Antitumorsko djelovanje biljke Camellia sinensis

Jurić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:567621

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ANTITUMORSKO DJELOVANJE BILJKE *CAMELLIA SINENSIS*

ANTITUMOR ACTIVITY OF PLANT *CAMELLIA SINENSIS*

SEMINARSKI RAD

Ivana Jurić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1. Uvod 2
2. Tumori 6
2.1. Antitumorska djelovanja ljekovite biljke *Camellia sinensis* 7
3. Kemoprevencijski i kemoterapijski učinci zelenog i bijelog čaja čaja na tumore 8
3.1. Djelovanje katehina zelenog čaja EGCG na MCF-7/BOS tumorske stanice dojke 8
3.2. Djelovanje ekstrakta zelenog čaja na ljudske tumorske stanice grkljana 13
3.2.1. Citotoksični učinak katehina i ekstrakta zelenog čaja 14
3.2.2. Peroksidacija lipida 15
3.2.3. Analiza rezultata metodom *Comet assay* ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.3. Djelovanje bijelog čaja na proliferaciju stanica raka debelog crijeva HT-29 16
3.3.1. Ukupni sadržaj fenola i flavonoida 16
3.3.2. Antiproliferacijski učinak ekstrakta bijelog čaja na tumorske stanice *in vitro* 17
4. Zaključak 19
5. Literatura 20
6. Sažetak 22
7. Summery 23

1. Uvod

Camellia sinensis je biljka iz obitelji *Theaceae* kultivirana u trideset zemalja diljem svijeta, a spada u zimzeleno grmlje ili mala stabla čiji se listovi i pupoljci koriste u proizvodnji čaja. Kultivirane takse čine tri glavna prirodna hibrida: *C. sinensis (L.) O. Kuntze* ili kineski tip (Slika 1.), *C. Assam (Masters)* ili azijski tip (Slika 2.) i *C. assay sub spp lasiocalyx* (Planchon ex Watt.) ili južna vrsta. Radi se o zimzelenim, višegodišnjim biljkama koje najčešće mogu narasti i do 15 metara. Međutim, u kultiviranom stanju, visina grmova, koji služe za berbu listova, je od 60 do 100 cm. Takvi grmoliki oblici mogu biti postojani i do 100 godina te uspješno korišteni za proizvodnju čajeva. Cvjetovi su im bijele boje te se mogu nalaziti pojedinačno ili u parovim na izdancima. Plodovi su zelene boje s dvije do tri sjemenke iz kojih počinje klijati grmolika biljka nakon 5-6 godina od zasađivanja. List je glavni kriterij po kojem se mogu klasificirati. Ukratko, azijski tip ima najveće lišće, kineski ima najsitniju vrstu lišća dok je kambodni ili južni tip lišća veličinom između azijskog i kineskog (Mondal i sur. 2004.).



Slika 1. Grmlje biljke čajevca *Camellia sinensis (L.) O. Kuntze* (https://herbologymanchester.wordpress.com/tag/camellia-sinensis/)



Slika 2. Nisko stablo biljke čajevca *Camellia Assam (Masters)* (http://articles.bannacha.com/index.php?article17/qiaomu-and-guanmu)

Postoje različite vrste čaja, ovisno o biljnim vrstama, zemljopisnom podrijetlu i obradi. Ukoliko ih se promatra s obzirom na "fermentaciju", mogu se svrstati u tri glavne skupine: nefermentirani (zeleni i bijeli čaj), djelomično fermentirani (oolong čaj) i potpuno fermentirani (crni čaj) (Slika 3.). Iako se ovaj postupak često pogrešno naziva fermentacija, najprikladniji pojam je oksidacija (često praćena polimerizacijom), što znači izlaganje zraku, i reakcija katalizirana enzimom polifenol oksidazom. Za proizvodnju zelenog čaja, listovi se prešaju i uparavaju kako bi se smanjila oksidacija i inaktivirala polifenol oksidaza prije sušenja. U proizvodnji crnog čaja, nakon što se listovi isprešaju, dolazi do narušavanja stanične raspodjele i fenolni spojevi se dovode u dodir s polifenol oksidazama, podvrgavaju se oksidaciji 90-120 minuta. Oolong čaj se proizvodi kraćim "fermentacijskim" razdobljem od crnog čaja i ima okus i boju između zelenog i crnog čaja. Bijeli čaj pripremljen je iz vrlo mladih listova ili pupova prekrivenih sitnim, srebrnim dlačicama koje se javljaju samo jednom godišnje u rano proljeće. U proizvodnji bijelog čaja, biljni materijali se isparavaju i odmah se suše nakon branja kako bi se spriječilo oksidiranje, dajući mu lagani i nježni okus. To je jedan od manje proučavanih čajeva, ali njegov okus je više prihvaćen u Europi od okusa zelenog čaja. Čaj je, uz vodu, jedan od najraširenijih napitaka na svijetu. Ova je popularnost vjerojatno povezana sa specifičnim okusom čajeva, relativno niskom maloprodajnom cijenom i potencijalnim zdravstvenim prednostima. Unatoč tome što se čaj u velikoj mjeri pije zbog užitka, njegovi ljekoviti učinci su također široko istraživani, imaju dugu, bogatu povijest s prvim referencama prije gotovo 5.000 godina (Dias i sur. 2013.).

Iako se potrošnja čaja u zdravstvene svrhe koristi od davnina, znanstvena istraživanja ovog napitka i njegovih sastojaka u tijeku su manje od tri desetljeća. Čaj sadrži više bioaktivnih spojeva za koje se vjeruje da imaju širok raspon fizioloških svojstava. Osim šta mogu imati ulogu stimulansa i antidepresiva, sudjeluju u sprječavanju i liječenju raznih bolesti djelujući protuupalno, antioksidirajuće, antiaterosklerotski, antihipertenzivno, antiinfektivno, nekoliko sastojaka ima antimutagene, antikarcinogene i antitumorske efekte. Ujedno je velika primjena čajeva i njihovih sastojaka kao antimikrobnih, hipolipidemskih, hipokolesterolemičnih, neuroprotektivnihi antidijabetičnih sredstva, gdje je u nekoliko studija poboljšan imuni odgovor korištenjem istih. Unatoč tome što su mnogi od tih fizioloških mehanizama povezani s kemijskim svojstvima polifenola i njihovim antioksidativnim učincima, i unatoč brojnim podacima o fenolnim sastojcima, antioksidativnom djelovanju i poboljšanim efekta zelenog i crnog čaja na ljudsko zdravlje, korišenje čajeva biljke *Cmellia sinensis* i određenih kemijskih sastojaka i dalje je kontroverzno (Dias i sur. 2013.). Stoga se danas najviše istraživanja bazira upravo na korištenju ljekovitog bilja u svrhu antikarcinogenog djelovanja s obzirom da za niti jednu vrsu tumora ni dan danas nije pronađen jedinstven i apsolutno učinkovit lijek. Specifične biljke štite tijelo od raka pojačavanjem detoksikacijske funkcije tijela. Poznati su određeni biološki modifikatori, izolirani iz bilja, koji inhibiraju rast tumora djelujući na aktivnosti specifičnih hormona i enzima dok neke biljke smanjuju toksične nuspojave kemoterapije i radioterapije. Razumijevajući kompleksne sinergističke interakcija različitih sastojaka antikancerogenih biljaka, biljna formula može biti dizajnirana tako da napadne kancerogene stanice bez da oštećuje normalne. Mnogi sastojci biljka također su značajan izvor sintetiskih i biljnih lijekova. Dosad su farmaceutske tvrtke istražile više od 25 000 biljaka u svrhu dobivanja lijeka za borbu protiv različitih vrsta rakova. Baš kao što su tumori proizvod poremećaja u tijelu, tako specifične biljke imaju sposobnost da svojim kemijskim spojevima isprave takve poremećaje te uspješno kontroliraju mnoge tumore. Tako je biljka čajevca *Camellia sinensis* samo jedna od vrlo značajnih ljekovitih biljaka (Tablica 1.) (Sakarkar i Deshmukh 2011.). Svrha ovog pregleda je okupiti korisne znanstvene informacije o svojstvima bijelog i zelenog čaja biljke *Camellia sinensis* u svrhu njihovog antitumorskog djelovanja.

	Ime biljke	Porodica	Aktivne komonente
1.	***Allium sativam***	***Lilliaceae***	**Alin, alicin alin, alinaza, S-alilcistein (SAC), dialildisulfid (DADS), dialiltrisulfid (DATS) i**

			metilaliltrisulfid
2.	***Actindia chinensis***	***Actinidiaceae***	**Polisaharid poznat kao "ACPS-R"**
3.	***Aloe ferox***	***Liliaceae***	**Aloe-emodin, emodin, aloin Acemanan**
4.	***Ananas comosus***	***Bromeliaceae***	**Bromelain**
5.	***Angelica sinensis***	***Umbelliferae***	**Frakcija polisaharida poznata kao "AR-4"**
6.	***Amona species***	***Annonaceae***	**Acetogenini**
7	***Arctium lappa***	***Compositae***	**Potentni antitumorsi faktoru**
8.	***Astragalus membranaceus***	***Papilionaceae***	**Svainzonin**
9.	***Betula utilis***	***Betulaceae***	**Betulin**
10.	***Camellia sinensis***	***Theaceae***	**Epigalokatehin galat**
11.	***Catharanthus rosues***	***Apocynaceae***	**Vinblastin, vincristin, alstonine, Ajmalicin i reserpin**
12.	***Chlorella pirenoidosa***	***Oocystaceae***	**Lizin**
13.	***Colchium luteum***	***Liliaceae***	**Kolhicin demekolcin**
14.	***Combretum caffrum***	***Combritaceae***	**Kombretastatin**
15.	***Curcuma longa Linn.***	***Zinziberaceae***	**Tumoeron, kurcumin**
16.	***Echinacea angustifolia***	***Asteraceae***	**Arabinogalaktan, Jukogalaktoksiloglukani**
17.	***Fagopyrum esculentum***	***Polygonaceae***	**Amigdalin, rutin**
18.	***Ginko biloba***	***Ginkoaceae***	**Ginkolid-A, B, C i J**
19.	***Glycine max***	***Fabaceae***	**Cink, selenium, vitamini (A, B1, B2, B12, C, D, E i K), amino kiseline, izoflavoni, inhibitori proteaze, saponini i fitosteroli**
20.	***Glycirrhyza glabra***	***Fabaceae***	**Glizirizin**
21.	***Gosyppium babardense***	***Malvaceae***	**Gosifitol**
22.	***Gyrophora esculenta***	***Umbilicariaceae***	**Polisaharidi β-glukana, α-glukani, i galaktomanani**
23.	***Lentinus edodes***	***Agaricaceae***	**Lentinan**
24.	***Linum usitattisimum***	***Linaceae***	**Kinogenetički glikozidi i lignani**
25.	***Mantha species***	***Labiateae***	**Monoterpenski ketoni**
26.	***Ochrosia elliptica***	***Apocynaceae***	**Elipticin i 9-metoksi elipticin su piridokarbazol (monomerski indol) alkaloidi**
27.	***Panax ginseng***	***Aralaceae***	**Ginzenozidi, panaksosidi**
28.	***Picrorrhizia kurroa***	***Scrophulariaceae***	**Pikrozidi 1, 2, 3, i kutkozid**
29.	***Podophyllum hexandrum***	***Berberidaceae***	**Podofilin, astragalin**

30.	***Taxus brevifolia***	***Taxaceae***	**Taksani, taksol cefolomanin**
31.	***Withania somnifera***	***Solanaceae***	**Vitanolidi**
32.	***Zingiber officinale***	***Zingiberaceae***	**Kurcumin, gingeronon, gingoli, cingeron**

Tablica 1. Biljke s antikancerogenim djelovanjem (preuzeto i modificirano Sakarkar i Deshmukh 2011.)

2. Tumori

Tumor je opći pojam koji se odnosi na niz malignih bolesti koje mogu utjecati na različite dijelove tijela. Te su bolesti karakterizirane brzim i nekontroliranim formiranjem abnormalnih stanica stvarajući tako masovne nakupine istih inicirajući rast ili tumor. Također takve stanice mogu proliferirati kroz tijelo i tako tvoriti abnormalnosti na drugim mjestima u tijelu. Ukoliko se proces ne spriječi, može napredovati i dovesti do smrti organizma. Glavni oblici liječenje raka kod ljudi su operacija, zračenje i lijekovi (kemoterapijski agensi za rak). Kemoterapijska sredstva često mogu privremeno ublažiti simptome, produljiti život i povremeno izliječiti bolesnika. Postoji nekoliko stotina kemijskih varijanti poznatih klasa kemoterapijskih agensa tumora koji su sintetizirani, ali je problem što uzrokuju mnogo nuspojava (umor, crvenilo, ljuštenje, iritacija, povraćanje, opadanje dlaka...). Sintetske izmjene poznatih lijekova i dalje su veoma važan aspekt istraživanja. Međutim, unatoč mnogim sintetskim izmjenama, relativno su mala poboljšanja prototipova lijekova. S obzirom na stalnu potrebu za novim prototipovima, novi predlošci su korištenje prirodnih proizvoda kao potencijalnih kemoterapijskih sredstava. Spojevi biljnog podrijetla, koji inhibiraju tumore, dali su impresivan niz novih struktura. Mnoge od tih struktura su iznimno složene, ali najvjerojatnije je da bi takvi spojevi mogli biti sintetizirani u empirijskim pristupima novih lijekova, kao što je to već bio slučaj dosad.

U većini slučajeva nastanka raka dolazi do promjene u DNA koja smanjuje ili u potpunosti uklanja normalnu kontrola staničnog rasta, sazrijevanja te uzrokuje programiranu staničnu smrt. Te se promjene češće javljaju kod osoba s određenom genetskom predispozicijom i kod osoba zaraženih kroničnim virusima (npr. virusni hepatitis može dovesti do karcinoma jetre, HIV može dovesti do limfoma). Krajnji uzrok, bez obzira na genetske sklonosti ili viruse koji mogu utjecati na rizik od raka, često je izloženost kancerogenim kemikalijama (uključujući i one koje se nalaze u prirodi) i/ili zračenju (uključujući prirodno kozmičko i zemaljsko zračenje), koji uzrokuju nemogućnost imunog

sustava da uklanja stanice raka u ranoj fazi širenja. Imunološka slabost može nastati godinama nakon izlaganja kemikalijama ili radijaciji (npr. leukemija nakon 6 do 8 godina). Ostali faktori rizika su pušenja duhana, konzumiranje alkohola, droga, prekomjerno izlaganje suncu, zaraze onkogenim virusom poput cervikalnih papiloma virusa, adenovirusa Kaposi's sarcoma, izlaganje azbestu i slično. Stanice raka se dijele čak i u situacijama u kojima normalne stanice obično čekaju poseban signal kemijske transdukcije. Stanice tumora zanemaruju takve signale za zaustavljanje koji šalju susjedna tkiva. Takve stanice također imaju karakter besmrtnosti čak i *in vitro* dok sekod normalnih stanica zaustavlja dioba 50-70 generacija i tada sljedi programirana smrt stanica (apoptoza). Ukoliko se ne uspiju obuzdati, tumorske stanice rastu i napadaju obližnja tkiva te tako metastaziraju na udaljene dijelove tijela. Metastaza je najsmrtonosniji aspekt karcinogeneze (Sakarkar i Deshmukh 2011.).

Postoji nekoliko mogućih načina prevencije i inhibicije tumorskih stanica kao što su stimuliranje fagocitoze makrofaga i pojačavanje aktivnost imunih stanica prirodnih ubojica; poticanje apoptoze stanica tumora povećanom proizvodnjom interferona interleukina-2 imunoglobulina i komplementa u krvnom serumu; provođenje nekroze tumora, inhibiranje njegove translokacija i širenja blokiranjem dotoka krvi u tumorsko tkivo te povećavanje broja leukocita i trombociti poticanjem hematopoeze. Također se može poticati reverzni nastanak normalnih stanica iz tumorskih, pojačanje metabolizma i prevencija normalnih stanica od tumorskih te poticanje apetita, poboljšanje kvalitete spavanja i ublažavanje boli, kako bi se poboljšalo zdravlje pacijenata (Sakarkar i Deshmukh 2011.)

2.1. Antitumorska djelovanja ljekovite biljke *Camellia sinensis*

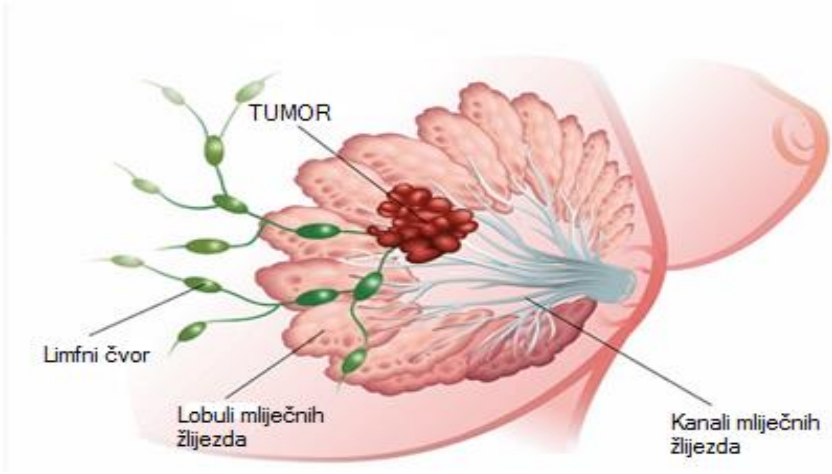
Camellia sinensis sadrži polifenolike za koje je poznato da posjeduju antimutagenska i antitumorskadjelovanja. Neki dokazi sugeriraju da čaj ima zaštitni učinak protiv raka želuca i debelog crijeva. Istraživanja na životinjama također upućuju na to da je rizik od raka u nekoliko organa smanjen potrošnjom zelenog i crnog čaj ili njihovih glavnih katehina. Incidencija tumora i prosječni prinos tumora kod štakora, s kemijski induciranim rakom debelog crijeva, bili su značajno smanjeni kada su štakori primili epigalokatehin galat (glavni polifenolni sastojak zelenog čaja). U sklopu studije provedene u medicinskoj školi u New Jersey-u, ekstrakti crnog i zelenog čaja značajno inhibiraju leukemiju i stanice tumora jetre sprječavajući replikaciju DNA tumorskih stanica (Lea i sur. 1993.). Zeleni i crni čaj također

posjeduju antifungalna, antibakterijska i antivirusna djelovanja prethodno spomenuta u uvodu. Ujedno inhibiraju rast i širenje raka uklanjajući slobodne radikale iz tijela. Pronađeni galati u zelenom čaju štite tijelo od štetnih posljedica radijacija. Redovita uporaba zelenog čaja štiti tijelo od mnogih vrsta tumora uključujući one jetre, jednjaka, želuca, crijeva i pluća. Opaženo je da dnevna potrošnja od 5 grama zelenog čaja inhibira sintezu nitrozamina koji je glavni karcinogen u tijelu (Sakarkar i Deshmukh 2011).

3. Kemoprevencijski i kemoterapijski učinci zelenog i bijelog čaja čaja na tumore

3.1. Djelovanje katehina zelenog čaja EGCG na tumorske stanice dojke MCF-7/BOS

Povećana potrošnja zelenog čaja biljke *Camellia sinensis* može biti obrnuto proporcionalna s rizikom ponovnog pojavljivanja karcinoma dojke (Slika 3.). Pokazalo se da je ova biljka obećavajući kemoprevencijski kandidat za rak dojke zbog mehanizma djelovanja polifenola čaja prilikom signalizacije čimbenika rasta, angiogeneze i metabolizma lipida (Rafieian-Kopaei i Movahedi 2017.). Četiri glavna katehina prisutna u listovima zelenog čaja su epigalokatehin-3-galat (EGCG), epikatehin galat (ECG), epigalokatehin (EGC) i epikatehin (EC). Nazivaju se polifenolima zelenog čaja i čine oko 30% suhe mase listova zelenog čaja (Hajiaghaalipour i sur. 2015.).



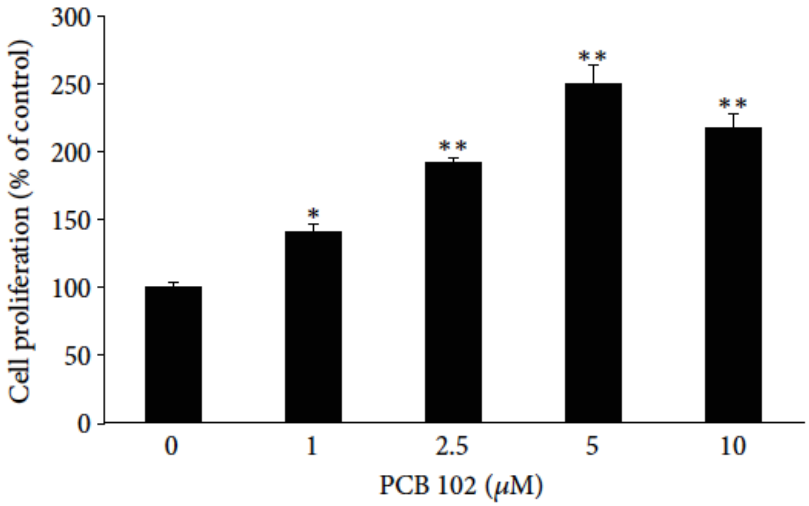
Slika 3. Rak dojke kod žena (http://www.everlastinghealthcenter.com/breast-cancer-and-obesity/)

U istraživanju iz 2015. godine ispitvani su pojedinačni i kombinirani učinci PCB-a 102 (2,2',4,5,6'-pentaklorobifenil) i EGCG-a na proliferaciju. Ustanovljeno je da *Camellia sinensis*, koja protektivno djeluje na rak dojke preko polifenola EGCG-a, uspješno obustavlja proliferaciju linije tumorskih stanica MCF-7/BOS stimuliranu djelovanjem okolišnog estrogena PCB 102 (Rafieian-Kopaei i Movahedi 2017.).

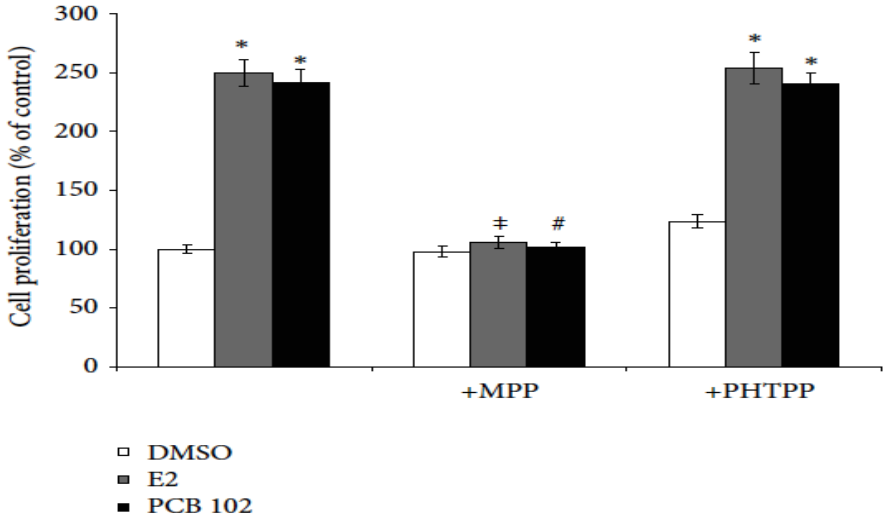
Ksenoestrogeni su specifična skupina endokrinih disruptivnih kemikalija koje ometaju hormonsku signalizaciju oponašajući djelovanje estrogena unutar tijela. Neki od polikloriranih bifenila (PCB), perzistentnih organskih zagađivača koji se nalaze u tlu, zraku, vodi i hrani, kategorizirani su kao ksenoestrogeni, s obzirom na činjenica da se oni izravno vežu na estrogenske receptore, osobito ERα. S obzirom na povećanu koncentraciju PCB-a u određenim ljudskim organima (u krvi, masnoćama i mlijeku) znanstvenici su pretpostavili da ovaj ksenoestrogen ima potencijalnu ulogu u povećanju učestalost karcinoma osjetljivih na estrogen, uključujući i rak dojke. Pokazalo se da je epigalokatehin galat (EGCG) jedan od kemoprevencijskih spojeva *in vitro*. EGCG se veže na ERα i ERβ i inhibira proliferaciju staničnih linija raka dojke MCF-7, osjetljivih na estrogen. Uz antiproliferacijske učinke, putem estrogenskih receptora, EGCG također djeluje neovisno o ER-u tako da inhibira ekspresiju gena reguliranih aril hidrokarbonom- (AhR-) i inducira apoptozu. Osim PCB-a 102 i EGCG-a, koristi se i 17p-estradiol (E2), dimetilsulfoksid (DMSO), selektivni ERα antagonist 1,3-bis(4-hidroksifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoksi)Fenol]-lH-pirazol dihidroklorid (MPP dihidroklorid) i selektivni ERβ antagonist 4-[2-fenil-5,7-bis (trifluorometil) pirazol [1,5-a] pirimidin-3-il] fenol (PHTPP) za dobivanje željenih rezultata.

Otkriveno je da PCB 102 stimulira staničnu proliferaciju u stanicama raka dojke MCF-7/BOS u ovisnosti o dozi (Slika 4.). Proliferacijski učinci PCB-a 102 posredovani su s ERα, a mogu biti blokirani s Erα-specifičnim inhibitorom MPP, ali ne i s ERβ-specifičnim inhibitorom PHTPP (Slika 5.). Stoga se može reći da je ovo bilo prvo izvješće koje je pokazalo da PCB 102 pokazuje estrogensku aktivnost. Uz to, proliferacijski učinci E2 u stanicama MCF-7/BOS (korištene kao pozitivna kontrola) potpuno su prekinuti djelovanjem selektivnog ERα antagonista MPP u stanicama MCF-7/BOS. Proliferacijsko djelovanje PCB-a 102 preko ERα također može biti antagonizirano s EGCG-om koji izaziva inhibiciju ovisnu o dozi (Slika 6.), s gotovo potpunom inhibicijom pri 25 μM EGCG-a. Prethodne su studije pokazale da EGCG inhibira proliferacije stanica raka dojke redukcijom ekspresije ciklina i CDK (ciklin ovisnih kinaza), kao i indukcijom ekspresije CDK inhibitora p21 i p27, čime se

zaustavlja faza staničnog ciklusa G1. Osjetljivost na liječenje EGCG-om jako ovisi o staničnom tipu, a u nekim stanicama raka visoka koncentracije EGCG-a (≥ 85 μM) inducira apoptozu. Stoga je važno naglasiti da je u ovom istraživanju s MCF-7/BOS stanicama, liječenje samo s EGCG-om nije inhibiralo rast stanica sve dok nije postignuta najviša koncentracija od 50 μM. Na osjetljivost stanica MCF-7/BOS, koje se tretiraju s EGCG-om, utjecalo je i vrijeme izlaganja. Dodavanje 50 μM EGCG-a na stanice 24 sata nakon nasađivanja rezultiralo je smanjenjem proliferacije za 65%, dok je dodavanje iste koncentracije u stanice MCF-7/BOS, 48 sati poslije, rezultiralo smanjenjem rasta za 34%. Moguće objašnjenje ove razlike je da su stanice nakon više proteklog vremena fiziološki stabilnije (Mantzke Baker i Bauer 2015.).

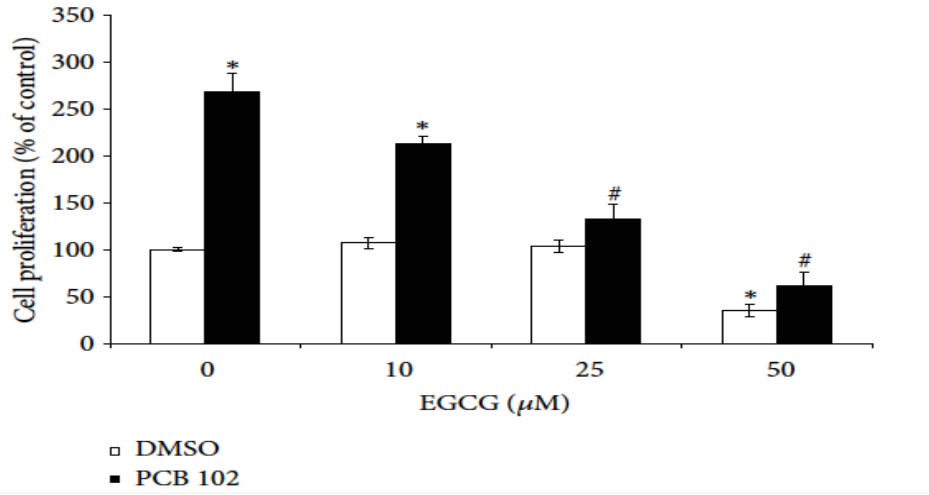


Slika 4. PCB 102 povećava proliferaciju stanica karcinoma dojke MCF-7 / BOS.MCF-7 / BOS stanice tretirane su različitim koncentracijamaPCB 102 (1, 2,5, 5 i 10 uM) tijekom 72 sata. Brojevi stanica bili su određeni hemocitometrom i izraženi kao postotak DMSO kontrole (postavljena na 100%). Vrijednosti se izražavaju kao srednja vrijednost ± SE(n = 3). Značaja razlika između sredstava: *<0,05,**P<0,001 u usporedbi s kontrolom DMSO (Mantzke Baker i Bauer 2015.).

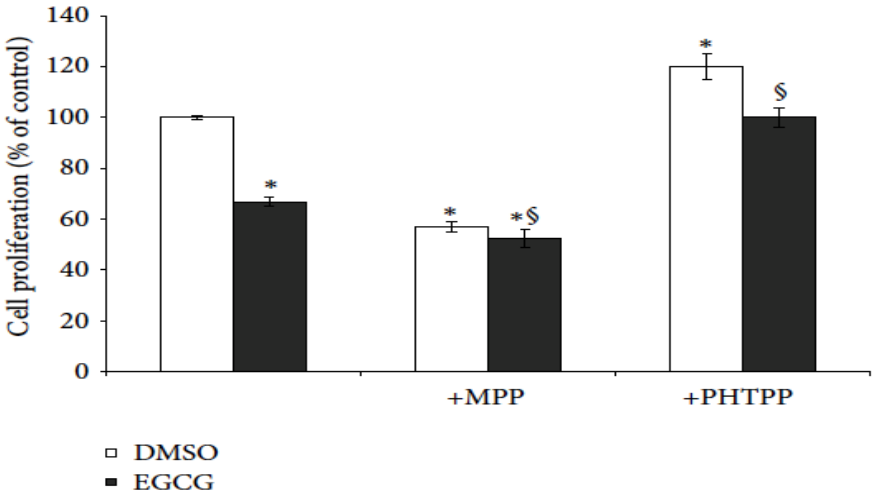


Slika 5. PCB 102 inducira staničnu proliferaciju preko ERα.MCF-7 / BOS stanice su tretirane sa 1 nME2 ili 5 uM PCB 102 sa i bez ERα-specifičnog inhibitora MPP (1 uM) ili ERβ- specifičnog inhibitora PHTPP (1 uM) tijekom 72 sata. Brojevi stanica bili su određeni hemocitometrom i izraženi kao postotak DMSO kontrole (postavljena na 100%). Vrijednosti se izražavaju kao srednja vrijednost ± SE(n = 3). *Značajno drugačiji u usporedbi s kontrolom, P<0.05; značajno drugačiji u usporedbi s E2 tretmanom, P<0,05; i značajno drugačiji u usporedbi s PCB tretmanom, P<0,05 (Mantzke Baker i Bauer 2015.).

Nadalje, serum iz pacijenata s rakom dojke, koji su unosili EGCG oralno nekoliko tjedana u kombinaciji s radioterapijom, inhibira kulture metastatskih stanica raka dojke *in vitro*. Zajedno ovi nalazi podupiru kemoprevencijski potencijal EGCG-a *in vivo*. Iako se EGCG može vezati za oba ER izoforma, budući da 3-galatna skupina oponaša 7α-položaj E2, on ima veći afinitet vezanja za ERβ od ERα. Stanice MCF-7/BOS eksprimiraju ERα i ERβ, ali ERα je predominantni tip ER. ERβ djeluje kao dominantni represor transkripcije estrogenog receptora α i tako inhibira ERα uzrokovanu proliferaciju karcinoma dojke i stvaranje tumora. S obzirom na zaštitni učinak ERβ, ispitano je igra li on važnu ulogu prilikom inhibicije rasta tumorskih stanica pri 50 μM EGCG. Tako je antiproliferacijsko samostalno djelovanje EGCG-a u staničnoj liniji MCF-7/BOS bilo blokirano pomoću ERβ-specifičnog inhibitora PHTPP, ali ne i ERα-specifičnog inhibitora MPP (Slika 7.). Stoga rezultati pokazuju da EGCG vjerojatno djelujuje kao ERβ agonist te tako inhibira proliferaciju stanica (Mantzke Baker i Bauer 2015.).



Slika 6. EGCG suprimira staničnu proliferaciju induciranu s PCB 102. MCF-7 / BOS stanice tretirane su sa 5 uM PCB 102 samostalno i prisutnost EGCG (10-50 uM) tijekom 72 sata. Brojevi stanica bili su određeni hemocitometrom i izraženi kao postotak DMSO kontrole (postavljena na 100%). Vrijednosti se izražavaju kao srednja vrijednost ± SE(n = 3). *Značajno drugačiji u usporedbi s kontrolom, P<0.05; značajno drugačiji u usporedbi s PCB tretmanom, P<0,05 (Mantzke Baker i Bauer 2015.).



Slika 7. ERβ-specifični inhibitor PHTPP blokira inhibiciju stanične proliferaciju EGCG-om. MCF-7 / BOS stanice su prethodno tretirane sERα-specifičnim inhibitorom MPP (1 uM) ili ERβ-specifičnim inhibitorom PHTPP (1 uM) tijekom 24 sata te su zatim tretirane s 50 uM EGCG tijekom dodatnih 72 sata. Broj stanica određen je hemocitometrom i izražen kao postotak kontrole DMSO (postavljena na 100%). Vrijednosti se izražavaju kao srednja vrijednost ± SE (n = 3).*Značajno drugačiji u usporedbi s kontrolom, P<0.05; §značajno drugačiji u usporedbi s liječenjem samo s EGCG, P<0,05 (Mantzke Baker i Bauer 2015.).

Otkriveno je da inhibicija ERβ s PHTPP-om rezultirala značajnim povećanjem proliferacije stanica MCF-7/BOS čak i u odsutnosti E2. Nasuprot tome, inhibicija ERα, korištenjem ERα-specifičnog inhibitora MPP, tijekom dužeg vremena (96 sati) rezultirala je značajnim smanjenjem rasta stanične linije MCF-7/BOS. Ovakvi rezultati sugeriraju da na proliferaciju stanica MCF-7/BOS utječe omjer ERα/ERβ. Stoga EGCG također može biti važan faktor prilikom suzbijanja učinka PCB-a u stanicama raka dojke s negativnim receptorom za estrogen (ER-). PCB uzrokuje pretjeranu ekspresiju rasta vaskularnog endotelnog faktora (VEGF), poboljšava migraciju stanica i potiče metastaze u ER- stanicama raka dojke. Nasuprot tome, EGCG inhibira VEGF ekspresiju, migraciju i invaziju stanica raka dojke ER-. Osim toga, bolesnici koji imaju rak dojke i koji su unosili EGCG oralno te ujedno primali radioterapiju, imaju značajno niže razine VEGF-a u serumu i smanjenu aktivnost invazije metaloproteinaza u usporedbi s pacijentima koji su primili samo radioterapiju. Može se reći da je velika sposobnost EGCG-a u inhibiciji štetnog djelovanja PCB-a preko specifičnih ER-ova stanica raka te je svakako potrebno provesti detaljnije istraživanje (Mantzke Baker i Bauer 2015.).

3.2. Djelovanje ekstrakta zelenog čaja na ljudske tumorske stanice grkljana

Fitokemikalije u ekstraktu zelenog čaja (uglavnom flavonoidi) uklanjaju slobodne radikale, ali potiču i prooksidacijske reakcije u stanici. Stoga se nastoje procjeniti potencijalni citotoksični i prooksidativni učinci ekstrakta zelenog čaja i dvaju glavnih flavonoidnih komponenta, epigalokatehin galata (EGCG) i epikatehin galata (ECG), na ljudskoj staničnoj liniji karcinoma grkljana (HEp2) i njezinoj križno-rezistentnoj staničnoj liniji CK2. Stanična linija CK2 je dobivena iz roditeljskih stanica HEp2 tretiranjem s postupnim povećanjem koncentracije cisplatina. Tako dobivene stanice CK2 su razvile otpornost na cisplatin i križnu rezistenciju na vinkristin, metotreksat, florouracil, mitomicin C i karboplatinu. Katehini se primjenjuju kao zasebni spojevi pri čemu se proučava citotoksičnost, peroksidacija lipida i razina primarnog oštećenja DNA u obje vrste stanica.

Rezultati pokazuju da je EGCG i ekstrakt zelenog čaja povećavao oštećenje DNA u staničnoj liniji CK2 tijekom kratkog izlaganja. Citotoksičnost EGCG-a i ECG-a je povećana tijekom inkubacije, dok je ekstrakt zelenog čaja ujedno izazvao je peroksidaciju lipida u staničnoj liniji CK2. Prooksidacijski učinak zelenog čaja određen je u koncentracijama

većima od onih pronađenih u tradicionalno pripremljenim ekstrktima zelenog čaja (Durgo i sur. 2011.)

3.2.1. Citotoksični učinak katehina i ekstrakta zelenog čaja

U prethodnim studijama otkriveno je da katehini posjeduju antioksidativne, prooksidativne, antitumorska ili citotoksična svojstva, obično u koncentracijama u rasponu od 10 μmol L-1 do 1 000 μmol L-1. Citotoksičnost ECG-a/EGCG-a i ekstrakta zelenog čaja se povećava s koncentracijom i vremenom inkubacije. Citotoksični učinak ekstrakta zelenog čaja bio je veći od oba katehina što se može objasniti sinergističkim učinkom otrovnih spojeva u zelenom čaju. EGCG i ekstrakt zelenog čaja djeluju toksično na staničnu liniju CK2 već u prvih nekoliko sati inkubacije, ali takav učinak se smanjuje nakon dužeg djelovanja ekstrakta zelenog čaja na stanice CK2. Kod nanomolarnih koncentracija, katehini se brzo biotransformiraju metilacijom, sulfatacijom, i reakcijama pripajanja prstena do konačnog dobivanja feniloctene i fenilpropionske kiseline. Reaktivne kisikove vrste (ROS) nastaju tijekom staničnog metabolizma veće koncentracije katehina i često su odgovorne za njihovo citotoksično djelovanje na stanične linije tumora (Durgo i sur. 2011.). Važno je reći i da se dokazalo da visoke koncentracije katehina zelenog čaja ne izazivaju formiranje ROS-ova u normalnim keratinocitima već se njihova razini kontinuirano smanjivala. Shodno tim rezultatima, ista skupina znastvenika je otkrila kontinuirano formiranje ROS-ova u staničnim linijama oralnih karcinoma, što ukazuje na to da katehini mogu potaknuti djelovanje ROS-ova i tako uklanjati slobodne radikale, ovisno o tipu stanica. Sugerira se i da su stanice karcinoma više osjetljive na citotoksični učinak katehina i ekstrakta zelenog čaja od normalnih staničnih linija iz zdravih tkiva, sudeći prema apoptotičkim događajima. Također se otkrilo da se odgovor razlikuje u različitim tipovima stanica, ovisno o njihovoj sposobnosti toleriranja polifenola. Stanice koje su u čestom dodiru s katehinom mogu tolerirati veće koncentracije (Yamamoto i sur. 2003.). Proučavajući mehanizam toksičnosti katehina otkriveno je da EGCG inhibira telomeraznu aktivnost koja uzrokuje apoptotičke događaje u izloženim stanicama (Yang i sur 1993.). Primjećen je i sličan učinak ECG-a koji je inhibirao aktivnost telomeraze uzrokujući zaustavljanje stanične faze G1 (Naasani i sur. 1998.).

3.2.2. Peroksidacija lipida

Prooksidacijska i antioksidacijska svojstva bioaktivnih spojeva, uključujući ekstrakt zelenog čaja i ECG/EGCG, određuju se mjerenjem MDA (malondialdehid) koji nastaje degradacijom masnih kiselina djelovanjem slobodnih radikala. Povećana peroksidacija lipida nakon tretmana s ekstraktom zelenog čaja otkrivena je u obe stanične linije nakon 72 sata inkubacije. EGCG je smanjio razinu kontrole lipidne peroksidacije u križno-rezistentnoj liniji, što ukazuje na njegovu antioksidativnu prirodu, dok ECG nije pokazao nikakav efekt. Antioksidativni učinak EGCG-a u usporedbi s ECG-om se može objasniti dodatnom OH skupinom na 5' položaju EGCG molekule. Važno je spomenuti da se razine EGCG-a, koje se mogu naći u sistemskoj cirkulaciji, mjere u nanomolima. Dok se većina istraživanja temelji na mikromolarnim ili milimolarnim koncentracijama, kako bi se došlo do prooksidativnih učinaka EGCG-a ili eventualno oksidacijskog stresa, degradacije DNA, peroksidacije lipidi i proizvodnje H_2O_2. Može se reći da niža koncentracija i kraće vrijeme izlaganja dovode do antioksidacijskog učinka EGCG-a. U ovom slučju se antioksidacijska aktivnost u stanicama značajno smanjila nakon sedam dana od prestanka konzumiranja katehina čaja (Durgo i sur. 2011.)

3.2.3. Genotoksični učinak

Rezultati istraživanja su pokazali da ekstrakt zelenog čaja uzrokuje oštećenja DNA molekule. Njegov genotoksični učinak se povećava s povećanjem vremena izloženosti. Oštećenje DNA je više bilo izraženo u roditeljskoj staničnoj liniji HEp2 nego u rezistentoj liniji CK2. Stoga se pretpostavlja da stanična linija HEp2 ima osjetljiviji genom, ali je isto tako moguće da je stanična linija CK2 ima djelotvornije endogene mehanizme popravka. Također su se povukla oštećenja DNA na podlozi staničnih linija CK2, uzrokovana djelovanjem katehina, u prvih 48 sati jer se inkubacija nastavila. U periodu od 48 sati, i EGCG i ECG, su štitili stanice HEp2. Slično tome, utvrđeno je da EGCG, u koncentracijama od 0,01 μmol L-1 do 10 μmol L-1, snižava DNA oštećenja u ljudskim limfocitima, ali također je pokazao jaki endotoksični učinak pri većim koncentracijama (1 mmol L-1) (Durgo i sur. 2011.).

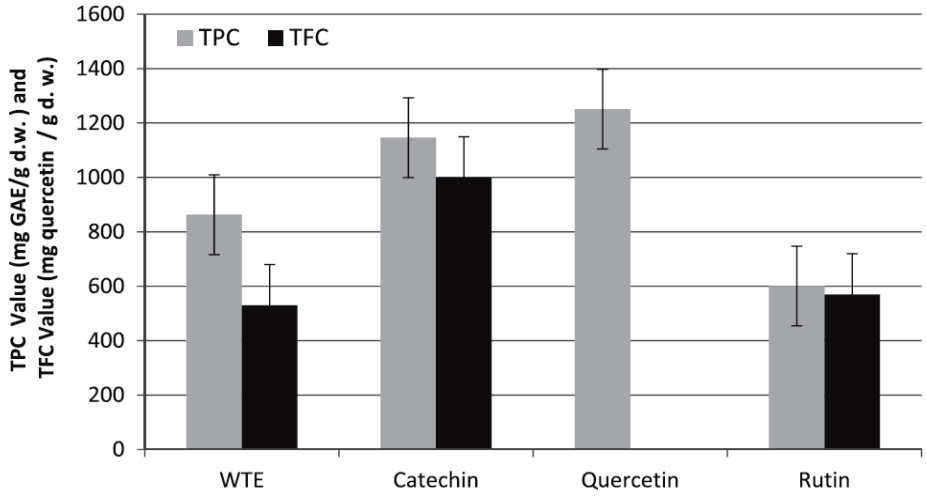
.

3.3. Djelovanje bijelog čaja na proliferaciju stanica raka debelog crijeva HT-29

Mehanizmi djelovanja bijelog čaja koji bi se mogli koristiti u zdravstvene svrhe uključuju uklanjanje ROS-ova, modifikaciju puteva uključenih u prijenos signala, kontrolne točke staničnog ciklusa, apoptozu te indukciju aktivnosti različitih enzima uključenih u metabolizam lijekova i karcinogenu aktivaciju/ detoksikacija (Yang i sur. 2009.).

3.3.1. Ukupni sadržaj fenola i flavonoida

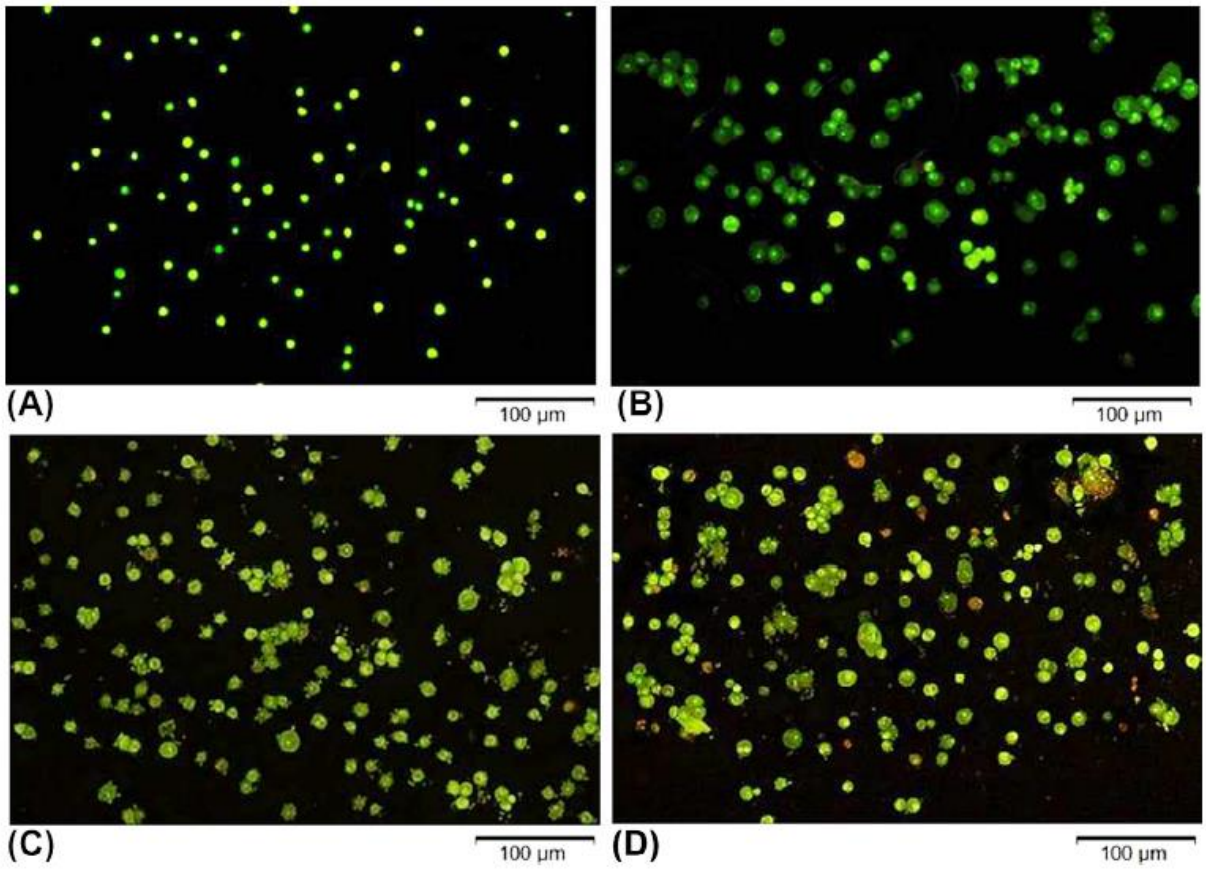
Ukupni sadržaj fenola (TPC- total phenol content) kvantificiran je kao ekvivalent galinske kiseline (GAE). Bijeli čaj ekstrahiran toplom vodom pokazuje visoke količine ukupnih fenola unutar vremena ekstrakcije od 5 min (Slika 8.). TPC ekstrakta tople vode bio je veći od količine čistog flavonoida. Općenito je ukupni sadržaj polifenola zelenog i bijelog čaja visok u vrućem ekstraktu nakon 7 minuta i hladnom nakon 2 sata (Hajiaghaalipour i sur. 2015.).



Slika 8. Ukupni sadržaj fenola i flavonoida ekstrakata bijelog čaja. Ukupni sadržaj fenola (izražen kao mg GAE / g osušene težine uzorka) i ukupni sadržaj flavonoida (Izraženo kao mg kvercetina / g osušene težine uzorka) bijelog čaja ekstrahiranog vrućom vodom tijekom 5 minuta (Hajiaghaalipour i sur. 2015.).

3.3.2. Antiproliferacijski učinak ekstrakta bijelog čaja na tumorske stanice *in vitro*

Kako bi se detektirali željeni rezultati korišten je test 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolij bromid (MTT), indirektna kolorimetrijska analiza za procjenu broja vijabilnih stanica koje su pogodne za mjerenje modulacija rasta stanica *in vitro*.Vrući ekstrakt vode pokazao je jaku antiproliferacijsku aktivnost na stanice HT-29 (IC_{50} = 86,68 ± 0,73 ug/ml). Prethodna epidemiološka istraživanja su pokazale da se antiproliferacijski učinci na tumorske stanice raka debelog crijeva mogu povezati s prisutnošću polifenola bijelog čaja te da je zaštitna aktivnost povezana s jakom detoksikacijom i antioksidativnim kapacitetom bijelog čaja. Za mjerenje mogućih citotoksičnosti ekstrakata bijelog čaja na normalnim stanicama ispitivana je stanična linija fibroblasta, HDF-a. IC_{50} ekstrakta korištena na fibroblastima je bila znatno veća od one korištene za kancerogene stanične linije. Dakle, ekstrakt bijelog čaja pokazuje visoku antiproliferativnu aktivnosti prema tumoroskim stanicama linije HT-29, bez toksičnog djelovanja na normalne stanice fibroblasta (Slika 9.) (Hajiaghaalipour i sur. 2015.).



Slika 9. Fluorescentni mikrograf akridinskog crvenila i propidij jodida dvostruko obojenih ljudskih stanica raka debelog crijeva (HT-29). (A) Neobrađene stanice pokazale su normalnu strukturu bez

istaknute apoptoze. (B) Stanice tretirane ekstraktom bijelog čaja nakon 8 sati pokazale su rana obilježja apoptoze, uključujući razaranje membrane i kondenzaciju kromatina. (C) Stanice pokazuju apoptotičke karakteristike nakon inkubacije od 16 sati, što se očituje u interkalirajućem akridinskom crvenilu među fragmentiranom DNA i fragmentiranom jezgrom. (D) Jasno vidljiva prisutnost crvenkasto-narančaste bojenakon tretmana od 24 sata (Hajiaghaalipour i sur. 2015.).

4. Zaključak

Gotovo svi dosadašnji eksperimenti na raznim tumorskim staničnom linijama *in vitro*, na životinjama i na ljudima ukazuju na pozitivan antikancerogeni učinak biljke *Camellia sinensis*. Njezine se biološki aktivne komponente, kao što su polifenolici obitelji flavan-3-ol (katehin), nalaze u dovoljno visokim koncentracijama u zelenom i bijelom čaju te mogu imati antiproliferacijski, antioksidativni te prooksidtivni učinak. Ujedno mogu inducirati apoptozu, diferencijaciju, poboljšati aktivnost imunog sustava, inhibirati angiogenezu te svojim doprinosom poboljšati djelovnje raznih lijekova. Stoga se može zaključiti da su ekstrakti bijelog i zelenog čaja te njihove izolirane kemijske komponente vrlo učinkoviti prilikom kemoprevencije i kemoterapije raznih vrsta i stadija tumora. Iako se preporuča svakodnevna konzumacija čajeva biljke *Camellia sinensis* u svrhu prevencije raznih bolesti, treba uzeti u obzirda visoke koncentracije katehina i drugih biološki aktivnih spojeva mogu uzrokovati ozbiljne i neočekivane nuspojave jer su mnogi mehanizami, koji sudjeluju u suzbijanju tumorskih stanica, nedovoljno istraženi.

5. Literatura

Baker K.M, Bauer A.C, 2015. Green Tea Catechin, EGCG, Suppresses PCB 102-Induced Proliferation in Estrogen-Sensitive Breast Cancer Cells. *International Journal of Breast Cancer*,1-8.

Dias T.R., Tomás G., Teixeira N.F., Alves M.G, Oliveira P.F., Silva B.M., 2013. White Tea (Camellia Sinensis (L.)): Antioxidant Properties And Beneficial Health Effects. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*, 2, 19-26.

Drugo K., Kostić S., Gradiški K., Komesi D., Osmak M., Franekić J., 2011. Genotoxic efects of green tea extract on human laryngeal carcinoma cells *in vitro*. *Arh Hig Rada Toksikol*, 62, 139-146.

Hajiaghaalipour F., Kanthimathi M.S., Junedah Sanusi J., Rajarajeswaran J., 2015. White tea (Camellia sinensis) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chemistry*, 169, 401-410.

Lea M.A., Xiao Q., Sadhukhan A.K., Cottle S., Wang, Z.Y., Yang C.S., 1998. Inhibitory effects of tea extracts and (-)-epigallocatechin gallate on DNA synthesis and proliferation of hepatoma and erythroleukemia cells. *Cancer Lett*, 68, 231–6.

Naasani I., Seimiya H., Tsuruo T., 1998. Telomerase inhibition, telomere shortening and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem Biophys Res Commun*, 240, 391-6.

Rafieian-Kopaei M., Movahedi M., 2017. Breast cancer chemopreventive and chemotherapeutic effects of Camellia Sinensis (green tea): an updated review. *Electronic Physician*, 9, 3838-3844.

Sakarkar D.M., Deshmukh V.N., 2011. Ethnopharmacological Review of Traditional Medicinal Plants for Anticancer Activity. *International Journal of PharmTech*

Research, pp. 298-308.

Yang C. S., Wang X., Lu G., Picinich S. C., 2009. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 429–439.

Yamamoto T., Hsu S., Lewis J., Wataha J., Dickinson D., Singh B., Bollag W.B., Lockwood P., Ueta E., Osaki T.,Schuster G., 2003. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Therap*, 307, 230-6.

Internetski izvori:

www.everlastinghealthcenter.com/breast-cancer-and-obesity/ (pristupljeno 21.7.2017.)

www.herbologymanchester.wordpress.com/tag/camellia-sinensis/ (pristupljeno 21.7.2017.)

www.ohaskin.com/oha-101-green-tea-extract/ (pristupljeno 23.7.2017)

6. Sažetak

Camellia sinensis pripada biljnoj porodici *Theaceae* te postoji u obliku zimzelenog grmlja ili malih stabala čiji se listovi i pupoljci koriste za proizvodnju čaja.Ukoliko ih se promatra s obzirom na "fermentaciju", postoje tri glavne skupine čajeva: nefermentirani (zeleni i bijeli čaj), djelomično fermentirani (oolong čaj) i potpuno fermentirani (crni čaj). S obzirom na to da se *Camellia sinensis*ubraja u ljekovito bilje, ova biljka čajevca,zbog svojih kemijskih spojeva,ima važnu ulogu u prevenciji i liječenju tumora. Polifenolzelenog čaj EGCGuspješno obustavlja proliferaciju linije tumorskih stanica dojkeMCF-7/BOS stimuliranu djelovanjem okolišnog estrogena PCB 102. Također je ispitivan potencijalni citotoksični i prooksidativni učinak ekstrakta zelenog čaja i dva glavna flavonoida, epigalokatehin galata(EGCG) i epikatehin galata (ECG), na tumorskestanične linije grkljana (HEp2) i njezinu križno-rezistentnu staničnu liniju CK2. EGCG i ekstrakt zelenog čaja povećavaju oštećenje DNA u staničnoj liniji CK2 tijekom kratkog izlaganja. Citotoksičnost EGCG i ECG se povećava s vremenom inkubacije, dok je ekstrakt zelenog čaja izazvao peroksidaciju lipida ustaničnoj liniji CK2. Ispitivan je i ekstrakt bijelog čaja koji inhibira proliferaciju stanica tumora debelog crijeva HT-29, a štiti normalne stanice 3T3-L1 od oštećenja DNA vodikovim peroksidom. U ovom radu se nastoje istaknuti mogući korisni ljekoviti učinci biljke *Camellia sinensis* u kemoprevenciji i kemoterapiji različitih tipova stanica raka.

7. Summery

Camellia sinensis is a species of evergreen shrub or small tree whose leaves and leaf buds are used to produce tea. Concerning to the level of "fermentation", it can be categorized into three major types: not fermented (green and white tea), partially fermented (oolong tea) and completely fermented (black tea). *Camellia sinensis* is a medicinal herb that plays an important role in prevention and treatment of tumors. Green tea polyphenol EGCG, suppressed the proliferation-stimulating activity of the environmentalestrogen PCB 102 on MCF-7/BOS breast cancer cells. Potential cytotoxic and prooxidative effects of green tea extract and its two main flavonoid constituents epigallocatechin gallate (EGCG) and epicatechin gallate (ECG) were also observed when tasted on human laryngeal carcinoma cell line (HEp2) and it's crossresistant CK2 cell line. The results showed that EGCG and green tea extract increased the DNA damage in the CK2 cell line during short exposure. The cytotoxicity of EGCG and ECG increased with the time of incubation. Green tea extract induced lipid peroxidation in the CK2 cell line. White tea extract, that inhibits the proliferation of HT-29 colon tumor cells and protects normal 3T3-L1 cells from DNA damage by hydrogen peroxide, was also explored. This paper presents a brief overview of beneficial therapeutic effects of *Camellia sinensis* in chemoprevention and chemotherapy of different cancer cells types.