNA uslijed oštećenja uzrokovanih djelovanjem reaktivnih kisikovih radikala

Model DNA plazmida $\phi\text{X174 RF1}$ sastoji se od određene količine superzavijene i relaksirane forme cirkularnog prstena. Rezultati djelovanja UV-fotolize na H_2O_2 molekulu te neposredno na DNA molekulu uz dodatak ispitivanih uzoraka prikazani su na **slici 23** i u **tablici 20**.

Obradom rezultata gel elektroforeze pomoću programa GelAnalyzer te statističkom analizom pokazano je da koncentracija arbutina u dnevnoj dozi ekstrakta medvjeteke (2,4 mg/mL) pokazuje zaštitni učinak na molekulu DNA dok sam ekstrakt medvjeteke i antibiotik nitrofurantoin u profilaktičkoj i terapijskoj dozi ne štite DNA od oksidacijskog oštećenja. Nadalje, hidrokinon u cijelom ispitivanom koncentracijskom rasponu (5 – 900 $\mu\text{g/mL}$) te smjese nitrofurantoina i hidrokinona su očuvale % superzavijene forme plazmida koji se nisu statistički razlikovale od negativne kontrole čime je također dokazano da hidrokinon u smjesi štiti DNA molekulu od oksidacijskih oštećenja uzrokovanih hidrosilnim radikalima nastalih UV djelovanjem na H_2O_2 molekulu.



*1 kb DNA Ladder; SCP-superzavijena cirkularna forma plazmida, RCP-relaksirana cirkularna forma plazmida

NK – negativna kontrola: ¹samo plazmid, ²plazmid + H₂O₂, ³plazmid + UV; PK - pozitivna kontrola, plazmid + H₂O₂ + UV

Smjesa nitrofurantoina i hidrokinona: 0,167 mg/mL N + 5 µg/mL HQ (1); 0,167 mg/mL N + 20 µg/mL HQ (2); 0,167 mg/mL N + 50 µg/mL HQ (3); 0,33 mg/mL N + 5 µg/mL HQ (4); 0,33 mg/mL N + 20 µg/mL HQ (5); 0,33 mg/mL N + 50 µg/mL HQ (6)

Slika 23. Slike gela s prikazom utjecaj ekstrakta medvjjetke (0,5 – 5×), arbutina (0,4 – 2,4 mg/mL), hidrokinona (5 – 900 µg/mL), nitrofurantoina (0,167 – 0,33 mg/mL) i smjesa nitrofurantoina i hidrokinona na oksidacijsko oštećenje DNA (ϕX174 RF1) potaknuto UV-fotolizom H₂O₂ (0,03 M).

Tablica 20. Rezultati eksperimenta ispitivanja zaštitnog učinka ekstrakta medvjette, arbutina, nitrofurantoina, hidrokinona te smjese nitrofurantoina i hidrokinona na oštećenja DNA uzrokovana UV-fotolizom H₂O₂ (model DNA plazmid ϕ X174 RF1).

			ekstrakt medvjette				arbutin (mg/mL)			
	NK	PK	0,5×	1×	3×	5×	0,4	0,8	2,4	4
% očuvane	99,73	71,58	81,3	81,3	68,2	61,4	70,2	76,7	84,6	88,7
SCP			2	1	9	4	5	3	7	9
st. dev.	0,55	7,41	1,63	3,85	1,63	5,82	6,09	4,87	4,56	5,55
			*c,d	*c,d	*a	*a	*c,d	*d	#a	#a,b
	nitrofurantoin (mg/mL)		hidrokinon (μg/mL)							
	0,167	0,33	5	20	50	320	900			
% očuvane	61,23	64,81	94,5	90,1	96,3	88,5	94,0			
SCP			3	6	3	7	5			
st. dev.	6,06	3,39	5,57	3,62	2,36	7,66	6,75			
			#	#	#	#	#			
	smjesa nitrofurantoina i hidrokinona									
	1	2	3	4	5	6				
% očuvane	92,89	94,83	92,3	90,7	89,4	93,2				
SCP			3	1	7	3				
st. dev.	4,79	4,40	3,28	5,43	7,43	2,65				
	#	#	#	#	#	#				

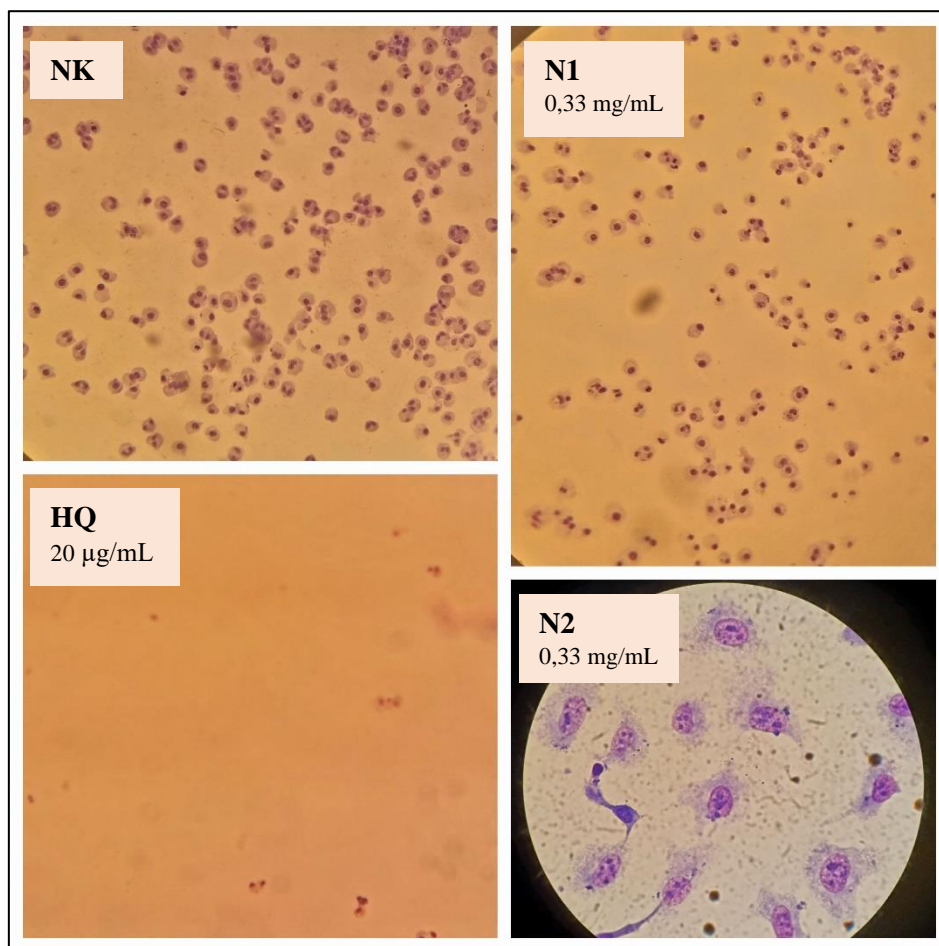
NK- negativna kontrola (plazmid bez UV i H₂O₂; ~100 % očuvane SCP); PK- pozitivna kontrola (plazmid+UV+H₂O₂); Ekstrakt medvjette: 1× – jedan terapijski napitak; SCP – superzavijena cirkularna forma plazmida ϕ X174 RF1 DNA; St. dev. – standardna devijacija

Smjese nitrofurantoina i hidrokinona: 0,167 mg/mL N + 5 μg/mL HQ (1); 0,167 mg/mL N + 20 μg/mL HQ (2); 0,167 mg/mL N + 50 μg/mL HQ (3); 0,33 mg/mL N + 5 μg/mL HQ (4); 0,33 mg/mL N + 20 μg/mL HQ (5); 0,33 mg/mL N + 50 μg/mL HQ (6)

Statistički značajna razlika u odnosu na: *NK, #PK

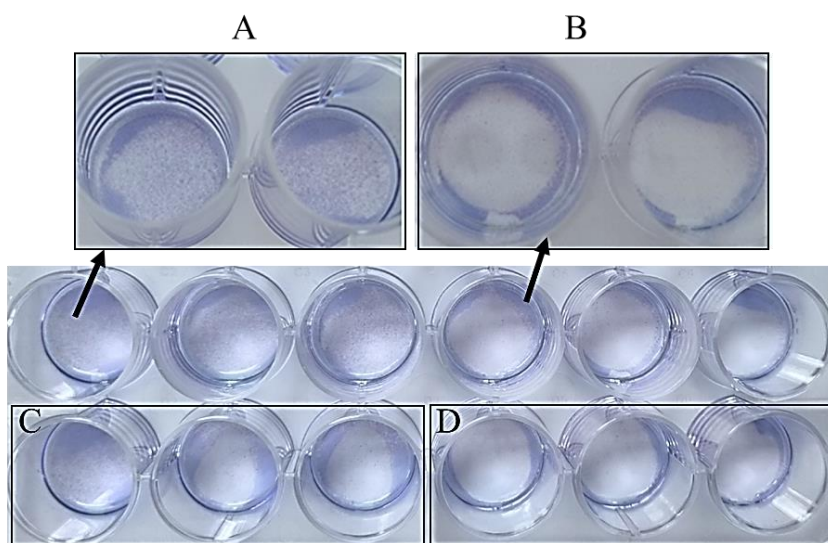
4.8. Genotoksični učinak – mikronukleus *cytome* test

Nakon provedbe mikronukleus *cytome* testa na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura tretiranim koncentracijama hidrokinona (20 i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i nitrofurantoina (0,167 i 0,33 mg/mL) tijekom 2, 4 i 8 h utvrđeno je da hidrokinon negativno utječe na adheziju T24 stanica u tolikoj mjeri da nije bilo moguće analizirati rezultate u sva tri vremena tretmana jer se stanice nisu vezale za predmetna stakalca gdje ih je potrebno fiksirati i obojati kako bi se provela analiza (**slika 24**). Nitrofurantoin je usporio diobu T24 stanica te u tretiranim uzorcima nije bilo dovoljno binuklearnih stanica za analizu (**slika 24**). Samo uzorci tretirani koncentracijom nitrofurantoina od 0,167 mg/mL tijekom najkraćeg vremena tretmana od 2 h su bili zadovoljavajući za analizu.

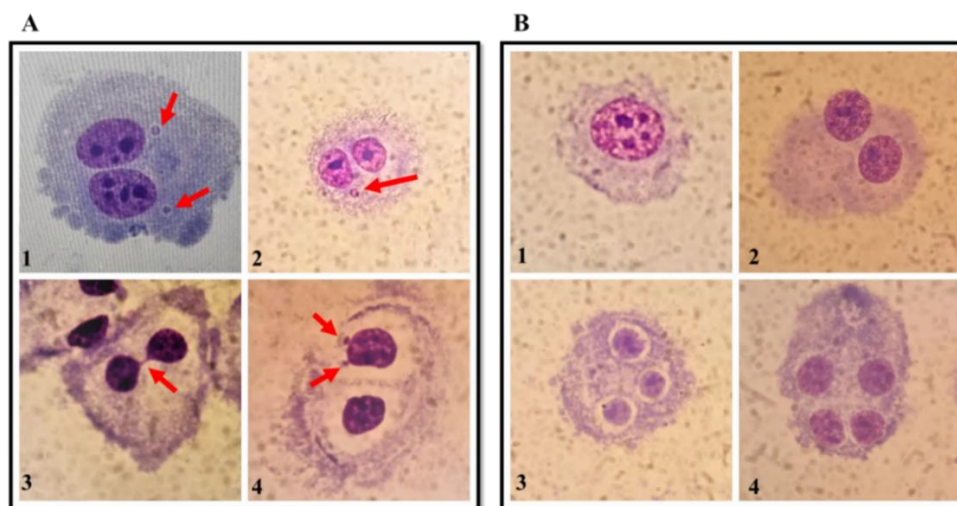


Slika 24. Mikroskopski prikaz fiksiranih i obojenih T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana hidrokinonom (HQ, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i nitrofurantoinom (N, 0,33 mg/mL) tijekom 2 h i provedenog mikronukleus *cytome* testa. NK – negativna kontrola, netretirane T24 stanice; N1 – nitrofurantoin, 0,33 mg/mL , 2h, povećanje 100 \times ; N2 – nitrofurantoin, 0,33 mg/mL , 2 h, povećanje 400 \times .

Konačno, ispitane su manje koncentracije hidrokinona (5 i 10 $\mu\text{g/mL}$) tijekom 2 i 8 h, nitrofurantoina (0,167 mg/mL) te smjese hidrokinona i nitrofurantoina tijekom 2 h tretmana, kako utječu na genetički materijal T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura. Također i manje ispitivane koncentracije hidrokinona (5 i 10 $\mu\text{g/mL}$, 8 h) su imale negativan utjecaj na staničnu adheziju u odnosu na netretirane T24 stanice (negativna kontrola) što je vidljivo na **slici 25B** i **25C** iako ne u tolikom mjeri kao prethodno testirane veće koncentracije, te je bilo dovoljno binuklearnih stanica za analizu. Na **slici 25D** prikazane su fiksirane T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura nakon 8 h tretmana smjesom hidrokinona koncentracije 5 $\mu\text{g/mL}$ i nitrofurantoina koncentracije 0,167 mg/mL gdje je vidljivo da je smjesa utjecala na adheziju T24 stanica u tolikoj mjeri da nema dovoljno stanica za analizu. Na **slici 26A** prikazane su primjeri binuklearnih stanica nakon provedenog mikronukleus *cytome* testa s mikronukleusima (1 i 2) te nukleoplazmatskim mostom (3) i jezgrinim pupovima (4) dok su na **slici 26B** prikazani primjeri mononuklearne (1), binuklearne (2), trinuklearne (3) i tetranuklearne (4) stanice nakon provedenog mikronukleus *cytome* testa.



Slika 25. Prikaz rezultata mikronukleus *cytome* testa u 24-well pločicama s vidljivim negativnim utjecajem hidrokinona na adheziju T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura na pokrovna stakalca nakon tretmana od 8 h . Fotografija nakon fiksiranja i bojenja T24 stanica 5 %-tnom otopinom Giemsa boje. **A** – uvećana fotografija negativne kontrole (netretirane T24 stanice), **B** – uvećana fotografija fiksiranih T24 stanica nakon 8 h tretmana hidokinonom koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$, **C** – fiksirane T24 stanice nakon 8 h tretmana hidrokinonom koncentracije 5 $\mu\text{g/mL}$, **D** - fiksirane T24 stanice nakon 8 h tretmana smjesom hidrokinona koncentracije 5 $\mu\text{g/mL}$ i nitrofurantoina koncentracije 0,167 mg/mL.



Slika 26. Mikroskopski prikaz (400 \times) T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon provedenog mikronukleus *cytome* testa: **(A)** binuklearne stanice s dva mikronukleusa (1), jednim mikronukleusom (2), nukleoplazmatskim mostom (3), dva jezgrina pupa (4); **(B)** mono- (1), bi- (2), tri- (3), tetranuklearne stanice (4).

Ukupni rezultati mikronukleus *cytome* testa u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura tretiranim antibiotikom nitrofurantoinom i hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom tretmana od 2 i 8 h prikazani su u **tablici 21**. Broj mikronukleusa (MN) u binuklearnim stanicama (BNS) T24 statistički je značajno veći u svim tretiranim uzorcima u oba vremena izlaganja u odnosu na negativnu kontrolu. Najveća učestalost MN od 31,2 na 1000 pregledanih BNS T24 utvrđena je u uzorku tretiranom smjesom hidrokinona (5 $\mu\text{g/mL}$) i nitrofurantoina (0,167 mg/mL) tijekom 2 h (MIX 1, **tablica 21**). U uzorku tretiranom smjesom hidrokinona (10 $\mu\text{g/mL}$) i nitrofurantoina (0,167 mg/mL; MIX 2) tijekom 2 h nije bilo dovoljno BNS za analizu zbog prevelikog utjecaja na staničnu adheziju. Učestalost MN u uzorcima tretiranim tijekom 2 h nitrofurantoinom te hidrokinonom bila je otprilike jednaka (20,8 – 24,2 MN na 1000 BNS, **tablica 21**), a duplo veća koncentracija hidrokinona (10 $\mu\text{g/mL}$) nije značajno utjecala na povećanje učestalosti MN u odnosu na manju ispitivanu koncentraciju hidrokinona (5 $\mu\text{g/mL}$). S druge strane, broj MN nakon tretmana smjesom nitrofurantoina i hidrokinona statistički je značajno veći od zbroja MN u uzorcima tretiranim pojedinačnim spojevima izraženo na 6000 BNS ($p = 0,001$, χ^2 - test). Takav oblik djelovanja naziva se sinergizam, odnosno djelovanje smjese na učestalost MN veća je od zbroja djelovanja pojedinačnih spojeva. Veća ispitivana koncentracija hidrokinona (10 $\mu\text{g/mL}$) značajno je utjecala na adheziju T24 stanica pa su zbog nedovoljnog broja BNS rezultati izraženi na 500 BNS T24. Također, vrijeme tretmana nije utjecalo na broj MN-a u uzorcima tretiranim hidrokinonom.

Tablica 21. Rezultati mikronukleus *cytome* testa u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura tretiranim antibiotikom nitrofurantoinom i hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom 2 i 8 h u uvjetima *in vitro*. Prikazani su rezultati učestalosti mikronukleusa (MN) u binuklearnim T24 stanicama (BNS) te njihova raspodjela.

Tretman 2 h								
Parametar / Uzorak	NK ¹	NK ²	PK	N (167 µg/mL)	HQ (5 µg/mL)	HQ (10 µg/mL)	MIX 1	MIX 2
Učestalost mikronukleusa (MN)								
Σ MN / 6000 BNS	86	75	↑138 ^e	↑135 ^e	↑125 ^e	↑145 ^e	↑187 ^{a, b, c, d}	Nema dovoljno BNS
Broj MN / 1000 BNS	14,3	12,5	23	22,5	20,8	24,2	31,2	Nema dovoljno BNS
Raspodjela binuklearnih T24 stanica s mikronukleusima (BN _{MN})								
Σ BNS _{MN} / 6000 BNS	78	69	↑107 ^e	↑127	↑110 ^e	↑135	↑165 ^{a, c}	Nema dovoljno BNS
Σ BNS _{MN1}	71	63	92 ^{d, e}	↑118	↑96 ^e	↑125	↑141 ^{a, c}	Nema dovoljno BNS
Σ BNS _{MN2}	6	6	↑17 ^b	7 ^{a, e}	13	10 ^e	↑23 ^{a, b, d}	Nema dovoljno BNS
Σ BNS _{MN3}	1	0	4	1	1	0	0	Nema dovoljno BNS
Ukupni % BNS _{MN}	1,43	1,25	2,3	2,25	2,08	2,42	3,12	Nema dovoljno BNS
Σ BNS _{MN} / 1000 BNS	13	11,5	17,8	21,2	18,3	22,5	27,5	Nema dovoljno BNS
Tretman 8 h								
Parametar / Uzorak	NK ¹	NK ²	PK	HQ (5 µg/mL)	HQ (10 µg/mL)	MN – mikronukleus; BNS – binuklearne stanice; NK ¹ – negativna kontrola, netretirane stanice; NK ² – negativna kontrola, stanice tretirane 0,16 % otopinom DMSO-a korištenim za pripremu uzorka nitrofurantoina; PK – pozitivna kontrola (0,4 µg/mL doksorubicina); N – nitrofurantoin; HQ – hidrokinon; MIX 1 – N (167 µg/mL) + HQ (5 µg/mL); MIX 2 – N (167 µg/mL) + HQ (10 µg/mL); * izraženo na ukupno 3000 binuklearnih stanica odnosno 500 binuklearnih stanica po uzorku. Ukupni broj pregledanih stanica iznosio je 6000 (u duplikatu za 3 zasebna eksperimenta), a analiza preparata provedena je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa (1000×) pregledom 1000 binuklearnih stanica po uzorku (osim kod uzorka HQ 10 µg/mL, 500 binuklearnih stanica). Statistička značajnost ispitana je pomoću χ^2 -testa, uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$ (statistički značajne razlike u odnosu na NK ¹ označene su oznakom (↑), a u odnosu na sve druge uzorke malim slovima: a – PK, b – N (167 µg/mL), c – HQ (5 µg/mL), d – HQ (10 µg/mL), e – MIX 1).		
Učestalost mikronukleusa (MN)								
Σ MN / 6000 BNS	72	65	↑147 ^d	↑167 ^d	↑133 ^{a, c *}			
Broj MN / 1000 BNS	12	10,8	24,5	27,8	22,2 *			
Raspodjela binuklearnih T24 stanica s mikronukleusima (BN _{MN})								
Σ BNS _{MN} / 6000 BNS	68	62	↑133 ^d	↑143 ^d	↑112 ^{a, c *}			
Σ BNS _{MN1}	62	60	↑119 ^d	↑122 ^d	↑95 ^{a, c *}			
Σ BNS _{MN2}	6	2	14	↑18	↑13 *			
Σ BNS _{MN3}	0	0	0	3	4 *			
Ukupni % BNS _{MN}	1,2	1,08	2,45	2,78	2,22 *			
Σ BNS _{MN} / 1000 BNS	11,3	10,3	22,2	23,8	18,7 *			

Rezultati pojavnosti jezgrinih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova (NPB) u binuklearnim stanicama (BNS) T24 nakon tretmana nitrofurantoinom i hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom 2 h tretmana prikazani su u **tablici 22**. Učestalost NB-a u BNS T24 negativne kontrole je vrlo niska (1,3 NB na 1000 stanica). Tretman T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nitrofurantoinom i hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom 2 h izazvao je statistički značajan porast NB-a u odnosu na negativnu kontrolu. Najveća učestalost NB-a bila je u uzorku tretiranom smjesom nitrofurantoina (0,167 mg/mL) i hidrokinona (5 µg/mL; MIX 1) te iznosi 8,5 NB na 1000 analiziranih BNS pri čemu je broj NB-a u smjesi statistički značajno veći od broja NB-a u uzorcima tretiranim pojedinačnim spojevima izraženo na 6000 BNS, čime je dokazano njihovo sinergističko djelovanje ($p = 0,036$; , χ^2 - test). Učestalost NB-a u ostalim uzorcima bila je 5 – 8,2 NB-a na 1000 BNS (**tablica 22**). Nema statistički značajne razlike u broju NB-a između dvije ispitivane koncentracije hidrokinona. Broj NPB-a u svim uzorcima je statistički značajno veći od negativne kontrole pri čemu je najveća učestalost zabilježena nakon tretmana hidrokinonom (10 µg/mL) s 18,5 NPB-a na 1000 analiziranih BNS T24. Isto tako može se primijetiti da je broj NPB-a u uzorku tretiranom većom koncentracijom hidrokinona statistički značajno veći u odnosu na manju koncentraciju hidrokinona što kod MN-a i NB-a nije bio slučaj. Iako je broj NPB-a u uzorku tretiranom smjesom nitrofurantoina (0,167 mg/mL) i hidrokinona (5 µg/mL, MIX 1) statistički značajno veći u odnosu na negativnu kontrolu (14,2 NPB-a na 1000 BNS T24) on se statistički ne razlikuje od broja NPB-a uzorka tretiranog samo hidrokinonom (10,3 NPB-a na 1000 BNS T24) dok se razlikuje od broja NPB-a u uzorku tretiranom samo nitrofurantoinom (9 NPB-a na 1000 BNS T24). Unatoč tome, zbroj djelovanja pojedinačnih spojeva (nitrofurantoina i hidrokinona) na formiranje NPB-a u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura statistički je značajno manji od broja NPB-a nastalih djelovanjem smjese (izraženo na 6000 BNS-a) te se može zaključiti da nitrofurantoin i hidrokinon u smjesi djeluju sinergistički ($p = 0,022$, χ^2 - test). Nije bilo moguće odrediti broj NB-a i NPB-a u uzorku tretiranom smjesom nitrofurantoina (0,167 mg/mL) i hidrokinona (10 µg/mL; MIX 2) tijekom 2 h zbog nedovoljnog broja BNS na stakalcu. Rezultati pojavnosti NB i NPB u binuklearnim stanicama nakon tretmana hidrokinonom (5 i 10 µg/mL) tijekom 8 h prikazani su u **tablici 23**. Koncentracija hidrokinona 10 µg/mL značajno je utjecala na adheziju T24 stanica pa su rezultati izraženi na samo 500 BNS. Broj NB je statistički značajno veći u uzorku tretiranom koncentracijom hidrokinona 10 µg/mL tijekom 8 h u odnosu na manju koncentraciju dok kod broja NPB-a nema statistički značajne razlike. Može se primijetiti da vrijeme tretmana (2 i 8 h) nije utjecalo na razliku u broju NB-a i NPB-a u uzorcima tretiranim hidrokinonom.

Tablica 22. Rezultati mikronukleus *cytome* testa u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura tretiranim antibiotikom nitrofurantoinom i hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom 2 h u uvjetima *in vitro*. Prikazani su rezultati pojavnosti jezgrinih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova (NPB) u binuklearnim T24 stanicama (BNS) te njihova raspodjela.

Tretman 2 h								
Parametar Uzorak	NK ¹	NK ²	PK	N (167 µg/mL)	HQ (5 µg/mL)	HQ (10 µg/mL)	MIX 1	MIX 2
Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih T24 stanica koje ih sadrže (BNS _{NB})								
Σ NB / 6000 BNS	8	4	↑21 ^d	↑30 ^e	↑33 ^e	↑37 ^a	↑51 ^{a,b}	Nema dovoljno BNS
Broj NB / 1000 BNS	1,3	0,7	3,5	5	5,5	6,2	8,5	Nema dovoljno BNS
ΣBNS _{NB} / 6000 BNS	8	4	↑19 ^d	↑30 ^e	↑33 ^e	↑37 ^a	↑51 ^{a,b}	Nema dovoljno BNS
Ukupni % BNS _{NB}	0,13	0,07	0,35	0,5	0,55	0,62	0,85	Nema dovoljno BNS
ΣBNS _{NB} / 1000 BNS	1,3	0,7	3,5	5	5,5	6,2	8,5	Nema dovoljno BNS
Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih T24 stanica koji ih sadrže (BNS _{NPB})								
Σ NPB / 6000 BNS	7	9	↑44 ^{d,e}	↑54 ^{d,e}	↑62 ^d	↑111 ^{a,b,c}	↑85 ^{a,b}	Nema dovoljno BNS
Broj NPB / 1000 BNS	1,2	1,5	7,3	9	10,3	18,5	14,2	Nema dovoljno BNS
ΣBNS _{NPB} / 6000 BNS	7	8	↑35 ^{b,c}	↑54 ^{a,c,d,e}	↑77 ^{a,b,d}	↑111 ^{a,b,c}	↑85 ^{a,b}	Nema dovoljno BNS
Ukupni % BNS _{NPB}	0,12	0,15	0,73	0,9	1,03	1,85	1,42	Nema dovoljno BNS
ΣBNS _{NPB} / 1000 BNS	1,2	1,5	7,3	9	10,3	18,5	14,2	Nema dovoljno BNS

NB - jezgrin pup; NPB – nukleoplazmatski most; BNS – binuklearne stanice; NK¹ – negativna kontrola, netretirane stanice; NK² – negativna kontrola, stanice tretirane 0,16 % otopinom DMSO-a korištenim za pripremu uzorka nitrofurantoina; PK - pozitivna kontrola (0,4 µg/mL doksorubicina); N – nitrofurantoin; HQ – hidrokinon; MIX 1 – N (167 µg/mL) + HQ (5 µg/mL); MIX 2 - N (167 µg/mL) + HQ (10 µg/mL).

Ukupni broj pregledanih T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura iznosio je 6000 (u duplikatu za 3 zasebna eksperimenta), a analiza preparata provedena je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa (1000×) pregledom 1000 binuklearnih stanica (BNS) po uzorku. Statistička značajnost ispitana je pomoću χ^2 -testa, uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$ (statistički značajne razlike u odnosu na NK¹ označene su oznakom (↑), a u odnosu na sve druge uzorke malim slovima: a – PK, b - N (167 µg/mL), c - HQ (5 µg/mL), d - HQ (10 µg/mL), e – MIX 1).

Tablica 23. Rezultati mikronukleus *cytome* testa u netretiranim (kontrolnim) T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura te T24 stanicama tretiranim hidrokinonom nakon 8 h tretmana u uvjetima *in vitro*. Prikazani su rezultati pojavnosti jezgrinih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova (NPB) u binuklearnim T24 stanicama (BNS) te njihova raspodjela.

Tretman 8 h					
Parametar / Uzorak	NK ¹	NK ²	PK	HQ (5 µg/mL)	HQ (10 µg/mL)
Pojavnost jezgrinih pupova (NB) i binuklearnih T24 stanica koje ih sadrže (BNS _{NB})					
Σ NB / 6000 BNS	5	4	↑51 ^{b,c}	↑33 ^{a,c}	↑44 ^{a,b*}
Broj NB / 1000 BNS	0,8	0,7	8,5	5,5	7,3 *
ΣBNS _{NB} / 6000 BNS	5	4	↑51 ^{b,c}	↑33 ^{a,c}	↑44 ^{a,b*}
Ukupni % BNS _{NB}	0,08	0,07	0,85	0,55	0,73 *
ΣBNS _{NB} /1000 BNS	0,8	0,7	8,5	5,5	7,3 *
Pojavnost nukleoplazmatskih mostova (NPB) binuklearnih T24 stanica koji ih sadrže (BNS _{NPB})					
Σ NPB / 6000 BNS	7	6	↑71 ^{b,c}	↑46 ^a	↑19 ^{a*}
Broj NPB / 1000 BNS	1,2	1	11,8	7,7	3,2 *
ΣBNS _{NPB} / 6000 BNS	7	6	↑65 ^{b,c}	↑42 ^a	↑19 ^{a*}
Ukupni % BNS _{NPB}	0,12	0,1	1,18	1,9	0,32 *
ΣBNS _{NPB} /1000 BNS	1,2	1	11,8	19	3,2 *

NB - jezgrin pup; NPB – nukleoplazmatski most; BNS – binuklearne stanice; NK¹ – negativna kontrola, netretirane stanice; NK² – negativna kontrola, stanice tretirane 0,16 % otopinom DMSO-a korištenim za pripremu uzorka nitrofurantoina; PK - pozitivna kontrola (0,4 µg/mL doksorubicina); HQ – hidrokinon; * izraženo na ukupno 3000 binuklearnih stanica odnosno 500 binuklearnih stanica po uzorku.

Ukupni broj pregledanih T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura iznosio je 6000 (u duplikatu za 3 zasebna eksperimenta), a analiza preparata provedena je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa (1000×) pregledom 1000 binuklearnih stanica (BNS) po uzorku. Statistička značajnost ispitana je pomoću χ^2 -testa, uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$ (statistički značajne razlike u odnosu na NK¹ označene su oznakom (↑), a u odnosu na sve druge uzorke malim slovima: a – PK, b - HQ (5 µg/mL), c - HQ (10 µg/mL).

Rezultati stanične kinetike i preživljenja T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura tretiranih nitrofurantoinom, hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom tretmana od 2 h u uvjetima *in vitro* prikazani su u **tablici 24**, a samo hidrokinonom tijekom tretmana od 8 h u **tablici 25**.

Najveći indeks diobe jezgara (NDI) zabilježen je kod negativne kontrole i iznosi 1,726. Statistički značajna odstupanja od negativne kontrole pokazana su nakon tretmana profilaktičkom (0,167 mg/mL) i terapijskom dozom (0,33 mg/mL) nitrofurantoina (1,447 i 1,261) te smjesama profilaktičke doze nitrofurantoina i dvije ispitivane koncentracije hidrokinona (5 µg/mL, MIX 1, 1,225; 10 µg/mL, MIX 2, 1,077) tijekom 2 h. Također može se

primijetiti da je nakon tretmana smjesama nitrofurantoina i hidrokinona od 2 h značajno manji indeks diobe jezgara u odnosu na tretman pojedinačnim spojevima. S obzirom da se indeks diobe jezgara T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon djelovanja hidrokinonom ne razlikuje u odnosu na negativnu kontrolu može se zaključiti da u smjesi hidrokinon potencira negativno djelovanje nitrofurantoina na zaustavljanje diobe stanica te se to djelovanje u smjesi naziva potenciranje. Smanjenje indeksa diobe jezgara upućuje na sposobnost testiranih spojeva da uspore i/ili zakoče diobu T24 stanica s naglaskom na prijelaz stanica iz M_1 u M_2 što kao posljedicu ima porast broja stanica u M_1 . Prolongacijom tretmana na 8 h statistički se značajno smanjio indeks diobe jezgara T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon inkubacije uzoraka profilaktičkom dozom nitrofurantoina (1,059) i dozom hidrokinona od 10 $\mu\text{g/mL}$ (1,231) čime je pokazano da duže vrijeme izlaganja nitrofurantoinu i hidrokinonu ima jače djelovanje na usporavanje i/ili zakočenje diobe. Sve navedeno odnosi se i na vrijednost replikacijskog indeksa (**tablice 24 i 25**).

Najveći broj stanica u apoptozi određen je u uzorku T24 stanica tretiranih hidrokinonom u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ tijekom 2 h (15/6000) i 8 h (25/3000) pri čemu je broj stanica u apoptozi kod tretmana 8 h statistički značajno veći u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$, χ^2 test).

Također, na temelju broja živih i mrtvih stanica u negativnoj kontroli i tretiranim uzorcima, određene su vrijednosti proliferacijskog indeksa (CBPI). Najveća vrijednost CBPI određena je u negativnoj kontroli (1,718), a statistički značajna odstupanja od negativne kontrole označena su u **tablicama 24 i 25** te se slažu s NDI rezultatima.

Nadalje, na temelju rezultata izračunati su i postoci citostaze za sve tretirane uzorke. Citostatski učinak nitrofurantoina ovisan je o dozi te kod koncentracije koja odgovara profilaktičkoj dozi iznosi 27,3 %, a terapijskoj dozi 45,9 %. Hidrokinon nije pokazao značajan postotak citostaze (2,3 – 5,2 %) dok su smjese koncentracija koje odgovaraju profilaktičkoj dozi nitrofurantoina i ispitivanim koncentracijama hidrokinona (49,3 i 64,1 %) pokazale snažniji citostatski učinak od hidrokinona. S obzirom da je smjesa hidrokinona (10 $\mu\text{g/mL}$) i nitrofurantoina (0,167 mg/mL ; MIX 2) pokazala veći % citostaze u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura u odnosu na samo nitrofurantoin (45,9 %) može se zaključiti da hidrokinon iako bez učinka na % citostaze kao pojedinačni spoj u smjesi potencira djelovanje nitrofurantoina (potencijacija). Također produženo vrijeme tretmana od 8 h nitrofurantoinom i hidrokinonom utječe na povećanje % citostaze za ~10 – 20 %.

Tablica 24. Rezultati stanične kinetike i preživljenja T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura tretiranih nitrofurantoinom, hidrokinonom te njihovom smjesom tijekom 2 h u uvjetima *in vitro*.

Tretman 2 h							
Parametar / Uzorak	NK	N (167 µg/mL)	N (330 µg/mL)	HQ (5 µg/mL)	HQ (10 µg/mL)	MIX 1	MIX 2
Σ M ₁	1785	3383	4491	1893	2066	4698	5562
Σ M ₂	4124	2567	1467	4045	3868	1257	416
Σ M ₃	44	36	27	40	42	43	18
Σ M ₄	47	14	15	22	24	2	4
NDI	1,726	↓1,447	↓1,261	1,699	1,671	↓1,225	↓1,077
Replikacijski indeks	100	61,94	36,02	96,82	92,89	31,28	10,68
Σ stanica u apoptozi	8	10	11	9	15	8	9
% stanica u apoptozi	0,13	0,17	0,18	0,15	0,25	0,13	0,15
CBPI	1,718	↓1,445	↓1,259	1,695	1,666	↓1,225	↓1,077
% citostaze	0	27,3	45,9	2,3	5,2	49,3	64,1

NK – negativna kontrola, netretirane stanice; PK - pozitivna kontrola (0,4 µg/mL doksorubicina); N – nitrofurantoin; HQ – hidrokinon; MIX 1 – N (167 µg/mL) + HQ (5 µg/mL); MIX 2 - N (167 µg/mL) + HQ (10 µg/mL). Rezultat je izražen na 6000 pregledanih stanica (po dvije replike u 3 zasebna eksperimenta), a analiza je provedena na svjetlosnom mikroskopu (1000×). Statistička obrada podataka provedena je pomoću χ^2 -testa uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$ (statistički značajne razlike u odnosu na NK označene su oznakom (↓)).

Replikacijski indeks izračunat je prema formuli (Lorge i sur., 2008):

$$RI = \{[(\langle \text{broj dvojezgrenih stanica} \rangle + \langle 2 \times \text{broj višejezgrenih stanica} \rangle) \div (\text{ukupan broj stanica})] / [(\langle \text{broj dvojezgrenih stanica} \rangle + \langle 2 \times \text{broj višejezgrenih stanica} \rangle) / (\text{ukupan broj stanica u kontrolnoj skupini})]\} \times 100.$$

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

$$NDI = (M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / N$$

gdje su M₁ – M₄ broj stanica s jednom do četiri jezgre, a N ukupni broj izbrojenih živih stanica.

Proliferacijski indeks (engl. *Cytokinesis-Block Proliferation Index*, **CBPI**) izračunat je prema formuli (OECD, 2016):

$$CBPI = [(\text{broj jednojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj dvojezgrenih stanica}) + (3 \times \text{broj višejezgrenih stanica})] / (\text{ukupan broj stanica})$$

% citostaze izračunat je prema formuli (OECD, 2016):

$$\% \text{ citostaze} = 100 - 100 \times \{(\text{CBPI skupine} - 1) / (\text{CBPI kontrolne skupine})\}$$

Tablica 25. Rezultati stanične kinetike i preživljenja T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura tretiranih nitrofurantoinom i hidrokinonom tijekom 8 h u uvjetima *in vitro*.

Tretman 8 h				
Parametar / Uzorak	NK	N (167 µg/mL)	HQ (5 µg/mL)	HQ (10 µg/mL)
Σ M ₁	2690	5673	3368	4671
Σ M ₂	3270	309	2569	1286
Σ M ₃	24	9	42	30
Σ M ₄	16	9	22	13
NDI	1,561	↓1,059	1,453	↓1,231
Replikacijski index	100	10,29	80,51	40,96
Σ stanica u apoptozi	10	15	17	↑25*
% stanica u apoptozi	0,17	0,25	0,28	↑0,83*
CBPI	1,558	↓1,058	1,449	↓1,229
% citostaze	0	50,0	10,9	32,9

NK¹ – negativna kontrola, netretirane stanice; NK² – negativna kontrola, stanice tretirane 0,16 % DMSO korištenim za pripremu uzorka nitrofurantoina; PK – pozitivna kontrola (0,4 µg/mL doksorubicina); N – nitrofurantoin; HQ – hidrokinon. Rezultat je izražen na 6000 pregledanih stanica (po dvije replike u 3 zasebna eksperimenta), a analiza je provedena na svjetlosnom mikroskopu (1000×). Statistička obrada podataka provedena je pomoću χ^2 -testa uz granicu statističke značajnosti $p < 0,05$ (statistički značajne razlike u odnosu na NK označene su oznakama (↓ / ↑)). *izraženo na ukupno 3000 stanica

Replikacijski indeks izračunat je prema formuli (Lorge i sur., 2008):

$$RI = \{[(\langle \text{broj dvojezgrenih stanica} \rangle + \langle 2 \times \text{broj višejezgrenih stanica} \rangle) \div (\text{ukupan broj stanica})] / [(\langle \text{broj dvojezgrenih stanica} \rangle + \langle 2 \times \text{broj višejezgrenih stanica} \rangle) / (\text{ukupan broj stanica u kontrolnoj skupini})]\} \times 100.$$

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

$$NDI = (M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / N$$

gdje su M₁ – M₄ broj stanica s jednom do četiri jezgre, a N ukupni broj izbrojenih živih stanica.

Proliferacijski indeks (engl. *Cytokinesis-Block Proliferation Index*, **CBPI**) izračunat je prema formuli (OECD, 2016):

$$CBPI = [(\text{broj jednojezgrenih stanica}) + (2 \times \text{broj dvojezgrenih stanica}) + (3 \times \text{broj višejezgrenih stanica})] / (\text{ukupan broj stanica})$$

% citostaze izračunat je prema formuli : % citostaze = 100 - 100 × {(CBPI skupine - 1) / (CBPI kontrolne skupine)}

% citostaze izračunat je prema formuli (OECD, 2016):

$$\% \text{ citostaze} = 100 - 100 \times \{(\text{CBPI skupine} - 1) / (\text{CBPI kontrolne skupine})\}$$

4.9. Proteomska analiza T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura

4.9.1. Proteomska analiza nakon tretmana hidrokinonom tijekom 2 h

Rezultati dobiveni proteomskom analizom nakon tretmana T24 stanica koncentracijama hidrokinon 20 i 320 $\mu\text{g/mL}$ od 2 h pokazuju prekomjernu ekspresiju 17 proteina (relativni omjer $\geq 1,3$) u odnosu na netretirane stanice (kontrola, $p < 0,05$) (**tablica 26**). Obilježavanjem po pravilima genske ontologije koja objedinjuje domene staničnu komponentu, molekularnu funkciju i biološki proces u kojem protein sudjeluje, uočeno je da tretman hidrokinonom povećava ekspresiju proteina koji su uključeni u glikolitički proces (GO:0050896), odgovor na podražaj (GO:0050896) i inicijaciju translacije (GO:0006413). Vidljivo je da hidrokinon u minimalnoj i maksimalnoj dozi prisutnoj u mokraćnom mjehuru nakon konzumacije jednog terapijskog napitka ekstrakta medvjete aktivira signalne proteine koji pospješuju adaptaciju na stres (14-3-3 epsilon protein (**YWHAE**) i 14-3-3 zeta/delta protein (**YWHAZ**)), toplinskog šoka (eng. *heat shock protein*, HSP 90-alfa (**HSP90AA1**), HSP 90-beta (**HSP90AB1**) i HSP 90 ko-šaperon Cdc37 (**CDC37**)), odgovora na oksidacijski stres (peroksiredoksin-1 (**PRDX1**)), glikolize/glukoneogeneze (alfa-enolaza (**ENO1**), fruktoza-bisfosfat aldolaza A (**ALDOA**), fruktoza-bisfosfat aldolaza C (**ALDOC**), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (**GAPDH**) i trioza-fosfat izomeraza (**TPI1**)) i inicijacije translacije (eukariotski inicijacijski faktor 4A-I (**EIF4A1**) i faktor inicijacije eukariotske translacije 4 gama 1 (**EIF4G1**)) (**tablica 22**) (UniProt, 2023). Za određivanje protein-protein interakcija između identificiranih proteina korištena je STRING analiza koja je ukazala na djelomičnu biološku povezanost identificiranih proteina (p vrijednost obogaćivanja PPI iznosi $< 1,0 \times 10^{-16}$ što ukazuje na to da čvorovi nisu nasumični te da je promatrani broj rubova značajan; **slika 27**).

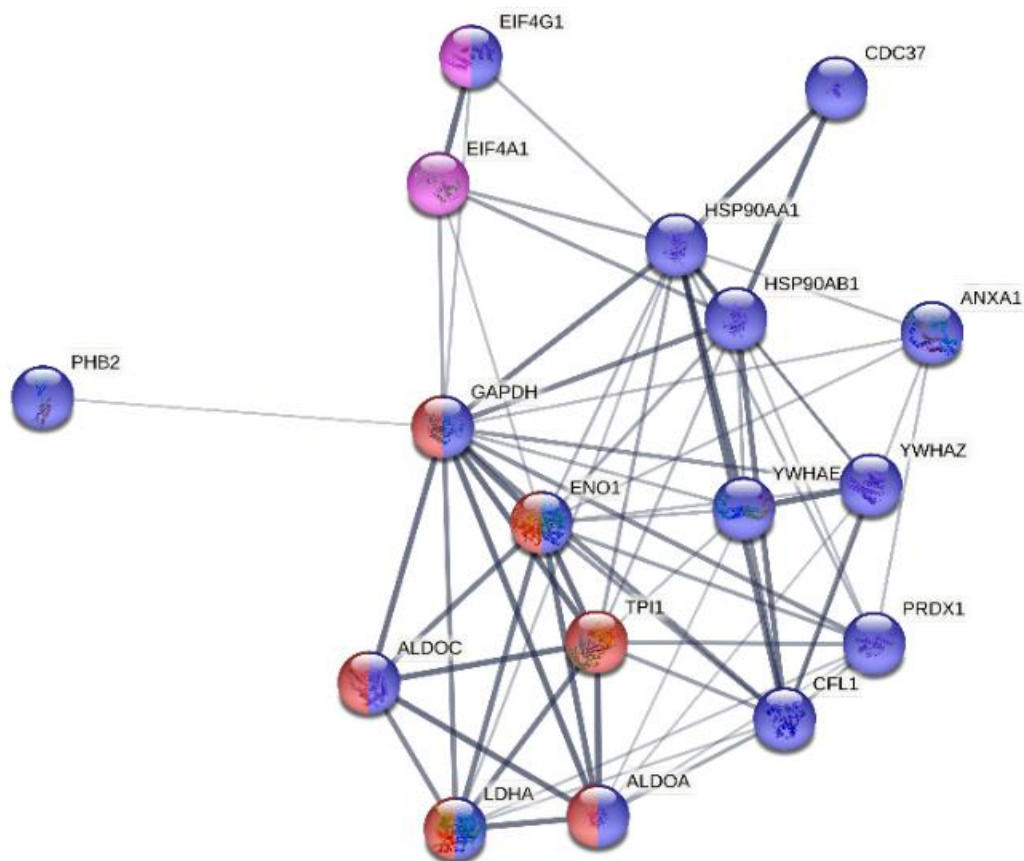
Tablica 26. Pregled promjena u sadržaju staničnih proteina T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana koncentracijama hidrokinona 20 i 320 µg/mL od 2 h.

Pristupni broj ^a	Gen ^b	Ime proteina	Biološki procesi ^c (Genska ontologija-GO)	20 µg/mL 2 h		320 µg/mL 2 h	
				Relativni omjer ^d	p-vrijednost	Relativni omjer ^d	p-vrijednost
P06733	<i>ENO1</i>	alfa-enolaza (anolaza 1)	Glikolitički proces (GO:0050896), Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0027	1,4	0,0046
P04075	<i>ALDOA</i>	fruktoza-bisfosfat aldolaza A	Glikolitički proces (GO:0050896), Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0223	1,4	0,0044
P09972	<i>ALDOC</i>	fruktoza-bisfosfat aldolaza C	Glikolitički proces (GO:0050896), Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,4	0,0001	1,7	0,0001
P04406	<i>GAPDH</i>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	Glikolitički proces (GO:0050896), Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,5	0,0133	1,4	0,0055
P60174	<i>TPII</i>	trioza-fosfat izomeraza	Glikolitički proces (GO:0050896)	1,3	0,0118	1,3	0,0018
P00338	<i>LDHA</i>	L-laktat dehidrogenaza A lanac	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0025	1,4	0,0021
Q16543	<i>CDC37</i>	Hsp90 ko-šaperon Cdc37	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,7	0,0001	1,3	0,0058
Q06830	<i>PRDX1</i>	peroksiredoksin-1	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0035	1,4	0,0008

Nastavak tablice 26

P07900	<i>HSP90AA1</i>	protein toplinskog šoka HSP 90-alfa	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,4	0,0055	1,4	0,0097
P08238	<i>HSP90AB1</i>	protein toplinskog šoka HSP 90-beta	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,2	0,2011	1,4	0,0193
P04083	<i>ANXA1</i>	aneksin A1	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0018	1,3	0,0221
P63104	<i>YWHAZ</i>	14-3-3 protein zeta/delta	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0010	1,4	0,0078
P62258	<i>YWHAE</i>	14-3-3 protein epsilon	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0005	1,3	0,0027
P23528	<i>CFL1</i>	kofilin-1	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0034	1,5	0,0062
Q99623	<i>PHB2</i>	prohibitin-2	Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0225	1,4	0,0107
P60842	<i>EIF4A1</i>	eukariotski inicijacijski faktor 4A-I	Inicijacija translacije (GO: 0006413), Odgovor na podražaj (GO:0050896)	1,3	0,0178	1,7	0,0001
Q04637	<i>EIF4G1</i>	faktor inicijacije eukariotske translacije 4 gama 1	Inicijacija translacije (GO: 0006413)	1,0	0,3184	1,5	0,0107

^a Jedinstveni alfanumerički identifikator svakog unosa u UniProt bazi podataka; ^b Jedinstveni alfanumerički identifikator koji se koristi za predstavljanje gena; ^c Biološki proces(i) prema genskoj ontologiji (GO); ^d Omjer srednje vrijednosti signala (tretman / kontrolni uzorak) izračunat iz MRM (eng. *Multiple-reaction monitoring*) podataka tri biološka ponavljanja.



Slika 27. Interaktom pojačano (relativni omjer tretiranog i netretiranog uzorak $\geq 1,3$) reguliranih proteina u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura iz **tablice 26** nakon tretmana hidrokinonom (20 i 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) od 2 h. Grafikon je generiran iz baze podataka STRING (<http://www.string-db.org>). Mrežni čvorovi predstavljaju proteine, a rubovi protein-protein interakcije. Debljina linije označava jačinu pouzdanosti podataka. Mrežna statistika: 17 čvorova, 67 rubova, 7,88 prosječni stupanj čvora, 0,811 prosječni lokalni koeficijent grupiranja, 14 očekivanih broj rubova, $< 1,0 \cdot 10^{-16}$ p-vrijednost obogaćivanja PPI. Čvorovi u bojama predstavljaju odnose prema biološkim procesima: crveno – glikolitički proces (GO:0006096), plavo – odgovor na podražaj (GO:0050896), ružičasto – inicijacija translacije (GO:0006413).

4.9.2. Proteomska analiza nakon tretmana hidrokinonom od 8 h

Rezultati proteomske analize nakon prolongiranog tretmana T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura od 8 h koncentracijom hidrokinona od 20 µg/mL ukazuju na stanične promjene u proteinskom sastavu citoskeleta i kromatina, aktivacije mehanizama odgovora stanice na nesmotane proteine kao i stanične smrti inducirane stresnim uvjetima (**tablica 27**). STRING analiza je pokazala djelomičnu biološku povezanost identificiranih proteina. Promjene u sastavu citoskeleta povezane su sa smanjenom ekspresijom tropomiozin alfa-3 lanca (**TPM3**) i povećanom ekspresijom filamin-C (**FLNC**) te MARCKS-srodnog proteina (**MARCKSL1**) (UniProt, 2023). Tretman hidrokinonom izazvao je ekspresiju proteina fascin (**FSCN1**) i aladin (**AAAS**) kojih nema prisutnih u netretiranom uzorku T24 stanica, a sudjeluju u staničnoj pokretljivosti, organizaciji snopa aktinskih niti te formiranju nabora membrane, mikrošiljaka i stresnih vlakana (Deinhardt i sur., 2011). Pojačana ekspresija ATP-zavisne 6-fosfofruktokinaze (**PFKP**) također je povezana s organizacijom citoskeleta (UniProt, 2023). Na promjene u sastavu kromatina i regulaciji transkripcije upućuje povećana ekspresija histona H1.4 (**HIST1H1E**) te smanjena ekspresija ne-histonskog proteina HMG-17 (**HMGN2**), heterogenog jezgrenog ribonukleoproteina U (**HNRNPU**) te podjedinice 4 THO kompleksa (**ALYREF**). Smanjena ekspresija CD44 antigena (**CD44**), katepsina B (**CTSB**) i albumina (**ALB**) te pojačana ekspresija neurotrofnog faktora podrijetlom iz mezencefalnog astrocita (**MANF**) povezana je s programiranom staničnom smrću T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura. Aktivaciju odgovora na nesmotane proteine također potvrđuje i povećana ekspresija proteina tirozin-protein fosfataza ne-receptor tip 1 (**PTPN1**) i UDP-glukoza:glikoprotein glukoziltransferaze 1 (**UGGT1**) (UniProt, 2023).

Tablica 27. Pregled promjena u sadržaju staničnih proteina T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana koncentracijom hidrokinona 20 µg/mL od 8 h.

Pristupni broj ^a	Gen ^b	Ime proteina	Biološki procesi ^c (Genska ontologija-GO)	20 µg/mL 8 h	
				Relativni omjer ^d	p-vrijednost
A0A0C4DGB6	<i>ALB</i>	albumin	negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066); negativna regulacija programirane stanične smrti (GO:0043069)	0,30	< 0,0001
A0A7I2V5R6	<i>GNAS</i>	guanin nukleotid-vezujući protein G(s) podjedinica alfa	prijenos signala posredovanjem G protein spregnutih receptora (GO:0007186)	0,35	0,0010
Q9H9B4	<i>SFXN1</i>	siderofleksin-1	transport aminokiselina(GO:0006865) metabolički proces s jednim ugljikom (GO:0006730)	0,50	0,0037
E9PB61	<i>ALYREF</i>	THO kompleks podjedinica 4	mRNA „splicing“ (GO:0008380) transport mRNA (GO:0051028)	0,35	< 0,0001
P16070	<i>CD44</i>	CD44 antigen	adhezija stanica (GO:0007155); migracija stanica (GO:0016477); negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066)	0,50	< 0,0001
A0A087WWU8	<i>TPM3</i>	tropomiozin alfa-3 lanac	organizacija aktinskih filamenata (GO:0007015)	0,50	0,0028
F5H385	<i>SLC39A3</i>	cink transporter ZIP3	transmembranski transport (GO:0055085)	0,27	0,0030
A0A1W2PPS1	<i>HNRNPU</i>	heterogeni jezgri ribonukleoprotein U	organizacija kromatina (GO:0006325) regulacija alternativnog izrezivanja mRNA (GO:0000381) pozitivna regulacija transkripcije preko RNA polimeraze II (GO:0045944) negativna regulacija održavanja telomera putem telomeraze (GO:0032211)	0,45	0,0024
A0A7P0NGZ6	<i>CTSB</i>	katapsin B	proteoliza (GO:0006508) regulacija katalitičke aktivnosti (GO:0050790)	0,50	0,0022

Nastavak tablice 27 (1)

P53597	<i>SUCLG1</i>	sukcinat--CoA ligaza [ADP/GDP-formirajuća] podjedinica alfa, mitohondrijska	sukcinil-CoA katabolički proces (GO:1901289) ciklus limunske kiseline (GO:0006099)	0,55	0,0010
P05204	<i>HMGN2</i>	ne-histon kromosomski protein HMG-17	organizacija kromatina (GO:0006325)	0,55	0,0028
O00469	<i>PLOD2</i>	prokolagen-lizin,2-oksoglutarat 5-dioksigenaza 2	protein modifikacijski proces (GO:0036211) odgovor na hipoksiju (GO:0001666)	1,53	< 0,0001
Q99536	<i>VAT1</i>	homolog VAT-1 proteina membrane sinaptičkih vezikula	negativna regulacija fuzije (smanjenje broja) mitohondrija (GO:0010637)	1,70	0,0030
Q14315	<i>FLNC</i>	filamin-C	vezanje aktina (GO:0003779)	1,70	0,0009
P55145	<i>MANF</i>	neurotrofni faktor podrijetlom iz mezencefalnog astrocita	odgovor na nesmotane proteine (GO:0006986) regulacija odgovora na endoplazmatski retikulum stres (GO:1905897)	1,65	0,0040
P18031	<i>PTPNI</i>	tirozin-protein fosfataza ne-receptor tip 1	aktin citoskelet reorganizacija (GO:0031532) odgovor na nesmotane proteine (GO:0006986) regulacija odgovora na endoplazmatski retikulum stres (GO:1905897)	2,30	0,0003
P54886	<i>ALDH18A1</i>	delta-1-pirolin-5-karboksilat sintaza	biosinteza prolina (GO:0006561)	1,85	< 0,0001
Q9NYU2	<i>UGGT1</i>	UDP-glukoza:glikoprotein glukoziltransferaza 1	katabolički proces pogrešno smotanog proteina povezan s endoplazmatskim retikulumom (GO:0071712)	2,00	< 0,0001
P10412	<i>HIST1H1E</i>	histon H1.4	kondenzacija kromosoma (GO:0030261) sklapanje nukleosoma (GO:0006334)	2,35	0,0017
Q96N66	<i>MBOAT7</i>	lizofosfolipidna aciltransferaza 7	proces biosinteze lipida (GO:0008610) metabolizam lipida (GO:0006629)	4,23	0,0010

Nastavak tablice 27 (2)

Q01813	<i>PFKP</i>	ATP-zavisna 6-fosfofruktokinaza, tip trombocita	glikolitički proces (GO:0006096)	4,35	0,0006
F8WD26	<i>LMO7</i>	LIM domena samo protein 7	regulacija stanične adhezije (GO:0030155) pozitivna regulacija transkripcije preko RNA polimeraze II (GO:0045944) regulacija stanične signalizacije (GO:0023051)	3,30	0,0010
P49006	<i>MARCKSL1</i>	MARCKS-srodan protein	organizacija aktinskih filamenata (GO:0007015) pozitivna regulacija proliferacije stanične populacije (GO:0008284)	8,07	0,0020
J3KQ48	<i>PTRH2</i>	aminoacil-tRNA hidrolaza	apoptotički proces (GO:0006915)	5,60	0,0001
Q02952	<i>AKAP12</i>	sidreni protein A-kinaze 12	signalni put receptora spregnutog G proteina koji inhibira adenilat ciklazu (GO:0007193)	samo u tretiranom uzorku	< 0,0001
Q16658	<i>FSCN1</i>	fascin	Stanična migracija (GO:0016477); uspostavljanje ili održavanje polariteta stanice (GO:0007163); organizacija aktinskih filamenata (GO:0007015); regulacija organizacije aktinskog citoskeleta (GO:0032956); pozitivna regulacija formiranja lamelipodija (GO:0010592), podosoma (GO:0071803) i filopodija (GO:0051491) formiranje mikrošiljaka (GO:0030035)	samo u tretiranom uzorku	< 0,0001
Q9GZR7	<i>DDX24</i>	ATP-ovisna RNA helikaza DDX24	RNA metabolički proces (GO:0016070)	samo u tretiranom uzorku	0,0002
Q9NRG9	<i>AAAS</i>	aladin	stvaranje snopa mikrotubula (GO:0001578)	samo u tretiranom uzorku	0,0012

^a Jedinствeni alfanumerički identifikator svakog unosa u UniProt bazi podataka; ^b Jedinствeni alfanumerički identifikator koji se koristi za predstavljanje gena; ^c Biološki proces(i) prema genskoj ontologiji (GO); ^d Omjer srednje vrijednosti signala reporter iona (tretman / kontrolni uzorak) na razini proteina iz seta podataka tri biološka ponavljanja.

4.9.3. Proteomska analiza nakon tretmana nitrofurantoinom tijekom 8 h

Rezultati ekspresije proteina nakon tretmana T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura profilaktičkom dozom nitrofurantoina (0,167 mg/mL) prikazani su u **tablici 28** te pokazuju da nitrofurantoin utječe na proteina koji imaju funkciju u procesu alternativnog izrezivanja (eng. *splicing*) mRNA, vezikularnog transporta, sintezu proteina i održavanje homeostaze proteina, stanični ciklus i proliferaciju stanica kao i reakciju na lijekove (rezistencija) te aktivaciju apoptotičkih procesa. Povećana ekspresija proteina 28S rRNA metiltransferaza (**NOP2**), 40S ribosomalni protein S15 (**RPS15**), aminoacil-tRNA-hidrolaza (**PTRH2**) i H/ACA ribonukleoprotein kompleks podjedinica DKC1 (**DKC1**) pokazuje da nitrofurantoin utječe na proces sinteze proteina, regulaciju proliferacije stanične populacije i prijenosa signala preko p53 medijatora u T24 stanicama. Utjecaj nitrofurantoina na adheziju T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura upućuje povećana ekspresija MARCKS-srodnog proteina (**MARCKSL1**) i kaveola-vezujući protein 3 (**CAVIN3**) dok ATPaza AAA domena-sadržavajući protein 3A (**ATAD3A**) sudjeluje u regulaciji rasta i stanične apoptoze (UniProt, 2023). Otpor stanice na djelovanje antibiotika pokazano je povećanom sintezom integrina alfa-6 (**ITGA6**) dok je odgovor T24 stanica na toksične tvari pokazan povećanom sintezom Sec1 proteina 1 (**SCFD1**) i VAT-1 proteina membrane sinaptičkih vezikula (**VAT1**). Narušenu homeostazu unutar stanica djelovanjem antibiotika pokazuje veća količina proteasom podjedinice beta tip-3 (**PSMB3**) koja uklanja krivo smotane ili oštećene proteine unutar stanice. Interaktom pokazuje povezanost prekomjerno eksprimiranog WD40-ponavljanje-sadržavajućeg proteina SMU1 (**SMU1**) i serin/arginin-bogatog *splicing* faktora 1 (**SRSF1**) koji sudjeluju u procesiranju mRNA, regulaciji alternativnog izrezivanja te transportu procesirane mRNA (UniProt, 2023).

Tablica 28. Pregled promjena u sadržaju staničnih proteina T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana koncentracijom nitrofurantoina 0,167 mg/mL od 8 h.

Pristupni broj ^a	Gen ^b	Ime proteina	Biološki procesi ^c (Genska ontologija-GO)	0,167 mg/mL 8 h	
				Relativni omjer ^d	p-vrijednost
P46087	<i>NOP2</i>	pretpostavljena 28S rRNA (citozin (4447)-C(5))-metiltransferaza	biogeneza ribosoma (GO:9942254); pozitivna regulacija proliferacije stanične populacije (GO:0008284); regulacija signalne transdukcije preko p53 medijatora (GO:1901796)	9,50	0,0018
Q9NVI7	<i>ATAD3A</i>	obitelj ATPaza AAA domena-sadržavajući protein 3A	organizacija mitohondrija (GO:0007005); negativna regulacija procesa apoptoze (GO:0043066); regulacija rasta stanice (GO:0001558)	4,50	0,0003
P49720	<i>PSMB3</i>	proteasom podjedinica beta tip-3	proteosomalni katabolički proces proteina (GO:0010498); proteasom-posredujući ubikvitin-ovisni katabolički proces (GO:0043161)	4,75	0,0020
O60832	<i>DKC1</i>	H/ACA ribonukleoprotein kompleks podjedinica DKC1	rRNA sinteza pseudouridina (GO:0031118); rRNA procesiranje (GO:0006364); pozitivna regulacija telomerazne aktivnosti (GO:0051973)	4,85	0,0024
K7ELC2 (+1)	<i>RPS15</i>	40S ribosomalni protein S15	biogeneza male podjedinice ribosoma (GO:0042274); regulacija signalne transdukcije preko p53 medijatora (GO:1901796)	2,60	0,0004
A0A8C8KBL6	<i>ITGA6</i>	integrin alfa-6	stanična adhezija (GO:0007155); pozitivna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043065); pozitivna regulacija stanične pokretljivosti (GO:0030335)	5,50	< 0,0001
J3KTL2 (+1)	<i>SRSF1</i>	serin/arginin-bogati <i>splicing</i> faktor 1	izrezivanje mRNA preko spliceosoma (GO:0000398); transport mRNA (GO:0051028); regulacija RNA izrezivanja (GO:0043484)	3,65	0,0010
E9PIE3	<i>CAVIN3</i>	kaveola-vezujući protein 3	kikardijska regulacija ekspresije gena (GO:0032922); organizacija kortikalnog aktin citoskeleta (GO:0030866)	6,40	0,0022

Nastavak tablice 28

O00264	<i>PGRMC1</i>	membrana-vezujući progesteron receptor komponenta 1	proces biosinteze hema (GO:0006783); modifikacija sinaptičke strukture (GO:0099563); negativna regulacija organizacije sinapse (GO:1905809); pozitivna regulacija lokalizacije proteina na plazma membranu (GO:1903078)	9,30	0,0013
Q2TAY7	<i>SMU1</i>	WD40 ponavljajući protein SMU1	izrezivanje mRNA preko spliceosoma (GO:0000398); regulacija alternativnog izrezivanja mRNA, preko spliceosoma (GO:0000381)	16,23	0,0003
P36551	<i>CPOX</i>	kisik-ovisni koproporfirinogen -III oksidaza, mitohondrijska	proces biosinteze hema (GO:0006783)	42,25	0,0035
P49006	<i>MARCKSL1</i>	MARCKS-srodan protein	organizacija aktinskih filamenata (GO:0007015); pozitivna regulacija proliferacije stanične populacije (GO:0008284); vezanje kalmodulina (GO:0005516)	11,60	0,0020
J3KQ48	<i>PTRH2</i>	aminoacil-tRNA hidrolaza	proces apoptoze (GO:0006915); negativna regulacija anuikis (GO:2000811); pozitivna regulacija anuikis (GO:2000210)	16,00	0,0001
Q99536	<i>VAT1</i>	homolog VAT-1 proteina membrane sinaptičkih vezikula	negativna regulacija fuzije (smanjenje broja) mitohondrija (GO:0010637)	6,75	0,0030
A0A7I2V3G4	<i>SCFD1</i>	Sec1 obitelj domena-sadržavajući protein 1	Odgovor na toksične tvari (GO:0009636); transport toksina (GO:1901998); retrogradni vezikula-posredujući transport između Golgi aparata i endoplazmatskog retikuluma (GO:0006890); odgovor na hipoksiju (GO:0001666); negativna regulacija formiranja autofagosoma (GO:19002902)	35,00	0,0001

^a Jedinstveni alfanumerički identifikator svakog unosa u UniProt bazi podataka; ^b Jedinstveni alfanumerički identifikator koji se koristi za predstavljanje gena; ^c Biološki proces(i) prema genskoj ontologiji (GO); ^d Omjer srednje vrijednosti signala reporter iona (tretman / kontrolni uzorak) na razini proteina iz seta podataka tri biološka ponavljanja.

4.9.4. Proteomska analiza nakon tretmana smjesom hidrokinona i nitrofurantoina od 8 h

Od navedenih 44 proteina u **tablici 29**, 29 proteina je razlikovno eksprimirano nakon kombiniranog tretmana T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nitrofurantoinom (0,167 mg/mL) i hidrokinonom (20 µg/mL). Prema tome, ti proteini se mogu pripisati sinergijskom djelovanju ispitivane smjese spojeva. U **tablici 29**, oznaka (↑) predstavlja povećanu ekspresiju proteina, a oznaka (↓) smanjenu ekspresiju proteina u odnosu na kontrolni netretirani uzorak T24 stanica. Na **slici 28** prikazan je interaktom smanjeno ili pojačano reguliranih proteina iz **tablice 29** nakon tretmana ispitivanom smjesom tijekom 8 h. Prema biološkim procesima u kojima sudjeluju opisani proteini, može se zaključiti da je sinergističko djelovanje usmjereno na biosintezu nezasićenih masnih kiselina (peroksisomalna 3-ketoacil-CoA tiolaze (**ACAA1**) i 3-oksoacil-CoA reduktaze (**HSD17B12**)), organizaciju citoskeleta preko regulacije polimerizacije aktinskih filamenata (LIM domena i aktin-vezujući protein 1 (**LIMA1**), podjedinica beta proteina za pokrivanje F-aktina (**CAPZB**) i koaktozin (**COTL1**)), procesiranje mRNA i proteina (*splicing* faktor U2AF (65 kDa podjedinica) (**U2AF2**), heterogeni nuklearnog ribonukleoprotein R (**HNRNPR**) i T-kompleks protein 1 podjedinice epsilon (**CCT5**)) kao i održavanje stanične homeostaze (protein disulfid-izomeraza A4 (**PDIA4**), protein disulfid-izomeraza A3 (**PDIA3**), tioredoksin domena-sadržavajući protein 5 (**TXNDC5**)), molekularni šaperoni - endoplazmin (**HSP90B1**) i kalretikulin (**CALR**) i mitohondrijski receptor TOM70 (**TOMM70**) (UniProt, 2023).

U uzorku tretiranom smjesom spojeva povećana je ekspresija histona 1.4 (**HIST1H1E**; 3,4 : 2,35) i antigena CD44 (**CD44**; 2,07 : 0,5) te lizofosfatidil-inozitol acetiltransferaze (**LCLT1**; 4,23 : 1,93) i **MARCKSL1** proteina (8,07 : 4,57). S druge strane, tretman antibiotikom nitrofurantoinom pokazao je povećanu ekspresiju proteasom 20S podjedinice beta 3 (**PSMB3**; 4,75 : 0,35) i aminoacil-tRNA hidrolaze (**PTRH2**; 16,00 : 4,90) u odnosu na smjesu. Proteini podokaliksin (**PODXL**), Ras-srodan protein Ral-A (**RALA**), podjedinica beta proteina za pokrivanje F-aktina (**CAPZB**), član 1 obitelji CCN (**CCN1**), purin nukleozid fosforilaza (**PNP**) i peroksisomalna 3-ketoacil-CoA tiolaza (**ACAA1**) su detektirani samo u uzorku T24 stanica tretiranim smjesom hidrokinona i nitrofurantoina u usporedbi sa zasebnim spojevima.

Tablica 29. Pregled promjena u sadržaju staničnih proteina T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana smjesom nitrofurantoina (0,167 mg/mL) i hidrokinona (20 µg/mL) od 8 h.

Pristupni broj ^a	Gen ^b	Ime proteina	Biološki procesi ^c (Genska ontologija-GO)	Smjesa N (0,167 mg/mL) i HQ (20 µg/mL) 8 h	
				Relativni omjer ^d	p-vrijednost
Q8N201	<i>INTS1</i>	integrator kompleks podjedinica 1	proliferacija stanična populacije (GO:0008283); apoptotički procesi (GO:0006915); procesirane snRNA(GO:0016180)	0,20 ↓	0,0003
P49720	<i>PSMB3</i>	proteasom podjedinica beta tip-3	proteosomalni katabolički proces proteina (GO:0010498); proteasom-posredujući ubikvitin-ovisni katabolički proces (GO:0043161)	0,35	0,0020
Q96JJ7	<i>TMX3</i>	protein disulfid-izomeraza TMX3	Proteinski modifikacijski procesi (GO:0036211)	0,40 ↓	0,0040
Q6Y1H2	<i>PTPLB</i>	vrlo dugi lanac (3R)-3-hidroksiacyl-CoA dehidrataza 2	biosinteza masnih kiselina (GO:0006633)	0,53 ↓	< 0,0001
A0A7P0NGZ6	<i>CTSB</i>	katapsin B	proteoliza (GO:0006508); regulacija katalitičke aktivnosti (GO:0050790)	0,53	0,0022
A0A7I2V5R6	<i>GNAS</i>	gvanin nukleotid-vezujući proteinG(s) podjedinica alfa, kratka izoforma	prijenos signala posredovanjem G protein spregnutih receptora (GO:0007186)	0,37	0,0010
A0A0C4DGB6	<i>ALB</i>	albumin	negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066); negativna regulacija programirane stanične smrti (GO:0043069)	0,30	< 0,0001
Q9UJZ1	<i>STOML2</i>	stomatin-slični protein 2, mitohondrijski	stanični odgovor na stres (GO:0033554); biogeneza staničnih komponenti /GO:0044085); unutarstanična kemijska homeostaza (GO:0055082)	0,45 ↓	0,0007

Nastavak tablice 29 (1)

O75475	<i>PSIP1</i>	PC4 i SFRS1- međudjelujući protein	odgovor na stres (GO:0006950); pozitivna regulacija transkripcije preko RNA polimeraze II (GO:0045944); RNA metabolički procesi (GO:0016070)	0,60 ↓	0,0013
P05388	<i>RPLP0</i>	60S ribosomalni protein P0	peptidni biosintetički proces (GO:0043043); biogeneza ribosoma (GO:0042254)	0,53 ↓	< 0,0001
Q9H9B4	<i>SFXN1</i>	siderofleksin-1	transport aminokiselina (GO:0006865); metabolički proces s jednim ugljikom (GO:0006730)	0,43	0,0037
Q9NYU2	<i>UGGT1</i>	UDP-glucoza:glikoprotein glukoziltransferaza 1	katabolički proces pogrešno smotanog proteina povezan s endoplazmatskim retikulumom (GO:0071712)	2,70	< 0,0001
P13667	<i>PDIA4</i>	protein disulfid-izomeraza A4	smatanje proteina (GO:0006457); sekrecija proteina (GO:0009306); odgovor na endoplazmatski retikulum stres (GO:0034976)	1,87 ↑	< 0,0001
P14625	<i>HSP90B1</i>	endoplazmin	negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066); smatanje proteina (GO:0006457); transport proteina (GO:0015031); odgovor na endoplazmatski retikulum stres (GO:0034976)	1,77 ↑	< 0,0001
P54886	<i>ALDH18A1</i>	delta-1-pirolin-5- karboksilat sintaza	biosinteza prolina (GO:0006561)	1,70	< 0,0001
P27797	<i>CALR</i>	kalretikulin	odgovor na podražaj (GO:0050896); organizacija citoskeleta (GO:0007010); negativna regulacija transkripcije preko RNA polimeraze II (GO:00000122); negativna regulacije translacije (GO:0017148); pozitivna regulacija staničnog ciklusa (GO:0045787); pozitivna regulacija proliferacije stanične populacije (GO:0008284); pozitivna regulacija ekspresije gena (GO:0010628); pozitivna regulacija fagocitoze (GO:0050766); smatanje proteina (GO:0006457); regulacija apoptotičkih procesa (GO:0042981)	1,57 ↑	< 0,0001

Nastavak tablice 29 (2)

A0A8I5KT88	<i>PDIA3</i>	protein disulfid-izomeraza A3	stanični odgovor na podražaj (GO:0051716); vanjski apoptotički signalni put (GO:0097191); smatanje proteina (GO:0006457); odgovor na endoplazmatski retikulum stres (GO:0034976)	1,60 ↑	< 0,0001
O43390	<i>HNRNPR</i>	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein R	mRNA procesiranje (GO:0006397); mRNA izrezivanje preko spliceosoma (GO:0000398)	1,70 ↑	< 0,0001
O94925	<i>GLS</i>	bubrežna glutaminaza izoforma, mitohondrijska	homeostaza staničnog glutamata (GO:0090461); biogeneza staničnih komponenti (GO:0044085)	1,87 ↑	< 0,0001
P16401	<i>HIST1H1B</i>	histon H1.5	organizacija staničnih komponenti (GO:0016043); negativna regulacija DNA rekombinacije (GO:0045910); negativna regulacija transkripcije preko RNA polimeraze II (GO:0000122); pozitivna regulacija staničnog rasta (GO:0030307); stabilizacija proteina (GO:0050821)	1,93 ↑	0,0038
Q8NBS9	<i>TXNDC5</i>	tioredoksin domena-sadržavajući protein 5	negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066); smatanje proteina (GO:0006457)	1,83 ↑	< 0,0001
Q14019	<i>COTL1</i>	koaktozin-slični protein	regulacija polimerizacije aktinskih filamenata (GO:0030833)	2,10 ↑	0,0008
P48643	<i>CCT5</i>	T-kompleks protein 1, podjedinica epsilon	smatanje proteina (GO:0006457); lokalizacija proteina (GO:0008104); stabilizacija proteina (GO:0050821)	2,03 ↑	0,0007
Q96N66	<i>MBOAT7</i>	lizofosfolipidna aciltransferaza 7	proces biosinteze lipida (GO:0008610) metabolizam lipida (GO:0006629)	1,93	0,0010
P26368	<i>U2AF2</i>	<i>splicing</i> faktor U2AF 65 kDa podjedinica	mRNA procesiranje (GO:0006397); mRNA izrezivanje preko spliceosoma (GO:0000398); negativna regulacija proteinske ubikvitinacije (GO:0031397)	2,33 ↑	0,0016
P20700	<i>LMNB1</i>	lamin-B1	organizacija jezgrene membrane (GO:0006998); formiranje heterokromatina (GO:0031507); lokalizacija jezgre (GO:0051647)	2,03 ↑	< 0,0001
Q9UHB6	<i>LIMA1</i>	LIM domena i aktin-vezujući protein 1	organizacija citoskeleta (GO:0007010); migracija stanica (GO:0016477)	2,23 ↑	0,0004

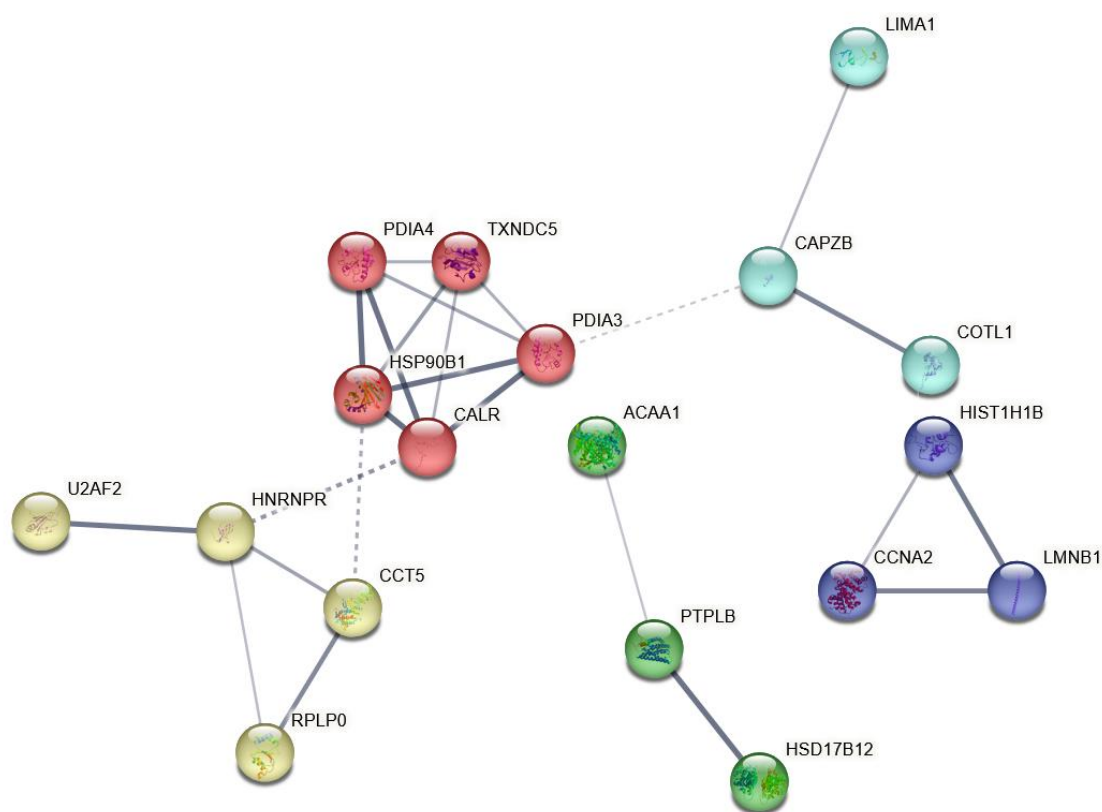
Nastavak tablice 29 (3)

P16070	<i>CD44</i>	CD44 antigen	adhezija stanica (GO:0007155); migracija stanica (GO:0016477); negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066)	2,07	< 0,0001
P18031	<i>PTPN1</i>	tirozin-protein fosfataza ne-receptor tip 1	aktin citoskelet reorganizacija (GO:0031532); odgovor na nesmotane proteine (GO:0006986); regulacija odgovora na endoplazmatski retikulum stres (GO:1905897)	1,80	0,0003
O94826	<i>TOMM70</i>	podjedinica mitohondrijskog uvoznog receptora TOM70	unutarstanični transport (GO:0046907); regulacija apoptotičkih procesa (GO:0042981)	3,20 ↑	0,0009
P10412	<i>HIST1H1E</i>	histon H1.4	kondenzacija kromosoma (GO:0030261); sklapanje nukleosoma (GO:0006334)	3,40	0,0017
P63313	<i>TMSB10</i>	timozin beta-10	organizacija citoskeleta (GO:0007010); regulacija stanične migracije (GO:0030334)	2,73 ↑	0,0031
J3KQ48	<i>PTRH2</i>	aminoacil-tRNA hidrolaza	apoptotički proces (GO:0006915)	4,90	0,0001
P80723	<i>BASP1</i>	protein 1 topiv u moždanoj kiselini	razvoj metanefričkog mezenhima (GO:0072075); negativna regulacija transkripcije DNA kalupa (GO:0045892)	3,00 ↑	0,0005
Q53GQ0	<i>HSD17B12</i>	vrlo dugi lanac 3-oksoacil-CoA reduktaze	biosinteza masnih kiselina (GO:0006633); pozitivna regulacija stanica-supstrat adhezije (GO:0010811); organizacija izvanstaničnog matriksa (GO:0030198)	3,10 ↑	0,0001
P49006	<i>MARCKSL1</i>	MARCKS-srodan protein	organizacija aktinskih filamenata (GO:0007015); pozitivna regulacija proliferacije stanične populacije (GO:0008284)	4,57	0,0020
Q01813	<i>PFKP</i>	ATP-ovisna 6-fosfofruktokinaza, trombocit	glikolitički proces (GO:0006096)	4,80	0,0006

Nastavak tablice 29 (4)

O00592	<i>PODXL</i>	podokaliksin	negativna regulacija stanične adhezije (GO:0007162); pozitivna regulacija stanične migracije (GO:0030335)	samo u tretiranom uzorku	< 0,0001
P11233	<i>RALA</i>	Ras-srodan protein Ral-A	organizacija citoskeleta (GO:0007010); stanična dioba (GO:0051301); egzocitoza (GO:0006887); odgovor na kemikaliju (GO:0042221)	samo u tretiranom uzorku	< 0,0001
B1AK88	<i>CAPZB</i>	podjedinica beta proteina za pokrivanje F-aktina	organizacija citoskeleta (GO:0007010); stanična morfogeneza (GO:0000902)	samo u tretiranom uzorku	< 0,0001
O00622	<i>CCNI</i>	član 1 obitelji CCN	negativna regulacija apoptotičkih procesa (GO:0043066); pozitivna regulacija stanične migracije (GO:0030335); pozitivna regulacija stanica-supstrat adhezije (GO:0010811); odgovor na kemikaliju (GO:0042221)	samo u tretiranom uzorku	0,0001
Q9GZR7	<i>DDX24</i>	ATP-ovisna RNA helikaza DDX24	RNA metabolički proces (GO:0016070)	samo u tretiranom uzorku	0,0002
P00491	<i>PNP</i>	purin nukleozid fosforilaza	odgovor na podražaj ksenobiotika (GO:0009410); nukleotid biosintetički proces (GO:0009165)	samo u tretiranom uzorku	0,0006
P09110	<i>ACAA1</i>	3-ketoacil-CoA tiolaza, peroksisomalna	beta-oksidacija masnih kiselina (GO:0006635); metabolički proces masnih kiselina (0006631)	samo u tretiranom uzorku	0,0010

^a Jedinstveni alfanumerički identifikator svakog unosa u UniProt bazi podataka; ^b Jedinstveni alfanumerički identifikator koji se koristi za predstavljanje gena; ^c Biološki proces(i) prema genskoj ontologiji (GO); ^d Omjer srednje vrijednosti signala reporter iona (tretman / kontrolni uzorak) izračunat iz podataka tri biološka ponavljanja. N - nitrofurantoin; HQ - hidrokinon. Bojom u tablici su označeni proteini koji su eksprimirani prilikom tretmana smjesom, a nisu detektirani nakon tretmana pojedinačnim spojevima pri čemu oznaka (↑) označava pojačanu ekspresiju proteina, a oznaka (↓) smanjenu ekspresiju proteina u odnosu na kontrolni netretirani uzorak.



Slika 28. Interaktom smanjeno ili pojačano reguliranih proteina u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura iz **tablice 29** nakon tretmana smjesom nitrofurantoina (0,167 mg/mL) i hidrokinona (20 µg/mL) od 8 h. Grafikon je generiran iz baze podataka STRING (<http://www.string-db.org>). Mrežni čvorovi predstavljaju proteine, a rubovi protein-protein interakcije. Debljina linije označava jačinu pouzdanosti podataka. Mrežna statistika: 29 čvorova (11 sakrivenih zbog nepovezanosti), 1,66 prosječni stupanj čvora, 0,459 prosječni lokalni koeficijent grupiranja, $1,42 \cdot 10^{-5}$ p-vrijednost obogaćivanja PPI. Čvorovi u bojama predstavljaju odnose prema biološkim procesima: crveno – održavanje stanične homeostaze (GO:0019725); zeleno - metabolizam masnih kiselina (GO:0006631), biosinteza nezasićenih masnih kiselina (GO:0006636); žuto – peptidni biosintetički procesi (GO:0043043), mRNA procesiranje (GO:0006396); svijetlo plavo – organizacija citoskeleta (GO:0007010), polimerizacija i depolimerizacija aktina (GO:0008154) i regulacija polimerizacije aktinskih filamenata (GO:0030833); tamno plavo – odgovor na podražaj (GO:0050896).

5. RASPRAVA

Fitoterapija je medicinska disciplina koja u preventivne ili terapijske svrhe primjenjuje ljekovite biljke i derivate njihovih spojeva s obzirom na prirodu i koncentraciju njihovih biološki aktivnih tvari (Choi, 2008). Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća zabilježen je porast upotrebe biljnih bioaktivnih tvari s terapijskim učinkom kao što je upotreba cijelih biljaka, njihovih ekstrakata ili homeopatskih pripravaka za prevenciju ili liječenje bolesti. Otprilike 80 % svjetske populacije koristi se tradicionalnom medicinom za blage smetnje i bolesti (Oyebode i sur., 2016). Međutim, primjena terapijskih tvari biljnog podrijetla nije bez rizika, jer mogu stupiti u interakciju s drugim primijenjenim lijekovima, dovesti do nuspojava ili smanjenja učinkovitosti lijekova, a osim toga, mogu izravno proizvesti toksične učinke na organizam. Unatoč brojnim znanstvenim istraživanjima, postoji nedostatak svijesti o rizicima interakcija prirodnih proizvoda i sintetskih lijekova s obzirom da se smatra da prirodne tvari mogu ublažiti toksičnost lijeka i da što se više biljaka uzima, to će biti više koristi, osobito u pogledu nuspojava povezanih s lijekovima. Najosjetljivije skupine ljudi na kojima se posebno mogu odraziti negativne posljedice nekontrolirane primjene biljnih pripravaka su osobe starije od 60 godina koje općenito imaju nižu toleranciju na lijekove, osobe s komorbiditetima (onkološke bolesti, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, kronično zatajenje bubrega, zaraza virusom humane imunodeficijencije te alergije na lijekove) i pretili osobe s obzirom da prekomjerni udio masti u organizmu može promijeniti način na koji lijek djeluje u tijelu čineći ga manje učinkovitim (Allegra i sur., 2023).

Ekstrakt lišća medvjetke koristi se često u individualnoj terapiji nekomplikiranih infekcija urinarnog trakta u kombinaciji s antibiotikom nitrofurantoinom. Ne postoje znanstvena istraživanja o njihovom potencijalnom citotoksičnom, antioksidacijskom/prooksidacijskom i genotoksičnom međudjelovanju kao ni međudjelovanju u vidu ekspresije proteina u staničnim linijama mokraćnog mjehura kao ciljnog terapijskog mjesta u uvjetima *in vitro*. Također, nije poznato kako se mijenja fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet ekstrakta medvjetke prilikom konzumacije propisanih terapijskih doza kao i biodostupnost biološki aktivnih tvari iz ekstrakta pri čemu je i upitno pridržavanje uputa o konzumaciji od strane konzumenata.

5.1. Fenolni sastav i antioksidacijski potencijal ekstrakta medvjjetke prije i nakon *in vitro* probave

U ovom radu korišteno je komercijalno dostupan proizvod osušenog lišća biljke medvjjetke te je pripremljen svježi vodeni ekstrakt prema uputama proizvođača. Istražene koncentracije ukupnih fenola su od 3 – 5× niže su od onih u drugim radovima što se može objasniti različitim uzorcima kao i metodama ekstrakcije. Sugier i sur. (2022) pokazali su da vrsta uzorka i metoda ekstrakcije statistički značajno utječu na koncentraciju ukupnih fenola i flavonoida, kao i antioksidacijski kapacitet vodenog ekstrakta lišća medvjjetke. Vodeni ekstrakt lišća medvjjetke iz 12 uzoraka ubranih na području srednje-istočne Poljske pokazao je široku varijaciju masenog udjela fenola (165,63 – 214,84 mg GAE/g suhe tvari), flavonoida (2,36 – 3,09 mg QE/g suhe tvari) i antioksidacijskog kapaciteta (metoda DPPH•, 490 – 821 mg ekvivalenta Trolox/g suhe tvari; metoda ABTS, 173 – 319 mg ekvivalenta Trolox/g suhe tvari). U radu Sugier i sur. (2022) ekstrakcija je provedena najprije maceracijom lišća u ultračistoj vodi temperature 100 °C, te je nakon toga provedena ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji na 40 °C tijekom 45 min, dok je u ovom istraživanju ekstrakcija trajala samo 15 min u ultračistoj vodi pri 80 °C. Nadalje, geografski uvjeti staništa na kojem raste ubrana biljka poput svjetlosnih uvjeta, nadmorske visine, količine oborina, kao i razina UV zračenja mogu promijeniti kemijski sastav lišća medvjjetke o čemu ovise maseni udio fenola i antioksidacijski kapacitet (Asensio i sur., 2020). Asensio i sur. (2020) su tijekom 3 godine skupili 249 biljaka medvjjetke koje su rasle na 42 različita staništa na području Španjolske te su pokazali varijaciju količine glavnog biološki aktivnog spoja arbutina (87 – 232 mg/g suhe tvari). Također, otkrivene su i varijacije u veličini genoma i na dvjema regijama plastidne DNA, kao i genotipovi medvjjetke s većim antioksidacijskim kapacitetom. Ovi rezultati naglašavaju da se učinak genetskih i abiotskih čimbenika mora uzeti u obzir kako bi se objasnila intraspecifična fitokemijska varijabilnost pronađena u biljci medvjjetci iz divljih populacija. Antioksidacijski kapacitet lišća medvjjetke proučavan je korištenjem brojnih kemijskih testova koji pokazuju vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost (Azman i sur., 2016). To je potvrđeno i rezultatima ovog rada.

Prilikom provedene *in vitro* probave ekstrakta medvjjetke, koncentracija ukupnih fenolnih spojeva ostala je nepromijenjena tijekom svih faza probave, dok se koncentracija flavonoida statistički značajno smanjila u želucu i tankom crijevu u odnosu na inicijalni uzorak te u ustima. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta, statistički se značajno povećao do konačne faze *in vitro* probave u tankom crijevu (metode DPPH• i FRAP), dok rezultati metode ABTS upućuju na statistički značajan pad % inhibicije u želucu i tankom crijevu. Iako je

antioksidacijski kapacitet biljnih uzoraka obično povezan s fenolnim sastavom, tijekom *in vitro* probave ta aktivnost može biti izmijenjena. Fenolni spojevi imaju aromatsku strukturu s više hidroksilnih skupina, te ih rijetko nalazimo u slobodnom obliku. Najčešće su esterificirani s malim organskim kiselinama, u polimernom obliku ili konjugirani sa šećernim jedinicama. Flavonoidi su najviše istraživani fenolni spojevi, a dijele se na antocijane, flavane, flavanone, flavone, flavonole i izoflavonoide. U gornjem dijelu probavnog sustava ne dolazi do intenzivnih promjena fenolnih spojeva te oni u tanko crijevo dopijevaju u nepromijenjenom obliku. U usnoj šupljini dolazi do hidrolize nekih flavonoidnih glikozida s glukoznim šećernim jedinicama što se događa uglavnom djelovanjem enzima iz epitelnih stanica kao i uz pomoć bakterija. Prema tome, mikrobiota usne šupljine može utjecati na razlike u količini hidroliziranih glukozidnih flavonoida među pojedincima (Walle i sur., 2005). S obzirom da u uvjetima provedene *in vitro* probave u ustima nisu bile uključene bakterije i epitelne stanice, koncentracija ukupnih fenolnih spojeva ostala je nepromijenjena. Intenzivni metabolizam svih vrsta flavonoida kreće u jejunumu i ileumu tankog crijeva, a njihovi metaboliti portalnom venom dolaze u jetru gdje se dalje metaboliziraju. Flavonoide dalje razgrađuje mikrobiota debelog crijeva u manje fenolne kiseline koje se mogu apsorbirati. Metabolizam se odvija i u drugim različitim tipovima stanica. Velik dio metabolita se izlučuje putem bubrega (Spencer, 2003). U ovom radu nije pokazan rast koncentracije ukupnih fenola u tankom crijevu što može biti objašnjeno ograničenim uvjetima *in vitro* probave ili visoke koncentracije slobodnih fenolnih spojeva u inicijalnoj fazi probave zbog čega nije uočena razlika.

Rezultati drugih studija pokazali su da ukupna koncentracija fenola i hidrokinon u vodenom ekstraktu lišća medvjete imaju pozitivan utjecaj na rezultate antioksidacijske aktivnosti izmjerene metodom ABTS (pozitivna korelacija, Pearson (r) korelacija) (Sugier i sur., 2022). Rezultati ovog rada pokazuju da sadržaj ukupnih fenolnih spojeva pozitivno korelira s antioksidacijskim kapacitetom ekstrakta kroz različite faze *in vitro* probave. S druge strane, flavonoidi su biljni fenolni spojevi koji se nalaze u povrću i voću te su dobro poznati po svojim antipiretskim, analgetskim i protuupalnim aktivnostima (Romagnolo i Selmin, 2012). Iako se flavonoidi smatraju snažnim antioksidansima (Lourenço i sur., 2019), u ovom radu nije uočena povezanost flavonoida s antioksidacijskim kapacitetom. Taj nedostatak doprinosa flavonoida antioksidacijskom kapacitetu može se objasniti niskom koncentracijom flavonoida u ukupnim fenolnim spojevima kod ekstrakta medvjete što je nedovoljno za značajan učinak na antioksidacijski kapacitet.

5.2. Identifikacija i kvantifikacija biološki aktivnih tvari u ekstraktu medvjete i njihova stabilnost tijekom *in vitro* probave te biodostupnost

U vodenom ekstraktu medvjete, metodom HPLC identificirane su i kvantificirane glavne biološki aktivne tvari arbutin i hidrokinon. U svježe pripremljenom ekstraktu (20 mg/mL, jedan terapijski napitak) izmjerena je koncentracija arbutina od 4 % (w/w) i koncentracija hidrokinona od 0,07 % (w/w). U svježe pripremljenom ekstraktu prisutno je 24,1 % više arbutina i 39,5 % više hidrokinona u odnosu na liofilizirani ekstrakt.

Braga i sur. (2020) analizirali su 8 komercijalno dostupnih uzoraka lišća medvjete te je u vodenim ekstraktima određen raspon sadržaja arbutina od 1,19 – 4,15 % (w/w) te hidrokinona od 0,022 – 0,604 % (w/w), a uočena je i pozitivna korelacija između koncentracija arbutina i hidrokinona. Također, utvrdili su da je zagrijavanje bitno za uspješnu ekstrakciju arbutina, ali nije primijećena razlika između ekstrahirane količine arbutina pri temperaturama 45 i 90 °C. Rezultati prikazani u ovom radu odgovaraju najvišim izmjerenim koncentracijama spomenutog istraživanja te ne zadovoljavaju kriterij Europske farmakopeje s minimalnim sadržajem arbutina u osušenom lišću medvjete od 7 % (w/w) (European Pharmacopoeia, 2018). S druge strane, rezultati Parejo i sur. (2001) pokazali su varijaciju arbutina u rasponu 6,30 – 9,16 % (w/w) te su pronađene razlike između uzoraka biljaka prikupljenih tijekom jeseni i proljeća kao i geografskog položaja mjesta uzgoja u Španjolskoj. Razlike u koncentraciji moguće su zbog različitih korištenih otapala i uvjeta ekstrakcije s obzirom da su u prethodnom radu koristili ultrazvučnu ekstrakciju i metanol kao ekstrakcijsko sredstvo. Sugier i sur. (2022) pokazali su da se kad se koristi voda kao ekstrakcijsko sredstvo ekstrahira statistički značajno više hidrokinona dok je u etanolom ekstraktu prisutno statistički značajno više ukupnih fenola, flavonoida i metilarbutina. Sugier i sur. (2021) su također izvijestili o varijacijama u ukupnom sadržaju flavonoida između ekstrakata biljaka koje rastu na različitim tipovima staništa. Visoke razine arbutina u biljkama mogu biti povezane s prilagodbom na niske temperature i stresom uzrokovanim sušnim razdobljima dok toplo i vlažno vrijeme pri uzgoju medvjete možda neće zadovoljiti količinu arbutina potrebnu za odgovarajuću terapijsku učinkovitost (Pop i sur., 2009). Utvrđena razlika u koncentraciji biološki aktivnih spojeva arbutina i hidrokinona između svježe pripremljenog ekstrakta i liofiliziranog uzoraka moguće je posljedica gubitaka nastalih tijekom manipulacije uzorkom poput isparavanja i metode liofilizacije. Prema tome, rezultati u ovom radu ukazuju na potrebu za većom kontrolom koncentracije biološki aktivnih tvari u proizvodima na bazi lišća medvjete kao glavnog biljnog markera kako bi se osigurala kvaliteta i pouzdanost terapijskog tretmana protiv urinarnih infekcija.

Dobiveni rezultati stabilnosti arbutina tijekom *in vitro* probave su u skladu s drugim istraživanjima koja su pokazala da arbutin nije hidroliziran pri niskom pH u želucu te je dospio u tanko crijevo u nepromijenjenom obliku što upućuje da glikozilirani oblik može u određenoj mjeri zaštititi od razgradnje (Braga i sur., 2020). Medvjетка sadrži oko 80 % derivata hidrokiona koji mogu biti hidrolizirani u kiselim uvjetima prekidom glikozidnih veza i otapanjem šećernih dijelova, iako općenito esterske veze ostaju netaknute (Domínguez-Rodríguez i sur., 2017). Eksperiment enzimske stabilnosti arbutina pokazao je da su β -glukozidaza i peroksidaza iz kore kruške vrlo brzo smanjile koncentraciju arbutina u uvjetima *in vivo* (< 8 h) s potpunim gubitkom nakon 24 h, ali bez ikakve detekcije hidrokinona (Avonto i sur., 2016). Ovi rezultati pokazali su da metabolizam arbutina možda neće generirati hidrokinon kao jedinstveni nusproizvod ili da su i arbutin i hidrokinon potencijalni supstrati peroksidaza koje ih pretvaraju u stabilnije krajnje proizvode. Smanjena biodostupnost hidrokinona uočena između želučane i intestinalne faze u ovoj studiji može se objasniti reakcijama stvaranja kompleksa s proteinima prisutnim u smjesi probavnih enzima iz gušterače (Thumann i sur., 2020).

U istraživanju apsorpcije arbutina i hidrokinona korištene su stanične linije koje su izložene arbutinu i hidrokinonu tijekom konzumacije i metabolizma ekstrakta medvjette u uvjetima *in vitro*. Rezultati eksperimenata na štakorima i miševima pokazuju da se arbutin transportira Na^+ /glukoza kotransporterima (eng. *Sodium-glucose cotransporters*, SGLTs) u tankom crijevu kao što je to slučaj i u čovjeka (Lostao i sur., 1994). U ovom radu, mala količina transportiranog arbutina od strane stanica karcinoma epitela jezika (CAL 27) u ustima može se objasniti kratkim realnim vremenom izlaganja (30 min). Ekstrakt medvjette sadrži niz fenolnih spojeva (glikozilirani i aglikonske forme) koji u obje forme stupaju u interakciju direktno s transporterima glukoze te značajno smanjuju unos glukoze u stanicu (Alzaid i sur., 2013). Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju da Caco-2 stanice nisu transportirale arbutin iz izvanstaničnog medija te da je mogući razlog tog učinka zapravo cjelokupni složeni sadržaj ekstrakta medvjette. Nadalje, osim aktivnim transportom, fitokemikalije se preko intestinalnog epitela (Caco-2) transportiraju i pasivnom difuzijom (Zhang i sur., 2020). Glavna prepreka pasivnoj difuziji preko intestinalnog epitela je vodeni granični sloj (uz apikalnu površinu epitela) za koji se pokazalo da ograničava brzinu transporta za visoko lipofilne spojeve. Aglikoni prodiru u submukozni sloj crijeva putem pasivne difuzije koja ovisi o tri međusobno ovisna fizikalno-kemijska svojstva: lipofilnosti ($\log P$ ili $\log D$), polarnosti (naboj, vodikova veza) i veličini molekule. Općenito, hidrofilne male fitokemikalije kao što je hidrokinon (molekulska masa niža od 200 Da) imaju slabu staničnu propusnost što smanjuje

bioraspoloživost i time ograničava terapijsku primjenu (Zhang i sur., 2020). Budući da postoji više čimbenika koji definiraju uvjete za transport hidrokinona i nedostatak specifičnih ispitivanja, potrebne su daljnje analize kako bi se objasnio slučaj minimalnog staničnog unosa hidrokinona u Caco-2 i mnogo većeg u HepG2 i T24 stanicama.

5.3. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakta medvjette i arbutina na stanice sustava i jetre

Biološki učinak ekstrakta medvjette i arbutina ispitan je na staničnim linijama s kojima dolazi u doticaj prilikom konzumacije pa su s obzirom na to CAL 27 stanice (usta) izložene 15 min, AGS (želudac) 1 h, Caco-2 (debelo crijevo) 2 i 4 h, a HepG2 (jetra) 1, 2 i 4 h uzorcima ekstrakta medvjette i arbutina u koncentracijama koje su odgovarale onima izmjerenim u ekstraktu medvjette u uvjetima *in vitro*. Rezultati ispitanog biološkog učinka ovise o tipu stanica i vremenu izlaganja te uvjetima analize bez oporavka ili s 24-satnim oporavkom stanica nakon provedenog tretmana.

Ekstrakt medvjette u terapijskoj dozi ima učinak jedino na staničnu liniju s kojom prvotno dolazi u kontakt prilikom konzumacije. Jedan terapijski napitak ekstrakta pokazuje trenutno proliferativno djelovanje bez dugotrajnog učinka na stanice epitela jezika dok na ostale stanične linije probavnog sustava i jetre nije pokazao učinak. S druge strane, jedan terapijski napitak ekstrakta i dnevna doza (3 napitka) imaju antioksidacijsko djelovanje na stanice epitela jezika (15 min) i debelog crijeva (4 h) bez oporavka te na stanice želuca (1 h) nakon 24-satnog oporavka. Koncentracija od 2,4 mg/mL arbutina (dnevna doza) pokazala je antioksidacijsko djelovanje u CAL 27 staničnoj liniji karcinoma epitela jezika bez oporavka pa se antioksidacijsko djelovanje ekstrakta može djelomično prepisati arbutinu kao glavnom biološki aktivnom spoju u lišću medvjette. Kod svih ispitivanih staničnih linija opisano djelovanje ne zadržava se daljnjim rastom i razvojem stanica, jedino je kod stanica želuca vidljivo antioksidacijsko djelovanje ekstrakta medvjette i arbutina nakon 24-satnog oporavka koje nije bilo prisutno u tretmanu bez oporavka.

Dell'Annunziata i sur. (2022) pokazali su da vodeni ekstrakt medvjette (0,07 – 1,25 mg/mL) ne utječe na vijabilnost keratinocita kože (HaCaT) tijekom 24 i 48 h dok je koncentracija od 5 mg/mL pokazala smanjenje preživljenja na ~50 %. Prema saznanju autora, nema drugih podataka o toksičnosti pojedinačne ili ponovljene doze ekstrakta lišća medvjette (Committee on herbal medicinal products, 2018). Wu i sur. (2021) pokazali su da arbutin u koncentracijama 6,8 – 50 µg/mL tijekom 24 h ne inhibira proliferaciju humanih hepatocita

(L-02) što se slaže i s rezultatima ovog rada. Također, pokazano je da arbutin samo u koncentracijama iznad 2,7 mg/mL nakon 24-satnog tretmana smanjuje preživljenje fibroblasta (Ebadollahi i sur., 2021). S druge strane, dokazano je da predtretman arbutinom (30 i 45 µg/mL tijekom 24 h) pokazuje zaštitno djelovanje u HepG2 stanicama karcinoma jetre protiv toksičnog djelovanja *tert*-butil hidroperoksida, čime se arbutin može gledati kao antioksidacijsko sredstvo potencijalno djelotvorno u bolestima jetre (Seyfizadeh i sur., 2012). Na modelu miša koncentracija arbutina od 8 g/kg aplicirana tijekom 2 tjedna nije pokazala toksični učinak u uvjetima *in vivo* (NTP - National Toxicology Program, 2006). Iako su ispitivane koncentracije u ovom istraživanju bile puno više (10 – 100 mg/mL ekstrakta medvjjetke), vrijeme izlaganja bilo je kraće (maksimalno 4 h) jer je osnovna ideja bila simulirati realne uvjete izlaganja ekstraktu medvjjetke prilikom konzumacije terapijskog napitka, čime se može opravdati izostanak citotoksičnog učinka na ispitivane stanične linije probavnog sustava i jetre.

Antioksidacijski potencijal lišća medvjjetke već je proučavan primjenom brojnih biokemijskih testova koji pokazuju njegovu vrlo visoki antioksidacijski kapacitet (Amarowicz i sur., 2004). Nekoliko studija antioksidacijskog djelovanja lišća medvjjetke ispitano je na modelu hrane, izravnim dodavanjem ekstrakta u meso ili ugradnjom u jestivu ambalažu za čuvanje hrane (Azman i sur., 2016). Također, Wrona i sur. (2019) opisali su novi višeslojni aktivni materijal s antioksidacijskim i antimikrobnim djelovanjem u koji je kao glavna aktivna komponenta uklopljen ekstrakt lišća medvjjetke iz Španjolske. Novo pakiranje koje sadrži prirodne ekstrakte kao aktivne tvari ima niz prednosti jer bi omogućilo zamjenu i uklanjanje sintetskih antioksidansâ. Također, metanolni ekstrakt lišća medvjjetke (20 mg/mL) pokazao je učinak na smanjenje embriotoksičnosti uzrokovane aflatoksinom B1 (AFB1 50 ng/10 µL) u pilećim jajima. Aflatoksini potiču stvaranje slobodnih radikala i stoga uzrokuju peroksidaciju u jetri, što dovodi do smanjenja razine antioksidansâ, apoptoze i oksidacijskog stresa. Pretpostavlja se da ekstrakt medvjjetke pojačava imunološki odgovor embrija i regulira biomarkere oksidacijskog stresa tako da povećava kapacitet antioksidacijskih enzima da se suprotstave oksidacijskom oštećenju koje stvara AFB1 (Elwan i sur., 2022). Khadir i sur. (2015) pokazali su da arbutin u dozi od 50 mg/kg tjelesne težine u uvjetima *in vivo* u potpunosti djeluje protiv oksidacijskog stresa izazvanog ciklosporinom A, na što upućuje smanjena peroksidacija lipida u serumu te je time dokazano njegovo antioksidacijsko djelovanje. Prema spomenutom radu, pretpostavlja se da je mehanizam antioksidacijskog djelovanja arbutina inhibicija otpuštanja arahidonske kiseline iz membrane putem inhibicije

fosfolipaze A2 čim se smanjuje peroksidacija lipida i stvaranje slobodnih radikala. Rezultati autora Tan i sur. (2022) pokazali su da arbutin u koncentraciji 0,03 mg/mL štiti neuronske stanice ($p < 0,05$) u uvjetima *in vitro* od peroksidacijske promjene, upale i pojačanog antioksidacijskog djelovanja, što upućuje na njegovu moguću zaštitnu ulogu od pojave moždanog udara.

5.4. Određivanje biološke aktivnosti antibiotika nitrofurantoina i biološki aktivnog spoja iz ekstrakta medvjete - hidrokinona te njegove smjese na stanice mokraćnog mjehura

Nitrofurantoin

Nitrofurantoin je učinkovit antibakterijski lijek za infekcije mokraćnog sustava kod kojeg nije došlo do klinički značajnog razvoja rezistencije zahvaljujući različitim mehanizmima djelovanja pri čemu bakterije nisu u stanju popraviti oštećene procese u isto vrijeme. To također pridonosi odsutnosti slučajeva unakrsne rezistencije s drugim vrstama antibiotika. Nitrofurantoin se aktivira unutar bakterija redukcijom putem flavoprotein nitrofurantoin reduktaze do nestabilnih metabolita, koji ometaju ribosomsku RNA, DNA i druge unutarstanične komponente. Djeluje baktericidno, posebno na bakterije prisutne u urinu s vrijednostima $pH < 7$. Spektar djelovanja nitrofurantoina uključuje većinu Gram-pozitivnih koka i *E. coli*. Njegova je uporaba ograničena na infekcije donjeg urinarnog trakta. Nitrofurantoin se brzo apsorbira iz crijeva te ne utječe na prirodnu crijevnu mikrobiotu te zato nije ispitivano njegovo biološko djelovanje na stanične linije probavnog sustava u uvjetima *in vitro*. Brzo se uklanja putem urina (lijek se pojavljuje u urinu unutar 30 min od primjene, a u potpunosti se uklanja unutar 6 h od primjene) i ne mogu se održati terapijske koncentracije u krvi (vrijeme poluživota je 20 min u plazmi) pa je prema tome u ovom istraživanju ispitan njegov utjecaj samo na stanice jetre i mokraćnog mjehura kao područja s maksimalnom koncentracijom (80 %) (Waller i Sampson, 2018).

Razine reaktivnih vrsta kisika u stanici ovise o ravnoteži između stvaranja ROS-ova i njihove detoksikacije različitim antioksidansima. Kao rezultat ove ravnoteže, održavanje homeostatskih razina ROS-a ključno je i za sprječavanje oksidacijskog oštećenja i za održavanje optimalnog redoks okruženja za normalnu funkcionalnost stanica. Prema tome može se zaključiti da je neravnoteža u razinama ROS-ova potaknuta maksimalnom terapijskom dozom nitrofurantoina (0,67 mg/mL) tijekom 2 i 4 h izlaganja unutar stanica izazvala smanjeno preživljenje stanica hepatocelularnog karcinoma HepG2 (prooksidacijsko

djelovanje). S druge strane, nitrofurantoin je djelovao antioksidacijski na HepG2 stanice nakon 1 i 2 h izlaganja u minimalnoj terapijskoj dozi (0,33 mg/mL).

Dokumentiran je širok spektar hepatotoksičnosti nitrofurantoina u rasponu od akutnog hepatitisa, granulomatozne reakcije, kolestaze ili autoimuno posredovanog hepatitisa do kroničnog aktivnog hepatitisa koji može dovesti do ciroze ili smrti. Mehanizam hepatotoksičnosti slabo je poznat, ali se pretpostavlja da je rezultat imunološkog procesa ili izravne citotoksične reakcije. Također, produljena izloženost nitrofurantoinu, veće koncentracije, ženski spol, starija dob i smanjena bubrežna funkcija, faktori su koji povećavaju rizik od razvoja hepatotoksičnosti (Sakaan i sur., 2014). Rano ukidanje terapije gotovo uvijek rezultira normalizacijom biokemijskih parametara jetre, ali je ona vrlo spora (2 – 6 mjeseci). Upitno je profilaktično nekontrolirano uzimanje lijeka tijekom duljeg vremenskog razdoblja.

U ovom istraživanju, nitrofurantoin primijenjen u maksimalnoj terapijskoj dozi (0,67 mg/mL) također je bio citotoksičan za stanice mokraćnog mjehura T24 nakon 2, 4 i 8 h izlaganja bez obzira na oporavak stanica. Antioksidacijsko djelovanje u T24 stanicama postignuto je samo nakon 8 h tretmana kod minimalne i maksimalne testirane koncentracije bez oporavka stanica pri čemu se to djelovanje nije prolongiralo daljnjom staničnom reprodukcijom. Vumma i sur., (2016) pokazali su da nitrofurantoin u koncentracijama 0,03 i 0,3 mg/mL nije imao utjecaj na vijabilnost tumorskih stanica mokraćnog mjehura (HTB-9) nakon 2, 4 i 12 h tretmana što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. S druge strane, pokazano je da nitrofurantoin izaziva inhibiciju rasta FANFT-induciranog tumora mišjeg mjehura (MBT2) i stanične linije humanog karcinoma prijelaznih stanica (GIBB) u rasponu koncentracija 0,03 – 0,12 mg/mL tijekom 2 – 9 dana tretmana u uvjetima *in vitro* (Bulbul i sur., 1985). Razlika u rezultatima može se objasniti u vremenu izlaganja nitrofurantoinu gdje su stanice tretirane 6 – 25 × dulje nego u ovom istraživanju.

Hidrokinon

Hidrokinon je pokazao citotoksičan učinak na T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura ovisan o dozi i vremenu kod tretmana bez staničnog oporavka. Statistički značajan učinak primijećen je kod jednog terapijskog napitka (~80 %) i koncentracije koja odgovara dnevnoj dozi hidrokinona (~70 %) samo nakon tretmana u trajanju od 8 h. Dvije najviše ispitivane koncentracije koje predstavljaju maksimalnu koncentraciju hidrokinona koja može doći u kontakt sa mokraćnim mjehurom iz preporučenih doza terapijskog napitka značajnije su smanjile preživljenje u sva tri ispitivana vremena (30 – 70 % preživljenje) te su utjecale na

promjenu morfologije T24 stanica. Stoga, može se zaključiti da su vrijeme izlaganja i konzumirana doza izrazito bitni u procjeni rizika citotoksičnog učinka hidrokinona na stanice mokraćnog mjehura. Toksični učinak pojačan oporavkom stanica pokazuje da hidrokinon ulazi u stanice i pokreće toksične procese koji se nastavljaju reprodukcijom stanica. Mao i sur. (2019) pokazali su da je koncentracija slobodnog hidrokinona od 44 µg/mL izazvala akutnu toksičnost u epitelnim stanicama proksimalnih tubula ljudskog bubrega (HK-2) i liniji epitelnih stanica ljudske jetre (THLE-2) nakon 4 h. Zanimljivo je da u ovom istraživanju koncentracije 20 µg/mL i 50 µg/mL nisu pokazale citotoksično djelovanje nakon 4 h, ali su statistički značajno smanjile preživljenje T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon 8 h što se može objasniti većom otpornošću tumorskih stanica korištenih u ovom radu u odnosu na normalne stanične linije. Također, može se pretpostaviti da kraće vrijeme izlaganja (2 i 4 h) uzrokuje samo reverzibilna oštećenja u tretiranim stanicama. Prethodno je dokazano da hidrokinon blokira fosforilaciju serin/treonin protein kinaze Akt uključene u širok spektar bioloških procesa, uključujući proliferaciju stanica, diferencijaciju, apoptozu, tumorigenezu, kao i sintezu glikogena i unos glukoze (Lee i sur., 2007).

Antioksidacijsko djelovanje hidrokinona izmjereno je u T24 stanicama nakon 8 h izlaganja koncentracijama 20 i 50 µg/mL hidrokinona bez oporavka stanica ($p < 0,05$) što se nije održalo nakon 24-satnog oporavka gdje se % ROS-ova ne razlikuje od negativne kontrole kod obje ispitivane koncentracije. S druge strane, kraće vrijeme izlaganja (4 h) manjim koncentracijama (5 i 20 µg/mL) uzrokovalo je indukciju ROS-ova u T24 stanicama. U drugim studijama također je pokazano da hidrokinon u nižim koncentracijama ima prooksidacijski učinak u stanicama hepatocelularnog karcinoma (HepG2) i ljudskim embrionalnim bubrežnim stanicama (HEK) nakon tretmana 4 h (Andersen i sur., 2010; Coulter i sur., 2013). Također, u ovom radu dokazano je da kod najviših ispitivanih koncentracija (320 i 900 µg/mL, sva tri ispitivana vremena) dolazi do narušavanja integriteta stanične membrane vjerojatno zbog oštećenja membrane stanica koja se nisu mogla popraviti pa metoda DCFH-DA nije bila primjenjiva. Također, prividno antioksidacijsko djelovanje jednog terapijskog napitka i dnevne doze hidrokinona (20 i 50 µg/mL, 8 h) bez oporavka stanica također se može objasniti oštećenjima membrane koja ne dozvoljavaju zadržavanje ROS-ova unutar stanice te su posljedično tome izmjerene njihove niže koncentracije u odnosu na negativnu kontrolu (100 %). Pri tome dokazano je da su kod nižih koncentracija hidrokinona (20 i 50 µg/mL, 8 h) oštećenja membrane reverzibilna jer kod T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura s 24-satnim oporavkom nije više vidljivo citotoksično djelovanje te manji % ROS-ova generiranih

unutar stanica. Jeyanthi i sur. (2021) pokazali su da hidrokinon nakon 30 min tretmana oštećuje staničnu membranu bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (31,24 µg/mL hidrokinona) i *Staphylococcus aureus* (62,5 µg/mL hidrokinona) putem oksidacijskog stresa uzrokovanog ROS-ovima. Unutar 1 h, membrane su se deformirale i nakon 2 h, činilo se da su stanice razbijene sa sadržajem stanice izbačenim u izvanstanični prostor. Također, Aspengren i sur. (2012) utvrdili su da hidrokinon (1,1 – 5,5 µg/mL) utječe na organizaciju mikrotubula i aktinskih filamenata odnosno inducira reorganizaciju mikrotubula u tanke snopove te rastavlja aktinske filamente i stresna vlakna čime narušava integritet stanične membrane u dermalnim melanoforima *Xenopus laevis*. Oksidacijski produkti hidrokinona su kinoni i ROS-ovi što dovodi do oksidacijskog oštećenja membranskih lipida i proteina, uključujući tirozinazu (Briganti i sur., 2003). U prethodnim studijama pokazano je da oksidacijski stres aktivira citotoksične mehanizme koji uzrokuju promjene citoskeleta te da je ravnoteža oksidacijskog stresa ključna u održavanju normalne stanične funkcije kao odgovora na egzogene i endogene čimbenike (Gao i sur., 2018). Mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK), kinaza regulirane izvanstaničnim signalom (ERK1/2), p38 kinazu i c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) imaju važne uloge u faktorom rasta induciranoj staničnoj proliferaciji i preživljavanju (Reddy i sur., 2003). Od spomenutih metaboličkih putova kinaza, ERK put je uključen u stanični rast i inhibiciju apoptoze dok su JNK i p38 putevi povezani s indukcijom apoptoze (Davis, 2000). Ljudske stanice limfoblastične leukemije (Jurkat stanice) izložene visokoj koncentraciji hidrokinona (5,5 µg/mL) pokazale su povećanje indukcije apoptoze preko ERK signalnog puta i kaspaza metaboličkog puta, dok je izloženost koncentraciji hidrokinona od 0,55 µg/mL rezultiralo povećanjem udjela stanica u S fazi staničnog ciklusa, vjerojatno zbog učinaka na raspodjelu mikrotubula (Kim i sur., 2009).

Smjesa nitrofurantoina i hidrokinona

Tijekom života ljudi su češće izloženi smjesama tvari nego pojedinačnim toksikantima. S obzirom da kombinirani utjecaj može rezultirati aditivnim, antagonističkim sinergističkim ili djelovanjem bez očiglednog međusobnog utjecaja, gdje je sinergističko djelovanje najnepovoljnije za čovjeka, važno je odrediti utjecaj smjese toksičnih tvari. Zbog mogućnosti sinergističkog djelovanja između dva spoja u kojem jedan agens pojačava djelovanje drugog te na taj način zajedno djeluju učinkovitije nego svaki zasebno, mnogi znanstvenici provode istraživanja usmjerena ispitivanju potencijalno sinergističkog djelovanja biljnih ekstrakata i antibiotika (Wagner i Ulrich-Merzenich, 2009).

U ovom radu istražena je interakcija hidrokinona i antibiotika nitrofurantoina u slučaju kada se koriste u zajedničkoj terapiji protiv urinarnih infekcija te je pokazano njihovo sinergističko djelovanje na smanjenje preživljenja T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura u tretmanu s 24-satnim oporavkom u odnosu na djelovanje pojedinačnih doza. Također, nitrofurantoin i hidrokinon u smjesi pokazuju sinergističko djelovanje u vidu indukcije ROS-ova. To je primijećeno kod manjih koncentracija hidrokinona (5 – 50 µg/mL) te kod kraćeg vremena izlaganja. Viša koncentracija i duži tretman utječu na preživljenje stanica te vjerojatno zbog oštećenja membrane dolazi do nemogućnosti zadržavanja ROS-ova unutar stanica pri čemu dobivamo prividan antioksidacijski učinak. U slučaju oštećenja stanične membrane, metoda DCFH-DA nije pogodna za mjerenje razine slobodnih radikala unutar stanice. Iako je statistički potvrđeno sinergističko djelovanje hidrokinona i nitrofurantoina, parametri za utvrđivanje su granični te je potrebno ostaviti otvoreno pitanje sinergizma za daljnja istraživanja korištenjem većeg raspona koncentracija i drugih kombinacija spojeva te dodatnim eksperimentima biološkog djelovanja kao potvrde. U ovom istraživanju, po prvi puta ispitano je biološko djelovanje smjese hidrokinona i antibiotika nitrofurantoina u vidu učinka na preživljenje i indukciju ROS-ova na modelu stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (T24).

Danas je poznato da mnogi biljni ekstrakti imaju antibakterijska svojstva te da mogu pojačavati djelovanje antibiotika ako se primjenjuju zajedno. Ta sposobnost biološki aktivnih spojeva iz biljnih ekstrakata vidi se preko modifikacije ili blokiranja bakterijskog mehanizma rezistencije čime bakterije postaju osjetljive na antibiotik ili antibiotik djeluje pri nižim koncentracijama. Takav terapijski pristup smanjuje učinkovitu dozu antibiotika te smanjuje nuspojave koje antibiotik može izazvati kao lijek. Jedan od primjera je smjesa etanolnog ekstrakta kore nara i ciprofloksacina koja je pokazala značajno antimikrobno djelovanje na rezistentni soj bakterije *Klebsiella pneumoniae* (Rafiq i sur., 2017). Također i pojedinačni biološki aktivni spojevi izoliranih iz različitih biljaka mogu pojačati antimikrobno djelovanje antibiotika. Na primjer, fenolni spoj korilagin iz biljke medvjetke (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) značajno je smanjio minimalnu inhibitornu koncentraciju β-laktamskih antibiotika, osobito u slučaju MRSA (eng. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (Shimizu i sur., 2001).

Osim preko smanjenja inhibitorne koncentracije antibiotika, učinak biljnih ekstrakata na djelovanje antibiotika može se pratiti i preko smanjenja štetnog prooksidacijskog učinka antibiotika. Letelier i sur. (2017) istraživali su antioksidacijski učinak ekstrakata ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), artičoke (*Cynara scolymus*) i bršljana (*Hedera helix*) prilikom

terapije nutrafurantinom. Pokazano je da zasebna terapija nitrofurantinom smanjuje aktivnost glutation S transferaza zbog reverzibilnog i ireverzibilnog vezanja elektrofilnih metabolita nastalih metabolizmom nitrofurantina. Djelovanjem nitrofurantina došlo je do lipidne peroksidacije jer metabolizmom nitrofurantina nastaju metaboliti i/ili slobodni radikali koji imaju oksidacijski učinak na mikrosome jetre štakora. Ispitivani biljni ekstrakti smanjili su prooksidacijski učinak nitrofurantina čime je došlo do smanjenja lipidne peroksidacije pri čemu su najveći antioksidacijski učinak pokazali ekstrakti bršljana i ružmarina (smanjenje prooksidacijskog učinka za 50 %) koji ujedno imaju i najveći udio fenolnih spojeva. Iz dobivenih rezultata, vidljiva je povezanost između koncentracije fenola unutar biljnih ekstrakata i njihovog antioksidacijskog kapaciteta. Spomenuti rezultati se ne slažu s rezultatima ovog istraživanja što je moguće objasniti time da je u smjesi uz antibiotik nitrofurantin korišten pojedinačni biološki aktivni spoj hidrokinon koji sam ima prooksidacijsko djelovanje na T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura.

5.5. Određivanje antimikrobnog i anti-adhezivnog učinka ekstrakta medvjetke i njezinih biološki aktivnih spojeva arbutina i hidrokinona

Citotoksični učinak ekstrakt medvjetke i arbutina

Ekstrakt medvjetke je u koncentracijama jednog terapijskog napitka i dnevne doze imao najveći citotoksični učinak na bakteriju *S. aureus* (preživljenje nakon tretmana ~30 %) i *L. plantarum* (preživljenje nakon tretmana ~50 %) dok je arbutin na iste bakterijske vrste pokazao slabije antibakterijsko djelovanje (preživljenje nakon tretmana ~80 % za obje bakterijske kulture). Što se tiče ostalih bakterijskih kultura korištenih u istraživanju (*E. coli* i *L. fermentum*), ekstrakt medvjetke nije drastično utjecao na njihovo preživljenje (preživljenje nakon tretmana ~80 %) dok je koncentracija arbutina prisutna u dnevnoj dozi ekstrakta (2,4 mg/mL) smanjila preživljenje *E. coli* na ~50 % te *L. fermentum* na ~60 %. Prema rezultatima može se zaključiti da ekstrakt medvjetke ima jače antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne bakterije.

Razlike u osjetljivosti na ekstrakt medvjetke između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija mogu se objasniti razlikom u strukturi njihove stanične stijenke. Fosfolipidna membrana Gram-negativnih bakterija, za razliku od Gram-pozitivnih, sadrži lipopolisaharidne komponente koje djeluju kao selektivna barijera hidrofiličnim spojevima te tako Gram-negativne bakterije pokazuju veću otpornost na djelovanje antimikrobnih spojeva (Seleshe i sur., 2017). Također, može se primijetiti znatna razlika između preživljenja

ispitivanih Gram-pozitivnih bakterija pri čemu je više preživljenje bakterija mliječne kiseline *L. fermentum* i *L. plantarum* u odnosu na patogenu *S. aureus*. Ovakav rezultat može se objasniti interakcijom između crijevne mikrobiote i prebiotika, odnosno fenolnih spojeva. Većina fenolnih spojeva ima nisku bioraspoloživost te dopijevaju u debelo crijevo u nepromijenjenom obliku. U debelom crijevu ti spojevi stupaju u dvosmjernu interakciju s crijevnim mikrobima modulirajući ih i, posljedično, otpuštajući metabolite poput organskih kiselina. Sve se više istražuju bioaktivni fenolni spojevi biljaka kao potencijalni prebiotici koji potiču rast i metabolizam probiotičkih bakterija. No, prebiotičko djelovanje fenola koje povoljno utječe na sastav crijevne mikrobiote uključuje i antibakterijsko djelovanje pomoću proizvedenih metabolita na patogene bakterije poput *S. aureus* (Plamada i Vodnar, 2021).

Biljke su bogate biološki aktivnim spojevima poput fenolnih spojeva, eteričnih ulja i mikronutrijenata. Za mnoge od navedenih spojeva objavljeno je da imaju antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Antimikrobno djelovanje fenolnih spojeva uključuju različite opisane mehanizme. Na primjer, flavonoidi denaturiraju bakterijske proteine i nukleinske kiseline stvarajući komplekse pomoću vodikovih veza. Pri tome dolazi do trajnih oštećenja i smrti bakterijske stanice. Najvažniji aspekt protubakterijskog djelovanja flavonoida je da moraju zadržati svoje amfifilne karakteristike kako bi prodrli u bakterije i ispoljili svoje snažne antibakterijske učinke (Shamsudin i sur., 2022). Također, fenolni spojevi stupaju u interakciju sa staničnim membranama i inaktiviraju enzime koji su ključni za stanično preživljenje. Pojedini fenoli mogu djelovati i kao prooksidansi te na taj način ispoljavaju baktericidno djelovanje (Gyawali i Ibrahim, 2012).

Nadalje, c i sur. (2022) pokazali su da vodeni ekstrakt lišća medvjete djeluje bakteriostatski na Gram-pozitivnu bakteriju *Cutibacterium acnes* te da je određena minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta medvjete bila 0,6 mg/mL nakon tretmana od 48 h. Također, ekstrakt medvjete je u tretmanu cijelom i polovičnom dozom minimalne inhibitorne koncentracije pokazao inhibitorno i degradativno djelovanje na matricu biofilma *C. acnes*. Glavna komponenta ekstrakta kojoj se pripisuje antioksidacijsko protuupalno djelovanje je arbutin koji smanjuje izlučivanje IL-1 β , TNF- α i IL-6 (Lee i Kim, 2012). Također, Hassan i sur. (2013) pokazali su antimikrobno djelovanje etanolnog ekstrakta lišća medvjete (ekstrakcija 24 h) protiv bakterije *E. coli* pri čemu su utvrđene minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije ekstrakta veće od 5 mg/mL.

Citotoksični učinak hidrokinona i nitrofurantoina na uropatogenu *E. coli*

Hidrokinon u koncentracijama iz jednog terapijskog napitka i dnevne doze ekstrakta medvjete djeluje antibakterijski na uropatogenu *E. coli* ovisno o duljini vremena izlaganja. Nakon 1 h izlaganja, samo maksimalna moguća koncentracija hidrokinona koja se može izlučiti preko urina (320 i 900 µg/mL) smanjuje preživljenje *E. coli* (~60 %). S druge strane, nakon 2 h i 4 h izlaganja, koncentracije hidrokinona 20 i 50 µg/mL smanjuju preživljenje *E. coli* na ~70 % odnosno 60 %. Nitrofurantoin je drastično smanjio rast uropatogene *E. coli* već nakon 2 h tretmana koncentracijama koje odgovaraju profilaktičkoj i minimalnoj terapijskoj dozi (preživljenje manje od 5 %).

Toksičnost hidrokinona prema uropatogenoj *E. coli* posredovana je oksidacijskim stresom te se može objasniti povećanom proizvodnjom H₂O₂. Predtretman katalazom blokirao je toksični učinak hidrokinona s obzirom da je katalaza enzim koji detoksificira H₂O₂ generiran oksidacijskim stresom. Također, poznato je da hidrokinon može lako autooksidirati u semikinon radikale, koji se kasnije mogu dismutirati u H₂O₂ pomoću superoksid dismutaze. Hidrokinon može uzrokovati i oksidacijsko oštećenje DNA u prisutnosti Cu(II) (Horita i sur., 2005). Glutation peroksidaza (GPx) također je važan enzim u regulaciji razine unutarstaničnog H₂O₂ u biološkim sustavima. Međutim, bakteriji *E. coli* nedostaje GPx, stoga je katalaza njezin glavni enzim u razgradnji H₂O₂. Neka su istraživanja pokazala da katalaza nije propusna za stanice, ali H₂O₂ je sposoban difundirati dalje od mjesta stvaranja i može lako ući u stanicu gdje se može detoksificirati unutarstaničnom katalazom (Engelich i sur., 2002). Ako količina proizvedenog H₂O₂ premašuje onu koju unutarstanična katalaza može ukloniti tijekom izlaganja hidrokinonu, prekomjerni H₂O₂ može dalje reagirati s metalima u tragovima i proizvesti OH• radikale Fentonovom reakcijom ili Haber-Weissovom reakcijom. Prema tome, H₂O₂ ili visoko reaktivni OH• doprinose citotoksičnosti izazvanoj hidrokinonom (Horita i sur., 2005).

Iako se uropatogena bakterija *E. coli* često kategorizira kao izvanstanični patogen, ona zapravo može napasti niz tipova stanica domaćina, uključujući terminalno diferencirane površinske stanice i manje zrele intermedijarne i bazalne epitelne stanice koje čine slojevite slojeve urotela mokraćnog mjehura (Dhakal i sur., 2008). Nitrofurantoin je jedan od rijetkih antibiotika koji je sposoban ukloniti i bakterijske infekcije kod kojih su *E. coli* pozicionirane unutar stanice što znači da nitrofurantoin može prodrijeti kroz staničnu membranu epitelnih stanica mjehura. Vumma i sur. (2016), pokazali su da nitrofurantoin u koncentraciji od 30 µg/mL iskorijenjuje bakteriju *E. coli* NU14 nakon 12 h, dok je visoka koncentracija

nitrofurantoina (300 µg/mL) iskorijenila NU14 nakon 4 h što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom radu gdje je minimalna terapijska koncentracija nitrofurantoina (330 µg/mL) smanjila preživljenje *E. coli* na manje od 0,5 % nakon 4 h tretmana. U *E. coli*, nitro skupina nitrofurantoina prevodi se u antimikrobne aktivne spojeve nitroreduktazama koje kodiraju *nsf* geni. Iako toksični produkti koji nastaju nakon redukcije nitrofurantoina ostaju nejasni, predloženi su intermedijarni nitrozo spojevi i stvaranje produkata hidroksilamina.

Učinak na adheziju

Rezultati učinka na adheziju pokazuju da arbutin (0,8 mg/mL) statistički značajno smanjuje jedino vezanje bakterije *L. plantarum* na epitel debelog crijeva za ~25 % (Caco-2) dok na vezanje bakterija *S. aureus* i *E. coli* nema učinka. Ekstrakt medvjete u koncentraciji koja odgovara dnevnoj dozi (3×) statistički značajno smanjuje adheziju bakterije *L. fermentum* za epitel debelog crijeva (~25 %) kao i epitel jezika (~40 %). Prema tome, može se zaključiti da arbutin i ekstrakt medvjete značajno utječu na adheziju samo bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactiplantibacillus*. Hidrokinon u koncentraciji od 20 µg/mL nema učinka na vezanje *E. coli* za epitel mokraćnog mjehura (T24) nakon 1 h tretmana dok s druge strane koncentracija 50 µg/mL smanjuje adheziju *E. coli* za ~70 %.

U radu Dykes i sur. (2003) od 25 ispitanih sojeva bakterija prisutnih u hrani, metoda vezanja bakterija za ugljikovodike (eng. *Bacterial adherence to hydrocarbons*, BATH) pokazala je da etanolni ekstrakt lišća medvjete (5 mg/mL, 1 h) značajno povećava hidrofobnost 14, smanjuje hidrofobnosti 4 i nema nikakav učinak na hidrofobnost površine 7 bakterijskih sojeva. Pri tome, površinska hidrofobnost *E. coli* je povećana nakon tretmana (+20,35) pri čemu je puno značajnije povećanje kod patogenog soja *E. coli* O157:H7 (+55,09). S druge strane, etanolni ekstrakt medvjete smanjio je hidrofobnost površine bakterije *S. aureus* (-42,68) i bakterija iz roda *Lactiplantibacillus* (*L. brevis* i *L. plantarum*, -6,59 i -4,52). Dokazano je da je antibakterijski učinak vodenog ekstrakta lišća medvjete prema bakteriji *E. coli* povezan s njegovom sposobnošću da poveća hidrofobnost površine bakterijskih stanica i posljedično smanji njihovu sposobnost adhezije na stanice domaćina (Geetha i sur., 2011). S obzirom da u ovom istraživanju arbutin nije utjecao na adheziju *E. coli*, može se zaključiti da on ne uzrokuje promjenu hidrofobnosti bakterijske površine. Pregledom literature, utjecaj vodenog ekstrakta lišća medvjete kao i utjecaj arbutina na adheziju bakterija iz roda *Lactiplantibacillus* do danas još uvijek nije istražen. Budući da ekstrakt lišća medvjete smanjuje hidrofobnost površine bakterija iz roda *Lactiplantibacillus*, moguće je da postoji neki drugi mehanizam osim povećanja hidrofobnosti površine bakterije koji utječe na adheziju *L.*

fermentum na humane stanice. Budući da je arbutin u ovom radu pokazao smanjeni postotak adhezije *L. plantarum*, on sigurno igra veliku ulogu u tom mehanizmu.

Aspengren i sur. (2012) pokazali su da je koncentracija hidrokinona iznad 11 µg/mL utjecala na sposobnost stanične adhezije melanofora, ali nije bilo moguće odrediti bilo kakve morfološke učinke na mikrotubule i aktinskih filamenata zbog odvajanja stanice prije i tijekom postupka imunološkog bojenja. Dobro je poznato da je adhezija ovisna o aktinu (Blystone, 2004), a utvrđeno je da je hidrokinon slabi inhibitor izgradnje mikrotubula u uvjetima *in vitro* (Aspengren i sur., 2012) pa se time može objasniti inhibicija adhezije *E. coli* za T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana hidrokinonom (50 µg/mL) pokazana u ovom radu. Izostanak utjecaja manje koncentracije (20 µg/mL) hidrokinona na adheziju *E. coli* može se objasniti kraćim vremenom tretmana (1 h) uvjetovanim citotoksičnim učinkom hidrokinona na T24 stanice nakon duljeg izlaganja.

5.6. Genotoksični učinak uslijed oštećenja izazvanih djelovanjem ROS-ova i ispitivanje zaštitnog učinka na DNA

Zaštitni učinak na DNA izmjeren nakon UV-fotolize na H₂O₂ molekulu

Rezultatima ovog istraživanja pokazano je da vodeni ekstrakt lišća medvjetteke i antibiotik nitrofurantoin nemaju zaštitni učinak na molekulu DNA dok su arbutin djelomično i hidrokinon u cijelom ispitivanom rasponu koncentracije (5 – 900 µg/mL) zaštitili DNA od oksidacijskih oštećenja uzrokovanih radikalima nastalim UV djelovanjem na H₂O₂ molekulu. Zaštitni učinak arbutina je ovisan o koncentraciji pri čemu manje ispitivane koncentracije (0,4 i 0,8 mg/mL) nisu pokazale zaštitno djelovanje.

Zaštitni učinak hidrokinona i arbutina od nastalih slobodnih kisikovih radikala može se objasniti njihovim antioksidacijskim kapacitetom i sposobnosti hvatanja radikala. Hidrokinon je vrlo učinkovit inhibitor peroksidacije lipida, što također ukazuje na njegovo antioksidacijsko djelovanje, a time i antimutagena svojstva (Valencia-Quintana i sur., 2016). Hidrokinon (50 µg/mL) izoliran iz biljke *Rhodiola sacra* pokazao je umjerenu inhibitornu aktivnost protiv superoksidnih aniona ($\bullet\text{O}_2^-$) stvorenih od strane sustava hipoksantin/ksantin oksidaze (Giner i sur., 2022). Također, Erenler i sur., (2016) pokazali su da je hidrokinon (0,054 % w/w) od 5 izoliranih spojeva (hidrokinon, arbutin, ružmarinska kiselina, 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon i hesperetin) iz nadzemnih dijelova biljke mažurana (*Origanum majorana* L.) pokazao najveći, a arbutin (0,039 % w/w) najniži antioksidacijski kapacitet određen metodama DPPH•, ABTS i FRAP. Nadalje, arbutin pokazuje slabu, ali dugotrajnu aktivnost hvatanja

radikala DPPH•, ali i potpuno istu antioksidacijsku aktivnost kao i hidrokinon određen metodom ORAC (eng. *The Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (Takebayashi i sur., 2010). Slaba aktivnost arbutina u hvatanju radikala može objasniti potrebnu veću koncentraciju arbutina (2,4 mg/mL) za postizanje zaštitnog učinka na molekulu DNA u odnosu na hidrokinon (5 µg/mL).

Mikronukleus test

Mikronukleus-test u tzv. *cytome* inačici (eng. CBMN *cytome* assay) jedna je od najopsežnijih metoda koja omogućava istovremeno proučavanje oštećenja kromosoma, oštećenja diobenog vretena, kinetike staničnog ciklusa i citotoksičnosti u tretiranim staničnim kulturama (Fenech i sur., 2011). Mikronukleusi mogu nastati usred gubitka acentričnih fragmenata kromosoma, kao posljedica različitih tipova oštećenja kromosoma, tijekom gubitka cijelog kromosoma ili prilikom oštećenja diobenog vretena i gubitka funkcionalnosti, a također nastaju uslijed nepravilnog ili pogrešnog popravka DNA, loma kromosoma ili nepravilne raspodjele kromosoma uslijed mitotičkih pogrešaka (Mishima, 2017). Nastanak mikronukleusa uslijed navedenih događaja mogu uzrokovati oksidacijski stres, izlaganje klastogenim i aneugenim agensima, genetski poremećaji u kontrolnoj točki staničnoga ciklusa, mutacije u genima koji sudjeluju u popravku DNA ili nedostatak hranjivih tvari kao izvora kofaktora koji sudjeluju u sintezi DNA (Bonassi i sur., 2007; Iarmarcovai i sur., 2008). Jezgrini pupovi uglavnom nastaju uklanjanjem sadržaja iz jezgre kao što su prekobrojni kromosomi i amplificirana DNA (Fenech, 2007). S druge strane, nukleoplazmatski mostovi predstavljaju mjeru staničnih poremećaja koji rezultiraju strukturnim oštećenjima kromosoma, acentričnim kromosomskim fragmentima, lomovima kromosoma ili asimetričnom kromosomskom preraspodjelom (Fenech i sur., 2011).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da antibiotik nitrofurantoin testiran u koncentraciji koja odgovara profilaktičkoj dozi (0,167 mg/mL) tijekom tretmana od 2 h u uvjetima *in vitro* izaziva statistički značajno povećanje broja mikronukleusa (MN), jezgrinih pupova (NB) i nukleoplazmatskih mostova u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura. Također, hidrokinon u obje ispitivane koncentracije (5 i 10 µg/mL) uzrokuje statistički značajno veći broj oštećenja genetičkog materijala u vidu većeg broja MN-a, NB-a i NPB-a u odnosu na negativnu kontrolu pri čemu taj broj ne ovisi o koncentraciji hidrokinona ni vremenu izlaganja (2 i 8 h), odnosno nema razlike u učinku između više i niže ispitane koncentracije hidrokinona. Iznimka su NPB-ovi gdje je zabilježen statistički značajno veći broj NPB-a na 1000 analiziranih BNS T24 tretiranih višom ispitivanom koncentracijom hidrokinona (10 µg/mL) u odnosu na

nižu koncentraciju hidrokionona (5 µg/mL). Nadalje, smjesa nitrofurantoina (0,167 mg/mL) i hidrokinona (5 µg/mL) pokazuje sinergističko djelovanje u vidu genotoksičnog djelovanja na T24 stanice u odnosu na pojedinačne spojeve.

Na temelju rezultata stanične kinetike i preživljenja T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura može se zaključiti da antibiotik nitrofurantoin testiran u koncentraciji koja odgovara profilaktičkoj i terapijskoj dozi inhibira/zaustavlja rast i diobu T24 stanica te je taj učinak ovisan o dozi i pojačava se s produljenjem vremena tretmana. Isto tako, ovim istraživanjem pokazano je potencirajuće djelovanje hidrokinona na nitrofurantoin u smjesi što se tiče citostatskog djelovanja nitrofurantoina na T24 stanice karcinoma mokraćnog mjehura u odnosu na uzorke tretirane pojedinačnim spojevima s obzirom da hidrokinon nema značajan učinak na indeks diobe jezgara T24 stanica nakon 2 h tretmana u odnosu na negativnu kontrolu. Spomenuti citostatski učinak smjese se povećava s produljenjem vremenom tretmana. Od svih testiranih spojeva, jedino hidrokinon u koncentraciji od 10 µg/mL nakon tretmana od 8 h uzrokuje statistički značajno veći broj stanica u apoptozi.

Za razliku od rezultata u ovom istraživanju, u radu Jurica i sur. (2017) hidrokinon u koncentraciji od 8 µg/mL tijekom tretmana od 24 h nije značajno utjecao na stvaranje mikronukleusa, ali su limfociti imali statistički značajno više jezgrinih pupova u odnosu na negativnu kontrolu dok su koncentracije od 140 i 280 µg/mL potpuno blokirale diobu limfocita. Nuklearno pupanje događa se tijekom S-faze staničnog ciklusa. Pretpostavlja se da procesi popravka DNA rezultiraju stvaranjem prekomjerne količine DNA, koja se koncentrira u periferni dio jezgre u obliku jezgrinih pupova (Fenech, 2006). Razliku u dobivenim rezultatima može se objasniti različitim staničnim linijama korištenim u istraživanju. Iako ne u tolikoj mjeri kao veće ispitivane koncentracije, koncentracija hidrokinona od 8 µg/mL također je značajno narušila staničnu kinetiku limfocita u odnosu na kontrolu, što se slaže s rezultatima ovog istraživanja. Unatoč tome što nema indikacija za izravnu mutagenost, hidrokinon se smatra odgovornim za kromosomske aberacije, abnormalne procese mitoze, formiranje mikronukleusa, aneuploidije i izmjene sestrinskih kromatida (Fenech, 2006). Do sada dobiveni kontradiktorni rezultati primjenom dobro utvrđenih citogenetičkih metoda onemogućavaju potpuno objašnjenje mehanizama biološkog djelovanja hidrokinona na staničnoj razini.

Rezultati istraživanja Fučić i sur. (2005) potvrđuju genotoksični potencijal nitrofurantoina u mladim i odraslim miševa u uvjetima *in vivo*, te pokazuju da su mladi miševi (stari 3 tjedna) osjetljiviji na genotoksične učinke nitrofurantoina od odraslih miševa (stari 8 tjedana) te da odgovor kod mladih miševa traje dulje vrijeme. Primjena mikronukleus *cytome*

testa u uvjetima *in vivo* pokazala je statistički značajno veći broj mikronukleusa u retikulocitima miševa tretiranih s 5, 10, i 50 mg/kg nitrofurantoina u odnosu na kontrolnu skupinu. Nitrofurantoin je u uvjetima *in vitro* izazvao inhibiciju rasta FANFT-induciranog tumora mišjeg mjehura (MBT2) i stanične linije humanog karcinoma prijelaznih stanica (GIBB) u koncentracijama od 125 μ M, 250 μ M i 500 μ M (30 – 120 μ g/mL) što se slaže i s rezultatima ovog istraživanja (Bulbul i sur., 1985).

Nekada se pogrešno smatralo da prilikom apoptoze dolazi do formiranja mikronukleusa. Danas se zna da je za razliku od apoptoze, za nastanak mikronukleusa nužno da stanica uđe u diobu, a stvaranje mikronukleusa ovisi o mehaničkim karakteristikama stanice, tipu stanica te veličini i broju kromosoma. S obzirom da mikronukleusi nastaju kao rezultat kromosomskih lomova i oštećenja diobenog vretena, brojenje mikronukleusa ne govori nam dovoljno o mehanizmima koji su doveli do njihova nastanka (Silva-Grecco i sur., 2012). Isto tako, pomoću mikronukleus *cytome* testa mogu se razlikovati stanice u apoptozi i nekrozi i na taj se način može procijeniti citotoksični učinak. Razlika između rane i kasne apoptoze je u tome da u ranoj stanice unutar jezgre imaju kondenzirani kromatin dok je u kasnoj apoptozi kromatin fragmentiran unutar netaknute citoplazme. S druge strane, rana nekroza vidljiva je preko oštećene stanične membrane i blijedo obojane citoplazme s brojnim vaukolama. U kasnoj nekrozi dolazi do gubitka citoplazme, izlivanja sadržaja jezgre i oštećenja jezgrine membrane što je vidljivo preko njezinog nepravilnog oblika (Fenech i sur., 2003).

5.7. Proteomska analiza stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 nakon tretmana hidrokinonom i nitrofurantoinom

Proteomska analiza nakon tretmana hidrokinonom tijekom 2 h

Tretman hidrokinonom (20 i 320 μ g/mL) tijekom 2 h povećava ekspresiju proteina u T24 stanicama koji su uključeni u glikolitički proces, odgovor na podražaj i inicijaciju translacije. Prema tome, hidrokinon u minimalnoj i maksimalnoj koncentraciji prisutnoj u mokraćnom mjehuru nakon konzumacije jednog terapijskog napitka ekstrakta lišća medvjete aktivira signalne proteine koji pospješuju adaptaciju na stres, proteine povezane s toplinskim šokom, odgovorom na oksidacijski stres, proteine uključene u procese glikolize/glukoneogeneze i inicijaciju translacije. Pojačano eksprimirani proteini 14-3-3 epsilon (YWHA ϵ) i 14-3-3 zeta/delta (YWHA ζ) nakon tretmana hidrokinonom tijekom 2 h u T24 stanicama su proteini koji reguliraju višestruke signalne puteve uključujući apoptozu, napredovanje staničnog ciklusa, autofagiju, metabolizam glukoze i pokretljivost stanica. 14-3-

3 proteini su obitelj strukturno sličnih fosfo-vezujućih proteina koji reguliraju praktički svaku glavnu staničnu funkciju. Nutritivno siromašna okolina i drugi čimbenici poput genotoksičnog stresa mogu dovesti do gubitka homeostatskih 14-3-3 interakcija kao i stvaranja novih interakcija koje omogućavaju prilagodbu na stresne uvjete. Također, prekomjerna ekspresija 14-3-3 izoformi uzrokuje kemorezistenciju (Pennington i sur., 2018). Tretman hidrokinonom aktivira proteine toplinskog šoka u T24 stanicama kao što su HSP90 proteini ili molekularni šaperoni koji imaju važnu ulogu u smatanju, stabilnosti i aktivnosti mnogih proteina (preživljavanje stanica, kontrola staničnog ciklusa, hormonska signalizacija i apoptoza) odgovornih za inicijaciju, napredovanje i metastaziranje tumora (Hoter i sur., 2018). Pogrešno smatanje proteina može biti posljedica promjene u molekuli DNA (mutacije), pogreške nastale tijekom transkripcije, translacije na ribosomu ili uslijed djelovanja okolišnih čimbenika u kojoj se protein nalazi (Romero-Romero i sur., 2022). Prekomjerno eksprimiran protein peroksiredoksin-1 (**PRDX1**) je tiol-specifična peroksidaza koja sudjeluje u staničnoj zaštiti od oksidacijskog stresa detoksikacijom peroksida. Katalizira redukciju peroksida pomoću NADPH i funkcionira kao senzor signalnih događaja posredovanih vodikovim peroksidom (Kang i sur., 1998). Terasaka i sur. (2000) pokazali su da citotoksičnost hidrokinona ide u smjeru djelovanja na mehanizma oksidacije posredovanog radikalima, a pojačana sinteza peroksiredoksina-1 nakon tretmana potvrđuje stanični odgovor na stvaranje slobodnih radikala. Nadalje, stanice mogu promicati regeneraciju NADPH pojačanom regulacijom enzima s ključnim ulogama u glikolizi/glikoneogenezi što i potvrđuju prekomjerno eksprimirani proteini **ENO1**, **ALDOA**, **ALDOC**, **GAPDH** i **TPI1** nakon tretmana hidrokinonom. Elongacijski faktori **EIF4A1** i **EIF4G1** su komponente proteinskog kompleksa eIF4 koji je ključan za vezanje mRNA na ribosom. U dostupnoj literaturi trenutno nema podataka o povezanosti spomenutih elongacijskih faktora s odgovorom na tretman hidrokinonom. U prethodnom istraživanju na stanicama fibroblasta pluća ljudskog embrija (HLF), pokazano je da hidrokinon (11 µg/mL, 24 h) izaziva promjenu u ekspresiji proteina uključenih u oksidacijski stres, staničnu signalizaciju, RNA izrezivanje (eng. *splicing*) i rekonstrukciju citoskeleta (Li i sur., 2006). S obzirom na rezultate spomenutog istraživanja, ispitana je ekspresija proteina uključenih u izgradnju citoskelata i regulaciju citoskeleta u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana hidrokinonom. Rezultati su pokazali da tretman hidrokinonom (20 i 320 µg/mL) nakon 2 h ne utječe na promjenu u ekspresiji proteina tubulina (**TUBA4A** i **TUBB1**), šaperona specifičnih za tubulin (**TBCA** i **TBCD**) i proteina povezanih s citoskeletom (**CKAP5** i **MAPRE1**).

Proteomska analiza nakon tretmana hidrokinonom tijekom 8 h

Prolongacija tretmana T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura hidrokinonom na 8 h izazvala je promjene u proteinskom sastavu citoskeleta i kromatina, aktivirala je mehanizam odgovora na nesmotane proteine te staničnu smrt izazvanu stresnim uvjetima. Promjene u sastavu citoskeleta izazvane djelovanjem hidrokinona dokazuje smanjena ekspresija tropomiozin alfa-3 lanca (**TPM3**) uključenog u stabilizaciju citoskeleta i povećana ekspresija filamin-C (**FLNC**) i MARCKS-srodnog proteina (**MARCKSL1**). Filamin-C je protein koji veže aktin, strukturni protein u eukariotskim stanicama koji sudjeluje u protein-protein interakcijama te je ključni čimbenik u održavanju oblika i polariteta stanice kao i reorganizaciju aktinskog citoskeleta kao odgovora na signalne podržaj (Agarwal i sur., 2021). MARCKS-srodni protein također sudjeluje u održavanju homeostaze citoskeleta i staničnu pokretljivost na način da utječe na stvaranje intermedijalne spojnice kod stanica-stanica ili stanica-matriks povezivanja u epitelnim i endotelnim tkivima (Björkblom i sur., 2012). U stanicama nakon tretmana hidrokinonom detektirani su proteini fascin (**FSCN1**) i aladin (**AAAS**) dok u kontrolnom uzorku nisu detektirani. Fascin je protein koji ima ulogu u staničnoj pokretljivosti, održavanju ili uspostavljanju polariteta stanice, organizaciji, regulaciji organizacije i formiranju snopa aktinskih niti te formiranju nabora membrane, mikrošiljaka i stresnih vlakana (Liu i sur., 2021). Također ovaj protein sudjeluje u pozitivnoj regulaciji stanične pokretljivosti (organizacija lamelipodija, podosoma i filopodija) (Yang i sur., 2013). Protein aladin sudjeluje u stvaranju snopa mikrotubula. Real-Hohn i sur. (2010) pokazali su da se ATP-zavisna 6-fosfofruktokinaza (**PFKP**) također veže na aktinske filamente u proteinskoj mreži koja tvori citoskelet eritrocita. Pojačana ekspresija delta-1-pirolin-5-karboksilat sintaze (**ALDH18A1**) upućuje na pojačanu sintezu prolina koji predstavlja mehanizam kojim se stanice u uvjetima stresa prebacuju na katabolički način održavanja stanične energije. Prolin tijekom stresa ima ulogu kelatora metala, antioksidacijske obrambene molekule te signalne molekule (Hayat i sur., 2012). Smanjena količina sukcinat-CoA ligaza alfa-podjedinice (**SUCLG1**) može uzrokovati smanjenje broja kopija mitohondrijske DNA što za posljedicu ima epitelno-mezenhimalni prijelaz koji omogućava stanicama karcinoma da suzbije svoje epitelne značajke mijenjajući se u mezenhimalne. Ova promjena omogućuje stanicama da steknu mobilnost i sposobnost migracije s primarnog mjesta (Kubo i sur., 2022). Na promjene u sastavu kromatina i regulaciji transkripcije upućuje povećana ekspresija histona H1.4 (**HIST1H1E**) koji je bitan za formiranje kromatina te smanjena ekspresija ne-histonskog proteina HMG-17 (**HMG2**), heterogenog jezgrenog ribonukleoproteina U (**HNRNPU**) i podjedinice 4 THO kompleksa (**ALYREF**). Ribonukleoprotein U sudjeluje u organizaciji nuklearnog kromatina, regulaciji duljine

telomera, transkripciji, alternativnom izrezivanju i stabilnost mRNA (UniProt, 2023). HMG-17 se veže na unutarnju stranu nukleosomske DNA mijenjajući tako interakciju između DNA i histonskog oktamera (UniProt, 2023). THO kompleks djeluje kao šaperon i potiče dimerizaciju transkripcijskih faktora i potiče aktivaciju transkripcije, a također je bitan i u transportu procesirane mRNA u citoplazmu (Virbasius i sur., 1999).

Smanjena ekspresija CD44 antigena (**CD44**), katepsina B (**CTSB**) i albumina (**ALB**) te pojačana ekspresija neurotrofnog faktora podrijetlom iz mezencefalnog astrocita (**MANF**) upućuju na moguću aktivaciju mehanizama programirane smrti stanice koja je rezultat endogenih staničnih procesa. MANF se pojačano izlučuje kao odgovor na endoplazmatski retikulum stres i hipoksiju te inhibira staničnu proliferaciju (Glembotski i sur., 2012). Također povećana ekspresija prokolagen-lizin,2-oksoglutarat 5-dioksigenaze 2 (**PLOD2**) pokazuje odgovor T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura na hipoksiju nakon tretmana hidrokinonom (Scheurer i sur., 2004). Povećana ekspresija proteina tirozin-protein fosfataza ne-receptor tip 1 (**PTPN1**) i UDP-glukoza:glikoprotein glukoziltransferaze 1 (**UGGT1**) potvrđuje aktivaciju odgovora na nesmotane proteine. Prvi od spomenutih proteina djeluje kao regulator odgovora endoplazmatskog retikulima na povećanje nesmotanih proteina dok glukoziltransferaza prepoznaje krivo smotane glikoproteine te osigurava kontrolu kvalitete smatanja proteina (Arnold i sur., 2000; Sangwan i sur., 2008). Svaki protein ima svoju nativnu konformaciju koju poprima procesom smatanja koju u većini slučajeva potpomažu šaperoni, a ona određuje njegovu biološku funkciju. Pogreške u smatanju proteina mogu se dogoditi uslijed pogreške nastale u procesu translacije ili djelovanjem okoline u kojoj se protein nalazi. Jedna od pogreški može biti nepravilno spajanje aminokiseline i nepripadajuće tRNA. Nakupljanjem krivo sparenih kompleksa dovodi do potrebe za popravak pogreške nakon prijenosa na tRNA što obuhvaća hidrolizu esterske veze pomoću aminoacil-tRNA hidrolaze (**PTRH2**). Prekomjerna ekspresija proteina hidrolaze u uzorku tretiranom hidrokinonom upućuje na pogreške u procesu translacije i prekomjernu proizvodnju krivo sparenih peptidil-tRNA čije nakupljanje u stanici dovodi do stanične smrti (Strange i sur., 2021).

Proteomska analiza nakon tretmana nitrofurantoinom tijekom 8 h

Profilaktička doza nitrofurantoina (0,167 mg/mL) u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura nakon 8 h tretmana utječe na proces alternativnog izrezivanja (eng. *splicing*) mRNA, vezikularni transport, sintezu i održavanje homeostaze proteina, rast i diobu stanica, reakciju na lijekove (rezistencija) te aktivaciju apoptotičkih procesa. Prekomjerno eksprimirani WD40-ponavljanje-sadržavajući protein (**SMU1**) je regulator DNA replikacije i spliceosomalni faktor potreban za normalno sklapanje mitotičkog vretena i napredovanje kroz mitozu (Bertram i sur., 2017) dok serin/arginin-bogati *splicing* faktor 1 (**SRSF1**) ima bitnu ulogu u prevenciji preskakanja egzona te tako osigurava točnost izrezivanja (Kohtz i sur., 1994). Nadalje, proteini 28S rRNA metiltransferaza (**NOP2**), 40S ribosomalni protein S15 (**RPS15**), aminoacil-tRNA-hidrolaza (**PTRH2**) i H/ACA ribonukleoprotein kompleks podjedinica DKC1 (**DKC1**) pokazuje da nitrofurantoin nakon 8 h tretmana utječe na proces sinteze proteina u T24 stanicama s obzirom da su navedeni proteini uključeni u sklapanje podjedinica ribosoma kao i u regulaciju proliferacije stanične populacije te regulaciju prijenosa signala preko p53 medijatora (NOP2 i RPS15) (UniProt, 2023). Protein p53 je transkripcijski faktor koji ima jaku tumor supresor funkciju. Aktivira druge gene za popravak oštećenja DNA koja se mogu popraviti, a u suprotnome sprječava stanicu da se podijeli te joj signalizira da krene u apoptozu (Vousden i Prives, 2009). DKC1 promovira stanica-stanica te stanica-supstrat adheziju (Angrisani i sur., 2011) dok PTRH2 ujedno i sudjeluje u negativnoj regulaciji programirane stanične smrti tijekom gubitka veze s izvanstaničnim matriksom i susjednim stanicama (anoikis) (Griffiths i sur., 2011). Utjecaj nitrofurantoina na razini adhezije potvrđuje i povećana ekspresija MARCKS-srodnog proteina (**MARCKSL1**) i kaveola-vezujući protein 3 (**CAVIN3**) koji sudjeluju u organizaciji aktinskih filamenata, regulaciji homeostaze citoskeleta, formiranju filopodija i lamelipodija kao i indukciji stanične migracije (UniProt, 2023). MARCKS-srodni protein sudjeluje i u procesu vezanja kalmodulina, modulatorskog proteina koji je ovisan o kalciju, a do poremećaja njegove razine dolazi pod utjecajem kemijskih i bioloških čimbenika. ATPaza AAA domena-sadržavajući protein 3A (**ATAD3A**) je je također uključen u negativnu regulaciju apoptotičkih procesa te regulaciju rasta stanica (Fang i sur., 2010). Proteasom podjedinica beta tip-3 (**PSMB3**) je nekatalitička podjedinica 20S srži kompleksa proteasoma koja sudjeluje u unutarstaničnoj proteolitičkoj razgradnji proteina. Njezina povećana ekspresija nakon tretmana nitrofurantoinom upućuje na povećane potrebe T24 stanica za održavanjem homeostaze proteina preko uklanjanja krivo smotanih ili oštećenih proteina koji bi mogli narušiti funkciju stanice. Negativnu reakciju T24 stanica na antibiotik dokazuje i povećana sinteza integrina alfa-6 (**ITGA6**) koji regulira mrežu ključnu za staničnu proliferaciju rast i

preživljenje, a promovira rast i otpor na lijekove (rezistenciju) u mnogim epitelnim stanicama (Wei i sur., 2019). Odgovor stanice na toksične tvari dokazuje i povećana sinteza Sec1 proteina 1 (**SCFD1**) i VAT-1 proteina membrane sinaptičkih vezikula (**VAT1**) koji su uključeni u vezikularni transport između endoplazmatskog retikuluma i Golgi aparata. Također, protein SCFD1 je dio odgovora na hipoksiju i ima ulogu u fuziji autofagosoma i lizosoma (Huang i sur., 2023).

Proteomska analiza nakon tretmana smjesom hidrokinona i nitrofurantoina tijekom 8 h

Nakon tretmana T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura smjesom antibiotika nitrofurantoina (profilaktička doza, 0,167 mg/mL) i hidrokinona (20 µg/mL) tijekom 8 h pokazano je njihovo sinergističko djelovanje ekspresijom 29 razlikovnih proteina koji se nisu ekspimirali u stanicama tretiranim pojedinačnim spojevima. To sinergističko djelovanje usmjereno je na organizaciju citoskeleta preko regulacije polimerizacije aktinskih filamenata, biosintezu nezasićenih masnih kiselina, procesiranje mRNA i proteina te održavanje narušene stanične homeostaze. Povećana ekspresija proteina ovisnih o redoksu iz porodice tioredoksina (protein disulfid-izomeraza A4 (**PDIA4**), protein disulfid-izomeraza A3 (**PDIA3**) i tioredoksin domena-sadržavajući protein 5 (**TXNDC5**)) te molekularnih šaperona (endoplazmin (**HSP90B1**) i kalretikulin (**CALR**)) upućuje na povećane potrebe održavanja stanične homeostaze nakon tretmana hidrokinonom i antibiotikom nitrofurantoinom. Disulfid izomeraze A3 i A4 kataliziraju redukciju, oksidaciju i izomerizaciju tiol-disulfida te su važni kod pravilnog formiranja disulfidnih mostova kod smatanja proteina kao i rearanžiranje nepravilno formiranih veza (Gaucci i sur., 2016). TXNDC5 je izomeraza u lumenu endoplazmatskog retikuluma koja je također uključena u proces smatanja proteina stvaranjem disulfidnih veza (UniProt, 2023). Proteini ovisni o redoksu imaju značajnu ulogu u održavanju stanične homeostaze i regulaciji staničnih procesa poput stanične proliferacije/diferencijacije i apoptoze. U antioksidacijskom sustavu stanične zaštite važnu ulogu ima sustav ovisan o tioredoksinu koji je uključen u procese stanične redoks-ovisne regulacije kroz kontrolu tiol-disulfidne izmjene. Kombinacija antioksidacijskih svojstava i sposobnosti aktivacije transkripcije gena, uključujući neke antioksidacijske enzime, kao i inhibicije redoks-ovisnih putova aktivacije apoptoze, ukazuje na važan doprinos ovog sustava antioksidacijskom obrambenom sustavu, koji povećava otpornost stanica na oksidacijski stres (Hasan i sur., 2022). Šaperoni endoplazmin i kalretikulin se još nazivaju i stresni proteini te predstavljaju konzerviranu skupinu proteina koji imaju važnu zaštitnu ulogu od različitih stresora s ciljem održavanja stanične homeostaze (Hu i sur., 2022). Sadržaj šaperona u stanici je u normalnim uvjetima konstitutivan dok njihova razina raste nakon

izlaganja stanica različitim oblicima stresa, a sudjeluju u mnogim esencijalnim staničnim funkcijama. Endoplazmin djeluje u procesiranju i transportu sekrecijskih proteina te je povezan s degradacijom proteina u endoplazmatskom retikulumu dok kalretikulin potiče smatanje proteina, sastavljanje oligomera te kontrolira kvalitetu smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu putem ciklusa kalretikulin/kalneksin (UniProt, 2023). Kalneksin je šaperon vezan uz membranu endoplazmatskog retikuluma dok je kalretikulin otopljen u lumenu. Ovi šaperoni prepoznaju svoj set glikoproteina bez funkcionalne konformacije te ih zadržavaju u endoplazmatskom retikulumu na način da se vežu za terminalnu glukozu kako bi osigurali njihovo pravilno smatanje. Ukoliko dođe do nepravilnog smatanja i protein ne prođe kontrolu, dolazi do njihove translokacije u citosol gdje se degradiraju (Kozlov i Gehring, 2020). Promjene u homeostazi stanice potvrđuje i prekomjerna ekspresija mitohondrijskog receptora TOM70 (**TOMM70**) koji ima ulogu kontrole kvalitete mitohondrija na način da posreduje u transportu novosintetiziranih proteina u mitohondrije načinom ovisnim o šaperonima. Prema radu Kim i sur. (2022) TOM70 ima zaštitnu ulogu zahvaljujući svojim anti-oksidacijskim i anti-apoptičkim svojstvima.

Povećana ekspresija peroksisomalne 3-ketoacil-CoA tiolaze (**ACAA1**) i 3-oksoacil-CoA reduktaze (**HSD17B12**) upućuju da je nakon tretmana došlo do promjena u biosintezi nezasićenih masnih kiselina. Tiolaza ima važnu ulogu u peroksisomalnoj beta-oksidaciji masnih kiselina dok reduktaza katalizira prvu od četiri reakcija elongacije dugolančanih masnih kiselina te je uključena u biološke procese sinteze membranskih lipida (UniProt, 2023). Wang i sur. (2021b) pokazali su da povećana ekspresija ACAA2 i HSD17B12 u preadipocitima ovaca inhibira adipogenezu te smanjuje nakupljanje lipida te sadržaj triglicerida. Također, pokazano je da povećana ekspresija spomenutih proteina može inhibirati proizvodnju triglicerida i proliferaciju stanica te inducirati apoptozu (Yang i sur., 2018).

LIM domena i aktin-vezujući protein 1 (**LIMA1**), podjedinica beta proteina za pokrivanje F-aktina (**CAPZB**) i koaktozin (**COTL1**) su važni regulatori organizacije staničnog citoskeleta. Njihova povećana ekspresija nakon tretmana dokazuje utjecaj smjese hidrokinona i nitrofuranotina na regulaciju i dinamiku aktinskog citoskeleta. LIMA1 sprječava boranje membrane te povećava broj i veličinu aktinskih stresnih vlakana, inhibira depolimerizaciju aktinskog filameta te smanjuje stvaranje razgranatih filamenata (Maul i sur., 2003). Protein CAPZB se veže na brzorastuće krajeve aktinskih filamenata te na taj način blokira razmjenu podjedinica na krajevima. Nadalje, ima ulogu u organizaciji citoskeleta kao i staničnoj morfologiji (Bai i sur., 2011). COTL1 također sudjeluje u regulaciji polimerizacije aktinskih

filamenata. Povećana ekspresija LIMA1 ukazuje na loše preživljavanje karcinoma glave i vrata (potječu iz epitela sluznice usne šupljine, ždrijela i grkljana) s obzirom da u normalnim uvjetima LIMA1 potiče epitel-mezenhimsku tranziciju što dalje dovodi do invazije tumora i metastaza (Ma i sur., 2022). Shao i sur. (2020) pokazali su da COTL1 potiče staničnu proliferaciju u uvjetima *in vitro* i pridonosi rastu tumora glioblastoma stanica kod miševa. Prema tome, može se zaključiti da zbog narušene organizacije i dinamike staničnog citoskeleta sinergističkim djelovanjem hidrokinona i nitrofurantoina, dolazi do smanjenog preživljenja T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura zbog čega se pojačano ekspimiraju prognostički markeri malignosti LIMA1, CAPZB i COTL1 koji potiču staničnu proliferaciju kako bi poboljšali narušeno preživljenje stanica.

Povećana ekspresija *splicing* faktora U2AF (65 kDa podjedinica) (**U2AF2**), heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina R (**HNRNPR**) i T-kompleks protein 1 podjedinice epsilon (**CCT5**) ukazuje na sinergistički učinak hidrokinona i nitrofurantoina na procesiranje mRNA te transport mRNA iz jezgre. U2AF2 i HNRNPR proteini ima važnu ulogu u izrezivanju prekursora mRNA u jezgri dok je U2AF2 nužno potreban za eksport mRNA iz jezgre (Millevoi i sur., 2006). S druge strane, CCT5 protein je uključen u pozitivnu regulaciju lokalizacije proteina u Cajalovim tjelešcima, odnosno regijama unutar jezgre bogatim proteinima i RNA uključenih u procesiranje mRNA (Seo i sur., 2010).

Ukoliko se uspoređi uzorak tretiran samo hidrokinonom i uzorak tretiran smjesom hidrokinona i nitrofurantoina može se primjetiti da je u uzorku tretiranom smjesom spojeva povećana ekspresija histona 1.4 (**HIST1H1E**; 3,4 : 2,35) i antigena CD44 (**CD44**; 2,07 : 0,5). tvoreći makromolekularnu strukturu poznatu kao kromatinsko vlakno. Ovi proteini su važni za međustanične interakcije, adheziju te staničnu migraciju (UniProt, 2023). Također, uočen je i porast ekspresije lizofosfatidil-inozitol acetiltransferaze (**LCLT1**; 4,23 : 1,93) i **MARCKSL1** proteina (8,07 : 4,57). LCLT1 sudjeluje u sintezi i metabolizmu lipida na način da služe kao donori acilne skupine dok MARCKSL1 protein sudjeluje u organizaciji aktinskih filamenata, pozitivnoj regulaciji proliferacije stanične proliferacije kao i u regulaciji homeostaze citoskeleta preko formiranja filopodija i lamelipodija (Tuladhar i Lum, 2015). Također, veže kalmodulin, modulatorski proteini ovisan o kalciju do čijeg koncentracijskog poremećaja dolazi pod utjecajem kemijskih ili bioloških čimbenika. Njegova najveća ekspresija pokazana je u stanicama tretiranim samo nitrofurantoinom. Tretman isključivo nitrofurantoinom je potaknuo povećanu ekspresiju proteasom 20S podjedinice beta 3 (**PSMB3**; 4,75 : 0,35) i aminoacil-tRNA hidrolaze (**PTRH2**; 16,00 : 4,90) u odnosu na smjesu. Proteini podokaliksin (**PODXL**), Ras-

srodan protein Ral-A (**RALA**), podjedinica beta proteina za pokrivanje F-aktina (**CAPZB**), član 1 obitelji CCN (**CCN1**), purin nukleozid fosforilaza (**PNP**) i peroksisomalna 3-ketoacil-CoA tiolaza (**ACAA1**) su eksprimirani samo u uzorku T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura tretiranim smjesom hidrokinona i nitrofurantoina u usporedbi sa zasebnim spojevima. Ovi proteini uključeni su u organizaciju citoskeleta, staničnu adheziju, staničnu migraciju, metaboličke procese masnih kiselina te stanični odgovor na kemikaliju/ksenobiotik (UniProt, 2023).

6. ZAKLJUČCI

1. S obzirom na varijacije rezultata sadržaja vodenog ekstrakta lišća medvjetke, potrebna je veća kontrola sastava proizvoda na bazi medvjetke kako bi se osigurala kvaliteta i pouzdanost terapijskog tretmana protiv urinarnih infekcija.
2. Arbutin je stabilan tijekom svih faza probave u uvjetima *in vitro*, dok se povećana koncentracija hidrokinona u želucu može objasniti činjenicom da ekstrakt medvjetke sadrži oko 80 % derivata hidrokinona koji mogu biti hidrolizirani u kiselim uvjetima. U ovom radu nije uočena povezanost između flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta. To može biti objašnjeno niskim udjelom ukupnih flavonoida u ukupnim fenolnim spojevima što je nedovoljno za značajan učinak na antioksidacijske parametre.
3. Rezultati ispitanog biološkog učinka ekstrakta medvjetke i arbutina na stanice probavnog sustava i jetre u uvjetima *in vitro* ovise o tipu stanica i vremenu tretmana te uvjetima analize, bez oporavka ili s 24-satnim oporavkom stanica nakon provedenog tretmana pri čemu su pokazani učinci trenutni te se daljnjom proliferacijom stanica gube.
4. Vodeni ekstrakt lišća medvjetke i arbutin imaju antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne bakterije. Antimikrobno djelovanje hidrokinona na uropatogenu bakteriju *E. coli* je ovisno o koncentraciji i povećava se duljinom trajanja tretmana. Vodeni ekstrakt lišća medvjetke i arbutin značajno utječu na adheziju samo bakterija iz roda *Lactiplantibacillus*.
5. Arbutin (2,4 – 4 mg/mL) i hidrokinon u cijelom ispitivanom koncentracijskom rasponu pokazuju zaštitne učinke na oksidacijska oštećenja molekule DNA uzrokovana hidroksilnim radikalima.
6. Maksimalna terapijska doza antibiotika nitrofurantoina pokazuje citotoksično djelovanje na HepG2 i T24 stanične linije što je vjerojatno posljedica njegovog prooksidacijskog djelovanja.
7. Hidrokinon u smjesi s nitrofurantoinom ima sinergističko djelovanje na T24 stanice u vidu citotoksičnog, prooksidacijskog i genotoksičnog djelovanja te promjenom ekspresije proteina usmjereno na organizaciju citoskeleta preko regulacije polimerizacije aktinskih filamenata, biosintezu nezasićenih masnih kiselina, procesiranje mRNA i proteina te održavanje narušene stanične homeostaze. Hidrokinon pojačava citostatsko djelovanje nitrofurantoina kada se primjenjuju zajedno u smjesi.

7. POPIS LITERATURE

- Adesunloye BA (2003) Acute renal failure due to the herbal remedy CKLS. *Am J Med* **115**, 506–507. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(03\)00427-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(03)00427-3)
- Adetoro AO, Opara UL, Fawole OA (2020) Effect of hot-air and freeze-drying on the quality attributes of dried pomegranate (*Punica granatum* L.) arils during long-term cold storage of whole fruit. *Agric* **10**, 1–16. <https://doi.org/10.3390/agriculture10110493>
- Agarwal R, Paulo JA, Toepfer CN, Ewoldt JK, Sundaram S, Chopra A, i sur. (2021) Filamin C cardiomyopathy variants cause protein and lysosome accumulation. *Circ Res* **129**, 751–766. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317076>
- Allegra S, De Francia S, Turco F, Bertaggia I, Chiara F, Armando T, i sur. (2023) Phytotherapy and drugs: can their interactions increase side effects in cancer patients? *J xenobiotics* **13**, 75–89. <https://doi.org/10.3390/jox13010007>
- Alzaid F, Cheung H-M, Preedy VR, Sharp PA (2013) Regulation of glucose transporter expression in human intestinal Caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. *PLoS One* **8**, e78932–e78932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078932>
- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* **84**, 551–562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4)
- Andersen FA, Bergfeld WF, Belsito D V, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, i sur. (2010) Final amended safety assessment of hydroquinone as used in cosmetics. *Int J Toxicol* **29**, 274S–87. <https://doi.org/10.1177/1091581810385957>
- Anderson GG, Martin SM, Hultgren SJ (2004) Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect* **6**, 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.023>
- Angrisani A, Turano M, Paparo L, Di Mauro C, Furia M (2011) A new human dyskerin isoform with cytoplasmic localization. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 1361–1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.012>
- Arnold SM, Fessler LI, Fessler JH, Kaufman RJ (2000) Two homologues encoding human UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity. *Biochemistry* **39**, 2149–2163. <https://doi.org/10.1021/bi9916473>

- Arsiccio A, Paladini A, Pattarino F, Pisano R (2019) Designing the optimal formulation for biopharmaceuticals: a new approach combining molecular dynamics and experiments. *J Pharm Sci* **108**, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.002>
- Asensio E, Vitales D, Lorenzo I, Peralba L, Viruel J, Montaner C, i sur. (2020) Phenolic compounds content and genetic diversity at population level across the natural distribution range of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*, *Ericaceae*) in the Iberian Peninsula. *Plants* **9**. <https://doi.org/10.3390/plants9091250>
- Aspengren S, Norström E, Wallin M (2012) Effects of hydroquinone on cytoskeletal organization and intracellular transport in cultured *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts. *ISRN Cell Biol* **2012**, 524781. <https://doi.org/10.5402/2012/524781>
- Avonto C, Wang YH, Avula B, Wang M, Rua D, Khan IA (2016) Comparative studies on the chemical and enzymatic stability of alpha- and beta-arbutin. *Int J Cosmet Sci* **38**, 187–193. <https://doi.org/10.1111/ics.12275>
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azman NAM, Gallego MG, Segovia F, Abdullah S, Shaarani SM, Almajano MP (2016) Study of the properties of bearberry leaf extract as a natural antioxidant in model foods. *Antioxidants* **5**, 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox5020011>
- Babich H, Borenfreund E (1991) Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2101–2103
- Baćun-Družina V, Čagalj Ž, Gjuračić K (2007) The growth advantage in stationary-phase (GASP) phenomenon in mixed cultures of enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **266**, 119–127. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00515.x>
- Bai SW, Herrera-Abreu MT, Rohn JL, Racine V, Tajadura V, Suryavanshi N, i sur. (2011) Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biol* **9**, 54. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-54>
- Barba-Ostria C, Carrera-Pacheco SE, Gonzalez-Pastor R, Heredia-Moya J, Mayorga-Ramos A, Rodríguez-Pólit C, i sur. (2022) Evaluation of biological activity of natural compounds: current trends and methods. *Molecules* **27**. <https://doi.org/10.3390/molecules27144490>

- Barbosa TM, Levy SB (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat* **3**, 303–311. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0167>
- Behzadi P (2020) Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs). *Folia Microbiol (Praha)* **65**, 45–65. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00719-x>
- Benzie IF, Strain JJ (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* **299**, 15–27
- Bertram K, Agafonov DE, Liu W-T, Dybkov O, Will CL, Hartmuth K, i sur. (2017) Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature* **542**, 318–323. <https://doi.org/10.1038/nature21079>
- Bilz M, Kell SP, Maxted N, Lansdown R V (2011) European red list of vascular plants. Published by the European Commission
- Björkblom B, Padzik A, Mohammad H, Westerlund N, Komulainen E, Hollos P, i sur. (2012) c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells. *Mol Cell Biol* **32**, 3513–3526. <https://doi.org/10.1128/MCB.00713-12>
- Blystone SD (2004) Integrating an integrin: a direct route to actin. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1692**, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.011>
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, i sur. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* **28**, 625–631. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
- Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T (2011) Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem* **128**, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Braga VC de C, Pianetti GA, César IC (2020) Comparative stability of arbutin in *Arctostaphylos uva-ursi* by a new comprehensive stability-indicating HPLC method. *Phytochem Anal* **31**, 884–891. <https://doi.org/10.1002/pca.2953>
- Briganti S, Camera E, Picardo M (2003) Chemical and instrumental approaches to treat

- hyperpigmentation. *Pigment Cell Res* **16**, 101–110. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00029.x>
- Brkanac SR, Geric M, Gajski G, Vujcic V, Garaj-Vrhovac V, Kremer D, i sur. (2015) Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regul Toxicol Pharmacol* **73**, 923–929. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.025>
- Brownmiller C, Howard LR, Prior RL (2008) Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *J Food Sci* **73**, H72-9. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00761.x>
- Bulbul MA, Chin JL, Huben RP, Englander LS, Pontes JE (1985) The effect of nitrofurantoin on bladder tumor cell lines: *in vitro* growth and implantation in the cauterized mouse bladder. *J Urol* **134**, 1231–1235. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)47701-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)47701-9)
- Chan JCY, Zhou L, Chan ECY (2015) The isotope-coded affinity tag method for quantitative protein profile comparison and relative quantitation of cysteine redox modifications. *Curr Protoc protein Sci* **82**, 23.2.1-23.2.19. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2302s82>
- Chandrasekhar K, Dileep A, Lebonah DE, Kumari JP (2014) A short review on proteomics and its applications. *Int Lett Nat Sci* **17**, 77–84. <https://doi.org/10.56431/p-avsz0g>
- Chen S-L, Yu H, Luo H-M, Wu Q, Li C-F, Steinmetz A (2016) Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin Med* **11**, 37. <https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7>
- Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F (2015) Quantitative proteomics using SILAC: principles, applications, and developments. *Proteomics* **15**, 3175–3192. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500108>
- Cheng S-L, Liu RH, Sheu J-N, Chen S-T, Sinchaikul S, Tsay GJ (2007) Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *J Biomed Sci* **14**, 87–105. <https://doi.org/10.1007/s11373-006-9130-6>
- Cheong HSJ, Seth I, Joiner MC, Tucker JD (2013) Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* **28**, 433–440. <https://doi.org/10.1093/mutage/get020>
- Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M (2016) Is modulation of oxidative stress an answer? The state of the art of redox therapeutic actions in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 7909380. <https://doi.org/10.1155/2016/7909380>

- Choi S-H (2008) WHO traditional medicine strategy and activities. “Standardization with evidence-based approaches”. *J Acupunct Meridian Stud* **1**, 153–154. [https://doi.org/10.1016/S2005-2901\(09\)60037-6](https://doi.org/10.1016/S2005-2901(09)60037-6)
- Claussen K, Stocks E, Bhat D, Fish J, Rubin CD (2017) How common are pulmonary and hepatic adverse effects in older adults prescribed nitrofurantoin? *J Am Geriatr Soc* **65**, 1316–1320. <https://doi.org/10.1111/jgs.14796>
- Colle I, Lemmens L, Van Buggenhout S, Van Loey A, Hendrickx M (2010) Effect of thermal processing on the degradation, isomerization, and bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. *J Food Sci* **75**, C753-9. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01862.x>
- Committee on herbal medicinal products (2018) Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. European Medicines Agency, London, United Kingdom.
- Coppo E, Marchese A (2014) Antibacterial activity of polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* **15**, 380–390. <https://doi.org/10.2174/138920101504140825121142>
- Coulter JB, O’Driscoll CM, Bressler JP (2013) Hydroquinone increases 5-hydroxymethylcytosine formation through ten eleven translocation 1 (TET1) 5-methylcytosine dioxygenase. *J Biol Chem* **288**, 28792–28800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491365>
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafán H, Uribe F, i sur. (1991) Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet (London, England)* **337**, 262–264. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90868-p](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90868-p)
- Crump KS (1984) A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol* **4**, 854–871. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(84\)90107-6](https://doi.org/10.1016/0272-0590(84)90107-6)
- Cunha BA (1988) Nitrofurantoin - current concepts. *Urology* **32**, 67–71. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(88\)90460-8](https://doi.org/10.1016/0090-4295(88)90460-8)
- Cunha BA (2006) New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. *Med Clin North Am* **90**, 1089–1107. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.07.006>
- Cushnie TPT, Lamb AJ (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties

- of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- da Silva KR, Damasceno JL, Inácio M de O, Abrão F, Ferreira NH, Tavares DC, i sur. (2019) Antibacterial and cytotoxic activities of *Pinus tropicalis* and *Pinus elliottii* resins and of the diterpene dehydroabiatic acid against bacteria that cause dental caries. *Front Microbiol* **10**, 987. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00987>
- Daglia M (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 174–181.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Daneman N, Gruneir A, Newman A, Fischer HD, Bronskill SE, Rochon PA, i sur. (2011) Antibiotic use in long-term care facilities. *J Antimicrob Chemother* **66**, 2856–2863.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr395>
- Davis JA, Gift JS, Zhao QJ (2011) Introduction to benchmark dose methods and U.S. EPA's benchmark dose software (BMDS) version 2.1.1. *Toxicol Appl Pharmacol* **254**, 181–191.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.10.016>
- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239–252.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00116-1)
- Dayon L, Sanchez J-C (2012) Relative protein quantification by MS/MS using the tandem mass tag technology. *Methods Mol Biol* **893**, 115–127. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-885-6_9
- de Arriba SG, Naser B, Nolte K-U (2013) Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi folium* herbal preparations. *Int J Toxicol* **32**, 442–453.
<https://doi.org/10.1177/1091581813507721>
- DeCaprio AP (1999) The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. *Crit Rev Toxicol* **29**, 283–330.
<https://doi.org/10.1080/10408449991349221>
- Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, i sur. (2011) Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal* **4**, ra82. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002060>
- Dekić Rozman S, Butorac A, Bertoša R, Hrenović J, Markeš M (2021) Loss of thermotolerance in antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Environ Health Res* **32**, 1581–1593.
<https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1898550>

- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Dell'Annunziata F, Cometa S, Della Marca R, Busto F, Folliero V, Franci G, i sur. (2022) In vitro antibacterial and anti-inflammatory activity of *Arctostaphylos uva-ursi* leaf extract against *Cutibacterium acnes*. *Pharmaceutics* **14**, 1952. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091952>
- Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA (2008) Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest* **38**, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01986.x>
- Domínguez-Rodríguez G, Marina ML, Plaza M (2017) Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *J Chromatogr A* **1514**, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066>
- Dykes GA, Amarowicz R, Pegg RB (2003) Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiol* **20**, 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00107-7)
- Eastmond DA, Tucker JD (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen* **13**, 34–43. <https://doi.org/10.1002/em.2850130104>
- Ebadollahi SH, Pouramir M, Zabihi E, Golpour M, Aghajanzpour-Mir M (2021) The effect of arbutin on the expression of tumor suppressor p53, BAX/BCL-2 ratio and oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide in fibroblast and LNCap cell lines. *Cell J* **22**, 532–541. <https://doi.org/10.22074/cellj.2021.6902>
- Elwan H, Mohamed ASA, Dawood DH, Elnesr SS (2022) Modulatory effects of *Arctostaphylos uva-ursi* extract in ovo injected into broiler embryos contaminated by aflatoxin B1. *Animals* **12**, 2042. <https://doi.org/10.3390/ani12162042>
- Engelich G, White M, Hartshorn KL (2002) Role of the respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza A virus and *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **51**, 484–490. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-6-484>
- Engels C, Schieber A, Gänzle MG (2011) Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action

- of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Appl Environ Microbiol* **77**, 2215–2223. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-10>
- English JC, Deisinger PJ (2005) Metabolism and disposition of hydroquinone in Fischer 344 rats after oral or dermal administration. *Food Chem Toxicol* **43**, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.015>
- Enguita FJ, Leitão AL (2013) Hydroquinone: environmental pollution, toxicity, and microbial answers. *Biomed Res Int* **2013**, 542168. <https://doi.org/10.1155/2013/542168>
- Erenler R, Sen O, Aksit H, Demirtas I, Yaglioglu AS, Elmastas M, i sur. (2016) Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *J Sci Food Agric* **96**, 822–836. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7155>
- European Pharmacopoeia (2018) European Pharmacopoeia, Council of Europe, 9th edn. Council of Europe, Strasbourg.
- Fair RJ, Tor Y (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem* **6**, 25–64. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459>
- Fang H-Y, Chang C-L, Hsu S-H, Huang C-Y, Chiang S-F, Chiou S-H, i sur. (2010) ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J Cell Sci* **123**, 1171–1180. <https://doi.org/10.1242/jcs.062034>
- Fazly Bazzaz BS, Khameneh B, Zahedian Ostad MR, Hosseinzadeh H (2018) *In vitro* evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates. *Avicenna J phytomedicine* **8**, 246–253
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nat Protoc* **2**, 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytochrome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* **600**, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028>
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **534**, 65–75. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00249-8)

- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, i sur. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **26**, 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Feron VJ, Groten JP (2002) Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **40**, 825–839. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00021-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00021-2)
- Feron VJ, Groten JP, van Bladeren PJ (1998) Exposure of humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. *Arch Toxicol Suppl* **20**, 363–373. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46856-8_32
- Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**, 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* **13**, 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Fransen F, Melchers MJB, Meletiadiis J, Mouton JW (2016) Pharmacodynamics and differential activity of nitrofurantoin against ESBL-positive pathogens involved in urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* **71**, 2883–2889. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw212>
- Freshney RI (2010) Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 6th edn. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Fučić A, Marković D, Ferencić Ž, Mildner B, Jazbec A-M, Špoljar Bubić JB (2005) Comparison of genomic damage caused by 5-nitrofurantoin in young and adult mice using the *in vivo* micronucleus assay. *Environ Mol Mutagen* **46**, 59–63. <https://doi.org/10.1002/em.20129>
- Gágyor I, Hummers E, Schmiemann G, Friede T, Pfeiffer S, Afshar K, i sur. (2021) Herbal treatment with uva ursi extract versus fosfomycin in women with uncomplicated urinary tract infection in primary care: a randomized controlled trial. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **27**, 1441–1447. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.032>
- Gao Y, Tang H, Xiong L, Zou L, Dai W, Liu H, i sur. (2018) Protective effects of aqueous

- extracts of *Flos Lonicerae japonicae* against hydroquinone-induced toxicity in hepatic L02 cells. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 4528581. <https://doi.org/10.1155/2018/4528581>
- Gaucci E, Raimondo D, Grillo C, Cervoni L, Altieri F, Nittari G, i sur. (2016) Analysis of the interaction of calcitriol with the disulfide isomerase ERp57. *Sci Rep* **6**, 37957. <https://doi.org/10.1038/srep37957>
- Geetha R V., Roy A, Lakshmi T (2011) Nature's weapon against urinary tract infections. *Int J Drug Dev Res* **3**, 85–100
- Giner RM, Ríos JL, Máñez S (2022) Antioxidant activity of natural hydroquinones. *Antioxidants (Basel)* **11**, 343. <https://doi.org/10.3390/antiox11020343>
- Glembotski CC, Thuerauf DJ, Huang C, Vekich JA, Gottlieb RA, Doroudgar S (2012) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *J Biol Chem* **287**, 25893–25904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356345>
- Glöckl I, Blaschke G, Veit M (2001) Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **761**, 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00322-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00322-X)
- Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M (2011) Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* **26**, 185–191. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq088>
- Graham JP, Amato HK, Mendizabal-Cabrera R, Alvarez D, Ramay BM (2021) Waterborne urinary tract infections: have we overlooked an important source of exposure? *Am J Trop Med Hyg* **105**, 12–17. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1271>
- Gravina GL, Ranieri G, Muzi P, Marampon F, Mancini A, Di Pasquale B, i sur. (2013) Increased levels of DNA methyltransferases are associated with the tumorigenic capacity of prostate cancer cells. *Oncol Rep* **29**, 1189–1195. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2192>
- Gray J, Robinson D (2010) Textbook of female urology and urogynecology. In: Cardozo L, Staskin D (eds) Lower urinary tract infections - Simple and complex, 3th edn. CRC Press, London, p 1042–1056.
- Grayson M, Whitby M (2010) Nitrofurans: nitrofurazone, furazolidone, and nitrofurantoin. In: Grayson M, Crowe S, McCarthy J (eds) Kucers' the use of antibiotics, 6th edn. Hodder

- Arnold, London, p 1195–1204.
- Griffiths GS, Grundl M, Leychenko A, Reiter S, Young-Robbins SS, Sulzmaier FJ, i sur. (2011) Bit-1 mediates integrin-dependent cell survival through activation of the NFkappaB pathway. *J Biol Chem* **286**, 14713–14723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228387>
- Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, i sur. (2011) International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* **52**, e103–e120. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>
- Gyawali R, Ibrahim SA (2012) Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**, 29–45. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4117-x>
- Haber LT, Dourson ML, Allen BC, Hertzberg RC, Parker A, Vincent MJ, i sur. (2018) Benchmark dose (BMD) modeling: current practice, issues, and challenges. *Crit Rev Toxicol* **48**, 387–415. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1430121>
- Hanash SM (2000) Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis* **21**, 1202–1209. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6<1202::AID-ELPS1202>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1202::AID-ELPS1202>3.0.CO;2-I)
- Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, i sur. (2017) Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA journal Eur Food Saf Auth* **15**, e04658. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4658>
- Hasan AA, Kalinina E, Tatarskiy V, Shtil A (2022) The thioredoxin system of mammalian cells and its modulators. *Biomedicines* **10**, 1757. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071757>
- Hashiguchi A, Tian J, Komatsu S (2017) Proteomic contributions to medicinal plant research: from plant metabolism to pharmacological action. *Proteomes* **5**, 35. <https://doi.org/10.3390/proteomes5040035>
- Hassan HM, Jiang Z-H, Asmussen C, McDonald E, Qin W (2013) Antibacterial activity of northern Ontario medicinal plant extracts. *Can J Plant Sci* **94**, 417–424. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-258>

- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal Behav* **7**, 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hazman Ö, Evin H, Bozkurt MF, Cigerci İH (2022) Two faces of arbutin in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells: Anticarcinogenic effect in high concentration and protective effect against cisplatin toxicity through its antioxidant and anti-inflammatory activity in low concentration. *Biologia (Bratisl)* **77**, 225–239. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00921-8>
- Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **27**, 146–159
- Hertzberg RC, MacDonell MM (2002) Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci Total Environ* **288**, 31–42. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(01\)01113-5](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(01)01113-5)
- Hixon KK, Lopez-Ferrer D, Robinson E, Paša-Tolić L (2017) Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. Elsevier Ltd, Richland, SAD.
- Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, i sur. (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3–12
- Horita M, Wang D-H, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Kira S (2005) Involvement of oxidative stress in hydroquinone-induced cytotoxicity in catalase-deficient *Escherichia coli* mutants. *Free Radic Res* **39**, 1035–1041. <https://doi.org/10.1080/10715760500232008>
- Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY (2018) The HSP90 Family: structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Int J Mol Sci* **19**, 2560. <https://doi.org/10.3390/ijms19092560>
- Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, i sur. (2022) Heat shock proteins: biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm* **3**, e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
- Huang H, Ouyang Q, Mei K, Liu T, Sun Q, Liu W, i sur. (2023) Acetylation of SCFD1 regulates SNARE complex formation and autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **19**, 189–203. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2064624>

- Huđek A, Škara L, Smolkovič B, Kazazić S, Ravlić S, Nanić L, i sur. (2018) Higher prevalence of *FTO* gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085, and GG rs17817449 and saliva containing *Staphylococcus aureus* in obese women in Croatia. *Nutr Res* **50**, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.12.005>
- Huđek Turković A, Gunjača M, Marjanović M, Lovrić M, Butorac A, Rašić D, i sur. (2022) Proteome changes in human bladder T24 cells induced by hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* herbal preparation. *J Ethnopharmacol* **289**, 115092. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115092>
- Huttner A, Verhaegh EM, Harbarth S, Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW (2015) Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *J Antimicrob Chemother* **70**, 2456–2464. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv147>
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* **658**, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.001>
- Ionescu ME, Ciocirlan M, Becheanu G, Nicolaie T, Ditescu C, Teiusanu AG, i sur. (2011) Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions. *Maedica (Buchar)* **6**, 173–178
- Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catalá C, Saladié M, i sur. (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc* **1**, 769–774. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.102>
- Jackson CM, Esnouf MP, Winzor DJ, Duewer DL (2007) Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accredit Qual Assur* **12**, 283–294. <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0254-1>
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jakobek L (2015) Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem* **175**, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>
- Jaynes J, Ding X, Xu H, Wong WK, Ho CM (2013) Application of fractional factorial designs to study drug combinations. *Stat Med* **32**, 307–318. <https://doi.org/10.1002/sim.5526>
- Jeyanthi V, Velusamy P, Kumar GV, Kiruba K (2021) Effect of naturally isolated hydroquinone in disturbing the cell membrane integrity of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 741 and

- Staphylococcus aureus* MTCC 740. *Heliyon* **7**, e07021–e07021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07021>
- Jurica K (2016) Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Doktorski rad
- Jurica K, Karačonji IB, Benković V, Kopjar N (2017) *In vitro* assessment of the cytotoxic, DNA damaging, and cytogenetic effects of hydroquinone in human peripheral blood lymphocytes. *Arh Hig Rada Toksikol* **68**, 322–335. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-3060>
- Kang MJ, Ha HW, Kim GH, Lee SK, Ahn YT, Kim DH, i sur. (2012) Role of metabolism by intestinal bacteria in arbutin-induced suppression of lymphoproliferative response *in vitro*. *Biomol Ther (Seoul)* **20**, 196–200. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.2.196>
- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **273**, 6297–6302. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6297>
- Karaś M, Jakubczyk A, Szymanowska U, Złotek U, Zielińska E (2017) Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *Int J Food Sci Technol* **52**, 291–305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.13323>
- Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, i sur. (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* **150**, 41–48. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00369-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00369-9)
- Khadir F, Pouramir M, Joorsaraee SG, Feizi F, Sorkhi H, Yousefi F (2015) The effect of arbutin on lipid peroxidation and antioxidant capacity in the serum of cyclosporine-treated rats. *Casp J Intern Med* **6**, 196–200
- Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Sedigheh B, Bazzaz F (2019) Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control* **8**, 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
- Kim S-J, Zhou C, Coutavas E, Lee PJ (2022) Mitochondrial TOM70 in hyperoxia-induced acute lung injury. *FASEB J* **36**, 7461. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.L7461>
- Kim YJ, Woo HD, Kim BM, Lee YJ, Kang SJ, Cho YH, i sur. (2009) Risk assessment of hydroquinone: differential responses of cell growth and lethality correlated to

- hydroquinone concentration. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* **72**, 1272–1278. <https://doi.org/10.1080/15287390903212279>
- Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Lührmann R, Garcia-Blanco MA, i sur. (1994) Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119–124. <https://doi.org/10.1038/368119a0>
- Kong F, Singh RP (2008) Disintegration of solid foods in human stomach. *J Food Sci* **73**, R67-80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T (2007) Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* **115**, 106–114. <https://doi.org/10.1289/ehp.9358>
- Kozlov G, Gehring K (2020) Calnexin cycle - structural features of the ER chaperone system. *FEBS J* **287**, 4322–4340. <https://doi.org/10.1111/febs.15330>
- Kraljević Pavelić S, Saban N (2007) Evolving “-omics” technologies in the drug development process. *Expert Opin Drug Discov* **2**, 431–436. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.431>
- Kreuz S, Fischle W (2016) Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics* **8**, 843–862. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0002>
- Kubo Y, Tanaka K, Masuike Y, Takahashi T, Yamashita K, Makino T, i sur. (2022) Low mitochondrial DNA copy number induces chemotherapy resistance via epithelial-mesenchymal transition by DNA methylation in esophageal squamous cancer cells. *J Transl Med* **20**, 383. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03594-2>
- Kurkin VA, Ryasanova T, Daeva E, Kadentsev V (2018) Constituents of *Arctostaphylos uva-ursi* leaves. *Chem Nat Compd* **54**, 278–280. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2323-1>
- Larsen HO, Olsen CS (2007) Unsustainable collection and unfair trade? Uncovering and assessing assumptions regarding Central Himalayan medicinal plant conservation. *Biodivers Conserv* **16**, 679–1697. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9039-4>
- Larsson K, Cavonius L, Alminger M, Undeland I (2012) Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal *in vitro* digestion. *J Agric Food Chem* **60**, 7556–7564. <https://doi.org/10.1021/jf301444x>
- Lee HJ, Kim KW (2012) Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflamm Res* **61**, 817–825. <https://doi.org/10.1007/s00011-012->

0474-2

- Lee JY, Kim JY, Lee YG, Shin WC, Chun T, Rhee MH, i sur. (2007) Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. *Mol Cells* **23**, 198–206
- Lei T, Srinivasan S, Tang Y, Manchanda R, Nagesetti A, Fernandez-Fernandez A, i sur. (2011) Comparing cellular uptake and cytotoxicity of targeted drug carriers in cancer cell lines with different drug resistance mechanisms. *Nanomedicine* **7**, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.11.004>
- Leitzmann C (2016) Characteristics and health benefits of phytochemicals. *Forsch Komplementmed* **23**, 69–74. <https://doi.org/10.1159/000444063>
- Letelier ME, Iturra-Montecinos PA, Gallardo-Garrido CA (2017) Herbal extracts differentially inhibit oxidative effects caused by the biotransformation of nifurtimox, nitrofurantoin and acetaminophen on rat liver microsomes. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat* **16**, 88–98
- 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 Methods* **16**, 1–6. <https://doi.org/10.1080/15376520500191797>
- Liebler DC (2002) Introduction to proteomics: tools for the new biology. Humana Totowa, NJ, Totowa SAD.
- Lindon JC, Tranter GE, Koppenaal D (2017) Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry, 3rd edn. Elsevier
- Liu CM, Aziz M, Park DE, Wu Z, Stegger M, Li M, i sur. (2023) Using source-associated mobile genetic elements to identify zoonotic extraintestinal *E. coli* infections. *One Heal* **16**, 100518. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100518>
- Liu H, Zhang Y, Li L, Cao J, Guo Y, Wu Y, i sur. (2021) Fascin actin-bundling protein 1 in human cancer: promising biomarker or therapeutic target? *Mol Ther oncolytics* **20**, 240–264. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.12.014>
- Liu Y, Liu D, Xie Z (2022) Rapid and specific fluorescence method for the quantification of arbutin in cosmetics. *Anal Lett* **55**, 318–326. <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1929278>

- Locke AB (2022) Urinary tract infection. In: Rakel D (ed) Integrative medicine. Elsevier, Philadelphia, p 211–217.
- Lorge E, Hayashi M, Albertini S, Kirkland D (2008) Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. *Mutat Res* **655**, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.003>
- Lostao MP, Hirayama BA, Loo DD, Wright EM (1994) Phenylglucosides and the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): analysis of interactions. *J Membr Biol* **142**, 161–170. <https://doi.org/10.1007/BF00234938>
- Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD (2019) Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. *Molecules* **24**, 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J (2010) Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chem* **121**, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.028>
- Ma W, Liao Y, Gao Z, Zhu W, Liu J, She W (2022) Overexpression of LIMA1 indicates poor prognosis and promotes epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* **16**, 1–15. <https://doi.org/10.1177/11795549221109493>
- MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, i sur. (2010) Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>
- Mao J, Dai W, Zhang S, Sun L, Wang H, Gao Y, i sur. (2019) Quinone–thioether metabolites of hydroquinone play a dual role in promoting a vicious cycle of ROS generation: *in vitro* and *in silico* insights. *Arch Toxicol* **93**, 1297–1309. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02443-4>
- Maul RS, Song Y, Amann KJ, Gerbin SC, Pollard TD, Chang DD (2003) EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J Cell Biol* **160**, 399–407. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212057>
- McClements DJ, Li Y (2010) Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct* **1**, 32–59. <https://doi.org/10.1039/c0fo00111b>
- McGregor D (2007) Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Crit Rev Toxicol* **37**, 887–914.

<https://doi.org/10.1080/10408440701638970>

- McLellan LK, Hunstad DA (2016) Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends Mol Med* **22**, 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>
- McOsker CC, Fitzpatrick PM (1994) Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother* **33**, 23–30. https://doi.org/10.1093/jac/33.suppl_a.23
- Mendoza-Valdes A, Rosete A, Rios Bueno E, Frentzel A, Trapp S, Kirch W, i sur. (2010) Antimicrobial and clinical efficacy of nitrofurantoin in the treatment of acute lower urinary tract infections in adults. *Med Klin (Munich)* **105**, 698–704. <https://doi.org/10.1007/s00063-010-1121-2>
- Meng M, Walsh T, Chi T (2016) Current medical diagnosis and treatment. In: Papadakis M, McPhee S (eds) Urologic disorders. McGraw Hill, New York, p 905–927.
- Menz J, Götz ME, Gündel U, Gürtler R, Herrmann K, Hessel-Pras S, i sur. (2023) Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose–response data. *Arch Toxicol* **97**, 2303–2328. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03553-w>
- Michalska A, Łysiak G (2015) Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *Int J Mol Sci* **16**, 18642–18663. <https://doi.org/10.3390/ijms160818642>
- Millevoi S, Loulergue C, Dettwiler S, Karaa SZ, Keller W, Antoniou M, i sur. (2006) An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *EMBO J* **25**, 4854–4864. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601331>
- Mir H, Elieh Ali Komi D, Pouramir M, Parsian H, Moghadamnia AA, Seyfizadeh N, i sur. (2021) The hepatoprotective effects of *Pyrus bioessieriana* buhse leaf extract on *tert*-butyl hydroperoxide toxicity in HepG2 cell line. *BMC Res Notes* **14**, 298. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05713-6>
- Mishima M (2017) Chromosomal aberrations, clastogens vs aneugens. *Front Biosci (Schol Ed)* **9**, 1–16. <https://doi.org/10.2741/s468>
- Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W (2017) Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biol* **11**, 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.011>

- Muller AE, Verhaegh EM, Harbarth S, Mouton JW, Huttner A (2017) Nitrofurantoin's efficacy and safety as prophylaxis for urinary tract infections: a systematic review of the literature and meta-analysis of controlled trials. *Clin Microbiol Infect* **23**, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.08.003>
- Munoz-Davila MJ (2014) Role of old antibiotics in the era of antibiotic resistance. highlighted nitrofurantoin for the treatment of lower urinary tract infections. *Antibiotics* **3**, 39–48. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3010039>
- Naffati A, Vladić J, Pavlić B, Radosavljević R, Gavarić A, Vidović S (2017) Recycling of filter tea industry by-products: application of subcritical water extraction for recovery of bioactive compounds from *A. uva-ursi* herbal dust. *J Supercrit Fluids* **121**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.010>
- Nile S, Park SW (2013) Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* **30**, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>
- Norton I, Moore S, Fryer P (2007) Understanding food structuring and breakdown: engineering approaches to obesity. *Obes Rev* **8**, 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00324.x>
- Novak J, Kos B (2022) Predavanja iz kolegija “Crijevna mikrobiota, prehrana i zdravlje.” Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- NTP - National Toxicology Program (2009) Supporting information for toxicological evaluation by the National Toxicology Program for hydroquinone [CAS 123- 31-9] https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/noms/support_docs/hydroquinone_may2009.pdf
- NTP - National Toxicology Program (2006) Chemical information review document for arbutin [CAS No . 497-76-7] and extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/arbutin_508.pdf
- O'Donoghue JL (2006) Hydroquinone and its analogues in dermatology - a risk-benefit viewpoint. *J Cosmet Dermatol* **5**, 196–203. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2006.00253.x>
- Oberg M (2010) Benchmark dose approaches in chemical health risk assessment in relation to number and distress of laboratory animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **58**, 451–454. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.015>

- OECD/OCDE (2016) OECD guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating test guideline no. 487. In vitro mammalian cell micronucleus test. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264861-en.pdf?expires=1633936873&id=id&accname=guest&checksum=830CA135B6D484E8B985C1247B4D353E>. Pristupljeno 20 April 2023.
- Ough CS, Amerine MA (1988) Methods for analysis of musts and wines. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Oyebode O, Kandala N-B, Chilton PJ, Lilford RJ (2016) Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study. *Health Policy Plan* **31**, 984–991. <https://doi.org/10.1093/heapol/czw022>
- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA (2011) The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci* **76**, R6–R15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
- Pappa E, Vougas K, Zoidakis J, Vastardis H (2020) Proteomic advances in salivary diagnostics. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1868**, 140494. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140494>
- Parada J, Aguilera JM (2007) Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* **72**, R21–32. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2001) A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* **12**, 336–339. <https://doi.org/10.1002/pca.602>
- Parvez S, Long MJC, Poganik JR, Aye Y (2018) Redox signaling by reactive electrophiles and oxidants. *Chem Rev* **118**, 8798–8888. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00698>
- Pečivová J, Nosál' R, Svitekova K, Mačičková T (2014) Arbutin and decrease of potentially toxic substances generated in human blood neutrophils. *Interdiscip Toxicol* **7**, 195–200. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0028>
- Peng C, Arthur D, Liu F, Lee J, Xia Q, Lavin MF, i sur. (2013) Genotoxicity of hydroquinone in A549 cells. *Cell Biol Toxicol* **29**, 213–227. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9247-0>
- Pennington KL, Chan TY, Torres MP, Andersen JL (2018) The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene* **37**, 5587–5604. <https://doi.org/10.1038/s41388->

018-0348-3

- Plamada D, Vodnar DC (2021) Polyphenols-gut microbiota interrelationship: a transition to a new generation of prebiotics. *Nutrients* **14**, 137. <https://doi.org/10.3390/nu14010137>
- Pop C, Vlase L, Mircea T (2009) Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* **37**, 129–132. <https://doi.org/10.15835/nbha3713108>
- Poujol S, Pinguet F, Malosse F, Astre C, Ychou M, Culine S, i sur. (2003) Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. *Clin Chem* **49**, 1900–1908. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.023481>
- Quintus J, Kovar K-A, Link P, Hamacher H (2005) Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. *Planta Med* **71**, 147–152. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837782>
- Rafiq Z, Narasimhan S, Haridoss M, Vennila R, Vaidyanathan R (2017) *Punica granatum* rind extract: antibiotic potentiator and efflux pump inhibitor of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Asian J Pharm Clin Res* **10**, 1–5. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i3.16000>
- Ramos OS, Malcata FX (2011) Food-grade enzymes. In: Comprehensive biotechnology, 2nd Volume. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p 555–569.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- Real-Hohn A, Zancan P, Da Silva D, Martins ER, Salgado LT, Mermelstein CS, i sur. (2010) Filamentous actin and its associated binding proteins are the stimulatory site for 6-phosphofructo-1-kinase association within the membrane of human erythrocytes. *Biochimie* **92**, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.023>
- Recasens J, Ninot P, Cristóbal R, Aymerich P (2008) Sustainable wild harvesting of *Arctostaphylos uva-ursi* in the Pyrenees as a conservation practice. *J Herbs Spices Med Plants* **14**, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10496470802341110>
- Recht J, Chansamouth V, White NJ, Ashley EA (2022) Nitrofurantoin and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a safety review. *JAC-antimicrobial Resist* **4**, dlac045.

<https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac045>

- Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N (2003) Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 395–403. <https://doi.org/10.1023/a:1023781114568>
- Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA (2016) Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1863**, 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* **3**, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Reed J, Calani L, i sur. (2014) Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol* **88**, 1803–1853. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1330-7>
- Romagnolo DF, Selmin OI (2012) Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr* **31**, 206–238. <https://doi.org/10.1080/21551197.2012.702534>
- Romero-Romero ML, Landerer C, Poehls J, Toth-Petroczy A (2022) Phenotypic mutations contribute to protein diversity and shape protein evolution. *Protein Sci* **31**, e4397. <https://doi.org/10.1002/pro.4397>
- Rychlińska I, Nowak S (2012) Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* **40**, 109–113. <https://doi.org/10.15835/nbha4027987>
- Sakaan SA, Twilla JD, Usey JB, Winton JC, Self TH (2014) Nitrofurantoin-induced hepatotoxicity: a rare yet serious complication. *South Med J* **107**, 107–113. <https://doi.org/10.1097/smj.0000000000000059>
- Sangwan V, Paliouras GN, Abella J V, Dubé N, Monast A, Tremblay ML, i sur. (2008) Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *J Biol Chem* **283**, 34374–34383. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805916200>
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I (2007) Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* **101**, 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>
- Savio ALV, da Silva GN, de Camargo EA, Salvadori DMF (2014) Cell cycle kinetics, apoptosis

- rates, DNA damage and *TP53* gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutat Res* **762**, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.02.006>
- SCCS Scientific Committee on Consumer Safety (2023) Opinion on the safety of alpha- (CAS No. 84380-018, EC No. 617-561-8) and beta-arbutin (CAS No. 497-76-7, EC No. 207-8503) in cosmetic products, preliminary version of 15-16 March 2022, final version of 31 January 2023, SCCS/1642/22. European Union, 2023.
- Scheurer SB, Rybak JN, Rösli C, Neri D, Elia G (2004) Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: a transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* **4**, 1737–1760. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300689>
- Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, von Niecieck A, Wittig J, Krähmer N, i sur. (2002) Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uvae ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans. *J Clin Pharmacol* **42**, 920–927. <https://doi.org/10.1177/009127002401102740>
- Seleshe S, Lee JS, Lee S, Lee HJ, Kim GR, Yeo J, i sur. (2017) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of three kinds of strawberries. *Prev Nutr food Sci* **22**, 203–210. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.3.203>
- Seo M-Y, Lee S-M (2002) Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *J Hepatol* **36**, 72–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00236-7)
- Seo S, Baye LM, Schulz NP, Beck JS, Zhang Q, Slusarski DC, i sur. (2010) BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1488–1493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910268107>
- Seyfizadeh N, Mahjoub S, Zabihi E, Moghadamnia A, Pouramir M, Mir H, i sur. (2012) Cytoprotective effects of arbutin against *tert*-butyl hydroperoxid induced toxicity in Hep-G2 cell line. *World Appl Sci J* **19**, 163–167. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.19.02.1810>
- Shamsudin NF, Ahmed QU, Mahmood S, Ali Shah SA, Khatib A, Mukhtar S, i sur. (2022) Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: a comparative interpretation. *Molecules* **27**, 1149.

- <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>
- Shao S, Fan Y, Zhong C, Zhu X, Zhu J (2020) Coactosin-like protein (COTL1) promotes glioblastoma (GBM) growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Manag Res* **12**, 10909–10917. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S246030>
- Sheerin NS, Glover EK (2019) Urinary tract infection. *Medicine (Baltimore)* **47**, 546–550. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.06.008>
- Shim S-M, Yoo S-H, Ra C-S, Kim Y-K, Chung J-O, Lee S-J (2012) Digestive stability and absorption of green tea polyphenols: influence of acid and xylitol addition. *Food Res Int* **45**, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.016>
- Shimizu M, Shiota S, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T, i sur. (2001) Marked potentiation of activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3198–3201. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3198-3201.2001>
- Siegers C, Siegers J, Pentz R, Bodinet C, Frreudenstein J (1997) Metabolism of arbutin from *Uvae ursi* extracts in humans. *PPL* **7**, 90–92
- Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Silva-Grecco RL, Navarro GC, Cruz RM, Balarin MAS (2012) Micronucleated lymphocytes in parents of Down syndrome children. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* **45**, 573–577. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500063>
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S (2019) Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* **24**, 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Slob W (2014) Benchmark dose and the three Rs. Part I. Getting more information from the same number of animals. *Crit Rev Toxicol* **44**, 557–567. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.925423>
- Spencer JPE (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr* **133**, 3255S–3261S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3255S>
- Ștefanescu BE, Szabo K, Mocan A, Crisan G (2019) Phenolic compounds from five Ericaceae species leaves and their related bioavailability and health benefits. *Molecules* **24**, 2046.

<https://doi.org/10.3390/molecules24112046>

- Stefanović OD (2018) Synergistic activity of antibiotics and bioactive plant extracts: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. In: Kirmusaoğlu S (ed) Bacterial pathogenesis and antibacterial control. IntechOpen, London, United Kingdom, p Chapter 2.
- Strange DS, Gaffin SS, Holloway WB, Kinsella MD, Wisotsky JN, McFeeters H, i sur. (2021) Natural product inhibition and enzyme kinetics related to phylogenetic characterization for bacterial peptidyl-tRNA hydrolase 1. *Molecules* **26**, 2281. <https://doi.org/10.3390/molecules26082281>
- Sugier P, Sęczyk Ł, Sugier D (2022) Variation in population and solvents as factors determining the chemical composition and antioxidant potential of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. leaf extracts. *Molecules* **27**, 2247. <https://doi.org/10.3390/molecules27072247>
- Sugier P, Sęczyk Ł, Sugier D, Krawczyk R, Wójcik M, Czarnecka J, i sur. (2021) Chemical characteristics and antioxidant activity of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. at the southern border of the geographical range of the species in Europe. *Molecules* **26**, 7692. <https://doi.org/10.3390/molecules26247692>
- Szatrowski TP, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* **51**, 794–798
- Takebayashi J, Ishii R, Chen J, Matsumoto T, Ishimi Y, Tai A (2010) Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic Res* **44**, 473–478. <https://doi.org/10.3109/10715761003610760>
- Tan J, Yadav MK, Devi S, Kumar M (2022) Neuroprotective effects of arbutin against oxygen and glucose deprivation-induced oxidative stress and neuroinflammation in rat cortical neurons. *Acta Pharm* **72**, 123–134. <https://doi.org/10.2478/acph-2022-0002>
- Terasaka H, Takayama F, Satoh K, Fujisawa S, Sakagami H (2000) Effect of antioxidants on radical intensity and cytotoxicity of hydroquinone. *Anticancer Res* **20**, 3357–3362
- Thumann TA, Pferschy-Wenzig EM, Aziz-Kalbhenn H, Ammar RM, Rabini S, Moissl-Eichinger C, i sur. (2020) Application of an *in vitro* digestion model to study the metabolic profile changes of an herbal extract combination by UHPLC–HRMS. *Phytomedicine* **71**, 153221. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153221>
- Trill J, Simpson C, Webley F, Radford M, Stanton L, Maishman T, i sur. (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. <https://doi.org/10.1186/s13063-017-2145-7>
- Tuladhar R, Lum L (2015) Fatty acyl donor selectivity in membrane bound O-acyltransferases and communal cell fate decision-making. *Biochem Soc Trans* **43**, 235–239. <https://doi.org/10.1042/BST20140282>
- UniProt (2023) UniProtKB. https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=*. Pristupljeno 24 June 2023.
- Unwin RD (2010) Quantification of proteins by iTRAQ. *Methods Mol Biol* **658**, 205–215. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-780-8_12
- Valencia-Quintana R, Gómez-Arroyo S, Sánchez-Alarcón J, Milić M, Olivares JLG, Waliszewski SM, i sur. (2016) Assessment of genotoxicity of Lannate-90® and its plant and animal metabolites in human lymphocyte cultures. *Arh Hig Rada Toksikol* **67**, 116–125. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2763>
- Vallejo MJ, Salazar L, Grijalva M (2017) Oxidative stress modulation and ROS-mediated toxicity in cancer: a review on *in vitro* models for plant-derived compounds. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 4586068. <https://doi.org/10.1155/2017/4586068>
- Vásquez-Caicedo AL, Schilling S, Carle R, Neidhart S (2007) Effects of thermal processing and fruit matrix on β -carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into purée and nectar. *Food Chem* **102**, 1172–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.005>
- Vervoort J, Xavier BB, Stewardson A, Coenen S, Godycki-Cwirko M, Adriaenssens N, i sur. (2015) Metagenomic analysis of the impact of nitrofurantoin treatment on the human faecal microbiota. *J Antimicrob Chemother* **70**, 1989–1992. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv062>
- Virbasius CM, Wagner S, Green MR (1999) A human nuclear-localized chaperone that regulates dimerization, DNA binding, and transcriptional activity of bZIP proteins. *Mol Cell* **4**, 219–228. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80369-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80369-x)
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* **137**, 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>
- Vraneš J (1994) Adhezini uropatogenih sojeva *Escherichia coli* i njihovo značenje u patogenezi

- infekcija mokraćnog sustava. *Med Vjesn* **26**, 51–58
- Vumma R, Bang CS, Kruse R, Johansson K, Persson K (2016) Antibacterial effects of nitric oxide on uropathogenic *Escherichia coli* during bladder epithelial cell colonization - a comparison with nitrofurantoin. *J Antibiot (Tokyo)* **69**, 183–186. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.112>
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **16**, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Wallace TC, Blumberg JB, Johnson EJ, Shao A (2015) Dietary bioactives: establishing a scientific framework for recommended intakes. *Adv Nutr* **6**, 1–4. <https://doi.org/10.3945/an.114.007294>
- Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK (2005) Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* **135**, 48–52. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.48>
- Waller DG, Sampson AP (2018) Chemotherapy of infections. In: Waller DG, Sampson AP (eds) *Medical pharmacology and therapeutics*, 5th edn. Elsevier, p 581–629.
- Wang C-Q, Wang X-M, Li B-L, Zhang Y-M, Wang L (2021a) Arbutin suppresses osteosarcoma progression via miR-338-3p/MTHFD1L and inactivation of the AKT/mTOR pathway. *FEBS Open Bio* **11**, 289–299. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13024>
- Wang Y, Li X, Cao Y, Xiao C, Liu Y, Jin H, i sur. (2021b) Effect of the ACAA1 gene on preadipocyte differentiation in sheep. *Front Genet* **12**, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.649140>
- Wei L, Yin F, Chen C, Li L (2019) Expression of integrin α -6 is associated with multi drug resistance and prognosis in ovarian cancer. *Oncol Lett* **17**, 3974–3980. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10056>
- WHO - World Health Organization (2004) *Folium Uva ursi* monograph <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4927e/s4927e.pdf>
- Williams HD, Sassene P, Kleberg K, Bakala-N’Goma J-C, Calderone M, Jannin V, i sur. (2012) Toward the establishment of standardized *in vitro* tests for lipid-based formulations, part 1: method parameterization and comparison of *in vitro* digestion profiles across a range of

- representative formulations. *J Pharm Sci* **101**, 3360–3380.
<https://doi.org/10.1002/jps.23205>
- Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D (2000) Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans* **28**, 16–22.
<https://doi.org/10.1042/bst0280016>
- Wright GD (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* **13**, 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
- Wrona M, Blasco S, Becerril R, Nerin C, Sales E, Asensio E (2019) Antioxidant and antimicrobial markers by UPLC®–ESI-Q-TOF-MSE of a new multilayer active packaging based on *Arctostaphylos uva-ursi*. *Talanta* **196**, 498–509.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.057>
- Wu P, Qiao L, Yu H, Ming H, Liu C, Wu W, i sur. (2021) Arbutin alleviates the liver injury of α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through farnesoid X receptor activation. *Front cell Dev Biol* **9**, 758632. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.758632>
- Xu K-X, Xue M-G, Li Z, Ye B-C, Zhang B (2022) Recent progress on feasible strategies for arbutin production. *Front Bioeng Biotechnol* **10**, 914280.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.914280>
- Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O (1997) Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol* **157**, 1127–1129
- Yang L, Wang K, Li H, Denstedt JD, Cadieux PA (2014) The influence of urinary pH on antibiotic efficacy against bacterial uropathogens. *Urology* **84**, 731.
<https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.04.048>
- Yang S, Huang F-K, Huang J, Chen S, Jakoncic J, Leo-Macias A, i sur. (2013) Molecular mechanism of fascin function in filopodial formation. *J Biol Chem* **288**, 274–284.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427971>
- Yang Y, Fang X, Yang R, Yu H, Jiang P, Sun B, i sur. (2018) MIR-152 regulates apoptosis and triglyceride production in MECs via targeting ACAA2 and HSD17B12 genes. *Sci Rep* **8**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18804-x>
- Yang Z, Shi H, Chinnathambi A, Salmen SH, Alharbi SA, Veeraraghavan VP, i sur. (2021) Arbutin exerts anticancer activity against rat C6 glioma cells by inducing apoptosis and

- inhibiting the inflammatory markers and P13/Akt/mTOR cascade. *J Biochem Mol Toxicol* **35**, e22857. <https://doi.org/10.1002/jbt.22857>
- Yarnell E (2002) Botanical medicines for the urinary tract. *World J Urol* **20**, 285–293. <https://doi.org/10.1007/s00345-002-0293-0>
- Yin L-Z, Xu X, Zhou L-G, Wang D-C, Deng X-M, Ouyang P (2010) Isolation and identification of a new compound from the roots of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Chem J Chinese Univ* **31**, 84–87
- Zeng X, Liu H, Huang Z, Dong P, Chen X (2022) Anticancer effect of arbutin on diethylnitrosamine-induced liver carcinoma in rats via the GRP and GADD pathway. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **41**, 15–26. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2021039772>
- Zhang H, Hassan YI, Liu R, Mats L, Yang C, Liu C, i sur. (2020) Molecular mechanisms underlying the absorption of aglycone and glycosidic flavonoids in a Caco-2 BBe1 cell model. *ACS omega* **5**, 10782–10793. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00379>
- Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, i sur. (2019) Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol* **26**, 101284. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* **64**, 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zieske LR (2006) A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* **57**, 1501–1508. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj168>

Prilog 1 - MRM (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) tranzicijska lista korištena za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju ciljanih proteina izoliranih iz T24 stanica karcinoma mokraćnog mjehura nakon tretmana koncentracijama hidrokinona 20 i 320 µg/mL tijekom 2 h.

Accession No.*	Ime proteina	Peptid	Prekursor ion (m/z, Da)	Produkt ion (m/z, Da)	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (V)	Polarnost
P06733	Alfa-enolaza	GNPTVEVDLFTSK	703,86	938,48	130	22,8	Pozitivna
				809,44	130	22,8	Pozitivna
				710,37	130	22,8	Pozitivna
				335,19	130	22,8	Pozitivna
		LNVTEQEK	480,75	847,42	130	15,9	Pozitivna
				733,37	130	15,9	Pozitivna
				634,30	130	15,9	Pozitivna
				533,26	130	15,9	Pozitivna
		YISPDQLADLYK	475,91	722,41	130	12,3	Pozitivna
				609,32	130	12,3	Pozitivna
				538,29	130	12,3	Pozitivna
				310,18	130	12,3	Pozitivna
		YNQLLR	403,73	643,39	130	13,5	Pozitivna
				529,35	130	13,5	Pozitivna
				401,29	130	13,5	Pozitivna
		IEEELGSK	452,73	791,38	130	15,0	Pozitivna
662,34	130			15,0	Pozitivna		
533,29	130			15,0	Pozitivna		
404,25	130			15,0	Pozitivna		
P04075	Fruktoza-bisfosfat aldolaza A	QLLLTADDR	522,79	803,43	130	17,2	Pozitivna
				690,34	130	17,2	Pozitivna
				577,26	130	17,2	Pozitivna
				476,21	130	17,2	Pozitivna
		GGVVGIK	315,20	515,36	130	10,8	Pozitivna

				416,29	130	10,8	Pozitivna
				317,22	130	10,8	Pozitivna
		ALQASALK	401,25	617,36	130	13,4	Pozitivna
				489,30	130	13,4	Pozitivna
				418,27	130	13,4	Pozitivna
P09972	Fruktoza-bisfosftat aldolaza C	ELSDIALR	458,76	787,47	130	15,2	Pozitivna
				674,38	130	15,2	Pozitivna
				359,24	130	15,2	Pozitivna
P04406	Gliceraldehid-3- fosfat dehidrogenaza	LVINGNPITIFQER	538,64	793,42	130	14,6	Pozitivna
				692,37	130	14,6	Pozitivna
				579,29	130	14,6	Pozitivna
				432,22	130	14,6	Pozitivna
		GALQNIIPASTGAAK	706,40	928,55	130	22,9	Pozitivna
				815,46	130	22,9	Pozitivna
				702,38	130	22,9	Pozitivna
				534,29	130	22,9	Pozitivna
		VIPELNGK	435,26	657,36	130	14,5	Pozitivna
				560,30	130	14,5	Pozitivna
				431,26	130	14,5	Pozitivna
				318,18	130	14,5	Pozitivna
P60174	Triozafosfat izomeraza	QSLGELIGTLNAAK	707,90	900,55	130	22,9	Pozitivna
				787,47	130	22,9	Pozitivna
				674,38	130	22,9	Pozitivna
				617,36	130	22,9	Pozitivna
		VVFEQTK	425,74	751,40	130	14,2	Pozitivna
				652,33	130	14,2	Pozitivna
				505,26	130	14,2	Pozitivna
				376,22	130	14,2	Pozitivna
				376,20	130	14,2	Pozitivna
		SNVSDAVAQSTR	617,80	934,46	130	20,2	Pozitivna

				847,43	130	20,2	Pozitivna		
				732,40	130	20,2	Pozitivna		
				661,36	130	20,2	Pozitivna		
				562,29	130	20,2	Pozitivna		
				491,26	130	20,2	Pozitivna		
				363,20	130	20,2	Pozitivna		
P00338	L-laktat dehidrogenaza Alanac	DQLIYNLLK	560,32	876,56	130	18,4	Pozitivna		
				763,47	130	18,4	Pozitivna		
				650,39	130	18,4	Pozitivna		
				487,32	130	18,4	Pozitivna		
		VTLTSEEEAR	567,79	934,45	130	18,6	Pozitivna		
				821,36	130	18,6	Pozitivna		
				720,32	130	18,6	Pozitivna		
				633,28	130	18,6	Pozitivna		
Q16543	Hsp90 ko-šaperon Cdc37	ELEVAEGGK	466,24	560,30	130	15,5	Pozitivna		
				461,24	130	15,5	Pozitivna		
				390,20	130	15,5	Pozitivna		
		LQAEAQQLR	528,79	815,44	130	17,4	Pozitivna		
				744,40	130	17,4	Pozitivna		
				615,36	130	17,4	Pozitivna		
				544,32	130	17,4	Pozitivna		
		TEEDSEEVK	547,24	734,33	130	18,0	Pozitivna		
				532,27	130	18,0	Pozitivna		
				403,23	130	18,0	Pozitivna		
		Q06830	Peroksiredoksin-1	DISLSDYK	470,73	712,35	130	15,6	Pozitivna
						625,32	130	15,6	Pozitivna
512,24	130					15,6	Pozitivna		
310,18	130					15,6	Pozitivna		
TIAQDYGVLK	554,31			893,47	130	18,2	Pozitivna		

		ADEGISFR	447,72	822,44	130	18,2	Pozitivna
				694,38	130	18,2	Pozitivna
				579,35	130	18,2	Pozitivna
				823,39	130	14,9	Pozitivna
				708,37	130	14,9	Pozitivna
				579,32	130	14,9	Pozitivna
				409,22	130	14,9	Pozitivna
P07900	Protein toplinskog šoka HSP 90-alfa	FYEQFSK	474,73	801,38	130	15,7	Pozitivna
				638,31	130	15,7	Pozitivna
				509,27	130	15,7	Pozitivna
				381,21	130	15,7	Pozitivna
		DQVANSAFVER	618,30	992,52	130	20,2	Pozitivna
				893,45	130	20,2	Pozitivna
				822,41	130	20,2	Pozitivna
				708,37	130	20,2	Pozitivna
				621,34	130	20,2	Pozitivna
P08238	Protein toplinskog šoka HSP 90-beta	VVVITK	329,73	559,38	130	11,2	Pozitivna
				460,31	130	11,2	Pozitivna
				361,24	130	11,2	Pozitivna
		FYEAFSK	446,22	744,36	130	14,8	Pozitivna
				581,29	130	14,8	Pozitivna
				452,25	130	14,8	Pozitivna
				381,21	130	14,8	Pozitivna
P04083	Aneksin A1	NALLSLAK	415,26	644,43	130	13,9	Pozitivna
				531,35	130	13,9	Pozitivna
				418,27	130	13,9	Pozitivna
		VLDLELK	415,26	730,43	130	13,9	Pozitivna
				617,35	130	13,9	Pozitivna
				502,32	130	13,9	Pozitivna
P63104		VVSSIEQK	445,25	790,43	130	14,8	Pozitivna

	14-3-3 protein zeta/delta	GIVDQSQQAYQEAFEISK	681,00	691,36	130	14,8	Pozitivna		
				604,33	130	14,8	Pozitivna		
				517,30	130	14,8	Pozitivna		
				951,48	130	19,7	Pozitivna		
				823,42	130	19,7	Pozitivna		
				694,38	130	19,7	Pozitivna		
		TAFDEAIAELDTLSEESYK	711,34	623,34	130	19,7	Pozitivna		
				956,46	130	20,8	Pozitivna		
				855,41	130	20,8	Pozitivna		
				742,33	130	20,8	Pozitivna		
P62258	14-3-3 protein epsilon	IISIEQK	459,27	655,29	130	20,8	Pozitivna		
				804,45	130	15,2	Pozitivna		
				691,36	130	15,2	Pozitivna		
				517,30	130	15,2	Pozitivna		
		AAFDDAIAELDTLSEESYK	696,66	404,21	130	15,2	Pozitivna		
				956,46	130	20,3	Pozitivna		
				855,41	130	20,3	Pozitivna		
				742,33	130	20,3	Pozitivna		
				655,29	130	20,3	Pozitivna		
				688,39	130	15,2	Pozitivna		
P23528	Kofilin-1	NIILEEGK	458,26	575,30	130	15,2	Pozitivna		
				462,22	130	15,2	Pozitivna		
				333,18	130	15,2	Pozitivna		
				940,48	130	21,2	Pozitivna		
		EILVGDVGQTVDDPYATFVK	722,70	825,45	130	21,2	Pozitivna		
				494,30	130	21,2	Pozitivna		
				393,25	130	21,2	Pozitivna		
				792,44	130	20,5	Pozitivna		
				LLGAGAVAYGVR	630,38	494,27	130	20,5	Pozitivna
						331,21	130	20,5	Pozitivna
Q99623	Prohibitin-2								

		IYLTADNLVLNLQDESFTR	742,39	882,40	130	21,9	Pozitivna
				754,34	130	21,9	Pozitivna
				639,31	130	21,9	Pozitivna
				510,27	130	21,9	Pozitivna
P60842	Eukariotski inicijacijski faktor 4A-I	ATQALVLAPTR	570,84	968,59	130	18,7	Pozitivna
				840,53	130	18,7	Pozitivna
				769,49	130	18,7	Pozitivna
				656,41	130	18,7	Pozitivna
		DQIYDIFQK	585,30	926,50	130	19,1	Pozitivna
				813,41	130	19,1	Pozitivna
				535,32	130	19,1	Pozitivna
				422,24	130	19,1	Pozitivna
Q04637	Faktor inicijacije eukariotske translacije 4 gama 1	GVIDLIFEK	517,30	764,42	130	17,0	Pozitivna
				649,39	130	17,0	Pozitivna
				536,31	130	17,0	Pozitivna
				423,22	130	17,0	Pozitivna

Životopis

Ana Huđek Turković rođena je 04. veljače 1993. godine u Varaždinu. Pohađala je Prvu Gimnaziju Varaždin gdje je maturirala 2011. godine. Akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke biotehnologije stekla je 2014. godine, a 2016. godine diplomirala je i stekla akademski naziv magistre inženjerke molekularne biotehnologije. Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2017. godine. Godine 2022. prijavila je i uspješno obranila temu doktorskoga rada uz mentorstvo prof. dr. sc. Ksenije Durgo i prof. dr. sc. Gordane Rusak.

Tijekom studija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu bila je među 10 % najboljih studenata. Dodijeljene su joj tri nagrade dekana za najbolji prosjek i nagrada za izvrsnost u znanstveno-istraživačkom radu. Već u studentskim danima sudjelovala je u znanstveno-istraživačkom radu koji je bio prijavljen za dodjelu Rektorove nagrade, a rezultirao je objavom znanstvene publikacije s prvim autorstvom. Prvi je autor na 4 te koautor na 8 znanstveno-istraživačkih radova i jednom poglavlju u knjizi. Godine 2019. sudjelovala je kao stručni suradnik u organizaciji Kongresa studenata biotehnologije u Zagrebu i bila je član Organizacijskog odbora na 6. Hrvatskom toksikološkom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem (CROTOX2021) održanom 2021. godine. Bila je aktivni sudionik na 10 znanstvenih i stručnih skupova s međunarodnim sudjelovanjem. Dobitnica je stipendije Sveučilišta u Zagrebu za akademsku mobilnost doktorskih studenata Sveučilišta u Zagrebu u 2022. godini, nagrade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za objavljeni znanstveni rad u najbolje rangiranom časopisu u 2020. godini u području Biotehnologije, stipendije Hrvatskog toksikološkog društva za poticanje rada mladih znanstvenika i Instem nagrade za podršku mladim istraživačima 2019. godine te IUTOX nagrade izvrsnim doktorskim studentima 2018. godine. Sudjelovala je na više stručnih tečajeva i radionica s ciljem usavršavanja i stjecanja kompetitivnosti na znanstveno-nastavnom području. Bila je pomoć pri izradi 11 diplomskih i jednog završnog rada. Vodila je radionice na događanjima popularizacije znanosti kao što su Festival znanosti i Dani otvorenih vrata Fakulteta.

Bila je član vijeća udruge *European Young Engineers* Hrvatska. Aktivni je član Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog toksikološkog društva, Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu, Hrvatskog mikrobiološkog društva i udruge Penkala. Također, predstavnica je grupacije asistenata u Povjerenstvu za studentske radove Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja autora

Poglavlja u knjigama

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K.; **Hudek, A.**, Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Polyphenols: Properties, Recovery and Applications: *Overview of polyphenols and their properties*, Elsevier Woodhead Publishing, Cambridge.

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

Hudek Turković, A., Durgo, K., Čučković, F., Ledenko, I., Krizmanić, T., Martinić, A., Vojvodić Cebin, A., Komes, D., Milić, M. (2023) Reduction of oral pathogens and oxidative damage in the CAL 27 cell line by *Rosmarinus officinalis* L. and *Taraxacum officinale* Web. extracts. *J. Ethnopharmacol.* **316**, 116761.

Popović, A.-M., **Hudek Turković, A.**, Žuna, K., Bačun-Družina, V., Rubelj, I., Matovinović, M. (2022) FTO gene polymorphisms at the crossroads of metabolic pathways of obesity and epigenetic influences. *Food Technol. Biotech.* **61**, 14-26.

Šeremet, D., Durgo, K., Komljenović, A., Antolić, M., Mandura Jarić, A., **Hudek Turković, A.**, Komes, D., Šantek, B. (2022) Red beetroot and banana peels as value-added ingredients: assessment of biological activity and preparation of functional edible films. *Polymers* **14**, 4724.

Jurić, A., **Hudek Turković, A.**; Brčić Karačonji, I., Prđun, S., Bubalo, D., Durgo, K. (2022) Cytotoxic activity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey, its extract, and homogentisic acid on CAL 27, HepG2, and Caco-2 cell lines. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **73**, 158-168.

Hudek Turković, A., Matovinović, M., Žuna, K., Škara, L., Kazazić, S., Bačun-Družina, V., Durgo, K. (2022) Association of vitamins D, B9 and B12 with obesity-related diseases and oral microbiota composition in obese women in Croatia. *Food Technol. Biotech.* **60**, 135-144.

Hudek Turković, A., Gunjača, M., Marjanović, M., Lovrić, M., Butorac, A., Rašić, D., Peraica, M., Vujčić Bok, V., Šola, I., Rusak, G., Durgo, K. (2022) Proteome changes in human bladder T24 cells induced by hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* herbal preparation. *J. Ethnopharmacol.* **289**, 115092.

Škara, L., **Hudek Turković, A.**, Pezelj, I., Vrtarić, A., Sinčić, N., Krušlin, B., Ulamec, M. (2021) Prostate Cancer - focus on cholesterol. *Cancers* **13**, 4696.

Tumir, L.-M., Zonjić, I., Žuna, K., Radić Brkanac, S., Jukić, M., **Hudek, A.**, Durgo, K., Crnolatac, I., Glavaš-Obrovac, Lj., Cardullo, N., Pulvirenti, L., Muccilli, V., Tringali, C., Radić Stojković, M. (2020) Synthesis, DNA/RNA-interaction and biological activity of benzo[k,l]xanthene lignans. *Bioorg. Chem.* **104**, 104190.

Ančić, M., **Hudek, A.**, Rihtarić, I., Cazar, M., Bačun-Družina, V., Kopjar, N., Durgo, K. (2020) Physico chemical properties and toxicological effect of landfill groundwaters and leachates. *Chemosphere* **238**, 124574.

Šeremet, D., Durgo, K., Jokić, S., **Hudek, A.**, Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Jurasović, J., Komes, D. (2020) Valorization of banana and red beetroot peels: determination of basic macrocomponent composition, application of novel extraction methodology and assessment of biological activity *in vitro*. *Sustainability* **12**, 4539.

Šola, I., Stipaničev, M., Vujčić, V., Mitić, B., **Hudek, A.**, Rusak, G. (2018) Comparative analysis of native *Crocus* taxa as a great source of flavonoids with high antioxidant activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* **73**, 189-195.

Hudek, A., Škara, L., Smolković, B., Kazazić, S., Ravlić, S., Nanić, L., Matovinović Osvatić, M., Jelčić, J., Rubelj, I., Bačun-Družina, V. (2018) Higher prevalence of FTO gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085 and GG rs17817449 and saliva containing *S. aureus* in obese women in Croatia. *Nutr. Res.* **50**, 94-103.

Kongresna priopćenja

Durgo, K., **Hudek Turković, A.**, Martinić, A., Ledenko, I., Krizmanić, T., Čučković, F., Komes, D., Milić, M. (2023) Equivocal effect of bioactive compounds from plants. Book of abstracts of 13th Congress of the Serbian Society of Toxicology with international participation & 1st TOXSEE Regional Conference, Beograd, Srbija, str. 76-77.

Hudek Turković, A., Bebek Markovinović, A., Hadžiomeragić, E., Kostelac, D., Durgo, K., Putnik, P., Bursać Kovačević, D. (2023) Potential DNA protective effect of an extract from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) against oxidative stress damage. Book of abstracts of 13th Congress of the Serbian Society of Toxicology with international participation & 1st TOXSEE Regional Conference, Beograd, Srbija, str. 181-182.

Hudek Turković, A., Gunjača, M., Marjanović, M., Lovrić, M., Butorac, A., Rašić, D., Peraica, M., Vujčić Bok, V., Šola, I., Rusak, G., Durgo, K. (2022) Influence of hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* extract on T24 bladder cell proteome. Knjiga sažetaka, Dani doktorata biotehničkog područja 2022., Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, str. 102-103.

Hudek Turković, A., Butumović, A., Bebek Markovinović, A., Durgo, K., Bursać Kovačević, D. (2022) Biological activity of strawberry tree fruit. CEFood Congress Book, Congress of Food and Nutrition, CEFood 2022, Čatež ob Savi, Slovenija, str. 172.

Durgo, K., **Hudek Turković, A.**, Dević, D., Danček, M., Rumenova Raychinova, M., Čurčić (2021) Genotoxic properties of low doses of cadmium and phthalates. Supplement edition of Archives of Industrial Hygiene and Toxicology **72**, str. 81, 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, Continuing Education Course (CEC), Rabac, Hrvatska.

Hudek Turković, A., Skoblar, M., Šola, I., Vujčić Bok, V., Rusak, G., Durgo, K. (2021) Influence of bearberry extract (*Arctostaphylos uva ursi* L.) on gastrointestinal bacteria adhesion. Supplement edition of Archives of Industrial Hygiene and Toxicology **72**, str. 57, 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, Continuing Education Course (CEC), Rabac, Hrvatska.

Hudek Turković, A., Tumir, L. M., Zonjić, I., Durgo, K., Radić Brkanac, S., Žuna, K., Crnolatac, I., Tringali, C., Radić Stojković, M. (2021) Antibacterial, cytotoxic, and antioxidative effects of benzoxanthene lignans. Supplement edition of Archives of Industrial Hygiene and Toxicology **72**, str. 45, 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, Continuing Education Course (CEC), Rabac, Hrvatska.

Jurić, A., **Hudek Turković, A.**, Brčić Karačonji, I., Lušić, D., Durgo, K., Kopjar, N. (2021) Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey extract ameliorates the genotoxic effects of irinotecan

but lead to cell cycle delays in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. Supplement edition of Archives of Industrial Hygiene and Toxicology **72**, str. 57, 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, Continuing Education Course (CEC), Rabac, Hrvatska.

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

Šeremet, D., **Hudek, A.**, Durgo, K., Mandura, A., Vojvodić Cebin, A., Martinić, A., Šantek, B., Komes, D. (2019) The red beetroot peel extract – characterization of bioactive composition and biological activity *in vitro*. Book of Abstracts of the 12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH, Osijek, Hrvatska, str. 59.

Hudek, A., Joukhadar, L., Jurič, A., Bačun-Družina, V., Kopjar, N., Durgo, K. (2019) Genotoxic effect of irinotecan on human liver and colon tumor cells. Genetics & Applications **3**, Special edition – Book of abstracts of 1st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, str. 90.

Hudek, A., Martinić, A., Bačun-Družina, V., Komes, D., Durgo, K., Milić, M. (2019) Protective effect of *Rosmarinus officinalis* L. and *Taraxacum officinale* L. extracts on genetic material of human squamous carcinoma cell line CAL27. ICAW 2019 Conference Guide of 13th International Comet Assay Workshop, Pushchino, Rusija, str. 58.

Hudek, A., Škara, L., Smolković, B., Ravlić, S., Nanić, L., Matovinović, M., Rubelj, I., Bačun-Družina, V. (2019) Povezanost jednostrukih nukleotidnih polimorfizama (SNP-ova) rs9939609, rs1421085 i rs17817449 u *FTO* genu s povećanim indeksom tjelesne mase, sastavom oralne mikrobiote i životnim navikama u žena iz Zagrebačke županije u Hrvatskoj. Knjiga sažetaka 2. Kongresa studenata biotehnologije, Zagreb, Hrvatska, str. 17-19.

Hudek, A., Škara, L., Smolković, B., Ravlić, S., Nanić, L., Matovinović, M., Rubelj, I., Bačun-Družina, V. (2018) Evolution of single nucleotide polymorphisms in fat mass and obesity associated gene. Book of abstracts of 4th Congress of Croatian Geneticists with International Participation, Krk, Hrvatska, str. 48.

Hudek, A., Rumenova Raychinova, M., Čurčić, M., Mozo, J. E., Bačun-Družina, V., Durgo, K.: Low doses of cadmium and phthalates – cytotoxic and genotoxic properties, Book of abstracts of 4th Congress of Croatian Geneticists with International Participation, Krk, Hrvatska, str. 47.

Bačun-Družina, V., **Hudek, A.**, Butorac, A., Durgo, K. (2018) Ascendant of lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* L62 over *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Str^R in mixed culture. Book of abstract of 6th Congress of the Microbiologists of Macedonia with international participation, FEMS-supported Symposium: „Emerging infections“, Ohrid, Makedonija, str. 230-231.

Durgo, K., **Hudek, A.**, Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Komes, D., Bačun-Družina, V. (2018) Role of oxidants and antioxidants in degenerative diseases development: *in vitro* models. Book of Abstracts of 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) and 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology (12th SCT), Beograd, Srbija, str. 42-43.

Hudek, A., Durgo, K., Bertoša, R., Komes, D., Belščak-Cvitanović, A. (2017) Influence of the encapsulation method on biological effect of quercetin and L-ascorbic acid, Zbornik: esib, The European Summit of Industrial Biotechnology, ESIB2017 i Croatian - Austrian Science Day, Graz, Austrija, str. 171.

Hudek, A., Čučković, F., Bačun-Družina, V., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Durgo, K. (2017) Influence of plant extracts on bacterial adhesion. Journal of Biotechnology, abstract volume of European Biotechnology Congress, Dubrovnik, Hrvatska, str. 72.

Bačun-Družina, V., Miđić, J., Butorac, A., Mrvčić, J., **Hudek, A.**, Cindrić, M., Durgo, K. (2017) The negative influence of bacterium *Lactobacillus plantarum* on the growth of human HEp-2 laryngeal cancer cells. Book of abstracts of 11th Serbian Microbiologists Congress MICROMED 2017 with international participation, Beograd, Srbija, str. 138-139.

Smolkovič, B., **Hudek, A.**, Butorac, A., Cindrić, M., Bačun-Družina, V. (2016) The abortive growth advantage in stationary phase phenomenon in mixed cultures of bacteria *Lactobacillus brevis* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Book of abstract of 6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, Sveti Martin na Muri, Hrvatska, str. 61.