Antioksidacijski i cito/genoprotektivni učinci meda od kestena na oštećenja ljudskih limfocita izazvana UVB zračenjem u uvjetima in vitro

Kuzmić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:384439

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Marija Kuzmić

Antioksidacijski i cito/genoprotektivni učinci meda od kestena na oštećenja ljudskih limfocita izazvana UVB zračenjem u uvjetima *in vitro*

Diplomski rad

Rijeka, 2020

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Marija Kuzmić

Antioksidacijski i cito/genoprotektivni učinci meda od kestena na oštećenja ljudskih limfocita izazvana UVB zračenjem u uvjetima *in vitro*

Diplomski rad

Rijeka, 2020

Mentori rada: Dr.sc. Suzana Žunec

Prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Graduate programme Biotechnology in medicine

Marija Kuzmić

Assessment of antioxidative and cyto/genoprotective properties of chestnut honey against UVB radiation *in vitro*

Graduate thesis

Rijeka, 2020

Diplomski rad obranjen je dana 21.rujna 2020. godine na Odjelu za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Ivana Ratkaj, predsjednica povjerenstva

2. Izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car, član povjerenstva

3. Dr.sc. Suzana Žunec, mentorica

Rad ima 52 stranice, 12 slika, 1 tablicu i 46 literaturnih navoda.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Suzani Žunec na svim savjetima, strpljenju, stručnoj pomoći te prenesenom znanju koje su mi uvelike olakšali uspješnu izradu ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem dr. sc. Maji Lazarus na donaciji uzorka meda od kestena i dr. sc. Nevenki Kopjar na pruženoj pomoći prilikom provođenja istraživačkog dijela diplomskog rada.

Veliko hvala i svim djelatnicima Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada koji su osigurali okolinu u kojoj je bilo ugodno boraviti.

Zahvalila bih se svim prijateljima koji su mi bili podrška te koji su uljepšali ovo razdoblje.

Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji na podršci pruženoj tijekom cijelog studiranja te na svemu što su mi omogućili.

SAŽETAK

Ultraljubičasto B (UVB) zračenje izaziva niz štetnih učinaka u stanicama kao što su izravna oštećenja DNA, oksidacijski stres, poremećaji signalnih puteva, upalni odgovor te fotokancerogeneza. Sve intenzivnije se istražuju različiti prirodni spojevi koji pružaju zaštitu od štetnog djelovanja UV zračenja. Med je u potpunosti prirodan i nutritivan proizvod koji sadrži flavonoide i fenole s antioksidacijskim učinkom.

Ultraljubičasto B zračenje je dokazano genotoksičan agens, pa stoga hipoteza iz koje proizlazi istraživanje je da bi tretiranje limfocita medom iz ekološkog uzgoja moglo povećati stopu preživljenja te sniziti razinu primarnih oštećenja DNA i razinu oksidacijskog stresa nakon ozračivanja. U tu svrhu korišten je med od kestena s visokim udjelom polifenola za koji je utvrđena dobra antioksidacijska aktivnost. Istraživanje je provedeno u uvjetima *in vitro* na limfocitima i plazmi periferne krvi zdrave muške osobe. Provedena su dva modela izlaganja stanica i pune krvi: (I) pred-tretman medom u trajanju od 2 h, nakon kojega je slijedilo ozračivanje UVB zračenjem i dodatnih 1 h inkubacije stanica/krvi na 37 °C, (II) tretman koji je uključivao ozračivanje UVB zračenjem i zatim inkubaciju stanica/krvi s medom u trajanju od 2 h na 37 °C. Ispitani su učinci meda u koncentracijama koje odgovaraju dozama dnevno prihvatljivog unosa meda prehranom i deset puta većoj koncentraciji meda od dnevno prihvatljive doze. Razina primarnih oštećenja limfocitne DNA, kao i protektivni učinak meda, procijenjena je pomoću komet-testa u alkalnim uvjetima, dok su u uzorcima plazme određeni markeri oksidacijskog stresa.

Med od kestena pokazao je dobre citoprotektivne i genoprotektivne te antioksidacijske učinke nakon izlaganja limfocita i pune krvi UVB zračenju. Povoljan učinak meda bio je izraženiji nakon tretmana ozračenih uzoraka. Optimalnom koncentracijom meda pokazala se ona od 1 mg/mL, dok su najmanja (0,2157 mg/mL) i najveća (10 mg/mL) koncentracija

pokazale prooksidacijsko djelovanje u mjerenju razine markera oksidacijskog stresa.

Ključne riječi: Ultraljubičasto B zračenje, med od kestena, komet- test, markeri oksidacijskog stresa

ABSTRACT

Ultraviolet B (UVB) radiation causes a number of harmful effects in cells including direct DNA damage, oxidative stress, signalling pathway disorders, inflammatory response and photocancerogenesis. Great effort is invested into the investigation of various natural compounds that can provide protection from the harmful effects of UVB radiation. Honey is a completely natural and nutritive product that contains flavonoids and phenols with antioxidant effect.

Ultraviolet B radiation has been proven to be genotoxic, therefore the initial hypothesis of the study was that treating lymphocytes with honey can increase the survival rate and decrease primary DNA damage as well as the oxidative stress levels after exposure to irradiation. For this purpose, we used chestnut honey, which has been proven to have high ratios of polyphenols and good antioxidant activity. The study was conducted *in vitro* on the lymphocytes and peripheral blood plasma of a healthy male. There were two models of cells and whole blood exposure: (I) 2 hours of pretreatment with honey followed by exposure to UVB irradiation and an additional 1 hour incubation of cells/whole blood at 37 °C, (II) treatment including exposure to UVB irradiation and incubation of cells/whole blood with honey for 2 hours at 37 °C. The effects of the honey were analyzed at concentrations that correspond to the daily acceptable honey intake dose and a 10 times larger concentration than the daily acceptable dose. The primary damage of lymphocyte DNA, as well as the protective effect of honey, was evaluated using the alkaline comet assay, while the plasma samples were used to determine markers of oxidative stress.

Chestnut honey showed good cytoprotective and genoprotective, as well as antioxidative effect after exposure of lymphocytes and whole blood to UVB irradiation. The beneficial effect of honey was more pronounced after the treatment of irradiated samples. The optimal concentration of honey was shown to be 1 mg/mL, while the lowest (0,2157 mg/mL) and

the largest (10 mg/mL) concentrations showed a prooxidative effect in measuring oxidative stress markers.

Key words: Ultraviolet B radiation, chestnut honey, comet assay, oxidative stress markers

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
   1.1. UVB zračenje ... 1
   1.2. Oštećenja DNA kao posljedica djelovanja UVB zračenja ... 3
   1.3. Reaktivne kisikove vrste (ROS) ... 4
   1.4. Lipidna peroksidacija kao posljedica djelovanja ROS ... 6
   1.5. Mehanizmi popravka u ljudskom tijelu ... 10
   1.6. Glutation (GSH) kao endogeni antioksidans ... 10
   1.7. Prirodni spojevi kao zaštita od djelovanja UV zračenja ... 11
   1.8. Med ... 12
      1.8.1. Svojstva meda ... 14
   1.9. Med od kestena ... 16
2. CILJ RADA ... 19
3. MATERIJALI I METODE ... 20
   3.1. Materijali ... 20
      3.1.1. Kemikalije ... 20
      3.1.2. Instrumenti i oprema ... 21
   3.2. Metode ... 21
      3.2.1. Priprema uzoraka limfocita i plazme ... 21
      3.2.2. Priprema otopina meda od kestena i umjetnog meda ... 22
      3.2.3. Tretmani limfocita i pune krvi ... 24
      3.2.4. Test preživljenja limfocita ... 26
      3.2.5. Komet-test u alkalnim uvjetima ... 26
      3.2.6. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije ... 28
      3.2.7. Određivanje razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) ... 29
      3.2.8. Određivanje razine glutationa (GSH) ... 30
4. REZULTATI ... 31
   4.1. Test preživljenja limfocita ... 31
   4.2. Komet-test u alkalnim uvjetima ... 33
   4.3. Određivanje markera oksidacijskog stresa u plazmi ... 36
      4.3.1. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije ... 36

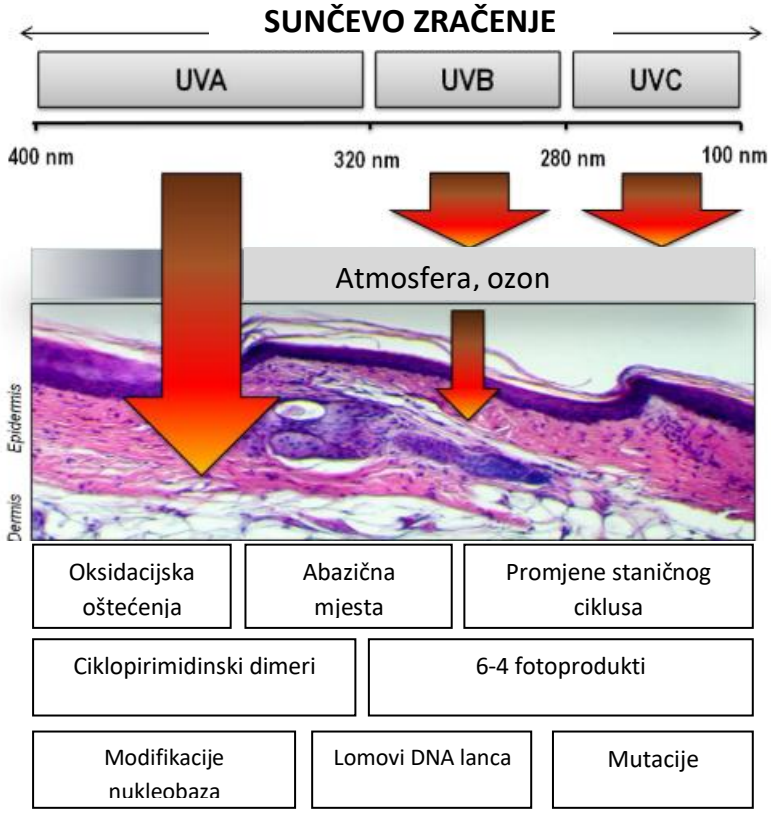
4.3.2. Određivanje razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) 38
4.3.3. Određivanje razine glutationa (GSH) 40
5. RASPRAVA 42
6. ZAKLJUČAK 45
7. LITERATURA 46
8. ŽIVOTOPIS 51

1. UVOD

1.1. UVB zračenje

Ultraljubičasto B (engl. *ultraviolet B*, UVB) zračenje je zračenje valne duljine 280–300 nm koje dopire do površine Zemlje te čiji se intenzitet povećava sa smanjenjem koncentracije ozona. Premda čini malu količinu UV zračenja koje dopire do površine Zemlje, UVB zračenje je visoko mutageno. Može uzrokovati oštećenja DNA svojim izravnim djelovanjem na ovu biomolekulu jer nukleobaze apsorbiraju fotone iz UVB zračenja. Također, zračenje može uzrokovati genske mutacije, imunosupresiju, oksidacijski stres te upalne odgovore u tijelu (1). Izloženost kože UVB zračenju može rezultirati upalnim procesom koji se manifestira kao eritem i edem. Dugotrajna izloženost ovom zračenju dovodi do kroničnog upalnog stanja koje ima ulogu u inicijaciji i progresiji raka kože (2). S druge strane, stvaranje DNA foto-lezija je posljedica izravnog utjecaja UVB na pirimidinske nukleobaze što rezultira stvaranjem dvaju glavnih razreda bipirimidinskih foto-produkata uključujući ciklobutanske pirimidinske dimere (engl. *cyclobutane pyrimidine dimers*, CPD) i 6,4-fotoprodukte u DNA fibroblasta, keratinocita te koži. CPD su vrlo mutageni jer je popravak spor, a uslijed pogrešaka u popravku, može doći do nastanka mutacija u onkogenima i zloćudne preobrazbe stanica. Osim stvaranja 6,4-pirimidinskog fotoprodukta, UVB inducira i stvaranje purinskih dimera te pirimidinskih foto-adukata koji mogu dovesti do mutacija u epidermalnim stanicama. UVB zračenje također može inducirati oksidacijska oštećenja u staničnoj DNA. Premda je oksidacijski stres specifičniji mehanizam djelovanja UVA zračenja, i UVB zračenje može potaknuti oksidacijske procese koji ostaju aktivni i nakon završetka izloženosti zračenju. Pokazano je da se reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS), pogotovo hidroksilni radikal HO·, stvaraju u UVB-ozračenim keratinocitima (3). Osim navedenih učinaka, UVB

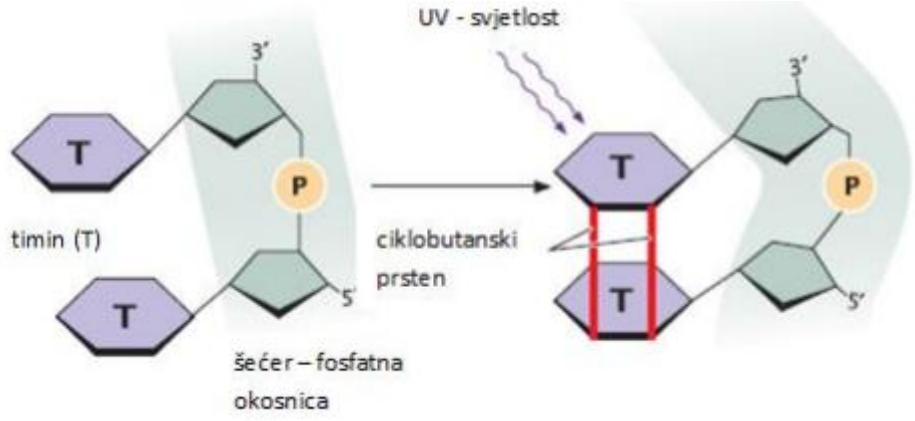
zračenje uzrokuje aktivaciju nekoliko signalnih puteva u stanici, uključujući staničnu proliferaciju, upalu i fotokancerogenezu. Izloženost kože miševa UVB zračenju dovela je do fosforilacije mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) te aktivacije nuklearnog faktora kappa B (NF-κB) koji su uključeni u procese kao što su oksidacijski stres, upala te rak kože (4). UVB zračenje može potaknuti i imunosupresiju što utječe na mnoge stanične funkcije. Primjerice, smanjenjem broja Langerhansovih stanica u epidermisu mijenja njihovu ulogu prezentacije antigena na površini. Nadalje, potiče sintezu fosfolipaze A (1 ili 2) i lizofosfolipaze, enzima koji imaju ulogu u nastanku upale i kontroli staničnog rasta (5).



Slika 1. Biološki utjecaj UV zračenja na stanice.
Preuzeto od: D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci,* 2013.

1.2. Oštećenja DNA kao posljedica djelovanja UVB zračenja

Kao što je spomenuto, ultraljubičaste B zrake se apsorbiraju te uzrokuju niz fotokemijskih reakcija u koži i tkivu uzrokujući pritom brojna oštećenja molekula kao što je DNA. Biološki najveći utjecaj ima stvaranje dimera pirimidinskih baza. Apsorpcijom fotona UVB zračenja u DNA dolazi do povećanja energije elektrona u bazama te do premještanja dvostrukih veza. Na taj način nastaje ciklobutanski prsten između 5. i 6. ugljikovog atoma bilo koje dvije susjedne pirimidinske baze, najčešće dva timina. Takvi produkti nazivaju se ciklobutanski pirimidinski dimeri. Mutacije karakteristične za djelovanje UVB zračenja su tranzicijske mutacije iz citozina u timin na dipirimidinskim sljedovima. Tijekom replikacije, DNA polimeraza pogrešno ubacuje adenin nasuprot oštećenog citozina, te u idućoj fazi adenin kodira za timin. U konačnici dolazi do zamjene oštećenog citozina timinom. Ovako formirani pirimidinski dimeri blokiraju replikaciju DNA i sintezu mRNA. 6,4-fotoprodukti se stvaraju u manjoj mjeri te su oni karakterizirani stabilnim vezama između pozicija 6. i 4. ugljikovog atoma dvaju susjednih pirimidinskih baza te se preferencijalno formiraju na 5'TC i 5'CC sljedovima (6).



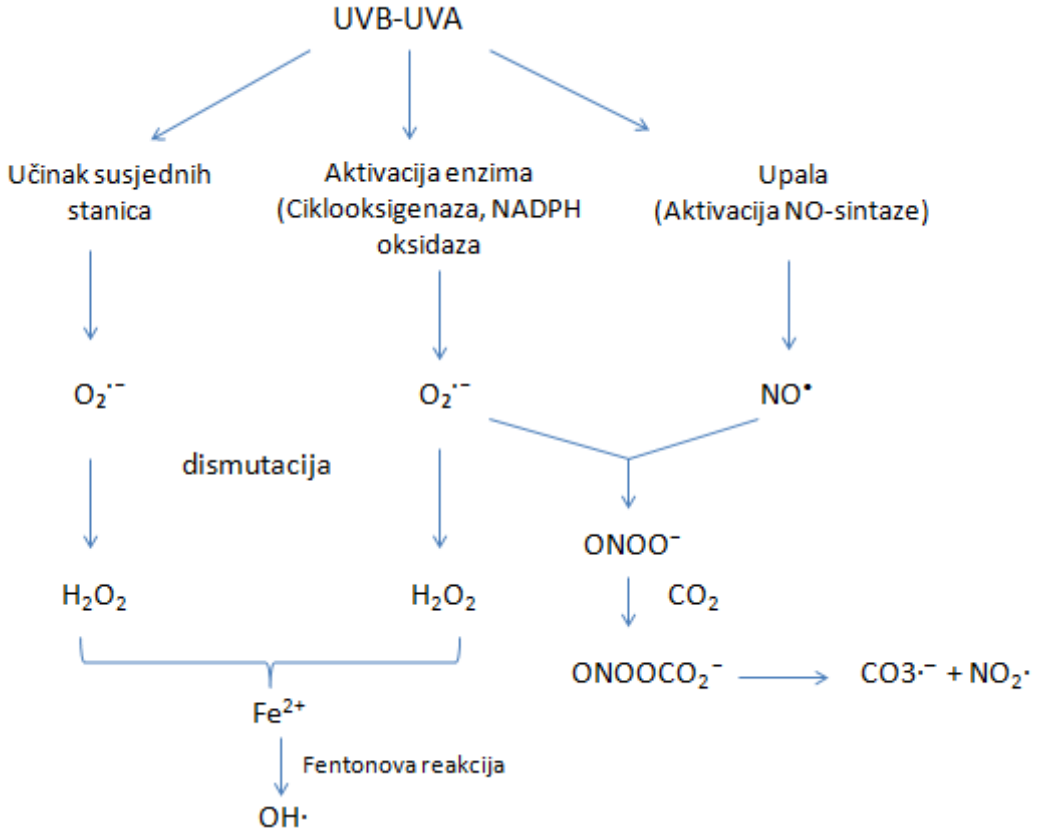
Slika 2. Nastanak ciklobutanskog prstena između dva susjedna timina.
Preuzeto od: Prenković D, Louvar B, Medved D, Razlog A, Tovarović I. Biologija s kemijom u životnim procesima. 2016.

Ultraljubičasto B zračenje uzrokuje i indirektna oštećenja DNA stvaranjem ROS-ova. Oni svojim djelovanjem mogu pokidati lanac DNA. Pod djelovanjem zračenja, zbog velike osjetljivosti veze između baze i šećera, dolazi do pucanja uzvojnice DNA i modifikacije purinskih baza. Mutacije nastaju kada zbog pucanja lanca dođe do promjene redoslijeda baza što u konačnici dovodi do poremećaja u sintezi proteina i nadalje do mogućeg razvoja patoloških stanja (7).

1.3. Reaktivne kisikove vrste (ROS)

Reaktivne kisikove vrste ili slobodni radikali se mogu stvarati endogenim i egzogenim putem. Nastaju kao produkti metaboličkih procesa u ljudskom organizmu, ali i djelovanjem duhanskog dima, zračenja, ksenobiotika i kemikalija. U fiziološkim koncentracijama, ROS-ovi su signalne molekule koje posreduju staničnom rastu, migraciji i diferencijaciji. U povišenim koncentracijama induciraju staničnu smrt, apoptozu i senescenciju. Nakon dugotrajnog izlaganja ovakvim štetnim agensima, može doći do stvaranja lezija u DNA. Kao što je navedeno, UV zračenje je štetan agens koji inducira stvaranje ROS-ova i posljedično modifikacije u putevima povezanim sa staničnim rastom i preživljenjem (8). Reaktivne kisikove vrste su kemijske vrste koje sadrže barem jedan kisikov atom te imaju barem jedan nespareni elektron u orbitali koji je zaslužan za veliku reaktivnost ovakvih molekula. Najpoznatiji ROS-ovi su hidroksilni radikal (OH·) te superoksidni ion (O_2^-). Također postoje i neradikalne kisikove vrste kao što je vodikov peroksid (H_2O_2) (9). Dva najčešća radikala koja utječu na lipide su OH· i hidroperoksil (HO_2·). Hidroksilni radikal je mala, polarna molekula koja je ujedno i najreaktivnija među slobodnim radikalima. Hidroksilni radikali nespecifično napadaju biomolekule udaljene nekoliko nanometara od njihovog mjesta stvaranja te uzrokuju oksidacijska oštećenja stanica. To dovodi do poremećaja u stanicama i može uzrokovati neurodegenerativna oštećenja, kardiovaskularne bolesti i rak. Hidroksilni radikal se stvara Fentonovom

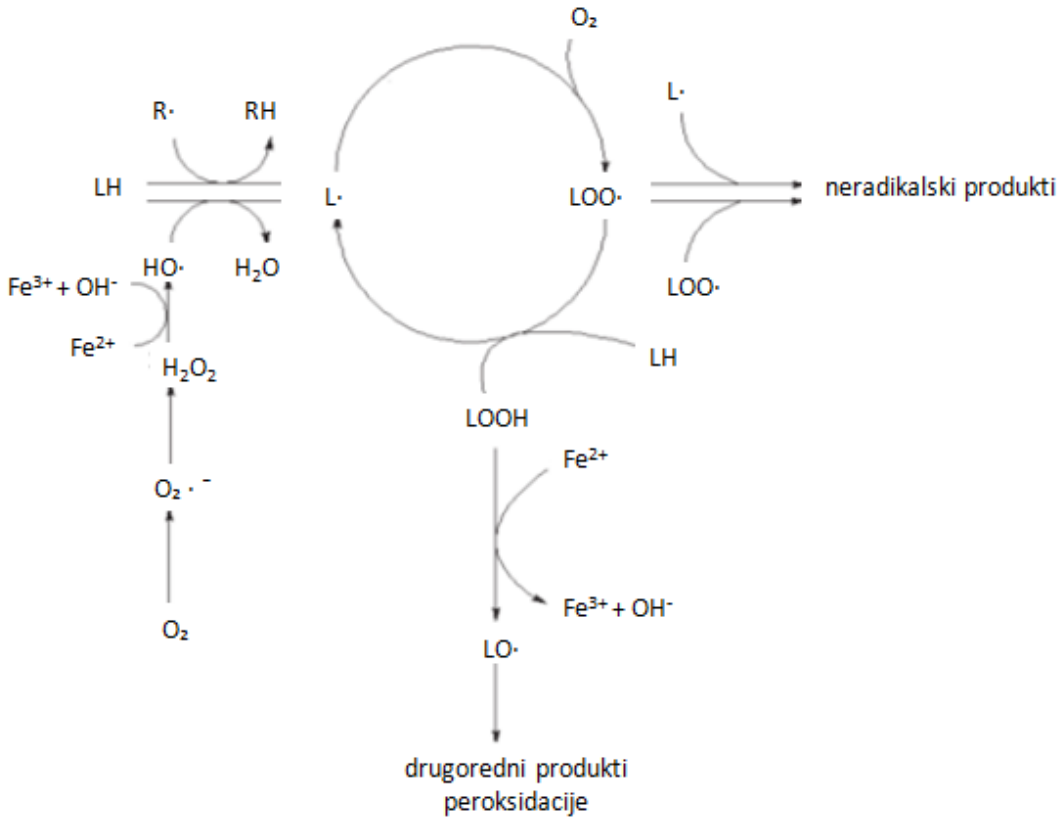
reakcijom gdje Fe^{2+} reagira s vodikovim peroksidom, te Haber–Weissovom reakcijom O_2^- s Fe^{3+}. Hidroperoksil je jak oksidans koji može započeti lančanu reakciju oksidacije polinezasićenih fosfolipida što može dovesti do poremećaja funkcije stanične membrane (10).



Slika 3. Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) djelovanjem UV zračenja. Preuzeto od: Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol,* 2015.

1.4. Lipidna peroksidacija kao posljedica djelovanja ROS

Visoke razine ROS-ova mogu direktno utjecati na lipidne strukture te uzrokovati oštećenja stanica i tkiva. Mitohondrij, peroksisomi i endoplazmatski retikulum smatraju se primarnim izvorima proizvodnje ROS-ova. Kao vanjski izvori prisutne su infekcije patogenima, toksini iz okoliša te UV zračenje. Najčešći ROS-ovi koji uzrokuju oštećenja lipida su $OH\cdot$ i $HO_2\cdot$. Lipidna peroksidacija je proces u kojem oksidansi napadaju lipide koji sadrže dvostruke ugljik-ugljik (C=C) veze. To su najčešće polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs). Reakcija inicijacije uključuje izdvajanje atoma vodika iz metilenske skupine od strane ROS-ova što dovodi do nastanka lipidnog radikala (L•). Reakcijom lipidnog radikala s kisikom nastaje peroksilni radikal (LOO•). Peroksilni radikal zatim može izdvojiti vodikov atom iz neke druge lipidne molekule čime se ponovno stvara L•, koji započinje novu lančanu reakciju, te lipidni hidroperoksid (LOOH). Ova faza se naziva propagacijska faza. U posljednjoj, terminacijskoj fazi, antioksidans (npr. vitamin E) donira atom vodika LOO•. Time nastaje odgovarajući radikal antioksidansa koji reagira sa drugim LOO• stvarajući neradikalne produkte (10).



Slika 4. Proces lipidne peroksidacije.
Preuzeto iz: Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation - Causes and consequences. *Medicina (B Aires),* 2007.

Primarni produkti procesa lipidne peroksidacije su prethodno spomenuti LOOH. Kao sekundarni produkti nastaju brojni aldehidi uključujući malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE). Malondialdehid se smatra najmutagenijim produktom lipidne peroksidacije te ujedno i najpouzdanijim biomarkerom za određivanje razina oksidacijskog stresa u organizmu (10).

Malondialdehid je konačni produkt enzimatske ili neenzimatske dekompozicije arahidonske kiseline i većih polinezasićenih masnih kiselina. U fiziološkim uvjetima nalazi se u obliku enolatnog iona koji ulazi u interakciju s proteinima. Razlog zbog kojeg je MDA mutagen je njegov afinitet prema gvaninu u DNA (11). Pri smanjenju pH, MDA prelazi u beta-hidroksiakrolein pri čemu mu raste reaktivnost. Reakcijom između MDA i slobodne aminokiseline ili proteina nastaju Schiffove baze. Jedan od

produkata metabolizma MDA je acetaldehid koji može proizvesti izrazito imunogene malondialdehid acetaldehid adukte. Malondialdehid acetaldehid adukti mogu uzrokovati ukriženo povezivanje proteina/DNA čime oštećuju funkciju biomolekula te se akumuliraju tijekom procesa starenja i u kroničnim bolestima. Malondialdehid može reagirati i sa nukleozidima što može dovesti do pucanja DNA lanca, mutacija, zaustavljanja staničnog ciklusa i indukcije apoptoze. Također, ima sposobnost modifikacije brojnih proteina kao što su enzimi, prijenosni proteini, proteini citoskeleta te proteina uključenih u antioksidativne procese. Neke od bolesti povezane s povišenom razinom MDA u organizmu su Parkinsonova bolest, rak, dijabetes te kardiovaskularne bolesti (10).

4-hidroksinonenal se smatra najtoksičnijim produktom lipidne peroksidacije jer se proizvodi u velikim količinama te je vrlo reaktivan. Ovaj spoj je produkt peroksidacije ω-6 PUFA-e (linoleinske i arahidonske kiseline). Pri visokim razinama ima sposobnost inhibicije staničnog rasta, modifikacije lipoproteina te poticanja razvoja ateroskleroze. Metabolizam 4-HNE se odvija stvaranjem konjugata s glutationom pomoću glutation transferaza koji prelaze u merkapturne kiseline i u konačnici se izlučuju mokraćom (11).

Lipidna peroksidacija je povezana s patogenim stanjima u organizmu. Kod malih razina lipidne peroksidacije, stanice stimuliraju proces preživljenja kroz obrambene antioksidacijske sustave ili aktivacije signalnih puteva koji potiču ekspresiju antioksidansa kao odgovor na stanični stres. Suprotno tome, u slučajevima kada su razine lipidne peroksidacije visoke, kapacitet oksidacijskog oštećenja nadmašuje mehanizme prilagodbe stanica na stres i dolazi do apoptoze ili nekroze stanica. Ovi procesi mogu dovesti do oštećenja stanica te razvoja patoloških stanja i ubrzanog starenja (10). Lipidna peroksidacija ima veliku ulogu u neurodegenerativnim bolestima. Mozak stvara velike količine ROS-ova kao nus-produkata sinteze ATP-a. Isto tako, membranski fosfolipidi u središnjem živčanom sustavu su bogati polinezasićenim

masnim kiselinama čime postaje okoliš pogodan za započinjanje procesa lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je identificirana kao primarni uzrok feroptoze, odnosne regulirane stanične smrti ovisne o željezu. Erastin i RSL 3 su dvije molekule koje induciraju feroptozu te je pokazano da one svoj letalni učinak provode kroz moduliranje antioksidacijske aktivnosti u stanicama. Alzheimerova bolest je karakterizirana ekstracelularnim nakupljanjem amiloidnih plakova te unutarstaničnim nakupljanjem neurofibrilarnih čvorova. Nakupljanje amiloidnih plakova u staničnim membranama dovodi do stvaranja vodikovog peroksida, lipidnih peroksida i MDA što govori o potencijalnoj ulozi lipidne peroksidacije u progresiji Alzheimerove bolesti (12). De Souza Bastos i suradnici (13) osmislili su istraživanje u kojem se ispitivala povezanost lipidne peroksidacije i dijabetesa tipa 2. Pokazano je da je povišena lipidna peroksidacija povezana sa sistemskim upalama većeg intenziteta kod pacijenata s dijabetesom tipa 2 te da povećava rizik i učestalost komplikacija. Još jedna bolest povezana sa procesom lipidne peroksidacije je ateroskleroza. Ona je karakterizirana formiranjem zadebljanja u arterijskoj stijenci što dovodi do smanjenja protoka krvi. Aldehidi kao što su MDA i 4-HNE su produkti peroksidacije koji imaju toksično djelovanje te mogu potaknuti razvoj ateroskleroze. Oksidacijski stres te povećana razina oksidiranog glutationa su čimbenici koji utječu na stvaranje zadebljanja na stijenci arterije. Samim time povećanje procesa lipidne peroksidacije povećava rizik za razvoj ateroskleroze (14). Oba ova stanja, dijabetes i ateroskleroza, povezani su s hiperglikemijom, odnosno povećanom razinom glukoze u krvi. Hiperglikemija inducira stvaranje ROS-ova te prekomjeran utrošak endogenih antioksidansa čime se prekomjerno potiče proces lipidne peroksidacije (15).

1.5. Mehanizmi popravka u ljudskom tijelu

Procesi koje uzrokuje štetno UVB zračenje doprinose procesu starenja u ljudskom tijelu. Organizam ima nekoliko mehanizama popravka oštećenja uzrokovanih UVB zračenjem kao i ostalim štetnim agensima. Mehanizmi popravka uključuju zaštitu i popravak DNA, regulaciju upalnih odgovora u tijelu i antioksidacijsku zaštitu. Unatoč tome, tijekom vremena ovi se mehanizmi mogu narušiti, što rezultira nemogućnošću popravka ili netočnim popravkom oštećenja dovodeći do zloćudne preobrazbe stanica. Proces starenja kože uzrokovan UV zračenjem naziva se fotostarenje. Ono se, za razliku od kronološkog starenja, odvija brzo i izravno je povezano s izloženosti suncu. Koža ima „mrežu" mehanizama za zaštitu od staničnih oštećenja i održavanje ravnoteže, no kod učestalog i dugotrajnog izlaganja UVB zračenja oni sami po sebi nisu dovoljni (16). Upravo ono što brojne studije istražuju je sposobnost antioksidacijske zaštite jer antioksidansi imaju glavnu ulogu u zaštiti stanica u tkivima, uključujući kožu.

1.6. Glutation (GSH) kao endogeni antioksidans

Glutation je jedan od najvažnijih antioksidansa u eukariotskim stanicama. Po svom sastavu on je tripeptid koji sadrži aminokiseline cistein, glicin i glutaminsku kiselinu. Njegova sinteza odvija se u citoplazmi pomoću dva enzima: γ-glutamilcistein sintetaze i glutation sintetaze. Uloga u organizmu mu je inaktivacija molekula koje uzrokuju oksidacijski stres na način da svoj atom vodika donira nezasićenim spojevima kao što su oksidansi. Nakon te reakcije, glutation prelazi u reducirani oblik te kao takav štiti stanice od oštećenja uzrokovanog oksidacijskim stresom i omogućava održavanje ravnoteže u organizmu. Osim antioksidacijskog učinka, GSH sudjeluje u brojnim staničnim procesima kao što su

detoksifikacija od stranih tvari u organizmu, pohranjivanje i prijenos cisteina, stanična proliferacija te regulacija apoptoze (17).

Promjene u razini GSH mogu ukazati na promjene u stanici, kao što je nastanak oksidacijskog stresa. U normalnim uvjetima, razine GSH u plazmi su mikromolarne. Pokazano je da smanjenje koncentracije GSH može biti povezano sa starenjem i patogenezom mnogih bolesti među kojima su reumatoidni artritis, mišićna distrofija, amiotrofična lateralna skleroza, AIDS, Alzheimerova bolest te genetički poremećaj Wernerov sindrom. Mjerenjem reduciranog, kao i oksidiranog oblika GSH može se predvidjeti rizik za bolesti te nastanak određenih oštećenja u tijelu uzrokovanih prekomjernim nastankom ROS-ova. Pokazano je da kod HIV infekcije u svim stadijima bolesti dolazi do porasta oksidacijskog stresa, dok su GSH razine smanjene u plazmi, eritrocitima i T-stanicama. Primjer je i smanjenje razine GSH u eritrocitima i trombocitima ljudi koji imaju dijabetes (18). Zabilježeno je i smanjenje razine GSH kod neurodegenerativnih bolesti kao što je Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease,* PD). Jedan od uzroka smatra se pad koncentracije GSH te povećanje oksidacijskog stresa u organizmu zbog nedostatne borbe GSH protiv ROS-ova. Smanjenje GSH smatra se prvim indikatorom oksidacijskog stresa kod progresije PD te deplecija GSH povećava osjetljivost neurona na oštećenja. Isto tako, razine i aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) i glutation-S-transferaze su promijenjene kod ljudi koji imaju PD. Mutacije u enzimu GPx-4 povećavaju osjetljivost dopaminergičnih neurona kod oboljelih (19).

1.7. Prirodni spojevi kao zaštita od djelovanja UV zračenja

Usporedno s istraživanjima biološke podloge zloćudne preobrazbe stanica, istražuju se i prirodni i sintetski spojevi koji mogu pružiti zaštitu od djelovanja štetnog UVB zračenja. Njihove prednosti su niska toksičnost i dobra učinkovitost. Pokazano je da antioksidansi, bilo endogeni ili egzogeni, kao što su vitamin C, karotenoidi te GPx, imaju ulogu u

staničnoj zaštiti. U istraživanju koje su osmislili Wood i suradnici (16) pripremljena je fitonutritivna smjesa, koja potpomaže već postojećim mehanizmima popravka kod čovjeka, sa ciljem proučavanja može li takva mješavina zaštititi kožu od djelovanja UV zračenja. Pokazano je da su sastojci mješavine, uključujući resveratrol, kvercetin, eikozapentansku kiselinu itd., pozitivno modulirali antioksidacijsku aktivnost, stanični odgovor na stres, metabolizam te ravnotežu upalnih procesa. Dobar primjer su i polifenoli iz čaja koji su u *in vitro* i *in vivo* studijama pokazali doprinose u zaštiti od djelovanja UVB zračenja. Uspješno su potaknuli popravak DNA, smanjili upalne procese i oksidacijski stres, te inhibirali signalne puteve inducirane UVB zračenjem, a koji doprinose zloćudnoj preobrazbi i upalama (4).

1.8. Med

Med je potpuno prirodan i nutritivno bogat proizvod pčela medarica (*Apis mellifera*) (20). Sastoji se većinom od šećera, dok se u manjem udjelu u medu nalaze i enzimi, aminokiseline, organske kiseline, vitamini, minerali te aromatski spojevi. Med je po sastavu bogat flavonoidima i fenolnim kiselinama te se upravo radi toga smatra prirodnim antioksidansom (21). O njegovim povoljnim učincima po zdravlje govori i to da su prije 5500 godina ljudi koristili med, što zbog nutritivnih vrijednosti, to zbog medicinskih svojstava, odnosno protuupalnog, antibakterijskog, antidijabetskog učinka te protektivnog učinka na kardiovaskularni i živčani sustav (20). Osim polifenola, med sadrži i esencijalne minerale među kojima su najzastupljeniji kalij, kalcij, bakar, željezo, magnezij, cink i natrij. Također sadrži i vitamine uključujući vitamin C, tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B5) itd (22). Četiri najvažnija enzima u medu su invertaza, amilaza, glukoza-oksidaza, katalaza i kisela fosfataza. Ovi enzimi služe kao pokazatelji kvalitete meda te načina pohrane i procesuiranja (23).

Zbog svojih antibakerijskih, protuupalnih te antioksidacijskih svojstava, med je našao brojne primjene u nutritivne i zdravstvene svrhe. Pokazano je da uzimanje meda dovodi do modificiranja pH zubnog plaka, smanjuje broj bakterija te inhibira njihov rast. Kao takav, med se koristi za spriječavanje stvaranja karijesa i gingivitisa (24). Primjer je manuka med koji ima antimikrobno djelovanje te je pokazao pozitivan učinak kod sprječavanja razvoja karijesa u odnosu na voćni sok koji je doveo do zubne erozije (25).

Kod pacijenata s dijabetesom često dolazi do komplikacija te do toksične nefropatije i zatajenja bubrega. Pokazano je da med ublažava oksidacijski stres u bubregu. Primjena meda kod štakora s dijabetesom dovela je do povećanja ukupne antioksidacijske aktivnosti, kao i do povećanja aktivnosti enzima glutation S-transferaze, glutation reduktaze, katalaze i GPx. Smanjen je proces lipidne peroksidacije te je došlo do poboljšanja u morfologiji bubrega (26). Med se koristi i u kozmetičke svrhe, primjerice za tretiranje rana. Zbog svog antibakterijskog djelovanja, med čisti ranu, stimulira regeneraciju tkiva te smanjuje upalu. Pokazano je da ubrzava cijeljenje i smanjuje nastajanje ožiljaka (27).

Med je dobra alternativa šećerima i umjetnim zaslađivačima koji mogu imati štetan učinak po zdravlje. U tu svrhu proizvedeni su slatkiši koji su sadržavali med umjesto šećera i umjetnih dodataka prehrani (28). Time se dobiva zdravija verzija slatkiša, a zbog niskog glikemijskog indeksa med bi mogao zamijeniti brojne zaslađivače općenito u prehrani i samim time utjecati na zdravlje smanjenjem razine glukoze u krvi.

1.8.1. Svojstva meda

1.8.1.1. Glikemijski indeks

S obzirom da se med većinom sastoji od ugljikohidrata, često se određuje glikemijski indeks (GI) kako bi se spoznalo kako određena hrana, pa tako i med, utječe na razinu glukoze u krvi. Ugljikohidrati s visokim GI-om induciraju velik rast glukoze u krvi, dok oni s niskim GI-om induciraju mali rast glukoze u krvi. Tako primjerice med vrste *Eucalyptus melliodora* ima niski glikemijski indeks koji iznosi 35±4, dok u prosjeku GI meda iznosi oko 55. Smatra se da GI ovisi o koncentraciji fruktoze u određenoj vrsti meda - što je veća koncentracija fruktoze, manji je GI. Sudeći po tome, vrste meda koje imaju niski GI bi mogle biti dobra alternativa zaslađivačima s visokim GI-om (25).

1.8.1.2. Polifenoli u medu

Polifenoli su važne skupine koje se u velikom udjelu nalaze u medu te pridonose njegovom izgledu i funkcionalnim svojstvima. Skupine na koje se dijele polifenoli u medu su flavonoidi, fenolne kiseline te derivati fenolne kiseline. Ukupan sadržaj tih polifenola varira od 56 do 500 mg/kg meda te su upravo oni zaslužni za antioksidacijski učinak meda. Antioksidacijska aktivnost meda ovisi o botaničkom podrijetlu meda te značajno varira između različitih vrsta ovisno o udjelu pojedinih komponenti (25). Najčešće fenolne sastavnice identificirane u različitim vrstama meda su katehini, apigenini, krizin, galangin, kaempferol i kvercetin. Polifenoli imaju sposobnost hvatanja ROS-ova te formiraju stabilnije i manje toksične molekule. S obzirom da polifenoli imaju hidroksilne skupine, oni stabiliziraju slobodne radikale na način da doniraju vodik. Stupanj antioksidacijske aktivnosti izravno je povezan sa brojem hidroksilnih skupina (22).

Ispitivanjem meda različitih vrsta iz našeg podneblja dobiveni su podaci za ukupan sadržaj fenolnih komponenti u svakom od uzoraka. Smatra se da je med od planike najbogatiji fenolnim komponentama. U studiji Tariba Lovaković i sur. (38) izmjeren je ukupan fenolni sadržaj od 415 mgGAE/kg meda od planike. Ujedno, med od planike sadrži visoku koncentraciju homogentizinske kiseline. Ta kiselina ima sposobnost hvatanja ROS-ova i pruža zaštitu kod oštećenja fibroblasta uzrokovanih s H_2O_2. Nadalje, Flanjak i sur. (29) su uspoređujući med od bagrema, lipe, kadulje, kestena te medun, utvrdili da je najveći sadržaj fenolnih komponenti prisutan u medunu s 318,6 mg GAE/kg meda, a nakon njega slijedi med od kestena s 162,1 mg GAE/kg meda. U drugom istraživanju ispitivale su se karakteristike meda od lavande, timijana, kestena i ružmarina. Najveći sadržaj fenolnih komponenti imao je med od timijana s 121,38 mgGAE/kg meda, a nakon njega je slijedio med od kestena sa 113,69 mgGAE/kg meda (30). Ovi podaci ukazuju na to da se med od kestena nalazi visoko na ljestvici medova s visokim udjelom fenolnih spojeva u svom sastavu.

1.8.1.3. Antimutagena i protutumorska aktivnost meda

Pokazano je kako med aktivira imunološki sustav te konzumacija meda povoljno utječe na prevenciju metastaziranja raka induciranog kod miševa (31). Pokazano je da med od akacije ima antiproliferativni učinak na ljudske i mišje stanice melanoma. Smatra se da taj učinak dolazi od krizina koji je u velikoj mjeri zastupljen u tom medu te da bi on mogao biti potencijalni kandidat za daljnje istraživanje u prevenciji i liječenju raka. Pichichero i suradnici (32) testirali su utjecaj meda na humanim i mišjim staničnim linijama melanoma u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Rezultati su u oba slučaja pokazali da je, zbog velike količine krizina u medu, došlo do antiproliferativnog učinka, pro-apoptotičkog učinka ovisno o dozi te u konačnici smanjenja volumena tumora.

1.9. Med od kestena

Pitomi kesten (*Castanea sativa L.*) je stablo iz porodice bukvi koje se intenzivno uzgaja na Mediteranu te u središnjoj Europi. Med od kestena je blago gorkog okusa i često ga proizvode pčelari u regijama na obali Crnog mora te se koristi u alternativnoj medicini jer doprinosi smanjenju patoloških stanja uzrokovanih ROS-ovima. Kvaliteta meda od kestena je povezana s razinom njegove bioaktivnosti. Utvrđeno je da antioksidacijska aktivnost i aktivnost enzima u medu ovisi o geološkim, geokemijskim, sezonskim i klimatskim parametrima. Med od kestena sadrži hlapivu komponentu 3-aminoacetofenon koji služi kao marker za identifikaciju ove vrste meda. Što se sastava meda od kestena tiče, prethodno je spomenuto da se po sadržaju fenola on nalazi visoko na ljestvici. Kod meda od kestena podrijetlom iz Turske, pronađene su fenolne komponente kvercetin i apigenin te galna, ferulična, *p*-kumarinska, kafeinska, vanilinska i protokatehinska kiselina (33). Med od kestena pokazao je visoku aktivnost enzima invertaze, amilaze, glukoza-oksidaze, katalaze i kisele fosfataze te mu je određen visok sadržaj proteina i aminokiseline prolina (23). Po mineralnom sastavu pokazao se bogat kalcijem, natrijem, kalijem i manganom (34).

U medu od kestena pronađena je kinurenska kiselina (engl. *kynurenic acid*, KYNA) u visokim koncentracijama. Kinurenska kiselina je metabolit triptofana te ima brojne pozitivne učinke kao što su protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Turski i suradnici (35) izmjerili su koncentracije kinurenske kiseline u nekoliko medova od kestena te je ona varirala od 305 μg/g do 601 μg/g što je bilo značajno više u odnosu na ostale analizirane vrste medova kod kojih koncentracija KYNA-e nije bila veća od 20 μg/g. Kako KYNA pokazuje brojne pozitivne učinke po zdravlje te se listovi kestena u Portugalu koriste protiv kašlja, prehlade i visokog kolesterola u krvi, smatra se da bi med od kestena mogao isto tako imati povoljne učinke u ljudskom organizmu (35). U studiji koju su proveli Lugo-Huitrón i suradnici (36) na uzorcima tkiva mozga štakora te *in vivo,*

KYNA (100, 150 i 500 μM) je pokazala veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala kao što su OH· i O_2^- od endogenog antioksidansa GSH te je spriječila formiranje ROS-ova kao i proces lipidne peroksidacije smanjujući time oksidacijska oštećenja.

Osim antioksidacijskog djelovanja, razmatrana su i druga svojstva meda od kestena koja bi mogla imati učinak na patološka stanja. Med od kestena pokazao se kao inhibitor nekoliko enzima koji imaju glavnu ulogu u patofiziologiji određenih bolesti. Među njima su hijaluronidaza koja je povezana s bolestima kao što je rak, a inhibicija tog enzima djeluje protuupalno, antitumorski, antireumatoidno te antimikrobno. Med od kestena djeluje inhibitorno i na ksantin oksidazu koja je povezana s hepatitisom, kancerogenezom, starenjem i gihtom, te ureazu koja ima ulogu u gastritisu i čiru na želucu. U sva tri slučaja med od kestena je, ovisno o koncentraciji, pokazao inhibitorni učinak i samim time se pokazao povoljnim po zdravlje (37).

U okviru projekta "Usporedba nutritivnih i toksikoloških značajki ekološkog i konvencionalnog meda" (voditeljica dr. sc. Maja Lazarus, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb), provedeno je ispitivanje antioksidacijskih svojstava nekoliko vrsta medova podrijetlom iz Hrvatske među kojima su bili uzorci meda od kestena, bagrema, kadulje i vrijeska. Radi se o neobjavljenim rezultatima koji su pokazali kako je med od kestena (uzorak podrijetlom iz Hrastovice) pokazao najveći udio fenolnih komponenti te najbolji antioksidacijski kapacitet koristeći FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) metode u odnosu na ostale testirane vrste meda. Ukupan sadržaj fenola u uzorku meda od kestena podrijetlom iz Hrastovice iznosio je 267,9 mg galne kiseline (GAE)/kg meda, FRAP vrijednost je iznosila 429,3 μM Fe u 10% otopini meda, a DPPH vrijednost 0,798 mmolTE/kg meda. Metodom ICP-MS (induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom) utvrđeno je da testirani med od kestena sadrži visoke koncentracije Na, te visoke koncentracije Cd i Co. Također, u testiranom medu od kestena pronađeni su tragovi atrazina (sredstvo protiv varoe), no

u koncentracijama ispod one maksimalno dozvoljene. Nalaz kvalitativne melisopalinološke analize (Laboratorij za analizu pčelinjih proizvoda i biologiju pčela, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) pokazao je da se testirani uzorak meda razvrstava u kestenov med, čime udovoljava odredbama Pravilnika o kakvoći uniflornog meda (N.N. br. 122/09), a nalaz fizikalno-kemijske analize (Laboratorij za analitičku kemiju i rezidue, Veterinarski zavod Križevci, Hrvatski veterinarski institut) pokazao je da testirani uzorak meda prema analiziranim parametrima odgovara Pravilniku o medu NN 53/15 (Direktiva vijeća 2001/110/EZ od 20.12.2001. o medu). Na osnovi rezultata provedenih analiza med od kestena podrijetlom iz Hrastovice odabran je za istraživanja u ovom radu.

2. CILJ RADA

S obzirom da UVB zračenje izaziva niz štetnih učinaka u stanicama kao što su izravna oštećenja DNA, oksidacijski stres, poremećaji signalnih puteva, upalni odgovor te fotokancerogenezu, sve je veći broj istraživanja usmjeren na proučavanje zaštitnog učinka prirodnih spojeva. Jedan takav proizvod je i med koji se konzumira posvuda u svijetu te je poznato da je bogat polifenolima koji imaju antioksidacijska svojstva te samim time povoljan učinak na ljudsko zdravlje. Stoga je glavni cilj ovog rada otkriti može li med iz ekološkog uzgoja povećati stopu preživljenja i sniziti razinu primarnih oštećenja DNA i razinu oksidacijskog stresa nakon ozračivanja krvi odnosno limfocita.

Istraživanje će se provesti na limfocitima i plazmi iz periferne krvi zdrave muške osobe na 2 načina. Dio uzoraka bit će izloženo pred-tretmanu s medom nakon čega slijedi ozračivanje UVB zračenjem kako bi se istražilo može li konzumacija meda prije samog izlaganja UVB zračenju imati zaštitni učinak te prevenirati oštećenja nastala djelovanjem štetnog agensa. Drugi dio uzoraka će biti izložen UVB zračenju i nakon toga će uslijediti inkubacija s medom kako bi se spoznalo mogu li se smanjiti oštećenja uzrokovana štetnim zračenjem. Učinci meda ispitat će se u koncentracijama koje odgovaraju dozama dnevno prihvatljivog unosa meda prehranom: (I) jedna žlica (25), (II) prosječna dnevna konzumacija meda hrvatske populacije koja prema podacima Hrvatske agencije za hranu iz 2015. godine iznosi 15,1 g/dan (38), (III) dnevne doze od 50-80 g obzirom da se mnogi povoljni učinci konzumiranja meda postižu tek pri tim dozama (25).

Kako bi se dobio odgovor o djelotvornosti meda i protektivnom učinku, procijenit će se preživljenje limfocita i razina primarnih oštećenja limfocitne DNA te odrediti razine slobodnih radikala i endogenog antioksidansa glutationa te stupanj lipidne peroksidacije u uzorcima izdvojene plazme.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 1,1,3,3-tetrametoksipropan 3,035 mM, Sigma-Aldrich
- Butilhidroksitoluen (BHT), 0,2% (v/v), Sigma-Aldrich
- Fosfatna kiselina (H_3PO_4), 1% (v/v), Kemika
- Tiobarbiturna kiselina (TBA), 0,6% (w/v), Sigma-Aldrich
- 2,7- diklorofluorscein diacetat (DCFDA) 10 mM, Sigma-Aldrich
- Monoklorbiman 5 mM, Sigma-Aldrich
- Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS)
- Med od kestena, OPG Pčelarstvo Miroslav Antolčić (pčelinjak na lokaciji Hrastovica (Petrinja), Hrvatska, vrcan 2018. godine)
- Fruktoza
- Glukoza
- Maltoza
- Sukroza
- Etidij bromid
- Akridin narančasta boja
- Agaroza normalnog tališta (NMP), 0,6%
- Agaroza niskog tališta (LMP), 0,5%
- Pufer za lizu, pH 10
- Pufer za denaturaciju, pH 13
- Neutralizacijski pufer Tris-HCl 0,4 M, pH 7.5
- Vodikov peroksid (H_2O_2) 25 µM, Kemika

3.1.2. Instrumenti i oprema

- Analitička vaga
- Uvitec Crosslinker CL-E508M (Cambridge, Velika Britanija)
- Biofuge centrifuga (Heraeus instruments)
- Fluorescentni mikroskop, Olympus
- Epifluorescencijski mikroskop, AX 70; Olympus
- UV-Vis spektrofotometar, Shimadzu
- Čitač mikrotitarskih pločica, TECAN
- Termostatirana kupelj

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka limfocita i plazme

Određivanje antioksidacijskog i citoprotektivnog učinka meda od kestena nakon ozračivanja UVB zračenjem provedeno je *in vitro*, na limfocitima i plazmi periferne krvi zdrave muške osobe. Osoba je bila upoznata sa detaljima istraživanja te je dala informirani pristanak na dobrovoljno sudjelovanje. Prikupljanje osobnih podataka i uzoraka venske krvi ispitanika provedeni su u skladu s odobrenjem Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Klasa: 01-18/20-02-2/1; Ur. Br.: 100-21/20-16). U heparizirane spremnike (BD vacutainer, BectonDickinson, SAD) izvađeno je ukupno 30 mL krvi. Izolirani su limfociti pomoću reagensa Histopaque®-1077 sukladno uputama proizvođača. Ostatak pune krvi je centrifugiran na 4400 rpm/10 min te je odvojena plazma koja je spremljena na -20 °C do analize markera oksidacijskog stresa.

3.2.2. Priprema otopina meda od kestena i umjetnog meda

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišten je uzorak meda od kestena dobiven iz OPG Pčelarstva Miroslav Antolčić (pčelinjak na lokaciji Hrastovica (Petrinja), Hrvatska). Med je vrcan 2018. godine, a 2020. godine provedena je analiza fizikalno-kemijskih svojstava i peludna analiza. Med je čuvan na sobnoj temperaturi u mraku.

Izračun koncentracija meda od kestena:

(I) Od danog uzorka, u plastičnu („Falcon") tubicu od 50 mL, uz pomoć analitičke vage odredila se odvaga 1 žlice („tablespoon") meda. Izračunata koncentracija za prosječnu odraslu osobu iznosila je 0,234 mg/mL.

(II) Izračunata koncentracija koja odgovara dnevnoj konzumaciji meda hrvatske populacije (15,1 g/dan prema podacima Hrvatske agencije za hranu iz 2015. godine) za prosječnu odraslu osobu iznosila je 0,2157 mg/mL.

(III) Izračunata koncentracija koja odgovara dozi meda odabranoj prema podacima iz literature (70 g/dan prema Bogdanov i sur., 2008.) za prosječnu odraslu osobu iznosila je 1 mg/mL.

Obzirom da koncentracija meda izračunata prema dozi dnevno prihvatljivog unosa meda prehranom u vidu unosa jedne žlice odgovara koncentraciji meda izračunatoj prema dnevnoj konzumaciji meda hrvatske populacije u iznosu 15,1 g/dan, odabrane koncentracije meda od kestena za istraživanje bile su:

M1 = 0,2157 mg/mL - koncentracija meda koja odgovara dnevnoj konzumaciji meda hrvatske populacije (15,1 g/dan prema podacima Hrvatske agencije za hranu iz 2015. godine)

M2 = 1 mg/mL - koncentracija meda koja odgovara dozi meda odabranoj prema podacima iz literature (70 g/dan prema Bogdanov i sur., 2008)

M3 = 10 mg/mL – koncentracija meda koja odgovara deseterostruko višoj koncentraciji meda od koncentracije izračunate prema podacima iz literature.

Priprema otopina meda od kestena:

Od danog uzorka, u plastičnu („Falcon“) tubicu 15 mL, uz pomoć analitičke vage odvagalo se 246,9 mg meda od kestena. Pripremljena je ishodišna otopina koncentracije 200 mg/mL u destiliranoj vodi miješanjem na električnoj miješalici do postizanja homogenosti. Radne otopine meda od kestena ukupnog volumena 500 µL pripremljene su razrjeđivanjem ishodišne otopine u destiliranoj vodi.

Priprema otopina umjetnog meda:

Umjetni med u sastavu 40% fruktoza, 30% glukoza, 8% maltoza i 2% sukroza korišten je kako bi se utvrdilo utječu li glavne šećerne komponente meda na provedene analize. Obzirom da je dnevna doza umjetnog meda pandan dnevnoj dozi meda, ispitali smo učinak umjetnog meda u koncentraciji 0,2157 mg/mL.

U plastičnu („Eppendorf“) tubicu od 2 mL, uz pomoć analitičke vage, odvagano je 200 mg fruktoze, 150 mg glukoze, 40 mg maltoze i 10 mg sukroze. Dodatkom 500 µL destilirane vode i miješanjem na električnoj miješalici pripremljena je homogena otopina umjetnog meda. Za potrebe pokusa pripremljena je radna otopina koncentracije 4,314 mg/mL na način da je u plastičnu („Eppendorf“) tubicu 2 mL, uz pomoć analitičke vage, odvagano 2,157 mg pripremljenog umjetnog meda i dodano 500 µL destilirane vode.

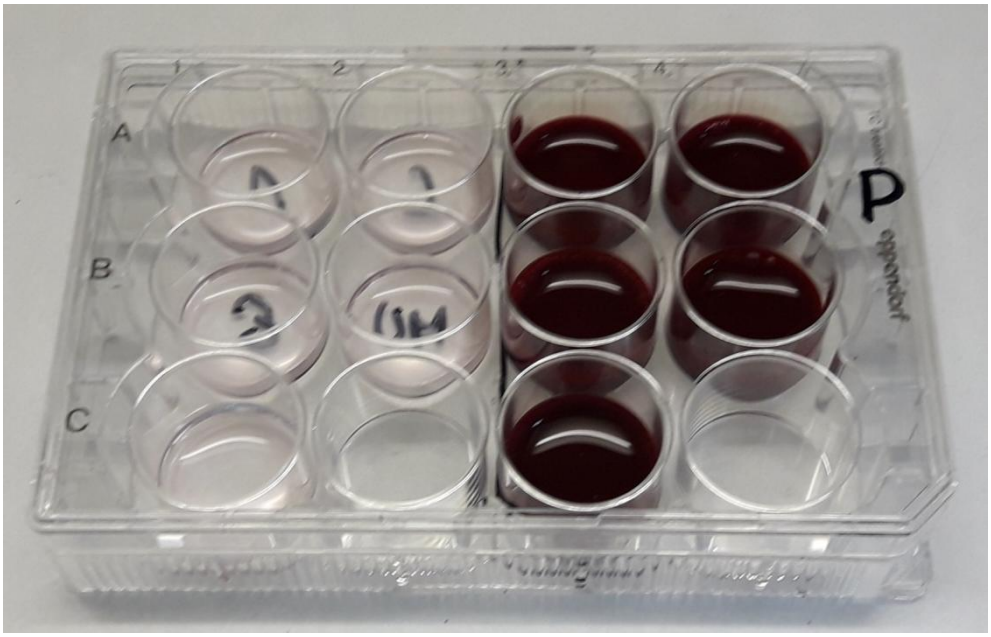
3.2.3. Tretmani limfocita i pune krvi

Provedena su dva modela izlaganja stanica i pune krvi:

(I) pred-tretman medom u trajanju od 2 h, nakon kojega je slijedilo ozračivanje UVB zračenjem i dodatnih 1 h inkubacije stanica/krvi na 37 °C

(II) tretman koji je uključivao ozračivanje UVB zračenjem i zatim inkubaciju stanica/krvi s medom u trajanju od 2 h na 37 °C.

Pripremljene su dvije mikrotitracijske pločice s 12 jažica, jedna za pred-tretman i druga za tretman.



Slika 5. Mikrotitracijska pločica podijeljena u dva dijela za pred-tretman s medom od kestena i umjetnim medom. U prvih 6 jažica s lijeva na desno nalazi se suspenzija limfocita, a u preostalih 6 puna krv. U 4 jažice dodane su radne otopine meda od kestena (oznake 1, 2 i 3) i radna otopina umjetnog meda (oznaka UM). Jedna je jažica sadržavala suspenziju limfocita odnosno krv izloženu UVB zračenju.

Svaka mikrotitracijska pločica bila je podijeljena na dva dijela: u prvih 6 jažica odpipetirano je 475 µL suspenzije limfocita te je dodano 25 µL radne otopine meda od kestena odnosno umjetnog meda, a u preostalih 6 jažica odpipetirano je 1425 µL pune krvi te je dodano 75 µL radne otopine meda od kestena odnosno umjetnog meda. Ukupni volumen u jažicama

iznosio je 500 µL limfocita i 1500 µL pune krvi te je tome prilagođen protokol za odgovarajuće negativne kontrole, tj. 500 µL limfocita i 1500 µL pune krvi odpipetirano je u plastične („Eppendorf") tubice od 2 mL i podvrgnuto istom režimu inkubacije.

Eksperimentalne skupine prema ispitivanim agensima:

1) negativna kontrola (NK) - netretirani limfociti i krv
2) limfociti i krv izloženi UVB zračenju od 2 kJ/m^2 (doza zračenja koja odgovara medijalnoj eritemalnoj dozi, tj. razini UVB koja izaziva crvenilo kože) (39) pomoću uređaja Uvitec Crosslinker CL-E508M (Cambridge, Velika Britanija) (UVB)
3) limfociti i krv izloženi UVB zračenju i inkubirani medom od kestena koncentracije 0,2157 mg/mL (UVB + M1)
4) limfociti i krv izloženi UVB zračenju i inkubirani medom od kestena koncentracije 1 mg/mL (UVB + M2)
5) limfociti i krv izloženi UVB zračenju i inkubirani medom od kestena koncentracije 10 mg/mL (UVB + M3)
6) limfociti i krv izloženi UVB zračenju i inkubirani umjetnim medom (UVB + UM).



Slika 6. Suspenzija limfocita i puna krv izloženi UVB zračenju od 2 kJ/m^2 pomoću uređaja Uvitec Crosslinker CL-E508M (Cambridge, Velika Britanija).

3.2.4. Test preživljenja limfocita

Za mjerenje citotoksičnih učinaka ispitivanih agensa korišten je test preživljenja s kombinacijom fluorescencijskih boja etidij-bromida i akridin narančaste boje. Etidij-bromid fluorescira samo kada je vezan za DNA, stoga razina fluorescencije označava razinu unutarstanične akumulacije (40). Akridin narančasta boja se veže za nukleinske kiseline te omogućava detekciju RNA i DNA kao pokazatelje vijabilnosti stanica nakon izloženosti određenim štetnim agensima (41). Za sam pokus suspenzija tretiranih limfocita (100 µL) pomiješana je s 10 µL etidij bromida (100 µg/mL) i 10 µL akridin oranža (100 µg/mL). Kao negativna kontrola poslužili su netretirani limfociti. Analiza je provedena pomoću fluorescentnog mikroskopa (Olympus, Japan) te je za svaki uzorak pregledano 300 stanica. Nakon pobuđivanja s UV svjetlom, žive stanice fluoresciraju zeleno jer ne propuštaju ulazak boje u citoplazmu. Stanice u ranoj apoptozi fluoresciraju zeleno, dok u kasnijim fazama apoptoze fragmenti jezgre poprimaju narančasto-crvenu boju. Mrtve stanice fluoresciraju crveno zbog obojenja DNA.

3.2.5. Komet-test u alkalnim uvjetima

Komet-test u alkalnim uvjetima ili metoda mikroelektroforeze pojedinačnih stanica u agaroznom gelu koristi se procjenu oštećenja molekule DNA (jednolančanih i dvolančanih lomova) na staničnoj razini. Isto tako, omogućuje praćenje popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrozi. Zasniva se na tome da pod utjecajem električnog polja, oštećena i fragmentirana DNA migrira iz nukleoida (poznat kao glava kometa) te formira obrise repa u agaroznom gelu. Stupanj oštećenja DNA može se procijeniti mjerenjem kometa dobivenih nakon elektroforeze, primjenom sustava epifluorescencijskog mikroskopa

koji je pomoću kamere povezan s računalom. Stupanj oštećenja DNA najčešće se procjenjuje upotrebom posebnih računalnih programa koji istovremeno mjere niz parametara kometa, od kojih je najvažniji parametar intenzitet repa. On upućuje na postotak fragmentirane DNA u repu kometa te je linearno povezan s učestalošću lomova (42, 43).

Kako bi se pripremio mikrogel agaroze za izradu preparata za komet-test, najprije su pripremljene svježe otopine 0,6 %-tne agaroze normalnog tališta (NMP), te 0,5 %-tne agaroze niskog tališta (LMP). Mikropipetom je na brušeno predmetno stakalce nakapano 300 µL 0,6 %-tne NMP agaroze, koja je zatim pokrivena pokrovnicom i ostavljena na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije i skidanja pokrovnica, stavljen je novi sloj od 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze pomiješane sa 5 µL uzorka, tj. suspenzije tretiranih limfocita. Stakalce je ponovo ostavljeno 10 minuta na ledu te je nakon polimerizacije sloj prekriven sa 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze i ponovno ostavljen na ledu dodatnih 10 min. Nakon polimerizacije skinuta je pokrovnica, a preparati su prebačeni u pufer za lizu (pH = 10) koji je pripremljen neposredno prije upotrebe iz matične otopine za lizu (NaCl, Na-laurilsarkozinat, Tris-HCl), uz dodatak 10 %-tne otopine DMSO i detergenta Triton X-100. Preparati su u puferu za lizu držani preko noći na 4°C kako bi se oslobodila DNA. Nakon lize, preparati su prebačeni u pufer za denaturaciju (NaOH, Na_2EDTA, redestilirana voda, pH = 13), pripremljen neposredno prije upotrebe. Denaturacija je trajala 20 min na 4°C, te su preparati preneseni u kadicu za horizontalnu elektroforezu. Elektroforeza je provedena u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, u trajanju od 20 min. Nakon elektroforeze, preparati su ispirani tri puta po 5 min u neutralizacijskom puferu (0,4 mol/L Tris-HCl, pH = 7,5), te nakon zadnjeg ispiranja obojeni sa 100 µL etidij-bromida (20 µg/mL) u trajanju od 10 min. Obojeni gelovi kratko su isprani u Tris-HCl puferu (pH = 7,5) i pokriveni pokrovnicom. Prije početka analize preparati su držani u mraku 15 minuta kako bi se stabilizirala boja. Na isti način pripremljeni su i kontrolni uzorci. Kao negativna kontrola poslužili su netretirani limfociti, a

za pozitivnu kontrolu suspenzija izoliranih limfocita tretirana je vodikovim peroksidom konačne koncentracije 25 µmol/L. Analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa (AX 70; Olympus, Japan) s ekscitacijskim filterom od 515 - 560 nm. Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike Comet Assay IV (Instem-Perceptive Instruments Ltd., Velika Britanija). Za svaki uzorak izmjereno je 100 kometa. Postoji nekoliko parametara koje mjeri program, kao što su dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment kometa. Ipak, kao najrelevantniji parametar izdvaja se intenzitet repa kometa koji označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu.

3.2.6. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije određen je u uzorcima plazme pomoću testa za dokazivanje reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (engl. *tiobarbituric acid reactive substances*, TBARS). TBARS metoda se temelji na reakciji MDA, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *tiobarbituric acid*, TBA). Osim sa MDA, TBA reagira i sa drugim aldehidima, nazvanih TBARS. Nakon reakcije TBA sa TBARS iz uzorka, dolazi do razvitka crveno/ružičastog obojenja te se mjeri apsorbancija na 532 nm. Reakcijska smjesa za određivanje koncentracije TBARS sadržavala je 50 µL uzorka (standarda ili uzorka plazme), 5 µL 0,2 %-tnog butiliranog hidroksitoluena (BHT), 750 µL 1 %-tne fosfatne kiseline (H_3PO_4), 250 µL 0,6 %-tne otopine TBA i 445 µL destilirane vode. Nakon kratkotrajnog miješanja na vorteks-miješalici uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji na temperaturi od 90 °C tijekom 30 min. Po završetku inkubacije, epruvete sa uzorcima ohlađene su u hladnoj vodi i spektrometrijski je izmjerena apsorbancija pri 532 nm. Sva mjerenja provedena su u tri paralelne probe. Koncentracija TBARS-a u uzorcima

plazmi očitana je iz baždarnog dijagrama. Veća apsorbancija upućuje na stvaranje veće količine TBARS-a te viši stupanj oksidacije.

3.2.7. Određivanje razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)

Razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u uzorcima plazme ispitana je 2',7'-diklorofluorescein-diacetatfluorometrijskim testom. U toj metodi koriste se redoks-aktivne probe koje se, nakon oksidacije pomoću ROS, pretvaraju u fluorescentne probe. 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) je nepolarni, neionski, nefluorescentni spoj koji lako difundira kroz staničnu membranu te se u citosolu stanica djelovanjem unutarstaničnih enzima prevodi u 2',7'-diklorofluorescein (DCFH) koji je isto tako nefluorescentan. 2',7'-diklorofluorescein se u prisutnosti ROS-ova oksidira do zelenog fluorescentnog produkta 2', 7'- diklorofluoresceina (DCF) (44). Mjeri se intenzitet fluorescencije koji ukazuje na nastanak oksidacijskog stresa zbog prekomjernog stvaranja ROS-ova ili trošenja antioksidansa. Na taj način ovakve probe upućuju na prisutnost ROS-ova kao što su O_2^- i H_2O_2. Za mjerenje razine ROS-ova, uzorci plazme razrijeđeni su tako da je u 900 µL PBS-a dodano 100 µL plazme. Mjerenje je provedeno u mikrotitracijskim crnim pločicama sa 96 jažica. Uzorci su mjereni u triplikatima te je u svaku jažicu dodano 100 µL razrijeđene plazme i 20 µL 0,12 mM DCFDA pripremljenog neposredno prije mjerenja radi osjetljivosti na fotooksidaciju. Pločice su inkubirane 30 min na 37°C. Po završetku inkubacije izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini eksitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije 520 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan).

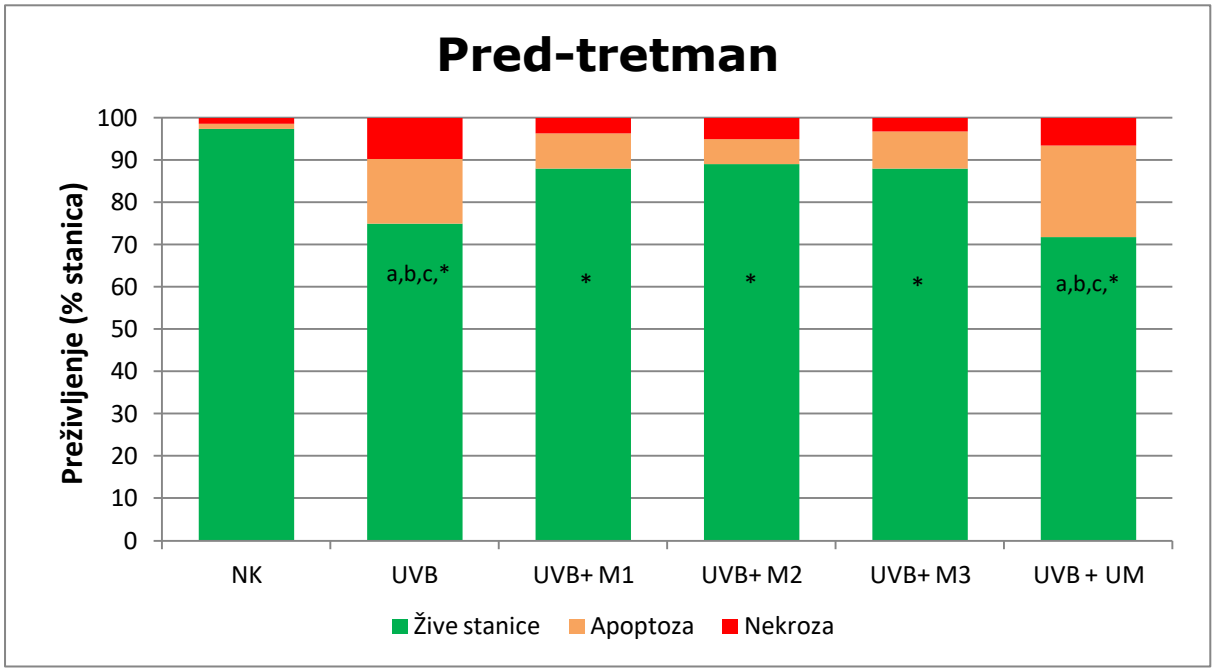
3.2.8. Određivanje razine glutationa (GSH)

Slično kao i DCFH-DA boja, monoklorobiman (mBCl) je sam po sebi nefluorescentan. Tek nakon konjugacije s tiolnim molekulama male molekularne mase nastaju fluorescentni plavi adukti. Monoklorobiman se veže za GSH te se kao takav koristi kao biomarker razine GSH u stanicama (45). Isto kao i za mjerenje razine ROS-ova u plazmi, mjerenje razine GSH provedeno je u mikrotitracijskim pločicama u triplikatima za pojedini uzorak plazme. U jažice je dodano 100 µL razrijeđene plazme te 20 µL 0,24 mM mBCl-a. Pločice su inkubirane 20 min na 37°C. Izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini eksitacije od 355 nm i valnoj duljini emisije 460 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan).

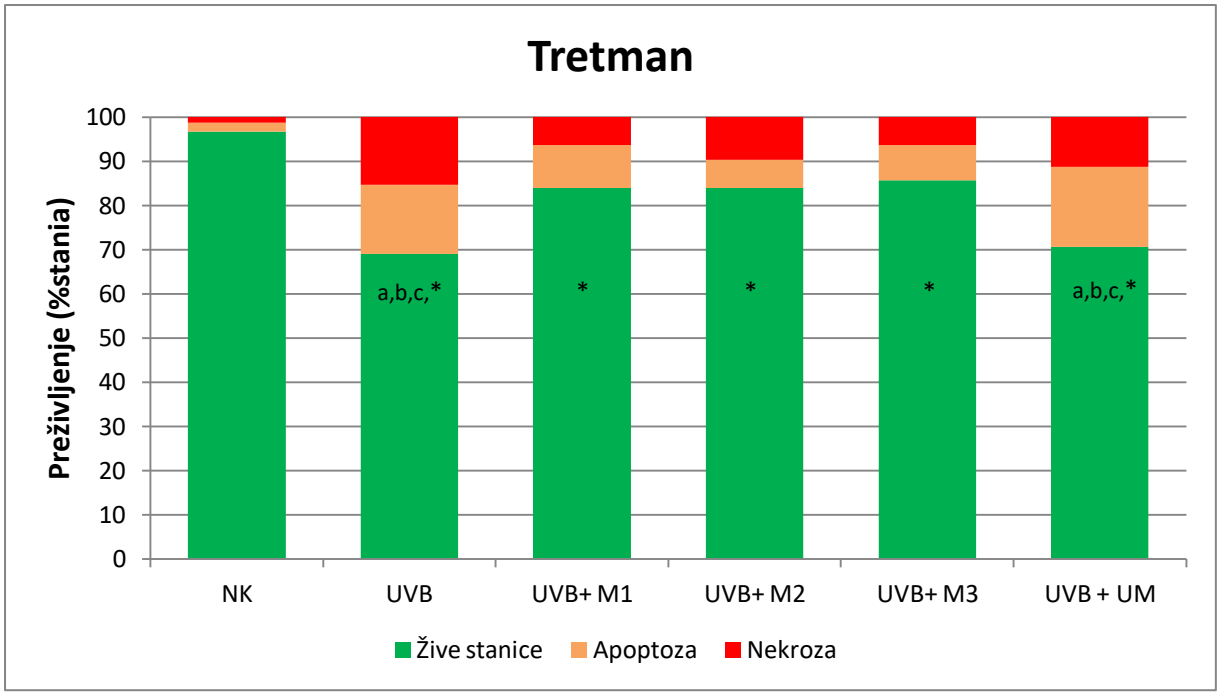
4. REZULTATI

4.1. Test preživljenja limfocita

Rezultati fluorescencijskog testa za istovremeno otkrivanje živih stanica te stanica u apoptozi i nekrozi u uzorcima izoliranih ljudskih limfocita nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom prikazani su na Slikama 7 i 8. Stanice u apoptozi identificirane su na temelju fragmentacije jezgre i narančastog obojenja, a nekrotične na temelju promjena u izgledu citoplazme i organela uz lizu membrane i crvenog obojenja. Žive stanice su nakon obojenja fluorescirale zeleno. Izloženost UVB zračenju rezultirala je značajnim smanjenjem vijabilnosti limfocita u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 7 i 8). Pred-tretman i tretman s medom od kestena uzrokovao je povećanje broja živih stanica u odnosu na ozračene stanice. Nakon izlaganja limfocita UVB zračenju utvrđeno je 75% živih stanica u pred-tretmanu te 69% u tretmanu dok je primjena testiranih koncentracija meda od kestena rezultirala s 88-89% živih stanica u pred-tretmanu te 84-85% u tretmanu. Nakon primjene umjetnog meda postotak živih stanica u pred-tretmanu je iznosio 71,7% a u tretmanu 70,7% što je statistički značajno različito u odnosu na sve ostale eksperimentalne skupine.



Slika 7. Rezultati testa preživljenja izoliranih ljudskih limfocita nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom (UM). Konačne koncentracije meda od kestena u suspenziji izoliranih limfocita bile su: 0,2157 mg/mL (M1), 1 mg/mL (M2) i 10 mg/mL (M3). Neozračeni limfociti služili su kao negativna kontrola (NK). Po svakom uzorku pregledano je 300 stanica.
Statistički značajna odstupanja (χ^2 test; $P < 0,05$): a *vs*. skupina UVB + M1; b *vs*. UVB + M2; c *vs.* UVB + M3, * *vs*. negativna kontrola.



Slika 8. Rezultati testa preživljenja izoliranih ljudskih limfocita nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom (UM). Konačne koncentracije meda od kestena u suspenziji izoliranih limfocita bile su: 0,2157 mg/mL (M1), 1 mg/mL (M2) i 10 mg/mL (M3). Neozračeni limfociti služili su kao negativna kontrola (NK). Po svakom uzorku pregledano je 300 stanica.
Statistički značajna odstupanja (χ^2 test; $P < 0,05$): a *vs.* skupina UV + M1; b *vs.* UV + M2; c *vs.* UV + M3; * *vs.* negativna kontrola.

4.2. Komet-test u alkalnim uvjetima

Kako bi se ispitala razina primarnih oštećenja limfocitne DNA korišten je komet-test u alkalnim uvjetima uz analizu preparata epifluorescencijskim mikroskopom. Rezultati-komet testa za parametar intenzitet repa (% DNA u repu kometa) mjeren na izoliranim ljudskim limfocitima nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom te u odgovarajućim kontrolama prikazani su u Tablici 1. Specifičnost i osjetljivost metode komet-testa potvrđena je statistički značajno povišenim vrijednostima intenziteta repa izmjerenim u uzorcima pozitivne kontrole, što ujedno potvrđuje da je vodik peroksid jak oksidans koji u niskim koncentracijama može izazvati značajnu količinu primarnih oštećenja DNA. Ultraljubičasto B

zračenje također je uzrokovalo značajno povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu i to povećanje je bilo najizraženije u eksperimentalnom modelu tretmana. Med od kestena primijenjen u koncentracijama 1 mg/mL i 10 mg/mL u pred-tretmanu pokazao je povoljan genoprotektivni učinak, odnosno smanjenje postotka DNA u repu kometa u odnosu na ozračene stanice. Nasuprot tome, primjena meda koncentracije 0,2157 mg/mL u pred-tretmanu rezultirala je većim postotkom DNA u repu kometa u odnosu na ozračene stanice premda to povećanje nije bilo statistički značajno. No, postotak DNA u repu kometa u uzorcima limfocita koji su u pred-tretmanu tretirani s 0,2157 mg/ml meda od kestena bio je statistički značajno veći u odnosu na uzorke tretirane medom koncentracije 10 mg/mL. Primjena meda od kestena u svim analiziranim koncentracijama u tretmanu rezultirala je smanjenjem postotka DNA u repu kometa u odnosu na ozračene stanice. U uzorcima limfocita tretiranim umjetnim medom uočen je manji intenzitet repa kometa u odnosu na ozračene stanice, ali ne i uzorke stanica tretirane medom od kestena.

Tablica 1. Rezultati komet testa za parametar intenzitet repa (% DNA u repu kometa) mjeren na izoliranim ljudskim limfocitima nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom te u odgovarajućim kontrolama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška (prvi red), medijan (drugi red) te raspon od minimalne do maksimalne vrijednosti (treći red) za 100 pojedinačnih kometa po uzorku.

	Intenzitet repa (%DNA u repu kometa)	
Skupina	**Pred-tretman**	**Tretman**
Negativna kontrola	0,82±0,16[*] 0,02 0,00-9,07	0,46±0,12[*] 0,03 0,00-6,89
Pozitivna kontrola	14,45±1,34[c,d] 12,02 0,00-48,67	8,31±0,95 5,14 0,01-39,27
UVB	10,34±0,98 7,19 0,08-41,90	11,97±0,89[c,d,e,f] 9,30 0,34-36,73
UVB + M1	12,35±1,07[d] 9,76 0,03-39,67	10,98±0,77[c,d,f] 9,61 0,01-32,77
UVB + M2	7,83±0,75 5,88 0,10-26,92	8,10±0,70 5,42 0,05-25,82
UVB + M3	8,48±0,92 4,95 0,00-38,44	7,56±0,71 5,30 0,01-33,05
UVB + UM	9,75±0,95 7,53 0,08-40,98	8,84±0,80 6,38 0,02-32,94

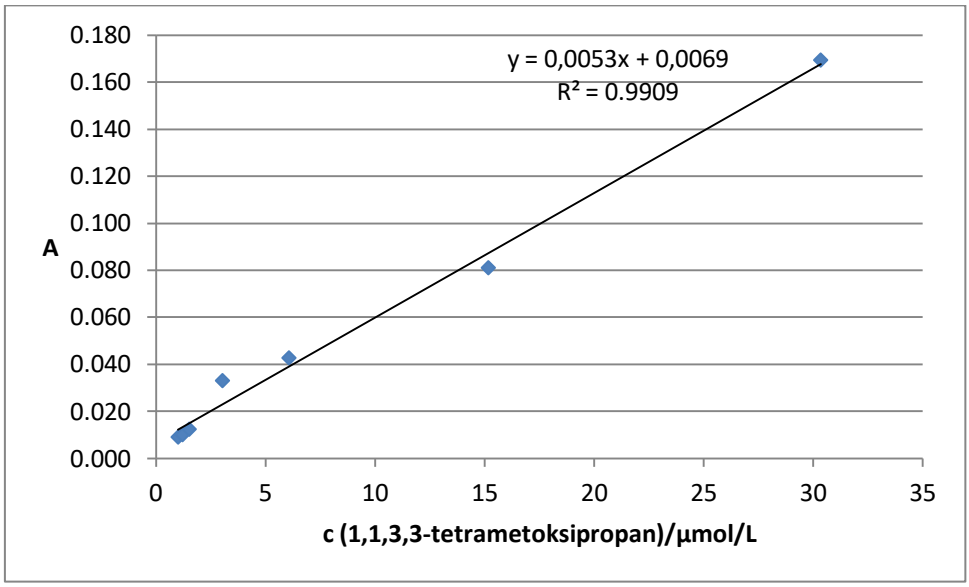
Negativna kontrola – neozračeni uzorak; pozitivna kontrola – 100 μM H_2O_2, 10 min na ledu; M1 - 0,2157 mg/mL meda od kestena; M2 - 1 mg/mL meda od kestena; M3 - 10 mg/mL meda od kestena; UM – umjetni med.

Statistički značajna odstupanja (analiza varijance uz *post-hoc* Tukey HSD test, P<0,05): c *vs.* UVB + M2; d *vs.* UVB + M3, e *vs.* UVB + UM; f *vs.* pozitivna kontrola, * *vs.* sve skupine.

4.3. Određivanje markera oksidacijskog stresa u plazmi

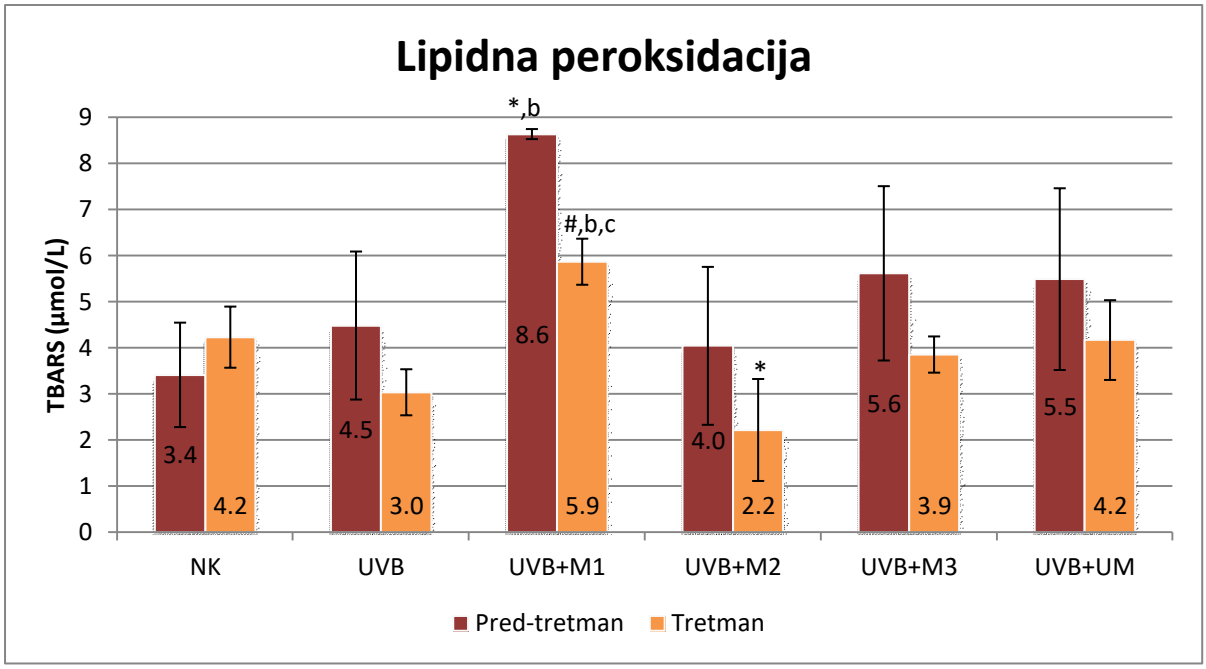
4.3.1. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Određivanje produkata lipidne peroksidacije, izraženih kao TBARS (engl. *thiobarbituric acid reactive substances)*, izvršeno je spektrofotometrijskom metodom pomoću tiobarbiturne kiseline (engl. *tiobarbituric acid*, TBA) u uzorcima plazme. Izrađen je baždarni dijagram, koristeći 1,1,3,3-tetrametoksipropan kao standard u koncentracijama od 1,01 do 30,35 µmol/L. Iz baždarnog dijagrama se na temelju izmjerene apsorbancije odredila nepoznata koncentracija TBARS u uzorcima plazme (Slika 9). Jednadžba pravca glasi y = 0,0053x + 0,0069. X označava koncentraciju standarda otopine 1,1,3,3-tetrametoksipropana (µmol/L), a Y označava izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 532 nm. Kako su uzorci za spektrofotometrijska mjerenja analizirani u triplikatima, za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost apsorbancije na temelju koje je očitana koncentracija iz baždarnog dijagrama.



Slika 9. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (engl. *tiobarbituric acid reactive substances*, TBARS).

Rezultati TBARS testa na uzorcima plazmi izdvojenih nakon izlaganja krvi UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom prikazani su na Slici 10. Ozračivanje krvi s UVB u pred-tretmanu rezultiralo je povećanjem koncentracije produkata lipidne peroksidacije, dok je u tretmanu uočeno smanjenje u odnosu na negativnu kontrolu. No navedene promjene nisu bile statistički značajne. Primjena meda od kestena koncentracije 1 mg/mL rezultirala je vrlo povoljnim učinkom, tj. postignuto je smanjenje stupnja lipidne peroksidacije nakon izlaganja UVB zračenju i u pred-tretmanu i tretmanu. Primjena deseterostruko veće koncentracije meda od kestena kao i umjetnog meda rezultirala je povećanjem koncentracije TBARS, te su koncentracije određene nakon pred-tretmana bile više od onih izmjerenih i u neozračenim i u ozračenim uzorcima plazmi. Vrijednosti određene nakon tretmana s 10 mg/mL meda od kestena i umjetnog meda bile su u granicama kontrolnih vrijednosti. Najveće povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije uočeno je nakon primjene meda od kestena koncentracije 0,2157 mg/mL i u pred-tretmanu i tretmanu.

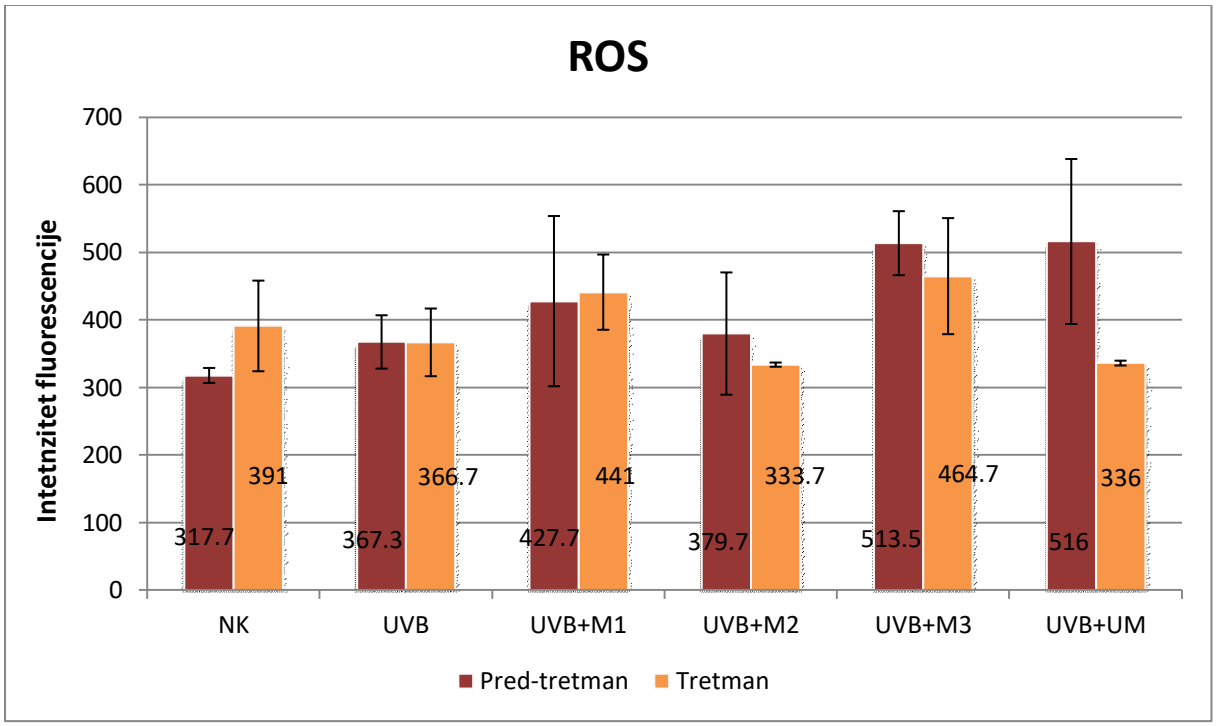


Slika 10. Promjena koncentracije reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (TBARS) u uzorcima plazme izdvojenih nakon izlaganja krvi UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom (UM). Konačne koncentracije meda od kestena u uzorcima krvi bile su: 0,2157 mg/mL (M1), 1 mg/mL (M2) i 10 mg/mL (M3). Neozračeni uzorci krvi služili su kao negativna kontrola (NK).
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistički značajna odstupanja (analiza varijance uz *post-hoc* Tukey HSD test, P < 0,05): b *vs*. M2; c *vs*. UVB + M3, * *vs*. negativna kontrola (NK), # *vs*. UVB.

4.3.2. Određivanje razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)

U svrhu testiranja *in vitro* antioksidacijskog učinka meda od kestena, određena je razina ROS-ova u uzorcima plazme nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom. Za tu potrebu korištena je DCFH-DA boja koja fluorescira u prisutnosti ROS-ova. Izmjereni intenzitet fluorescencije u uzorcima plazmi proporcionalan je količini ROS-ova, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 11. Prema rezultatima fluorometrijske analize, ustanovljene su značajne fluktuacije u utjecaju različitih koncentracija meda kao i umjetnog meda na formiranje ROS-ova. Nakon izlaganja krvi UVB zračenju u pred-tretmanu utvrđeno je da je došlo do stvaranja ROS-ova jer se intenzitet fluorescencije povećao u odnosu na intenzitet fluorescencije u neozračenim uzorcima. Pred-tretman s medom od

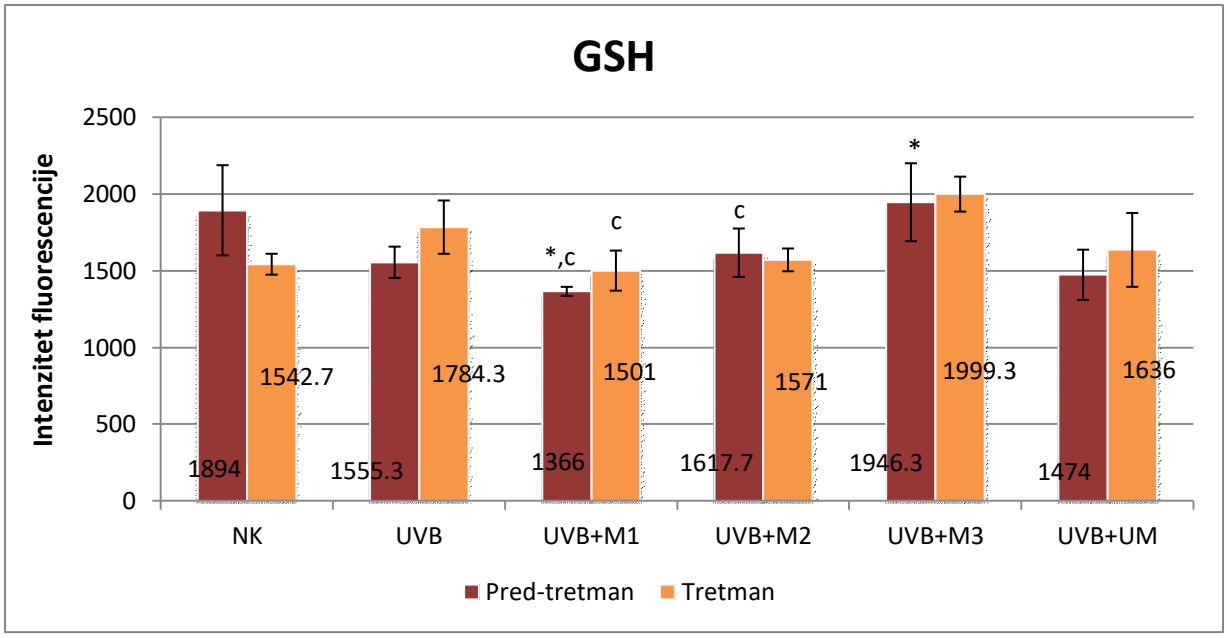
kestena u svim analiziranim koncentracijama uzrokovao je povećanje razine ROS-ova u odnosu na negativnu kontrolu i ozračene uzorke, no pritom treba istaknuti da je primjena meda koncentracije 1 mg/mL u pred-tretmanu rezultirala formiranjem najmanje količine ROS-ova. Nakon pred-tretmana s umjetnim medom također je vidljiv porast u razini ROS-ova u odnosu na negativnu kontrolu i ozračene uzorke. Kod tretmana jedino je primjena meda koncentracije 1 mg/mL rezultirala smanjenjem formiranja ROS-ova. Tretman medom u koncentracijama 0,2157 mg/mL i 10 mg/mL nije rezultirao smanjenjem formiranja ROS-ova u uzorcima plazme.



Slika 11. Promjena razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u uzorcima plazme izdvojenih nakon izlaganja krvi UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom (UM). Konačne koncentracije meda od kestena u uzorcima krvi bile su: 0,2157 mg/mL (M1), 1 mg/mL (M2) i 10 mg/mL (M3). Neozračeni uzorci krvi služili su kao negativna kontrola (NK).
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost testirana je pomoću analize varijance i post-hoc Tukey HSD testa, uz razinu statističke značajnosti $P<0,05$.

4.3.3. Određivanje razine glutationa (GSH)

Razina GSH u uzorcima plazme određena je pomoću boje monoklorobimana. Mjeren je intenzitet fluorescencije u uzorcima plazme koji je proporcionalan razini GSH. Rezultati fluorometrijske analize za detekciju GSH u uzorcima plazme nakon izlaganja UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom prikazani su na Slici 12. Nakon izlaganja krvi UVB zračenju uočeno je smanjenje razine GSH u pred-tretmanu u odnosu na negativnu kontrolu, dok je u tretmanu došlo do povišenja razine GSH u odnosu na negativnu kontrolu. Navedene promjene nisu bile statistički značajne. Primjena meda od kestena koncentracije koncentracije 0,2157 mg/mL u pred-tretmanu smanjila je razinu GSH u plazmi u odnosu na ozračene uzorke a čak i statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu. Sličan učinak pokazao je umjetni med. Nasuprot tome, primjena meda koncentracije 1 mg/mL u pred-tretmanu rezultirala je povećanjem razine GSH u odnosu na ozračeni uzorak, no određena vrijednost intenziteta fluorescencije bila je znantno niža od vrijednosti za negativnu kontrolu. Nakon primjene najveće koncentracije meda (10 mg/mL) utvrđene su najviše razine GSH u pred-tretmanu. I nakon tretmana ozračene krvi s 10 mg/mL meda od kestena utvrđene su najviše razine GSH. Tretman s medom u koncentracijama 0,2157 i 1 mg/mL smanjio je razinu GSH u odnosu na ozračene uzorke, a vrijednosti intenziteta fluorescencije bile su u rasponu kontrolnih vrijednosti. Tretman s umjetnim medom također je smanjio razinu GSH u odnosu na ozračeni uzorak, no vrijednosti intenziteta fluorescencije bile su više u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 12. Promjena razine glutationa (GSH) u uzorcima plazme izdvojenih nakon izlaganja krvi UVB zračenju u kombinaciji s pred-tretmanom i tretmanom s medom od kestena i umjetnim medom (UM). Konačne koncentracije meda od kestena u uzorcima krvi bile su: 0,2157 mg/mL (M1), 1 mg/mL (M2) i 10 mg/mL (M3). Neozračeni uzorci krvi služili su kao negativna kontrola (NK).
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistički značajna odstupanja (analiza varijance uz *post-hoc* Tukey HSD test;P < 0,05): c *vs*. UVB + M3, * *vs*. NK.

5. RASPRAVA

Ultraljubičasto B (UVB) zračenje je dokazano štetan agens koji može uzrokovati oštećenja DNA, genske mutacije, oksidacijski stres te potaknuti upalne odgovore u organizmu. Izlaganje UVB zračenju dovodi do formiranja ROS-ova čije prekomjerno stvaranje posljedično dovodi do procesa lipidne peroksidacije. Ovakvo stanje u organizmu povezano je s patološkim stanjima kao što su Parkinsonova bolest, rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, Alzheimerova bolest te arterioskleroza. Molekule koje hvataju reaktivne kisikove vrste stoga su ključne kako bi se održala homeostaza i smanjila mogućnost razvoja patoloških stanja. Prema prethodnim istraživanjima svojstava i antioksidacijske aktivnosti medova različitih vrste, pokazano je da se med od kestena nalazi među medovima koji imaju visok udio fenolnih komponenti te posljedično dobar antioksidacijski učinak. To potvrđuju i činjenice da se med od kestena pokazao kao dobar inhibitor nekoliko enzima (hijaluronidaza, ksantin oksidaza, ureaza) povezanih s razvojem patoloških stanja (37) te da se listovi kestena koriste protiv kašlja, prehlade i visokog kolesterola u krvi (35).

Kako bi se ispitao antioksidacijski te citoprotektivni i genoprotektivni učinak meda od kestena, u ovom radu provedena su istraživanja na *in vitro* modelu ljudskih limfocita i krvi. Standardne citogenetičke metode zasnivaju se upravo na ovom modelu jer su limfociti periferne krvi primarne stanice stabilnog genoma te se na njima uspješno može procijeniti učinak ispitivanog meda od kestena na razini stanice. Alternativni model za ovakve istraživačke namjene bile bi različite stanične linije. One su većinom tumorskog podrijetla zbog čega se na njima ne mogu ispitivati svi parametri, a pogotovo oni vezani uz proliferaciju i stupanj oštećenja DNA. Učinci meda od kestena ispitani su u koncentracijama koje odgovaraju dozama dnevno prihvatljivog unosa meda prehranom. To su jedna žlica meda, prosječna dnevna konzumacija meda hrvatske populacije koja prema podacima Hrvatske agencije za

hranu iz 2015. iznosi 15,1 g/dan (38) te dnevna doza od 50-80 g jer se brojni povoljni učinci konzumiranja meda postižu tek pri tim dozama (25). Suspenzija limfocita i puna krv izloženi su djelovanju UVB zračenja kako bi se utvrdilo njegovo štetno djelovanje, a sam pokus je imao dva dijela: pred-tretman medom prije samog ozračivanja te tretiranje medom nakon ozračivanja stanica i pune krvi. Učinci meda od kestena procijenjeni su koristeći test preživljenja limfocita, komet-test u alkalnim uvjetima te mjerenjem markera oksidacijskog stresa uključujući lipidnu peroksidaciju, glutation te reaktivne kisikove vrste.

Test preživljenja limfocita je pokazao da primjena meda u svim ispitivanim koncentracijama rezultira povećanjem stope preživljenja limfocita u pred-tretmanu i tretmanu, odnosno povećava vijabilnost stanica nakon ozračivanja stanica UVB zračenjem. Primjenom umjetnog meda nije pokazano poboljšanje u odnosu na stanice tretirane samo UVB zračenjem, pa se može zaključiti da šećeri u medu nisu interferirali tijekom provedbe analize zaštitnog učinka meda od kestena. Rezultati komet-testa u alkalnim uvjetima pokazali su da pred-tretman medom od kestena u koncentracijama od 1 mg/mL i 10 mg/mL rezultira smanjenjem postotka DNA u repu kometa u odnosu na stanice ozračene UVB zračenjem. Primjenom meda najniže koncentracije (0,2157 mg/mL) posljedično je došlo do povećanja postotka DNA u repu kometa. Med najmanje koncentracije ima manji udio sastavnica s antioksidacijskim učinkom te se u analizama nije pokazao zaštitni učinak protiv UVB zračenja, već je došlo do veće razine oštećenja. Kod tretmana, primjenom svih analiziranih koncentracija meda došlo je do smanjenja oštećenja stanica, odnosno smanjenja postotka DNA u repu kometa. U pred-tretmanu je primjena meda koncentracije 1 mg/mL rezultirala manjim postotkom DNA u repu kometa od meda koncentracije 10 mg/mL čime se da pretpostaviti da previsoke koncentracije određenih sastavnica meda od kestena mogu imati i pro-oksidacijski učinak, odnosno da sam med ima dvojni učinak. Slični rezultati pokazani su i ispitivanjem stupnja lipidne peroksidacije gdje je primjena meda koncentracije 1 mg/mL uzrokovala

smanjenje stupnja lipidne peroksidacije nakon izlaganja UVB zračenju i u pred-tretmanu i tretmanu. Rezultati TBARS testa tako su u skladu s onim dobivenim za pred-tretman kod komet testa gdje je med koncentracije 1 mg/mL pokazao najbolji zaštitni učinak od UVB zračenja te optimalnu količinu sastavnica s antioksidacijskim djelovanjem. Najbolji učinak u sprječavanju nastanka ROS-ova pokazan je primjenom meda koncentracije 1 mg/mL i u pred-tretmanu i tretmanu jer su razine formiranih ROS-ova bile najniže. Primjena meda koncentracije 0,2157 mg/mL i 10 mg/mL nije rezultirala smanjenjem stvaranja ROS-ova što je u skladu s prethodnim rezultatima koji ukazuju na pro-oksidacijsko djelovanje sastavnica meda u prevelikim koncentracijama te nedovoljan zaštitni učinak kada su sastavnice u malim koncentracijama. Primjena meda koncentracije 10 mg/mL imala je za posljedicu povišenje razine GSH u pred-tretmanu i tretmanu. Ozračivanjem stanica u pred-tretmanu uzrokovano je smanjenje razine GSH u odnosu na negativnu kontrolu jer je UVB zračenje dovelo do stvaranje ROS-ova čime se povećala potrošnja GSH kao antioksidansa. Primjenom meda koncentracije 0,2157 mg/mL došlo je do značajnog smanjenja razine GSH u plazmi zbog njegovog utroška što govori o pro-oksidacijskom učinku meda primjenjenog u toj koncentraciji. Tretman medom koncentracije 1 mg/mL povećao je razinu GSH u odnosu na negativnu kontrolu.

Neki polifenolni spojevi, pod određenim uvjetima kao što su visok pH, visoka koncentracija iona prijelaznih metala te prisutnost molekule kisika, mogu ispoljavati i prooksidacijsko djelovanje. U tim uvjetima omogućuje se autooksidacija tih fenolnih antioksidansa te se oni počinju ponašati kao prooksidansi. Autooksidaciji su lako podložni manji fenolni spojevi koji se lako oksidiraju. Takvi spojevi su kvercetin i galna kiselina te oni mogu imati prooksidacijsko djelovanje. U *in vitro* uvjetima, pokazano je da fenoli uključujući kvercetin, rutin, apigenin, resveratrol i kurkumin te galnu, taninsku, kafeinsku kiselinu mogu uzrokovati oksidacijska oštećenja, odnosno pucanje lanca DNA (46). Iz rezultata pokusa, kao i iz znanja o pro-oksidacijskom učinku pojedinih spojeva, da

se pretpostaviti da neke sastavnice meda od kestena povećavaju oksidacijski stres kod primjene meda u najvećoj koncentraciji. Isto tako, med najmanje koncentracije nema dovoljan antioksidacijski učinak jer se određene sastavnice nalaze u malim količinama koje ne mogu neutralizirati nastale reaktivne kisikove vrste. Potrebno je dalje istražiti koja je optimalna koncentracija koja bi imala najpovoljniji učinak te koje su sastavnice zaslužne za dvojni učinak meda od kestena. S obzirom da je kinurenska kiselina u velikim količinama zastupljena u medu od kestena, a poznato je da ona ima antioksidacijski učinak, valjalo bi dalje ispitati njen učinak kao sastavnice koja je u velikom udjelu zastupljena u medu od kestena.

6. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati u skladu su s pretpostavkom da med od kestena može pružiti zaštitu od štetnog djelovanja UVB zračenja. Uspoređujući pred-tretman i tretman stanica i krvi ispitivanim koncentracijama meda od kestena koje odgovaraju dnevno prihvatljivoj konzumaciji, pokazalo se da tretman ima nešto povoljniji učinak od pred-tretmana. Ultraljubičasto B zračenje je vidljivo štetan agens jer je uzrokovao povećanje markera oksidacijskog stresa ROS u plazmi te je inducirao lipidnu peroksidaciju, a posljedično i oštećenja DNA. Med od kestena primjenjen u koncentraciji od 1 mg/mL pokazao je povoljniji učinak, pogotovo u testovima određivanja lipidne peroksidacije, u odnosu na primjenu ostale dvije ispitane koncentracije što govori u prilog da se radi o optimalnoj koncentraciji sastavnica u medu od kestena. Dakle, med od kestena pokazao je citoprotektivne i genoprotektivne, kao i antioksidacijske učinke u vidu „hvatanja" reaktivnih kisikovih vrsta, te se njegov učinak mora dalje istražiti na *in vitro* i *in vivo* modelima.

7. LITERATURA

1 Pinault L, Bushnik T, Fioletov V, Peters CE, King WD, Tjepkema M. The risk of melanoma associated with ambient summer ultraviolet radiation. *Heal Reports* 2017; **28**: 3–11.

2 D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 12222–12248.

3 Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol* 2015; **91**: 140–155.

4 Sharma P, Montes de Oca MK, Alkeswani AR, McClees SF, Das T, Elmets CA *et al.* Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2018; **34**: 50–59.

5 Kostović K. Procjena djelotvornosti lokalne fotodinamičke terapije u bolesnika s površinskim bazaliomom pomoću Ki-67, bcl-2, p53 i p63. 2010.

6 Mikolašević K, Macan J. Karcinomi kože uzrokovani solarnim zračenjem kao profesionalna bolest. *Sigurnost* 2018; **60**: 235–245.

7 Devečerski S. Fiziologija s patofiziologijom. 2012.

8 Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O *et al.* The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact* 2010; **188**: 334–339.

9 Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**. doi:10.1155/2016/4350965.

10 Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid. Med. Cell. Longev. 2014. doi:10.1155/2014/360438.

11 Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid

peroxidation - Causes and consequences. *Medicina (B Aires)* 2007; **43**: 84–93.

12 Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **482**: 419–425.

13 Bastos ADS, Graves DT, Paula A, Loureiro DM, Rossa C, Frizzera F *et al.* HHS Public Access. 2016; **30**: 1593–1599.

14 Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R *et al.* Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2010; **44**: 1125–1171.

15 Gunawardena HP, Silva R, Sivakanesan R, Ranasinghe P, Katulanda P. Poor Glycaemic Control Is Associated with Increased Lipid Peroxidation and Glutathione Peroxidase Activity in Type 2 Diabetes Patients. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 9471697.

16 Wood SM, Mastaloudis AF, Hester SN, Gray R, Kern D, Namkoong J *et al.* Protective effects of a novel nutritional and phytonutrient blend on ultraviolet radiation-induced skin damage and inflammatory response through aging defense mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 2017; **16**: 491–499.

17 Sebastià J, Cristòfol R, Martín M, Rodriguez-Farré E, Sanfeliu C. Evaluation of Fluorescent Dyes for Measuring Intracellular Glutathione Content in Primary Cultures of Human Neurons and Neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytom Part A* 2003; **51**: 16–25.

18 Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; **333**: 19–39.

19 Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015; **18**: 89–95.

20 Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. Honey and health: A review of recent clinical research. Pharmacognosy Res. 2017. doi:10.4103/0974-8490.204647.

21 Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem* 2016;

196: 309–323.

22 Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodriguez P, Manna PP *et al.* Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* 2018; **23**: 1–20.

23 Flanjak I, Strelec I, Kenjerić D, Primorac L. Croatian produced unifloral honeys characterised according to the protein and proline content and enzyme activities. *J Apic Sci* 2016; **60**: 39–48.

24 Atwa ADA, AbuShahba RY, Mostafa M, Hashem MI. Effect of honey in preventing gingivitis and dental caries in patients undergoing orthodontic treatment. *Saudi Dent J* 2014; **26**: 108–114.

25 Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: A review. *J Am Coll Nutr* 2008; **27**: 677–689.

26 Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Honey: A novel antioxidant. *Molecules* 2012; **17**: 4400–4423.

27 Arawwawala M, Hewageegana sujatha. Health Benefits and Traditional Uses of Honey: A Review. *J Apitherapy* 2017; **2**: 9.

28 Mutlu C, Tontul SA, Erbaş M. Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar. *Lwt* 2018; **93**: 499–505.

29 Flanjak I, Kenjerić D, Bubalo D, Primorac L. Characterisation of selected Croatian honey types based on the combination of antioxidant capacity, quality parameters, and chemometrics. *Eur Food Res Technol* 2016; **242**: 467–475.

30 León-Ruiz V, González-Porto A V., Al-Habsi N, Vera S, San Andrés MP, Jauregi P. Antioxidant, antibacterial and ACE-inhibitory activity of four monofloral honeys in relation to their chemical composition. *Food Funct* 2013; **4**: 1617–1624.

31 Oršolić N, Bašić I. Honey as a cancer-preventive agent. *Period Biol* 2004.

32 Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, Muzi MG, Canini A. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *Int J Oncol* 2010.

doi:10.3892/ijo-00000748.

33 Can Z, Yildiz O, Sahin H, Akyuz Turumtay E, Silici S, Kolayli S. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem* 2015; **180**: 133–141.

34 Küçük M, Kolayli S, Karaoğ lu Ş, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem* 2007; **100**: 526–534.

35 Turski MP, Chwil S, Turska M, Chwil M, Kocki T, Rajtar G *et al.* An exceptionally high content of kynurenic acid in chestnut honey and flowers of chestnut tree. *J Food Compos Anal* 2016; **48**: 67–72.

36 Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverrí J, Silva-Adaya D *et al.* On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol* 2011; **33**: 538–547.

37 Karaçelik AA, Sahin H. Determination of enzyme inhibition and antioxidant activity in some chestnut honeys. *Foods Raw Mater* 2018; **6**: 210–218.

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

39 Milić M, Pavičić I, Vinković Vrček I, Selmani A, Domazet Jurašin D, Matijević Glavan T, Zapletal E. The influence of titanium dioxide nanomaterials on human keratinocyte HaCaT cells after UVB radiation with one medial erythemal dose. *Zbornik radova Jedanaestog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja 2017*; 149-154.

40 Whittle EE, Legood SW, Alav I, Dulyayangkul P, Overton TW, Blair JMA. Flow Cytometric Analysis of Efflux by Dye Accumulation. *Front Microbiol* 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.02319.

41 Plemel JR, Caprariello A V., Keough MB, Henry TJ, Tsutsui S, Chu TH *et al.* Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *J Cell Biol* 2017. doi:10.1083/jcb.201602028.

42 Lu Y, Liu Y, Yang C. Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *J Vis Exp* 2017. doi:10.3791/56450.

43 Collins A. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 2004.

44 Reiniers MJ, Van Golen RF, Bonnet S, Broekgaarden M, Van Gulik TM, Egmond MR *et al.* Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. *Anal Chem* 2017; **89**: 3853–3857.

45 Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem* 2000. doi:10.1006/abio.2000.4765.

46 Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; **15**: 7313–7352.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Kuzmić Marija

Viduševačka ulica 10A, 44400 Glina

(+385) 998777535

marija.kuzmic1012@gmail.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

01/10/2018–danas Magistra biotehnologije u medicini (mag. biotech. in med.)
Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

01/10/2015–01/10/2018 Prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova (univ. bacc. biotechn. et pharm. inv.)
Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

2011–2015
Opća gimnazija Glina, Glina (Hrvatska)

PRIZNANJA I NAGRADE

Primljena diploma sveučilišne prvostupnice biotehnologije i istraživanja lijekova uz pohvalu CUM LAUDE

2016–danas Dobitnik stipendije grada Gline

10/06/2018–26/06/2018 Sudjelovanje u ljetnoj školi „Patofiziologija aktualnih javnozdravstvenih problema i bolesti“

RADNO ISKUSTVO

01/08/2019–21/08/2019 Skladišni radnik/skladišna radnica na sortiranju i otpremi robe
Hamax d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

01/07/2018–14/07/2018 Praksa
Jadran galenski laboratorij, Rijeka (Hrvatska)
- Odjel registracija

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
njemački	B1	B1	B1	B1	B1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

Snalažljivost, sklonost timskom radu stečeni volontiranjem:

22/04/2018 Volonter

Festival sporta i rekreacije "Homo si teć", Rijeka (Hrvatska)

24/04/2017 Volonter

Festival sporta i rekreacije "Homo si teć", Rijeka (Hrvatska)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Temeljni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Vozačka dozvola B