# Određivanje genotoksičnog potencijala ekstrakta lista obične planike (Arbutus unedo L.) i arbutina u štakora

**Cikač, Tihana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:744543

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Tihana Cikač

# Određivanje genotoksičnog potencijala ekstrakta lista obične planike (*Arbutus unedo* L.) i arbutina u štakora

**Diplomski rad**

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je izrađen dijelom na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a dijelom u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicnu rada, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Benković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

*Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Benković na stručnom vođenju, mnogobrojnim savjetima, razumijevanju i iznimnom strpljenju te predanosti prema ovom radu.*

*Zahvaljujem svim suradnicima i zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na nesebičnoj i stručnoj pomoći.*

*Za pruženu podršku tijekom svih godina studiranja zahvaljujem svim kolegama i prijateljima, a ponajviše Ivoni Cvetković.*

*Najviše hvala mojim roditeljima, Tihomiru i Snježani, koji su mi omogućili studiranje te bili bezuvjetna podrška i oslonac tijekom cijelog studija.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

## ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG POTENCIJALA EKSTRAKTA LISTA OBIČNE PLANIKE (*Arbutus unedo* L.) I ARBUTINA U ŠTAKORA

Tihana Cikač

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Obična planika je biljna vrsta koja zbog bogatog polifenolnog sastava svoju primjenu nalazi u fitoterapiji. Najzastupljeniji fenolni spoj u listu obične planike je arbutin, a prirodni proizvodi koji ga sadrže najčešće se koriste za liječenje urinoinfekcija. Terapijsko djelovanje se zasniva na antibakterijskim svojstvima hidrokinona, farmakološki aktivnog metabolita arbutina. Ovo istraživanje je provedeno s ciljem procjene genotoksičnog učinka ekstrakta lista obične planike i arbutina na životinjskom modelu. Štakori soja Lewis odvojeni su po spolu i raspoređeni u 6 skupina po 4 životinje (1 kontrolna i 2 tretirane skupine za svaki spol). Pokusne skupine tretirane su vodenim ekstraktom lista obične planike i arbutinom u koncentraciji od 200 mg/kg tijekom 14 dana. Za procjenu genotoksičnog utjecaja primijenili smo standardnu izvedbu komet testa u alkalnim uvjetima i mikronukleus test u uvjetima *in vivo*. Komet test je proveden na stanicama periferne krvi, bubrega i jetre, a mikronukleus test na retikulocitima periferne krvi. Komet testom izmjerene razine oštećenja ne prelaze 10% DNA u repu kometa u sve tri vrste stanica. Nadalje, nije zabilježen ni statistički značajan porast broja mikronukleusa kao posljedica primijenjenih tretmana. Na temelju navedenih rezultata možemo zaključiti kako ekstrakt lista obične planike i arbutin imaju niski genotoksični potencijal.

(55 stranica, 16 slika, 11 tablica, 91 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi**: obična planika, arbutin, genotoksičnost, mikronukleus test *in vivo*, komet test

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

doc. dr. sc. Jasna Lajtner

izv. prof. dr. sc. Antun Alegro

Rad prihvaćen: 3.11.2016.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

## DETERMINATION OF GENOTOXIC POTENTIAL OF WILD STRAWBERRY TREE (Arbutus unedo L.) LEAF EXTRACT AND ARBUTIN IN RATS

Tihana Cikač

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Strawberry tree is a plant species which due to the rich polyphenol content finds its use in fitotherapy. The most represented phenol compound within the leaf of strawberry tree is arbutin. Natural products containing arbutin are most frequently used in urinoinfection therapy. Therapeutic effects of those products are based on antibacterial activity of hydroquinone, pharmacologically active metabolite of arbutin. This research was carried out with the aim of evaluation of genotoxic effect of strawberry tree leaf extract and arbutin on animal model. Rats of the Lewis breed were separated by gender and arranged into 6 groups by 4 animals (1 control and 2 treated groups for each gender). The test groups were treated with strawberry tree leaf extract or arbutin in concentration of 200 mg/kg during 14 days. For evaluation of genotoxic effects, we applied the standard performance of comet assay in alkali conditions and micronucleus assay *in vivo*. The comet assay was carried out on the cells of peripheral blood, kidneys and liver while micronucleus assay was carried out on the reticulocytes of peripheral blood. Measured levels of damage using comet assay do not exceed 10% DNA in comet tail for all of the cell types. Furthermore, we didn't notice statistically relevant increase of micronuclei number as a consequence of applied treatments. Based on the indicated results we can conclude that the strawberry tree leaf extract and arbutin have low genotoxic potential.

(55 pages, 16 figures, 11 tables, 91 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: strawberry tree, arbutin, genotoxicity, micronuleus assay *in vivo*, comet assay

Supervisor: Vesna Benković, PhD, Professor

Reviewers: Vesna Benković, PhD, Professor
Jasna Lajtner, Assistant Professor
Antun Alegro, PhD, Professor

Thesis accepted: 3.11.2016.

**POPIS KRATICA**

ALS – alkalno labilna mjesta (od engl. *alkali labile sites*)

CA – strukturne aberacije kromosoma (od engl. *chromosomal aberration*)

CBMN – citohalazinom blokirani mikronukleus test (od engl. *cytokinesis-block micronucleus assay*)

CD 71 – receptor za transferin (od engl. *cluster differentiation* 71)

CFU-E – stanice koje stvaraju kolonije eritrocita (od engl. *colony-forming unit erythrocyte*)

CNS – središnji živčani sustav (od engl. *central nervous system*)

DMSO – dimetil sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

DSB – dvolančani lom (od engl. *double-strand break*)

GAE – galna kiselina ekvivalent

LMP – tvar niskog tališta (od engl. *low melting point*)

NMP – tvar normalnog tališta (od engl. *normal melting point*)

OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (od engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*)

RNA – ribonukleinska kiselina (od engl. *ribonucleic acid*)

SCE – izmjena sestrinskih kromatida (od engl. *sister chromatid exchanges*)

SCGE – mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu (od engl. *single cell gel electrophoresis assay*)

SSB – jednolančani lom (od engl. *single-strand break*)

US EPA - Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (od engl. *United States Environmental Protection Agency*)

# Sadržaj

**1. UVOD** ..... **1**
1.1. Obična planika (*Arbutus unedo L.*) ..... 1
1.2. Utjecaj obične planike na zdravlje ..... 4
1.3. Fitokemijski sastav lista obične planike ..... 5
1.3.1. Fenolni spojevi ..... 5
1.3.1.1. Flavonoidi ..... 8
1.3.1.1.1. Flavanoli ..... 8
1.3.1.1.2. Flavonoli ..... 9
1.3.1.2. Tanini ..... 9
1.3.1.3. Arbutin ..... 9
1.3.2. Eterična ulja ..... 12
1.4. Metode određivanja genotoksičnosti ..... 13
1.4.1. Komet test ..... 13
1.4.2. Mikronukleus test ..... 15
1.5. Cilj istraživanja ..... 17
**2. MATERIJALI I METODE** ..... **18**
2.1. Biljni materijal i priprema vodenog ekstrakta lista obične planike ..... 18
2.2. Priprema otopine arbutina ..... 18
2.3. Pokusne životinje ..... 18
2.4. Obrada i tretman životinja ..... 19
2.5. Komet test ..... 20
2.6. Mikronukleus test *in vivo* ..... 22
2.7. Statističke metode ..... 22
**3. REZULTATI** ..... **23**
3.1. Rezultati komet testa na leukocitima periferne krvi štakora ..... 23
3.2. Rezultati komet testa na stanicama bubrega štakora ..... 29
3.3. Rezultati komet testa na stanicama jetre štakora ..... 35
3.4. Rezultati mikronukleus testa ..... 41
**4. RASPRAVA** ..... **43**
**5. ZAKLJUČAK** ..... **46**
**6. LITERATURA** ..... **47**

# 1. UVOD

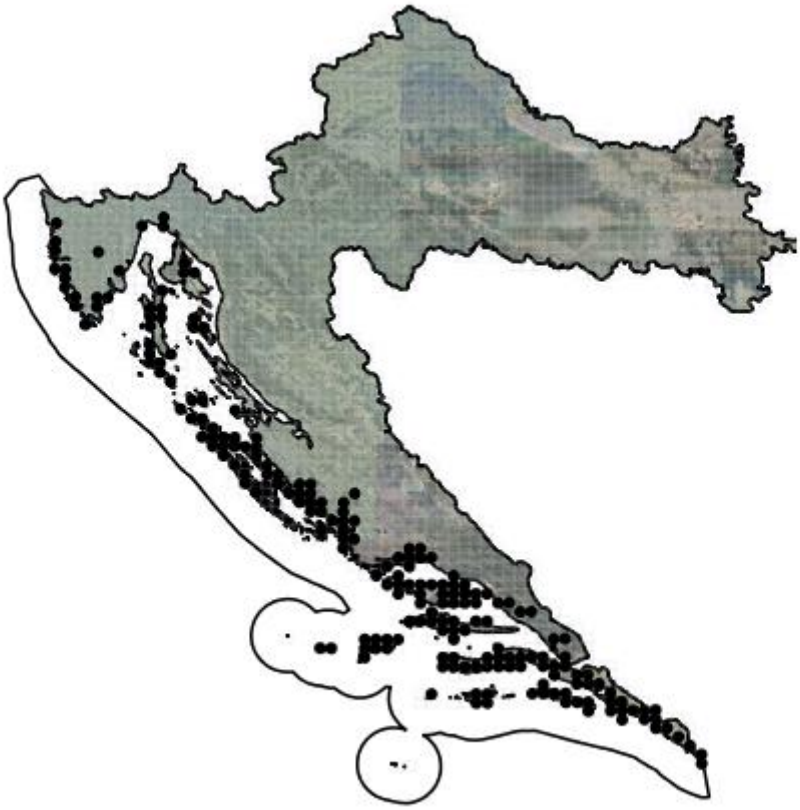
Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je vrsta iz porodice vrijesova, rasprostranjena u zemljama oko Sredozemnog mora gdje nastanjuje makije i šume crnike te samoniklo raste kao visoki grm ili nisko stablo. Svi dijelovi biljke koriste se u narodnoj medicini. Iako svoju primjenu nalazi u liječenju različitih oboljenja i ozljeda, najčešće se koristi kao dodatna terapija kod gastrointestinalnih i uroloških problema (Maleš i sur., 2006; Oliveira i sur., 2011; Jurica i sur., 2015).

Od biološki aktivnih tvari u listu obične planike prisutni su fenoli, terpenoidi, α tokoferol i eterična ulja, a utvrđen je i relativno visok sadržaj arbutina i ukupnih hidrokinonskih derivata kojima se pripisuje antimikrobni učinak. Aktivna tvar arbutin metaboliziranjem pod utjecajem bakterija crijevne flore u gastrointestinalnom traktu prelazi u hidrokinon potencijalno hepatotoksičnog i genotoksičnog učinka (Blaut i sur., 2006; Oliveira i sur., 2011; Pavlović i sur., 2009).

## 1.1. Obična planika (*Arbutus Unedo* L.)

Obična planika je zimzelena biljna vrsta koja taksonomski pripada porodici vrijesova, rodu planika. Prvi ju je opisao Carl Linnaeus 1753. godine u djelu *Species Plantarum*. Prema etimologiji, znanstveni naziv vrste „unedo“ izveden je od latinske fraze „unum tantum edo“ što u prijevodu znači „jedem samo jedan“, aludirajući pri tom na umjerenu konzumaciju plodova planike (Vidrih i sur., 2013). Narodna imena u hrvatskom govornom području uključuju sljedeće nazive: planičac, planika, obična planika, metličasta planika, magunja, manjiga, jagodica, jagodica rast.

Planika je mediteranska vrsta rasprostranjena na širokom području Sredozemlja gdje joj stanište najčešće čine makije, vazdazelene šume hrasta crnike i šume alepskog bora. U Hrvatskoj je rasprostranjena duž Jadranske obale, uključujući otoke (Slika 1). Obična planika je biljka punog svjetla, pokazatelj je ekstremne topline i suhih tala (Nikolić, 2015). Postoje zapisi o pronalasku vrste duž Jugozapadne obale Irske što pokazuje da se uspjela prilagoditi i hladnijim podnebljima s više vlage iako mladi izbojci biljke stradaju za suviše jakih zima (Miguel i sur., 2014; Oliveira i sur., 2011; Bracanović, 1941).



**Slika 1.** Rasprostranjenost *Arbutus unedo* L. u Hrvatskoj (Nikolić, 2015).

Obična planika se javlja u obliku nanofanerofita. Grm ili nisko drvo najčešće doseže visinu od 1,5 do 3 metra iako može narasti i do 12 metara visoko (Nikolić, 2015; Maleš i sur., 2013). Biljka ima dug i dobro razgranat korijen te jaku izbojnu snagu iz korijena. Crvenkastosmeđa kora planike ljušti se u uzdužnim ljuskama.

Peteljke listova također su crvenkaste boje, dužine 3-10 mm te nose naizmjenično raspoređene listove dužine 5-10 cm, a širine 2-3 cm. Listovi su cjeloviti, jajasto izduženog oblika, nazubljenog ruba i ušiljenog vrha. Razlikujemo kožasto, sjajno i tamnozeleno lice lista od naličja svjetlije zelene boje bez sjaja (Slika 2).

Viseći grozdasti cvatovi dužine 5 cm sastoje se od zvonolikih cvjetova bijele do svjetloroze boje. Cvjetovi su dugi 8-9 mm. Planika cvate u jesen i ranu zimu, od listopada do prosinca. (Hajdić, 2009; Bracanović, 1941). Medonosna je biljka, a med je žute boje i gorkastog okusa. Zbog cvjetanja planike u zimskim mjesecima, nektar ponekad ostaje neprerađen zbog čega je podložniji kvarenju u saću (Šimić, 1980).

Biljka nosi plodove, maginje, koji se razvijaju iz nadrasle plodnice planike. Maginje su okrugle bobe promjera 1-2 cm, ovisno o stupnju zrelosti. O stupnju zrelosti ovisi i boja plodova koja varira od žute, preko narančaste do crvene boje. Vanjska površina maginja gusto je prekrivena bradavičastim izraslinama dok je usplođe mesnato i sočno s mnoštvom sitnih sjemenki smeđe boje (Slika 2). Iako jestivi, u većim količinama sirovi plodovi slatko kiselog okusa izazivaju probavne smetnje uz moguću vrtoglavicu i stanje slično pijanstvu. Zbog navedenog, plodovi se često prerađuju te se od njih proizvode marmelade, džemovi i alkoholna pića poput likera, rakija i vina. Plodovima je za sazrijevanje potrebno 12 mjeseci do čega dolazi između listopada i prosinca, u vrijeme cvatnje.

Dekorativan izgled koji se postiže istovremenom cvatnjom i prinosom plodova u zimskim mjesecima jedan je od razloga zbog kojih se planika nerijetko uzgaja kao ukrasna biljka (Maleš i sur., 2013; Olivera i sur., 2011; Hajdić, 2009).

S ekološkog stajališta obična planika je važna biljna vrsta jer pomaže u održavanju biološke raznolikosti faune određenog područja te sprječava eroziju tla (Gomes i sur., 2009). Svoju primjenu nalazi i u fitoremedijaciji tla gdje pomaže u sanaciji tla kontaminiranih arsenom (Moreno-Jiménez i sur., 2008).



**Slika 2.** Plod i cvat obične planike.
(izvor: http://medecine.savoir.fr/arbousier-arbutus-unedo-l-proprietes-medicinales/)

### 1.2. Utjecaj obične planike na zdravlje

Povoljan utjecaj obične planike na zdravlje prepoznat je u narodu zbog čega gotovo svi dijelovi biljke svoju primjenu nalaze u tradicionalnoj medicini (Oliveira i sur., 2011).

Pripravci korijena i kore koriste se kao pomoć u liječenju poremećaja urinarnog sustava tj. bolesti mokraćnog mjehura i bubrega (Kivçak i sur., 2001). Budući da pomažu u izbacivanju tekućine iz organizma putem urinarnog sustava, primjenjuju se i kao prirodni diuretici (Ziyyat i sur., 1997). Utjecaj pripravaka na kardiovaskularni sustav uključuje: poboljšanu vaskularnu reaktivnost i povećanu osjetljivost baroreceptora, prevenciju hipertrofije miokarda, sprečavanje tromboze te vazodilataciju (Ziyyat i Boussairi, 1998; Mekhfi i sur., 2004; Oliveira i sur., 2011; Afkir i sur., 2008). Važnost vazodilatacijskog učinka navedenih pripravaka očituje se u regulaciji krvnog tlaka. Naime, širenjem krvnih žila povećava se krvni protok što za posljedicu ima snižavanje visokog krvnog tlaka. Pripravci korijena i kore djeluju i na gastrointestinalni sustav gdje se primjenjuju za uklanjanje trbušnih tegoba te kao pomoć kod proljeva (Ziyyat i sur., 1997). Osim toga, pripravci se koriste i kao pomoćna terapija kod dermatoloških problema (Novais i sur., 2004). Dosadašnja istraživanja ukazuju na antimikrobna svojstva vodenog i metanolnog ekstrakta korijena obične planike u vidu inhibicije rasta bakterija *Escherichia Coli* i *Staphylococcus aureus* (Miguel i sur., 2014; Dib i sur., 2010; Dib i sur., 2013).

Kahriman i sur. (2010) ukazuju na antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja ekstrahiranog iz cvijeta obične planike. Pokusom je utvrđeno da ulje inhibira rast bakterija *Listeria monoyitogenes* ATCC 43251 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Isbilir i sur. (2012) utvrđuju mnoštvo polifenola u sastavu vodenog, metanolnog i etanolnog ekstrakta cvijeta obične planike kojima pripisuju antioksidativno djelovanje. Planika je medonosna biljka. Med je žute boje i gorkog okusa za koji je zaslužna homogentizična kiselina koja čini više od polovice (50-60%) ukupno izoliranih polifenola iz meda planike. Utjecaj meda na ljudsko zdravlje je predmet brojnih istraživanja, a u okviru istih pripisuju mu se antioksidativna i antiradikalna svojstva zahvaljujući polifenolima koji ulaze u njegov sastav (Tuberoso i sur., 2010; Tuberoso i sur., 2013).

U tradicionalnoj medicini plodovi obične planike se koriste u tretmanu gastrointestinalnih poremećaja, dermatoloških i uroloških problema, kao i kod kardiovaskularnih bolesti (El-Hilaly i sur., 2003; Leonti i sur., 2009; Cornara i sur., 2009). El-

Hilaly i sur. (2003) ukazuju na pozitivno djelovanje sirovih plodova u patološkim stanjima kao što su gastritis i bolesti bubrega. Plodovi sadrže značajne količine polifenola za koje se smatra da smanjuju rizik od nastanka tumora, koronarnih bolesti srca i drugih degenerativnih bolesti. Bez obzira na to, plodovi se rijetko konzumiraju sirovi, neprerađeni (Fortalezas i sur., 2010). Iz ploda je, kao i iz cvijeta, izolirano eterično ulje kojem se pripisuje antibakterijsko djelovanje (Kahriman i sur., 2010).

U narodnoj medicini pripravci lista se koriste kod raznih patoloških stanja koja uključuju gastrointestinalne i kardiovaskularne poremećaje, urološke i dermatološke probleme, bolesti bubrega i srca, dijabetes i hemeroide (Ziyyat i sur., 1997; Kivçak i sur., 2001; El-Hilaly i sur., 2003; Cornara i sur., 2009). Pripravci lista pokazuju protuupalno, antioksidacijsko, antidijaroično, diuretsko i adstringentno djelovanje te antitrombocitni-antiagregacijski učinak (Maleš i sur., 2015; Leonti i sur., 2009). Brojna istraživanja ukazuju na vazodilatacijska svojstva lista obične planike što ima veliku ulogu u regulaciji arterijskog tlaka (Afkir i sur., 2015; El Haouari i sur., 2007; Oliveira i sur., 2011). Za vazodilatacijske učinke zaslužno je djelovanje tanina i katehin galata prisutnih u sastavu lista obične planike (Legssyer i sur., 2004; Lim, 2012).

## 1.3. Fitokemijski sastav lista obične planike

### 1.3.1. Fenolni spojevi

Pod pojmom fenoli podrazumijevamo skupinu spojeva kod kojih je hidroksilna grupa (-OH) direktno vezana na aromatski prsten. Najjednostavniji predstavnik je fenol ($C_6H_5OH$) po kojem skupina nosi i ime. Prema broju hidroksilnih skupina fenole dijelimo na monohidroksilne, dihidroksilne i polihidroksilne fenole. Ovi spojevi su široko rasprostanjeni u prirodi, a u različitom sastavu i broju su prisutni u listu i cvijetu obične planike (Isbilir i sur., 2012; Oliveira i sur., 2011). Jurica (2016) donosi polifenolni profil lista obične planike na temelju određivanja kvalitativnog fenolnog sastava vodenog i metanolnog ekstrakta lista obične planike pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (Tablica 1). U biljnih vrsta fenolni spojevi nastaju kao rezultat sekundarnog metabolizma, a djeluju kao obrambeni mehanizam u borbi protiv patogenih mikroorganizama (Baidez i sur., 2007). Zahvaljujući antioksidativnim svojstvima, sprječavaju nastanak slobodnih radikala i umanjuju oksidativni stres. Antioksidativna aktivnost fenolnih spojeva ovisi o ukupnom broju i

smještaju -OH grupa, a mjeri se određivanjem ukupnih fenola (Kazazić, 2004). Brojna dosadašnja istraživanja pružaju podatke o količini ukupnih fenola u listu obične planike (Tablica 2) (Jurica, 2016).

**Tablica 1.** Polifenolni profil lista obične planike (Jurica, 2016).

| Broj pika | Naziv spoja | Polifenolna grupa | Vodeni ekstrakt | Metanolni ekstrakt |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Arbutin | fenolni glukozid | + | + |
| 2. | Hidroksibenzojeva kiselina *O*-heksozid izomer 1 | derivat fenolne kiseline | + | + |
| 3. | Dihidroksibenzojeva kiselina *O*-heksozid | derivat fenolne kiseline | + | + |
| 4. | Galokatehin | flavanol | + | + |
| 5. | Protokatehinska kiselina | fenolna kiselina | + | + |
| 6. | Hidroksibenzojeva kiselina *O*-heksozid izomer 2 | derivat fenolne kiseline | + | + |
| 7. | Eskulin | kumarinski glukozid | + | + |
| 8. | Galoil arbutin | derivat fenolnog glukozida | + | + |
| 9. | Kumarinska kiselina *O*-heksozid | derivat fenolne kiseline | + | + |
| 10. | Klorogenska kiselina | fenolna kiselina | + | + |
| 11. | Katehin | flavanol | + | + |
| 12. | *p-Hidroksibenzojeva kiselina* | fenolna kiselina | + | + |
| 13. | Kafeinska kiselina | fenolna kiselina | + | + |
| 14. | Elaginska kiselina *O*-heksozid | derivat fenolne kiseline | + | + |
| 15. | Siringinska kiselina (3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzojeva kiselina) | fenolna kiselina | + | + |
| 16. | Vanilinska kiselina (4-hidroksi -3-metoksibenzojeva kiselina) | fenolna kiselina | + | + |
| 17. | Miricetin 3-*O*-rutinozid | derivat flavonola | + | + |
| 18. | Miricetin 3-*O*-heksozid | derivat flavonola | + | + |
| 19. | Elaginska kiselina *O*-pentozid | derivat fenolne kiseline | + | + |
| 20. | Miricetin *O*-pentozid izomer 1 | derivat flavonola | + | + |
| 21. | Rutin (Kvercetin 3-*O*-rutinozid) | derivat flavonola | + | + |
| 22. | p-Hidroksifenil octena kiselina | derivat fenil octene kiseline | + | + |
| 23. | Miricetin *O*-pentozid izomer 2 | derivat flavonola | + | + |
| 24. | Miricitrin (Miricetin 3-*O*-ramnozid) | derivat flavonola | + | + |
| *25.* | *p-Kumarinska kiselina* | fenolna kiselina | + | + |
| 26. | Elaginska kiselina | fenolna kiselina | + | + |
| 27. | Katehin 3-galat | flavanoli | + | + |
| 28. | Vanilin (4-hidroksi-3-metoksi-benzaldehid) | fenolni aldehid | + | + |
| 29. | Kamferol 7-*O*-rutinozid | derivat flavonola | + | + |
| 30. | Ferulinska kiselina (4-Hidroksi-3-metoksi cinaminska kiselina) | fenolna kiselina | + | + |
| 31. | Morin | flavonol | – | + |
| 32. | Kvercetin *O*-pentozid izomer 1 | derivat flavonola | + | + |
| 33. | Naringin | flavanon glikozid | + | + |
| 34. | Kvercetin *O*-pentozid izomer 2 | derivat flavonola | + | + |
| 35. | Kvercetin derivat | derivat flavonola | + | + |
| 36. | Miricetin | flavonol | + | + |
| 37. | Kamferol 3-*O*-pentozid | derivat flavonola | + | + |
| 38. | Kvercetin 3-*O* heksuronid | derivat flavonola | + | + |
| 39. | Kamferol 7-*O* pentozid | derivat flavonola | + | + |
| 40. | Kamferol 7-*O* heksuronid | derivat flavonola | + | + |
| 41. | Kamferol 7-*O* ramnozid | derivat flavonola | + | + |
| 42. | Koniferil aldehid | fenolni aldehid | + | + |
| 43. | Kvercetin 3-*O*-*p*-kumaroil heksozid | derivat flavonola | + | + |
| 44. | Kamferol 7-*O*-*p* kumaroil heksozid | derivat flavonola | + | + |
| 45. | Kvercetin | flavonol | + | + |
| 46. | Cimetna kiselina | fenolna kiselina | + | + |
| 47. | Naringenin | flavanon | + | + |
| 48. | Kamferol | flavonol | + | + |

+ spoj detektiran u listu; – spoj nije detektiran u listu

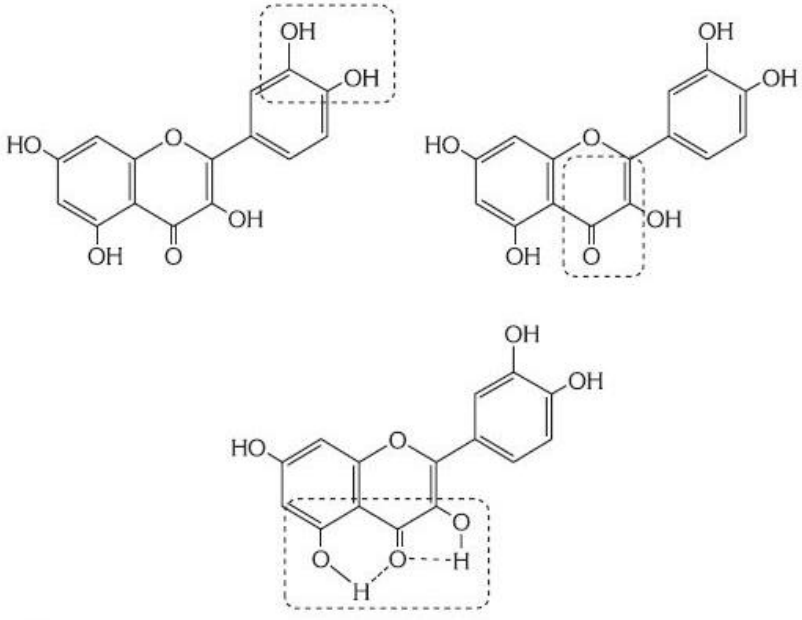
**Tablica 2.** Ukupni fenoli u listu obične planike u dosadašnjim istraživanjima (Jurica, 2016).

| Uzorak | Mjesto i godina rasta | Vrsta ekstrakcije | Ukupni fenoli (% ili mg GAE/g ekstrakta) | Literatura |
|---|---|---|---|---|
| **list** | Arrabida<br>Portugal 2007 | voda/etanol<br>50% | ~18,0 | (Tavares *i sur.*, 2010) |
| **list** | Monthesito<br>Portugal 2008 | Voda | 170,3 ± 1,4 | (Mendes *i sur.*, 2011) |
| **list** | Monthesito<br>Portugal 2009 | Voda<br>Metanol<br>Etanol<br>Dietil eter | 172,21 ± 6,29<br>149,28 ± 5,33<br>192,66 ± 1,66<br>14,93 ± 0,54 | (Oliveira *i sur.*, 2009) |
| **list** | Djebel Amour<br>Alžir | Voda/etanol<br>70% | 104,98 ± 4,59 | (Boulanouar *i sur.*, 2013) |
| **list** | Braganca 1<br>Pinela 3<br>Donai<br>Vila Verde<br>Vila Boa 2<br>Portugal | Voda | 215,0 ± 18,2<br>184,4 ± 28,8<br>180,8 ± 39,7<br>199,3 ± 17,1<br>156,8 ± 3,8 | (Malheiro *i sur.*, 2012) |
| **list** | Božava i Orebić<br>Hrvatska 2003 | Metanol | | (Males *i sur.*, 2006) |
| **list** | Luštica<br>Crna Gora 2004 | Etanol 70% | 204,8 ± 3,6<br>mg CE/g ekst. lista<br>110,8 ± 0,30<br>mg CE/g suhog lista | (Pavlović *i sur.*, 2011) |
| **list** | Halkidiki<br>Grčka 2006 | Etanol 70% | 286,9 ± 5,7<br>Mg CE/g ekst. lista<br>158,2 ±0,1<br>mg CE/g suhog lista | (Pavlović *i sur.*, 2011) |
| **list** | Canakkale<br>Turska 2009 | voda<br>metanol<br>etanol | 197,16 ± 1,43<br>169,05 ± 0,82<br>119,97 ± 1,46 | (Orak *i sur.*, 2011) |
| **list** | Bejaia<br>Alžir 2009 | metanol | 179,6 ± 6,7 suhog lista | (Guendouze-Bouchefa *i sur.*, 2015) |

**GAE** – galna kiselina ekvivalent; **%** – postotak ukupnih spojeva

### 1.3.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi velike strukturne heterogenosti. Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$) s dva aromatska prstena (A, B) povezana preko piranskog oksigeniranog srednjeg prstena (C) s jednim od tri slobodna ugljikova atoma na prstenu C (Kazazić, 2004; Tsao, 2010). Skupina flavonoida obuhvaća više od 6400 identificiranih spojeva. Oni se prirodno nalaze u biljkama, najčešće u obliku 3-O-glikozida ili polimera. U biljaka flavonoidi imaju zaštitno djelovanje, štite od patogenih mikroorganizama i UV zračenja. Osim toga, služe kao fotoreceptori i agensi za privlačenje pozornosti. Antioksidativna svojstva flavonoida proizlaze iz njihove sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (Slika 3) (Kazazić, 2004). Flavonoidi izolirani iz lista obične planike u sklopu dosadašnjih istraživanja obuhvaćaju sljedeće spojeve: katehin galat, miricetin, afzelin, avikularin, rutin, juglanin, rutin (Males i sur., 2006).




**Slika 3.** Strukturne skupine flavonoida važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

#### 1.3.1.1.1. Flavanoli

Flavanoli su fenolni spojevi koji pripadaju skupini flavonoida, a u prirodi se pojavljuju u obliku monomera i polimera. Od flavanola, u ekstraktu lista obične planike dokazana je prisutnost katehina, dimera procijanidina i estera galne kiseline (Mendes i sur., 2011; Miguel i

sur., 2014). Od velike su biološke važnosti zbog snažnog antioksidativnog djelovanja. Pojedini autori navode kako flavanoli imaju veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala od flavona što se pripisuje većem broju hidroksilnih skupina te hidroksilnoj skupini u položaju 3- (Rice-Evans i sur., 1996; van Acker i sur., 1996)

#### 1.3.1.1.2. Flavonoli

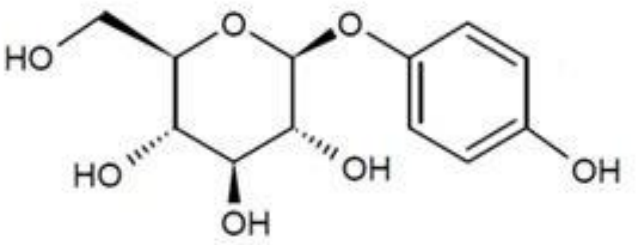
Flavonoli su biološki aktivni spojevi svrstani u skupinu flavonoida, a pronađeni gotovo u svakoj biljci (Kazazić, 2004). Flavonoli prisutni u listu obične planike su kvercetin i kamferol (Mendes i sur., 2011; Miguel i sur., 2014). Kvercetin je izuzetno snažan antioksidans. Ima visoku sposobnost hvatanja slobodnih radikala te posjeduje sposobnost interakcije s drugim antioksidansima što rezultira sinergijskim učinkom (Kazazić, 2004).

### 1.3.1.2. Tanini

Tanini su polifenolni spojevi antibakterijskog, protuupalnog i antimutagenog djelovanja. Dijelimo ih na hidrosolubilne i kondenzirane tanine (Jurica, 2016). Brojna istraživanja ukazuju na prisutnost tanina u listu obične planike (Oliveira i sur., 2011). Legssyer i sur. (2004) su testirali ekstrakt lista obične planike koristeći različita sredstva kao otapala s ciljem procjene vazodilatacijskog učinka na aortalnom krugu štakora. Dokazano je snažno vazodilatacijsko djelovanje koje se smatra posljedicom prisutnosti kondenziranih tanina i katehin galata. Mekhfi i sur. (2006) prisutnost tanina u listu obične planike povezuju s usporavanjem procesa zgrušavanja krvi uslijed smanjenog nakupljanja trombocita.

### 1.3.1.3.Arbutin

Fenolni glikozid 4-hidroksifenil-b-D-glukopiranozid, kratko nazvan arbutin (Slika 4), je dobio značajnu pozornost, o čemu kao dokaz svjedoči više od 735 radova objavljenih u razdoblju od 1995.-2010. godine koji sadržavaju izraz "arbutin". Arbutin ima dva dijastereoizomera, alfa i beta. Beta arbutin je prirodno sadržan u biljkama dok se alfa arbutin dobiva kemijskom sintezom (Nycz i sur., 2010). Sinteza se odvija uz djelovanje brojnih enzima, iz acetobromglukoze i hidrokinona ili reakcijom b-D-glukoze pentaacetata i hidrokinon monobenzila u prisutnosti fosfornog oksiklorida (Kitao i Sekine, 1994).




**Slika 4.** 2D struktura arbutina.

Arbutin je prirodno prisutan u sastavu mnogih biljnih vrsta kao što su obična planika (*Arbutus unedo* L.), medvjetka (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng.), brusnica (*Vaccinium vitis-idaea* L.), kruška (*Pyrus communis* L.) i bergenija (*Bergenia crassifolia*) (Pop i sur., 2009). List bergenije naveden je u literaturi kao jedan od najbogatijih arbutinom. Arbutin je općenito prisutan u biljkama u kombinaciji s metil-arbutinom, posebno u porodici vrijesovki (*Ericaceae*). Oliveira i sur. (2009) na temelju spektrofotometrijskog ispitivanja ističu arbutin kao najzastupljeniji fenolni spoj u listu obične planike (627 mg/kg).

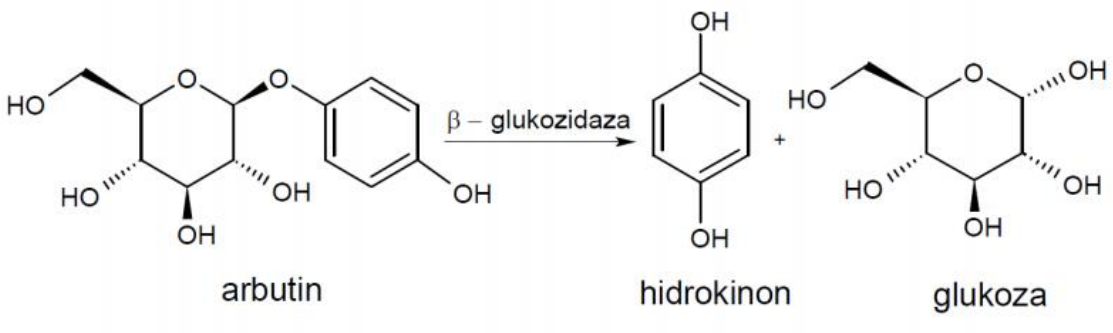
Prirodni proizvodi koji sadrže arbutin uglavnom se koriste kao diuretici ili služe za tretiranje infekcija urinarnog trakta, cistitisa i bubrežnih kamenaca. Inhibicija proliferacije patogena fenolnim spojevima, kao što je arbutin, pripisuje se njihovom oksidativnom potencijalu (Nycz i sur., 2010). Arbutin se zbog niske citotoksičnosti koristi u nekim proizvodima koji služe za izbljeđivanje kože, kao pomoćna terapija kod hiperpigmentacije (Liang i sur., 2016; Hu i sur., 2009). Dodatno, arbutin se koristi kao stabilizator za boje za fotografije, a spominje se i u brojnim studijama kao fenol djelotvoran protiv starenja, UV-B/UV-C zračenja i za ublažavanje bolova, kao i za zacjeljivanje rana bez ožiljaka (Nycz i sur., 2010).

Prema Swann i sur. (1983), proizvodnja i korištenje arbutina kao inhibitora oksidacije, inhibitora polimerizacije, kemijskog posrednika u ostalim kemijskim reakcijama i kao sastojka u kozmetici može dovesti do ispuštanja određenih količina arbutina u okoliš kroz različite vrste otpada. Ako je arbutin pušten u zrak, procjenjuje se da je njegov tlak pare 2.3X10-12 mm Hg na 25°C što znači da će arbutin postojati samo u fazi čestica u atmosferi. Faze čestice arbutina će biti uklonjene iz atmosfere mokrim ili suhim taloženjem. Kemijska struktura arbutina je takva da nijedan dio njegove molekule nije u stanju apsorbirati na valnim duljinama >290 nm i zbog toga se ne očekuje da će biti osjetljiv na izravnu fotolizu sunca. Ukoliko dođe do apsorpcije arbutina u tlo očekuje se vrlo visoka pokretljivost molekula

arbutina. Podatci o biorazgradnji arbutina u tlu nisu dostupni. Ako je pušten u vodu, arbutin se neće adsorbirati na suspendirane tvari i sediment. Molekule arbutina u vodi neće ishlapiti niti će proces hidrolize utjecati na okoliš jer ovaj spoj nema funkcionalne skupine koje hidroliziraju pod uvjetima okoline (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/arbutin #section=Environmental-Fate-Exposure-Summary).

Profesionalna izloženost arbutinu može se javiti putem udisanja i kožnog kontakta na radnim mjestima gdje se arbutin proizvodi ili koristi. Do sad prikupljeni podatci pokazuju da opća populacija može biti izložena arbutinu putem uzimanja određenih namirnica i dermalnim kontaktom s ovim spojem ili drugim potrošačkim proizvodima koji sadržavaju arbutin. Medvjedka je vrsta s visokim sadržajem arbutina koja je najčešće konzumirana zbog njegovog povoljnog utjecaja na suzbijanje infekcija urinarnog trakta. Kozumira se u obliku zdrobljenog lišća, praha ili vodenog ekstrakta, izlažući pri tom potrošače dozi od 400 do 840 mg arbutina po danu. (Deisinger, 1996).

U tijelu se arbutin pretvara u hidrokinon, koji ima antimikrobna i dezinfekcijska svojstva, a također je inhibitor formiranja melanina. Enzim koji sudjeluje u pretvorbi arbutina u hidrokinon naziva se beta glukozidaza, a sam proces konverzije se odvija u enterocitima crijevnih resica probavnog sustava (Blaut i sur., 2006) (Slika 5).




**Slika 5.** Biotransformacija arbutina u hidrokinon.

Hidrokinon je uvršten među kancerogene spojeve koji djeluju na štakore, a klasificiran je i kao leukemogen za ljude. U istraživanjima kronične toksičnosti kod glodavaca uočeno je da je hidrokinon pokazao kancerogene osobine, na što ukazuje činjenica da potiče nastanak benignih tumora jetre i bubrega, kao i nastanak mononuklearne leukemije (Whysner i sur., 1995; Roza i sur., 2003). Osim ovih negativnih svojstava hidrokinona, uočeno je da on pozitivno djeluje kao inhibitor lipidne peroksidacije, čime su pokazane njegove antimutagene

i antioksidacijske osobine (Soucek i sur., 2000; Roza i sur., 2003). Osim životinjskih stanica istraživane su i ljudske. Ljudski limfociti u uvjetima *in vitro* tretirani su hidrokinonom u rasponu količina koje bi imale toksično ili subtoksično djelovanje. Nakon određenog vremenskog intervala (24, 41 i 48 sati) nije uočena nikakva strukturna promjena kromosoma u tretiranim stanicama (Khadir i sur., 2015; Pavlović i sur., 2009; Roza i sur., 2003).

I arbutin i hidrokinon posjeduju inhibicijski učinak na enzim tironazu (Nycz i sur., 2010). Prednost arbutina naspram hidrokinona je veća stabilnost, a osim toga uzrokuje manje iritacije ili njegovo djelovanje uopće ne uzrokuje iritacije na koži. Nema neugodan miris, a nisu zabilježene ni nuspojave kao posljedice korištenja arbutina. Nedostatak arbutina u odnosu na hidrokinon je cijena. Biosintetski, biljke koje sadrže enzim glukoziltransferazu mogu aktivirati određene biokemijske putove pri čemu dolazi do konverzije, odnosno pretvaranja hidrokinona u arbutin. Cijena arbutina je značajno veća (~ 200 puta) od cijene hidrokinona (Kittipongpatana i sur., 2007). Kittipongpatana i sur. (2007) smatraju logičnim razvoj sustava postrojenja za stanične kulture koje mogu pretvoriti manje skup hidrokinon u arbutin. Takvi sustavi mogu koristiti poznate biljke koje su u mogućnosti proizvoditi arbutin ili sustave koji proizlaze iz biljaka koje ne mogu akumulirati arbutin, ali su sposobne za obavljanje procesa glikozilacije.

### 1.3.2. Eterična ulja

Eterična ulja su kompleksne smjese različitih kemijskih spojeva. Moguće ih je izolirati iz različitih dijelova mnogih biljnih vrsta u kojima nastaju kao produkti disimilacijske izmjene tvari u biljnoj protoplazmi. Iako je prisutnost eteričnih ulja u mnogobrojnim istraživanjima dokazana u listu planike, ista se u većoj mjeri nalaze u cvijetu obične planike (Oliveira i sur., 2011). Kivcak i sur. (2001) su analizirali sastav eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom iz obične planike s područja Turske. Analiza je pokazala da eterično ulje sadrži 37 komponenata od kojih su najzastupljenije sljedeće: (E)-2-dekenal (12,0 %), α-terpineol (8,8 %), heksadekanoična kiselina (5,1 %) i (E)-2-undekanal (4,8 %). Eteričnim uljima ekstrahiranim iz cvijeta i ploda obične planike pripisuje se antibakterijsko djelovanje (Kahriman i sur., 2010).

## 1.4.Metode određivanja genotoksičnosti

### 1.4.1. Komet test

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu (SCGE – od engl. *single cell gel electrophoresis assay*) je tehnika za detekciju i procjenu oštećenja DNA molekule uzrokovanih različitim kemijskim i fizikalnim agensima. Osim toga, pomoću komet testa moguće je praćenje popravka stanične DNA te detekcija stanica u apoptozi kao i nekrotičnih stanica (Slika 5). Metoda se primjenjuje u toksikologiji, gdje je uobičajena u istraživanjima genotoksičnosti u uvjetima *in vivo* i *in vitro,* a temelji se na uklapanju stanica u agarozni gel, lizi i denaturaciji staničnih struktura te bojanju i analiziranju preparata (Slika 6) (Sreelatha i sur., 2015).

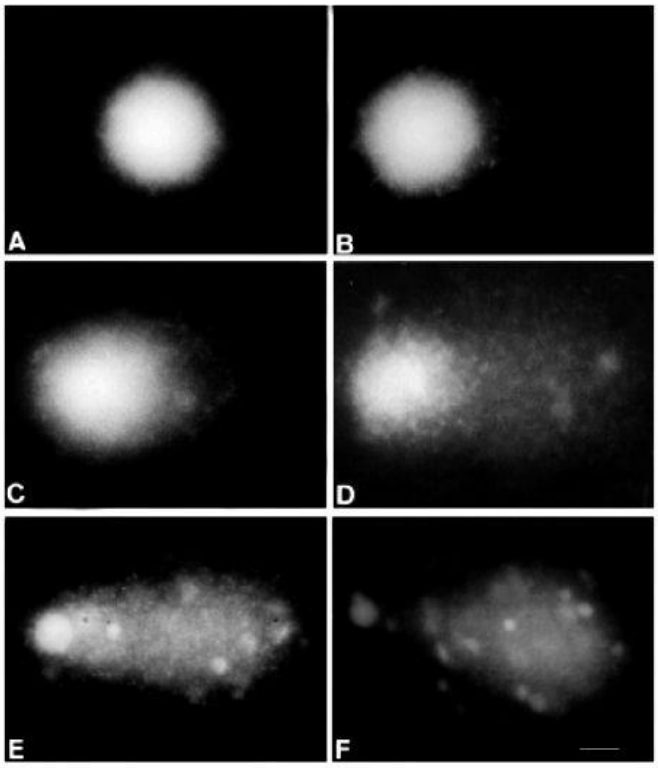
Prvu mikroelektroforezu s ciljem procjene oštećenja DNA na razini pojedinačne stanice u neutralnim uvjetima proveli su Östling i Johanson 1984. godine. Četiri godine kasnije, 1988., Sigh i sur. po prvi puta provode ovu tehniku u alkalnim uvjetima (Olive i sur., 2006).

U prvom koraku komet testa, uklapanju stanica u agarozni gel na brušenom predmetnom stakalcu, gel formira matriks od ugljikovodičnih vlakana koja enkapsuliraju stanice što za posljedicu ima fiksaciju stanica na određenom mjestu. Osim toga, osmotska neutralnost gela omogućava prodor otopina kroz gel i djelovanje na stanice, a sve bez promjene položaja stanica (Rojas, 1999). Sljedeći korak je liza staničnih struktura pomoću visoke koncentracije soli etilendiamintetraoctene kiseline ($Na_2EDTA$) i detergenta čime se oslobađa ukupna stanična DNA. Nakon lize slijedi denaturacija DNA koja se ovisno o pH vrijednosti pufera za denaturaciju može provesti u neutralnim ili alkalnim uvjetima. Dok je metoda u neutralnim uvjetima pogodna samo za detekciju dvostrukih lomova DNA (Tice i sur., 2000; Fairbairn i sur., 1995), tipovi oštećenja DNA detektabilni alkalnim komet testom su:

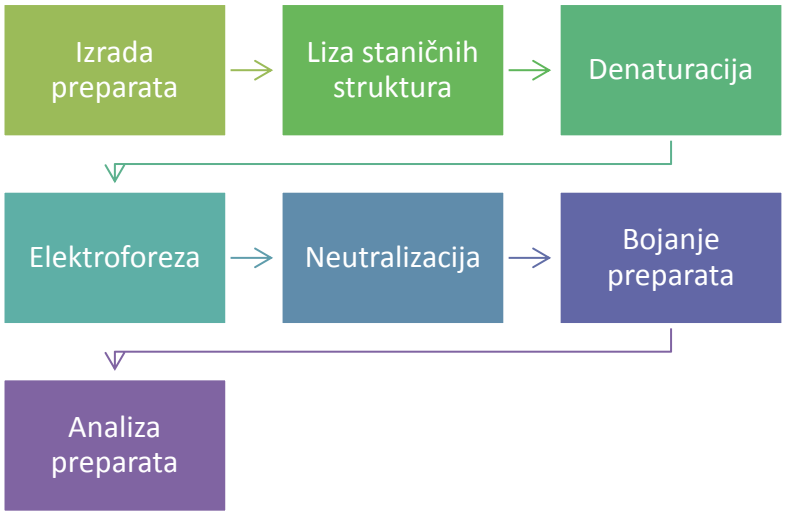
- jednolančani (SSB) i dvolančani (DSB) lomovi DNA molekule
- alkalno labilna mjesta; apurinska i apirimidinska mjesta (ALS)
- unakrsno povezivanje (cross-linking) s molekulom DNA ili proteinima

Sljedeći korak, zajednički u obje verzije, je elektroforeza. Tijekom elektroforeze negativno nabijeni fragmenti DNA pod utjecajem električnog polja putuju u agaroznom gelu prema anodi pozitivnog naboja. Brzina kretanja fragmenata DNA kroz gel se

razlikuje. Kraći fragmenti manje molarne mase putuju brže od dužih fragmenata veće molarne mase pa će u istom vremenskom periodu stići dalje. Tako neoštećena DNA zbog velike molarne mase uglavnom ostaje na mjestu formirajući time „glavu“, dok oštećeni fragmenti putuju kroz gel i tako formiraju „rep“ kometa, po čemu je tehnika i dobila ime (Sreelatha i sur., 2015) (Slika 6). Vizualizacija kometa vrši se epifluorescencijskim mikroskopom nakon bojanja preparata DNA-specifičnom fluorescencijskom bojom, najčešće etidij-bromidom. Analizira se 50-100 kometa po uzorku, a pomoću računalnog programa za analizu slike, za svaki pojedinačni komet istovremeno se mjeri više parametara. Tri osnovna parametra su dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost koju su fragmenti DNA prešli tijekom elektroforeze. Mjeri se od sredine glave kometa, a izražava se u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotni udio DNA koja je migrirala u rep, proporcionalan je broju lomova u DNA (Olive i sur., 1990; Tice i sur., 2000), a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se izračunava pomoću računalnog programa kao umnožak dužine repa i intenziteta repa kometa.




**Slika 5.** Različiti stupnjeva oštećenja DNA detektiranih komet testom (da Silva i sur., 2000): A – prikaz gotovo neoštećene DNA; B,C,D– prikaz oštećene DNA; E – prikaz maksimalnog oštećenja DNA; F – prikaz apoptotične stanice.



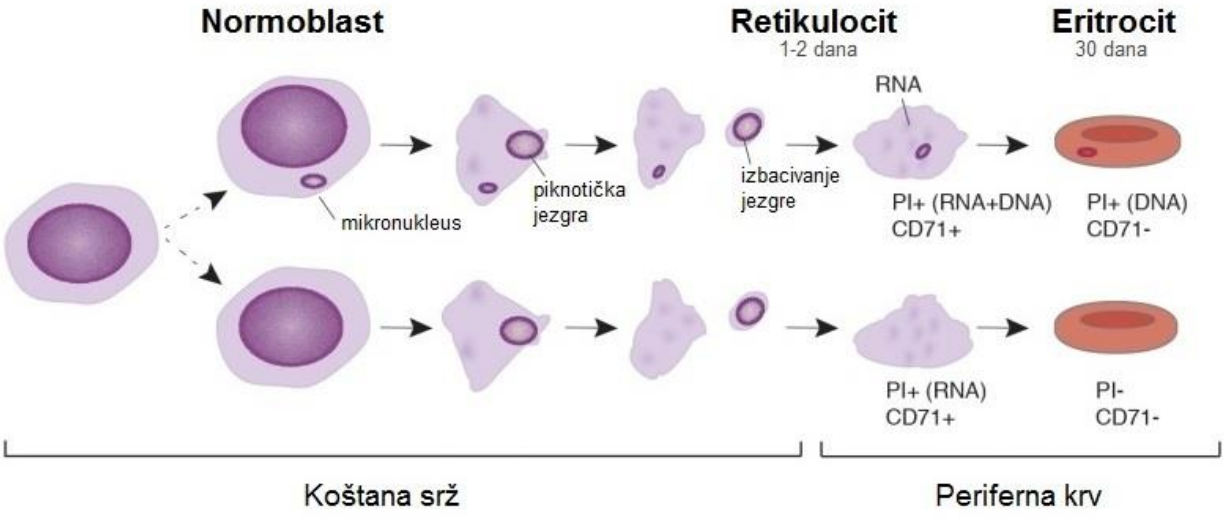

**Slika 6.** Shematski prikaz ključnih koraka alkalnog komet testa.

Komet test se može provesti na različitim vrstama stanica koje posjeduju jezgru, a brojne prednosti pred ostalim metodama određivanja oštećenja DNA uključuju: osjetljivost testa, brzinu izvođenja, reproducibilnost, jednostavnost primjene te niske troškove izvedbe (Olive i sur., 2006; Sreelatha i sur., 2015).

### 1.4.2. Mikronukleus test

Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje samostalno egzistiraju u citoplazmi. Promatrani svjetlosnim mikroskopom u interfaznoj stanici, mikronukleusi nalikuju staničnoj jezgri no manjeg su promjera, između 1/16 i 1/3 promjera glavnih jezgara (Fenech i sur., 2003; Kopjar i sur., 2010). Nastaju tijekom eritropoeze u koštanoj srži (Slika 7). Usmjerene matične stanice od kojih nastaju eritrociti nazivaju se stanice koje stvaraju kolonije eritrocita (CFU-E od engl. *colony-forming unit erythrocyte*). Prva stanica razvojnog ciklusa eritrocita koja nastaje od CFU-E je proeritroblast (Guyton i Hall, 2012). Proeritroblast se dijeli 4 puta, stvarajući na posljetku 16 zrelih eritrocita. Na razvojnom stupnju normoblasta stanica gubi sposobnost mitoze i započinje sa kondenzacijom kromatina. Jezgra se zgusne i smanji, a u konačnici dolazi do izbacivanja piknotičke jezgre iz stanice. U tom se stadiju stanica naziva retikulocit. Retikulociti protiskivanjem kroz pore kapilarne membrane migriraju iz koštane srži u perifernu krv gdje kroz dan-dva sazrijevaju u eritrocite. Zrele eritrocite karakterizira gubitak retikularne RNA mreže i gubitak ekspresije receptora za transferin (CD 71).

Mikronukleusi se u stanicama mogu formirati spontano tijekom mitoze u nekom od koraka eritropoeze. Jednom formiran, mikronukleus se za razliku od stanične jezgre ne izbacuje iz stanica tijekom sazrijevanja eritrocita. Međutim, nastanak mikronukleusa u normalnim, zdravim stanicama je iznimno rijedak (Balmus i sur., 2014). Do formacije mikronukleusa najčešće dolazi kao rezultat aneugenog ili rjeđe klastogenog učinka genotoksičnih tvari u uvjetima *in vivo* i/ili *in vitro* (Fučić i Mijić, 1999). Aneugeni interferiraju s mehanizmom ciklusa stanične diobe. Uslijed oštećenja ili gubitka funkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena sprječava se putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice tijekom mitoze. Tako zaostali kromosomi nakon citokineze u citoplazmi stanica kćeri kondenzacijom tvore mikronukleuse (Albertini i sur., 2000). Klastogeni učinak uvjetuje nastanak mikronukleusa kao posljedicu strukturalnih oštećenja kromosoma (od acentričnih ulomaka kromosoma) (Fučić i Mijić, 1999; Kopjar i sur., 2010).




**Slika 7.** Nastanak mikronukleusa tijekom eritropoeze (Balmus i sur., 2015).

Mikronukleus test je moguće provesti u *in vivo* i *in vitro* uvjetima.

*In vitro* metodu prvi puta su opisali Fenech i Marley 1985. godine (Fenech i Marley, 1985). Metoda je danas poznata pod nazivom citohalazinom blokirani mikronukleus test (CBMN od engl. *cytokinesis-block micronucleus assay*), a primjenjuje se u citogenetičkom nadzoru uz analizu strukturnih aberacija kromosoma (CA od engl. *chromosomal aberration*) i

analizu izmjena sestrinskih kromatida (SCE od engl. *sister chromatid exchanges*) (Fučić i Mijić, 1999; Kopjar i sur., 2010).

Metodu u uvjetima *in vivo* po prvi put opisuje Hayashi 1900. Godine (Hayashi i sur., 1900). Za potrebe testa, uzorak periferne krvi koristi se za izradu krvnog razmaza na predmetnom stakalcu premazanom akridin oranžom. Preparat se prekriva pokrovnicom te analizira pod fluorescentnim mikroskopom pri čemu jezgre i mikronukleusi fluoresciraju žuto, a retikulum crveno. Učestalost mikronukleusa određuje se analizom 1000 ili više retikulocita po životinji ili ispitaniku. Analizu je osim mikroskopom moguće izvršiti i pomoću protočnog citometra čime se broj analiziranih stanica po uzorku penje do 10000. Preparate je potrebno analizirati u roku od nekoliko dana nakon pripreme budući da je nedostatak metode nemogućnost pohrane preparata na duže vrijeme. Prednosti *in vivo* mikronukleus testa uključuju osjetljivost metode, brzinu izvođenja, jednostavnost pripreme i analiziranja preparata za izradu kojih su potrebne male količine uzoraka koji se višestruko mogu uzimati od iste životinje čime se eliminira potreba za negativnom kontrolom (Fučić i Mijić, 1999; Kopjar i sur., 2010; Suralles i sur., 1998).

## 1.5.CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je istražiti moguće genotoksično djelovanje ekstrakta lista obične planike (*Arbutus unedo* L.) i arbutina u dozi od 200 mg/kg. Istraživanje ćemo provesti na modelu *in vivo* (Lewis štakor), primjenom alkalnog komet testa na stanicama periferne krvi, bubrega i jetre te mikronukleus testa na retikulocitima periferne krvi.

# 2. MATERIJALI I METODE

## 2.1. Biljni materijal i priprema vodenog ekstrakta lista obične planike

Listovi obične planike (*Arbutus unedo* L.) prikupljeni su po principu slučajnosti s većeg broja stabala i grmova na području Malog Lošinja u svibnju 2013. godine (Jurica, 2016). Ukratko, uzorci listova osušeni su u tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi te samljeveni u prah u laboratorijskom mlinu. Iz dobivenog praha priređen je vodeni ekstrakt lista obične planike na sljedeći način. U Erlenmayerovoj tikvici pomiješano je 3 g praha s 80 mL destilirane vode. Tako dobivena vodena otopina stavljena je u ultrazvučnu kupelj na temperaturu od 50 °C i vrijeme od 60 minuta. Otopina je periodično vorteksirana svakih 15 minuta u trajanju od 20 sekundi. Nakon toga je uslijedilo centrifugiranje uzoraka na 4000 okretaja u minuti. Dobiveni supernatant liofiliziran je u liofilizatoru Hetosic (Heto, Danska) na temperaturi od -50 °C te u vremenskom periodu od 48 sati čime je dobiven suhi vodeni ekstrakt lista obične planike (Jurica, 2016). Budući da liofilizat posjeduje svojstvo higroskopnosti, pohranjen je u eksikatoru. Netom prije aplikacije, liofilizat je otopljen u redestiliranoj vodi na sobnoj temperaturi. Vodena otopina lista obične planike je aplicirana pokusnim životinjama u dozi od 200 mg/kg.

## 2.2. Priprema otopine arbutina

Vodena otopina arbutina pripremljena je otapanjem arbutina (98 %) proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka) u redestiliranoj vodi na sobnoj temperaturi. Suspenzija je aplicirana pokusnim životinjama u dozi od 200 mg/kg.

## 2.3. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na muškim i ženskim štakorima soja Lewis (Slika 8) starosti 60±5 dana uzgojenim na uzgajalištu Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su okoćene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (glodavaca). Hranjene su standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP, 4 RF 1, Mucedola, Settimo

Milanese, Milano, Italija), uz stalno dostupnu vodu *ad libitum*. Za provođenje pokusa na životinjama dobivena je suglasnost Etičkog povjerenstva PMF-a (URBROJ: 251-58-10617-14-104). Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006.) i prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, NN 55/13.



**Slika 8**. Štakor soja Lewis.
(izvor: http://www.hilltoplabs.com/public/lewis.html)

### 2.4. Obrada i tretman životinja

Životinje su slučajnim odabirom raspoređene u 6 skupina, od čega dvije kontrolne skupine (0,1) te 4 skupine (4,5,6,7) koje su tretirane istraživanim tvarima. Svaku skupinu čine po 4 životinje istog spola. Po dvije skupine životinja tretirane su arbutinom (4,5) tj. vodenim ekstraktom lista obične planike (6,7) tijekom 14 dana. Tretiranje pokusnih životinja provedeno je Sukladno s odredbom 407 OECD (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) i US EPA (engl. *United States Environmental Protection Agency*) preporukama o trajanju kratkoročnog toksikološkog tretiranja (OECD 407, 2008, Hayes WA, 2001). Kontrolne skupine tretirane su istim volumenom redestilirane vode. Kontrolne i tretirane skupine su tijekom trajanja istraživanja držane u istim uvjetima. Štakori su žrtvovani 24 sata nakon primjene zadnje doze radi uzimanja uzoraka krvi i organa (jetra, bubreg). Tijekom žrtvovanja sve su životinje bile adekvatno anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar ketamin) (0,8 mL/kg) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar ksilazin) (0,6 mL/kg).

### 2.5.Komet test

U ovom istraživanju primijenili smo standardnu izvedbu komet testa u alkalnim uvjetima (Sigh i sur. 1988) na leukocitima i stanicama bubrega i jetre.

*Priprema uzoraka za analizu*

Za pripremu preparata uzeli smo uzorak periferne krvi (5 µl) iz repne vene štakora. Suspenzije stanica (10 µl) ispitivanih organa pripremili smo mehaničkim usitnjavanjem tkiva bubrega i jetre u puferu za homogenizaciju [(0,075 M NaCl i 0,024 M $Na_2EDTA$, pH 7,5] prethodno ohlađenom na 4 °C.

Za potrebe komet testa pripremili smo 3 svježe otopine agaroze:

- 1 %-tna agaroza normalnog tališta (NMP od engl. *normal melting point*) (Sigma)
- 0,6 %-tna agaroza normalnog tališta (NMP od engl. *normal melting point*) (Sigma)
- 0,5 %-tna agaroza niskog tališta (LMP od engl. *low melting point*) (Sigma)

Na brušeno predmetno stakalce Pasteurovom pipetom smo nakapali priređenu 1% -tnu NMP agarozu. Stakalce smo pokrili pokrovnicom i ostavili na sobnoj temperaturi. Nakon polimerizacije agaroze na sobnoj temperaturi, uklonili smo gel i pokrovnicu s predmetnog stakalca. Na osušeno stakalce mikropipetom smo nakapali 300 µL 0,6 %-tne NMP agaroze, pokrili pokrovnicom i ostavili na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije, uklonili smo pokrovno stakalce te smo na sloj NMP agaroze nanosili sljedeći sloj od 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze pomiješane s 5 µL uzorka. Preparat je prekriven pokrovnim stakalcem i ostavljen na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije i uklanjanja pokrovnog stakalca, preparat je prekriven završnim slojem od 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze i ostavljen na ledu da polimerizira 10 minuta.

*Liza staničnih struktura*

Pripremili smo pufer za lizu [NaCl (Kemika), Na-laurilsarkozinat (Sigma-Aldrich, SAD), Tris-HCl (Sigma-Aldrich)], DMSO (Kemika), Tritona X-100 (Sigma-Aldrich)] pH vrijednosti 10. Preparatima je uklonjena pokrovnica te su uronjeni u navedeni pufer za lizu na vremenski period od 60 minuta pri temperaturi od 4 °C.

*Denaturacija*

Nakon lize staničnih struktura, preparate smo na 20 minuta uronili u prethodno priređen pufer za denaturaciju [NaOH (Kemika), $Na_2EDTA$ (Sigma-Aldrich)] pH vrijednosti 13.

*Elektroforeza*

Po završetku denaturacije, preparate smo premjestili u aparat za horizontalnu elektroforezu. Elektroforezu smo proveli u istom puferu kao i denaturaciju, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V te u vremenskom trajanju od 20 minuta.

*Neutralizacija*

Nakon elektroforeze, preparate smo isprali tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom puferu (0,4 M Tris-HCl) pH vrijednosti 7,5.

*Bojanje preparata*

Za bojanje preparata koristili smo 100 μL fluorescentne boje etidij bromid koncentracije 20 μg/mL (Sigma-Aldrich). Višak boje kratko smo isprali u Tris-HCl puferu pH vrijednosti 7,5. Preparate smo pokrili pokrovnicom, a u svrhu stabilizacije boje prije početka analize držali smo ih u mraku najmanje 15 minuta.

*Analiza preparata*

Preparate smo analizirali pomoću epifluorescencijskog mikroskopa (Olympus, Japan). U svakom preparatu izmjereno je 50 do 100 kometa. Tri najvažnija parametra (dužina repa, % DNA u repu, repni moment) izmjerena su pomoću programa za analizu slike (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK).

### 2.6. Mikronukleus test *in vivo*

Za potrebe mikronukleus testa, uzorak periferne krvi dobiven je iz repne vene štakora. Na predmetnim stakalcima smo priredili krvne razmaze. Iste smo jednoliko premazali vodenom otopinom akridin oranža i pokrili pokrovnicom. Mikroskopsku analizu preparata obojanih fluorescencijskom bojom izvršili smo fluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom 502-525 nm. Po svakom preparatu analizirali smo 1000 retikulocita u kojima smo utvrdili broj i raspodjelu mikronukleusa.

### 2.7. Statističke metode

Za statističku obradu podataka koristili smo program STATISTICA 9.0 (STATsoft, SAD) i Microsoft Office Excel 2010.

Rezultate za dužinu repa kometa, intenzitet repa (% DNA u repu) i repni moment obradili smo primjenom klasične deskriptivne statistike. Svi mjereni parametri obrađeni su i primjenom analize varijance (ANOVA) uz post-hoc Scheffe-test s ciljem utvrđivanja razlika između skupina. Razlike u osjetljivosti između mužjaka i ženki na primijenjene tretmane (za svaku vrstu stanica pojedinačno) ispitane su pomoću Mann-Whitney U-testa.

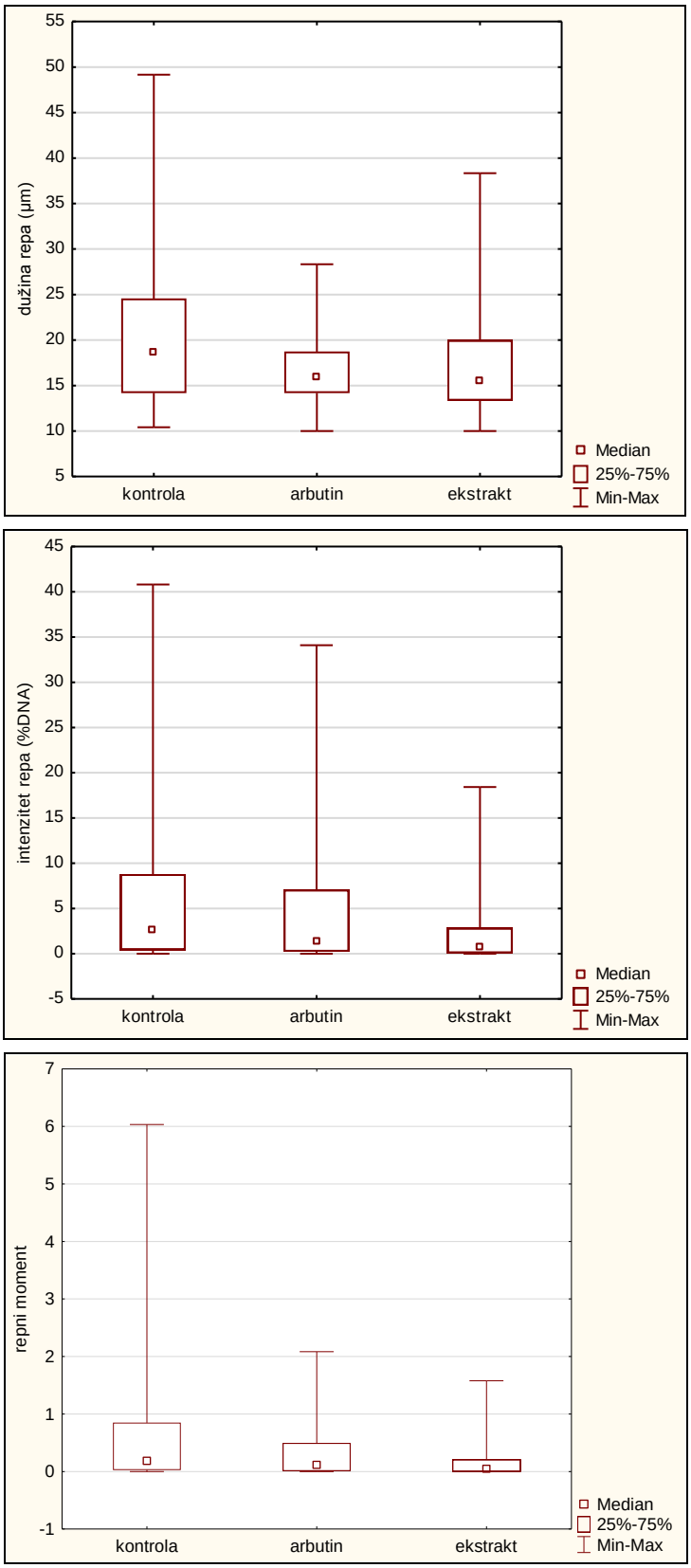
Rezultate mikronukleus testa in vivo prikazali smo kao srednje vrijednosti broja stanica s mikronukleusom, a obradili smo ih primjenom deskriptivne statistike te pomoću $\chi 2$ testa.

# 3. REZULTATI

Procjena genotoksičnog učinka ekstrakta lista obične planike (200 mg/kg) i arbutina (200 mg/kg) na leukocite periferne krvi, stanice bubrega i jetre štakora muškog i ženskog spola provedena je primjenom komet testa. Izmjereni su parametri: dužina repa, intenzitet repa i repni moment. Navedene parametre komet testa analizirali smo koristeći četiri parametra deskriptivne statistike kojima pripadaju: srednja vrijednost sa standardnom pogreškom, medijan, minimum i maksimum. Statistička značajnost ($p < 0,05$) vrijednosti triju parametara kometa između pokusnih skupina ispitana je pomoću analize varijance uz primjenu *post-hoc* Scheffé-ovog testa.

## 3.1. Rezultati komet testa na leukocitima periferne krvi štakora

U obje tretirane skupine mužjaka srednje vrijednosti parametara dužina repa i repni moment bile su statistički značajno niže u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine (21,42±0,67 za dužinu repa, 0,64±0,07 za repni moment) (Slika 9). U skupini tretiranoj arbutinom uočena je snižena (4,06±0,39) ali ne i statistički značajna vrijednost parametra intenzitet repa u odnosu na kontrolnu skupinu (6,02±0,54) (Tablica 3). Usporedimo li tretirane skupine međusobno, statistički značajno snižena vrijednost uočena je u skupini tretiranoj ekstraktom u parametru intenzitet repa (2,38±0,27) u odnosu na skupinu tretiranu arbutinom (4,06±0,39).



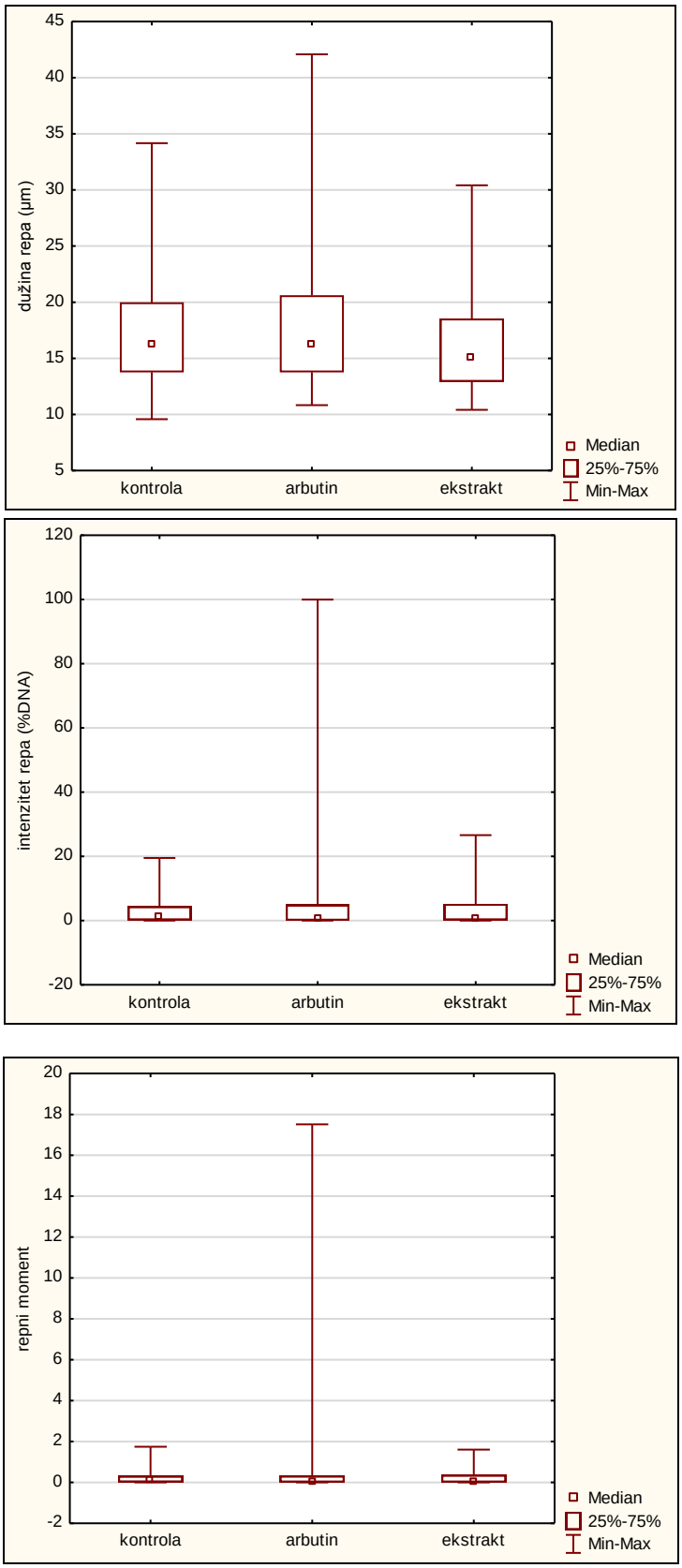

**Slika 9.** Vrijednosti (A) dužine repa, (B) intenziteta repa i (C) repnog momenta komet testa izmjerene u leukocitima periferne krvi mužjaka štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) i vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) tijekom 14 dana.

**Tablica 3.** Statističke značajnosti za parametre komet testa u leukocitima periferne krvi štakora muškog spola (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

| | **Dužina repa** | | |
|---|---|---|---|
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,000000 | 0,000000 |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | 0,000000 |
| **Arbutin** | | | 0,015309 |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Repni moment** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,000021 | 0,000000 |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |

n.z. – nema statističke značajnosti

Usporedimo li sve tri skupine ženki međusobno, srednja vrijednost svih parametara komet testa najviša je u skupini tretiranoj arbutinom (17,40±0,33 za dužinu repa, 3,65±0,59 za intenzitet repa i 0,31±0,09 za repni moment) (Slika 10). Nadalje, zamijećena je niža vrijednost parametra dužina repa u skupini tretiranoj ekstraktom (16,07±0,28) nego li u kontrolnoj skupini (17,26±0,30), dok su izmjerene srednje vrijednosti za navedene skupine jednake u parametru repni moment (0,23±0,02). Skupina tretirana ekstraktom lista obične planike statistički se značajno razlikuje u parametru intenzitet repa u odnosu na skupinu tretiranu arbutinom (3,65±0,59) i kontrolnu skupinu (3,01±0,29) (Tablica 4).




**Slika 10.** Vrijednosti (A) dužine repa, (B) intenziteta repa i (C) repnog momenta komet testa izmjerene u leukocitima periferne krvi ženki štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) i vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) tijekom 14 dana.

**Tablica 4.** Statističke značajnosti za parametre komet testa u leukocitima periferne krvi štakora ženskog spola (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

| | **Dužina repa** | | |
|---|---|---|---|
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | 0,027662 |
| **Arbutin** | | | 0,014011 |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Repni moment** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |

n.z. – nema statističke značajnosti

Razlike u osjetljivosti leukocita periferne krvi mužjaka i ženki štakora na 14-dnevne tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike ispitane su pomoću Mann-Whitney U-testa.

Postoji statistički značajna razlika između kontrolnih skupina mužjaka i ženki u sva tri parametra komet testa (dužina repa kometa, intenzitet repa, repni moment). Nadalje, utvrđene su statistički značajne razlike između mužjaka i ženki tretiranih arbutinom u parametrima intenzitet repa i repni moment, dok za skupine mužjaka i ženki tretirane vodenim ekstraktom lista obične planike ne postoji statistički značajna razlika u ni jednom od parametara komet testa (Tablica 5).

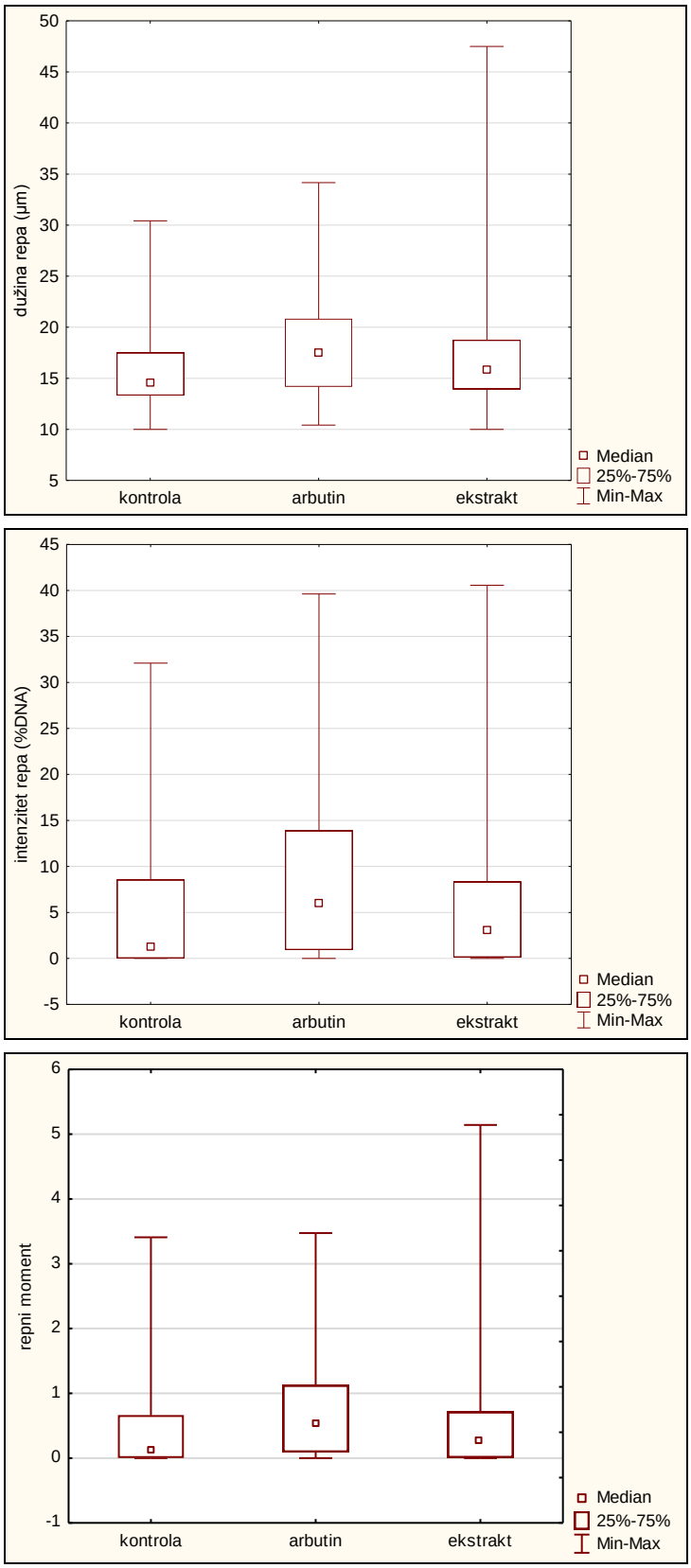
**Tablica 5**. Procjena razlika u osjetljivosti između leukocita periferne krvi mužjaka i ženki štakora na primijenjene tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike tijekom 14 dana [Mann-Whitney U-test; ($p < 0,05$)].

| | | **Dužina repa kometa** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Dužina repa kometa** | **Kontrola** | p=0,0001 | | |
| | **Arbutin** | | n.z. | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |
| | | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Intenzitet repa (%DNA)** | **Kontrola** | p<0,0001 | | |
| | **Arbutin** | | p=0,0086 | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |
| | | **Repni moment** | | |
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Repni moment** | **Kontrola** | p<0,0001 | | |
| | **Arbutin** | | p=0,0098 | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |

Statistički značajno $p < 0,05$; n.z. – nema statističke značajnosti

### 3.2. Rezultati komet testa na stanicama bubrega štakora

Srednje vrijednosti sva tri parametra komet testa bile su statistički značajno više u skupini tretiranoj arbutinom (18,01±0,34 za dužinu repa, 8,75±0,64 za intenzitet repa i 0,76±0,06 za repni moment), nego li u kontrolnoj skupini (15,87±0,26 za dužinu repa, 5,12±0,50 za intenzitet repa i 0,42±0,04 za repni moment) (Slika 11). Skupina tretirana ekstraktom također pokazuje povišene vrijednosti svih parametara u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističkog značaja. Nadalje, međusobnom usporedbom tretiranih skupina uočena je snižena vrijednost svih parametara skupine tretirane ekstraktom lista u odnosu na skupinu tretiranu arbutinom, sa statističkom značajnošću u parametrima intenzitet repa (5,82±0,44) i repni moment (0,51±0,05) (Tablica 6).



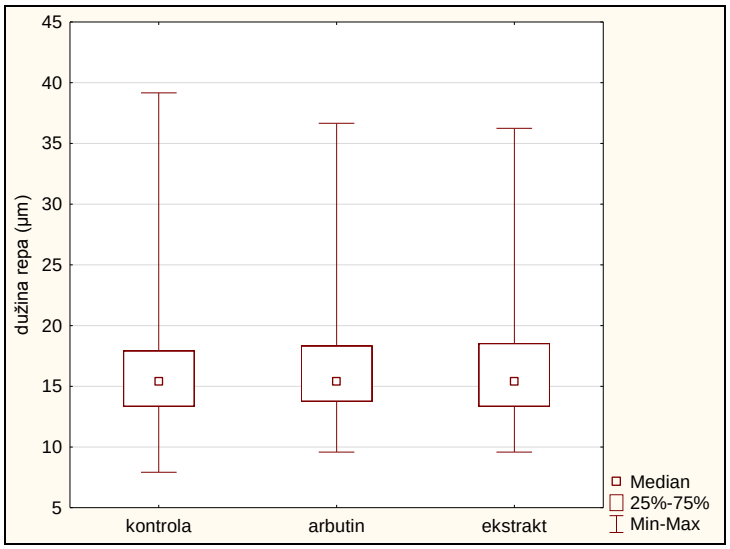

**Slika 11.** Vrijednosti (A) dužine repa, (B) intenziteta repa i (C) repnog momenta komet testa izmjerene u stanicama bubrega mužjaka štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) i vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) tijekom 14 dana.

**Tablica 6.** Statističke značajnosti za parametre komet testa u stanicama bubreg štakora muškog spola (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

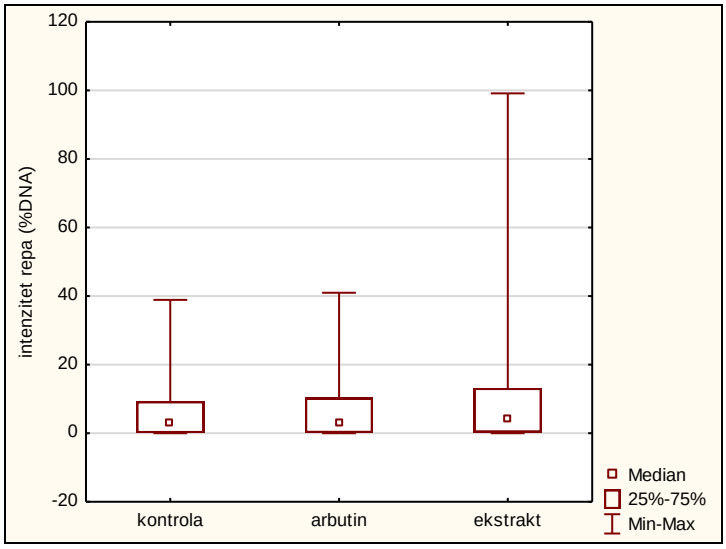
| | **Dužina repa** | | |
|---|---|---|---|
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,00002 | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,000009 | n.z. |
| **Arbutin** | | | 0,003436 |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Repni moment** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,000003 | n.z. |
| **Arbutin** | | | 0,001404 |
| **Ekstrakt** | | | |

n.z. – nema statističke značajnosti

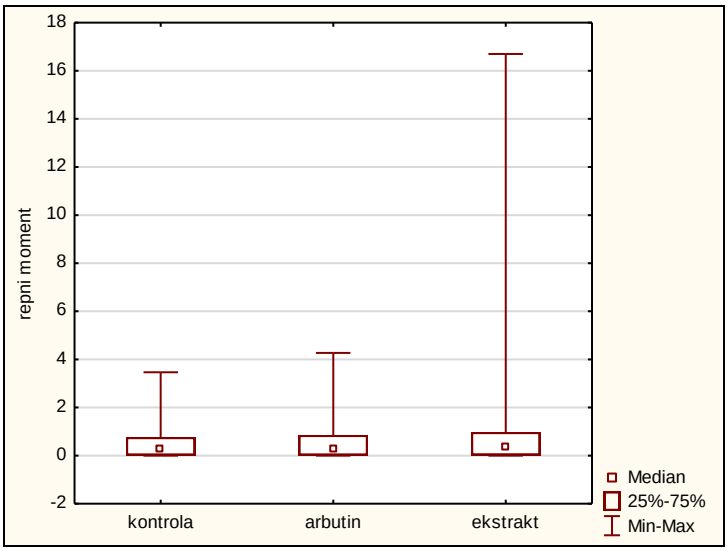
Usporedimo li sve skupine ženki međusobno, srednja vrijednost svih parametara komet testa najniža je u kontrolnoj skupini (16,21±0,33 za dužinu repa, 6,06±0,54 za intenzitet repa i 0,50±0,04 za repni moment), iako bez statističkog značaja (Slika 12). U skupini tretiranoj ekstraktom lista uočene su najviše (16,76±0,37 za dužinu repa, 9,21±0,94 za intenzitet repa i 0,82±0,11 za repni moment), ali ne i statistički značajne vrijednosti svih parametara (Tablica 7).




A




B




C

**Slika 12.** Vrijednosti (A) dužine repa, (B) intenziteta repa i (C) repnog momenta komet testa izmjerene u stanicama bubrega ženki štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) i vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) tijekom 14 dana.

**Tablica 7.** Statističke značajnosti za parametre komet testa u stanicama bubreg štakora ženskog spola (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

| | **Dužina repa** | | |
|---|---|---|---|
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Repni moment** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |

n.z. – nema statističke značajnosti

Razlike u osjetljivosti stanica bubrega mužjaka i ženki štakora na 14-dnevne tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike ispitane su pomoću Mann-Whitney U-testa.

Testom je utvrđeno kako između kontrolnih skupina mužjaka i ženki ne postoje statistički značajne razlike u ni jednom od parametara dok između mužjaka i ženki tretiranih arbutinom postoje statistički značajne razlike u sva tri parametra komet testa (dužina repa kometa, intenzitet repa, repni moment). Nadalje, mužjaci i ženke tretirani ekstraktom lista obične planike statistički se značajno razlikuju samo u parametru intenzitet repa (Tablica 8).

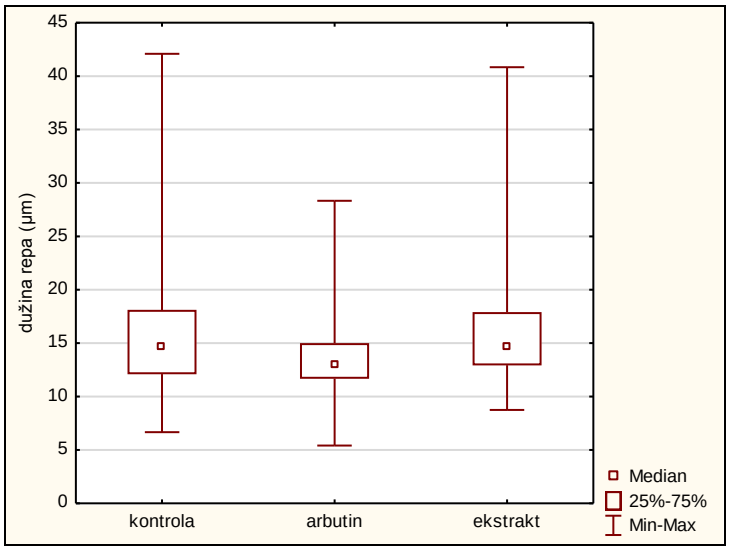
**Tablica 8.** Procjena razlika u osjetljivosti stanica bubrega mužjaka i ženki štakora na primijenjene tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike tijekom 14 dana [Mann-Whitney U-test ($p<0,05$)].

| | | **Dužina repa kometa** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Dužina repa kometa** | **Kontrola** | n.z. | | |
| | **Arbutin** | | p<0,001 | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |
| | | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Intenzitet repa (%DNA)** | **Kontrola** | n.z. | | |
| | **Arbutin** | | p<0,001 | |
| | **Ekstrakt** | | | p=0,042 |
| | | **Repni moment** | | |
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Repni moment** | **Kontrola** | n.z. | | |
| | **Arbutin** | | p<0,001 | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |

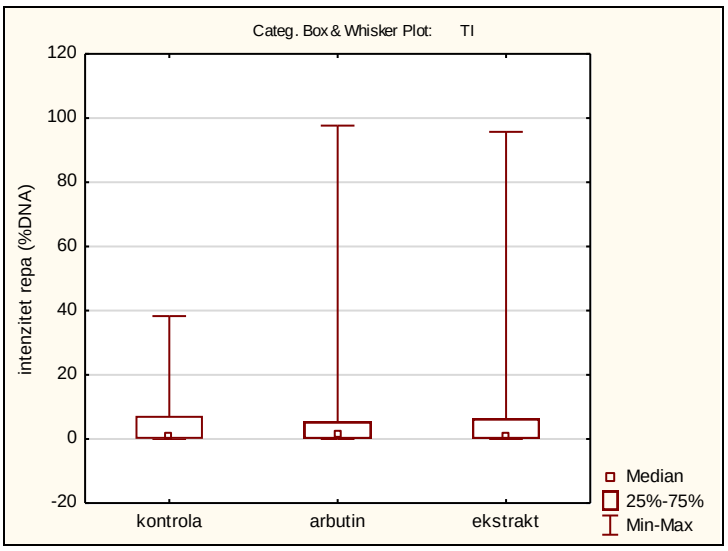
Statistički značajno $p < 0,05$; n.z. – nema statističke značajnosti

### 3.3. Rezultati komet testa na stanicama jetre štakora

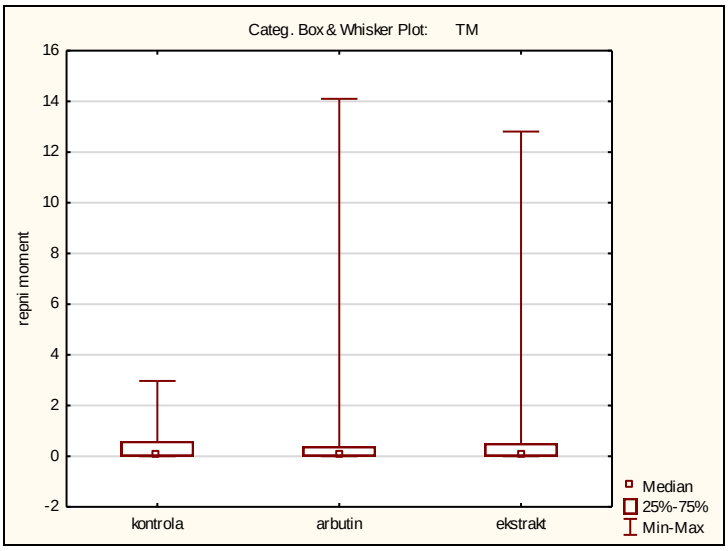
Usporedimo li kontrolnu skupinu mužjaka s tretiranim skupinama, uočavamo snižene vrijednosti svih parametara skupine tretirane arbutinom u odnosu na kontrolnu skupinu (15,70±0,35 za dužinu repa, 4,87±0,52 za intenzitet repa i 0,40±0,04 za repni moment), međutim, razlika je od statističkog značaja samo u parametru dužina repa (13,40±0,23) (Slika 13, Tablica 9). Usporedimo li tretirane skupine međusobno, uočavamo isti obrazac; snižene vrijednosti svih parametara skupine tretirane arbutinom u odnosu na skupinu tretiranu ekstraktom lista sa statističkim značajem samo u parametru dužina repa (16,12±0,38).




A




B




C

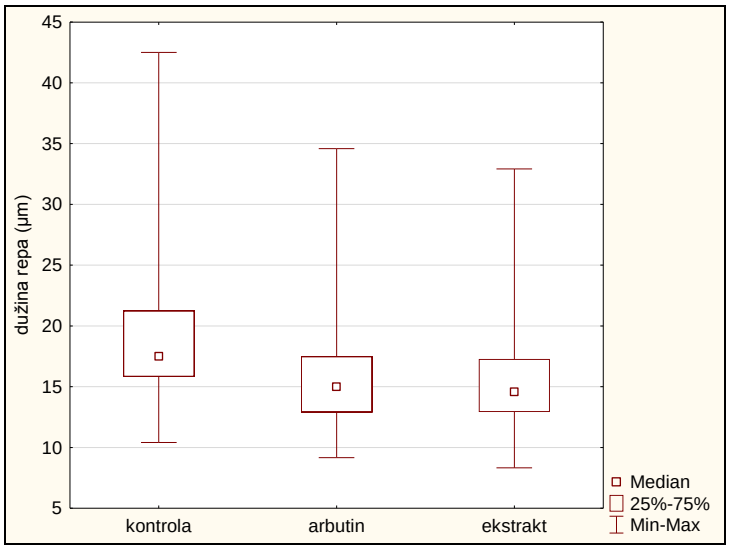
**Slika 13.** Vrijednosti (A) dužine repa, (B) intenziteta repa i (C) repnog momenta komet testa izmjerene u stanicama jetre mužjaka štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) i vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) tijekom 14 dana.

**Tablica 9.** Statističke značajnosti za parametre komet testa u stanicama jetre štakora muškog spola (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

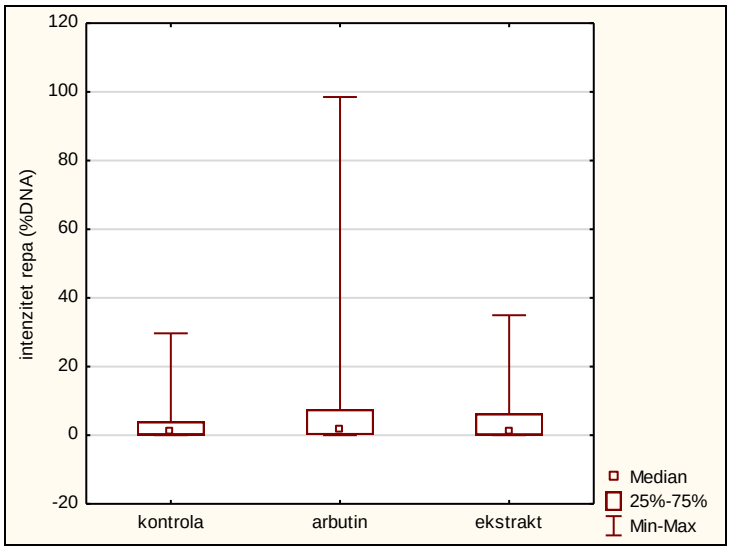
| | **Dužina repa** | | |
|---|---|---|---|
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,000003 | n.z. |
| **Arbutin** | | | 0,000000 |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Repni moment** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |

n.z. – nema statističke značajnosti

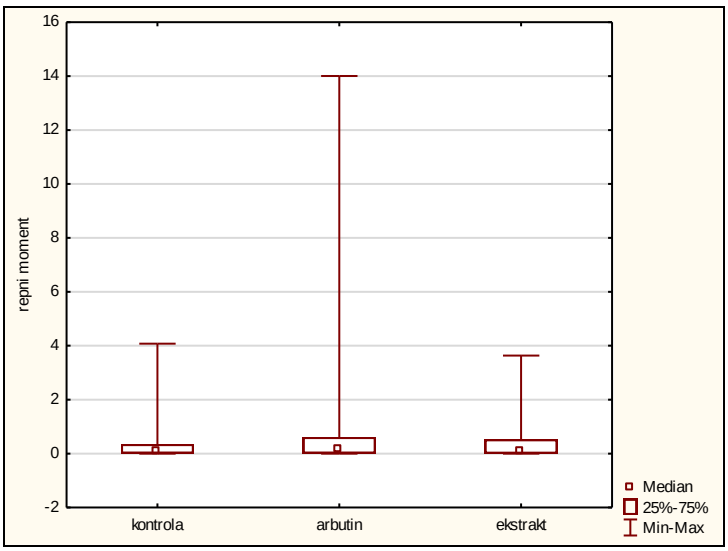
U obje tretirane skupine ženki, srednje vrijednosti parametra dužina repa bile su statistički značajno niže u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine (18,98±0,38) (Slika 14). Suprotno tome, srednje vrijednosti parametara intenzitet repa i repni moment obje tretirane skupine bile su više u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine (3,14±0,37 za intenzitet repa i 0,30±0,04 za repni moment), ali bez statističkog značaja (Tablica 10).




A




B




C

**Slika 14.** Vrijednosti (A) dužine repa, (B) intenziteta repa i (C) repnog momenta komet testa izmjerene u stanicama jetre ženki štakora tretiranih arbutinom (200 mg/kg) i vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) tijekom 14 dana.

**Tablica 10.** Statističke značajnosti za parametre komet testa u stanicama jetre štakora ženskog spola (analiza varijance uz *post-hoc* Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

| | **Dužina repa** | | |
|---|---|---|---|
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | 0,000000 | 0,000000 |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |
| | **Repni moment** | | |
| | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Kontrola** | | n.z. | n.z. |
| **Arbutin** | | | n.z. |
| **Ekstrakt** | | | |

n.z. – nema statističke značajnosti

Razlike u osjetljivosti stanica jetre mužjaka i ženki štakora na 14-dnevne tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike ispitane su pomoću Mann-Whitney U-testa.

Za vrijednosti koje se odnose na parametre intenzitet repa i repni moment kometa, uočen je isti obrazac statističke značajnosti – niti jedna od izmjerenih vrijednosti nije pokazala statističku značajnost na razini $p < 0,05$ (Tablica 11). U parametru dužina repa kometa utvrđene su statistički značajne razlike između mužjaka i ženki kontrole skupine i skupine tretirane arbutinom.

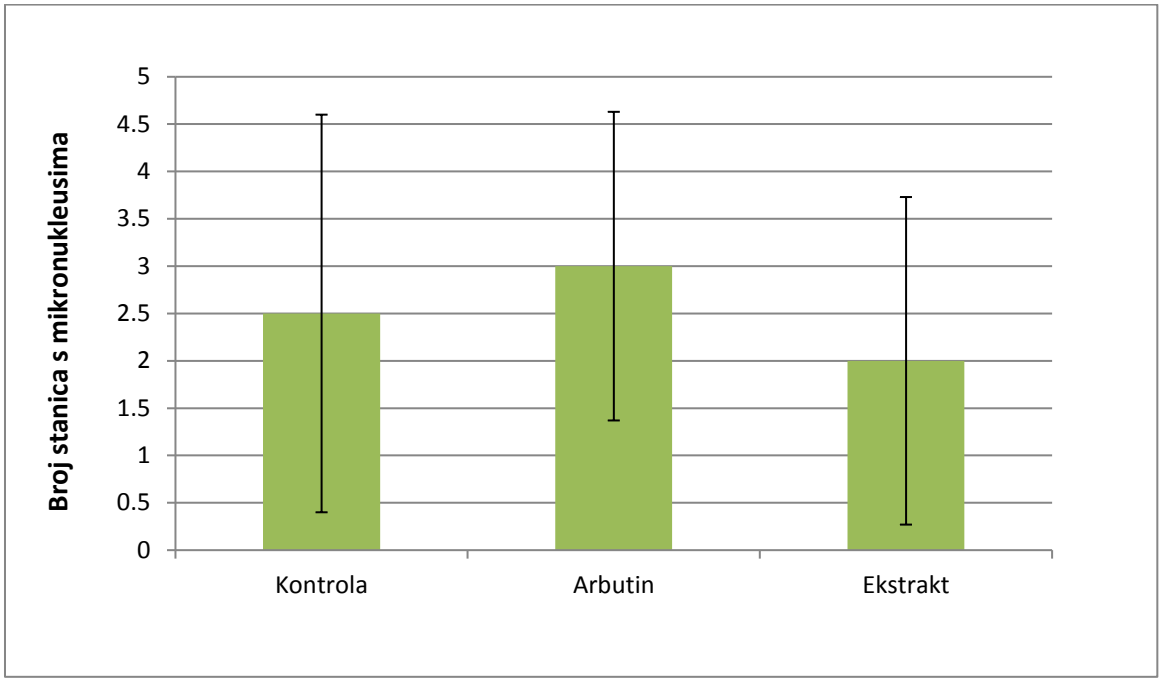
**Tablica 11.** Procjena razlika u osjetljivosti stanica jetre mužjaka i ženki štakora na primijenjene tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike tijekom 14 dana [Mann-Whitney U-test ($p<0,05$)].

| | | **Dužina repa kometa** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Dužina repa kometa** | **Kontrola** | p<0,001 | | |
| | **Arbutin** | | p<0,001 | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |
| | | **Intenzitet repa (%DNA)** | | |
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Intenzitet repa (%DNA)** | **Kontrola** | n.z. | | |
| | **Arbutin** | | n.z. | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |
| | | **Repni moment** | | |
| | | **Kontrola** | **Arbutin** | **Ekstrakt** |
| **Repni moment** | **Kontrola** | n.z. | | |
| | **Arbutin** | | n.z. | |
| | **Ekstrakt** | | | n.z. |

Statistički značajno $p < 0,05$; n.z. – nema statističke značajnosti

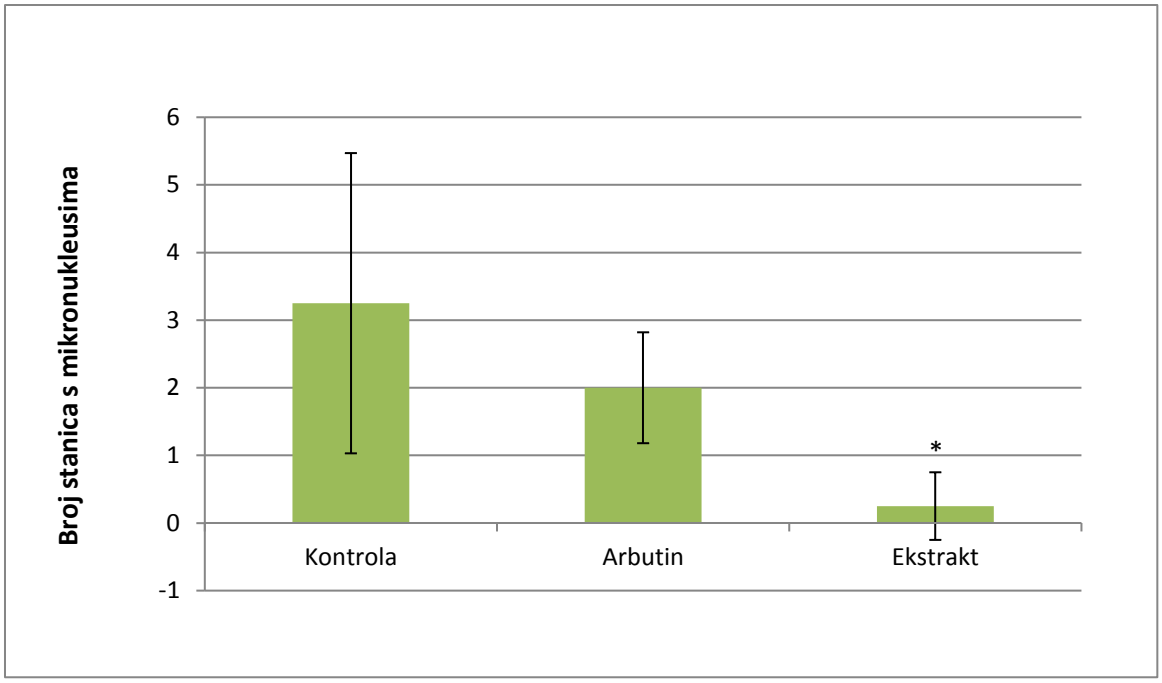
### 3.4. Rezultati mikronukleus testa

Učestalost mikronukleusa smo određivali analizom 1000 retikulocita periferne krvi po životinji. Slika 15 prikazuje srednje vrijednosti broja stanica sa mikronukleusima u kontrolnoj skupini te u skupinama tretiranim s arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike za mužjake. Nismo utvrdili statistički značajne razlike u broju mikronukleusa između tretiranih skupina i kontrole.




**Slika 15.** Broj retikulocita (srednje vrijednosti ± standardna pogreška) sa mikronukleusima štakora muškog spola tretiranih arbutinom (200mg/kg), vodenim ekstraktom lista obične planike (200mg/kg) tijekom 14 dana i kontrolne skupine. Broj mikronukleusa određen je na 1000 retikulocita.

Srednje vrijednosti broja stanica sa mikronukleusima u kontrolnoj skupini te u skupinama tretiranim sa arbutinom i vodenim ekstraktom obične planike za ženke ukazuju na statistički značajnu razliku ($p=0,0386$) u broju mikronukleusa između skupine tretirane vodenim ekstraktom lista obične planike i kontrole skupine. Suprotno tome, nema statistički značajne razlike u broju mikronukleusa skupine tretirane arbutinom u odnosu na kontrolu.




**Slika 16.** Broj retikulocita (srednje vrijednosti ± standardna pogreška) sa mikronukleusima štakora ženskog spola tretiranih arbutinom (200mg/kg), vodenim ekstraktom lista obične planike (200mg/kg) tijekom 14 dana i kontrolne skupine. Broj mikronukleusa određen je na 1000 retikulocita.

*statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($\chi 2$ test)

# 4. RASPRAVA

U tradicionalnoj medicini, pripravci obične planike često se koriste u liječenju različitih oboljenja i ozljeda. Osim toga, fenolni glikozid arbutin kojeg prirodno nalazimo u sastavu lista obične planike sadržan je i u mnogim komercijalno dostupnim pripravcima namijenjenim za liječenje infekcija mokraćnog sustava. Terapijsko djelovanje pripravaka zasniva se na antibakterijskim svojstvima hidrokinona, farmakološki aktivnog metabolita arbutina. Različiti bakterijski sojevi humane crijevne flore imaju sposobnost deglikozilacije arbutina u različitoj mjeri u aglikon hidrokinon (Kang i sur., 2012, Blaut i sur., 2006). Uz literaturne zapise koji svjedoče antimikrobnoj aktivnosti hidrokinona u vidu inhibicije rasta različitih vrsta bakterija i gljivica (Jahodár i sur., 1985, Schindler i sur., 2002; Jurica, 2015), postoje i zapisi u kojima se ističe toksičnost hidrokinona (Roza i sur., 2003, Khanal i sur., 2011). Što se tiče toksičnosti arbutina, u literaturi postoje kontradiktorni navodi. Za potencijalno toksično djelovanje vodenog ekstrakta lista obične planike u dostupnoj literaturi nema relevantnih podataka.

Upravo zbog manjkavih i kontradiktornih literaturnih navoda, a učestale primjene navedenih spojeva u terapiji, ovo istraživanje proveli smo s ciljem procjene genotoksičnog potencijala ekstrakta lista obične planike i arbutina na životinjskom modelu. Uzevši u obzir konverziju arbutina u hidrokinon čija akutna oralna toksičnost LD50 za štakore iznosi između 298-390 mg/kg dnevno te toksični učinak hidrokinona na CNS (od engl. *central nervous system*) štakora u dozi od 400 mg/kg dnevno (Jurica, 2016), oba tretmana provedena su primjenom „srednje“ doze od 200 mg/kg tijekom 14 dana.

Mnogi fenolni spojevi sadržani u listu obične planike, uključujući arbutin, podliježu metabolizmu jejunuma i ileuma tankog crijeva. Tako nastali metaboliti portalnom venom dolaze u jetru gdje se dalje metaboliziraju (Spencer, 2003). Aglikon arbutina, hidrokinon, nastao djelovanjem enzima β-glikozidaze u tankom crijevu, u jetri prolazi metabolizam procesom enzimske konjugacije sa sulfatom ili glukoronskom kiselinom. Nakon toga se zajedno sa drugim metabolitima polifenola izlučuje putem bubrega u urin (Quintus i sur., 2005). Budući da list obične planike sadrži bogatstvo fenolnih spojeva čiji metabolizam uključuje prolazak kroz bubrege i jetru, učinak vodenog ekstrakta lista i arbutina na DNA ispitali smo primjenom komet testa upravo na stanicama navedenih organa, uz leukocite periferne krvi. Mjereni parametri komet testa koji ukazuju na razinu oštećenja DNA su dužina repa, intenzitet repa (%DNA) i repni moment.

Razlike u osjetljivosti leukocita te stanica bubrega i jetre mužjaka i ženki štakora na 14-dnevne tretmane arbutinom i vodenim ekstraktom lista obične planike ispitane su pomoću Mann-Whitney U-testa. Testom na leukocitima su utvrđene statistički značajne razlike između mužjaka i ženki tretiranih arbutinom u parametrima intenzitet repa i repni moment. No zabilježena je i statistički značajna razlika između kontrolnih skupina mužjaka i ženki za sva tri parametra komet testa (dužina repa kometa, intenzitet repa, repni moment). Sličan trend uočavamo i na primjeru stanica jetre. Naime, na stanicama jetre su utvrđene statistički značajne razlike u parametru dužina repa između mužjaka i ženki skupine tretirane arbutinom no i same kontrolne skupine. Pomoću Mann-Whitney U-testa na stanicama bubrega uočene su statistički značajne razlike u sva tri parametra komet testa između mužjaka i ženki tretiranih arbutinom. Nadalje, zabilježena je i statistički značajna razlika u parametru intenzitet repa između mužjaka i ženki tretiranih ekstraktom lista obične planike. Kako nema statistički značajne razlike u ni jednom od parametara za kontrolne skupine mužjaka i ženki, rezultati upućuju na razlike u osjetljivosti stanica bubrega s obzirom na spol prvenstveno na tretman arbutinom. Bez obzira na navedene razlike između spolova, sve komet testom izmjerene razine oštećenja su ispod 10 % DNA u repu kometa za oba tretmana i spola u sve tri vrste stanica što upućuje na nisku genotoksičnost vodenog ekstrakta lista obične planike i arbutina.

Rezultati komet testa mogu se dvojako tumačiti. Izmjerene vrijednosti mogu biti rezultat djelovanja samog arbutina. Međutim, uzmemo li u obzir dosadašnja istraživanja koja upućuju na toksično djelovanje hidrokinona (Roza i sur., 2003, Khanal i sur., 2011), postoji mogućnost da su izmjerene vrijednosti rezultat djelovanja hidrokinona nastalog metaboliziranjem arbutina. Bez obzira to, primjena vodenog ekstrakta lista obične planike kao fitoterapeutika smatra se nisko rizičnom.

Prema Chakraborty i sur. (1988), izloženost ljudskih stanica melanoma i normalnih ljudskih melanocita arbutinu u dozi od 100 μg/mL tijekom 5 dana ne rezultira inhibicijom rasta navedenih stanica. Međutim, u periodu od 48 sati nakon petodnevnog tretmana arbutinom u dozi od 300 μg/mL, zamijećen je genotoksični učinak te odvajanje kultura stanica od Petrijeve zdjelice. Kako je prisutnost mikronukleusa pokazatelj postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice, učestalost mikronukleusa može se koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma pod utjecajem različitih genotoksičnih agenasa (Fenech i sur., 2003). Uzevši u obzir navedeno, *in vivo* mikronukleus testom na retikulocitima periferne krvi željeli smo ustanoviti utječu li vodeni ekstrakt lista obične planike i arbutin na povećanje broja stanica sa mikronukleusima.

Kao posljedica primijenjenih tretmana na životinje oba spola nije zabilježen statistički značajan porast u broju mikronukleusa. Rezultati mikronukleus testa se podudaraju sa rezultatima komet testa te upućuju na nisku genotoksičnost arbutina i vodenog ekstrakta lista obične planike. Zabilježeno statistički značajno smanjenje stanica s mikronukleusima u ženki tretiranih s vodenim ekstraktom lista obične planike ide u prilog sigurnosti navedenog tretmana kao fitoterapeutika. Istraživanje citotoksičnosti provedeno od strane Deysson i Truhaut (1957) dokazuje inhibiciju rasta korijena *Allium sativum* L. i atimitotičke učinke arbutina (1-14 μg/mL). Antimitočki učinak je zamijećen u periodu od 24 sata nakon tretmana arbutinom u dozi od 2,7 μg/mL dok se doza od 5,4 μg/mL iskazala vrlo toksičnom, zaustavljajući rast korijena u potpunosti već nakon prvog tretmana. Jedno od mnogobrojnih istraživanja genotoksičnosti arbutina provode Müller i Kasper (1996), a iz njega proizlazi kako primjena arbutina (2,73 mg/mL) ne rezultira indukcijom mutacija u V79 stanicama hrčaka. Međutim kada je tretman proveden nakon prethodne inkubacije arbutina s β–glikozidazom, zabilježen je mutageni učinak. Istraživanje na životinjskom modelu, preciznije na laboratorijskim miševima oralno tretiranim arbutinom (0,5-2 g/kg), nema za posljedicu indukciju mikronukleusa u stanicama koštane srži (Müller i Kasper, 1996). Prema istraživanju antikancerogenih svojstava arbutina od strane Kamei i sur. (1988), inkubacijom arbutina tijekom četiri dana dokazana je slaba inhibicija rasta HCT-15 stanica humanog karcinoma debelog crijeva.

S obzirom na preporuku proizvođača komercijalno dostupnih proizvoda s arbutinom za korištenje kroz kraće vremensko razdoblje, fokus daljnjih istraživanja trebao bi biti na procjeni potencijalnih citogenetičkih oštećenja i utjecaja na diobeno vreteno kroz dulji vremenski period primjene. Time bi se dobila cjelovitija slika o sigurnosti primjene tretmana kroz duži vremenski period čime bi se potencijalno smanjila primjena antibiotika za liječenje uroinfekcija.

# 5. ZAKLJUČAK

- Oštećenje DNA izmjereno komet testom u leukocitima periferne krvi, bubrega i jetre štakora oba spola nakon 14-dnevnog tretmana arbutinom i vodenim ekstraktom obične planike ukazuju na nisku genotoksičnost navedenih tretmana, budući da su izmjerene razine oštećenja ispod 10% DNA u repu kometa u sve tri vrste stanica.

- Vrijednosti parametra repni moment u leukocitima periferne krvi i stanicama bubrega ukazuju na razlike u osjetljivosti navedenih stanica među spolovima na tretman arbutinom.

- Rezultati mikronukleus testa u uvjetima *in vivo* upućuju na nisku genotoksičnost arbutina.

- U mužjaka tretiranih vodenim ekstraktom lista obične planike uočen je pad broja stanica s mikronukleusima.

- Statistički značajno smanjenje stanica s mikronukleusima u ženki tretiranih s vodenim ekstraktom lista planike, ukazuje da vodeni ekstrakt lista obične planike ima niski genotoksični potencijal ili isti izostaje.

## 6. LITERATURA


Afkir S, Markaoui M, Aziz M, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyyat A. Effect of flavonoïds from Arbutus unedo leaves on rat isolated thoracic Aorta. *Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants* 2015;1:75-93

Afkir S, Nguelefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyyat A. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;116:288-295

Baidez AG, Gomez P, Del Rio JA, Ortuno A. Dysfunctionality of the xylem in Olea europaea L. plants associated with the infection process by Verticillium dahliae Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:3373-3377

Balmus G, Karp NA, Ng BL, Jackson SP, Adams DJ, McIntyre RE. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nature protocols* 2015;10:205-215

Blaut M, Braune A, Wunderlich S, Sauer P, Schneider H, Glatt H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44:1940-1947

Bracanović N. O važnosti planike na našem mediteranskom kršu. *Hrvatski šumarski list* 1941;493-495

Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Research* 1998;11:206-212

Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti MG. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 2009;125:16-30

da Silva J, de Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology* 2000;23:241-245

Deisinger PJ. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996;47:31-46

Deysson G., Truhaut R. Influence of glucoside formation on radiomimetic activity; comparison of hydroquinone and its glucoside, arbutoside. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 1957;151:1719-1722

Dib MA, Allali H, Tabti B. Identification of phenolic compounds and antimicrobial activity of roots of *Arbutus unedo* L. *Asian Journal of Chemistry* 2010;22:4045-4053

Dib MEA, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N, Tabti B. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society* 2013;17:381-385

El Haouari M, López JJ, Mekhfi H, Rosado J, Salido GM. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;113:325-331

El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology* 2003;86:149-158

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 1995;339:37-59

Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 2003;534:65-75

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 1985;147:29-36

Fortalezas S, Tavares L, Pimpão R, Tyagi M, Pontes V, Alves PM, McDougall G, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients* 2010;2:214-229

Fučić A, Mijić A. In vitro i in vivo mikronukleus metode u genotoksikološkim istraţivanjima. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 1999;50:299-306

Gomes F, Canhoto J. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 2009;45:72-82.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, Medicinska naklada Zagreb 2012;413-415

Hajdić M. Planika – novi izazov za bonsai uzgajivače, *Poljoprivredni glasnik* 2009;6:24-27

Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou S. In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, and Automated Scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000;35:234-252

Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocyte using acridine orange coated slides. *Research* 1990;245:245-249.

Hu ZM, Zhou Q. Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *Journal of Dermatological Science* 2009;55:179-184

Isbilir SS, Orak HH, Yagar H, Ekinci N. Determination of antioxidant activities of Strawberry tree (*Arbutus unedo* l.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 2012;11:223-237

Jahodár L, Jílek P, Páktová M, Dvoráková V. Antimicrobial effect of arbutin and an extract of the leaves of *Arctostaphylos uva-ursi in vitro*. *Ceská a Slovenská farmacie* 1985;34:174-178

Jurica K, Karačonji IB, Šegan S, Opsenica DM, Kremer D. Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (Arbutus unedo L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 2015;66:197-202

Jurica K. Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci, doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu 2016.

Kahriman N, Albay CG, Dogan N, Usta A, Karaoglu SA, Yayli N. Volatile constituents and antimicrobial activities from flower and fruit of *Arbutus unedo* L. *Asian Journal of Chemistry* 2010;22:6437-6442

Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M. Inhibition of cell growth in culture by quinones. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 1998;13:185-188

Kang MJ, Ha HW, Kim GH, Lee SK, Ahn YT, Kim DH, Jeong HG, Jeong TC. Role of Metabolism by Intestinal Bacteria in Arbutin-Induced Suppression of Lymphoproliferative Response in vitro. *Biomolecules and Therapeutics* 2012;20:196-200

Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 2004;55:279-290

Khadir F, Pouramir M, Joorsaraee SG, Feizi F, Sorkhi H, Yousefi F. The effect of arbutin on lipid peroxidation and antioxidant capacity in the serum of cyclosporine-treated rats. *Caspian Journal of Internal Medicine* 2015;6:196-200

Khanal T, Kim HG, Hwang YP, Kong MJ, Kang MJ, Yeo HK, Kim DH, Jeong TC, Jeong HG. Role of metabolism by the human intestinal microflora in arbutin-induced cytotoxicity in HepG2 cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011;413:318-324

Kitao S, Sekine H. α-D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α-arbutin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1994;58:38-42

Kittipongpatana N, Chaiwan A, Pusod U, Kittipongpatana OS. High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separation and Quantitative Analysis of Arbutin in Plant Tissue Cultures. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 2007;6:65-74

Kivçak B, Mert T, Denizci A. Antimicrobial activity of *Arbutus unedo* L. FABAD *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;26:125-128

Kivcak, B, Mert T, Demirci B, Baser K. Composition of the essential oil of Arbutus unedo. *Chemistry of Natural Compounds* 2001;37:445-446

Kopjar N, Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Ţeljeţić D, Gajski G, i sur. Micronucleus assay in Croatian general population. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 2010;61:219-234

Kopjar N. Normal and Cut-Off Values of the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Peripheral Blood Lymphocytes in the Croatian General Population. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 2010;61:219-234

Legssyer A, Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Herrenknecht C, Roumy V, Fourneau C, Laurens A, Hoerter J, Fischmeister R. Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy Research* 2004;18:889–894

Leonti M, Casu L, Sanna F, Bonsignore L. A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;121:255-267

Liang K, Xu K, Bessarab D, Obaje J, Xu. Arbutin encapsulated micelles improvedtransdermal delivery and suppression of cellular melanin production *BMC Research Notes* 2016;9:1-6

Lim TK. *Arbutus unedo*. *Edible Med Non-Medicinal Plants* 2012;2:444–451

Males Z, Plazibat M, Vundac VB, Zunta I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – Arbutus unedo L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutica* 2006;56:245-250

Maleš Ž, Fabijančić P, Barman A, Gregov I, Bojić M. Antioksidacijski učinak i HPLC analiza listova planike – *Arbutus unedo* L. *Farmaceutski glasnik* 2015;71:522-528

Maleš Ž, Šarić D, Bojić M. Quantitative determination of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves of *Arbutus unedo* L. using thin layer chromatography. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013;1-4

Mekhfi H, El Haouari M, Bnouham M, Aziz M, Ziyyat A, Legssyer A. Effects of extracts and tannins from Arbutus unedo leaves on rat platelet aggregation. *Phytotherapy Research* 2006;20:135–139

Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Remmal A, Ziyyat A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2004;94:317-322

Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49:2285-2291

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules* 2014;19:15799-15823

Moreno-Jiménez E, Peñalosa, J, Carpena- Ruiz R, Esteban E. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 2008;71:466-473

Müller L i Kasper P. The mutagenic potential of arbutine, a naturally occurring hydroquinone glycoside. *Mutation Research* 1996;360:291-292

Nikolić T ur. (2015) Department of Botany, Faculty of Science Zagreb. *Flora Cratica Database* Dostupno na: http://hirc.botanic.hr/fcd

Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 2004;93:183-195

Nycz JE, Malecki G, Morag M, Nowak G, Ponikiewski L, Kusz J, Switlicka A. Arbutin: Isolation, X-ray structure and computional studies. *Journal of Molecular Structure* 2010;980:13-17

Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogencity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research* 1990;122:86-94.

Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocol* 2006;1:23-29

Oliveira I, Baptista P, Bento A, Alberto Pereira J. Arbutus unedo L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research* 2011;50:73-85

Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology* 2009;47:1507-1511

Ostling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced dna damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984;123:291-298

Pavlović RD, Lakušić B, Došlov-Kokoruš Z, Kovačević N. Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* 2009;64:656-659

Pop C, Vlase L, Tamas M. Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the Leaves of Bergenia crassifolia (L.) Fritsch acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2009;37:129-132

Quintus J, Kovar KA, Link P, Hamacher H. Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. *Planta Medica* 2005;71:147-152

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;20:933-956

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999;722:225-254

Roza L, de Vogel N, van Delft JHM. Lack of clastogenic effects in cultured human lymphocytes treated with hydroquinone. *Food and Chemical Toxicology* 2003;41:1299-1305

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

Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 1988;175:184-191

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988;175:184-191

Soucek P, Ivan G, Pavel S. Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation. *Chemico – Biological Interactions* 2000;126:45-61.

Spencer JP. Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Nutrition* 2003;133:3255-3261

Sreelatha G, Muraleedharan A, Chand P, Rajkumar RP, Sathidevi PS. An Improved Automatic Detection of True Comets for DNA Damage Analysis Procedia Computer. *Science* 2015;46:135-142

Surralles J, Puerto S, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Mullenders L H, Natarajan AT. Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility. *Mutation Research* 1998;404:39-44

Swann RL, Laskowski DA, McCall PJ. A rapid method for the estimation of the environmental parameters octanol/water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio and water solubility. *Medicinal Research Reviews* 1983;85:17-28

Šimić F, (1980.), Naše medonosno bilje, Zagreb: Znanje

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000;35:206-221

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010;2:1231-1246.

Tuberoso CIG, Bifulco E, Caboni P, Cottiglia F, Cabras P, Floris I. Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58:384-389

Tuberoso CIG, Boban M, Bifulco E, Budimir D, Pirisi FM. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chemistry* 2013;140:686-691

van Acker SABE, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;20:331-342

Vidrih R, Hribar J, Prgomet Ž, Poklar Ulrih N. The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Science and Technology* 2013;5:29-33

Whysner J, Verna L, English JC, Williams GM. Analysis of studies related to tumorigenicity induced by hydroquinone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1995;21:158-176.

Ziyyat A, Boussairi EH. Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research* 1998;12:110-113

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* 1997;58:45-54

Web stranice:

http://medecine.savoir.fr/arbousier-arbutus-unedo-l-proprietes-medicinales; pristupljeno 26.8.2016.

http://www.hilltoplabs.com/public/lewis.html; pristupljeno 29.8.2016.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/arbutin#section=Environmental-Fate-Exposure-Summary; pristupljeno 5.9.2016.

# ŽIVOTOPIS

## Osobne informacije

Ime i prezime: Tihana Cikač
Datum rođenja: 15.10.1991.
Adresa: Koprivnička 147, 48000 Koprivnica
e-mail: tihana.cikac@gmail.com
Kontakt broj: 099/7452185

## Obrazovanje

**2014.-2016.** Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet
Biološki odsjek
Smjer: Diplomski studij eksperimentalne biologije
Modul: Fiziologija i imunobiologija

**2010.-2014.** Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

**2007.-2010.** Srednja škola Koprivnica
Smjer: Farmaceutski tehničar

## Iskustvo u struci

Laboratorijske vježbe:

Klinički bolnički centar Rebro (odjel za molekularnu dijagnostiku i transplantaciju)
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice (odjel za onkologiju)

Laboratorijska praksa:

Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (jedinica za mutagenezu)

## Studentski poslovi

Carlsberg Croatia d.o.o., Koprivnica
Müller d.o.o., Koprivnica
Narodne Novine d.d., Zagreb

## Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski Strani jezici: engleski

Dobro razvijena intrapersonalna komunikacija kao rezultat preispitivanja vlastitih odluka i svakodnevnih pojavnosti, kao i interpersonalna komunikacija razvijena raznim diskusijama s kolegama i poznanicima

## Digitalna kompetencija

Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi – Internet (e-mail, google+, društvene mreže)