

# Učinak ekstrakta lista masline na metaboličku aktivnost stanica humanih staničnih linija melanoma A375 i A375M

---

**Brajdić, Ivona**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:015822>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivona Brajdić**

**Učinak ekstrakta lista masline na metaboličku  
aktivnost stanica humanih staničnih linija  
melanoma A375 i A375M**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biološka kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sanje Dabelić.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sanji Dabelić na susretljivosti, povjerenju, iznimno stručnom vodstvu te ukazanoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju s kojima su me pratili kroz sve moje akademske i životne izazove.*

*Veliko hvala mojim prijateljima jer su vjerovali u mene, bili mi oslonac i beskonačan izvor sreće i smijeha.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Melanom .....	1
1.1.1. Molekularni aspekti u patogenezi melanoma .....	3
1.1.2. Terapijske opcije u liječenju melanoma .....	6
1.2. Maslinova ulja i njihove bioaktivne sastavnice .....	8
1.3. Oleuropein .....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	16
3.1. Priređivanje ekstrakta lista masline .....	16
3.2. Stanične linije .....	17
3.3. Tretiranje staničnih linija ekstraktom lista masline .....	19
3.4. Statistička analiza .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
5. ZAKLJUČAK .....	27
6. LITERATURA .....	28
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	34

# 1. UVOD

## 1.1. MELANOM

Maligni melanom čini samo 4% svih vrsta tumora kože, no kao jedan od najagresivnijih tumora u čovjeka odgovoran je za 80% smrtnih slučajeva svih kožnih tumora (Davis i sur., 2019). U zadnjih nekoliko desetljeća postao je tumor s najbrže rastućom incidencijom. Glavni rizični čimbenici za razvoj melanoma jesu učestalo i intenzivno izlaganje ultraljubičastom zračenju, frekventnost zadobivanja sunčevih opekline, fenotipske karakteristike (svijetla put i kosa), broj nevusa, pozitivna obiteljska anamneza te genske mutacije (Russo i sur., 2009). Iako se iznimno rijetko javlja prije 40. godine života, incidencija melanoma u mlađim dobnim skupinama kroz zadnja četiri desetljeća raste, a u prosjeku je dijagnosticiran s 53 godine (Šitum, 2016).

Australija i Novi Zeland imaju najveću učestalost pojavnosti melanoma, a zatim SAD i skandinavske zemlje (Conforti i Zalaudek, 2021). U Hrvatskoj se melanom prema učestalosti pojavljivanja zloćudnih tumora nalazi na 11. mjestu i čini 3% svih malignoma, a zabilježen je porast incidencije od 140% u zadnjih 20 godina. Stopa mortaliteta uzrokovanim melanomom također je u porastu na svjetskoj razini, iako javnozdravstvene kampanje i veća osviještenost populacije o opasnosti melanoma povećavaju učestalost ranog otkrivanja, a time i uspješnijeg liječenja te preživljenja pacijenata (Šitum, 2016). Bolesnicima kojima je melanom otkriven u uznapređovalom stadiju imaju medijan preživljavanja manji od godine dana (Santourlidis i sur., 2022).

Melanom je vrsta zloćudnog tumora kože koji nastaje kao posljedica maligne transformacije melanocita, specijaliziranih stanica zaduženih za proizvodnju pigmenta melanina. Melanociti se nalaze u bazalnom sloju epidermisa kože, sluznicama, oku, unutarnjem uhu i ovojnicama središnjeg živčanog sustava. Melanin se sintetizira u melanosomima, citoplazmatskim organelima, uz pomoć enzima tirozinaze iz aminokiseline tirozina. To je pigment koji apsorbira ultraljubičasto zračenje i štiti stanice od oksidacijskog stresa uzrokovnog reaktivnim kisikovim spojevima (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Šitum, 2016). No, kod izlaganja i pod utjecajem intenzivnog ultraljubičastog zračenja, teških metala, herbicida, itd. umjesto antioksidativnih svojstava melanin može ispoljavati prooksidativna svojstva. To u stanicama dovodi do povećanja koncentracije kisikovih radikala koji uzrokuju mutacije unutar DNA molekula, te posljedično pretjeranu aktivaciju različitih signalnih puteva

u stanici, nekontroliranu proliferaciju, diferencijaciju i imortalizaciju stanica. (Strashilov i Yordanov, 2021).

Sunčeva svjetlost stanice oštećuje direktno i indirektno. UVA zrake (320-400 nm) indirektno oštećuju DNA molekule proizvodnjom kisikovih slobodnih radikala u stanici, dok UVB zrake (290-320 nm) direktno oštećuju DNA. Pri izlaganju stanica koje sadrže melanin UVB zračenju nastaju superoksid i dušikov oksid koji uzrokuju degradaciju melanina i ulazak fragmenata melanina u staničnu jezgru. Takvi ekscitirani fragmenti melanina posjeduju energiju fotona koju prenose na DNA, tj. na citozin i timin koji ju apsorbiraju te nastaju „tamni ciklobutan pirimidin dimer (engl. *cyclobutane pyrimidine dimer*, CPD)“ i „citozin koji sadrži CPD“ koji posjeduju mutageno, citotoksično i kancerogeno djelovanje (Mouret i sur., 2006). Osim djelovanja na ključne stanične regulacijske gene, UV zračenje može ispoljavati kancerogeno djelovanje imunosupresijom i poremećenom regulacijom različitih faktora rasta.

Kada stanica normalno funkcionira ima brojne mehanizme kojima se štiti od promjena nastalih na genskom materijalu, kao što su aktivacija reparacijskih enzima, prigušivanje gena metilacijom DNA i obustavljanje daljnje transkripcije te pokretanje apoptoze, programirane stanične smrti. No, ukoliko dođe do većih genskih oštećenja, pojave se greške u apoptoznim putevima ili dođe do mutacije ključnih gena, u kombinaciji s naslijeđenim genskim aberacijama, može doći do nastanka tumora (Šitum, 2016).

### 1.1.1. MOLEKULARNI ASPEKTI U PATOGENEZI MELANOMA

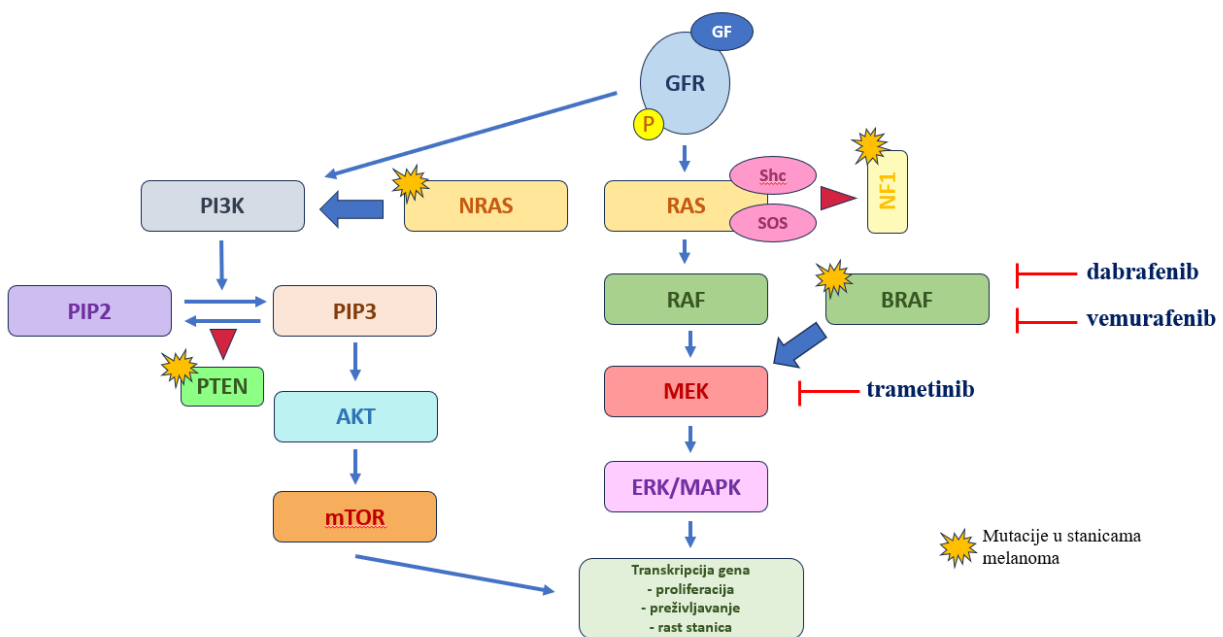
Međustanična komunikacija, parakrina komunikacija, autokrina regulacija, različiti homeostatski mehanizmi kao što su diferencijacija, mirovanje, proliferacijski i apoptotički odgovori utječu na integritet melanocita. Narušavanjem bilo kojeg od navedenih procesa može doći do razvoja tumora tj. do ekstenzivne proliferacije stanica koja je glavno obilježje tumorskog tkiva. Stanice melanoma prekomjerno eksprimiraju mnogo vrsta vlastitih čimbenika rasta, hormona, citokina i njihovih receptora te tako autoreguliraju svoj rast (Leonardi, 2018).

Do autonomnog tumorskog rasta može doći zbog promjena u nekoliko staničnih puteva prijenosa signala. Najčešće do promjene dolazi u RAS-RAF MAPK signalnom putu. Mitogenima aktivirani putevi protein kinaza (eng. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) su putevi prijenosa signala kroz citoplazmu kojima se kaskadom fosforilacija prenosi signal u jezgru gdje se pokreće transkripcija ciljanih gena fosforilacijom (aktivacijom) ciljanih transkripcijskih čimbenika. Vežanje faktora rasta na membranski receptor dovodi do promjene konformacije receptora i njegove dimerizacije te autofosforilacije specifičnih tirozinskih ostataka na unutarstaničnom dijelu receptora. Na fosforilirane dijelove vežu se SH2 domene adaptorskih proteina, npr. iz Shc (engl. *Src homology and Collagen*) skupine proteina, od kojih se zatim regrutiraju citosolni proteini SOS (engl. *Son of Sevenless*). Vežanjem adaptorskih proteina na RAS (engl. *Rat sarcoma virus*) protein mijenja se njegova konformacija te dolazi do fosforilacije inaktivnog RAS-GDP-a u aktivni RAS-GTP. Signal se dalje fosforilacijom prenosi na RAF (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), koji je vrlo važan za patogenezu melanoma, MEK (engl. *Mitogen-activated protein kinase kinase*) i ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*). U konačnici dolazi do aktivacije transkripcijskog faktora FOS (engl. *Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*) koji regulira aktivaciju ciklina D1, ključnog proteina za progresiju stanice kroz G1 fazu staničnog ciklusa i ulazak u S fazu (Šitum, 2016).

Ovdje je najvažnija mutacija BRAF gena (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) koja je prisutna u preko 50% slučajeva razvitka melanoma. Zbog supstitucije valina glutaminskom kiselinom na poziciji 600, mutirana protein kinaza BRAF V600E aktivira kaskadu MAPK signalnog puta neovisno o prethodnoj aktivaciji RAS-om te tako dolazi do neprekidne proliferacije stanica i inhibicije apoptoze (Strashilov i Yordanov, 2021).

Druga najčešća mutacija zbog koje se može promijeniti signaliziranje MAPK putem prisutna je zbog pogrešne (missense) mutacije kodona gena za NRAS protein (engl.

*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*). Zbog ovih mutacija dolazi do produljenja aktivnog stanja NRAS-a što vodi u abnormalnu signalizaciju MAPK putem, ali i fosfatidilinozitol-3 kinaznim (engl. *phosphoinositide 3-kinase, PI3K*) putem. Do mutacije može doći i u genu za tumor supresor NF1 (engl. *Neurofibromin 1*) koji inaktivira RAS. Unutar PI3K/AKT (engl. *phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B*) puta može doći do gubitka aktivnosti tumor supresora PTEN-a (engl. *Phosphatase and tensin homolog*), a posljedično do pretjerane aktivacije signalnog puta i proliferacije stanica (Lugović-Mihić i sur., 2019).



Slika 1. Molekularni aspekti u patogenezi melanoma i mete terapijskih opcija.

C-KIT je tirozin-kinaza receptor čiji se gubitak ekspresije na površini melanocita povezuje s progresijom melanoma prema metastatskom fenotipu, a povezan je s RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/AKT putem. MITF (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*) je transkripcijski čimbenik koji ima bitnu ulogu u rastu i diferencijaciji melanocita, te je prekomjerno aktivan u 10-20% melanoma (Strashilov i Yordanov, 2021).

Uzrok pretjeranoj proliferaciji pigmentnih stanica može biti i narušena regulacija staničnog ciklusa. Progresija staničnog ciklusa ovisi o različitim ciklinima i o ciklinima ovisnim kinazama (engl. *cyclin-dependent kinases, CDK*) koje pokreću kaskadu fosforilacija te dovode do aktivacije transkripcije i pokretanja procesa mitoze. Tumorski supresor p53 i inhibitori o ciklinu ovisnih kinaza p16, p15, p21 i p27 su negativni regulatori progresije staničnog ciklusa, od kojih je za melanom najznačajniji p16. Protein p16 važan je u aktivaciji proteina tumor



supresora Rb koji inhibira aktivnost kompleksa ciklina tipa D, CDK4 i CKD6, pozitivnog regulatora progresije stanice kroz G1 fazu staničnog ciklusa. Kod jedne vrste melanoma, spriječeno je vezanje p16 za CKD4 te zbog toga dolazi do neograničene i konstantne progresije kroz stanični ciklus (Šitum, 2016).

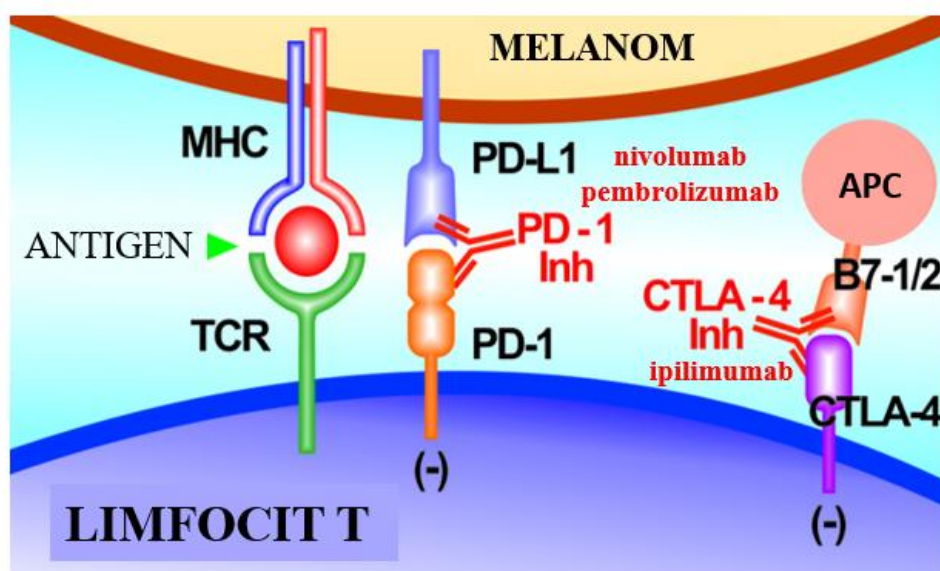
Kod tumorskih stanica može doći do poremećaja puteva kojima stanice ulaze u apoptozu. Kod melanoma, često je povećana ekspresija Bcl-2 (engl. *B-Cell Leukemia/Lymphoma 2*), proteina koji sprječava apoptozu stanica inhibirajući otpuštanje citokroma C iz mitohondrija (Wang i sur., 2007).

Angiogeneza ima vrlo važnu ulogu kod metastaziranja tumora, a do poremećaja angiogeneze dolazi zbog visoke aktivnosti telomeraze i pojačanog djelovanja VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) i FGF- $\beta$  (engl. *basic fibroblast growth factor*). Stanice melanoma također izlučuju metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP), proteolitičke enzime koji razgrađuju i mijenjanju izvanstanični matriks, a poremećeno je i funkcioniranje tkivnih inhibitora metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP) (Šitum, 2016).

### 1.1.2. TERAPIJSKE OPCIJE U LIJEČENJU MELANOMA

Osnovni način liječenja primarnog melanoma jest kirurški zahvat kojim se nastoji u cijelosti izrezati tumorska izraslina i rub zdrave kože kako bi se postigla trajna kontrola lokalne bolesti. Radioterapija se rijetko koristi u primarnom tretmanu jer se melanomi smatraju radiorezistentnim tumorima (Banjin, 2018). U svrhu kemoterapije najčešće se koriste alkilirajući agensi dakarbazin i temozolomid, iako je ona kao terapijska opcija najčešće korištena tek u slučajevima relapsa, kod metastaza koje su iznimno napredovale ili u sklopu palijativne skrbi (Heistein i sur., 2023).

Novi pristupi liječenju uznapredovalog metastatskog melanoma uključuju imunoterapiju i ciljanu terapiju. Imunoterapija melanoma, za razliku od ciljane, ne zahtijeva biološki preduvjet i može se primjenjivati i kod pacijenata koji nemaju mutaciju BRAF V600E. U terapiji se koriste ipilimumab, monoklonsko protutijelo usmjereno na CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) te nivolumab i pembrolizumab, monoklonska protutijela usmjerena na PD-1 (engl. *Programmed Cell Death Protein 1*) (Lopes i sur., 2022). Stanice melanoma na svojoj površini ekspimiraju molekulu B7 (ligand za CTLA-4) i PD-L1 (ligand za PD-1) te tako inhibiraju aktivaciju limfocita T. Navedeni lijekovi inhibiraju negativnu regulaciju imunološkog odgovora od strane tumora i dovode do aktivacije limfocita T i reakcije imunološkog sustava na stanice tumora (Banjin, 2018).



Slika 2. Imunoterapija melanoma (preuzeto i prilagođeno iz Leonardi i sur., 2018).

Terapija melanoma napredovala je otkrićem specifičnih mutacija u MAPK signalnom putu. Vemurafenib i dabrafenib su lijekovi iz skupine BRAF inhibitora koji selektivno inhibiraju mutiranu BRAF V600 kinazu i tako sprječavaju proliferaciju tumorskih stanica. Na drugu tirozin kinazu u RAS/RAF/MEK/ERK signalnom putu djeluje MEK inhibitor trametinib koji se najčešće koristi u kombinaciji s BRAF inhibitorom zbog kumulativno uspješnije inhibicije rasta melanomskih stanica (Slika 1.). Ciljana terapija može se koristiti samo kod pacijenata kod kojih je dokazana mutacija gena BRAF (Lopes i sur., 2022). No iako su imunoterapija i ciljana terapija opcije izbora kod uznapredovalih slučajeva melanoma, one nisu u potpunosti efektivne opcije. Odgovor na imunoterapiju je ograničen kod većine pacijenata, a također može uzrokovati hepatotoksičnost, endokrinopatije i dermatotoksičnost. Kod upotrebe BRAF i MEK inhibitora, zbog agresivne prirode melanoma i brzih mutacija vrlo brzo se javlja rezistencija ([www.medscape.com](http://www.medscape.com)).

## 1.2. MASLINOVA ULJA I NJIHOVE BIOAKTIVNE SASTAVNICE

Veliki broj epidemioloških i eksperimentalnih istraživanja pokazuje da mediteransko stanovništvo rjeđe obolijeva od kroničnih upalnih bolesti i karcinoma u odnosu na ostatak svjetske populacije, što se povezuje sa specifičnim načinom prehrane bogatom voćem, povrćem, ribom i maslinovim uljem (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Maslinovo ulje sastoji se od glicerolne frakcije (osapunjivog dijela) i ne-glicerolne frakcije (neosapunjivog dijela). Osapunjivi dio (90-99%) čine trigliceridi i slobodne masne kiseline. Ovdje je najzastupljenija oleinska masna kiselina, koja je strukturno jednostruko nezasićena masna kiselina, a također su prisutne i palmitoleinska i eikozanoinska masna kiselina. Maslinovo ulje sadrži vrlo specifičan i povoljan omjer višestruko nezasićenih masnih kiselina, linolne (dvostruko nezasićena,  $\omega$ -6) i  $\alpha$ -linolenske (trostruko nezasićena,  $\omega$ -3) masne kiseline. Upravo zbog svog jedinstvenog sadržaja navedenih masnih kiselina, posebno zbog količine nezasićenih masnih kiselina maslinovo ulje vrjednije je nego druge vrste ulja ([www.oliveoilsource.com](http://www.oliveoilsource.com)).

Neosapunjive sastavnice maslinovog ulja dijele se na lipofilne i hidrofilne. U lipofilne ubrajamo skvalen koji djeluje kemoprotektivno kod nekih vrsta raka, dugolančane zasićene alifatske alkohole, hidroksipentacikličke triterpenske kiseline, pigmente klorofil i karotenoid te prirodne antioksidanse sterole i tokoferole, od kojih je najpoznatiji  $\alpha$ -tokoferol ili vitamin E (Kabaran, 2019).

Hidrofilne neosapunjive spojeve u maslinovom ulju nalazimo u vrlo niskom postotku, no oni su zaslužni za većinu antioksidativnih svojstava maslinovog ulja. Zbog svoje hidrofilnosti čak se 80% ovih spojeva može izgubiti u procesu prerade maslinovog ulja jer zaostaju u vegetabilnoj vodi, a njihova prisutnost i sadržaj ovise o sorti masline, geografskoj regiji, agrotehničkim mjerama i zrelosti ploda kod berbe, ekstrakciji i preradi ulja, skladištenju te načinu uporabe ulja. U ovu skupinu spojeva ubrajamo fenolne kiseline, derivate benzojeve kiseline (3-hidroksibenzojeva, gentizinska, vanilinska, galna kiselina), cimetne kiseline (o-kumarna, kavena, fenelična kiselina), hidroksiizokromane, flavonoide i lignane. No najvažniji i najzastupljeniji spojevi ove skupine su fenolni alkoholi tirozol i hidroksitirozol te njihovi derivati. Fenolni alkoholi mogu biti slobodni ili esterificirani s elenolnom kiselinom, a ako je na njih vezana još i glukoza, nazivamo ih sekoiridoidima. Najobilniji sekoiridoidi u maslinovom ulju su oleokantal i oleuropein aglikon (Pejović i sur., 2014).

Fenolni spojevi u ekstra djevičanskom maslinovom ulju ispoljavaju mnoge važne biološke učinke te su predmet ispitivanja velikog broja istraživanja koji proučavaju na koje sve načine povoljno djeluju na zdravlje.

U organizmu prirodno nastaju slobodni radikali, a neki ulaze u organizam iz okoliša. To su vrlo reaktivni spojevi koji imaju visoki afinitet vezanja za proteine, lipide, ugljikohidrate i nukleinske kiseline u našem tijelu i uzrokuju oksidoredukcijski stres ukoliko naši mehanizmi antioksidativne zaštite nisu dostatni za njihovo uklanjanje. To može dovesti do razvoja tumora i pojave kroničnih upalnih bolesti. Fenoli iz maslinovog ulja inhibiraju stvaranje peroksida i oštećenje makromolekula, a rezultati istraživanja pokazali su da su u tome najučinkovitiji hidroksitirozol, oleuropein aglikon, 3,4-dihidroksibenzojeva i kavena kiselina. Također, ekstrakt ekstra djevičanskog maslinovog ulja koji sadrži smjesu fenolnih spojeva potentniji je antioksidans u odnosu na uzorke koji su sadržavali pojedine ukoncentrirane fenole (Cicerale i sur., 2012).

Svakodnevni unos maslinovog ulja pokazao je i protuupalni učinak te tako smanjio razvoj kroničnih upalnih bolesti. Fenoli iz maslinovog ulja prema nekim istraživanjima imaju antiinflamatorno i antitrombotsko djelovanje, što je dokazano snižavanjem vrijednosti upalnih markera (TxB<sub>2</sub>, TLB<sub>4</sub>) u krvnom serumu (Visioli i sur., 2005). Oleokantal, tirozolni ester u maslinovom ulju, dijeli mehanizam djelovanja s nesteroidnim protuupalnim lijekom ibuprofenom. On inhibira enzime ciklooksigenazu 1 i 2 te tako sprječava sintezu proupalnih prostaglandina. Fenolni spojevi također smanjuju koncentraciju proupalnog citokina interleukina-6 i C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP), a povećavaju koncentraciju interleukina-12 i interleukina-4 važnih za uklanjanje unutarstaničnih i vanstaničnih patogena. Fenolni alkohol hidroksitirozol također inhibira ekspresiju TNF $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) i interleukina-1 $\beta$  (Emma i sur., 2021).

Konsumacija maslinovog ulja ima protektivan učinak na kardiovaskularni sustav. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja pokazala su da hidroksitirozol i oleuropein smanjuju plazmatske koncentracije kolesterola, triglicerida, lipoproteina male gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL) te smanjenu aktivnost 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze zadužene za sintezu kolesterola, a povećava koncentraciju lipoproteina visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL) u plazmi. Mononezasićene masne kiseline također imaju povoljan učinak na smanjenje razine LDL-a. Fenolni spojevi, a osobito oleuropein aglikon i luteolin, imaju antiagregacijsko djelovanje (Bendini i sur., 2007).

Polifenoli imaju i antitumorsko djelovanje. Različitim mehanizmima inhibiraju sintezu DNA u tumorskim stanicama, moduliraju nastajanje i pomažu u uklanjanju reaktivnih kisikovih

spojeva, reguliraju apoptozu, stanično preživljavanje i proliferaciju. Isto tako, mogu interferirati s ekspresijom različitih proteina važnih za stanični ciklus. Fenolni spojevi u različitim organima sprječavaju nastanak specifičnih tumora pa je tako istraživana njihova primjena te je uočen pozitivan učinak kod karcinoma dojke (Moral i Escrich, 2022), mokraćnog mjehura i bubrega (Spagnuolo i sur., 2022), leukemije (Fabiani i sur., 2008) i glioblastoma (Lamy i sur., 2016). Također, kod primjene tretmana maslinovim uljem na kožu nakon izlaganja UV zračenju opažena je odgoda i smanjenje promjene normalnih stanica u tumorske stanice melanoma.

Zbog prisutnosti *o*-dihidroksi katehola u svojoj strukturi, fenolni spojevi maslinovog ulja posjeduju antimikrobna svojstva, a na mikroorganizme mogu djelovati povećanjem površinske aktivnosti membrane i narušavanjem peptoglikanskog sloja, smanjenjem sinteze određenih aminokiselina te stimulacijom fagocitoze. Tirozol i hidroksitirozol inhibiraju rast bakterijskih vrsta *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonellae enteritidis*, dok oleokantal ima značajan utjecaj na preživljavanje *Helicobacter pylori*. Oleuropein uz bakterije *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Bacillus cereus* ima utjecaj na razvoj virusa hepatitisa, rotavirusa i respiratornog sincicijskog virusa. Djeluje i na odgodu razvoja i sporulacije plijesni vrsta *Aspergillus parasiticus* te smanjenje proizvodnje aflatoksina (Cicerale i sur., 2012).

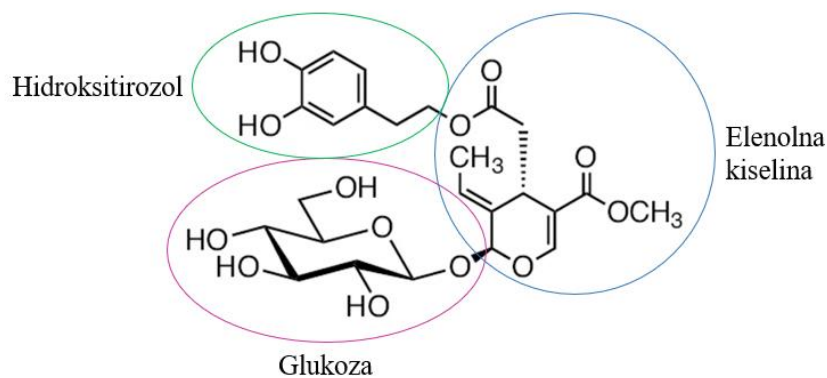
Oleokantal i oleuropein su u istraživanjima pokazali neuroprotektivno djelovanje, specifično u razvoju Alzheimerove bolesti. Ovi spojevi inhibiraju nakupljanje proteina  $\beta$ -amiloida koji se kod Alzheimerove bolesti vežu na postsinaptička mjesta u živčanom sustavu te se time gubi sinaptička funkcija i dolazi do propadanja neurona. Djeluju tako da mijenjaju oligomerizacijsko stanje  $\beta$ -amiloida i povećavaju njegov klirens regulacijom transportnih proteina u krvno-moždanoj barijeri (Romani i sur., 2019).

Dokazan je i učinak fenolnih spojeva na usporeno starenje stanica, povećanje izgradnje koštane mase kostiju i na regulaciju nekih cirkulirajućih crijevnih peptida kao što su gastrin, kolecistokinin, polipeptidi gušterače, sekretin i somatostatin (Pejović i sur., 2014).

### 1.3. OLEUROPEIN

Oleuropein je glavna bioaktivna fenolna sastavnica maslinovog ulja te je kao takav predmet istraživanja brojnih studija koje proučavaju njegove potencijalne pozitivne učinke na organizam, a osobito je zanimljiva njegova uloga u budućnosti antitumorske terapije.

Oleuropein strukturno spada u skupinu sekoiridoida, spojeva koji se nalaze u skupinama *Oleaceae*, *Gentianaceae* i *Cornaleae*. Nastaju sekundarnim metabolizmom terpena i prekursori su za različite indolne alkaloidne (Ruzzolini i sur., 2020). Oleuropein je ester 2-(3,4-dihidroksifenil)etanola (hidroksitirozola) i elenolne kiseline na čiju je OH skupinu na C1 atomu vezana  $\beta$ -D-glukoza (Tripoli i sur., 2005), a u plodu masline i maslinovom ulju može postojati i kao aglikon koji također ima vrlo potentno djelovanje.



Slika 3. Struktura oleuropeina (preuzeto i prilagođeno prema [www.tcichemicals.com](http://www.tcichemicals.com)).

On je hidrofilan i polaran spoj te podliježe reakcijama kemijske i enzimske hidrolize endogenim  $\beta$ -glukozidazama i esterazama tijekom sazrijevanja plodova, ali i u procesu prerade maslinovog ulja. U mladim nezrelim plodovima količina oleuropeina može doseći do 140 mg/g suhe tvari, a daljnjim sazrijevanjem se značajno smanjuje. Usporedno s tim, koncentracija hidroksitirozola dobivenog hidrolizom oleuropeina raste (Nediani i sur., 2019). Dokazana je visoka bioraspoloživost fenolnih spojeva iz maslinovog ulja, a pretpostavlja se da se oleuropein iz tankog crijeva apsorbira preko transportera za glukozu koja je sastavni dio molekule spoja. U organizmu prolazi vrlo ekstenzivan metabolizam i prelazi u hidroksitirozol.

Oleuropein posjeduje antioksidativno djelovanje, uklanja reaktivne kisikove i dušikove spojeve čija povećana koncentracija u organizmu dovodi do stanja oksidativnog stresa i gubitak

funkcije važnih makromolekula. Uklanjanjem reaktivnog dušikovog oksida inhibira oksidaciju lipoproteina niske gustoće, a ima učinak i na smanjenje razine ukupnog kolesterola u plazmi. Postoje i dokazi koji nalažu kako oleuropein smanjuje adheziju stanica na stimulirani endotel krvnih žila i smanjuje lipidnu peroksidaciju membrana stanica krvnih žila te tako ukupno smanjuje rizik od ateroskleroze. Sličnim mehanizmom djeluje i na stanice živčanog sustava gdje smanjuje nakupljanje  $\beta$ -amiloida nastalog pod utjecajem ROS, a time i nastanak i progresiju Alzheimerove bolesti (Omar, 2010).

Oleuropein također pokazuje snažnu antimikrobnu aktivnost u prisutnosti Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, pa čak i mikoplazmi, što se pripisuje njegovoj kateholskoj strukturi koja narušava integritet peptidoglikana u membrani bakterija. Moguće je da oleuropein uzrokuje direktnu stimulaciju fagocitoze mikroorganizama od strane imunološkog sustava. Posebno su zanimljiva istraživanja koja pokazuju da oleuropein inhibira rast bakterija *Helicobacter pylori* i meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Bisignano i sur., 1999). Dokazano je i djelovanje oleuropeina na virus hepatitisa, rotavirusa, respiratornog sincicijskog virusa, a istražuje se i primjena u liječenju virusa HIV-a (Barbaro i sur., 2014; Omar, 2010).

S druge strane, oleuropein u makrofagima aktiviranima lipopolisaharidom (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) inducira proizvodnju dušikovog oksida tako što dodatno aktivira inducibilnu sintazu dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) i time poboljšava funkcionalnost imunološkog sustava. Protuupalno djeluje i na način da inhibira aktivnost lipooksigenaze i proizvodnju leukotriena B<sub>4</sub> (Czerwińska i sur., 2011).

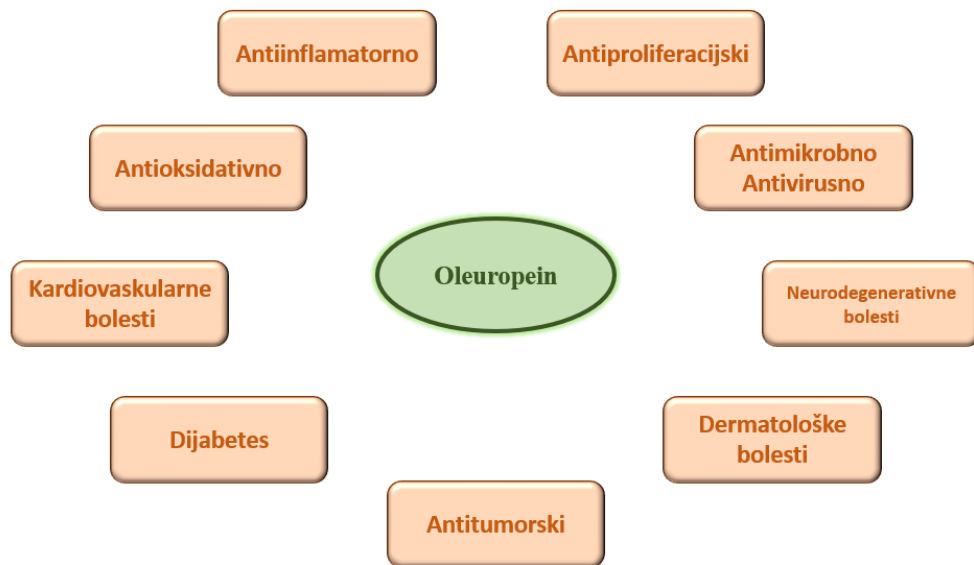
Funkcija proteasoma, kompleksa zaduženog za specifičnu razgradnju proteina u stanici, s godinama se smanjuje. To dovodi do nakupljanja nefunkcionalnih i štetnih proteina te starenja stanica. Istraživanja su potvrdila da kod stanica tretiranih oleuropeinom dolazi do povećanja aktivnosti proteasoma, a u kombinaciji s njegovom sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala i do znatnijeg produljenja životnog vijeka stanica. Istraživani su još i antidijabetički, vazodilatatorni, antiagregacijski, hipotenzivni, antireumatski, diuretici i antipiretski učinci oleuropeina gdje je njegova primjena vrlo obećavajuća (Omar, 2010).

Oleuropein i oleuropein aglikon imaju inhibitorno djelovanje na rast tumorskih stanica te potiču njihovu apoptozu. Kod stanica tumora debelog crijeva, oleuropein potiče proces apoptoze preko p53 proteina i smanjenje razine HIF-1 $\alpha$  (engl. *hypoxia inducible factor-1  $\alpha$* ) te usporedno smanjuje razinu upalnih markera i razinu oštećenja DNA u leukocitima (Cárdeno i sur., 2013). U kombinaciji s cisplatinom smanjuje proliferaciju stanica hepatocelularnog karcinoma (Sherif i Al-Gayyar, 2018). Kod staničnih linija karcinoma štitnjače oleuropein je



smanjio razine AKT i ERK fosforilacije tako inhibirajući dva važna signalna puta za stanično preživljavanje tumorskih stanica. Istraživana je primjena i kod raka prostate gdje oleuropein smanjuje motilitet tumorskih stanica blokiranjem o naponu ovisnih natrijevih kanala te kod raka pluća gdje oleuropein aktivira p38 MAPK signalni put koji dovodi do apoptoze stanica (Emma i sur., 2021). Oleuropein također pokazuje vrlo obećavajuće rezultate u terapiji HER2 (engl. *Human epidermal growth factor receptor 2*) pozitivnog raka dojke, a djeluje na način da smanjuje ekspresiju transmembranskih HER2 proteina te njihovu autofosforilaciju, a u konačnici proliferaciju tumorskih stanica raka dojke (Ruzzolini i sur., 2020). U terapiji karcinoma dojke koristi se trastuzumab, monoklonsko protutijelo koje se veže na HER2 receptore, no kod primjene često dolazi do rezistencije. Aglikon oleuropeina nadjačao je rezistenciju u *in vitro* uvjetima i tako ukazao na mogućnost sinergističkog djelovanja oleuropeina i trastuzumaba (Menendez i sur., 2007).

Provedena su brojna istraživanja o utjecaju oleuropeina na stanice melanoma. BRAF mutacija, prisutna u više od 50% melanoma, uzrokuje pretjeranu aktivaciju MAPK i PI3K signalnog puta u melanocitima i time nastanak i razvitak tumora. Nakon tretiranja stanica melanoma oleuropeinom, uočeno je smanjenje ekspresije fosforiliranih ERK (MAPK signalni put) i AKT (PI3K signalni put) molekula čime je smanjena proliferacija stanica (De Cicco i sur., 2022). Posebno je važno djelovanje na supresiju aktivnosti PI3K/AKT/mTOR puta u slučajevima kada se javlja rezistencija na BRAF inhibitore i dakarbazin (Ruzzolini i sur., 2018). Dokazano je da suprimira razvoj karcinoma inhibicijom ekspresije VEGF, MMP-2, MMP-9 i MMP-13 te redukcijom razine ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*, COX) (Omar, 2010). U drugom istraživanju, pokazana je smanjena ekspresija transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  koji je važan za regulaciju gena uključenu u motilitet stanica, njihovu adheziju i izlučivanje angiogenetskih citokina (Rishmawi i sur., 2022). Važna značajka tumorskih stanica je da umjesto procesa oksidativne fosforilacije, čak i u aerobnim uvjetima, koriste proces glikolize kao primarni izvor energije (Warburgov efekt) (Jiang, 2017). Primijenjen na stanice melanoma, oleuropein snižava stupanj glikolize u stanicama tako da smanjuje ekspresiju GLUT-1 (engl. *glucose transporter-1*), PKM2 (engl. *protein kinase isoform M2*) i MCT4 (engl. *monocarboxylate transporter-4*) što rezultira manjim unosom glukoze u stanice i njihovim smanjenim preživljenjem (Ruzzolini i sur., 2020).



Slika 4. Djelovanje oleuropeina.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Melanom je tumor koji ima vrlo visoku pojavnost u mlađim dobnim skupinama, a u zadnjih nekoliko desetljeća njegova incidencija ubrzano raste zbog čega postaje sve veći javnozdravstveni problem. Ukoliko se ne dijagnosticira i ne liječi u ranom stadiju, vrlo brzo metastazira te se time vjerojatnost izlječenja i oporavka iznimno smanjuje. Ako se tumorsko tkivo uspješno ne ukloni kirurškim zahvatom, ne preostaje mnogo terapijskih opcija na raspolaganju. Kod primjene imunoterapije odgovor većine pacijenata je ograničen, a kao nuspojave javljaju se hepatotoksičnost, dermatotoksičnost i endokrinopatije. Na ciljanu terapiju melanoma se vrlo brzo razvija rezistencija zbog čestih mutacija prisutnih kod melanomskih stanica. U terapiji je također prisutan problem generalne toksičnosti antitumorske terapije na zdrave stanice organizma.

Zbog nedovoljno efikasnih i potencijalno opasnih terapijskih opcija za liječenje melanoma, potrebno je istražiti alternativne terapijske puteve. Blagotvoran učinak maslinovog ulja i njegovih polifenolnih sastavnica na ljudsko zdravlje uočen je kroz povijest te je istraživana njegova primjena u različitim terapijskim područjima. Između ostalog, dokazan je učinak na smanjenje preživljenja tumorskih stanica HER+ raka dojke, kolorektalnog karcinoma, glioblastoma, hepatokarcinoma, karcinoma štitnjače, prostate, pluća, gušterače i melanoma.

Primjena polifenola iz masline, s naglaskom na oleuropeinu, u nekoliko je istraživanja ispitivana na staničnoj liniji A375 gdje su promatrani njegovi učinci u kombinaciji s drugom antitumorskom terapijom (dakarbazin, everolimus, vemurafenib, doksorubicin) te je dokazan sinergistički učinak u djelovanju s oleuropeinom koji ovisi o koncentraciji oleuropeina i vremenu izlaganja stanica ispitivanom uzorku.

U ovom diplomskom radu cilj je prikazati izolirani učinak ekstrakta lista masline na različite stanične linije u svrhu istraživanja potencijalne primjene navedenog ekstrakta kao potporne antitumorske terapije. Ekstrakt lista masline primijenjen je u različitim koncentracijama na stanice spontano imortaliziranih humanih keratinocita HaCaT, stanice humanog malignog melanoma A375 i na liniju A375 s visokom sposobnošću metastaziranja, A375M, te je praćen učinak ekstrakta na metaboličku aktivnost stanica.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. PRIREĐIVANJE EKSTRAKTA LISTA MASLINE

Ekstrakt lista masline ustupila je na korištenje izv. prof. Monika Barbarić sa Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Ekstrakt lista masline priređen je na način opisan u tekstu koji slijedi. Suhe jednogodišnje grančice masline s lišćem (*O. europaea*) sorte 'Rosinjola' (sinonim 'Rošinjola', 'Rovinježa') i 'Istarska bjelica' (sinonim 'Bianchera') iz ekološkog maslinika na lokaciji Južna Istra (Hrvatska) 44°58'23"N 13°51'03"E i 120 m nadmorske visine, skupljalo se više puta tijekom rezidbe masline od kraja ožujka do sredine svibnja 2022. Prilikom rezidbe masline stabala, jednogodišnje mladice ostavljene su dva do tri dana u masliniku na srednjoj dnevnoj temperaturi od 18 °C do najviše 29 °C. Zatim su prebačene u nadstrešnicu gdje su držane do početka srpnja 2022. godine u ambijentalnim uvjetima s prosječnom dnevnom temperaturom od 24 °C do 26 °C u hladu, zaštićene plastičnim mrežama. Početkom srpnja uzet je određeni dio uzoraka suhih grančica s lišćem, podijeljen i pohranjen na sobnoj temperaturi i 4 °C, tri mjeseca, do analize.

Polifenolni spojevi ekstrahirani su iz prethodno na zraku osušenog lišća masline prema postupku opisanom u literaturi Amidžić i sur., 2018 uz neke modifikacije. Izvagana količina praškastog (0,5 mm, veličine oka) biljnog materijala (2,50 – 4,00 g) dodana je u 50 mL etanola i smjesa je sonicirana 30 minuta pomoću ultrazvučne kupelji (Elma Transonic T570 HF = 320 W, Njemačka), uz održavanje temperature ispod 30 °C. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 4000 okretaja u minuti 30 minuta (Hettich centrifuga D-78532, Tuttlingen, Njemačka), a supernatant je sakupljen i koncentriran pomoću rotacijskog isparivača na temperaturi ispod 40 °C (Büchi Heating Bath B-490 , Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) do sušenja. Suhi ekstrakt lišća otopljen je u DMSO (100 mg/mL) i pohranjen na -20 °C. Neposredno prije upotrebe, razrijeđen je s medijem za rast stanica do odgovarajućih koncentracija.

## 3.2. STANIČNE LINIJE

Stanična linija spontano imortaliziranih humanih keratinocita HaCaT ([web.expasy.org](http://web.expasy.org)) ustupljena je za rad od prof. dr. sc. Jasmine Lovrić sa Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska. Ova je stanična linija originalno kupljena od Cell Line Services GmbH (Eppelheim, Njemačka). HaCaT stanična linija ima vrlo visoku sposobnost diferenciranja i proliferacije *in vitro*.

Tumorske stanične linije humanog melanoma A375 ([web.expasy.org](http://web.expasy.org)) te humanog melanoma s visokom sposobnošću metastaziranja, A375M ([web.expasy.org](http://web.expasy.org)) ustupljene su od dr. Nede Slade sa Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, a originalno su nabavljene od American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD).

Stanice su uzgajane u potpunom mediju za stanične kulture koji se sastoji od RPMI 1640, 2 mmol/L glutamina, 10%-tnog toplinski inaktiviranog fetalnog govedjeg seruma (*fetal bovine serum*, FBS), penicilina (100 IU/mL; 1 IU 67,7 µg/mL) i streptomicina (100 µg/mL) kako bi se spriječila kontaminacija bakterijama. Sve sastavnice potpunog medija za stanične kulture nabavljene su od Lonza, Basel, Švicarska. Kulture su čuvane u inkubatoru pri konstantnim uvjetima s 5% CO<sub>2</sub>, na 37°C i s 95% relativne vlažnosti zraka. Promatranjem pod invertnim mikroskopom utvrđeno je kada je postignuta 80-90%-tna konfluentnost tih adherirajućih stanica te su stanice tada rasađivane na način opisan u tekstu koji slijedi. Prvo se iz boca za uzgoj stanica uklanja medij iznad adheriranih stanica vakuum sisaljkom te ih se ispiru od zaostalog medija pomoću otopine PBS (engl. *phosphate buffered saline*). Nakon toga se dodaje 0,25% otopina tripsin-EDTA te se stanice inkubiraju 5 min pri uvjetima 5% CO<sub>2</sub>, na 37°C i 95% relativne vlažnosti zraka kako bi proteolitički enzim tripsin pokidao proteine koji sudjeluju u adheziji stanica na podlogu što za posljedicu ima odvajanje stanica od podloge. Odvajanje stanica potom se potvrđuje promatranjem pod invertnim mikroskopom, kojim se uočava da se stanice prilikom odvajanja od podloge zaokružuju i uzdižu. Proteolitičko djelovanje tripsina zaustavlja se dodatkom medija korištenog za uzgoj stanica. Zatim se stanice prenesu u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugiraju 10 min pri 200 g (Hettich centrifuga D-78532, Tuttlingen, Njemačka) na sobnoj temperaturi. Vakuum sisaljkom se ukloni nadsloj u epruveti, a talog stanica se resuspendira u 1 mL medija za uzgoj stanica te potom medijem razrijedi do željene koncentracije.

Stanice su u osmoj pasaži korištene za eksperiment. Stanice se broje u Bürkerovoj komorici uz pomoć tripsanskog plavila. U 10 µL suspenzije stanica dodaje se 10 µL 0,4% boje

tripansko plavilo (Lonza, Basel, Švicarska). 10  $\mu\text{L}$  ovog uzorka prenese se u Bürkerovu komoricu koja se promatra pod povećanjem od 400 puta na invertnom mikroskopu. Tripansko plavilo služi za detekciju živih stanica zbog toga što ga one izbacuju uz pomoć membranskih pumpi i ostaju nebojene, dok ga mrtve stanice ne mogu izbaciti pa se tripansko plavilo akumulira u mrtvim stanicama. Prilikom brojanja uzimaju se u obzir samo žive nebojene stanice.

Bürkerova komorica koristi se za manualno prebrojavanje stanica. Na sredini ima jažicu točno određenog volumena koja se napuni ispitivanim uzorkom te se uz pomoć iscrtane mreže na komorici izbroje vijabilne stanice. Broji se na način da se izbroje stanice u svakom kvadrantu zasebno, pa se zatim izračuna srednja vrijednost broja stanica po kvadrantu ( $\bar{x}$ ). Ukupan broj stanica u mililitru uzorka izračunava se po formuli:

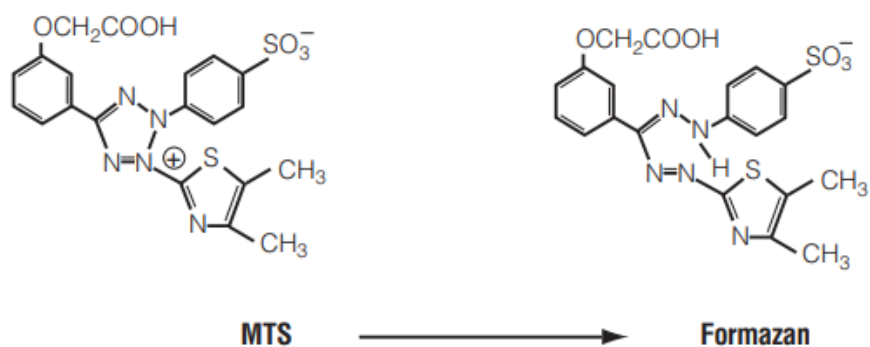
$$\text{Broj stanica/mL} = \bar{x} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 10^4$$

Na ovaj način određuje se koncentracija početne suspenzije stanica te se potom radi potrebno razrjeđenje.

### 3.3. TRETIRANJE STANIČNIH LINIJA EKSTRAKTOM LISTA MASLINE

Po 100  $\mu\text{L}$  svake stanične kulture stavljeno je na pločice za uzgoj stanica s 96 jažica. Stanične linije HaCaT i A375M nanese su na pločicu u koncentraciji  $4 \times 10^3$  stanica/jažica, a A375  $2 \times 10^3$  stanica/jažica, obzirom da je utvrđeno da ta stanična linija raste brže. Stanice su potom ostavljene 24 sata da adheriraju, a idući dan medij je uklonjen odsisavanjem te je dodan novi medij s ekstraktom lista masline u različitim koncentracijama. Ekstrakt lista za tretman je pripremljen tako da je originalno otopljen u 70  $\mu\text{L}$  DMSO te je serijski razrijeđen medijem za stanične kulture u koncentracijskom gradijentu od 6,25  $\mu\text{g/mL}$  do 400  $\mu\text{g/mL}$ . Kontrolne jažice sadržavale su redom medij bez stanica, stanice prikladnih staničnih kultura uzgajane u punom mediju te stanice prikladnih staničnih kultura uzgajane u punom mediju uz dodatak DMSO u koncentraciji 0,2%.

Stanice su sa ekstraktima inkubirane 48 sati prije nego je određivana biološka aktivnost. Biološka aktivnost staničnih linija nakon inkubacije s ekstraktom lista masline određena je uz pomoć CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, SAD). To je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje broja vijabilnih stanica kod ispitivanja proliferacije ili citotoksičnosti. Temelji se na sposobnosti živih stanica da prevedu tetrazolijevu sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) (*MTS*) u obojeni formazan, odnosno redukciji *MTS*-a kao rezultat aktivnosti sukcinat dehidrogenaze u vijabilnim stanicama. Navedena reakcija uzrokuje promjenu boje žute soli u ljubičasti formazan koji je topljiv u mediju za stanične kulture, nakon čega je moguće spektrofotometrijsko mjerenje intenziteta boje. Intenzitet je proporcionalan metaboličkoj aktivnosti stanica, a time i broju stanica u uzorku.



Slika 5. Strukture tetrazolijeve soli MTS i produkta redukcije formazana (preuzeto i prilagođeno iz CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB245).

Nakon inkubacije s ekstraktima medij je uklonjen odsisavanjem te je dodano 75  $\mu\text{L}$  čistog medija i 15  $\mu\text{L}$  MTS-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) koji su prethodno pomiješani. Stanice su zatim ponovno inkubirane u tami tijekom 2 h nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 490 nm korištenjem čitača mikrotitarskih pločica Victor2-1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Yokohama, Japan). Negativna kontrola (medij bez stanica) korištena je kao slijepa proba i vrijednost apsorbancije te kontrole oduzimana je od vrijednosti apsorbancije svih ostalih uzoraka. Svi eksperimenti provedeni su u oktaplikatu.

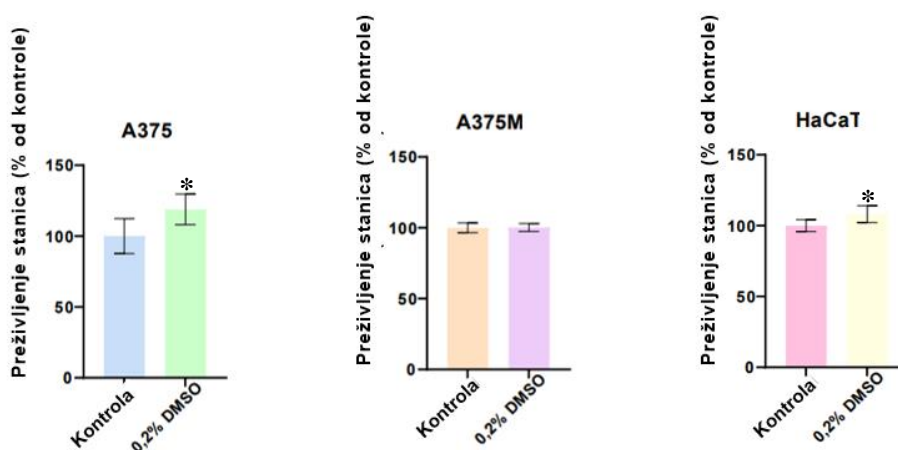


### 3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Eksperimenti su provedeni u 3 serije. Izmjerene vrijednosti apsorbancije za kontrolne i tretirane uzorke korigirane su za apsorbanciju samog medija. Odbačena je po jedna najniža i najviša vrijednost iz svake skupine čime je dobivena „Trimmed mean“ vrijednost oktaplikata, a potom su vrijednosti dobivene tretmanom stavljene u omjer s prosječnom vrijednosti kontrolne, netretirane skupine. Rezultati dobiveni pokusom analizirani su uz pomoć programa GraphPad Prism, verzija 10.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, SAD). Provjereno je jesu li vrijednosti unutar tretmanskih skupina raspodijeljene po normalnoj razdiobi korištenjem Shapiro-Wilk testa i Kolmogorov-Smirnov testa, te je utvrđeno da je prisutna normalna razdioba. Provedena je statistička analiza korištenjem dvosmjerne analize varijance (engl. *two-way ANOVA, Analysis of Variance*), a korišten je i test za višestruke usporedbe kako bi se utvrdilo točno koje tretmanske skupine međusobno pokazuju statistički značajnu promjenu. Podaci dobiveni analizom prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Za statistički značajnu razliku uzeta je vrijednost  $p < 0,05$ . Također su određene  $IC_{50}$  vrijednosti, tj. koncentracije primjenjenog ekstrakta lista masline koje smanjuju metaboličku aktivnost stanica za 50% vrijednosti. Vrijednost  $IC_{50}$  određena je korištenjem nelinearne regresijske krivulje te su u ovom slučaju rezultati prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Metabolička aktivnost staničnih linija A375 (nasađenih u koncentraciji  $2 \times 10^3$  stanica/jažica), A375M (nasađenih u koncentraciji  $4 \times 10^3$  stanica/jažica) i HaCaT (nasađenih u koncentraciji  $4 \times 10^3$  stanica/jažica) nakon 48-satne izloženosti ekstraktu lista masline određena je uz pomoć MTS kolorimetrijske metode. Za otapanje ekstrakta lista masline kao otapalo korišten je DMSO, a po otapanju su konačne koncentracije priređene razrjeđivanjem u punom mediju. Zbog važnosti ispravne interpretacije rezultata, provjeren je utjecaj najveće primijenjene koncentracije DMSO-a na metaboličku aktivnost staničnih linija korištenih u eksperimentu (Slika 6).



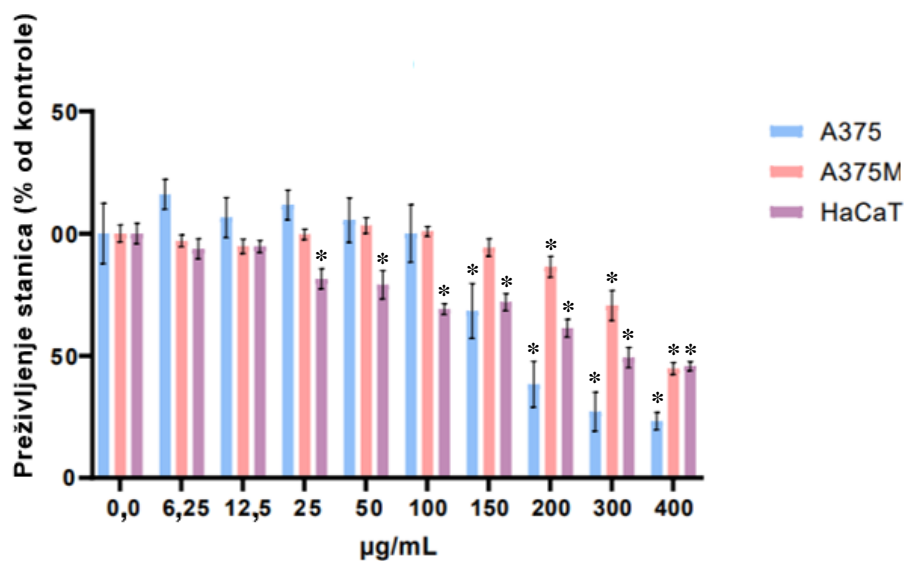
Slika 6. Stanične linije A375, A375M i HaCaT nakon izloženosti DMSO-u tijekom 48 sati.

Metabolička aktivnost mjerena je primjenom CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike između tretiranih stanica i kontrolnih (netretiranih) stanica pojedine stanične linije.

Metabolička aktivnost stanica izloženih DMSO-u mjerena je MTS metodom. Rezultati eksperimenta provedenih u heksaplikatu izraženi su kao srednja vrijednost postotka vijabilnosti stanica uspoređenih s netretiranim stanicama  $\pm$  SD. Kod stanične linije A375M ne postoji statistički značajna razlika između kontrolnih stanica i stanica tretiranih DMSO-om. Stanične linije A375 i HaCaT pokazuju statistički značajnu razliku ( $p=0,0186$ ,  $p=0,0221$ ) u vijabilnosti između netretiranih kontrolnih i stanica tretiranih DMSO-om. Linije A375 i HaCaT pokazale su nešto povećanu metaboličku aktivnost nakon izloženosti DMSO-u. Dobiveno statistički

značajno povećanje metaboličke aktivnosti pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji DMSO od 0,2% nije u skladu s literaturno poznatim podacima, uključujući i podatke dobivene u istom laboratoriju u kojem su ovi eksperimenti provedeni (Kugić i sur., 2022), kod kojih nije utvrđena statistički značajna promjena metaboličke aktivnosti. Obje je činjenice potrebno uzeti u obzir prilikom razmatranja učinka ekstrakta lista masline na navedene stanične linije.

Utjecaj ekstrakta lista masline na metaboličku aktivnost staničnih linija A375, A375M i HaCaT je izmjeren MTS metodom. Ekstrakt otopljen u DMSO je razrijeđen u punom mediju, te je na stanične linije A375, A375M i HaCaT nanesen redom u koncentracijama: 6,25, 12,50, 25,00, 50,00, 100,00, 150,00, 200,00, 300,00 i 400,00  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultati eksperimenta provedenih u oktaplikatu izraženi su kao srednja vrijednost postotka vijabilnosti stanica izraženih u odnosu na netretirane stanice, a korigiranih u odnosu na slijepu probu  $\pm$  SD (Slika 7).



Slika 7. Učinak različitih koncentracija ekstrakta lista masline na staničnu metaboličku aktivnost staničnih linija A375, A375M i HaCaT. Stanice su izložene djelovanju različitih koncentracija ekstrakta lista masline tijekom 48 sati. Metabolička aktivnost mjerena je primjenom CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike između tretiranih stanica i kontrolnih (netretiranih) stanica pojedine stanične linije.

Ekstrakt lista masline uzrokovao je smanjenje metaboličke aktivnosti stanica stanične linije A375 ovisno o primijenjenoj dozi (Slika 7, plavi stupci). Značajan učinak ekstrakta uočen je na toj staničnoj liniji pri koncentracijama od 150  $\mu\text{g/mL}$  i većima. Izloženost najvećoj ispitivanoj koncentraciji pokazala je, očekivano, najsnažniji učinak na metaboličku aktivnost stanica. Izračun vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  za staničnu liniju A375 iznosi  $200,142 \pm 9,162 \mu\text{g/mL}$  (Slika 8, Tablica 1).

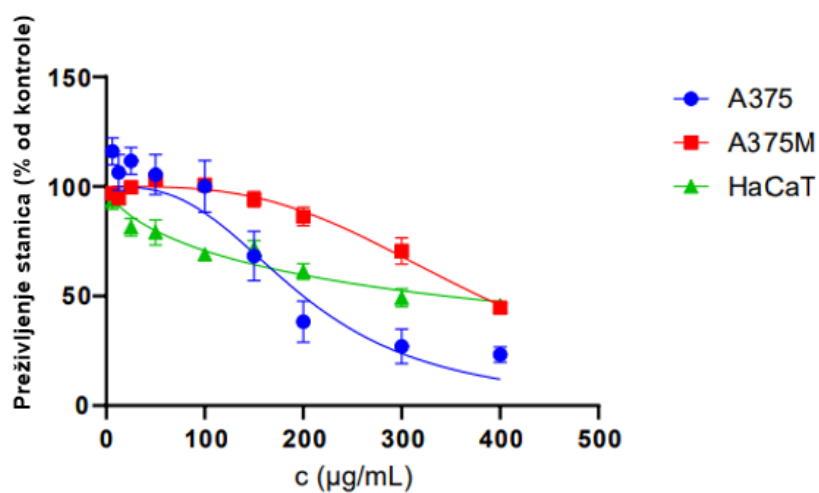
Krivulja ovisna o dozi prisutna je i kod stanične linije A375M (Slika 7, ružičasti stupci), no sa znatno manjim toksičnim efektom u usporedbi sa staničnom linijom A375 što upućuje na manju učinkovitost ekstrakta na inhibiciju metaboličke aktivnosti metastatskih tumorskih stanica. Ekstrakt lista masline ovdje ispoljava statistički značajan učinak pri koncentraciji od 200  $\mu\text{g/mL}$  i više. Izračun vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  za staničnu liniju A375M iznosi  $379,95 \pm 6,807 \mu\text{g/mL}$  (Slika 8, Tablica 1).

Stanice stanične linije humanih keratinocita HaCaT već pri koncentraciji 25  $\mu\text{g/mL}$  pa naviše mijenjaju, preciznije – smanjuju, svoju metaboličku aktivnost (Slika 7, ljubičasti stupci). Izračun vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  za staničnu liniju HaCaT iznosi  $345,374 \pm 23,079 \mu\text{g/mL}$  (Slika 8, Tablica 1).

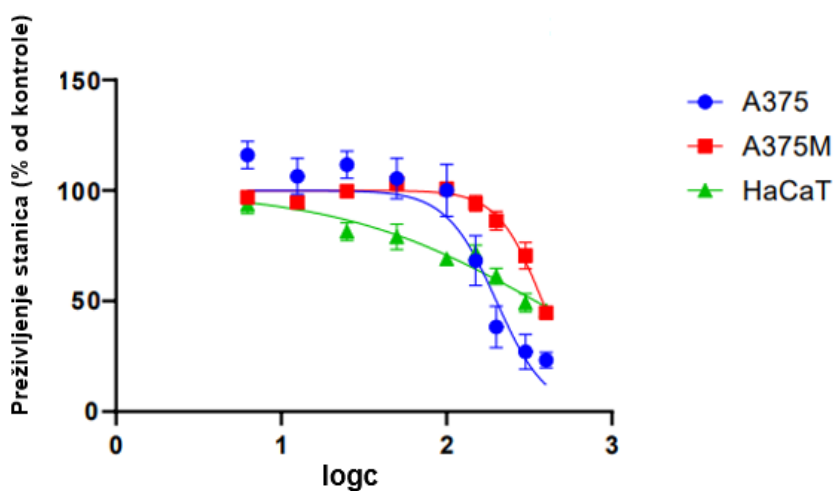
Program za obradu podataka korišten u ovom radu, GraphPad Prism, verzija 10.0.2., omogućava unos podataka ovisnosti izračunate vijabilnosti u odnosu na primijenjene koncentracije za izračun vrijednosti  $\text{IC}_{50}$ , kao što je prikazano na slici 8. Uobičajeno je, međutim, taj graf prikazivati kao ovisnost izračunate vijabilnosti u odnosu na logaritam primijenjene koncentracije (Slika 9). U takvom prikazu, klasična sigmoidalna krivulja koja omogućava relativno precizan izračun vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  uočljiva je samo kod stanica stanične linije A375. Druge dvije korištene stanične linije imaju drukčiji obrazac odgovora na primijenjene koncentracije ekstrakta masline, a izračun  $\text{IC}_{50}$  valja oprezno tumačiti, obzirom da nije postignuta dovoljna razina toksičnosti koja bi omogućila izračun s većom pouzdanošću. Uočljiv je također zanimljiv fenomen, a to je da stanična linija HaCaT, premda smanjenjem metaboličke aktivnosti reagira i na niže primijenjene koncentracije od stanične linije A375, pri većim primijenjenim koncentracijama pokazuje se manje osjetljivom na ekstrakt lista masline od stanica stanične linije A375. Stanice stanične linije A375M pokazuju najmanju osjetljivost na toksičan učinak primijenjenog ekstrakta lista masline, a njihova otpornost vjerojatno je posljedica brojnih mutacija koje te stanice posjeduju, kao što su primjerice mutacije u genima za različite signalne molekule, a koje su odgovorne i za njihov veliki metastatski potencijal.

Tablica 1. Biološka aktivnost ekstrakta lista masline na stanične linije A375, A375M i HaCaT izražena kao  $IC_{50} \pm SEM$ .

	A375	A375M	HaCaT
$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$200,142 \pm 9,162$	$379,95 \pm 6,807$	$345,374 \pm 23,079$



Slika 8. Ovisnost preživljenja stanica staničnih linija A375, A375M i HaCaT o koncentraciji ( $\mu\text{g/mL}$ ) ekstrakta lista masline.



Slika 9. Ovisnost preživljenja stanica staničnih linija A375, A375M i HaCaT o logc ekstrakta lista masline.

Molekularne mehanizme koji leže u pozadini opaženih učinaka tek treba razjasniti, a što uključuje istraživanja sastava korištenih ekstrakata te učinka pojedinačnih tvari od kojih se ekstrakt sastoji na različite stanične linije, kao i učinak različitih kombinacija tih pojedinačnih tvari. Je li za inhibitoran učinak ekstrakta lista masline na tumorske stanice odgovoran, u većoj ili manjoj mjeri, oleuropein za koji je već poznato da ima blagotvoran učinak u tretiranju tumorskih melanomskih stanica (De Cicco i sur., 2022; Rishmawi i sur., 2022; Ruzzolini i sur., 2020; Omar, 2010) ili neke druge molekule, zasad možemo samo nagađati. Uz to, ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica primjenom MTS testa je tek prvi u nizu eksperimentalnih postupaka koje je potrebno provesti kako bi se utvrdilo koje točno molekule i signalni putevi su odgovorni za različiti odgovor pojedinih vrsta stanica na isti tretman. Rezultati ovog istraživanja daju naznaku da ekstrakti lista masline imaju potencijal biti korišteni kao pomoćne tvari u tretiranju melanomskih stanica.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih ispitivanjem primjene ekstrakta lista masline u različitim koncentracijama na metabolizam staničnih linija A375, A375M i HaCaT dokazano je da ekstrakt ima značajan utjecaj na vijabilnost stanica, smanjujući njihovu metaboličku aktivnost.

Učinak ekstrakta ovisi o vrsti staničnih linija korištenih u eksperimentu i o primijenjenoj koncentraciji ekstrakta. Najpotentniji učinak ostvaren je na melanomskoj staničnoj liniji A375, zatim na liniji humanih keratinocita HaCaT, a najslabiji na melanomskoj staničnoj liniji sa sposobnošću metastaziranja A375M.

Rezultati ukazuju na potencijalnu mogućnost korištenja ekstrakta lista masline u antitumorskoj terapiji melanoma. No, potreban je izniman oprez pri primjeni visokih koncentracija ekstrakta s obzirom da uz smanjenu vijabilnost melanomskih stanica, uzrokuje i smanjenu vijabilnost humanih keratinocita. Na metastatske melanomske stanice nema učinak pri koncentracijama koje su toksične za zdrave keratinocite.

Potrebne su daljnje studije detaljnog mehanizma djelovanja sastavnica ekstrakta lista masline na tumorske i netumorske stanice, točnog sastava ekstrakta i načina na koji sastavnice pojedinačno ili u kombinacijama djeluju na stanice melanoma.

## 6. LITERATURA

A-375 (RRID:CVCL\_0132), [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0132](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0132), pristupljeno 20.09.2023.

A375-M (RRID:CVCL\_B222), [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_B222](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_B222), pristupljeno 20.09.2023.

Amidžić M, Marić P, Fumić B, Petlevski R, Bljajić K, Končić MZ. Oleuropein-Rich Olive Leaf Extracts May Ameliorate Consequences of Glucose-Induced Oxidative Stress in Hep G2 Cells. *Nat. Prod. Commun.*, 2018, 13, 657-660.

Banjini M. Melanom. Sarajevo, Udruženje Onkologa u Bosni i Hercegovini, 2018, str. 138-154, 192-288.

Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci*, 2014, 15, 18508-18524.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 2007, 12, 1679-1719.

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, 51, 971-974.

Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcón de la Lastra C. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nutr Cancer*, 2013, 65, 147-156.

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB245, Promega Corporation.



Chemical Characteristics, <https://www.oliveoilsource.com>, pristupljeno 10.06.2023.

Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23, 129-135.

Conforti C, Zalaudek I. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatol Pract Concept*, 2021, 11, e2021161S.

Cutaneous Melanoma Treatment & Management: Medical Care, Surgical care, Consultations, 2019., <https://www.medscape.com>, pristupljeno 06.06.2023.

Czerwińska M, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, 2011, 131, 940–947.

Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20, 1366-1379.

De Cicco P, Ercolano G, Tenore GC, Ianaro A. Olive leaf extract inhibits metastatic melanoma spread through suppression of epithelial to mesenchymal transition. *Pjyther Res*, 2022, 36, 4002-4013.

Emma MR, Augello G, Di Stefano V, Azzolina A, Giannitrapani L, Montalto G, Cervello M, Cusimano A. Potential Uses of Olive Oil Secoiridoids for the Prevention and Treatment of Cancer: A Narrative Review of Preclinical Studies. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 1234.

Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J. Nutr.*, 2008, 138, 1411-1416.

HaCaT (RRID:CVCL\_0038), [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0038](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0038), pristupljeno 20.09.2023.

Heistein JB, Acharya U, Mukkamalla SKR. Malignant Melanoma. U: StatPearls. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2023.

Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis*, 2017, 4, 25-27.

Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ, Prieto MA, Simal-Gandara J. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 2020, 9, 1014.

Kabaran S. Olive Oil: Antioxidant Compounds and Their Potential Effects over Health. U: Functional Foods. Lagouri V, urednik, IntechOpen, 2019.

Kugić A, Dabelić S, Jakobušić Brala C, Dabelić N, Barbarić M. Extra Virgin Olive Oil Secoiridoids Modulate the Metabolic Activity of Dacarbazine Pre-Treated and Treatment-Naive Melanoma Cells. *Molecules*, 2022, 27, 3310.

Lamy S, Ben Saad A, Zgheib A, Annabi B. Olive oil compounds inhibit the paracrine regulation of TNF- $\alpha$ -induced endo-thelial cell migration through reduced glioblastoma cell cyclooxygenase-2 expression. *J. Nutr. Biochem.*, 2016, 27, 136-145.

Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*, 2018, 52, 1071-1080.

Lopes J, Rodrigues CMP, Gaspar MM, Reis CP. Melanoma Management: From Epidemiology to Treatment and Latest Advances. *Cancers*, 2022, 14, 4652.

Lugović-Mihić L, Česić D, Vuković P, Novak Bilić G, Šitum M, Špoljar S. Melanoma Development: Current Knowledge on Melanoma Pathogenesis. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2019, 27, 163-168.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, GarciaVillalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2007, 7, 80.

Moral R, Escrich E. Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. *Molecules*, 2022, 27, 477.

Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103, 13765-13770.

Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, Calorini L. Oleuropein, a Bioactive Compound from *Olea europaea* L., as a Potential Preventive and Therapeutic Agent in Non-Communicable Diseases. *Antioxidants*, 2019, 8, 578.

Oleuropein 32619-42-4, <https://www.tcichemicals.com>, pristupljeno 10.09.2023.

Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*, 2010, 78, 133-154.

Pejović J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Maslinovo ulje – sastav i biološka aktivnost fenolnih spojeva. *Farmaceutski glasnik*, 2014, 70, 69-86.

Rishmawi S, Haddad F, Dokmak G, Karaman R. A Comprehensive Review on the Anti-Cancer Effects of Oleuropein. *Life (Basel)*, 2022, 12, 1140.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, Bernini R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 2019, 11, 1776.

Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrotta R, Libra M, McCubrey JA, Spandidos DA, Stivala F, Malaponte G. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol*, 2009, 34, 1481-1489.

Ruzzolini J, Peppicelli S, Andreucci E, Bianchini F, Scardigli A, Romani A, Ia Marca G, Nediani C, Calorini L. Oleuropein, the Main Polyphenol of *Olea europaea* Leaf Extract, Has an Anti-Cancer Effect on Human BRAF Melanoma Cells and Potentiates the Cytotoxicity of Current Chemotherapies. *Nutrients*, 2018, 10, 1950.

Ruzzolini J, Peppicelli S, Bianchini F, Andreucci E, Urciuoli S, Romani A, Tortora K, Caderni G, Nediani C, Calorini L. Cancer Glycolytic Dependence as a New Target of Olive Leaf Extract. *Cancers (Basel)*, 2020, 12, 317.

Santourlidis S, Schulz WA, Araúzo-Bravo MJ, Gerovska D, Ott P, Bendhack ML, Hassan M, Erichsen L. Epigenetics in the Diagnosis and Therapy of Malignant Melanoma. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 1531.

Sherif IO, Al-Gayyar MMH. Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life Sci*, 2018, 198, 87-93.

Spagnuolo C, Moccia S, Tedesco I, Crescente G, Volpe MG, Russo M, Russo GL. Phenolic Extract from Extra Virgin Olive Oil Induces Different Anti-Proliferative Pathways in Human Bladder Cancer Cell Lines. *Nutrients*, 2022, 15, 182.

Strashilov S, Yordanov A. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 6395.

Šitum M. Melanom, udžbenik i atlas. Zagreb, Medicinska naklada, 2016. str. 5-9, 15-31, 232-236.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 2005, 18, 98.

Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*, 2005, 44, 121-127.

Wang YF, Jiang CC, Kiejda KA, Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clin Cancer Res*, 2007, 13, 4934–4942.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Zbog nedovoljno efikasnih i opasnih terapijskih opcija za liječenje melanoma, potrebno je istražiti potencijalne alternativne terapijske pristupe. Cilj je ovoga rada ispitati kako primjena ekstrakta lista masline (*O. europaea*) sorte 'Rosinjola' (sinonim 'Rošinjola', 'Rovinježa') i 'Istarska bjelica' (sinonim 'Bianchera') utječe na metabolizam i preživljavanje humanih stanica staničnih linija melanoma A375, melanoma s visokom sposobnošću metastaziranja A375M i spontano imortaliziranih keratinocita HaCaT. Za određivanje metaboličke aktivnosti stanica nakon 48-satne izloženosti različitim koncentracijama ekstrakta lista masline korišten je kolorimetrijski MTS test CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Rezultati su obrađeni prikladnim statističkim metodama pomoću programa GraphPad Prism, verzija 10.0.2 te je izračunata vrijednost IC<sub>50</sub>. Utvrđeno je da jačina i obrazac učinka ovisi o tipu stanične linije i primijenjenoj koncentraciji ekstrakta. Najintenzivnije djelovanje uočeno je kod stanične linije A375, zatim kod HaCaT, a najslabije kod stanične linije A375M. Daljnja su istraživanja potrebna kako bi se utvrdilo koje su sastavnice ekstrakta odgovorne za uočeni učinak i kojim se molekularnim mehanizmima taj učinak ostvaruje.

Due to insufficiently effective and dangerous therapeutic options for the treatment of melanoma, it is necessary to explore potential alternative therapeutic approaches. The aim of this thesis is to examine how the application of olive leaf extract (*O. europaea*) of the variety 'Rosinjola' (synonymous to 'Rošinjola', 'Rovinježa') and 'Istarska bjelica' (synonymous to 'Bianchera') affects the metabolism and survival of human melanoma cell line A375, highly metastatic human melanoma cell line A375M and spontaneously immortalized keratinocytes cell line HaCaT. For determining the metabolic activity of cells after a 48-hour exposure to different concentrations of olive leaf extract, the colorimetric MTS test CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay was used. The results were analyzed using the appropriate statistical methods within the GraphPad Prism program, version 10.0.2, and the IC<sub>50</sub> value was calculated. The strength and pattern of the effect was found to depend on the type of cell line used and the applied concentration of the extract. The most intense effect was observed with the A375 cell line, followed by HaCaT, and the weakest with the A375M cell line. Further research is needed to determine which components of the extract are responsible for the observed effect and by which molecular mechanisms is this effect achieved.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UČINAK EKSTRAKTA LISTA MASLINE NA METABOLIČKU AKTIVNOST STANICA HUMANIH STANIČNIH LINIJA MELANOMA A375 I A375M

Ivona Brajdić

#### SAŽETAK

Zbog nedovoljno efikasnih i opasnih terapijskih opcija za liječenje melanoma, potrebno je istražiti potencijalne alternativne terapijske pristupe. Cilj je ovoga rada ispitati kako primjena ekstrakta lista masline (*O. europaea*) sorte 'Rosinjola' (sinonim 'Rošinjola', 'Rovinježa') i 'Istarska bjelica' (sinonim 'Bianchera') utječe na metabolizam i preživljavanje humanih stanica staničnih linija melanoma A375, melanoma s visokom sposobnošću metastaziranja A375M i spontano imortaliziranih keratinocita HaCaT. Za određivanje metaboličke aktivnosti stanica nakon 48-satne izloženosti različitim koncentracijama ekstrakta lista masline korišten je kolorimetrijski MTS test CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Rezultati su obrađeni prikladnim statističkim metodama pomoću programa GraphPad Prism, verzija 10.0.2 te je izračunata vrijednost IC<sub>50</sub>. Utvrđeno je da jačina i obrazac učinka ovisi o tipu stanične linije i primijenjenoj koncentraciji ekstrakta. Najintenzivnije djelovanje uočeno je kod stanične linije A375, zatim kod HaCaT, a najslabije kod stanične linije A375M. Daljnja su istraživanja potrebna kako bi se utvrdilo koje su sastavnice ekstrakta odgovorne za uočeni učinak i kojim se molekularnim mehanizmima taj učinak ostvaruje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 34 stranice, 9 grafičkih prikaza, 1 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ekstrakt lista masline, melanom, keratinociti, kolorimetrijski MTS test

Mentor: **Dr. sc. Sanja Dabelić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanja Dabelić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Domagoj Kifer**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 30. listopada 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THE EFFECT OF OLIVE LEAF EXTRACT ON THE METABOLIC ACTIVITY OF HUMAN MELANOMA CELL LINES A375 AND A375M

Ivona Brajdić

#### SUMMARY

Due to insufficiently effective and dangerous therapeutic options for the treatment of melanoma, it is necessary to explore potential alternative therapeutic approaches. The aim of this thesis is to examine how the application of olive leaf extract (*O. europaea*) of the variety 'Rosinjola' (synonymous to 'Rošinjola', 'Rovinježa') and 'Istarska bjelica' (synonymous to 'Bianchera') affects the metabolism and survival of human melanoma cell line A375, highly metastatic human melanoma cell line A375M and spontaneously immortalized keratinocytes cell line HaCaT. For determining the metabolic activity of cells after a 48-hour exposure to different concentrations of olive leaf extract, the colorimetric MTS test CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay was used. The results were analyzed using the appropriate statistical methods within the GraphPad Prism program, version 10.0.2, and the  $IC_{50}$  value was calculated. The strength and pattern of the effect was found to depend on the type of cell line used and the applied concentration of the extract. The most intense effect was observed with the A375 cell line, followed by HaCaT, and the weakest with the A375M cell line. Further research is needed to determine which components of the extract are responsible for the observed effect and by which molecular mechanisms is this effect achieved.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 34 pages, 9 figures, 1 table and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive leaf extract, melanoma, keratinocytes, colorimetric MTS test

Mentor: **Sanja Dabelić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sanja Dabelić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Domagoj Kifer, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 30th October 2023.