Antiproliferativna aktivnost vodenog ekstrakta biljke Centaurea ragusina L. na dvije stanične linije raka

Krejčir, Kornelija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:437837

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST VODENOG EKSTRAKTA BILJKE *CENTAUREA RAGUSINA* L. NA DVIJE STANIČNE LINIJE RAKA

ZAVRŠNI RAD

KORNELIJA KREJČIR

Matični broj: 205

Split, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST VODENOG EKSTRAKTA BILJKE *CENTAUREA RAGUSINA* L. NA DVIJE STANIČNE LINIJE RAKA

ZAVRŠNI RAD

KORNELIJA KREJČIR

Matični broj: 205

Split, rujan 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF PLANT *CENTAUREA RAGUSINA* L. ON TWO CARCINOMA CELL LINES

BACHELOR THESIS

KORNELIJA KREJČIR

Parent number: 205

Split, September 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc.dr.sc. Mila Radan

Antiproliferativna aktivnost vodenog ekstrakta biljke *Centaurea ragusina* L. na dvije stanične linije raka

KORNELIJA KREJČIR, 205

Sažetak: Rak (lat. *cancer*) je pojam koji se koristi za veliku skupinu bolesti u kojima se abnormalne stanice dijele bez kontrole te imaju sposobnost prodiranja i invazije u druga tkiva. Nakupine abnormalnih stanica mogu tvoriti benigne ili maligne tumore. Razlika između njih je u agresivnosti rasta te u tome što maligni daju metastaze i šire se u okolinu, prodirući u okolno tkivo, dok benigni tumori ne daju metastaze na druge organe i ne prodiru u okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju odnosno rastu ekspanzivno.

Fitoterapeutici ili fitofarmaceutici kao aktivne sastojke sadrže biljke, biljne dijelove i njihove pripravke, a podrazumijevaju standardizirane biljne lijekove sa strogo definiranim sadržajem i sastavom terapijski aktivnih tvari, čija je učinkovitost potvrđena farmakološkim i kliničkim istraživanjima, uz naznaku mogućih nuspojava i interakcija s drugim lijekovima.

Cilj ovog rada bio je ispitati antiproliferativno djelovanje vodenih ekstrakta endemske vrste *Centaurea ragusina* L., koja raste na području Dalmacije, na stanice raka dojke (MB-MDA 231) i raka prostate (T24).

Vodeni ekstrakt *Centaurea ragusina* L. pokazao je dobro antiproliferativno djelovanje na stanice raka prostate i raka dojke.

Ključne riječi: rak dojke, rak prostate, *Centaurea ragusina* L., antiproliferativnost

Rad sadrži: 32 stranica, 7 slika, 14 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Dr. sc. Franko Burčul, znan. sur. - predsjednik
2. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur. - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan – član - mentor

Datum obrane: 23. rujna 2016.

Rad je tiskan u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.
Mentor: Mila Radan, PhD, assistant professor

Antiproliferative activity of aqueous extract of plant *Centaurea ragusina* L. on two carcinoma cell lines

KORNELIJA KREJČIR, 205

Abstract: Cancer (lat. *cancer*) is the term used for a large group of diseases in which abnormal cells divide without control and are capable of penetrating and invading other tissues. Clusters of abnormal cells may form benign or malignant tumors. The difference between them is in the growth aggressivness, and that the malignant tumors can spread and metastasize, penetrating into the surrounding tissue, while benign tumors do not give metastases to other organs and do not invade the surrounding healthy tissue, they grow expansively.

Phytotherapeutics or phytopharmaceuticals consist of: plants, plant parts and their extracts, and include standardized herbal drugs with strictly defined content and a composition of a therapeutically active substance. Their effectiveness has been confirmed by pharmacological and clinical research, with the indication of possible side effects and drug interactions.

The aim of this study was to examine the antiproliferative activity of aqueous extract of several species of *Centaurea ragusina* L., which can be found in Dalmatia, on breast cancer cells (MDA-MB 231) and prostate cancer (T24).

The aqueous extract of *Centaurea ragusina* L. showed the best anti-proliferative effect on prostate cancer cells and breast cancer cells.

Keywords: breast cancer, prostate cancer, *Centaurea ragusina* L., antiproliferativity

Thesis contains: 32 pages, 7 figures, 14 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD – chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD - member
3. Mila Radan, PhD, assistant prof. - supervisor

Defence date: September 23, 2016

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od ožujka do srpnja 2016. godine.

Iskreno zahvaljujem doc. dr. sc. Mili Radan koja mi je pomogla da uspješno odradim eksperimentalni rad te mi pomogla svojim stručnim savjetima i sugestijama tijekom pisanja i obrade podataka završnog rada.

Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- *Pretraživanje literature vezano za razvoj raka i primjenu citostatika, fitoterapeutika i različitih ljekovitih biljaka u terapiji.*
- *Priprava vodenih ekstrakata biljke Centaurea ragusina* L.
- *Određivanje antiproliferativne aktivnosti biljke Centaurea ragusina* L. *korištenjem MTT testa.*

SAŽETAK

Rak (lat. *cancer*) je pojam koji se koristi za veliku skupinu bolesti u kojima se abnormalne stanice dijele bez kontrole te imaju sposobnost prodiranja i invazije u druga tkiva. Nakupine abnormalnih stanica mogu tvoriti benigne ili maligne tumore. Razlika između njih je u agresivnosti rasta, te u tome što maligni daju metastaze i šire se u okolinu, prodirući u okolno tkivo, dok benigni tumori ne stvaraju metastaze na drugim organima i ne prodiru u okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju odnosno rastu ekspanzivno.

Fitoterapeutici ili fitofarmaceutici kao aktivne sastojke sadrže biljke, biljne dijelove i njihove pripravke, a podrazumijevaju standardizirane biljne droge sa strogo definiranim sadržajem i sastavom terapijski aktivnih tvari, čija je učinkovitost potvrđena farmakološkim i kliničkim istraživanjima, uz naznaku mogućih nuspojava i interakcija s drugim lijekovima. Osnovna karakteristika fitofarmaceutika/fitoterapeutika je postojanje smjesa prirodnih tvari, a ponekad se procesuira i nekoliko biljaka (ili njihovih dijelova) u jedan pripravak.

Cilj ovog rada bio je ispitati antiproliferativno djelovanje vodenih ekstrakta endemske vrste *Centaurea ragusina* L., koja raste na području Dalmacije, na stanice raka dojke (MB-MDA 231) i raka prostate (T24).

Vodeni ekstrakt *Centaurea ragusina* L. pokazao je dobro antiproliferativno djelovanje na stanice raka prostate i raka dojke.

Ključne riječi: rak dojke, rak prostate, *Centaurea ragusina* L., antiproliferativnost

SUMMARY

Cancer (lat. *cancer*) is the term used for a large group of diseases in which abnormal cells divide without control and are capable of penetrating and invadingother tissues. Clusters of abnormal cells may form benign or malignant tumors. The difference between them is in the growth aggressivness , and that the malignant tumors can metastasize and spread into the environment, penetrating into the surrounding tissue, while benign tumors do not give metastases to other organs and does not blend into the surrounding healthy tissue, they grow expansively.

Phytotherapeutics or phytopharmaceuticals have active ingredients such as: plants, plant parts and their concotions, and include standardized herbal drugs with strictly defined content and a composition of a therapeutically active substance, which has confirmed the effectiveness of pharmacological and clinical research, with the indication of possible side effects and drug interactions. The main characteristic of phytopharmaceuticals / phytotherapeutics is the existence of a mixture of natural substances, and sometimes several plants (parts) are processed in a single concotion.

The aim of this study was to examine the antiproliferative activity of aqueous extract of several species of *Centaurea ragusina* L., which can be found in Dalmatia, on breast cancer cells (MDA-MB 231) and prostate cancer (T24).

The aqueous extract of *Centaurea ragusina* L. showed the best anti-proliferative effect on prostate cancer cells and breast cancer cells.

Keywords: breast cancer, prostate cancer, *Centaurea ragusina* L., antiproliferativity

Sadržaj

UVOD **1**

1 Opći dio **2**

1.1 Rak ***2***

1.1.1 Podjela tumora **3**

1.1.2 Razvoj tumora **4**

1.1.3 Uzroci nastanka tumora **7**

1.1.4 Rak dojke (MB-MDA231) **10**

1.1.5 Rak prostate (T24) **11**

1.2 Lijekovi ***13***

1.2.1 Citostatici **13**

1.2.2 Fitoterapeutici **14**

1.2.3 Antitumorsko djelovanje biljaka **17**

2 Pregled korištenih metoda **18**

2.1 Spektrofotometrija ***18***

2.2 MTT test ***20***

3 Eksperimentalni dio **23**

3.1 Rod zečina ***23***

3.1.1 Dubrovačka zečina **24**

3.2 Predobrada biljnog materijala ***26***

3.3 Kulture stanica ***26***

3.4 MTT-metoda ***27***

4 Rezultati **29**

5 Rasprava **30**

6 Zaključak **31**

7 Literatura **32**

UVOD

Rak je pojam koji se koristi za veliku skupinu bolesti u kojima se abnormalne stanice dijele bez kontrole te imaju sposobnost prodiranja i invazije u druga tkiva. Nakupine abnormalnih stanica mogu tvoriti benigne ili maligne tumore. Razlika između njih je u agresivnosti rasta te u tome što maligni daju metastaze i šire se u okolinu, infiltrirajući se u okolno tkivo, dok benigni tumori ne daju metastaze na druge organe i ne prodiru u okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju odnosno rastu ekspanzivno**.**

Testovi, kojima se mjeri proliferacija i citotoksičnost, se često koriste da bi se utvrdili odgovori i stanje stanica u kulturi nakon što ih se tretira s različitim tvarima. Odabir odgovarajućeg testa ovisi o broju i vrsti stanica, ali i o očekivanom rezultatu. Testovi stanične proliferacije mogu mjeriti broj stanica tokom vremena, broj staničnih podjela, metaboličku aktivnost ili DNA sintezu. Ovi testovi imaju rasprostranjenu primjenu kod mjerenja jakosti vezivanja receptora i raznih staničnih događanja koji mogu biti povezani s ekspresijom genskih receptora, praćenjem funkcije organela ili kretanjem staničnih komponenti.

Bez obzira o kojoj vrsti testa se radi, važno je znati koji broj stanica će preživjeti po završetku eksperimenta. Postoji mnogo vrsta testova kojim je moguće utvrditi broj živih eukariotskih stanica. Test redukcije tetrazoliumom mjeri neke aspekte metabolizma ili enzimsku aktivnost kao marker stanica. Test zahtjeva inkubaciju reagensa s populacijom stanica, kako bi se supstrat preveo u obojeni ili fluorescentni produkt koji se može detektirati mjerenjem apsorbancije ili fluorescencije korištenjem čitača mikrotitarskih pločica.

1 Opći dio

1.1 Rak

Rak je pojam koji se koristi za veliku skupinu bolesti u kojima se abnormalne stanice dijele bez kontrole te imaju sposobnost prodiranja i invazije u druga tkiva. Novotvorina, neoplazma (*grč. neos* - nov, *plasia* - rast) ili tumor (*lat. tumor* - oteklina) patološka je tvorba nastala kao posljedica nekontrolirane diobe stanica.

Rast novotvorine nadmašuje rast normalnih tkiva, biološki je nesvrhovit, nepravilan i neorganiziran. U osnovi, novotvorine nastaju kad se izgubi normalna fiziološka regulacija kontrolnih mehanizama rasta stanice. Gubitak kontrole rasta posljedica je narušavanja niza regulacijskih sustava što rezultira nastankom stanica s promijenjenim svojstvima u odnosu na normalne stanice. Tijelo odraslog čovjeka se sastoji od otprilike 10^{15} stanica[1] od kojih mnoge imaju sposobnost dijeljenja i diferencijacije kako bi mogle obnavljati tkiva i organe kojima je to potrebno. Ipak, unatoč ogromnoj proizvodnji novih stanica, ljudsko tijelo zadržava stalnu masu tijekom mnogih desetljeća. To se postiže strogom kontrolom nad umnažanjem stanica djelovanjem složenih i isprepletenih molekularnih mehanizama koji upravljaju staničnom proliferacijom i staničnom smrti, ili apoptozom ukoliko se radi o programiranom događaju. Bilo koji čimbenik koji mijenja tu ravnotežu ima potencijal, ukoliko ga se ne spriječi, promijeniti ukupan broj stanica u određenom organu ili tkivu. Nakon više generacija takvo povećano umnažanje stanica može postati klinički prepoznatljivo kao neoplazija. Novonastale stanice se od polaznih stanica razlikuju i strukturno i funkcionalno, ali se u većini slučajeva može prepoznati od koje vrste stanica ili tkiva je nastao tumor.

1.1.1 Podjela tumora

Nakupine abnormalnih stanica mogu tvoriti benigne ili maligne tumore. Razlika između njih je u agresivnosti rasta te u tome što maligni daju metastaze i šire se u okolinu, infiltrirajući se u okolno tkivo, dok benigni tumori ne daju metastaze na druge organe i ne penetriraju u okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju odnosno rastu ekspanzivno. Zloćudnost ili malignost nekog tumora odnosi se na svojstvo tog tumora da razara okolno tkivo i da stvara udaljene metastaze u organizmu te kao posljedica nastupa smrt. Naravno, dijagnoza zloćudnog tumora ne podrazumijeva smrt.

Pravodobnom dijagnozom i dobrim odabirom terapije izlječenje je moguće kod nekih malignih tumora. Maligni tumori, koji se označavaju i pojmom rak, su često smrtonosni jer imaju sposobnost metastaziranja, tj. migracije putem krvi i limfe u udaljene dijelove tijela. Razlikuju se:

- Neinvazivni maligni tumori
  Neinvazivni tumor (lat. *carcinoma in situ*) je tumor u kojem građe stanica imaju morfološke i druge osobine malignosti, čiji je međusobni odnos izmijenjen, ali koji ne probija bazalnu membranu. U visokom postotku prerasta u pravu, invazivnu neoplazmu, ali je ponekad moguće i njeno spontano povlačenje.
- Invazivni maligni tumori
  To su promjene koje imaju sve morfološke i funkcionalne maligne osobine.

Sve stanice malignih tumora pokazuju šest obilježja: rast stanica i podjela u odsutnosti odgovarajućih signala, stalan rast i podjela usprkos prisutnosti suprotnih signala, izostanak apoptoze, neograničen broj staničnih dioba, poticanje izgradnje krvnih žila (angiogeneza) i invazija tkiva i formiranje metastaza.

1.1.2 Razvoj tumora

Prirodni tok razvoja tumora se odvija u nekoliko uzastopnih faza:

• maligna transformacija stanice (kancerogeneza)

• klonalni rast tumorskih stanica i stvaranje tumorske mase

• lokalna invazija

• stvaranje udaljenih metastaza.

Na rast tumorske mase pored kinetike rasta samih tumorskih stanica utječe i njihova opskrba krvlju. Inicijalno tumor koristi postojeće krvne žile domaćina, ali porastom iznad 1-2 mm dolazi do stvaranja novih krvnih žila, odnosno tumorske neoangiogeneze. Ona se događa pod utjecajem angiogena. Mnogi angiogeni su produkt onkogena. Geni čiji su produkti potrebni za nastajanje i održavanje malignog stanja nazivaju se onkogenima. Oni potencijalno mogu mijenjati međusobni odnos stanica, njihov rast, a prije svega diobu i diferencijaciju. Onkogeni su najprije otkriveni kao dijelovi genoma akutno transformirajućih retrovirusa, koji uzrokuju stvaranje tumora kod životinja u vremenu od dva do tri tjedna (virusni onkogeni). Antionkogeni su tumor supresorski geni. Za razliku od onkogena, koji proizvode stimulirajuće faktore za rast tumora, proteinski produkti antionkogena koče rast tumora. Produkti onkogena zovu se onkoproteini te su slični normalnim proteinima i djelomično imaju istu funkciju. Međutim, izgubljeni su neki važni mehanizmi regulacije te njihova ekspresija postaje manje ili više neovisna od vanjskih ili unutrašnjih regulatornih mehanizama.

1.1.2.1 Kancerogeneza

Proces transformacije stanica ili kancerogeneza počinje s promjenama rasporeda baza u molekuli DNA i poremećaju aktivnosti gena odgovornih za rast i diferencijaciju stanice. U fazi inicijacije dolazi do promjene aktivnosti genskog sustava0. U toku sljedećih dioba ove promjene se potenciraju. Ovaj proces može biti zaustavljen ili nastavljen i prelazi u fazu promocije uz sudjelovanje mnogobrojnih čimbenika unutarnje i vanjske sredine. Nakon ovoga, kraći ili duži latentni period je različit za različite tumore, ali i čimbenike koji su doveli do konačne transformacije normalnih stanica u tumorske. Uzroci nastanka većine malignih tumora su nepoznati, međutim, poznato je da su mnogobrojni uzroci unutarnji (nasljedni, endogeni hormoni i dr.) i vanjski (kemijski, fizički, biološki) čimbenici.

Za nastanak i razvoj maligne stanice ključna su mutacijska oštećenja koja rezultiraju aktivacijom gena uključenih u stimulaciju proliferacije i preživljavanja stanica tzv. onkogena te inaktivacijom tzv. tumor supresorskih gena koji sprječavaju pretjeranu (nekontroliranu) proliferaciju i rast stanica te potiču apoptozu.

Tumorsko napredovanje je pojava koja upućuje na činjenicu da tumor vremenom postaje agresivniji u smislu ubrzanog rasta, povećanja invazivnosti, sposobnosti stvaranja metastaza, otpornosti na terapiju. Radi poznate genetičke nestabilnosti tumora, česta je pojava mutacija u njegovim stanicama, čime nastaje heterogenost unutar prvobitno homogene tumorske populacije.

Metastaziranje je proces stvaranja tumorskih stanica udaljenih od primarne lokalizacije bolesti. Tumori imaju veoma različit potencijal metastaziranja, ovisno o histološkom tipu i specifičnim strukturnim promjenama unutar samog tumora. Ponekad se metastaze pojavljuju i prije samog primarnog tumora. Metastaze nastaju od subpopulacije veoma agresivnih stanica, koje se javljaju rano u toku razvoja, progresije primarnog tumora. Metastatski potencijal stanice obuhvaća niz svojstava: pokretljivost, sposobnost invazije i ulaska u krvne žile, sposobnost preživljavanja u cirkulaciji, sposobnost diobe i rasta na udaljenim mjestima.

Distribucija metastaza po pojedinim organima je različita, ovisno o histološkom tipu i anatomskoj lokalizaciji tumora. Metastaze se najčešće lociraju u prvom kapilarnom

sjedištu na putu cirkulirajućih stanica (sarkomi u plućima, tumori kolona u jetri, tumori pluća u mozgu). Pojedini tumori metastaziraju na mjesta koja ne mogu biti objašnjena anatomskim razlozima, nego specifičnim afinitetom.

Maligni tumori djeluju na organizam lokalno i sustavno. Ukoliko se uspješno ne liječe, neminovno dovode do smrti pacijenta.

1.1.3 Uzroci nastanka tumora

Uzroci koji dovode do maligne transformacije stanica i nastanka malignih tumora rezultat su interakcije faktora okoline i domaćina. Kemijski karcinogeni su organske i anorganske tvari koje pokazuju selektivni afinitet prema određenim tkivima. Neki su uobičajeno prisutni u životnoj sredini, dok su drugim izložene pojedine kategorije ljudi (npr. kemijski kancerogeni radne sredine). Stoga, većina karcinoma kod ljudi nije naprosto genetski predodređena posljedica starenja nego prije očitovanje individualne izloženosti. Većina se kemijskih kancerogena metabolički aktivira preko citokroma 450 ili drugih enzima.

- Procjenjuje se da u svijetu puši oko 1,2 milijarde ljudi, a da su stotine milijuna nepušača izloženi duhanskom dimu. Glavni izvor duhanskog dima su cigarete, kojih godišnje izgara oko 5,5 trilijuna, tj. oko 1000 cigareta na svakog stanovnika zemlje.[2] Dokazano je da je nikotin jedan od glavnih faktora nastanka karcinoma pluća i grla. Devedeset posto oboljelih od karcinoma pluća su pušači. Kod preostalih 10 % koji su oboljeli od karcinoma pluća, a spadaju u nepušače, nedavno je otkriven gen odgovoran za karcinom pluća. Glavni čimbenici koji utječu na rizik obolijevanja su dužina pušenja i broj cigareta. Nakon prekida pušenja postepeno se smanjuje rizik od karcinoma. Rizik od karcinoma je svakako veći kod onih koji su prestali pušiti nego onih koji nikada nisu pušili. Pasivno pušenje, tj. boravak i rad u prostorima gdje se puši također nosi jednak rizik od karcinoma. Pušenje je također rizični čimbenik za karcinom usana, usne šupljine, ždrijela i grkljana i mokraćnog mjehura. Kancerogene sastojke duhanskog dima čine policiklički i heterociklički aromatski ugljikovodici, nitrozoamini, aromatični amini, aldehidi, fenoli, različite organske komponente i metali. Štetnost pušenja može utjecati i na razvoj fetusa.
- Kontinuirano konzumiranje većih količina žestokih pića uz pušenje povećava rizik od nastanka raka usne šupljine, ždrijela, jednjaka, larinksa i jetre.
- Kemikalije kao uzrok nastanka raka dokazane su kod nekih rijetkih profesionalnih grupa. Kancerogenost nekih kemijskih agensa dokazana je i u eksperimentalnim istraživanjima na životinjama. Odavno je poznato da su neki

tumori češći kod ljudi koji su profesionalno izloženi različitim toksičnim tvarima u proizvodnji i primjeni boja i lakova, preradi nafte i derivata, industriji guma, azbesta, pesticida, duhana itd.

- Ionizirajuće zračenje predstavlja najpoznatiji fizički čimbenik s direktnim dokazima da povećava rizik od nastanka karcinoma. Karcinogeni učinak zračenja poznat je još od početka manipulacija s ovim izvorima, ubrzo nakon otkrića x-zraka (Röntgen 1895.) potom radioaktivnosti (Becquerel 1896., Curie 1898.). Ionizirajuće zračenje dovodi do ionizacije vodenog medija stanica i nastanka reaktivnih spojeva, slobodnih radikala koji onda stupaju u različite kemijske procese dovodeći do deaktivacije enzima i drugih spojeva u stanici. Na ovaj način nastaju oštećenja DNA, greške u procesu popravka šteta, mutacije. Akutna i kronična mijeloična leukemija, akutna limfatična leukemija vrlo su osjetljive na indukciju zračenjem, a od solidnih tumora tiroidne žlijezde, pluća, dojke i mnoga druga tkiva. Latentni period (između izlaganja zračenju i pojave tumora) je kraći za leukemije nego za ostale tumore. Za leukemije to je period od 2 godine, s najvećom mogućnošću 4 do 8 godina, dok je za ostale tumore 5 do 10 godina. Naročitu opasnost predstavlja kontaminacija dugoživućim radioaktivnim izotopima (dospjelim u zrak, vodu i tlo, direktnom ili indirektnom kontaminacijom hrane (povrće, voće, meso, mlijeko).
- Ultraljubičasta zračenja su glavni uzrok svih oblika kožnih karcinoma. Ovi karcinomi uglavnom se dovode u direktnu vezu sa sunčevim zračenjem, ali nisu smrtonosni. Maligni tumor je manje ovisan o potpunom izlaganju (akumuliranoj dozi) nego o akutnim opekotinama nakon sunčanja. Opekotine od sunčanja ponavljane 5 puta udvostručuju rizik od tumora.
- Različita istraživanja, poput ekoloških, migracijskih, kontroliranih (*engl. case control study*) istraživanja i nasumičnih kliničkih istraživanja, pokazale su razlike u učestalosti pojedinih vrsta malignih tumora kod stanovništva s određenim navikama u ishrani. Najznačajniji utjecaj dijete na rizik od tumora je kroz razmatranja tjelesne težine. Prekomjerna debljina i pomanjkanje fizičke aktivnosti smatra se jednim od glavnih rizičnih faktora za rak dojke u postmenopauzi, zatim raka debelog crijeva, pankreasa i mnogih drugih. Dobitak 10 kg više u postmenopauzi znakovito povećava rizik od tumora dojke u žena koje nisu uzimale hormonalnu nadomještanu terapiju. Suprotno, gubitak tjelesne težine smanjuje rizik od ovog tumora. Porast težine direktno je vezan s

povećanjem nivoa endogenih estrogena u žena u postmenopauzi. Pored tjelesne težine, konzumiranje alkohola je jedan od dokazanih rizičnih čimbenika za nastanak tumora. Životinjske masti i crveno meso dovode se u vezu s rizikom za rak debelog crijeva i prostate i to osobito agresivnijih oblika. Za povrće i voće pretpostavljalo se da imaju glavnu zaštitnu ulogu u prevenciji tumora radi bogatstva u sadržaju antikancerogenih tvari - antioksidansa, minerala, vlakana, vitamina, karotenida. Međutim, nasumična istraživanja su pokazala da je zaštitna uloga voća i povrća precijenjena. Hrana bogata vlaknima uz fizičku aktivnost glavni su čimbenici koji doprinose redovnom pražnjenju stolice pa se smatraju važnim preventivnim čimbenikom za razvoj raka debelog crijeva. Preventivna uloga soje u nastanku raka dojke analizirana je mnogim kliničkim istraživanjima. Obećavajuća istraživanja o utjecaju prehrane na pojavu raka su posebno ona koja se odnose na vitamin D, mlijeko i način ishrane u djetinjstvu.

- Dokazano je da su kronične virusne infekcije uzroci nekih malignih tumora. Virusi posjeduju onkogene ili se ugrađuju u genom stanice domaćina dovodeći do transformacije stanica u maligne. Latentni period od infekcije do nastanka raka je obično dug, 20 i više godina. Malignoj transformaciji stanice doprinose i drugi karcinogeni koji pospješuju ovaj proces virusne onkogeneze. Retrovirusi, među njima Humani T limfotropni virus tip 1 (HTLV-1) i tip 2 povezani su s razvojem malignog limfoma i T-limfocitne leukemije. Virus humane imunodeficijencije, HIV-1 i HIV-2 dovodi do sindroma stečene imunodeficijencije - SIDA što može doprinijeti razvoju mnogih malignih tumora.

  Kronična infekcija jetre s Hepatitis B i Hepatitis C virusima predstavlja glavni čimbenik u nastanku hepatocelularnog karcinoma. Tako je učestalost od ovog karcinoma najveća u azijskim zemljama gdje je infekcija ovim virusom veoma česta. Humani papiloma virusi (HPV), njih oko 140 poznatih tipova, od kojih su najčešći tipovi 6, 11, 16, 18, uzročnik je raka grlića materice u preko 90 % slučajeva. [3]

1.1.4 Rak dojke (MB-MDA231)

Rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena u svijetu koji nastaje kad normalne žljezdane stanice dojke promijene svoja svojstva te počnu nekontrolirano rasti, umnožavati se i uništavati okolno zdravo tkivo. Prema podatcima Registra za rak Hrvatske (Hrvatski zavod za javno zdravstvo), godišnje u Hrvatskoj od raka dojke obolijeva oko 2300 žena. Rak dojke je i najčešći uzrok smrti od raka kod žena u Hrvatskoj, godišnje umire preko 800 žena. Očekuje se daljnji trend porasta broja oboljelih u Hrvatskoj.

Od raka dojke najčešće obolijevaju žene iznad 50. godine života, ali i žene mlađe dobi. Zemlje koje su rano počele s organiziranim programima ranog otkrivanja (palpacija i mamografija) već imaju prisutan pad smrtnosti. U Hrvatskoj je 18. listopada 2006. počela provedba nacionalnog programa prevencije raka dojke, u kojem su sve žene u dobi od 50 do 69 godina bile pozvane na preventivni mamografski pregled. Cilj programa je smanjiti smrtnost od raka dojke za najmanje 25 %. Od raka dojke mogu oboljeti i muškarci, ali je rak dojke stotinu puta češći kod žena, nego u muškaraca.

Od ukupnog broja pregleda dojki u 2011. godini zabilježeno je 10,6 % onih s patološkim nalazom što je povećanje u odnosu na prethodnu godinu (5,4 %). Dojka se sastoji od žljezdanog i potpornog tkiva. Žljezdano tkivo čine mliječne žlijezde i mliječni kanali, a potporno čine masno i vezivno tkivo. Najveći broj karcinoma dojke javlja se u gornjem vanjskom kvadrantu i izdancima žljezdanog tkiva usmjerenim prema aksili (pazušnoj jami). Zloćudni tumori dojke najčešće su epitelnog porijekla. Mogu nastati iz epitela kanalića (90 %) ili epitela režnjića (10 %), a oba se dijele na one koji nisu probili bazalnu membranu (neinfiltrirajući *in situ*) i na one koji su probili (infiltrirajući).[4]

1.1.5 Rak prostate (T24)

Prostata je organ odnosno žlijezda kod muškaraca koja se nalazi na bazi ili vratu mokraćnog mjehura. Prostata okružuje početni dio uretre. Uretra je cijev koja odvodi mokraću iz mokraćnog mjehura prema van kroz izlaz na glavi penisa. Jedna od funkcija prostate je kontrola mokrenja koja se odvija izravnim pritiskom na gornji dio uretre koji prostata okružuje. Glavna funkcija prostate je proizvodnja određenih tvari koje se nalaze u normalnom sjemenu kao što su minerali i šećer. Sjeme je tekućina koja prenosi spermu kako bi se omogućila reprodukcija. Čovjek može, međutim, jako dobro funkcionirati i bez svoje prostate.

U mladog muškarca, normalna prostata je veličine oraha (< 30 g). Tijekom uobičajenog starenja žlijezda obično raste i postaje velika. Ovakav rast je uvjetovan hormonski te se povećanje prostate povezano sa starenjem naziva benigna hiperplazija prostate (BHP) i nije povezana s rakom prostate. I benigna hiperplazija prostate (BHP) i rak prostate, međutim, mogu uzrokovati slične probleme kod starijih muškaraca. Na primjer, povećana prostata može stisnuti uretru što utječe na izlaz urina iz mokraćnog mjehura ili uretre, a to dovodi do poteškoća s kontrolom mokrenja. Simptomi koji se javljaju obično uključuju usporavanje tijeka mokraće i češće mokrenje, osobito noću. Pojava ovih simptoma zahtijeva pregled i savjet od urologa ili liječnika primarne zdravstvene zaštite.

Kako rak prostate u svom rastu napreduje, povećava se mogućnost njegovog širenja izvan prostate u okolna tkiva (lokalno širenje) ili stvaranja metastaza. Najčešća mjesta metastaza raka prostate su kosti, pluća i jetra. Simptomi i znakovi raka prostate zapravo su više povezani sa širenjem bolesti u udaljene organe, nego s lokaliziranom bolesti u samoj prostati.

Rak prostate je po učestalosti drugi najčešći zloćudni tumor u Hrvatskoj (tj. dijeli drugo mjesto s rakom debelog crijeva i rektuma). Od raka prostate u Hrvatskoj u 2010. g. je oboljelo 1786 muškarca što čini 16 % od ukupnog broja muškaraca oboljelih od raka. U istoj godini od raka prostate umrla su 723 muškaraca, odnosno 2,82 % od svih uzroka smrtnosti muškaraca u toj godini što rak prostate drži na visokom 7. mjestu svih uzroka

smrtnosti. Pojavnost raka prostate nije zabilježena prije 40. godine života, a nakon 50. g. života incidencija naglo raste, a najveća pojavnost je u dobi od 70 do 74 godine gdje se bilježi preko 400 novo dijagnosticiranih slučajeva raka prostate na godinu. Iako se oko ranog otkrivanja raka prostate u svijetu još uvijek vode brojne polemike, mnogi stručnjaci u ovom području preporučuju uvođenje i kontinuirano provođenje probirnog ili „screening“ programa za rak prostate kod svih muškaraca starijih od 40 godina.

1.2 Lijekovi

1.2.1 Citostatici

Citostatici su lijekovi koji ne djeluju selektivno; naime, uništavajući zloćudne stanice oni oštećuju i zdrave, poglavito one koje se brzo dijele (kao što su krvotvorne stanice, stanice sluznice probavnog trakta i spolne stanice).
Sama kemoterapija (liječenje citostaticima) može se primijeniti kao monoterapija (jedan lijek) ili češće kao polikemoterapija (kombinacija više lijekova). Vrlo često se primjenjuje istodobno s biološkom terapijom (imunoterapijom, antiangiogenom terapijom) ili uz zračenje. Budući da većina citostatika ne prolazi krvnomoždanu barijeru, u određenim tumorima središnjeg živčanog sustava lijek se aplicira intratekalno.

Ovisno o mehanizmu djelovanja razlikuju se nekoliko skupina citostatika:

- alkilirajuća sredstva (ciklofosfamid, ifosfamid, lomustin, karmustin, spojevi platine)
- antimetaboliti (5-fluorouracil, metotreksat, citarabin)
- prirodni spojevi (antraciklini, bleomicin, etopozid, vinkristin, vinblastin)

U novije doba razvijaju se novi tzv. pametni lijekovi u liječenju brojnih vrsta zloćudnih bolesti, a koji su drugačijeg mehanizma djelovanja od klasičnih citostatika. Ti lijekovi djeluju na molekularnoj razini sprečavajući molekule koje sudjeluju u prijenosu staničnih signala, angiogenezi, receptora za čimbenike rasta i slično, a uglavnom se primjenjuju uz standardnu kemoterapiju. Najčešće nuspojave terapije citostaticima vezane su uz krvnu sliku (npr. anemija) ili probavni trakt (mučnina, povraćanje, proljev). Intenzitet ovih nuspojava razlikuje se ovisno o vrsti citostatika.

1.2.2 Fitoterapeutici

Farmakognozija (grč. *pharmakon* - droga, *gnosis* - znanje) je znanost o ljekovitim tvarima biljnog, životinjskog i mineralnog porijekla (suvremena farmakognozija obuhvaća i mikroorganizme). Farmakognozija je interdisciplinarna znanost koja povezuje različita znanstvena područja: botaniku, biologiju, mikrobiologiju, kemiju, farmakologiju i dr.

Fitoterapeutici ili fitofarmaceutici prema definiciji (ESCOP – *engl. Europe Scientific Corporative of Phytotherapy*) kao aktivne sastojke sadrže biljke, biljne dijelove i njihove pripravke, a podrazumijevaju standardizirane biljne droge sa strogo definiranim sadržajem i sastavom terapijski aktivnih tvari, čija je učinkovitost potvrđena farmakološkim i kliničkim istraživanjima, uz naznaku mogućih nuspojava i interakcija s drugim lijekovima. Osnovna karakteristika fitofarmaceutika/fitoterapeutika je postojanje smjesa prirodnih tvari, a ponekad se procesuira i nekoliko biljaka (dijelova) u jedan pripravak. Njihove komponente se dijele na aktivne i prateće tvari u skladu s njihovim udjelom na kumulativni učinak. Količina djelatne (aktivne) tvari prisutne u biljnoj drogi ovisi o: uvjetima rasta biljke (tlo, temperatura, vlažnost, godišnje doba), stupnju zrelosti biljke u trenutku sabiranja, procesu sušenja, načinu i vremenu skladištenja. Prateće tvari također mogu doprinijeti učinku fitofarmaceutskog pripravka preko interakcije s aktivnim tvarima. Često cijeli niz u biljci prisutnih tvari pridonosi postizanju željenog učinka (npr. sinergističko djelovanje). U tom slučaju iz ljekovite biljke treba izvući sve te tvari istodobno, zadržavajući njihov međusobni odnos. Tako se dobiva standardizirani ekstrakt.

Uz aktivnu tvar, biljni ekstrakt sadrži i "druge komponente" prisutne u biljci, kemijski vrlo raznolike, koje zajedno s djelatnim tvarima čine fitokompleks. Važnost "ostalih komponenti" jest u tome što moduliraju djelovanje aktivnih tvari i pospješuju njihovu apsorpciju. Kao rezultat korištenja fitokompleksa u odnosu na pojedinačnu djelatnu tvar, uočeno je smanjenje toksičnosti, neželjenog djelovanja te cjelovitiji i uravnoteženiji učinak na cijeli organizam.

Općenite karakteristike fitofarmaceutika su:

• Blago djelovanje - aktivne tvari u fitofarmaceuticima obično su razrijeđene pratećim tvarima (biološki neaktivnim), a i same po sebi imaju blago djelovanje.

• Fitofarmaceutici su manje specifični od sintetskih lijekova i obično imaju širi spektar djelovanja.

• Manje neželjenih djelovanja - aktivne tvari fitofarmaceutika brže se metaboliziraju i izlučuju iz organizma pa rjeđe dolazi do nakupljanja u organizmu i mogućeg štetnog djelovanja.

• Tijekom terapije više je izražena psihosomatska komponenta – pacijenti često bolje prihvaćaju fitofarmaceutike nego sintetske lijekove.

• Djelovanje je sporo - često je potrebno dugotrajno liječenje.

• Moguće opasnosti - nijedna farmakološki aktivna tvar nije samo ljekovita, već istodobno ima i određenu štetnost.

Budući da sve tvari prisutne u biljnom lijeku nisu uvijek poznate, nije poznato ni da li i u kojoj mjeri mogu u određenim situacijama biti štetne (rizik je veći u složenijim situacijama liječenja).

Fitoterapija prestaje upravo u trenutku kada se metodama izolacije i obradom izolata dobije aktivna čista tvar. Dobivena čista tvar, za koju je utvrđena farmakološka djelotvornost, postaje tada sastavni dio liječenja u tradicionalnoj medicini.

Primjerice salicilna kiselina, praotac Aspirina®, a time i svih protuupalnih nesteroidnih lijekova (najviše korištenih lijekova protiv bolova), potječe od kore vrbe od koje se mljevenjem dobivao prašak koji se koristio kao fitofarmaceutik: analgetik (sredstvo za umanjivanje boli koje ne izaziva gubitak svijesti) i antipiretik (sredstvo za snižavanje povišene tjelesne temperature). Gotovo istodobno s ovim otkrićem, uočeno je i njeno štetno djelovanje na želučanu sluznicu. Zahvaljujući radu kemičara, salicilna kiselina se acetiliranjem prevodi u acetilsalicilnu kiselinu (aspirin), čime se smanjuje nepoželjno djelovanje i time je dobiven lijek – Aspirin®.

1.2.2.1 Dobivanje fitoterapeutskih tvari

Od ljekovitih biljaka do fitoterapeutskih pripravaka i pojedinačnih ljekovitih tvari se dolazi raznim metodama izolacije i pročišćavanja. Osim jednostavnih i oblikovanih fitoterapeutskih pripravaka kao smjese aktivnih tvari, današnja istraživanja usmjerena su na izolaciju pojedinačnih aktivnih tvari (ili smjese manjeg broja tvari) iz biljaka ili pripravaka u cilju određivanja kemijske strukture aktivne tvari te korelacije biološke aktivnosti s kemijskom strukturom.

Izolacija pojedinačnih biološki aktivnih tvari može predstavljati više ili manje složen problem, ovisno o koncentraciji tvari i složenosti pratećih tvari. Prirodni spojevi mogu doprinijeti istraživanju novih lijekova na različite načine: djelujući kao novi ljekovi koji se mogu koristiti u nepromijenjenom stanju (npr. vinkristin iz *Catharanthus roseus*), osiguravajući kemijske "građevne elemente" (eng. *bilding blocks*) za sintezu više kompleksnih molekula, indicirajući nove načine farmakološkog djelovanja koji omogućavaju potpunu sintezu novih kemijskih analoga.

Prirodni spojevi će se nastaviti smatrati glavnim izvorom novih lijekova u nadolazećim godinama zbog toga što: pružaju neusporedivu strukturnu različitost, mnogi od njih su relativno mali (< 2000 Da), imaju svojstva slična lijekovima (npr. mogu se absorbirati i metabolizirati).

Samo mali dio svjetske bioraznolikosti je istražen na biološku aktivnost. Tako postoji više od 250 000 vrsta viših biljaka, ali je do sada istraženo niti 5-10 %. Razvoj i uvođenje novih visoko specifičnih tehnika te kromatografskih metoda i spektroskopskih tehnika, omogućio je lakše, brže i preciznije ispitivanje, izoliranje i identifikaciju vodećih kemijskih struktura za lijekove.

1.2.3 Antitumorsko djelovanje biljaka

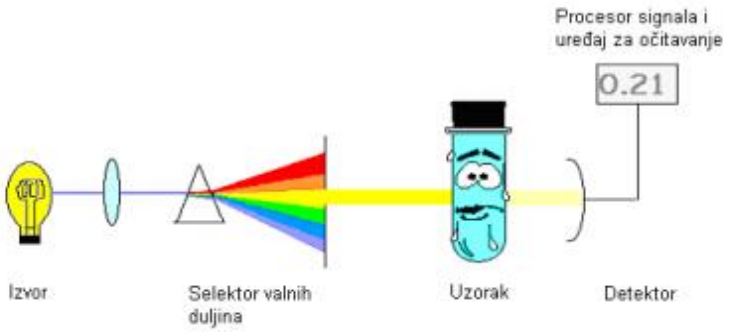
Biljke imaju dugu tradiciju upotrebe u tretiranju tumora. U revijalnom pregledu biljaka koje se koriste protiv tumora, Hartwell [5] spominje više od 3000 biljaka. Međutim, u mnogim slučajevima pojam tumor nije definiran ili se odnosi na različita stanja pacijenta, npr. pojačano znojenje i sl. Mnoge tvrdnje o učinkovitosti kod tretmana tumora trebaju se preispitati s većom dozom kritičnosti budući se tumor, kao specifična bolest, vjerojatno loše definira u tradicionalnoj medicini. Ovo je u suprotnosti u odnosu na druge terapije ljekovitim biljem koje se koriste u tradicionalnoj medicini za tretiranje drugih oboljenja kao što su malarija ili razne vrste boli, koji se mnogo lakše definiraju i gdje su oboljenja često prevladavajuća u područjima gdje se ekstenzivno koristi tradicionalna medicina.

Međutim, preko 60 % trenutačno korištenih protutumorskih sredstava izvedeno je na ovaj ili onaj način iz prirodnih izvora, uključujući biljke, morske organizme i mikroorganizme. Prirodni spojevi imaju i danas dominantnu ulogu u otkriću vodećih struktura za razvoj konvencionalnih lijekova za tretiranje većine oboljenja kod ljudi. Istraživanje protutumorskih tvari iz biljaka počelo je 1950.-tih s otkrićem i razvojem vinka alkaloida: vinblastina i vinkristina te izolacijom podofilotoksina. Ova otkrića su potakla *United States National Cancer Institute* (NCI) na početak ekstenzivnog sakupljanja biljaka u 1960.-tim, usmjerenim uglavnom na umjerena klimatska podneblja. To je dovelo do otkrića mnogih do tada nepoznatih kemotipova biljaka sa spektrom citotoksičnog djelovanja uključujući i taksane i kamptotecine, ali se njihov razvoj u klinički aktivne tvari proširio na period od 30 godina (od ranih 1960.-tih do 1990.-tih).

2 Pregled korištenih metoda

2.1 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je tehnika kojom se mjeri apsorpcija emitiranog elektromagnetskog zračenja do koje dolazi kada se određeni uzorak podvrgne samom zračenju. Uređaj za mjerenje apsorbancije naziva se spektrofotometar.



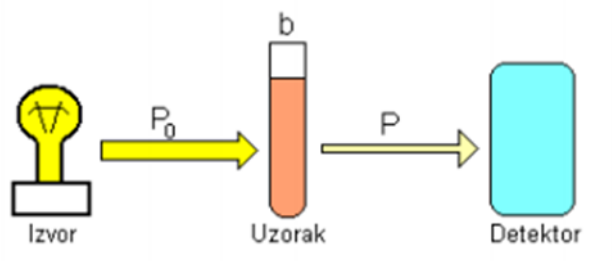
Slika 1. Shematski prikaz dijelova spektrofotometra

Najvažniji pojmovi u spektrofotometriji su transmitacija i apsorbancija.

Transmitacija *(T)* otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = P / P_0 \qquad (1)$$

gdje je P_0 ulazna snaga snopa svjetlosti, a P snaga snopa svjetlosti nakon apsorpcije. Transmitacija se često izražava u postotcima.



Slika 2. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini

Na slici 2 prikazan je snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaza kroz sloj otopine debljine b (cm) i koncentracije c vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju jest smanjenje snage snopa s P_0 na P.

Apsorbancija (A) se definira jednadžbom:

$$A = - \log_{10} T = - \log (P / P_0) = \log (P_0 / P) \quad (2)$$

Nasuprot transmitaciji, apsorbancija otopine se povećava s prigušenjem osnovnog snopa. Ova jednadžba zahtjeva logaritamsku apsorbancijsku ljestvicu.

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom i one koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao Lambert - Beerov zakon:

$$A = \log (P_0 / P) = a \cdot b \cdot c \quad (3)$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c je koncentracija apsorbirajuće vrste. Budući da je apsorbancija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska.

2.2 MTT test

Testovi koji mjere proliferaciju i citotoksičnost se često koriste da bi se utvrdili odgovori i stanje stanica u kulturi nakon što ih se tretira s različitim tvarima. Odabir odgovarajućeg testa ovisi o broju i vrsti stanica, ali i o očekivanom rezultatu. Testovi stanične proliferacije mogu mjeriti broj stanica tokom vremena, broj staničnih podjela, metaboličku aktivnost ili DNA sintezu. Ovi testovi imaju rasprostranjenu primjenu kod mjerenja jakosti vezivanja receptora i raznih staničnih događanja koji mogu biti povezani s ekspresijom genskih receptora, praćenjem funkcije organela ili kretanjem staničnih komponenti.

Bez obzira o kojoj vrsti testa se radi, važno je znati koliko živih stanica će ostati na kraju eksperimenta. Postoji mnogo vrsta testova kojima je moguće utvrditi broj živih eukariotskih stanica.

Test redukcije tetrazoliumom mjeri neke aspekte metabolizma ili enzimsku aktivnost kao marker stanica. Test zahtjeva inkubaciju reagensa s populacijom stanica, kako bi se supstrat preveo u obojeni ili fluoroscentni produkt koji se može detektirati s čitačem mikrotitarskih ploča. U većini slučajeva, inkubacija supstrata sa živim stanicama proizvodi signal koji je proporcionalan broju prisutnih stanica. Stanice koje umiru, brzo gube sposobnost pretvaranja supstrata u produkt. Ta razlika osigurava osnovu za mnoge testove ove vrste.

Mnogi spojevi tetrazolija se koriste kako bi se detektirale žive stanice. Najčešće korišteni su MTT, MTS, XTT i WST-1. Dijele se na dvije osnovne kategorije:

- MTT -pozitivno nabijen i lako prodire u žive eukariotske stanice
- MTS, XTT i WST-1 -negativno nabijeni i teško prodiru u stanice. Koriste se elektron akceptorom, koji može prenijeti elektrone iz citoplazme ili plazmatske membrane, kako bi olakšao redukciju tetrazoliuma u obojen produkt, formazan.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) je prvi test za homogenu održivost stanica prikladan za HTS (engl. *high troughput screening*). MTT test je široko prihvaćen i popularan u velikom broju laboratorija. MTT podloga je pripremljena u uravnoteženoj fiziološkoj otopini, dodana stanicama u kulturi, obično u koncentraciji od 0,2-0,5 mg/ml i inkubirana 1-4 sata. Količina formazana, proporcionalna broju živih

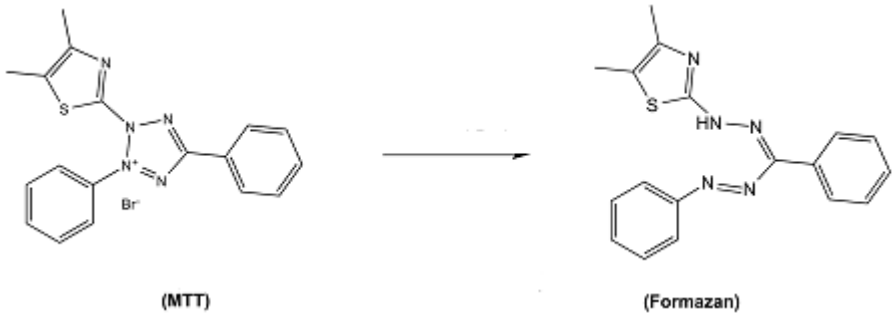
stanica, mjeri se snimanjem apsorbancije pri 570 nm. Žive stanice s aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u ljubičasto obojeni formazan s maksimalnom apsorbancijom od 570 nm. Nastupanjem stanične smrti, one gube sposobnost pretvaranja MTT-a u formazan, tako da boja služi kao marker živih stanica. Precizan stanični mehanizam redukcije MTT-a u formazan nije do kraja razjašnjen, ali vjerojatno uključuje reakciju s NADH ili sličnom redukcijskom molekulom koja prenosi elektrone na MTT. Formazan se nakuplja kao netopivi talog unutar stanice ili se odlaže blizu površine stanice, formazan mora biti topiv prije početka mjerenja apsorbancije. Otapanje formazana, stabilizacija boje, smanjenje isparavanja i interferencija fenol crvenog te ostalih komponenti kulture se postiže na različite načine. Za otapanje se koriste: zakiseljeni izopropanol, DMSO (dimetil sulfoksid), dimetilformaamidi, SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*) i različite kombinacije deterdženata i organskih otapala. Zakiseljenjem otopine mijenja se boja fenol crvenog u žutu i time se smanjuje moguća interferencija prilikom mjerenja. Također se može prilagoditi i pH otopine kako bi se osigurala maksimalna apsorbancija ako je osjetljivost u pitanju.[6]

Količina signala ovisi o nekoliko parametara uključujući: koncentraciju MTT-a, vremenski period inkubacije, broj živih stanica i njihov metabolizam.

Duže vrijeme inkubacije rezultira nakupljanjem boje i povećanjem osjetljivosti do neke točke, međutim vrijeme inkubacije je ograničeno zbog citotoksične prirode reagensa koji koristi energiju (redukcijski ekvivalenti poput NADH) iz stanice kako bi proizvelo signal. Za staničnu populaciju u lag fazi rasta, količina formazana je općenito proporcionalna broju metabolički aktivnih živih stanica.

Toksičnost komponenata testa je vjerojatno povezana s koncentracijom dodanom stanicama, optimizirajući koncentraciju smanjuje se toksičnost. Nedavna istraživanja su pokazala da kristali formazana sudjeluju u oštećivanju stanica tako što probiju membranu tijekom egzocitoze. Reducensi interferiraju s redukcijskim testovima. Tvari kao askorbinska kiselina, reducirani glutation, koenzim A mogu reducirati tetrazolijeve soli, bez enzima, povećavajući vrijednost apsorbancije. Povećana vrijednost pH (kiselo ili bazično) ili izloženost reagensa direktnom svjetlu može uzrokovati spontanu redukciju tetrazolijeve soli. Kemijske interferencije mogu se potvrditi pomoću

apsorbancijske vrijednosti kontrolnih jažica bez stanica inkubiranih s MTT-om. Oksoredukcijski stanični enzimi ovisni o NAD(P)H mogu, pod određenim uvjetima, pokazati koliko je prisutno živih stanica. Ovi enzimi su sposobni reducirati MTT u netopivi formazan, koji je ljubičast.



Slika 3. Redukcija MTT-a u formazan

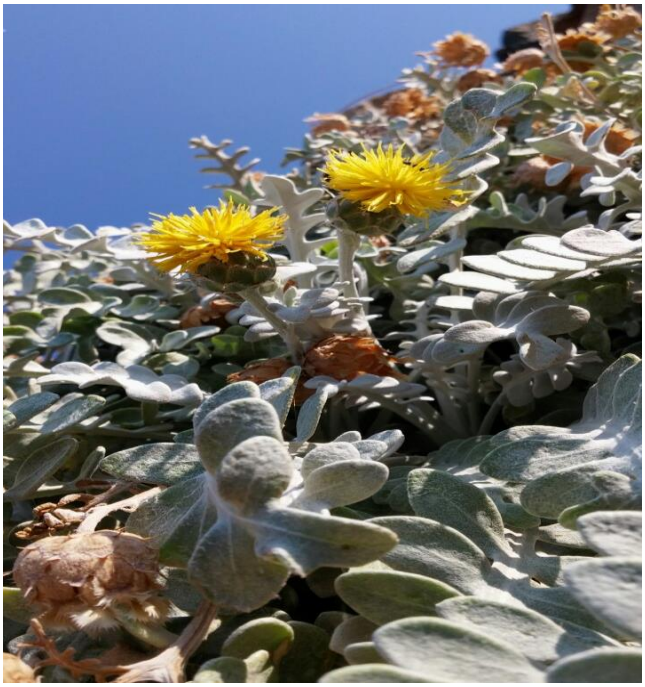
3 Eksperimentalni dio

3.1 Rod zečina

Rod zečina (*Centaurea*) jedan je od najvećih i najkompleksnijih rodova porodice Asteraceae koji obuhvaća oko 500 vrsta. Pripadnice roda zečina jednogodišnje su ili višegodišnje trave, rjeđe patuljasti grmovi. Listovi su im cjeloviti ili perasto razdijeljeni. Na stabiljci je prisutna jedna ili više cvjetnih glavica koje su u skupinama od dvije do tri smještene na vršnim dijelovima ogranaka stabiljke. Ovoj je cvjetnih glavica cilindričan ili okrugao, a pricvjetni listići često imaju resasti ili trnovit privjesak. Unutarnji cvjetovi glavice su dvospolni, a rubni neplodni. Vjenčić je cjevast s (5-8) režnjeva oboda. Plodovi zečine najčešće imaju kunadru koja u većine vrsta ostane na biljci, dok u manjeg broja vrsta otpadne. Kunadru čine dva ili više redova grubih do perastih dlaka ili ljusaka koje mogu biti ovalne do linearne. Red koji se nalazi u samoj unutrašnjosti najkraći je te su ljuske ili dlake koje ga tvore često donjim dijelom međusobno srasle i obično se razlikuju oblikom i teksturom od onih koje se nalaze u vanjskim redovima. Vanjski redovi dlaka (ljusaka) preklapaju jedan drugog.

3.1.1 Dubrovačka zečina

Dubrovačka zečina (lat. *Centaurea ragusina*) je endemska vrsta, zaštićena od 1969. godine na svim svojim staništima. Prvi je put znanstveno opisana krajem 17. stoljeća, kada je francuski botaničar Joseph Pitton de Tournefort, na svojoj ekspediciji po Sredozemlju, skupio biljku u okolici Cavtata i nazvao je „Jacea epidaurica candidissima tomentosa“, što bi u prijevodu s latinskog bilo „bijela dlakava zečina iz Cavtata“. Epidaurus je antički naziv za Cavtat, koji je tijekom srednjeg vijeka nazvan Ragusa Vecchia pa je zato nova biljna vrsta dobila naziv Centaurea ragusina– dubrovačka zečina, iako ona ne raste u samom Dubrovniku i njegovoj užoj okolici. Dubrovačka zečina raste u pukotinama karbonatnih stijena koje se okomito izdižu iznad mora, ali i na eruptivima otočića Brusnika. Hazmofitska je, heliofilna i halofitska vrsta. Raste na brdu Marjan kod Splita, otocima Šolti, Čiovu, Hvaru, Sv. Andriji, Brusniku, Biševu, Visu, Sušcu, Palagruži, Trpnju, Pelješcu, Mljetu te u okolici Cavtata. Višegodišnja je bijelo, prstenasta biljka. Stabiljke su joj uspravne ili pridignute, jednostavne, uglate, 30-60 cm visoke, pri vrhu s 1-4 cvjetne glavice, pri dnu odrvenjele i bijelo vunaste. Bazalni su listovi na dugoj peteljci brojni, perasto dijeljeni, sa svake strane s 4-5 odsječaka. Glavice su okruglaste, promjera 20-25 mm. Ovojne su ljuske blijedozelene do bijelo prstenaste, pri vrhu sa smeđe-crvenim, trokutastim, češljasto-trepavičastim privjeskom, koji završava apikalnim, oko 4 mm dugim trnom svinutim prema natrag. Roška je 4-5 mm duga i oko 1,5 mm široka. Valjkasta je, pri dnu blago sužena, sivkasta, prekrivena poleglim, blago stršećim, svilenkastim dlačicama. Kunadra je iste dužine kao i roška, sastavljena od bijelih stršećih i ukočenih dlaka.[7]



Slika 4. *Centaurea ragusina* L. - dubrovačka zečina

3.2 Predobrada biljnog materijala

Sakupljeni biljni materijal osušen je na zraku, na tamnom mjestu, pri sobnoj temperaturi od 20 °C. Dio materijala su bile potpuno osušene cijele biljke, a drugi dio samo dijelovi biljke (listovi, cvjetovi, stabljike). Nakon sušenja, osušeni biljni materijal je spremljen u tamne posude kako bi se zaštitio od djelovanja svjetla do upotrebe. Biljni materijal je ekstrahiran s vodom u trajanju od 24 sata. Ekstrakti su filtrirani kroz filter papir (Whatman, No.1), a ostatak otapala je uklonjen upotrebom liofilizatora. Tako dobiveni liofilizat ponovno su pohranjeni u male tamne posudice, spremni za daljnju obradu.

3.3 Kulture stanica

Inkubacija se provodi na temperaturi od 37 ºC u atmosferi s 95 % vlažnosti i 5 % CO_2. Stanice su uzgajane u navedenom mediju do približno 80 % konfluentnosti nakon čega su presađene, odnosno tretirane mikotoksinima. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS; pH = 7,4) i tretiraju s tripsinom (EDTA) te se resuspendiraju u novom mediju.

Korištene su dvije stanične linije raka: rak dojke (MB-MDA 231) i rak prostate (T24).

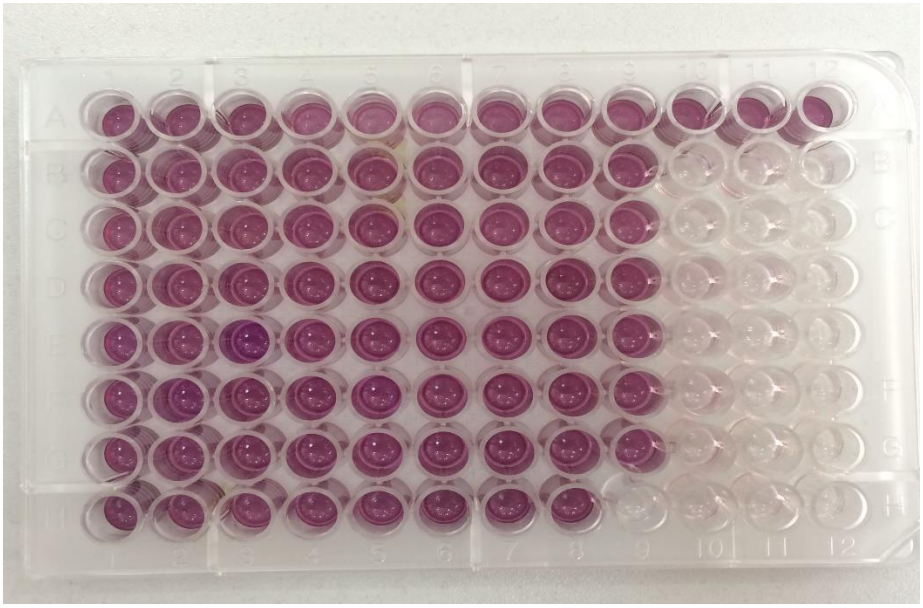
3.4 MTT-metoda

Protokol za nasađivanje stanica

1. Vađenje iz zamrzivača na -80 °C.
2. Priprema medija (u 500 mL medija se doda 50 mL fetalnog seruma goveda + antibiotici penicilin i streptomicin).
3. Stanice se napola odmrznu nakon čega se zbog opasnosti da ih DMSO[8](u kojem su otopljene) ne ošteti, centrifugiraju na 1,5 okr/min oko 5 min.
4. Supernatant se ukloni usisavanjem pomoću vakuuma, a zaostatak se lagano resuspendira u mediju i prenese u zdjelice.
5. Uspješnost odmrzavanja provjeri se na invertnom mikroskopu.
6. Stanice se prebace u inkubator na 37° C.

Za daljnje nasijavanje od te početne linije stanice se operu PBS-om[9], zatim se tripsiniziraju (djelovanjem tripsina stanice se skidaju s podloge) prebace na nove Petrijeve zdjelice i nadopune s medijem. U svaku jažicu ide po 100 μL stanica u mediju koje ostanu tako preko noći. Sljedeći dan se isisava medij i dodaje po 100 μL uzorka otopljenog u mediju. Nakon određenog vremena (4, 24, 48 i 72 sata) dodaje se 100 μL MTT-a i inkubira najmanje sat vremena. Nakon toga sisaljkom se ukloni MTT te dodaje 50 μL DMSO-a i očita se apsorbancija na 570 nm.

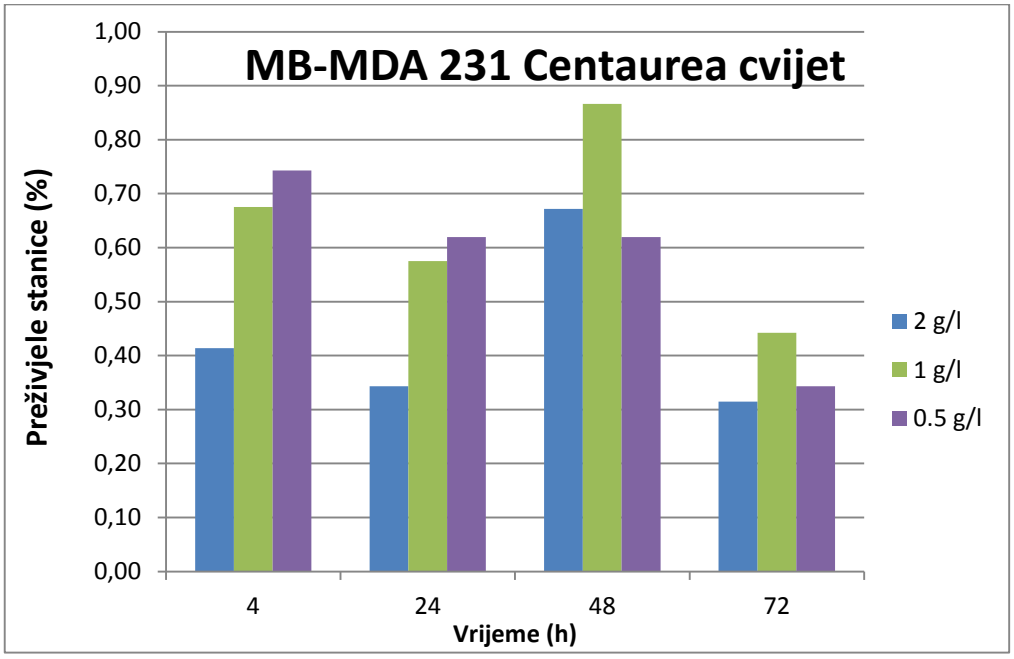
[8] Dimetil-sulfoksid (DMSO) je zapaljiva, higroskopna tekućina, $(CH_3)_2SO$, ledi se pri 18,5 °C, jedinstveno i mnogostrano otapalo. Vrlo brzo prodire kroz kožu, služi za apsorpciju lijekova preko kože, a pokazuje i protuupalna i analgetička svojstva.
[9] PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) je fosfatni pufer koji se često koristi u biološkim istraživanjima.



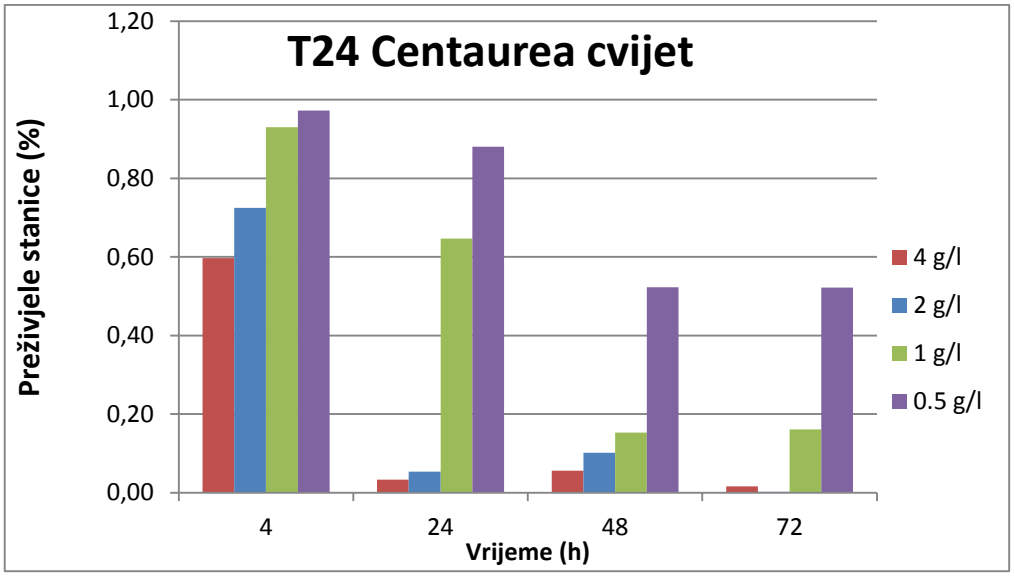
Slika 5. MTT test

4 Rezultati

Rezultati ispitivanja antiproliferativnog djelovanja ekstrakta cvijeta biljke *Centaurea ragusina* L. na stanice raka dojke (MB-MDA 231) i raka prostate (T24) prikazani su na slikama 6. i 7.



Slika 6. Djelovanje dubrovačke zečine na stanice raka dojke



Slika 7. Djelovanje dubrovačke zečine na stanice raka prostate

5 Rasprava

Odabrana biljka iz roda *Centaurea* testirana je zbog antiproliferativnog djelovanja na stanične linije raka dojke (MB-MDA 231) i raka prostate (T24). Korištena je biljka *Centaurea ragusina* L.

Djelovanje je mjereno u funkciji različitih koncentracija (2, 1, 0,5 g/L) te u funkciji vremena (4, 24, 48 i 72 sata). Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 570 nm. Uočena je linearna ovisnost povećanja inhibicije s povećanjem koncentracije inhibitora te porast postotka inhibicije s porastom vremena inkubacije.

Ekstrakt cvijeta *Centaurea ragusina* L. pokazao je bolje djelovanje na stanice raka prostate (T24). Nakon 4 i 24 sata imamo veliki pad u postotku preživjelih stanica za koncentracije 4 i 2 g/L. Za koncentraciju 0,5 g/L postotak preživjelih stanica je u svim vremenskim intervalima iznad 50%. Nakon 48 sati postotak preživjelih stanica je najmanji za sve mjerene koncentracije: 4% za 4g/L, 8% za 2 g/L, 16% za 1 g/L, 52% za 0,5 g/L.

Za stanice raka dojke (MB-MDA 231) ekstrakt cvijeta *Centaurea ragusina* L., u svim vremenskim intervalima i koncentracijama, postotak preživjelih stanica ne pada ispod 30%. Tek nakon 72 sata postotak preživjelih stanica znatno se smanjio: 32% za koncentraciju 2 g/L, 44% za koncentraciju 1 g/L te 35% za koncentraciju 0,5 g/L. U ostalim vremenskim intervalima za koncentracije 2 i 1 g/L postotak preživjelih stanica veći je od 50%.

S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da biljka *Centaurea ragusina* L. zavrjeđuje daljnja istraživanja kako bi se došlo do spoja i/ili spojeva koji su odgovorni za antiproliferativno djelovanje, posebno u liječenju raka prostate (T24).

6 Zaključak

U ovom završnom radu je ispitivano antiproliferativno djelovanje biljke *Centaurea ragusina* L. na dvije stanične linije raka (rak prostate i rak dojke) korištenjem MTT testa.

1. Testiranjem *Centaureae ragusina* L. na staničnu liniju raka dojke (MB-MDA 231) uočeno je da postotak preživjelih stanica, u svim vremenskim intervalima i koncentracijama, ne pada ispod 30%.
2. Biljka *Centaurea ragusina* L. pokazuje značajno antiproliferativno djelovanje na staničnu liniju raka prostate (T24) gdje postotak preživjelih stanica u vremenu od 48 sati, za koncentracije 4, 2 i 1 g/L, pada ispod 20%. S obzirom na dobivene rezultate može se primijetiti bolje antiproliferativno djelovanje na stanice raka prostate (T24) nego stanice raka dojke (MB-MDA 231).

7 Literatura

1. *Ruddon,R. W.*, Cancer Biology 4th Edition, Oxford University Press, New York, 2007
2. URL: http:// www.nzjz-split.hr (28.06.2016.)
3. *Doll R, Peto R.* The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancerin the Uniteted States today. J Natl Cancer Inst 1981
4. URL: http:// www.dietpharm/rak-dojke (24.06.2016.)
5. *Vladimir-Knežević, Sanda, Blažeković, Biljana, Kindl, Marija, Vladić, Jelena, Lower-Nedza, Agnieszka D.,Brantner, Adelheid H.,* Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family
6. *Terry L Riss, Richard A Moravec, Andrew L Niles, Sarah Duellman, Hélène A Benink, Tracy J Worzella, Lisa Minor,* Assay Guidance Manual
7. URL: http://www.enciklopedija.hr (28.06.2016.)
8. *Forner, A., Llovet, J. M., Bruix, J.* Hepatocellular carcinoma. Lancet 379 (2012) 1245–1255
9. *Hartwell, Johnathan L,* Plants Used Against Cancer,., Quarterman Publications,1981
10. *Kukoč-Modun, L*. Molekulska apsorpcijska spektrofotomerija (Laboratorijska vježba), 2003.
11. *Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J.*, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
12. *Berg, Jeremy M., Tymoczko John L., Stryer Lubert*, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
13. *Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter J. M., Moore P. K.,* Farmakologija, Pvo hrvatsko i peto englesko izdanje. Golden marketing , Zagreb, 2006.
14. *Wu A.H., Wan P., Hankin J.*, Carcinogenesis 2002; 23(9): 1491-1493