# Citotoksično djelovanje oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

**Šuman, Frane**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:167:697922

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

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

*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**

**I**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Frane Šuman**

# CITOTOKSIČNO DJELOVANJE OLEUROPEINA IZ EKSTRAKTA LISTA DIVLJE MASLINE NA RAZLIČITE STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT METODOM

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2016./2017.**

**Mentorica:**

**doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, 2017**.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

| | |
|---|---|
| **Znanstveno područje:** | Biomedicinske znanosti |
| **Znanstveno polje:** | Farmacija |
| **Nastavni predmet:** | Medicinska kemija i biokemija |
| **Tema rada** | prihvaćena je na __. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na __.sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i __. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta |
| **Mentor:** | doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić |
| **Pomoć pri izradi:** | doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić |

**Citotoksično djelovanje oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom**

Frane Šuman, broj indeksa 52

**Sažetak:**

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksično djelovanje divlje masline *(Olea europaea L. subsp. oleaster),* tj. njenog glavnog fenolnog sekoiridoida, oleuropeina. Otopinom oleuropeina koncentracija 0,5 g/L i 1 g/L tretirane su humane stanice karcinoma mokraćnog mjehura (stanična linija T24), dojke (stanična linija MDA-MB-231) i pluća (stanična linija A-549). Citiotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48, i 72 sata MTT metodom. Usporedba apsorbancije nastalog formazana kod tretiranih i netretiranih stanica (kontrola) pokazatelj je postotka preživljenja stanica. *In vitro* izlaganje karcinomskih stanica oleuropeinu dovelo je do željenog smanjenog preživljenja tih stanica. Citotoksično djelovanje nije jednako na sve ispitivane karcinomske linije, a ovisno je i o koncentraciji otopine oleuropeina te vremenu izlaganja stanica. Smanjeno preživljenje nije uvijek razmjerno s vremenom izlaganja, ali je uočena povezanost s povećanjem koncentracije. Sljedeći korak su *in vivo* istraživanja na pokusnim životinjama.

**Ključne riječi:** maslina, karcinom, citotoksičnost, MTT

**Rad sadrži:** 49 stranica, 12 slika, 10 tablica, 28 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

| | |
|---|---|
| 1. prof. dr. sc. Janoš Terzić | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Ivana Mudnić | član |
| 3. doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić | član-mentor |

**Datum obrane:** ožujak, 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**GRADUATE THESIS**

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine**
**Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy**
**University of Splitu, Croatia**

| | |
|---|---|
| **Scientific area:** | Biomedical sciences |
| **Scientific field:** | Pharmacy |
| **Course title:** | Medical Chemistry and Biochemistry |
| **Thesis subject** | was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. __ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. __ and Faculty Council of School of Medicine, session no. __. |
| **Mentor:** | Assist. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD |
| **Technical assistence:** | Assist. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD |

**Cytotoxic activity of oleuropein extracted from wild olive leaf in various human cancer cell lines measured by MTT method**

Frane Šuman, index number 52

**Summary:**

The aim of this study was to examine citotoxic effect of wild olive *(Olea europaea L. subsp. oleaster)* and its main phenolic secoiridoid, oleuropein. Urinary bladder cancer cell line T24, breast cancer cell line MDA-MB-231 and lung cancer cell line A-549 were treated with 0.5 g/L and 1 g/L oleuropein solution. Cytotoxicity was determined after 4, 24, 48 and 72 hours by MTT test. Percentage of cell survival was determined by comparing the absorbance of formazan in treated and untreated cells (control). *In vitro* exposure of cancer cells to oleuropein led to aimed cell survival reduction. The reduced survival rate was not equal for every tested cancer line and it depended on the concentration of oleuropein solution and the cell exposure time. Decreased survival was not always proportional to the exposure time, but it was proportional to concentration increase. The next step are *in vivo* studies on experimental animals.

**Key words:** olive, cancer, cytotoxicity, MTT

**Thesis contains:** 49 pages, 12 figures, 10 tables, 28 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

| | |
|---|---|
| 1. Janoš Terzić, PhD, full prof. | chair person |
| 2. Ivana Mudnić, PhD, assist. prof. | member |
| 3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD assist. prof. | supervisor |

**Defence date:** March 2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in** Library of Faculty of Chemistry and Technology University Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine University, Šoltanska 2.

**Zahvale:**

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na nesebičnom dijeljenju svog znanja, savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji koja je uvijek bila bezuvjetna potpora u svakom smislu te mojim kolegama i prijateljima koji su razdoblje studiranja učinili nezaboravnim.

# SADRŽAJ


*1. UVOD ... 1*

1.1. RAK ... 2

1.1.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA ... 3

1.1.2. KARCINOM DOJKE ... 4

1.1.3. KARCINOM PLUĆA ... 5

1.2. DIVLJA MASLINA ... 8

1.3. OLEUROPEIN ... 10

*2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 16*

*3. MATERIJALI I METODE ... 18*

3.1. STANIČNE LINIJE ... 19

3.2. POSTUPAK ... 22

*4. REZULTATI ... 25*

4.1. Stanična linija T24 ... 26

4.2. Stanična linija MB-MDA-231 ... 28

4.3. Stanična linija A-549 ... 30

*5. RASPRAVA ... 32*

*6. ZAKLJUČAK ... 38*

*7. LITERATURA ... 40*

*8. SAŽETAK ... 44*

*9. SUMMARY ... 46*

*10. ŽIVOTOPIS ... 48*

# 1. UVOD

## 1.1. RAK

Onkologija je područje medicine koje zahtijeva najviši stupanj suradnje medicinskog osoblja zbog svakodnevnih promjena, inovacija, novih spoznaja, ali i nepoznanica. Etički zahtjevi koji se postavljaju pred liječnike vrlo su specifični i ne postoje jasna pravila u donošenju odluka (1).

Pojam "neoplazma" označava novonastalu tvorbu u organizmu koja je nastala kao posljedica različitih unutrašnjih i vanjskih čimbenika koji djeluju na organizam. Tumori mogu biti maligni (zloćudni) i benigni (dobroćudni). Razlika između njih je u agresivnosti rasta te u tome što maligni metastaziraju i šire se u okolinu. Rak predstavlja zloćudni oblik novotvorine i svim vrstama raka je zajedničko da nastaju od zdravih stanica procesom zloćudne pretvorbe. Stanica zbog određenih promjena izgubi sposobnost odgovora na stanične signale, a to ima za posljedicu nekontroliranu diobu zloćudne preobražene stanice. Promjena koja je odgovorna za zloćudnu pretvorbu stanice je genska mutacija. Mutacija može biti nasljedna, ali najčešće nastaje u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutagena. Središnju ulogu u nastanku raka imaju onkogeni – geni koji potiču autonomni stanični rast u tumorskim stanicama bez prisustva normalnih mitogenih signala. Nasuprot njima, zaštitnu ulogu imaju tumor-supresorski geni, tj. protoonkogeni koji su sastavni dio genoma svake stanice i fiziološki su regulatori stanične proliferacije i diferencijacije (1).

Šest je ključnih obilježja po kojima se rak razlikuje od zdravog tkiva: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale inhibicije rasta, zaobilaženje apoptoze, neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza te sposobnost tkivne invazije i presađivanja. U novije vrijeme dodana su još četiri čimbenika: poremećen metabolizam, sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora, genomska nestabilnost i upala (1).

Iako je rak jedan od vodećih uzroka smrti, danas se na njega ne gleda kao na smrtnu presudu, već kao na kroničnu bolest s kojom se može kvalitetno živjeti ili je čak izliječiti. Farmaceutska industrija trenutno ulaže najviše novca i napora upravo za istraživanja na području onkologije (1).

### 1.1.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

Karcinom mokraćnog mjehura najčešći je tumor mokraćnih organa, ali općenito se može reći da je rijedak i čini 2% svih malignih tumora u ljudi. Bolest je to razvijenih, urbanih i industrijaliziranih zemalja. Prosječna starost bolesnika u vrijeme dijagnoze je 65 godina, i rijetko se otkriva prije 40. godine. Tri puta češće obolijevaju muškarci i kod njih je na četvrtom mjestu, i to nakon karcinoma prostate, pluća i tumora debelog crijeva. Pojavnost karcinoma kod starijih od 40 godina iznosi 20 na 100 000 ljudi godišnje (2).

Na nastanak karcinoma važan utjecaj imaju čimbenici rizika te genetska predispozicija. Najvažniji čimbenik rizika je pušenje koje je u direktnoj vezi s čak 50% karcinoma mokraćnog mjehura. U dimu cigareta nalazimo preko 50 štetnih spojeva od čega su najštetniji amini i katran. Aminima su izloženi i radnici u tekstilnoj industriji, industriji gumenih proizvoda, asfalta i boja. Uočena je i veća pojavnost kod ljudi koji su duže vrijeme i većim dozama liječeni ciklofosfamidom i fenacetinom. Učestale urinarne infekcije i česta zračenja također mogu dovesti do pojave tumora (1).

Najčešće se radi o karcinomu prijelaznog (urotelnog) epitela (90%). To su uglavnom papilarni tumori ograničeni na sluznicu (70%), dok oko 30% invadira submukozu. Ovakvi tumori skloniji su recidiviranju i povratku bolesti. Osim karcinoma prijelaznog epitela, patohistološki razlikujemo i karcinom pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i karcinom malih stanica (1%). Karcinom mokraćnog mjehura širi se lokalnim, limfnim i hematogenim rasapom. Najčešća mjesta udaljene diseminacije su jetra, pluća i skelet. Površinski lokalizirani karcinom je izlječiv, dok preživljavanje bolesnika s invazivnim karcinomom iznosi oko 50% (1).

**Klinička slika, dijagnostika i liječenje:**

Hematurija, tj. bezbolno, spontano i često krvarenje iz mokraćne cijevi, najčešći je simptom ovog karcinoma. Također, pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura, pečenje, opstipacija, limfedem, palpabilna masa i bol u maloj zdjelici.
Ako se pojavi hematurija, prvo se radi intravenska urografija te cistoskopija, a za procjenu proširenosti CT i MR. Nakon toga uzimaju se komadići tkiva iz mokraćnog mjehura za patohistološku dijagnostiku. U liječenju površinskog karcinoma primjenjuje se intravezikalna aplikacija imunoterapije (BCG) ili kemoterapija (mitomicin C, doksorubicin), a za invazivni karcinom prijelaznog epitela konkomitantna kemoradioterapija. Najvažnije je otkriti bolest u početnoj fazi, jer tada je moguće izlječenje (3).

### 1.1.2. KARCINOM DOJKE

Karcinom dojke najučestalija je zloćudna bolest kod žena u razvijenim zemljama (25%) i visoko je zastupljen među uzrocima smrti zbog raka (15%). Vrlo je rijetko, ali mogu oboljeti i muškarci. Postao je javno-zdravstveni problem i veliki se napori ulažu u rano otkrivanju te bolesti i njeno liječenje. Kvalitetnom primarnom prevencijom, tj. redovitom mamografijom žena u rizičnim skupinama te edukacijom o samopregledu dojki, znatno se smanjuje mortalitet i poboljšavaju prognoze kod oboljelih. 80% novih slučajeva bolesti bude otkriveno u ranoj fazi. Prema podacima Registra za rak Hrvatske 26% oboljelih žena od malignih bolesti boluje upravo od karcinoma dojke. Preko 2500 je novooboljelih slučajeva godišnje i preko 1000 smrti. Nažalost, stopa incidencije (broj novooboljelih na 100 000 stanovnika) u Hrvatskoj viša je nego u Europi. U zadnjih 20 godina taj postotak ima tendenciju rasta, ali razlog za to pronalazimo i u boljoj dijagnostici, svjesnosti i informiranosti populacije (2).

Mehanizam promjene normalne stanice u zloćudnu nije u potpunosti poznat. Zbog promjena gena, izgubi se nadzor nad staničnom diobom te se poremeti ravnoteža između rasta i smrti stanica.

Postoje određeni **rizični čimbenici** koji mogu dovesti do većeg broja staničnih promjena i nastanka karcinoma. Starija životna dob najveći je čimbenik rizika, a učestalost počinje zamjetnije rasti od 35. godine. Sljedeći je genetski čimbenik mutacije BRCA1 i BRCA2 gena koji povećava rizik za 40-85%. Pozitivna obiteljska anamneza također povećava rizik i do 8 puta. Slijede rana menarha (prije 12. godine) te kasna menopauza (nakon 50. godine) koje povećavaju rizik za 2-3 puta. Nerotkinje imaju 4 puta veću učestalost, a i kasna prva trudnoća povećava rizik. Zanimljivo, kasna menarha, rana menopauza, rana prva trudnoća i veći broj trudnoća imaju gotovo protektivan učinak. Od ostalih čimbenika treba spomenuti izloženost zračenju u ranom djetinjstvu, stres, hormonsku terapiju nakon menopauze (dugotrajno uzimanje estradiola može povećati rizik; terapija estrogenima u kombinaciji s progesteronima pokazala je čak i veće povećanje rizika), oralne kontraceptive te prehranu, tj. povećanu tjelesnu težinu (pretile žene u postmenopauzi imaju povećan rizik od razvoja te bolesti) (4).

**Klinička slika, dijagnostika i liječenje:**

Ovaj karcinom manifestira se pojavom nove tvorbe u području dojke. Najčešće se radi o bezbolnim čvorićima, ali razvija se i crvenilo, promjene na koži, osjetljivost dojke, bol u

bradavici ili cijeloj dojci, uvlačenje bradavice i iscjedak te promjena oblika dojke. Tumorske stanice mogu se odvojiti od tumora u dojci te putem krvi ili limfe dospjeti do udaljenih dijelova tijela, gdje stvaraju metastaze. Bogate mreže limfnih žila dojke odvode limfu prema čvorovima u pazuhu pa se najčešće prvo tu proširi. Gotovo polovica oboljelih razvije metastatsku bolest. Proširenost karcinoma dojke, odnosno stadij bolesti, određuje se s obzirom na veličinu primarnog tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i postojanje udaljenih metastaza (1).

Postavljanje dijagnoze temelji se na nekoliko dijagnostičkih metoda:
Radiološki pregledi - mamografija, ultrazvuk dojke (nadopuna za sumnjive nalaze) te CT ili MR (za praćenje metastaza) te citološka punkcija i biopsija. Karcinom dojke konačno se dijagnosticira patološkim pregledom uzorka tkiva dojke. Patohistološkom dijagnozom se dobiju točni podaci o veličini i vrsti tumora i o njegovim biološkim karakteristikama.
Laboratorijske pretrage služe za određivanje statusa hormonskih receptora i HER2 receptora što je nužno za planiranje liječenja karcinoma dojke.
Mamografija je glavna okosnica rane detekcije i smanjuje smrtnost za 30%.

Karcinom dojke liječi se kirurškim zahvatom, adjuvantnom kemoterapijom, imunoterapijom, radioterapijom i hormonskom terapijom. Karcinom dojke bolest je koja se dugo razvija prije nego što postane klinički manifetsna i postoje slučajevi gdje su bolesnice živjele bez terapije i 20 godina (1).

### 1.1.3. KARCINOM PLUĆA

Karcinom pluća vodeći je po uzroku smrtnosti od zloćudnih bolesti u svijetu. Na prvom je mjestu po učestalosti karcinoma kod muškaraca te treći najčešći karcinom u žena u Hrvatskoj. Prema podacima Registra za rak godišnje je više od 2700 novooboljelih od čega su oko 2000 muškarci. Ovo je jedan od najsmrtonosnijih karcinoma i, unatoč liječenju, životni vijek rijetko prelazi godinu dana nakon dijagnoze. Obično se javlja u populaciji starijoj od 60 godina (2).

Uzrok nastanka karcinoma pluća nije do kraja razjašnjen, ali poznato je da je rezultat niza mutacija koje mogu biti stečene tijekom života ili naslijeđene. Po važnosti se ističu EGFR (receptor epidermalnog čimbenika rasta, od eng. *epidermal growth factor receptor*) mutacija, ALK (kinaza anaplastičnog limfoma, od eng. *anaplastic lymphoma kinase*)-EML 4 fuzija i KRAS-mutacija. Pozitivna obiteljska anamneza povećava rizik za 5 puta. Ipak,

najvažniji vanjski čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća je pušenje. Približno 90 posto bolesnika s karcinomom pluća su pušači te postoji čvrsta povezanost između duljine trajanja navike pušenja te broja popušenih cigareta dnevno i rizika za razvoj karcinoma pluća (8-25 puta). Iako prestanak pušenja značajno smanjuje rizik od nastanka karcinoma pluća, bivši pušači još uvijek imaju veći rizik za razvoj ove bolesti od osoba koje nikada nisu pušile. Tek petnaestak godina od prestanka pušenja rizik od razvoja pluća približava se riziku u nepušača. Od ostalih čimbenika treba spomenuti pasivno pušenje, aeropoluciju u urbanim sredinama, te inhalacijske kancerogene kao benzpiren, azbest, radioaktivne materijale (radon), nikal, krom i arsen (5).

Histološki se primarni karcinomi pluća razvrstavaju u četiri osnovne skupine: adenokarcinome (40%), karcinome pločastih stanica (epidermoidni, planocelularni) (30%), karcinome velikih stanica (10-15%) i karcinome malih stanica (mikrocelularni) (10%). Postoje i miješani tumori. Primarni karcinom pluća najčešće se otkriva u stupnju područne ili udaljene proširenosti, što uvjetuje lošu prognozu bolesnika (petogodišnje preživljavanje manje od 10-15%) (1).

**Klinička slika, dijagnostika i liječenje:**

Klinički znakovi raznoliki su i nespecifični samo za tumor jer se primjećuju i u drugim plućnim bolestima. Najčešći su početni simptomi karcinoma pluća kašalj, hemoptiza, zaduh, dispneja, promuklost, sukrvav iskašljaj, umor, gubitak težine i energije, bol u prsištu te perzistentne infekcije respiracijskog trakta. U uznapredovaloj bolesti primjećuju se nabrekle vratne vene, otekline lica, vrata i ruku te gušenje u ležećem položaju (sindrom gornje šuplje vene). Moguć je i razvoj Pascoatova i Hornerova sindroma, hormonalnih smetnji, neuromuskularne i koagulacijske neravnoteže te poremećaji vezivnog i koštanog tkiva (paraneoplastički sindrom) (1).

Bolest se obično dijagnosticira u uznapredovaloj fazi. Inicijalna je pretraga RTG srca i pluća i CT toraksa. Za dokazivanje karcinoma pluća i određivanje podtipa tumora potrebna je patohistološka analiza. Za analizu se može koristiti iskašljaj, ali ipak najčešće se uzorak tkiva uzima bronhoskopijom. Ako je tumor smješten periferno, radi se transtorakalna punkcija pod kontrolom CT-a ili UZV-a.

Karcinom nemalih stanica liječi se kirurškim zahvatom, kemoterapijom, radioterapijom i tzv. ciljanom terapijom, dok je glavni način liječenja karcinoma malih stanica

kemoterapija, a zatim radioterapija. Važno je na vrijeme započeti i sa simptomatsko-potpornom terapijom. Nažalost, prognoze su najčešće loše (1).

## 1.2. DIVLJA MASLINA

*Olea europaea L. subsp. oleaster*
Vrsta: Olea oleaster
Porodica: Oleaceae

Maslina je simbol Mediterana i dio njegova kulturnog obilježja. Jedna je od najprepoznatljivijih biljaka, simbol mira i svjedok povijesti čija stabla dosežu starost i više stotina godina. Maslinovo ulje i plod sastavni su dio mediteranskog tipa prehrane koji često služi kao primjer najzdravijeg načina hranjenja. Osim u prehrani maslina se koristi u kozmetici, medicini, čak i u obradi drva. Glavni aktivni sastojci ulja su oleinska kiselina, skvalen i fenolni spojevi hidroksiriosol i oleuropein koji ekstradjevičanskom ulju daju gorak i opor okus (6).

Različiti klimatski i habitalni uvjeti razlog su brojnih genetskih varijacija i razlika među oleaster populacijom. Treba razlikovati divlju maslinu *Olea europaea oleaster* od pitome masline *Olea europaea sativa*. Divlja maslina pojavljuje se kao zimzeleni i vrlo razgranati grm koji raste na suhim i kamenitim priobalnim područjima Sredozemlja. Nešto je niža, ima manje listove i jako trnovite grane. Plodovi su joj sitniji, a oni zreli gotovo su crni, imaju veliku košticu po tome se razlikuje od pitome masline (7).



**Slika 1.** Divlja maslina - *Olea europaea L. subsp. oleaster*

Sitni, jajoliko-kopljasti, jednostavni listovi dugački su 30-50 mm, široki oko 10-15 mm. Glatka gornja površina sjajne je tamne zeleno-sive boje dok je donja površina dlakava i svjetlija (8).



**Slika 2.** Plod i list divlje masline

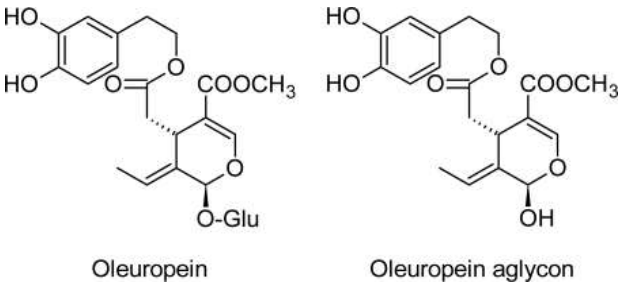
Fenolni spojevi nalaze se u svim dijelovima biljke, ali njihova priroda i koncentracija uvelike varira između različitih tkiva. Oleuropein, dimetil-oleuropein, ligustrozid i oleorozid predstavljaju glavne fenolne oleozide, dok je verbaskozid glavni hidroksicinaminski derivat ploda. Provjera identiteta biljke karakterizirana je prisustvom triterpena (na prisustvo anhidrida octene kiseline i sumporne kiseline daje crveno obojenje).

Kemijski sastojci maslinovog lista:

a) iridoidi: oleuropein (kao 6-O-glikolizirani i aglikan; 5-9%), ligustrozid, oleorozid;
b) triterpeni: oleanolična kiselina, maslinska kiselina;
c) flavonoidi: luteolin, kempferol, krisoeriol i derivati apigenina;
d) halkoni: olivin, olivin-4-o-diglukozid;
e) fenolne kiseline: kumarinska kiseline, kafeinska kiselina, ferulska kiselina, vanilinska kiselina;
f) kumarini: aeskuletin, skopoletin, aeskulin (8).

## 1.3. OLEUROPEIN

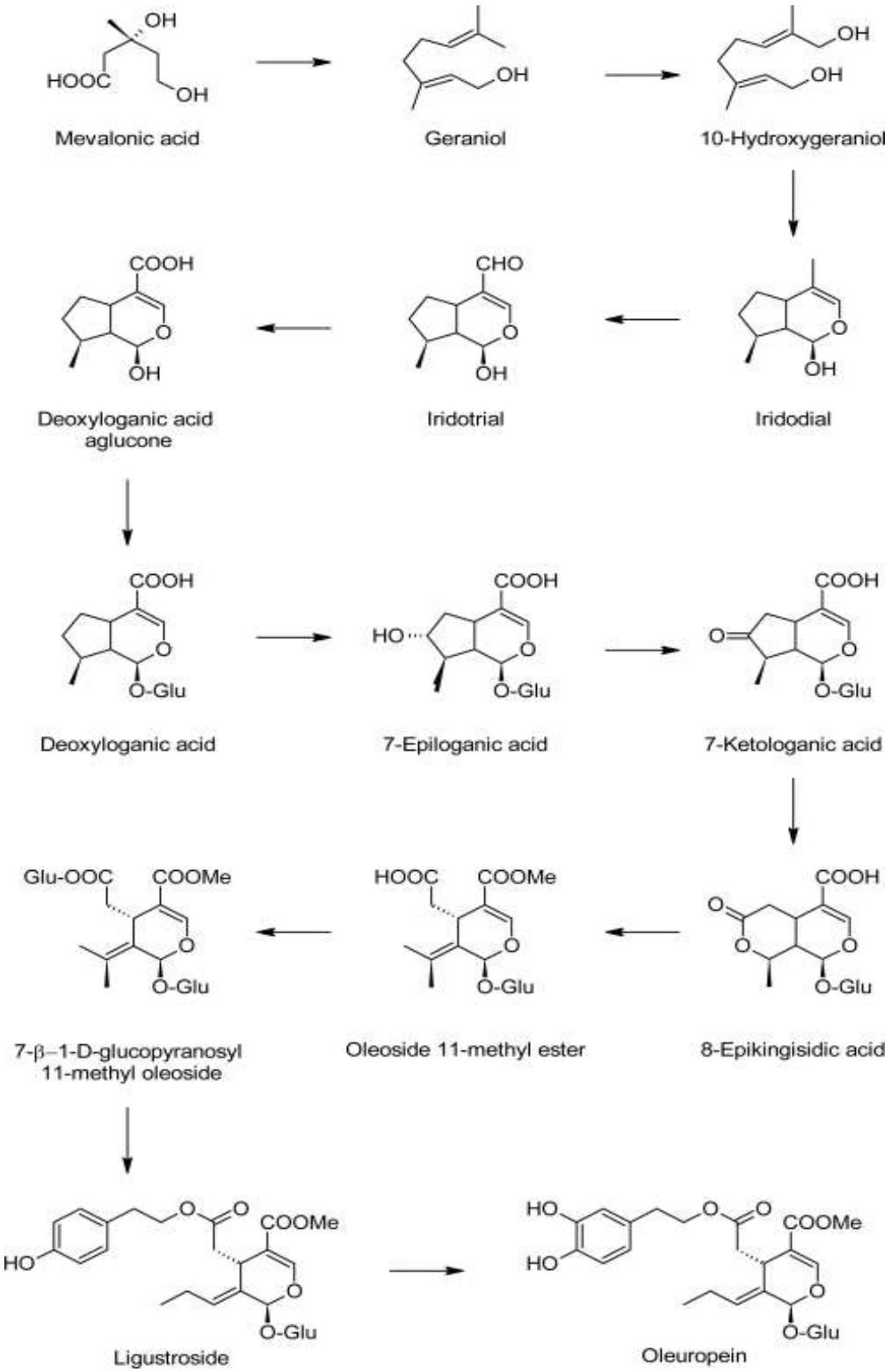
Oleuropein je najistaknutiji fenolni spoj u sorti maslina i može dosegnuti koncentraciju od 140 mg/g suhe tvari u mladih maslina te 60 do 90 mg/g suhe tvari u listovima. Ovaj ester elenolične kiseline i 2-(3,4-dihidroksifenil)etanola otkrili su Bourquelot i Vintilesco 1908. godine. Pripada skupini iridoida, derivata ciklopentanpirana, tj. sekoiridoida koji su rasprostranjeni u vrstama Oleaceae, Gentianaceae i Cornaleae. Iridoidi i sekoiridoidi spojevi su koji su obično glikozidno vezani i proizvodi su sekundarnog metabolizma terpena koji je prekursor različitih indolnih alkaloida (6).




**Slika 3.** Struktura oleuropeina
(Preuzeto sa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002804/figure/f2-scipharm.2010.78.133/scipharm.2010.78.133/ )

**Sintetski put:**

Ugljični kostur oleozida izveden je iz **mevalonske kiseline**, a biosinteza oleuropeina upravo započinje grananjem u putu njenog sekundarnog metabolizma čime nastaje **geraniol**. Slijedi ciklizacija kojom nastaje **iridodial**. Sekvenca koraka između deoksiloganske i 7-ketologanske kiseline može se razlikovati između biljnih vrsta, a može varirati i ovisno o dobu godine. Potom nastaje **ligustrozid**, izravni prekursor oleuropeina (6).




**Slika 4.** Pretpostavljeni biosintetski put oleuropeina
(Preuzeto sa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002804/figure/f3-scipharm.2010.78.133/ )

U razvoju maslinoa ploda obično razlikujemo tri faze: **fazu rasta** u kojoj dolazi do akumulacije oleuropeina; **zelenu faza sazrijevanja** u kojoj dolazi do smanjenja razine klorofila i oleuropeina te **crnu faza sazrijevanja** koja je karakterizirana pojavom antocijana i daljnjim padom razine oleuropeina. Dakle, maslina je bogata oleuropeinom u ranim fazama i u mladim plodovima gdje čini oko 14% suhe tvari. Iako je manja, njegovara razina i dalje je značajna kod kultura koje se beru zelene, dok u crnim sortama njegova razina naglo opada tijekom dozrijevanja, a u nekim sortama može pasti i na nulu (6).

Glikozidi elenolinske kiseline i dimetiloleuropeina pojavljuju se na početku zelene faze kad razina oleuropeina počinje opadati. Zatim se akumuliraju i dostižu maksimum u crnoj fazi gdje dimetiloleuropein postaje glavni sastojak crnih maslina. Smatra se da je nastanak ovih dviju komponenti uzrokovan pojačanom aktivnošću esteraza (6).

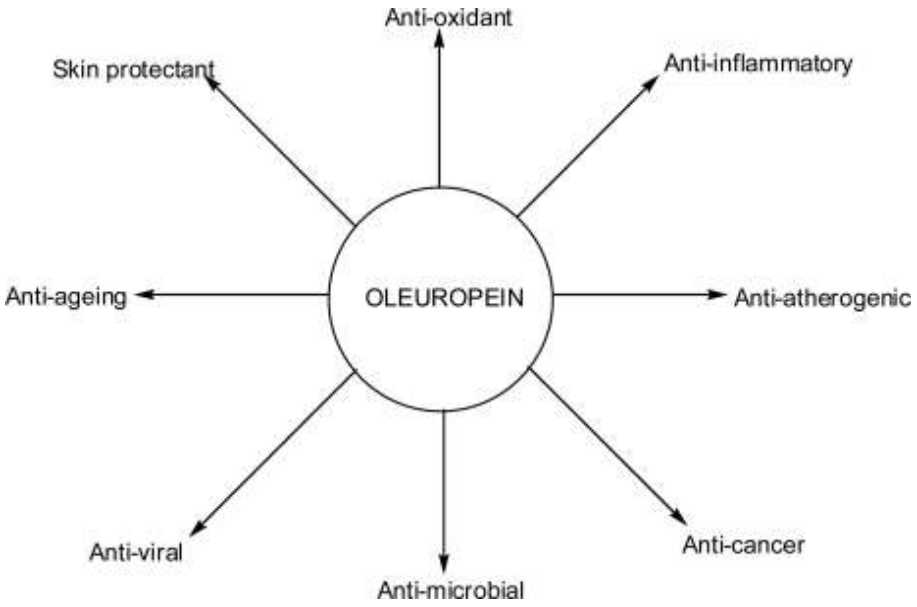
Plod akumulira samo glikozilirane derivate oleuropeina, dok su dihidroksitirazol i neglikozilirani sekoiridoidi izvedeni iz oleuropeina pronađeni u lišću. Pada razina i drugih oleozida, a raste razina fenolnih spojeva (flavonoidi i verbaskozidi). U mladih maslina verbaskozidi su prisutni samo u tragovima dok su razine ligustrozida i kornozida relativno velike. Kad zelena maslina dosegne normalnu veličinu, ligustrozidi nestaju, kao i kornozid i ostale komponente koje se transformiraju u haleridone (6).

Tijekom rasta i sazrijevanja koštunice u plodu su pronađene značajne razlike u razini tirozola, hidroksitirozola i glukozida tirozola. Povećanje njihove razine dosljedno korelira s hidrolizom komponenti s većim molekularnim težinama. Elonolni glukozidi i hidroksitirozol mogu se smatrati pokazateljima sazrijevanja masline. Zbog svoje interakcije s difenol-oksidazom oleuropein je također uključen u proces posmeđivanja koji se pojavljuje kod zelenih maslina ili nakon udara i ranjavanja tijekom berbe ili za vrijeme naknadne obrade. Dakle, stupanj rumenila znatno varira ovisno o fiziološkoj fazi ploda (6).

**Bioraspoloživost:**

Fenolni spojevi iz djevičanskog maslinova ulja pokazali su znatnu bioraspoloživost. Oleuropein postiže maksimalnu koncentraciju u plazmi nakon 2 sata. Metabolizira se do hidroksitirozola i tirozola te se izlučuju urinom kao glukoronidi ili kao slobodni oblici (6).

**Farmakološki učinci oleuropeina:**




**Slika 5.** Farmakološko djelovanje oleuropeina
(Preuzeto sa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002804/figure/f4-scipharm.2010.78.133/ )

Oleuropein pokazuje nemali broj farmakoloških učinaka - antioksidativno, protuupalno, antiaterogeničko, protutumorsko, antimikrobno i antivirusno djelovanje te anti-ageing djelovanje i u zaštiti kože (kozmetika). Također, poznato je i njegovo kardioprotektivno djelovanje kod primjene doksorubicina te antiishemijski i hipolipemički učinak (6).

1) **ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE**

   Oleuropein snažno i ovisno o dozi inhibira oksidaciju bakrovog sulfata u LDL-u (lipoprotein male gustoće). Osim što povećava rezistentnost LDL-a na oksidaciju, istovremeno smanjuje ukupni, slobodni i esterificirani kolesterol u plazmi (6).

2) **PROTUUPALNO DJELOVANJE**

   Oleuropein povećava proizvodnju dušikovog oksida u makrofagima povećanjem aktivnosti inducibilnog oblika NO-sintaze. Inhibira i aktivnost lipooksigenaze i proizvodnju leukotriena $B_4$ te tako povećava aktivnost imunokompetentnih stanica (9).

**3) ANTIATEROGENO DJELOVANJE**

Ovo djelovanje zasnovano je na smanjenju adhezije monocita na stimulirane endotelne stanice. Smanjuje i aktivnost lipooksigenaze tako što smanjuje razinu oksidiranog oblika glutationa (GSSH) (6).

**4) ANTITUMORSKO DJELOVANJE**

Aglikoni sekoiridoida koji su sastojci maslinovog ulja djelotvorno ublažavaju inicijaciju, promociju i progresiju tumorskih stanica. Oleuropein aglikon pokazao se kao najpotentniji fenolni spoj za smanjenje sposobnosti života stanica raka dojke. Također, inhibiraju i staničnu proliferaciju humanog karcinoma mokraćnog mjehura (10).

**5) ANTIMIKROBNO DJELOVANJE**

Oleuropein pokazuje snažno antimikrobno djelovanje i protiv Gram-negativnih i protiv Gram-pozitivnih bakterija, ali i protiv mikoplazmi. Djelovanje ostvaruje oštećujući bakterijsku membranu i/ili oštećenjem sloja peptidoglikana, inhibicijom sinteze aminokiselina potrebnih za rast bakterija ili poticanjem fagocitoze.

Inhibira razvoj *Klebsiellae pneumoniae*, *Escherichiae coli, Salmonelae enteridis* i *Bacilli cerei* te inhibira proizvodnju enterotoksina B kojeg proizvod*i Staphylococcus aureus* (11).

**6) ANTIVIRUSNO DJELOVANJE**

Potencijalno antivirusno djelovanje oleuropein pokazuje protiv herpes mononukleoze, hepatitisa, rotavirusa, respiratornog sincicijskog virusa, parainfluenca virusa, goveđeg rinovirusa i virusa mačje leukemije (12). Jedan od glavnih mehanizama djelovanja ekstrakta maslinovog lista (posebno oleuropeina) blokada je površinskog glikoproteina-41 koji je odgovoran za ubacivanje virusa HIV u zdravu stanicu (13).

**7) ZAŠTITA KOŽE I *ANTI-AGING***

Fenolni sastojci maslinovog ulja djeluju antioksidativno na kožu i uklanjaju slobodne radikale pa je čest sastojak *anti-aging* krema. Ekstrakti lista pokazuju preventivno djelovanje protiv UVB oštećenja, a smanjenjem razine COX-2 (ciklooksigenaze) smanjuju karcinogenezu i rast tumora (14).

## 8) NEUROPROTEKTIVNO DJELOVANJE

Starenje je rezultat oksidativnog oštećenja, posebice mitohondrija čija je biomembrana osjetljiva na slobodne radikale, što rezultira staničnom disfunkcijom te dovodi do neurodegenerativnih i kognitivnih bolesti.

Prema nekim studijama oleuropein smanjuje agregaciju β-amiloida (Aβ), proteina svojstvenog za Alzheimerovu bolest, te ima pozitivan učinak na demenciju (15).

# 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja ispitati citotoksično djelovanje ekstrakata lista divlje masline *(Olea europea L. subsp. oleaster)* i čistog oleuropeina na različite vrste humanih karcinoma. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivat će se na humanim staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura (stanična linija T24), karcinoma dojke (stanična linija MDA-MB-231) te karcinoma pluća (stanična linija A-549).

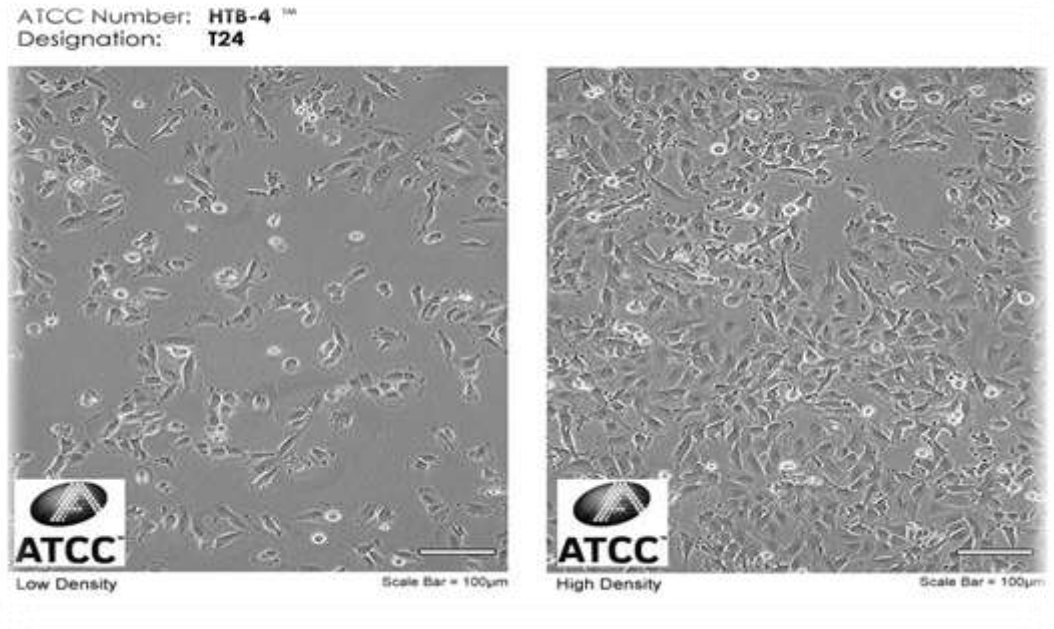
# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. STANIČNE LINIJE

*In vitro* istraživanje ispitivanja djelovanja oleuropeina provodilo se na karcinomskim stanicama T24, A-549 i MDA-MB-231. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama.

**Tablica 1.** Obilježja **T24** stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

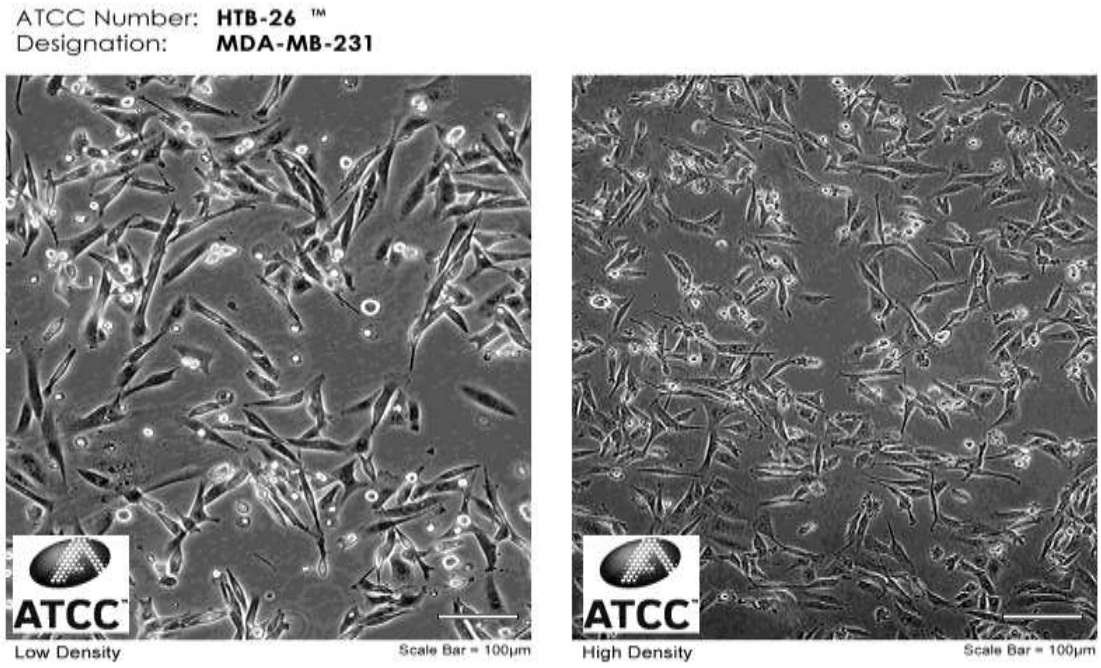
| | |
|---|---|
| **Organizam** | *Homo sapiens*, čovjek |
| **Tkivo** | mokraćni mjehur |
| **Forma proizvoda** | smrznuto |
| **Morfologija** | epitelna |
| **Obilježje kulture** | adherentna |
| **Bolest** | karcinom prijelaznih stanica |
| **Dob i spol** | 81 godina, žena (T24) |




**Slika 6**. Karcinomske stanice T24 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

**Tablica 2.** Obilježja **MDA-MB-231** stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

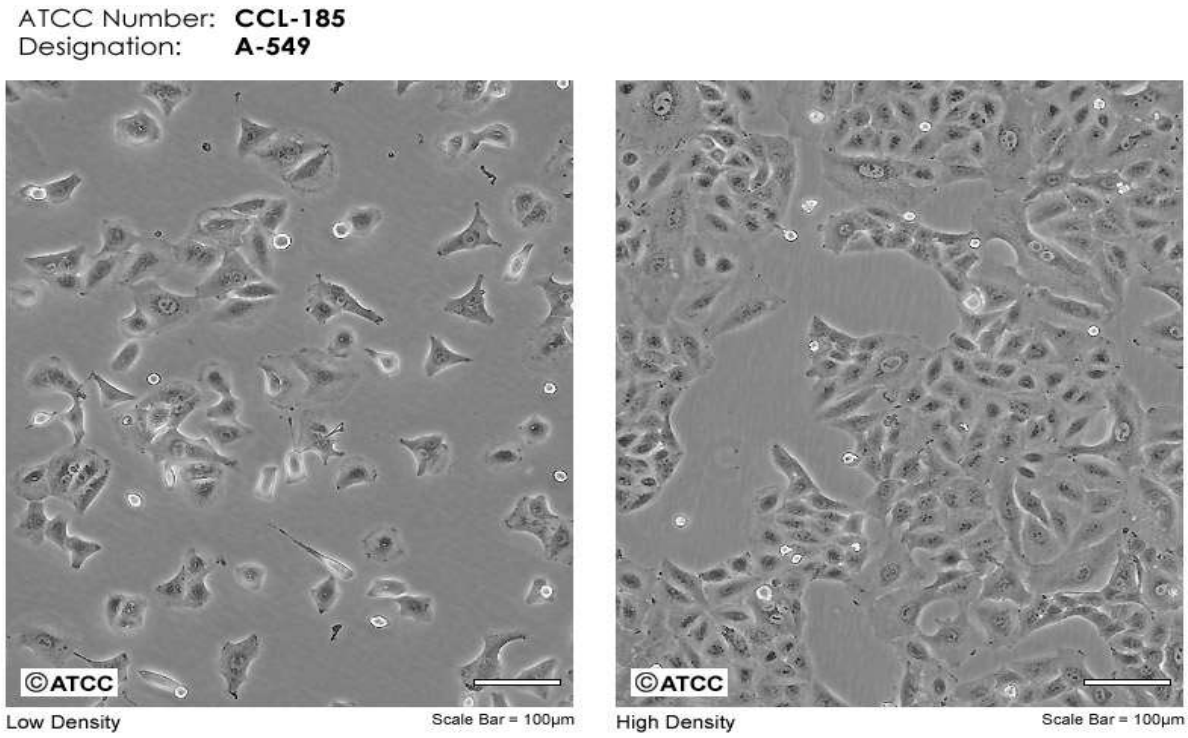
| | |
|---|---|
| **Organizam** | *Homo sapiens*, čovjek |
| **Tkivo** | dojka |
| **Forma proizvoda** | smrznuto |
| **Morfologija** | epitelna |
| **Obilježje kulture** | adherentna |
| **Bolest** | adenokarcinom |
| **Dob i spol** | 51 godina, žena |




**Slika 7**. Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

**Tablica 3.** Obilježja **A-549** stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

| | |
|---|---|
| **Organizam** | *Homo sapiens*, čovjek |
| **Tkivo** | pluća |
| **Forma proizvoda** | smrznuto |
| **Morfologija** | epitelna |
| **Obilježje kulture** | adherentna |
| **Bolest** | karcinom |
| **Dob i spol** | 58 godina, muškarac |




**Slika 8.** Karcinomske stanice A-549 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

## 3.2. POSTUPAK

Stanične linije nakon odmrzavanja uzgojene su u Dulbecco's Modified Eagle Medium (**DMEM**) mediju u vlažnom inkubatoru na 37$^{o}$C uz 5% $CO_2$. DMEM medij sadrži potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali te FBS (goveđi serum). Osim toga, u njemu se nalaze i antibiotici te Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti.

Stanice koje su adherirale na podlogu, nakon uklanjanja DMEM-a, tretiramo **tripsinom**, enzimom koji cijepanjem peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje.

Brojanje stanica radi se tako da se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl **Trypan Blue** boje koja oboji mrtve stanice te tako omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Potom se jednak broj stanica presađuje u 96 jažica u 4 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu.

U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim vodenim otopinama oleuropeina i ekstrakata lista masline u koncentracijama od 0,5 g/L i 1 g/L tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodavani ekstrakti masline.

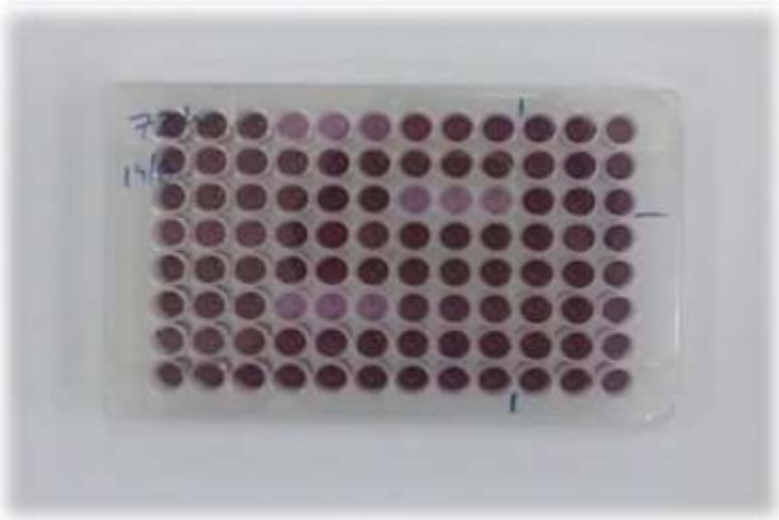



**Slika 9.** Vlažni inkubator i ploča s 96 jažica

**Test citotoksične aktivnosti:**

Stanična živost i proliferacija određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. Žuti tetrazolin **MTT** (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) je prah koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). MTT se reducira u metabolički aktivnim stanicama, tj metabolički neaktivne stanice ga ne vežu. Ovim testom određuje se postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja oleuropeinu i ekstraktima lista masline.

Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj **formazan**. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Rezultirajući intracelularni ljubičasti spoj formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski.
U jažice dodani MTT se nakon jednog sata ispere. Da bi se mogla očitati apsorbancija (na 570 nm) novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini **DMSO** (dimetil sulfoksid) koji se doda nakon uklanjanja MTT-a. Pločice su inkubirane 10 min na 37 °C uz treskanje.



**Slika 10.** Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO

Apsorbancija je mjerena spektrofotometrom na 570 nm (signal) i 690 nm (pozadina).



**Slika 11**. Spektrofotometar

Omjer apsorbancije stanica tretiranih različitim koncentracijama oleuropeina i ekstrakata lista masline te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj nam je citotoksične aktivnosti korištenih spojeva.

**A% = A** (oleuropeina ili ekstrakata lista masline) / **A** (kontrole)

# 4. REZULTATI

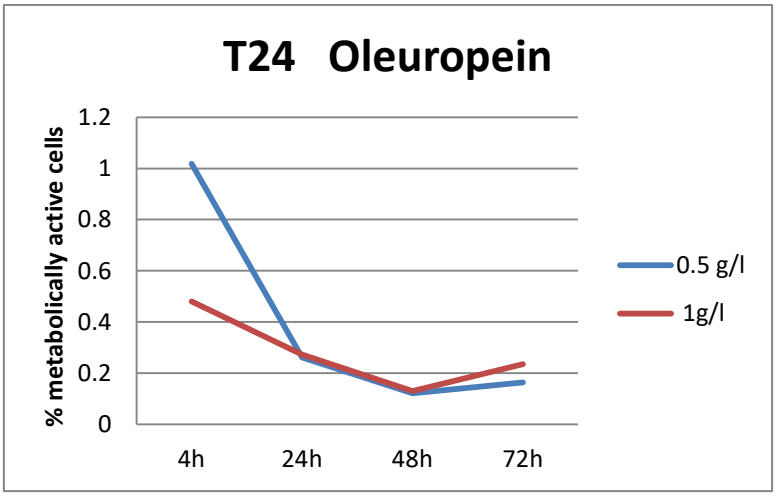
**Empirijska obrada:**

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

## 4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – stanična linija T24

**Tablica 4.1.1.** Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih **oleuropeinom**

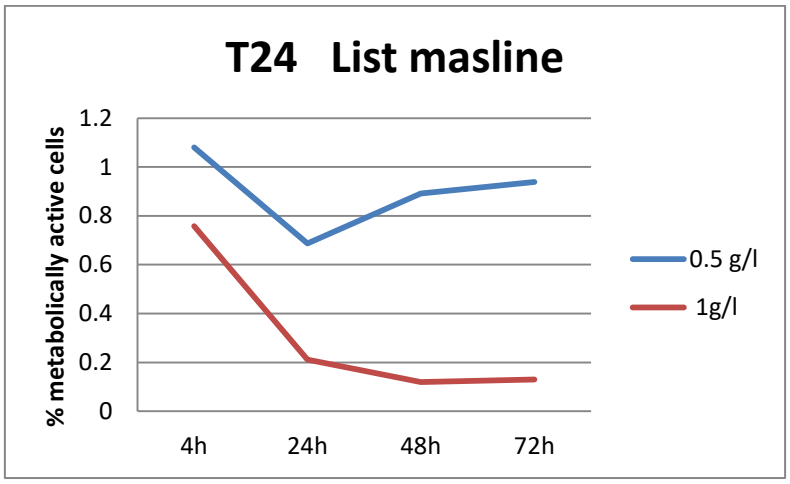
| | c [g/L] | 0,5 g/L | | 1 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|
| **t[h]** | **A(kontrola)** | **A(oleuropeina)** | **A%=A(oleuro)/ A(kontrole)** | **A(oleuropeina)** | **A%=A(oleuro)/ A(kontrole)** |
| **4** | 0,154889 | 0,157667 | **1,017934** | 0,074333 | **0,479914** |
| **24** | 0,220889 | 0,057667 | **0,261066** | 0,060333 | **0,273139** |
| **48** | 0,485 | 0,058667 | **0,120962** | 0,063333 | **0,130584** |
| **72** | 0,212357 | 0,034667 | **0,163233** | 0,05 | **0,235433** |




Pronađene su razlike u apsorbanciji između kontrolne skupine i skupina tretiranih koncentracijama od 0,5 g/L i 1 g/L otopine oleuropeina. Obje koncentracije pokazuju jednak citotoksični učinak nakon 24 sata, s tim da veća koncentracija (1 g/L) pokazuje citotoksični učinak već nakon 4 sata inkubacije.

**Tablica 4.1.2.** Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih **ekstraktom lista masline**

| | c [g/L] | 0,5 g/L | | 1 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|
| **t[h]** | **A(kontrola)** | **A(list masline)** | **A%=A(l.masl.)/ A(kontrole)** | **A(list masline)** | **A%=A(l.masl.)/ A(kontrole)** |
| **4** | 0,154889 | 0,167333 | **1,080344** | 0,117333 | **0,757532** |
| **24** | 0,220889 | 0,151667 | **0,68662** | 0,046667 | **0,211268** |
| **48** | 0,485 | 0,432333 | **0,891409** | 0,058 | **0,119588** |
| **72** | 0,212357 | 0,199333 | **0,938591** | 0,027667 | **0,130273** |



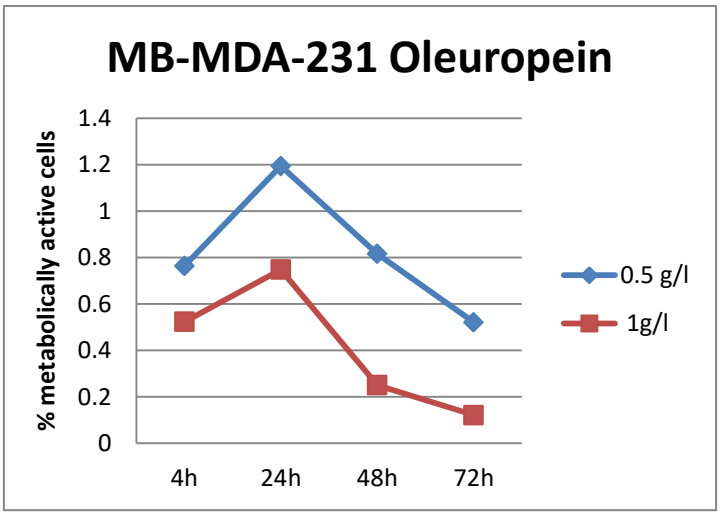

Pronađene su razlike u apsorbanciji između kontrolne skupine i skupine tretirane različitim koncentracijama ekstrakata lista masline. Koncentracija od 0,5 g/L ne pokazuje statistički značajan učinak, dok koncentracija od 1 g/L ostvaruje dobar učinak nakon 24 sata.

Otopina ekstrakata lista masline te otopina samog oleuropeina, pri koncentracijama od 1 g/L, pokazuju značajan citotoksični učinak na stanice karcinoma mokraćnog mjehura već nakon 24 sata od izlaganja.

## 4.2. KARCINOM DOJKE – stanična linija MB-MDA-231

**Tablica 4.2.1.** Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih **oleuropeinom**

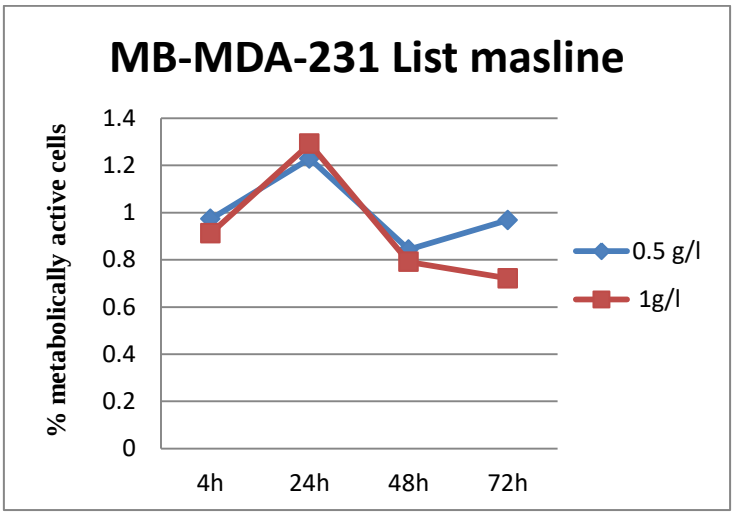
| | c [g/L] | 0,5 g/L | | 1 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|
| **t[h]** | **A(kontrola)** | **A(oleuropeina)** | **A%=A(oleuro)/ A(kontrole)** | **A(oleuropeina)** | **A%=A(oleuro)/ A(kontrole)** |
| **4** | 0,445333 | 0,34 | **0,763473** | 0,233 | **0,523204** |
| **24** | 0,3836667 | 0,458 | **1,1937445** | 0,287 | **0,748045** |
| **48** | 0,411667 | 0,335667 | **0,815385** | 0,103 | **0,250202** |
| **72** | 0,355 | 0,185 | **0,521127** | 0,043 | **0,121127** |




U odnosu na kontrolu uočene su razlike u apsorbanciji. Značajniju citotoksičnu aktivnost pokazuje skupina tretirana otopinom oleuropeina od 1 g/L, posebice nakon 48 sati, dok je otopina oleuropeina koncentracije 0,5 g/L citotoksično djelovala tek kod najduže inkubacije od 72 sata.

**Tablica 4.2.2.** Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih **ekstraktom lista masline**

| | c [g/L] | 0,5 g/L | | 1 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|
| **t[h]** | **A(kontrola)** | **A(list masline)** | **A%=A(l.masl.)/ A(kontrole)** | **A(list masline)** | **A%=A(l.masl.)/ A(kontrole)** |
| **4** | 0,445333 | 0,433 | **0,972305** | 0,406 | **0,911677** |
| **24** | 0,3836667 | 0,471333 | **1,22849** | 0,495333 | **1,291051** |
| **48** | 0,411667 | 0,347 | **0,842915** | 0,325667 | **0,791093** |
| **72** | 0,355 | 0,343667 | **0,968075** | 0,256 | **0,721127** |



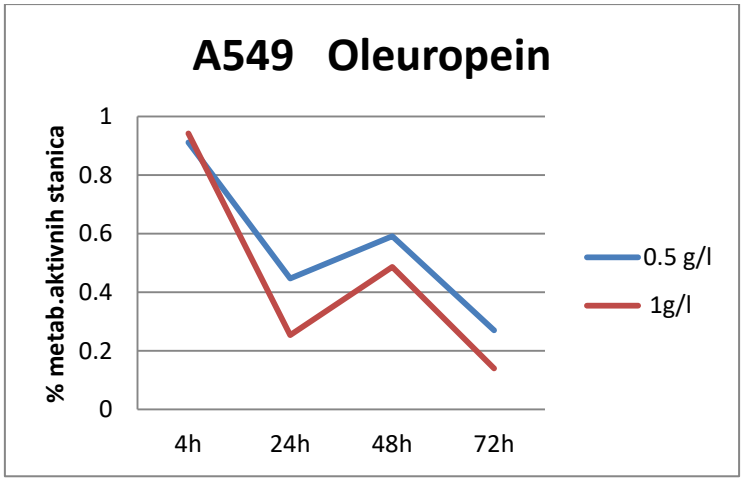

Skupina stanica karcinoma dojke tretirana ekstraktima lista masline pokazala je male razlike u apsorbanciji u odnosu na kontrolu. Slaba citotoksična aktivnost uočena je pri koncentraciji od 1 g/L nakon 48 sati.

Najveću citotoksičnu aktivnost na stanice karcinoma dojke pokazuje otopina oleuropeina u koncentraciji od 1 g/L 48 sati od izlaganja stanica.

## 4.3. KARCINOM PLUĆA – stanična linija A-549

**Tablica 4.3.1.** Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih **oleuropeinom**

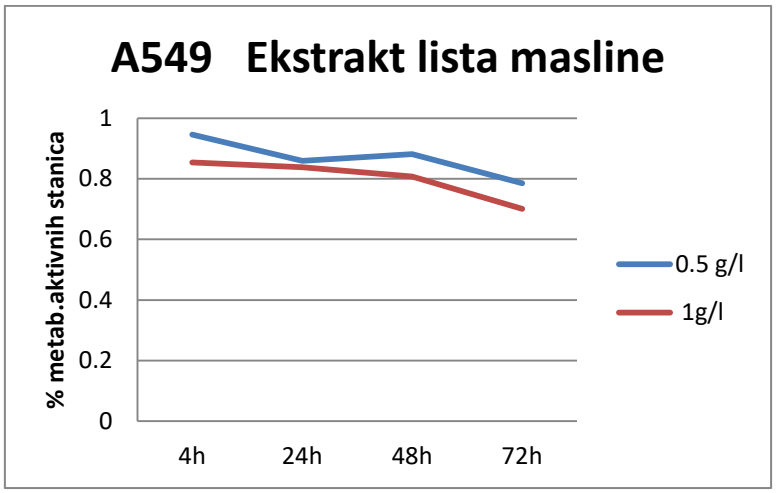
| | c [g/L] | 0,5 g/L | | 1 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|
| **t[h]** | **A(kontrola)** | **A(oleuropeina)** | **A%=A(oleuro)/ A(kontrole)** | **A(oleuropeina)** | **A%=A(oleuro)/ A(kontrole)** |
| **4** | 0,426333 | 0,388667 | **0,91165** | 0,401667 | **0,942142** |
| **24** | 0,463667 | 0,207333 | **0,44716** | 0,117667 | **0,253774** |
| **48** | 0,397667 | 0,235 | **0,590947** | 0,193333 | **0,486169** |
| **72** | 0,405667 | 0,109667 | **0,270337** | 0,056667 | **0,139688** |




Na ovom grafu vrlo je lako uočljiva povezanost citotoksičnosti i koncentracije otopine oleuropeina. Najveći učinak ostvaren je između 4 i 24 sata. Slijedi blagi oporavak stanica karcinoma, a nakon 48 sati ponovno je uočena citotoksična aktivnost obje koncentracije.

**Tablica 4.3.2.** Izmjerena apsorbancija stanica tretiranih **ekstraktom lista masline**

| | c [g/L] | 0,5 g/L | | 1 g/L | |
|---|---|---|---|---|---|
| **t[h]** | **A(kontrola)** | **A(list masline)** | **A%=A(l.masl.)/ A(kontrole)** | **A(list masline)** | **A%=A(l.masl.)/ A(kontrole)** |
| **4** | 0,426333 | 0,403 | **0,94527** | 0,364 | **0,853792** |
| **24** | 0,463667 | 0,398333 | **0,859094** | 0,388333 | **0,837527** |
| **48** | 0,397667 | 0,350333 | **0,880972** | 0,321 | **0,807209** |
| **72** | 0,405667 | 0,318333 | **0,784717** | 0,284333 | **0,700904** |



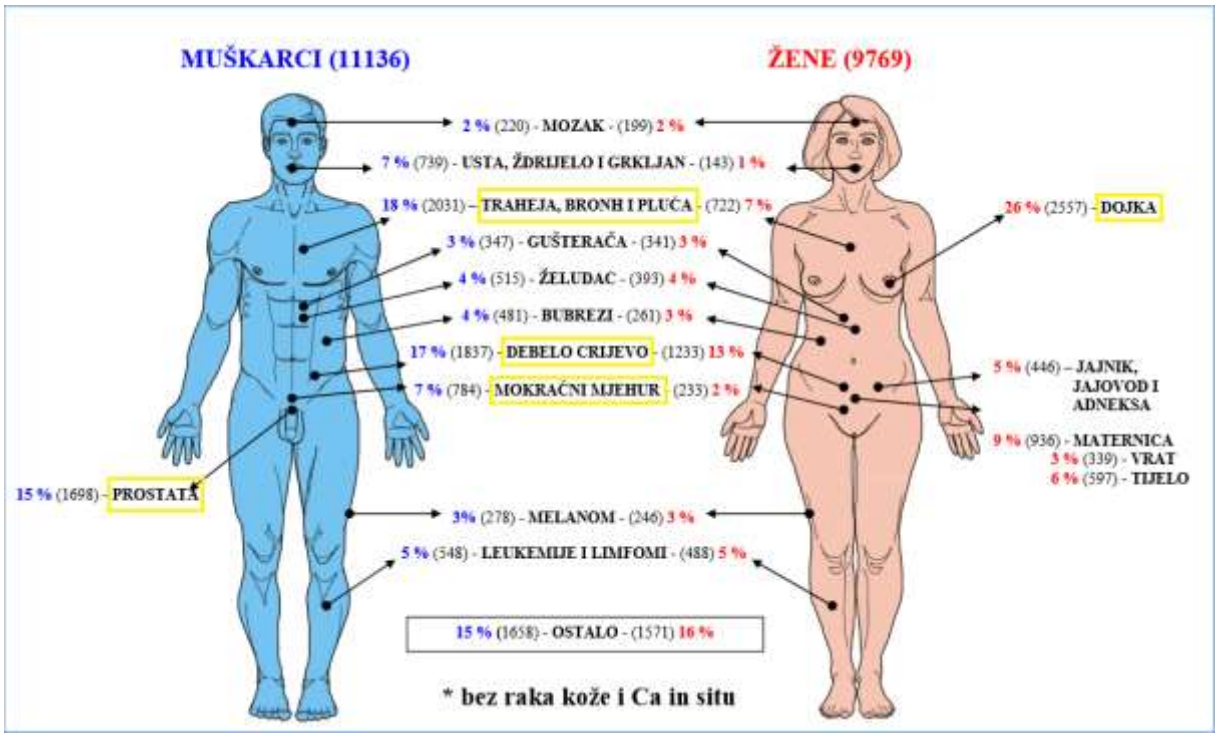

Slaba citotoksična aktivnost uočena je kod skupine tretirane otopinom ekstrakata lista masline s koncentracijom od 1 g/L, i to tek nakon 72 sata.

Otopina oleuropeina pokazala je zadovoljavajući, s koncentracijom proporcionalan, citotoksični učinak na stanice karcinoma pluća.

# 5. RASPRAVA

Uz bolesti srca i krvnih žila i različite smrtne nezgode karcinomi su jedan od vodećih uzročnika smrti. Stopa smrtnosti najviša je za karcinom pluća, debelog crijeva, dojke, gušterače, prostate te leukemija. Muškarci obolijevaju češće nego žene (2). Najčešći je rak kod muškaraca karcinom pluća. Glavni čimbenik rizika je pušenje, a karakterističniji je za razvijenije zemlje. Otežana i prekasna dijagnoza razlog su zbog kojeg je karcinom pluća najsmrtonosnija maligna bolest. Po učestalosti kod muškaraca slijede karcinomi prostate i kolona. Nažalost, bilježi se porast karcinoma pluća i u ženskoj populaciji te je kod njih na drugom mjestu (16).

Na prvom je mjestu po učestalosti kod žena karcinom dojke. Iako je incidencija u porastu, zahvaljujući edukaciji i ranom otkrivanju, smrtnost se ne povećava. Na godinu u Hrvatskoj oboli više od 2000 žena, a od ove bolesti umre svaka treća. Ukoliko se otkrije dovoljno rano, gotovo 90 % pacijentica može se izliječiti. Karcinomi maternice i kolona također se svrstavaju u najučestalije karcinome kod žena (2). Karcinom mokraćnog mjehura kod muškaraca na četvrtom je mjestu dok je kod žena puno rjeđi. Pogađa uglavnom starije od 60 godina, a pušenje je i u ovom slučaju najveći rizični čimbenik (17).




**Slika 12**. Raspodjela novooboljelih od raka prema sijelima u 2013.
Preuzeto sa: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf

Biljke se tisućljećima koriste u liječenju različitih tegoba i bolesti. Nerijetko se može čuti izraz da u prirodi postoji lijek za sve, samo ga treba pronaći. Razvoj tehnologije i nova saznanja omogućili su izolaciju spojeva koji pokazuju farmakološko djelovanje. Svrha je ovog istraživanja utvrditi postoji li, osim standardne terapije citostaticima, mogućnost liječenja i potporne terapije u vidu biljnog izvora.

U Tablici 10 prikazane se neke tradicionalne biljke za koje postoji određena razina dokaza o djelotvornosti u terapiji karcinoma (18).

**Tablica 10.** Tradicionalno korištene biljke u terapiji različitih linija karcinoma:

| Naziv biljke | Djelovanje | Razina dokaza |
|---|---|---|
| *Actaea racemosa* (habulica) | prevencija raka dojke | C |
| *Oenothera biennis* (noćurak) | prevencija i terapija raka dojke | C |
| *Linum usitatissimum* (lan) | prevencija i terapija raka dojke | C |
| *Paeonia sp.* (božur) | rak pluća | C |
| *Salvia officinalis* (kadulja) | prevencija raka pluća | C |
| *Rhodiola rosea* (rodiola) | rak mokraćnog mjehura | C |
| *Allium sativum* (češnjak) | prevencija raka | C |
| *Ginkgo biloba* | rak debelog crijeva i rektuma, rak želuca, rak gušterače, rak jajnika | C |
| *Ginseng* | prevencija raka, rak želuca | C |
| *Lavandula angustifolia* | terapija uznapredovalog raka | C |
| *Podophylum sp.* | rak maternice | C |
| *Plantago sp.* | rak debelog crijeva | C |
| *Trifolium pratense* (crvena djetelina) | rak prostate | C |
| *Salvia officinalis* | prevencija raka pluća | C |
| *Camellia sinensis* (zeleni čaj) | prevencija i terapija raka | C |
| *Curcuma longa* | prevencija i terapija raka | C |
| *Boswelia serrata* (indijski tamjan) | terapija raka mozga | B |
| *Chelidonium majus* (rosopas) | prevencija i terapija raka | B |

**B** – dobri znanstveni dokazi; do dva RKT (randomizirana kontrolirana pokusa) ili bar jedna metaanaliza ili slabija studija i utemeljenje u teoriji / *in vivo* pokusima.

**C** – nejasni ili proturječni znanstveni dokazi; RKT slabije kvalitete, slabije studije bez dokaza u teoriji / *in vivo* pokusima ili samo teorijski / *in vivo* dokazi.

Za biljku *Boswelia seratta* (indijski tamjan) postoji čvrsta razina dokaza u terapiji karcinoma mozga. Triterpenoidi, posebice bosvelična kiselina, citotoksičnu aktivnost ostvaruju indukcijom apoptoze (19). Sličnim mehanizmom, alkaloidi izolirani iz biljke *Chelidonium majus* (rosopas), a i sam biljni ekstrakt, pokazuju antitumorsku i citotoksičnu aktivnost ovisnu o vremenu i koncentraciji (20).

*Rhodiola rosea* (rodiola) ima dokazan *anti-ageing* učinak, a istraživanjem je uočeno i antitumorsko djelovanje jedne od njezinih bioaktivnih komponenti, salidrozida. Učinak ostvaruju inhibicijom translacije, a koristi se u prevenciji karcinoma mokraćnog mjehura (21).

*Oenothera biennis* (noćurak) i *Linum usitatissimum* (lan) imaju utjecaj na stanično preživljavanje te kao takvi imaju potencijal u liječenju karcinoma dojke. Polifenoli noćurka imaju dokazana protuupalna, antioksidativna te antitumorska svojstva (22). Sjeme lana koje je bogato lignanima te α-linolenskom kiselinom također posjeduje antitumorsku aktivnost. Mehanizam djelovanja uključuje suzbijanje stanične proliferacije te stimuliranje apoptoze moduliranjem metabolizma estrogena, estrogenskih receptora te signalnih putova. Istraživanja na životinjama pokazala su da prehrana obogaćena sjemenom lana usporava rast tumora, pojačava učinak tamoksifena te trastuzumab/herceptin monoklonskog protutijela (23).

Biljka *Paeonia sp.* (božur) ima dokazan citotoksični, antioksidativni, protuupalni te antitumorski učinak. Potencijalno je učinkovita alternativa u terapiji karcinoma pluća, i to upravo ispitivane stanične linije A-549. Citotoksični učinak iskazuje potičući oksidativni stres i apoptozu, zaustavljanjem staničnog ciklusa te blokirajući NF-κB kaskadni put (24).

Mediteranski tip prehrane jedan je od najzdravijih i često se preporučuje. Štiti od kardiovaskularnih bolesti, a istražuju se i brojna druga farmakološka djelovanja. Jedan od zaštitnih znakova Mediterana je maslina, a sekoiridoid oleuropein najvažniji je fenolni sastojak lista masline te je odgovoran za pozitivan farmakološki učinak koji uključuje antioksidativno, protuupalno, antimikrobno i antivirusno te *anti-ageing* djelovanje. Lista sintetičkih i prirodnih spojeva koji aktiviraju tumorsupresorske gene i inhibiraju onkogene stalno je u porastu i velik broj istraživanja usmjeren je na razvoj onkoloških lijekova. Cilj ovog istraživanja ide upravo u tom smjeru te ispituje potencijalne citotoksične učinke oleuropeina na različite linije humanih karcinoma.

Karcinom dojke velik je javno-zdravsteni problem, ali i jedan od pozitivnijih primjera gdje je ozbiljnost problema prepoznata u javnosti. Incidencija varira o populaciji i geografskoj lokaciji te o načinu prehrane. Edukacija i poticanje samopregleda smanjili su smrtnost unatoč povećanoj pojavnosti karcinoma. Naše *in vitro* istraživanje na staničnoj liniji MB-MDA-231 pokazalo je vrlo dobre, o vremenu i koncentraciji ovisne, rezultate. Koncentracija od 1 g/L nakon 72 sata metabolički je inaktivirala više od 80% stanica. Istraživanja rađena na miševima također pokazuju pozitivan učinak. Oralno administriran oleuropein inhibira HER2 protein koji je prekomjerno eksprimiran u stanicama karcinoma dojke te izaziva apoptozu stanica karcinoma. Također je uočeno da vrlo značajno poboljšava djelotvornost trastuzumaba, monoklonalnog protutijela koje se koristi u liječenju HER2 pozitivnog karcinoma dojke. Nedovoljno poznavanje kaskadne signalizacije usmjerilo je istraživanja prema molekularnoj razini i utvrđivanju točnog mehanizma djelovanja (25). Došlo se do saznanja da je apoptoza stanica karcinoma dojke inducirana aktivacijom p53 puta i Bax gena te smanjenom ekspresijom Bcl2 gena i blokadom NF-κB proteina (26). Postoji značajan potencijal za preventivnu i potpornu ulogu oleuropeina u liječenju ovog karcinoma.

Spomenuti protuupalni učinak mogao bi biti od važnosti kod ulceroznim kolitisom uzrokovanog karcinoma kolona. Smanjenje intestinalne koncentracije medijatora upale IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A te COX-2 moglo bi pružiti značajan zaštitni učinak u obliku dijetetskih dodataka prehrani (27).

Koncentracija oleuropeina od 0,5 g/L je nakon 48 sati *in vitro* ostvarila značajan citotoksični učinak na T24 staničnu linij karcinoma mokraćnog mjehura. Uroprotektivan učinak oleuropein ostvaruje sprječavanjem hemoragijskog cistitisa uzrokovanog kemoterapijom ciklofosfamidom koji se koristi u liječenju ovog karcinoma. U štakora je

uočeno da se taj učinak ostvaruje smanjenjem redukcije glutationa i različitih katalaza, tj antioksidativnim djelovanjem te protuupalnim smanjenjem intestinalnog NO i TNF-α (28).

Iako ovo istraživanja pokazuje pozitivan *in vitro* učinak oleuropeina i na staničnu liniju karcinoma pluća, zasad ne postoje *in vivo* istraživanja koja to potvrđuju.

Na temelju svega navedenog vidljivo je da postoji potencijal za tretiranje različitih karcinoma fenolnim sekoiroidom oleuropeinom izoliranog iz lista masline. Rezultati pokazuju pozitivne učinke oleuropeina te posljedično smanjeno preživljenje tretiranih stanica karcinoma mokraćnog mjehura, dojke i pluća. Iako postotak *in vitro* preživljenja ovisi o koncentraciji oleuropeina i vremenu izlaganja, a i o samoj vrsti stanične linije, hipoteza je ipak potvrđena te je ostvaren cilj ovog istraživanja. Kod nekih se linija već krenilo u *in vivo* istraživanja što je značajan korak prema učinkovitoj uporabi ovog ekstrakta.

# 6. ZAKLJUČAK

1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24), dojke (MDA-MB-231) i pluća (A-549) ekstraktima lista divlje masline (*Olea europaea L. subsp. oleaster*) dovodi do smanjenog preživljenja tih stanica.

2) Oleuropein kao najznačajnija komponenta lista divlje masline uzrokovao je različit postotak smanjenja preživljavanja stanica kod ispitivanih karcinoma. To djelovanje ovisno je o koncentraciji oleuropeina te o trajanju izloženosti staničnih linija.

3) Smanjenje preživljenja stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24, dojke MDA-MB-231 i pluća A-549 nije uvijek bilo u razmjeru s povećanjem koncentracije ekstrakta.

4) Potvrđeni *in vitro* učinak oleuropeina pozitivan je pokazatelj potencijalnih mogućnosti u liječenju ovim spojem, a slijedeća razina su *in vivo* istraživanja na pokusnim životinjama.

# 7. LITERATURA

1. Vrdoljak E, Šamija M i suradnici. Klinička onkologija Zagreb: Medicinska naklada; 2013.

2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 38. [Online].; 2015. Available from: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf.

3. Griffiths TR; Action on Bladder Cancer. Current perspectives in bladder cancer management. Int J Clin Pract. 2013. May;(67(5):435-48).

4. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol. 2001 March;(2(3):133-40).

5. Carole A. Ridge, Aoife M. McErlean, Michelle S. Ginsberg. Epidemiology of Lung Cancer. Semin Intervent Radiol. 2013 June;(30(2): 93–98.).

6. Omar SH. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Scientia Pharmaceutica. 2010; 78(2).

7. Gligić V, Marković S, Šilić Č. Plantea. [Online].; 2015. Available from: http://www.plantea.com.hr/maslina/.

8. Wharf C, Kingdom U. Assessment report on Olea europaea L., folium. [Online].; 2011. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2012/04/WC500125459.pdf.

9. de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. Biochem Pharmacol. 1999 February; 15;57(4):445-9.

10. Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Gerothanassis IP. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. Mol Nutr Food Res. 2009 May; 53(5):600-8. doi: 10.1002/mnfr.200800204.

11. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. J Pharm Pharmacol. 1999 August; 51(8):971-4.

12. Ma SC, He ZD, Deng XL, But PP, Ooi VE, Xu HX, Lee SH, Lee SF. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of Ligustrum lucidum as antiviral agents. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2001 November; 9(11):1471-3.

13. Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. fusion [corrected] inhibition. Biochem Biophys Res Commun. 2007 March.

14. Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. J Nutr. 2009 November; 139(11):2079-86.

15. Martorell M, Forman K, Castro N, Capó X, Tejada S, Sureda A. Potential Therapeutic Effects of Oleuropein Aglycone in Alzheimer's Disease. Curr Pharm Biotechnol. 2016; 17(11):994-1001.

16. Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F,Hesami SM,Shamlou R,Towhidi F, Salehiniya H, Makhsosi BR, Moini A. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. J Thorac Dis. 2016. June;( 8(6): 1094–1102).

17. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. Eur Urol. 2017 January;(71(1):96-108).

18. M ZK. Fitoterapija. predavanja prezentirana na Medicinskom fakultetu u Splitu ed.; 2014.

19. Khan MA, Ali R, Parveen R, Najmi AK, Ahmad S. Pharmacological Evidences for Cytotoxic and Antitumor Properties of Boswellic Acids From Boswellia Serrata. J Ethnopharmacol. 2016.;(191, 315-323.).

20. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, et al.. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. J Ethnopharmacol. 2016.;(48(2):646-56).

21. Liu Z, Li X, Simoneau AR, Jafari M, Zi X. Rhodiola rosea extracts and salidroside decrease the growth of bladder cancer cell lines via inhibition of the mTOR pathway and induction of autophagy. Mol Carcinog. 2012;(51(3):257-67).

22. 13. Lewandowska U, Owczarek K, Szewczyk K, Podsędek A, Koziołkiewicz M, Hrabec E. Influence of polyphenol extract from evening primrose (Oenothera paradoxa) seeds on human prostate and breast cancer cell lines. Postepy Hig Med Dosw. 2014.

23. Mason JK, Thompson LU. Flaxseed and its lignan and oil components: can they play a role in reducing the risk of and improving the treatment of breast cancer? Appl Physiol Nutr Metab. 2014;(39(6):663-78).

24. Almosnid NM, Gao Y, He C, Park HS, Altman E. In vitro antitumor effects of two novel oligostilbenes, cis- and trans-suffruticosol D, isolated from Paeonia suffruticosa seeds. Int J Oncol. 2016.

25. Fayyaz S, Aydin T, Cakir A, Gasparri ML, Panici PB, Farooqi AA. Oleuropein Mediated Targeting of Signaling Network in Cancer. Curr Top Med Chem. 2016;(16(22):2477-83).

26. Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, Daghestani MH, Al-Olayan ES, Elobeid MA, Virk P. Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;(Asian Pac J Cancer Prev).

27. Giner E, Recio MC, Ríos JL, Cerdá-Nicolás JM, Giner RM. Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. Mol Nutr Food Res. 2016;(60(2):242-55).

28. Sherif IO, Nakshabandi ZM, Mohamed MA, Sarhan OM. Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis. Int J Biochem Cell Biol. 2016;(74:12-7).

# 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:**

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje oleuropeina, fenolnog ekstrakta iz lista divlje masline (*Olea europaea L. subsp. oleaster*), na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (T24), dojke (MDA-MB-231) i pluća (A-549). Prepostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih stanica oleuropeinu njihov broj smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Materijali i metode:**

Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura, dojke i pluća rađeno je MTT testom. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih oleuropeinom i apsorbancije kod netretiranih stanica (kontrola), dobili smo postotak preživljenja karcinomskih stanica. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata.

**Rezultati:**

Karcinomske stanice mokraćnog mjehura (stanične linije T24) pokazuju značajno smanjenje preživljenja u odnosu na kontrolu nakon 24 sata tretiranja otopinom oleuropeina od 0,5 g/L i 1 g/L te nakon 48 sata tretiranja ekstraktom lista masline koncentracije 1 g/L.

Karcinomske stanice dojke (stanične linije MDA-MB-231) pokazuju značajno smanjenje preživljenja u odnosu na kontrolu nakon 48 sati tretiranja otopinom oleuropeina koncentracije 1 g/L te nakon 72 sata tretiranja koncentracijom od 0,5 g/L. Ekstrakt lista masline pokazuje manju citotoksičnu aktivnost nakon 72 sata pri koncentraciji od 1 g/L.

Karcinomske stanice pluća (stanične linije A-549) pokazuju smanjeno, o koncentraciji ovisno, preživljenje u odnosu na kontrolu nakon 24 sata. Ekstrakt lista masline ima vrlo slabu citotoksičnu aktivnost.

**Zaključci:**

*In vitro* istraživanje potencijalne citotoksičnosti oleuropeina iz lista divlje masline na karcinome mokraćnog mjehura, dojke i pluća dovelo je do smanjenog preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ne djeluje na sve ispitivane stanične linije karcinoma jednako, a ovisno je i o vremenu izlaganja te o koncentraciji otopine oleuropeina. Smanjenje preživljenja nije uvijek bilo u razmjeru s trajanjem izloženosti. Pozitivni rezultati dobar su predznak za buduća *in vivo* istraživanja.

# 9. SUMMARY

**The research aim:**

The aim of this study was to examine citotoxic effect of main phenolic secoiridoid from wild olive leaf *(Olea europaea L. subsp. oleaster)*, oleuropein, on urinary bladder cancer cell line T24, breast cancer cell line MDA-MB-231 and lung cancer cell line A-549. The hypothesis is that after exposure of cancer cells to oleuropein, their number will be reduced compared to untreated cells (control).

**Materials and methods:**

Cytotoxic effect on urinary bladder cancer cell line T24, breast cancer cell line MDA-MB-231 and lung cancer cell line A-549 was determined by MTT test. Percentage of cell survival was determined by comparing the absorbance of formazan in treated and untreated cells (control). Cytotoxicity was measured after 4, 24, 48 and 72 hours.

**Results:**

Bladder cancer cells (cell line T24) treated with oleuropein solution of 0.5 g/L and 1 g/L showed a significant decrease in survival compared to the control after 24 hours, and after 48 hours of treatment with olive leaf extract solution of 1 g/L.

Breast cancer cells (cell line MDA-MB-231) treated with oleuropein solution of 1 g/L showed a significant decrease in survival compared to the control after 48 hours of treatment, and after 72 hours of treatment with concentration of 0.5 g/L. Olive leaf extract solution of 1 g/L showed small cytotoxic activity after 72 hours.

Compared to control, lung cancer cells (cell line A-549) showed reduced, concentration depending, survival rate after 24 hours. Olive leaf extract had very low cytotoxic activity.

**Conclusions:**

*In vitro* study of potential cytotoxic activity of oleuropein, extracted from wild olive leaf, on urinary bladder, breast and lung cancer showed reduction in cells surviving ratio. The reduced survival rate was not equal for every tested cancer cell line and it depended on the concentration of oleuropein solution and the cell exposure time. Decreased survival was not always proportional to the exposure time. Positive results are encouraging signs for future *in vivo* studies.

# 10. ŽIVOTOPIS

**OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime**: Frane Šuman

**Datum rođenja**: 06.03.1993.

**Državljanstvo**: hrvatsko

**Adresa**: Obala Stjepana Radića 104

**e-mail**: frane.suman@gmail.com

**OBRAZOVANJE:**

- **1999. - 2007**. Osnovna škola "Ivo Dugandžić Mišić", Komin, Republika Hrvastska
- **2007. - 2011**. Srednja škola fra Andrje Kačića Miošića; smjer: opća gimnazija, Ploče, Republika Hrvatska
- **2011. - 2017**. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

**RADNO ISKUSTVO:**

**III. 2016. – IX. 2016. –** Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Blatine

**CPSA Split** (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

**POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici**: engleski jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija