

Ispitivanje bioloških učinaka seskviterpena iz biljke *Centaurea ragusina* L.

Kralj, Juran

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:375237>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Juran Kralj

Ispitivanje bioloških učinaka
seskviterpena iz biljke *Centaurea*
ragusina L.

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Anamarije Brozović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Ovim radom zatvaram veliko poglavlje svog života. Međutim, to je samo još jedno poglavlje knjige koju pišem svojim riječima, djelima i mukotrpnim radom. Kao svi veliki pisci, znanstvenici i radnici imao sam razdoblja s više ili manje motivacije, razdoblja uspjeha i neuspjeha, uspona i padova, sreće i neizmjerne tuge. Nije bilo lako, ali uspio sam. I pritom nikad nisam bio sam.

Stoga bih htio iskoristiti ovu priliku da zahvalim prvo svojim roditeljima Sandri i Krešimiru na bezuvjetnoj podršci kroz cijelo moje školovanje. Hvala za svaku riječ utjehe, motivacijski govor i pohvalu, ali najviše hvala za svaku kritiku koja me natjerala da razmislim, ostanem realan i na pravom putu.

Veliko hvala i mojoj predivnoj sestri Jeleni na sestrinskoj ljubavi, suosjećanju, svim šalama, filmskim večerima, savršenim obrocima i cijedenim sokovima. Hvala ti što si bila uz mene!

Zahvalio bih se i cijelom Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković: Andreji, Nini, Marini, Dragomiri, Ani, Kristini, Maji, Sanjici, Tihani, Mladenu, Davoru, Nebojši i Alenu, na odličnom društvu i savjetima koji su moj boravak u Laboratoriju učinili savršenim!

Posebno bih se zahvalio članici Laboratorija, dr. sc. Anamariji Brozović, čije sam ime izdvojio zbog svih velikih stvari koje je za mene učinila. Hvala što ste bili moja mentorica, učiteljica, duhovna savjetnica, kolegica i prijateljica u isto vrijeme. Hvala Vam za sve savjete i znanje koje ste bezuvjetno podijelili sa mnom. Hvala za uloženo vrijeme i trud potreban da naučim sve tehnike koje smo koristili u istraživanjima. Hvala za sve ugodne razgovore i šale, ali najviše hvala za Vaš vječni optimizam! Naučio sam biti smiren, razuman i prihvatiti neuspjeh jednako kao i uspjeh te naučiti nešto iz njega. Vi ste definicija savršene mentorice!

Zahvalio bih se i svom "cimeru" Karlu i kolegicama Luciji i Dori na prekrasnom iskustvu u Madridu te Josipu Š., Josipu P., Ivi, Pauli, Barbari, Tanji i Petri na nenadmašivim zabavama, druženjima i svim roštiljima i pekama koje smo ispekli i zajedno pojeli!

Posebno hvala mojim velikim prijateljima Bruni, Mateju, Lovri, Nikoli, Pablu i Tinu na druženjima i podršci još od osnovne i srednje škole te svim prijateljima iz Gračeca i karate kluba Bushido!

I na kraju, veliko hvala čovjeku s kojim je cijela priča o biologiji započela, profesoru Karlu Horvatinu, na odličnim predavanjima, kreativnosti i motivaciji!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ispitivanje bioloških učinaka seskviterpena iz biljke *Centaurea ragusina* L.

Juran Kralj
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Maligni tumori su, uz bolesti krvožilnog sustava, glavni uzrok smrtnosti ljudske populacije. Štetne popratne pojave i razvoj otpornosti tumora na lijekove glavni su problem uspješne kemoterapije. Potreba za učinkovitijim i manje štetnim spojevima, potencijalnim novim kemoterapeutičima, je zato velika. U ovom diplomskom radu je istraženo biološko djelovanje seskviterpen laktona raguzinina, izoliranog iz hrvatskog endema *Centaurea ragusina* L. (dubrovačka zečina). Biološki učinak seskviterpena raguzinina na ljudske stanice tumora vrata maternice (HeLa) istražen je korištenjem kolorimetrijske metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli bromid) te je pokazano njegovo toksično djelovanje s IC_{50} kod 2,2 μ M. Nadalje, korištenjem protočne citometrije pokazano je da raguzinin zaustavlja stanice u fazi G2 ciklusa stanice, te potiče apoptozu. Pojava apoptoze potvrđena je bojanjem stanica s propidij jodidom i Annexin-om V označenim fluorescein izotiocijanatom. Međutim, *Western blot* metodom se nije utvrdilo cijepanje opće prihvaćenih biljega apoptoze, kaspaze 3 i proteina PARP. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost da raguzinin potiče apoptozu neovisnu o kaspazama. Pomoću specifičnih prekursora i inhibitora sinteze glutationa i molekula uključenih u njegov metabolizam pokazano je da je glutation uključen u mehanizam smanjenja citotoksičnosti raguzinina kod stanica HeLa, te da je njegova uloga u tom procesu detoksikacijska, a ne stabilizacija oksidativno-reduktivnog sustava stanice.

(54 stranice, 16 slika, 6 tablica, 71 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: seskviterpen lakton, tumor, kemoterapija, citostatik, HeLa, raguzinin

Voditelj: **Dr. sc. Anamaria Brozović**, viši znanstveni suradnik

Suvoditelj: **Dr. sc. Maja Matulić**, izvanredni profesor

Ocjenitelj: **Dr. sc. Jasna Hrenović**, redovni profesor

Dr. sc. Goran Klobučar, redovni profesor

Dr. sc. Maja Matulić, izvanredni profesor

Dr. sc. Ivan Radosavljević, docent

Rad prihvaćen: 08.01.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Investigation of biological effects of sesquiterpene from *Centaurea ragusina* L.

Juran Kralj
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Malign tumours are, along with cardiovascular diseases, the main cause of death of human population. Harmful consequences and development of drug resistance are the main problems of successful chemotherapies. There is a big need for more efficient and less harmful substances, potential chemotherapeutics. In this thesis, biological effect of sesquiterpene lactone isolated from Croatian endemic plant *Centaurea ragusina* L. (dubrovačka zečina) was examined. Biological effect of sesquiterpene lactone ragusin in on human cervical carcinoma (HeLa) cell line was examined using colorimetric assay MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the ragusin in was obtained at 2,2 μM. We also analysed the cell cycle progression by propidium iodide staining using flow cytometry. The obtained data indicated ragusin in as a potent inducer of apoptotic cell death and as a trigger for increase in G2 phase population. The ability of ragusin in to induce apoptosis of HeLa cells was examined by Annexin V-FITC Assay using flow cytometry. The cleavage of caspase 3 and PARP was not detected indicating that ragusin in triggers caspase-independent cell death. Using specific precursors and inhibitors of glutathione synthesis and of other molecules involved in glutathione metabolism, it was shown that glutathione is involved in the mechanism of ragusin in cytotoxicity inhibition probably through detoxification mechanism, and not by stabilization of oxidative-redox system in the cell.

(54 pages, 16 figures, 6 tables, 71 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: sesquiterpene lactone, tumour, chemotherapy, cytostatic, HeLa, ragusin in

Supervisor: **Dr. Anamaria Brozović**, Senior Associate Scientist

Cosupervisor: **Dr. Maja Matulić**, Associate Professor

Reviewers: **Dr. Jasna Hrenović**, Full Professor

Dr. Goran Klobučar, Full Professor

Dr. Maja Matulić, Associate Professor

Dr. Ivan Radosavljević, Assistant Professor

Thesis accepted: 08.01.2018.

SADRŽAJ RADA

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | Tumori | 1 |
| 1.2 | Liječenje tumora | 3 |
| 1.2.1 | Kemoterapija | 4 |
| 1.2.2 | Otpornost na kemoterapiju | 6 |
| 1.2.3 | Kemoterapeutici izolirani iz biljaka | 6 |
| 1.2.4 | Seskviterpen laktoni | 7 |
| 1.3 | Molekularni mehanizmi djelovanja seskviterpen laktona | 9 |
| 1.4 | Glutation | 10 |
| 1.4.1 | Uloga glutaciona u regulaciji rasta i razvoja tumorskih stanica | 13 |
| 1.5 | Smrt stanice | 13 |
| 2 | CILJ ISTRAŽIVANJA | 17 |
| 3 | MATERIJALI I METODE | 18 |
| 3.1 | Materijali | 18 |
| 3.1.1 | Linije stanica | 18 |
| 3.1.2 | Kemikalije | 18 |
| 3.1.3 | Protutijela | 20 |
| 3.1.4 | Uređaji | 20 |
| 3.1.5 | Pomagala | 21 |
| 3.2 | Metode | 22 |
| 3.2.1 | Uzgoj stanica u kulturi | 22 |
| 3.2.2 | Određivanje preživljenja stanica | 22 |
| 3.2.3 | Analiza ciklusa stanica | 23 |
| 3.2.4 | Analiza smrti stanica | 24 |
| 3.2.5 | Analiza ekspresije proteina | 25 |
| 3.2.6 | Statistička analiza | 27 |
| 4 | REZULTATI | 28 |
| 4.1 | Citotoksičnost raguzinina | 28 |
| 4.2 | Raguzinin zaustavlja stanice u fazi G2 ciklusa stanice | 29 |
| 4.3 | Raguzinin aktivira programiranu smrt stanice | 30 |
| 4.4 | Citotoksični učinak raguzinina ovisi o koncentraciji glutaciona u stanici..... | 33 |
| 4.5 | Glutation nema ulogu stabilizatora oksidativno-reduktivnog sustava stanica HeLa tretiranih raguzininom | 35 |
| 4.6 | Glutation je uključen u detoksikaciju raguzinina..... | 38 |
| 5 | RASPRAVA | 40 |
| 6 | ZAKLJUČCI..... | 45 |
| 7 | LITERATURA..... | 46 |
| 8 | ŽIVOTOPIS | 53 |

KORIŠTENE KRATICE

1xABB – 1x pufer za vezanje aneksina (engl. *1x Annexin-Binding Buffer*)

ADP – adenzin difosfat (engl. *Adenosine Diphosphate*)

Apaf-1 – apoptozni proteazni aktivirajući čimbenik 1 (engl. *Apoptotic protease activating factor 1*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

Bak – bcl-2 homologni protein antagonist/protein ubojica (engl. *Bcl-2 homologous antagonist/killer protein*)

Bax – bcl-2 povezani x protein (engl. *Bcl-2-associated X protein*)

Bcl-2 – B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

Bcl-xl – iznimno veliki B-stanični limfom protein (engl. *B-cell lymphoma-extra large*)

Bid – protein koji promovira smrt, agonist BH3-reagirajuće domene (engl. *BH3-interacting-domain death agonist*)

bp – broj parova baza (engl. *base pairs*)

BSO – L-butionin sulfoksimin (engl. *Buthionine Sulfoximine*)

Cys – cistein (engl. *Cysteine*)

Cyt c – citokrom c (engl. *Cytocrome c*)

dATP – deoksiadenozin trifosfat (engl. *Deoxyadenosine Triphosphate*)

DISC – signalni kompleks koji inducira smrt (engl. *Death-Inducing Signalling Complex*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

EGF – epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*)

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*)

eIF-2 α – alfa podjedinica eukariotskog inicijacijskog čimbenika 2 (engl. *eucaryotic Initiation Factor – 2 alpha*)

ER – endoplazmatski retikulum (engl. *Endoplasmic Reticulum*)

Erk-1 – izvanstaničnim signalima regulirana kinaza 1 (engl. *Extracellular signal-regulated kinase-1*)

ETA – etakrina kiselina (engl. *Etacrynic Acid*)

FADD – Fas-povezani protein sa domenom za smrt (engl. *Fas-Associated protein with Death Domain*)

FasL – Fas Ligand (engl. *Fas Ligand*)

FITC – fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)

GABA – gama-aminobutirenska kiselina (engl. *Gamma-Aminobutyric Acid*)

Gly – glicin (engl. *Glycine*)

GS – GSH-sintetaza, glutation sintetaza (engl. *GSH-synthetase*)

GSH, γ -glu-cys-gly – glutation, reducirani oblik (engl. *Glutathione*)

GSSG – glutation disulfid, oksidirani oblik (engl. *Glutathione disulfide*)

IC₅₀ – ona koncentracija spoja koja je potrebna da se promatrani biološki efekt smanji za pola (engl. *50% Inhibitory Concentration*)

kaspaza – cistein-aspartička proteaza (engl. *cysteine-aspartic protease*)

MAPK – mitogenom-aktivirana proteinska kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

mGSH – mitohondrijski glutation (engl. *mitochondrial GSH*)

MRP –protein otpornosti na više lijekova (engl. *Multidrug-Resistant Protein*)

MTT - 3-(4,5-metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (engl. *(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)*)

NAC – natrijev acetilcistein (engl. *N-acetylcysteine*)

NF κ B – nuklearni čimbenik- κ B (engl. *Nuclear Factor-Kappa B*)

P-gp – P-glikoprotein (engl. *P-glycoprotein*)

p53 – tumorski protein 53 (engl. *tumour protein 53*)

PARP – poli(ADP-riboza) polimeraza (engl. *Poli ADP-Ribose Polymerase*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

PI – propidij jodid (engl. *Propidium Iodide*)

PM – proteinski marker (engl. *Protein Marker*)

prokaspaza – pro-cistein-aspartička proteaza (engl. *pro-cysteine-aspartic protease*)

RNaza A – Ribonukleaza A (engl. *Ribonuclease A, RNase A*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

rpm – broj okretaja u minuti (engl. *rounds per minute*)

SERCA – Ca²⁺-ATPaza sarko/endoplazmatskog retikuluma (engl. *Sarco/Endoplasmatic Reticulum Ca²⁺-ATPase*)

SL – seskviterpen lakton (engl. *Sesquiterpene Lactone*)

tBid – okrnjeni Bid protein (engl. *truncated Bid*)

tempol – 1-oksil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroksipiperidin, mimetik* enzima superoksid dismutaze

TNF, TNF- α – tumorski nekrozni čimbenik (engl. *Tumor Necrosis Factor /alpha*)

γ -GCS – γ -glutamilcistein sintetaza (engl. *γ -Glutamylcysteine Synthetase*)

γ -glu-cys – γ -glutamilcistein (engl. *γ -glutamylcysteine*)

*mimetik – onaj koji kopira ili se prikazuje kao isti

1 UVOD

1.1 Tumori

Tumori su, uz kardiovaskularne bolesti, najčešći uzrok smrti današnje populacije (Mitra *i sur*, 2015; Ramaswami *i sur*, 2013). Donedavno su bili smatrani samo nenormalnim izrastima nekontrolirano dijelećih stanica. Međutim, novija istraživanja pokazala su da su tumori mnogo kompleksniji. Naime, to su složena tkiva sastavljena od više tipova stanica koje su, ne samo u međusobnoj interakciji, već i interakciji sa stanicama koje ih okružuju i čimbenicima koji zajedno čine tumorski mikrookoliš. Nastali su od normalnih stanica koje su stekle nove karakteristike nakupljanjem mutacija. Karakterizira ih nekontrolirani rast, izbjegavanje programirane smrti stanice i starenja, izbjegavanje imunosnog odgovora organizma, angiogeneza, besmrtnost i invazivnost. Nakupljanjem mutacija i stjecanjem novih karakteristika, stanice prolaze kroz proces karcinogeneze koji može završiti pojavom malignog tumora (Hanahan i Weinberg, 2011).

Glavnim pokretačima i važnim čimbenicima napretka tumorigeneze u zdravim stanicama smatraju se mutacije. Dijelimo ih na prateće i pogonske. Pratećim mutacijama (engl. *passenger*) smatramo one koje ne rezultiraju direktno nastankom promjena karakterističnih za tumore. One mogu uzrokovati promjene u tkivima, ali ne dovode do razvoja tumorigenog ili malignog svojstva. S druge strane, pogonske mutacije (engl. *driver*) su promjene koje "okidaju" tumorigenezu stanice. Nastaju u genima čiji produkti sudjeluju u procesima rasta stanice, preživljavanja i održavanju stabilnosti genoma te rezultiraju stjecanjem obilježja karakterističnih za tumorske stanice (Slika 1.) (Hanahan i Weinberg, 2011). Transformirane tumorske stanice u prosjeku sadrže između dvije do osam pogonskih mutacija (Vogelstein *i sur*, 2013).



Slika 1. Obilježja stanica tumora. Preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg, 2011.

Ovisno kada su se mutacije dogodile, mogu se podijeliti na urođene i stečene. Urođene mutacije prenose se s roditelja na potomke, dok stečene nastaju za vrijeme života. Stečene mutacije događaju se spontano tijekom rasta stanice, njezine diobe, održavanja stabilnosti genoma i sličnih unutarstaničnih procesa, ali mogu biti potaknute i izvanstaničnim čimbenicima poput konzumacije duhanskih proizvoda i alkohola, izloženosti kemikalijama u hrani i okolišu, izloženosti različitim oblicima zračenja i slično. Za pojedine čimbenike postoje dokazi da povećavaju stopu mutacija. Samim time povećana je vjerojatnost nastanka pogonskih mutacija, čime tumore i rizične čimbenike dovodimo u korelacijsku vezu (Dieterich *i sur*, 2014; Hanahan i Weinberg, 2011).

U posljednjih 50 godina postignut je veliki napredak u području istraživanja malignih tumora (Shewach i Kuchta, 2009). Velika novčana sredstva ulažu se u prevenciju i liječenje. Nadalje, stopa preživljenja bolesnika s dijagnosticiranim rakom ovisi o njegovom tipu i stadiju (Ramaswami *i sur*, 2013). Podaci pokazuju da u svijetu

najveći broj muškaraca umire od raka pluća, prostate, zatim raka debelog crijeva, rektuma i melanoma, dok žene najviše umiru od raka pluća, dojke, raka vrata maternice te debelog crijeva i rektuma (Miller *i sur*, 2016).

1.2 Liječenje tumora

Danas se još uvijek većina tumora liječi kirurškim zahvatom, kemoterapijom i radioterapijom. Bolesnici nerijetko primaju više tipova terapija, jer su kombinirani pristupi liječenja uspješniji, pogotovo kod metastazirajućih tumora. Na žalost, bez obzira na napredak u dijagnostici, liječenju, aktivnijem i zdravijem načinu života, smrtnost uzrokovana rakom je još uvijek vrlo visoka. Glavni razlog tome možemo prikazati vrlo jednostavnom rečenicom iz stripa "Pogo" Walt Kelly-ja: „*Upoznali smo neprijatelja, i on je mi,...*“. U prijevodu, stanice tumora su naše vlastite transformirane stanice, što znači da su neizmerno slične i koriste iste metaboličke putove kao zdrave stanice našeg tijela (Mitra *i sur*, 2015; Ramaswami *i sur*, 2013), pa je teško pronaći terapiju koja bi diferencijalno ciljala samo tumorske stanice, a ne i zdrave.

Kirurško izrezivanje i fizičko odstranjivanje najstarija je i najučinkovitija metoda liječenja solidnih tumora ako je dijagnosticiran pravovremeno i u potpunosti uklonjen. Međutim, ako se dijagnosticira u kasnijim stadijima razvoja tumorske bolesti kada je tumor većih dimenzija, ne može biti lokaliziran, metastazirao ili se želi smanjiti mogućnost pojave recidiva, primjenjuju se druge metode liječenja poput radioterapije, imunoterapije, kemoterapije, terapije matičnim stanicama i druge (Baskar *i sur*, 2012).

U radioterapiji se koristi ionizirajuće zračenje kako bi se tumor uklonio ili smanjio. Postoje gama zrake i protonsko zračenje, a cilj je oštetiti DNA i ubiti stanice tumora. Električno nabijene čestice prolaze kroz tkivo i pritom ga oštećuju. Zbog toga je važno da su ioni precizno usmjereni, kako bi se smanjila oštećenja zdravog tkiva. Ako zdravo tkivo ipak bude zahvaćeno, ono često ima bolju sposobnost popravljivanja oštećenja, zbog čega nerijetko preživi zračenje i oporavi se. Međutim, višestruka izlaganja ionizirajućem zračenju vrlo često nepovratno oštećuju zdravo tkivo. Ako se koristi prije kirurškog zahvata, zračenje ima ulogu smanjenja dimenzija tumora. Može

se koristiti i nakon kirurškog liječenja tumora, međutim tada služi za uklanjanje preostalih stanica tumora i sprječavanje recidiva (Baskar *i sur*, 2012).

Imunoterapija je vrsta liječenja pri kojemu se nastoji obnoviti, stimulirati ili pojačati prirodna protutumorska funkcija imunološkog sustava pacijenta. Može biti aktivna - kada se potiče stvaranje specifičnih stanica imunološkog sustava potrebnih za imunološku reakciju, pasivna – prijenos protutijela sintetiziranih u drugom organizmu, i adoptivna – prijenos cijelih senzibiliziranih stanica (npr. infuzija donorskih limfocita (Baskar *i sur*, 2012).

U hormonskoj terapiji liječenje se temelji na sprječavanju rasta i napredovanja tumorske bolesti kontroliranjem aktivnosti hormona uključenih u navedene procese. Pritom se koriste lijekovi poput tamoksifena, toremifena, fulvestranta itd. (Cuzick *i sur*, 2015). Međutim, u klinici se, uz kirurško odstranjivanje tumora, i dalje najčešće primjenjuje kemoterapija (Baskar *i sur*, 2012).

1.2.1 Kemoterapija

Kemoterapija je liječenje tumora primjenom kemijskih spojeva (citostatika). Promjenom strukture DNA polimeraze i topoizomeraza I/II, inhibicijom njihovog enzimatskog djelovanja, uvođenjem dvolančanih lomova i drugih oštećenja te ometanjem sinteze DNA, funkcije sustava za popravak DNA, signaliziranja ili utjecanjem na mehanizam membranskih pumpi pokušava se potaknuti apoptotska smrt stanice tumora (Shewach i Kuchta, 2009). Prema tipu djelovanja, kemijske spojeve koji se koriste u kemoterapiji možemo podijeliti na alkilirajuća sredstva, antimetabolite, protutumorske antibiotike, inhibitore topoizomeraza, inhibitore mitoze i druge. Koji kemoterapeutik će bolesnik primiti ovisi o tipu tumora, njegovoj proširenosti i lokalizaciji te općem stanju bolesnika, dok s druge strane trajanje i način primjene kemoterapije ovise o odabranom kemoterapeutiku i rezultatima liječenja. Posljednjih nekoliko godina sve je veća pažnja usmjerena k molekularnom profiliranju bolesnika s tumorom koje se temelji na činjenici da je svaki tumor drugačiji te da terapiju treba odabrati prema molekularnim promjenama unutar stanica tumora. Liječenje bolesnika je na taj način personalizirano, a rezultat terapije

često uspješniji (manji broj ciklusa terapije) i s manje neželjenih popratnih pojava (Capdevila *i sur*, 2017).

Alkilirajući kemoterapeutici skupina su spojeva s jednom ili više alkilnih grupa u kemijskoj strukturi. Prvi alkilirajući spoj, dušikov iperit, koristio se kao kemijsko oružje u Prvom svjetskom ratu. Nakon rata krenula je njegova klinička primjena u liječenju zloćudnih tumora. Mehanizam djelovanja alkilirajućih sredstava temelji se na mogućnosti vezanja alkilnih grupa na biološke molekule. Vezanjem na molekule poput DNA, glutationa i drugih, alkilirajući spojevi izazivaju točkaste mutacije, ometaju transkripciju i replikaciju DNA, funkciju i metabolizam vezanih proteina te na taj način potiču programiranu smrt tumorskih, ali često i zdravih stanica. Alkilirajući kemoterapeutici koji se danas koriste u terapiji su altretamin, busulfan, karmustin, klorambucil, ciklofosamid, dakarbazin, lomustin, malfalan, temozolomid. Međutim, danas su najšire primjenjivi oni alkilirajući spojevi koji u svojoj strukturi imaju atom platine kao što su cisplatina, karboplatina i oksaliplatina (Brozovic, 2017; Warwick, 1963).

Antimetaboliti (5-fluorouracil, gemcitabin, kapacitabin, merkaptopurin, metotreksat itd.) su lijekovi čija je kemijska struktura vrlo slična biološki važnim molekulama u organizmu poput dušičnih baza i folne kiseline. U slučaju analoga dušičnih baza, tijekom sinteze bivaju ugrađeni u strukturu DNA umjesto uobičajenih baza i zbog svoje kemijske strukture blokiraju daljnju sintezu. Na taj način zaustavlja se rast tumorske stanice (Kaye, 1998).

Protutumorski antibiotici (daunorubicin, doksorubicin, epirubicin, idarubicin, aktinomicin-D, bleomicin, mitomicin-C itd.), inhibitori topoizomeraza (topotekan, irinotekan, etopozid itd.) i inhibitori mitoze (paklitaksel, vinkristin, vinblastin itd.) inhibiraju rast i diobu stanice, zaustavljajući tako daljnji rast tumora.

Međutim, zbog često vrlo nespecifičnog djelovanja kemoterapeutika, štetnih učinaka na zdrave stanice i razvoja otpornosti stanica tumora na primjenjivanu kemoterapiju, znanstvenici su u potrazi za preciznijim i učinkovitijim metodama liječenja (Miller *i sur*, 2016).

1.2.2 Otpornost na kemoterapiju

Iako je napredak u liječenju zloćudnih tumora u posljednjih 50 godina itekako vidljiv, i dalje najveći problem ostaje razvoj otpornosti na kemoterapiju. Otpornost stanica tumora na terapiju može se razviti već tijekom tumorigeneze. No, u najvećem broju slučajeva otpornost se razvije tijekom ili nakon terapije. Molekularni mehanizmi otpornosti mogu biti različiti, kao što su niska koncentracija citostatika unutar stanice zbog njegovog smanjenog unosa ili pojačanog izbacivanja, modulacija detoksikacijskog mehanizma stanice koja rezultira smanjenom biološkom raspoloživošću citostatika u stanici, učinkovitiji mehanizmi popravka oštećenja DNA, odupiranje programiranoj smrti stanice uzrokovanoj promjenom signalnih puteva aktivacije itd. (Housman *i sur*, 2014).

1.2.3 Kemoterapeutici izolirani iz biljaka

Uloga biljaka u liječenju ozljeda, poremećaja i bolesti je oduvijek bila vrlo velika i značajna (Duan *i sur*, 2010; Ghantous *i sur*, 2010; van Haaften *i sur*, 2015; Ko *i sur*, 2005; Kretschmer *i sur*, 2012; Lohberger *i sur*, 2013; Saeed *i sur*, 2015; Sun *i sur*, 2003). Razvojem znanosti, medicine i kemijske industrije početkom 20. stoljeća, počela je potraga za učinkovitijim i dostupnijim terapijama, kako za brojne druge bolesti, tako i za zloćudne tumore. Iako je interes za otkrivanje novih kemoterapeutika bio velik, zbog dugotrajnih biokemijskih analiza, pretkliničkih i kliničkih istraživanja, prvi protutumorski lijekovi uvedeni su na tržište tek više desetaka godina nakon otkrića aktivne tvari. Prvi otkriveni bili su vinka alkaloidi – vinkristin i vinblastin, izolirani iz biljke *Catharanthus roseus* L. (madagaskarski zimzelen). Upravo nakon njihovog otkrića uslijedio je ogroman porast interesa za istraživanje novih i već prethodno istraživanih biljnih supstanci u cilju pronalaska potencijalnih citostatika. U sljedećih pola stoljeća otkriveni su brojni kemoterapeutski spojevi od kojih su neki još uvijek primjenjuju, poput paklitaksela, prvi put izoliranog iz biljke *Taxus brevifolia* Nutt. (paciifičke tise). Međutim, kod spojeva izoliranih iz biljaka, najveći je problem nabava resursa. U slučaju paklitaksela, bilo je izračunato da je za

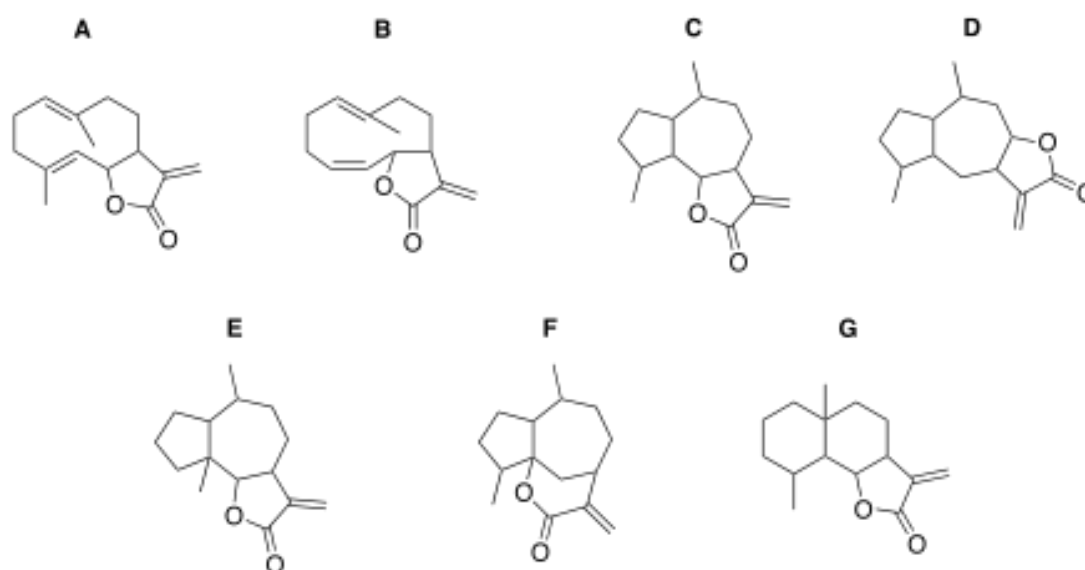
jedan kilogram spoja potrebno oguliti koru i tako uništiti između 2000 i 3000 stabala pacifičke tise. Ipak, znanstvenici su nekoliko godina kasnije pronašli način da polusintetskim putem dobiju dovoljne količine paklitaksela iz igličastih listova europske tise (*Taxus baccata* L.). Danas je paklitaksel glavna aktivna tvar protutumorskog lijeka Taxol®-a koji je ujedno jedan od najprodavanijih lijekova za liječenje karcinoma jajnika, dojke, pluća i Kaposijeva sarkoma. Osim spomenutih alkaloida i taksana, iz biljaka su izolirani i poznati protutumorski spojevi poput kamptotecina, podofilotoksina, roskovitina, maitansina, tapsigargina, terpena partenolida, artemizina i drugih (Cragg i Newman, 2005; Zhang *i sur*, 2005).

1.2.4 Seskviterpen laktoni

Seskviterpen laktoni (SL), skupina su više desetaka tisuća različitih spojeva koje nalazimo u dvadesetak biljnih porodica (*Apiaceae*, *Magnoliaceae*, *Laureaceae* i druge). Međutim, najbrojniji su i najvažniji sekundarni metaboliti biljaka porodice glavočika (*Asteraceae*), točnije rodova *Artemisia*, *Arnica*, *Ambrosia*, *Helenium*, *Tanacetum*, *Vernonia* i *Parthenium* (Amorim *i sur*, 2013; Ivanescu *i sur*, 2015). Već stoljećima se biljke iz porodice *Asteraceae* koriste u tradicionalnoj medicini pri liječenju brojnih bolesti i ozljeda (Ivanescu *i sur*, 2015; Lohberger *i sur*, 2013; Politeo *i sur*, 2012; Radić *i sur*, 2013; Zaghoul *i sur*, 2014). SL-i su bezbojni i gorkoga okusa, zbog čega biljci služe kao sredstva za privlačenje ili češće za odvratanje organizama. Najčešće su izolirani iz lišća i cvjetova, međutim kod porodice *Asteraceae* velike količine SL-a nalazimo i u dlakama.

SL-i se biosintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu iz tri izoprenske jedinice putem farnezil pirofosfata. Njihov lipofilni karakter rezultat je terpenoidne strukture nastale od 15 cikliziranih i oksidativno transformiranih ugljikovih atoma. Svi SL-i imaju α - β -nezasićeni ostatak, peteročlani laktonski prsten s karbonilnom grupom. Međutim, iako se ona smatra vrlo važnom, a po nekima čak i nužnom za citotoksičnost svakog SL-a, drugi pak tvrde da su za različiti učinak SL-a na tumorske stanice odgovorne druge funkcionalne grupe unutar njihove strukture i sama biodostupnost spoja unutar stanice (Amorim *i sur*, 2013; Chadwick *i sur*, 2013; Heilmann *i sur*, 2001).

Na temelju kemijskih i strukturnih karakteristika, SL-i su podijeljeni u nekoliko skupina (Slika 2.). Germakranolidi su najpoznatiji zbog svoje upotrebe u liječenju raznih bolesti te imaju prsten s deset ugljikovih (C) atoma. Guaianolidi imaju dva prstena sa sedam i pet C atoma, ali ih karakterizira metilna grupa na poziciji C-4. Struktura pseudoguaianolida jednaka je strukturi guaianolida, ali je karakteristična metilna skupina na poziciji C-5. Eudesmanolidi imaju dva spojena šesteročlana prstena.



Slika 2. Struktura najpoznatijih skupina seskviterpen laktona. A) Germakranolidi B) Heliangolidi C+D) Guaianolidi E) Pseudoguaianolidi F) Hipokretenolidi G) Eudesmanolidi.

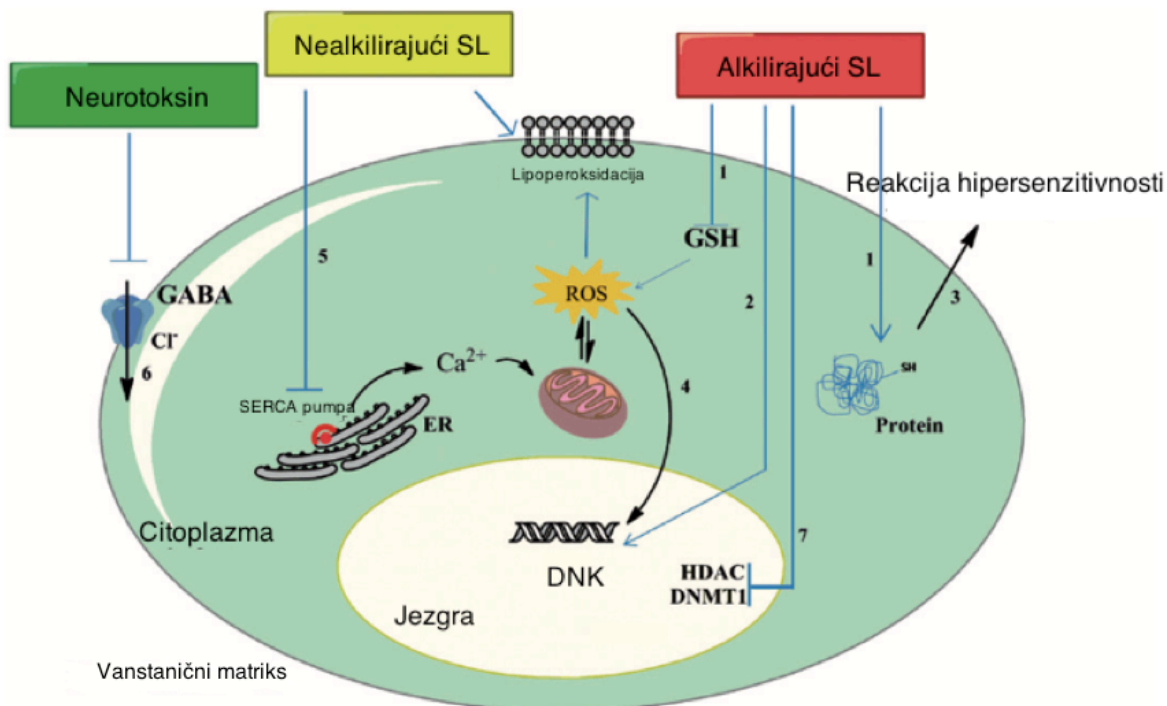
Preuzeto iz Seaman, 1982.

Ono što skupinu seskviterpen laktona čini zanimljivom jest da dokazano imaju širok spektar bioloških aktivnosti koji uključuje citotoksični, protuupalni, antibakterijski, antigljivični, antivirusni, antidepresijski i antiproliferativni učinak na normalne i tumorske stanice. Najpoznatiji i dosad najviše istražen SL je artemizin koji se koristi u liječenju malarije, dok je drugi najpoznatiji iz skupine germakranolida – kostunolid još uvijek u fazi istraživanja potencijalne primjene (Duan *i sur*, 2010; Sun *i sur*, 2003; Zhang *i sur*, 2005).

1.3 Molekularni mehanizmi djelovanja seskviterpen laktona

SL-i su najprije bili poznati po vrlo toksičnom djelovanju na stoku. Njihovom konzumacijom, stoka je nerijetko umirala, a stočari su doživljavali velike financijske gubitke. Međutim, znanstvenici su s godinama uvidjeli potencijalnu ulogu SL-a u liječenju zloćudnih tumora. Prema mehanizmu djelovanja, SL-i se mogu podijeliti na alkilirajuće, nealkilirajuće i neurotoksine (Amorim *i sur*, 2013).

Najčešćim mehanizmom protutumorskog djelovanja SL-a smatra se alkilacija. Kovalentnim vezanjem na sulfhidrilnu skupinu enzima i drugih funkcionalnih proteina Michaelovom adicijom elektrofilnih α - β -nezasićenih karbonilnih ostataka, SL-i alkiliraju i tako ometaju funkciju biomolekula na koje se vežu (DNA, proteina, itd). Osim spomenute alkilacije biomolekula, SL-i mogu inhibirati membranske transportere, inhibirati signalni put p53 i NF κ B, modulirati epigenetičke promjene genske ekspresije, ometati stanični redoks sustav promjenom koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i slobodnog glutationa u stanici, izazvati oštećenja DNA stvaranjem ROS-a ili djelovati na sintezu i strukturu određenih receptora i transkripcijskih faktora te na taj način inhibirati metastaziranje i angiogenezu tumorskih stanica (Slika 3.) (Amorim *i sur*, 2013; Chadwick *i sur*, 2013).

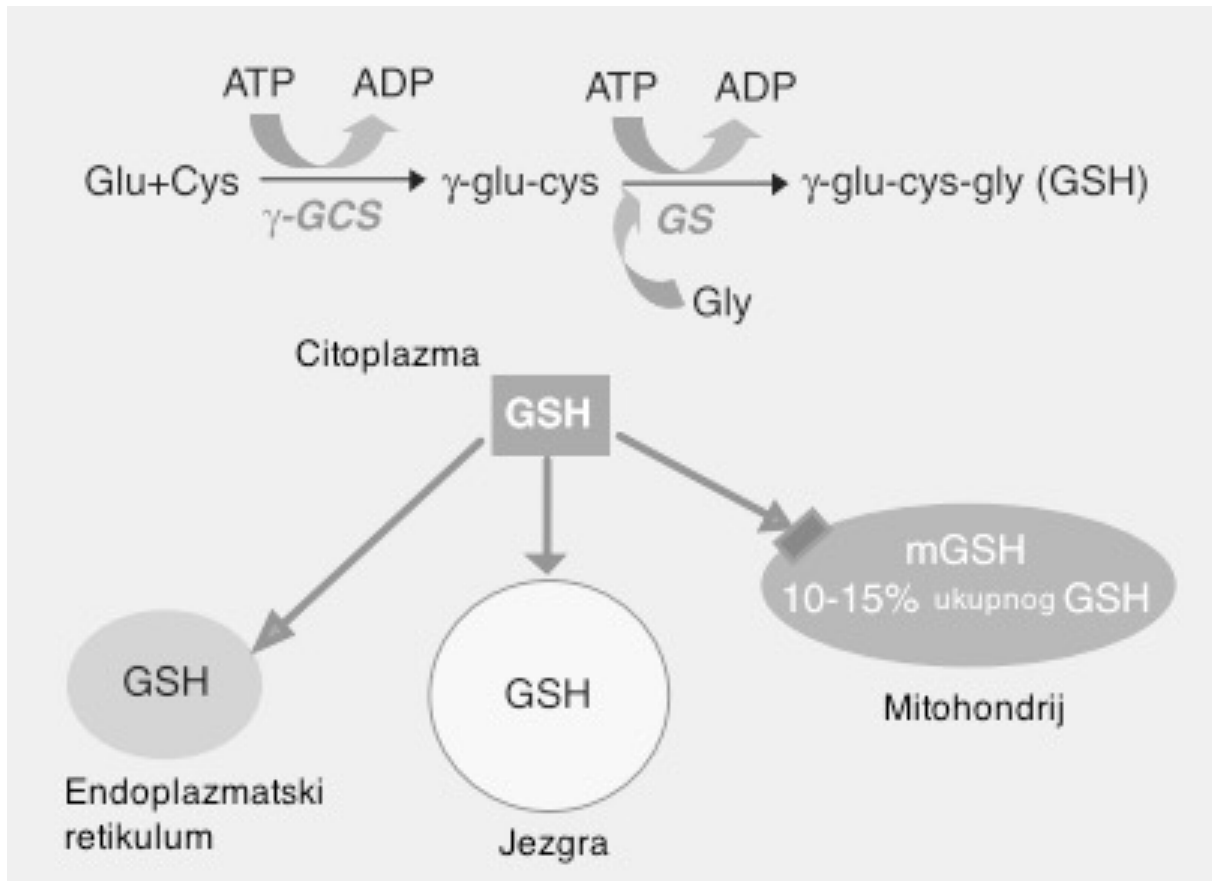


Slika 3. Najčešći mehanizmi djelovanja SL-a u stanici. 1) Alkilacija proteina i glutationa (GSH) što rezultira promjenom njihove funkcije i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta; 2) Alkilacija DNA; 3) Hipersenzitivna reakcija (negativna reakcija imunskog sustava) alkiliranih proteina pri čemu oni postaju "strana tijela" te se izbacuju iz stanice; 4) Oštećenje DNA izazvano produktima oksidativnog stresa; 5) Blokiranje pumpi SERCA, što rezultira nakupljanjem citoplazmatskog Cl⁻, zbog čega dolazi do neravnoteže koncentracije ROS-a u mitohondriju; 6) Neravnoteža transporta Cl⁻ u stanicu zbog antagonističkog djelovanja na receptor GABA; 7) Ometanje epigenetičkih procesa. Preuzeto i prilagođeno iz Amorim *i sur*, 2013.

1.4 Glutation

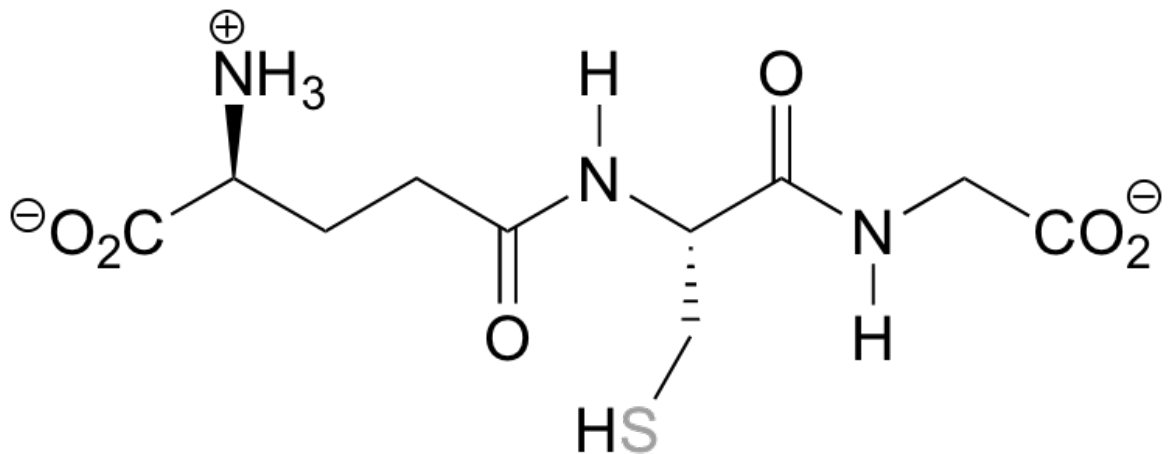
Glutation (GSH) je dehidrogenirajući tripeptid koji se sastoji od tri aminokiseline: glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Sintetizira se u citoplazmi u dva koraka koja zahtijevaju potrošnju ATP-a. Prvi korak rezultira sintezom γ -glutamilcisteina iz glutamata i cisteina pomoću enzima γ -glutamilcistein sintetaze. U drugom koraku, GSH sintetaza koristi produkt prve reakcije i glicin kako bi katalizirala

sintezu glutationa. Iako se sintetizira u citosolu, GSH nalazimo i u drugim staničnim organelima poput mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i jezgre (Slika 4.) (Marí *i sur*, 2009).

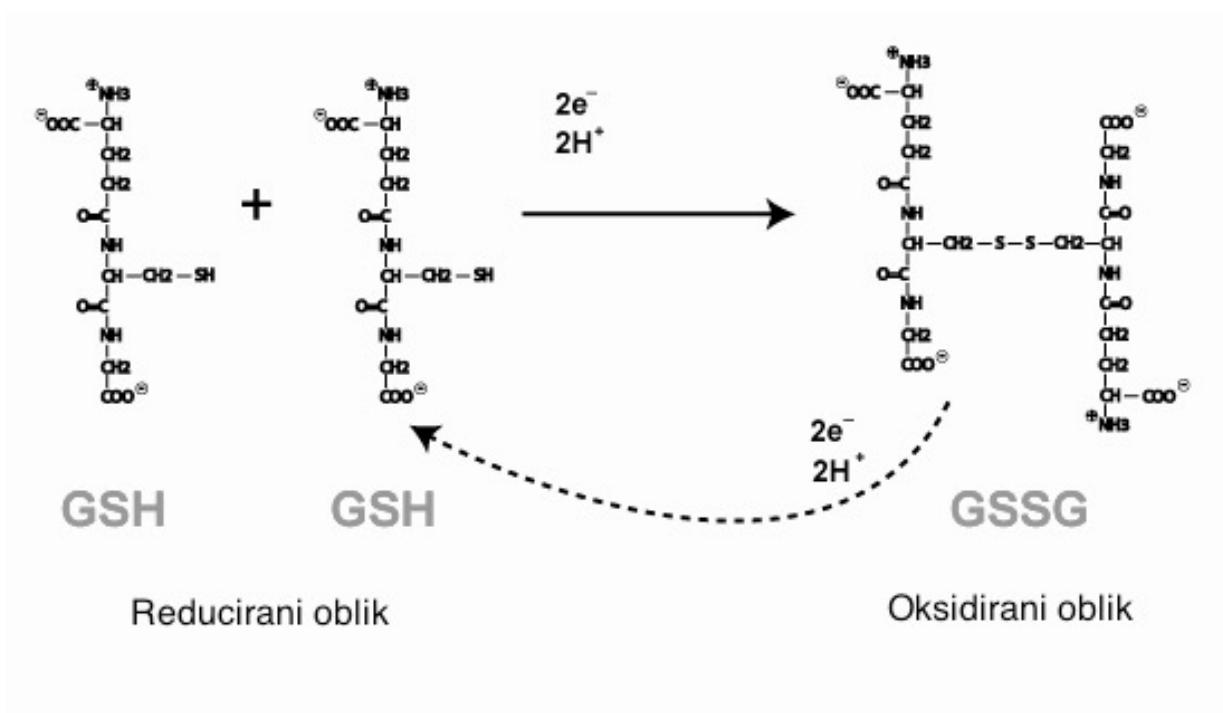


Slika 4. Sinteza i raspodjela glutationa u stanici. Preuzeto i prilagođeno iz Marí *i sur*, 2009.

Većina glutationa u stanici je u reduciranom obliku (GSH) (Slika 5.), međutim on lako dehidrogenira i prelazi u oksidirani disulfidni oblik (GSSG) (Slika 6.), koji je u stanici prisutan u količini manjoj od jedan posto. Omjer ta dva oblika određuje stanični redoks status koji je usko povezan s oksidacijsko-redukcijskim svojstvima staničnog organela/odjeljka u kojemu se nalaze. Glutation je upravo zbog toga važan stanični antioksidans koji sprječava oštećenja DNA. Međutim, novija istraživanja pokazala su da ima ulogu medijatora u mnogim fiziološkim reakcijama poput metabolizma ksenobiotika, u tiol-disulfidnim reakcijama izmjene, staničnoj signalizaciji i drugima (Aquilano *i sur*, 2014; Marí *i sur*, 2009; Schmitt *i sur*, 2015).



Slika 5. Kemijska struktura glutationa (GSH). Preuzeto i prilagođeno iz Bouligand *i sur*, 2007.



Slika 6. Reducirani i oksidirani oblik glutationa. Preuzeto i prilagođeno iz Bouligand *i sur*, 2007.

1.4.1 Uloga glutationa u regulaciji rasta i razvoja tumorskih stanica

Mitochondrij je najveći potrošač kisika u stanici. U njemu se događa važan metabolički proces – disanje stanice, kojim se stvara velik broj reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Reaktivne kisikove vrste su međuprodukti staničnog metabolizma, koji, ako nastanu u količinama iznad staničnog oksidativnog kapaciteta, mogu negativno djelovati na funkciju drugih molekula u stanici poput lipida, proteina i DNA. Kako bi mitochondrij i drugi stanični organeli izbjegli oštećenja izazvana ROS-om i zadržali svoju funkciju, u njima je neprestano aktivan antioksidativni mehanizam obrane. Glavni antioksidansi mitochondrija, ali i drugih organela su glutation, glutaredoksin i tioredoksin (Marí *i sur*, 2009).

Oksidativni stres smatra se glavnim uzročnikom neravnotežnog stanja redoks sustava stanice. Stanje u kojem količina nastalih ROS-ova prelazi stanični oksidativni kapacitet može biti vrlo štetno za stanicu te se često povezuje s velikim brojem patoloških stanja, bolesti i poremećaja organizma. U stanicama zloćudnih tumora vrlo su često zabilježene povišene razine GSH, koje ih nerijetko čine i otpornima na citostatike (Marí *i sur*, 2009; Thannickal i Fanburg, 2000). S druge strane, tretmani u kojima je L-butionin sulfoksiminom (BSO) snižena koncentracija GSH, učinili su tumorske stanice osjetljivijima na radioterapiju i kemoterapiju (Griffith i Meister, 1979).

Bolesti i poremećaji povezani sa sintezom, transportom, raspodjelom, dostupnošću glutationa i njegovim kemijskim vezanjem s drugim tvarima, najčešće se liječe primjenom različitih prekursora sinteze glutationa (N-acetil cistein, L-butionin sulfoksimin), inhibitora membranskih pumpi (probenecid) i antioksidansa (Atkuri *i sur*, 2007; Drew i Miners, 1984; Homolya *i sur*, 2003; Schmitt *i sur*, 2015; Wen *i sur*, 2002).

1.5 Smrt stanice

Smrt stanice može biti sastavni dio fizioloških procesa ili odgovor na određena patološka stanja. Može biti neprogramirana i programirana, kao dio procesa

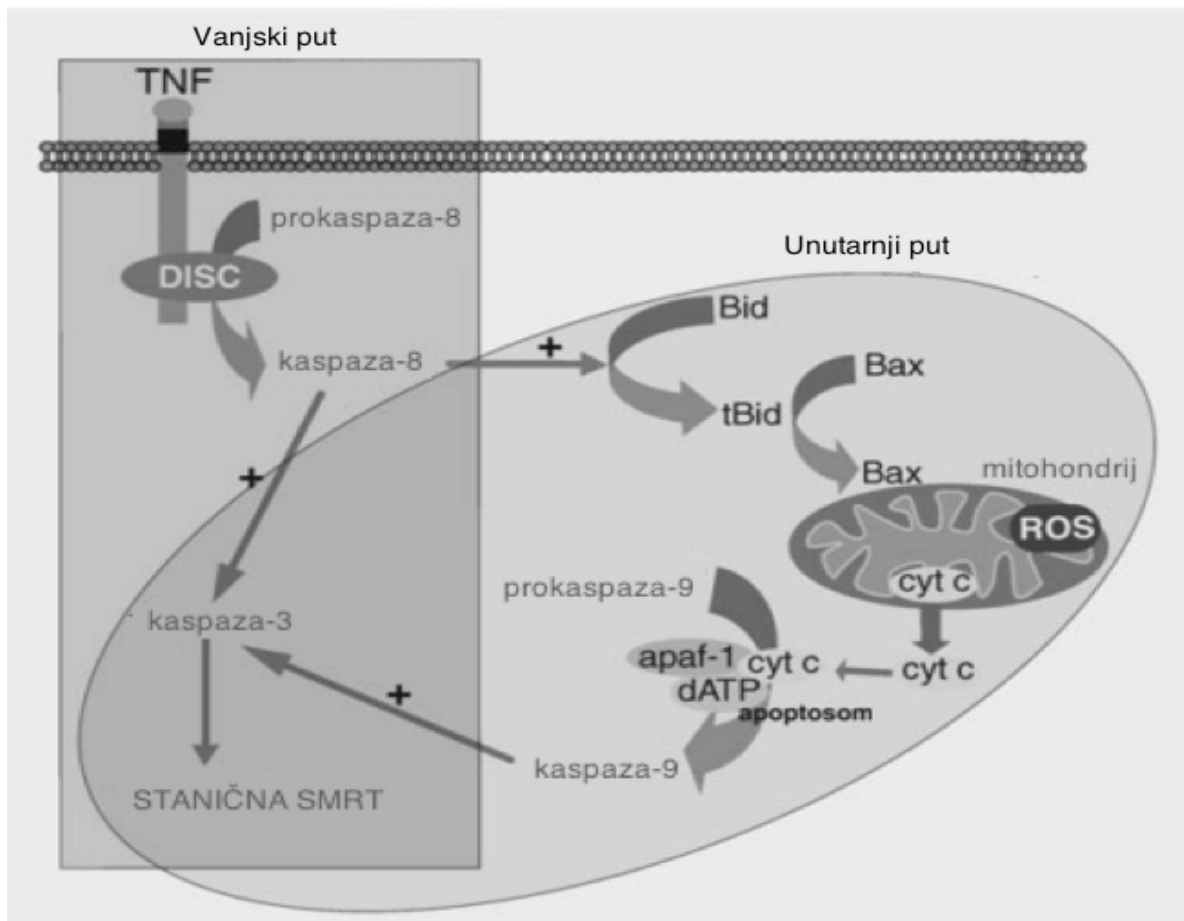
embrionalnog razvoja, razvoja imuniteta i slično. S obzirom na morfološki izgled stanice, smrt stanice se može definirati kao nekroza, apoptoza, autofagija ili smrt povezana s mitozom. Međutim, danas je poznato da postoje još i piroptoza, anoikis, onkoza, kornifikacija, mitotska katastrofa, nekroptoza i drugi oblici smrti (Tait *i sur*, 2014; Trump *i sur*, 1997).

Nekroza se javlja kao posljedica izravnog oštećenja membrane nastalog djelovanjem fizikalno-kemijskih čimbenika. Stanica bubri zbog narušene ravnoteže koncentracija iona unutar i izvan stanice, stanični organeli i membrane se raspadaju, uzrokujući istjecanje staničnog sadržaja u okolno tkivo. Sastojci staničnog sadržaja pokreću upalne procese, čiji produkti (enzimi, ROS) oštećuju zdravo tkivo i nerijetko uzrokuju veća oštećenja tkiva (Elmore, 2007).

Apoptoza, također poznata kao najčešći tip programirane smrti stanice, poseban je oblik smrti koji karakteriziraju biokemijske i morfološke promjene stanice. Stanica se vidno smanjuje, kromatin se kondenzira, a kasnije i fragmentira. Ako stanica ne bude fagocitirana od strane fagocita, apoptoza se nastavlja promjenom oblika stanične membrane koja postaje mjehurasta. Nastali mjehuri često sadrže ostatke kromatina i staničnih struktura te se nazivaju "apoptotska tijela". Apoptoza se razlikuje od nekroze po tome što se odvija na vrlo uskom području, strogo je kontrolirana i ne uzrokuje upalu. Ovisno odakle je signal pristigao, mehanizam pokretanja apoptoze možemo podijeliti na unutarnji i vanjski (Elmore, 2007; Hassan *i sur*, 2014).

Vanjski put apoptoze započinje vezanjem molekule TNF liganda na TNF membranski receptor i trimerizacijom preko molekule FADD. Vezanjem FADD na prokaspazu 8 dolazi do stvaranja kompleksa DISC i cijepanja prokaspaze 8, odnosno aktivacije kaspaze 8 i okidanja signalne kaskade. U kaskadi sudjeluju prokaspaze/kaspaze koje dijelimo na pokretačke (prokaspaze 2, 8, 9 i 10) i izvršne (kaspaze 3, 6 i 7). Osim što cijepaju druge prokaspaze, kaspaze cijepaju i brojne proteine od kojih je najpoznatiji PARP. Proteini bivaju pocijepani i deaktivirani, kako ne bi došlo do spontane aktivacije nekrotske smrti stanice ili drugih neželjenih procesa (Slika 7.) (Elmore, 2007; Green i Llambi, 2015; Hassan *i sur*, 2014; Kiraz *i sur*, 2016).

Unutarnji put apoptoze posredovan je velikom skupinom membranskih proteina obitelji Bcl-2. Dijelev se na proapoptotske (Bak, Bax, Bcl-xl, ...) i antiapoptotske (Bcl-2, Bcl-w i drugi) proteine. U slučaju neravnoteže u unutarnjoj membrani mitohondrija, mijenja se transmembranski potencijal mitohondrijskih membrana i proapoptotski proteini, citokrom c i drugi kroz pore izlaze iz međumembranskog prostora mitohondrija u citosol. Tamo aktiviraju apoptotski put ovisan o kaspazama. Citokrom c veže se na medijatorske molekule (Apaf-1), formira apoptosom, koji aktivira kaspazu 9, a ona pokreće otprije opisanu signalnu kaskadu. Aktivaciju ovog puta mogu uzrokovati toksične tvari, virusne infekcije, oštećenja molekule DNA, izlaganje zračenju ili nedostatak faktora rasta (Slika 7.) (Green i Llambi, 2015; Kiraz *i sur*, 2016).



Slika 7. Vanjski i unutarnji put apoptoze. Preuzeto i prilagođeno iz Marí *i sur*, 2009.

Osim što se može dokazati vizualizacijom karakterističnih staničnih struktura pomoću svjetlosnog ili elektronskog mikroskopa, apoptozu u današnje vrijeme možemo proučavati i dokazati korištenjem brojnih drugih metoda. Protočna citometrija je izvrstan alat kojim možemo kvantificirati apoptotske i nekrotske stanice na temelju signala korištenih fluorokroma. Komet testom možemo mikroelektroforetski vizualizirati fragmente DNA pojedinačnih stanica koji su posljedica apoptotske smrti, korištenjem propidij jodida i sličnih fluorokroma. Još jedna karakteristika apoptoze je i otkrivanje fosfatidilserina, koji se kod živih stanica nalazi na unutarnjoj strani membrane stanice. Kod mrtvih stanica, on se pojavljuje i na vanjskoj strani membrane te se može dokazati afinitetnim vezanjem specifičnog antikoagulantskog proteina od 36 kDa označenog fluorokromom – Annexin-a V. Kombiniranjem navedenih proba i označavanjem stanica možemo ih sortirati prema tipu stanične smrti (Nyky i sur, 2010). Razvijene su brojne imunohistokemijske metode te metode određivanja ekspresije endonukleaza, proapoptotskih i antiapoptotskih gena (Ras, ERK-1, ...) i drugih markera apoptoze poput kaspaza (Cas 3/7), proteina (PARP) i tako dalje (Chaitanya i sur, 2010; Žlender, 2004).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati citotoksičnu aktivnost seskviterpen laktona raguzinina, izoliranog iz dubrovačke zečine (*C. ragusina* L.), koristeći stanice ljudskog raka vrata maternice (HeLa) te razjasniti molekularni mehanizam njegova djelovanja sa svrhom njegove moguće primjene u liječenju zloćudnih tumora.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

- 1) Ispitati biološko djelovanje seskviterpen laktona raguzinina na stanice HeLa.
- 2) Ispitati molekularni mehanizam djelovanja raguzinina tj. potencijalna uloga glutationa u odgovoru stanica HeLa na spoj. Pri tome će biti ispitana moguća uloga glutationa u stabilizaciji oksidativno-reduktivnog statusa stanica i u detoksikaciji.
- 3) Ispitati koju vrstu stanične smrti uzrokuje raguzinin. U tu svrhu vrsta smrti stanica biti će utvrđena mjerenjem intenziteta bojanja stanica Annexin-om V i propidij jodidom te određivanjem ekspresije proteina uključenih u staničnu smrt.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Linije stanica

Ljudske stanice raka vrata maternice (HeLa) nabavljene su iz banke staničnih kultura (GIBCO BRL, Invitrogen, SAD). Stanice su rasle kao jednoslojna kultura u Dulbeccovoj modifikaciji Eaglove hranjive podloge (DMEM) s 10 % fetalnog seruma (Lonza, Švicarska) u vlažnoj atmosferi pri 37 °C i 5 % CO₂.

3.1.2 Kemikalije

Raguzinin. U Zavodu za farmakognoziju Sveučilišta Beč izoliran je ekstrakt u etanolu iz biljke *Centaurea ragusina* L., sakupljene na području Katalinić briga i Sustipana, Split, Hrvatska. U Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković (IRB) napravljene su analize kemijskih svojstava ekstrakata te određene pojedine kemijske frakcije. Točnije, iz ekstrakata su izolirana tri flavonoida i tri seskviterpen laktona pri čemu su izdvojeni seskviterpen laktoni hemistepsin A i 3aR,4S,6aR,8S,9aR,9bR)-[dodekahidro-8-dihidroksi-3,6,9-tris(metilen)-2-okso-2(3H)-azuleno[4,5-b]furanil]-3-metil-butanoat (Zdero *i sur*, 1989), imenovan raguzinin.

Kemikalije korištene u radu navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Korištene kemikalije

| Naziv | Proizvođač |
|---|--------------------|
| 2-merkptoetanol (C ₂ H ₆ OS) | Serva, Njemačka |
| 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli bromid (MTT) (C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S) | Sigma-Aldrich, SAD |

| | |
|--|-------------------------------|
| 4-Hidroksi-TEMPO, tempol (C ₉ H ₁₈ NO ₂) | Santa Cruz Biotechnology, SAD |
| Akrilamid (C ₃ H ₅ NO) | Serva, Njemačka |
| Akrilamid smjesa 30% | Serva, Njemačka |
| Amonijev persulfat, APS ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) | Serva, Njemačka |
| Amonijev persulfat, APS 10% ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) | Serva, Njemačka |
| Annexin V-FITC | BD Biosciences, SAD |
| Bisakrilamid (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂) | Serva, Njemačka |
| Bromfenol-plavo (engl. <i>Bromphenol blue</i>) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Dimetil sulfoksid, DMSO (C ₂ H ₆ OS) | Gram Mol, Hrvatska |
| Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM</i>) | Lonza, Švicarska |
| Etakrina kiselina (C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Etanol, 96% (CH ₃ CH ₂ OH) | Kefo d.o.o., Hrvatska |
| Fiksir | Fotokemika, Hrvatska |
| Glicerol | Kemika, Hrvatska |
| Glicin (NH ₂ CH ₂ COOH) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Govedi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumine, BSA</i>) | Macherey-Nagel, Njemačka |
| IsoFlow tekućina (engl. <i>IsoFlow Sheath Fluid</i>) | Beckman Coulter Inc., SAD |
| Kalcijev klorid (CaCl ₂) | Kemika, Hrvatska |
| Kalijev hidrogen-fosfat (KH ₂ PO ₄) | Kemika, Hrvatska |
| Kalijev klorid (KCl) | Kemika, Hrvatska |
| Klorovodična kiselina (HCl) | Gram Mol, Hrvatska |
| L-butionin sulfoksimin, BSO (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₃ S) | Biochemika, Njemačka |
| Metanol (CH ₃ OH) | Gram Mol, Hrvatska |
| N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonična kiselina, HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S) | Sigma-Aldrich, SAD |
| N-acetil cistein, NAC (HSCH ₂ CH(NHCOCH ₃)CO ₂ H) | Sigma-Aldrich, SAD |
| N, N, N', N'-tetrametiletilenediamin, TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂) | Sigma-Aldrich, SAD |
| N, N, N', N'-tetrametiletilenediamin, TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Natrij-dodecil sulfat, SDS (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Natrijev hidrogen-fosfat (Na ₂ HPO ₄) | Kemika, Hrvatska |
| Natrijev klorid (NaCl) | Kemika, Hrvatska |
| Natrijeva lužina (NaOH) | Kemika, Hrvatska |
| Nemasno mlijeko u prahu | Roth, Njemačka |
| Probenecid (C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S) | Santa Cruz Biotechnology, SAD |
| Propidij jodid, PI (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄) | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| Proteinski marker (engl. <i>Protein Marker, PM</i>) | Thermo Scientific, SAD |
| Razvijač | Fotokemika, Hrvatska |
| RNaza A (engl. <i>RNase A</i>) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Salubrinal (C ₂₁ H ₁₇ Cl ₃ N ₄ OS) | Santa Cruz Biotechnology, SAD |
| Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃) | Sigma, Njemačka |

| | |
|---|-------------------------------|
| Tris-klorovodična kiselina, Tris-HCl | Merck, SAD |
| Troloks (C ₁₄ H ₁₈ O ₄) | Santa Cruz Biotechnology, SAD |
| Tween-20® (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆) | Sigma-Aldrich, SAD |
| Virocid 1% | Genera, Hrvatska |
| <i>Western Lightening® Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus</i> | PerkinElmer®, SAD |
| <i>Western Lightening® Plus ECL Oxidizing Reagent Plus</i> | PerkinElmer®, SAD |

3.1.3 Protutijela

Protutijela korištena u istraživanju navedena su u Tablici 2.

Tablica 2. Korištena protutijela

| | Specifičnost | Proizvođač | Kataloški broj |
|--------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Primarna | Cas 3 | Cell Signaling Technology (SAD) | #9662, Lot # 10 |
| protutijela | ERK1/2 (K-23) | Santa Cruz Biotechnology (SAD) | sc-94, Lot # F1615 |
| | PARP-1 | Santa Cruz Biotechnology (SAD) | sc-8007, Lot # F2816 |
| Sekundarna | Anti-mišje IgG ECL™ HRP | GE Healthcare Life Sciences (SAD) | NA931V, Lot # 9799907 |
| protutijela | Anti-zečje IgG-HRP | Santa Cruz Biotechnology (SAD) | sc-2370, Lot # B0445 |

3.1.4 Uređaji

Uređaji korišteni u radu navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Korišteni uređaji

| Naziv | Proizvođač | Namjena |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|
| EV - 100 | Tehtnica Železniki, Slovenija | Vorteks |
| EV – 102 | Tehtnica Železniki, Slovenija | Vorteks |
| Heraeus cell 150 | Thermo Electron Corporation, SAD | Inkubator |
| Heraeus Functionline Labofuge 400 | Thermo Electron Corporation, SAD | Centrifuga |
| JB Nova | Grant, Engleska | Vodena kupelj |
| KDG Zaštitni uređaj | Klimaoprema, Hrvatska | Digestor |

| | | |
|--|--------------------------------|--|
| Klimaoprema <i>custom</i> | Klimaoprema, Hrvatska | Kabinet za rad sa staničnom kulturom |
| LX-300+ | EPSON, Japan | Pisač |
| Mini Spin | Eppendorf, Njemačka | Mini centrifuga |
| Mini-PROTEAN [®] Tetra System | BIO-RAD, SAD | Elektroforetska kadica |
| Opton 4758862 | Zeiss, Njemačka | Invertni mikroskop |
| PowerPac [™] Basic | BIO-RAD, SAD | Izvor napona |
| Rotamix 560 MMH | Tehtnica Železniki, Slovenija | Magnetska miješalica |
| Stat Fax - 2100 | Awareness Technology Inc., SAD | Spektrofotometar |
| Thermomixer <i>compact</i> | Eppendorf, Njemačka | Grijač i miješalica |
| Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom | Cole Palmer, SAD | Homogenizator |
| Vibromix 301 EVT | Tehtnica Železniki, Slovenija | Tresilica |
| Z2 Coulter [®] Particle Count and Size Analyzer | Beckman Coulter, SAD | Automatski brojač i analizator stanica |

3.1.5 Pomagala

Pomagala korištena u radu navedena su u Tablici 4.

Tablica 4. Materijali i pomagala

| Materijal | Proizvođač |
|--|------------------------------|
| Bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75 | Falcon Becton Dickinson, SAD |
| Fotografski film | GE Healthcare Limited, UK |
| Gumena strugalica | Falcon Becton Dickinson, SAD |
| Mikroeprevete | Eppendorf, Njemačka |
| Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 μm | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Pločice za uzgoj stanica sa 6 i 96 bunarčića | Falcon Becton Dickinson, SAD |

3.2 Metode

3.2.1 Uzgoj stanica u kulturi

Ljudska linija stanica raka vrata maternice (HeLa) uzgajana je kao jednoslojna kultura na plastičnoj podlozi. Za potrebe održavanja kulture stanica u svrhu izvođenja eksperimenata, stanice su odvajane 0,25 % tripsinom koji kao proteolitički enzim cijepa proteinske veze između stanica te stanica i podloge. Zdrava kultura stanica sastavljena je od stanica u logaritamskoj fazi rasta čije je vrijeme diobe oko 16,2 sata. Stoga je stanice HeLa potrebno dva puta tjedno rasaditi. Stanice su rasađivane tako da je prvo uklonjen medij u kojemu su stanice rasle, zatim dodana te uklonjena mala količina tripsina ili sterilnog fosfatnog pufera (PBS) (0,2 g 2,7 mM KCl; 0,2 g 1,5 mM KH₂PO₄; 8,0 g 137 mM NaCl; 1,15 g 8 mM Na₂HPO₄ u 1000 ml deH₂O) kako bi se uklonili mogući ostaci starog medija koji bi inhibirali djelovanje tripsina zbog prisutnosti seruma u njemu. Nakon dodavanja nove količine tripsina, kultura stanica je nekoliko minuta ostavljena pri 37 °C kako bi tripsin djelovao, a stanice odvojile od podloge. Stanice odvojene od podloge resuspendirane su u svježem mediju. Prema potrebi, suspenzija stanica je rasađena bez brojanja stanica ili su stanice izbrojene korištenjem automatskog brojača kako bi se točno određen broj stanica nasadio za eksperiment. Za brojanje stanica uzeto je 200 µL stanične suspenzije u 9800 µl izotonske tekućine za brojanje. Uvjeti uređaja podešeni su tako da brojač broji čestice veličine od 10 do 25 µm. Srednja vrijednost najmanje dva brojanja se pomnoži s vrijednosti razrjeđenja kako bi se dobio broj stanica u pola mililitra suspenzije stanica.

3.2.2 Određivanje preživljenja stanica

Kolorimetrijski test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli bromid) korišten je za određivanje metaboličke aktivnosti stanica kao mjere vijabilnosti stanica. Test je temeljen na pretvorbi tetrazolijske boje MTT u netopivi ljubičasto

obojeni formazan kao posljedica aktivnosti enzima mitohondrijske reduktaze. Intenzitet obojenja proporcionalan je količini stanica koje metaboliziraju, odnosno koje su žive, i mjeren je spektrofotometrom. Ukupno $2,2 \times 10^3$ HeLa stanica je nasađeno u svaki od bunarića u volumenu od 180 μ l, u pločicu s 96 bunarića. Točno 24 sata nakon nasađivanja stanice su tretirane spojem ili kombinacijom spojeva od interesa (u 20 μ l). Učinak svake koncentracije spoja ili kombinacije spojeva praćen je kod stanica nasađenih u kvadriplikatu. Nakon 72-satne inkubacije uklonjen je medij iznad stanica, a na stanice je dodano 40 μ l 10x razrijeđene otopine MTT-a (5 mg/ml) po bunariću. Pločica sa stanicama je inkubirana tri sata u inkubatoru za staničnu kulturu. Nastali kristali su otopljeni u 170 μ l DMSO-a, a apsorbancija je mjerena korištenjem spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm.

Vrijednost IC_{50} je izračunata u programu GraphPad Prism 7 iz korigiranog dijagrama zavisnosti koncentracije ispitivanog spoja i apsorbancije očitane na spektrofotometru.

3.2.3 Analiza ciklusa stanica

U Petrijeve zdjelice promjera 6 cm nasađeno je 1×10^5 stanica u 5 ml medija, u slučaju netretirane kontrole, odnosno $1,7 \times 10^5$ stanica u 5 ml medija u slučaju tretmana ispitivanim spojem. Točno 24 sata od nasađivanja, stanice su tretirane različitim koncentracijama ispitivanog spoja. Nakon inkubacije od 24 do 72 sata stanice su tripsinizirane i resuspendirane u mediju u kojemu su rasle. Nakon što su stanice izbrojene korištenjem automatskog brojača stanica, suspenzija stanica je centrifugirana 10 minuta na 1100 rpm-a, dekantiran je supernatant, a talog stanica je dva puta ispran u PBS-u. Taj postupak ponovljen je ukupno 3 puta. Talog stanica je zatim resuspendiran u 500 μ l PBS-a te je uz lagano miješanje na miješalici kap po kap dodan 1 ml 70 % etanola. Tako fiksirane stanice mogu se čuvati pri -20 °C i nekoliko tjedana.

Stanice fiksirane u etanolu su centrifugirane na 1100 rpm-a 5 min pri $+4$ °C. Nakon centrifugiranja odstranjen je supernatant, stanice su isprane u 5 ml PBS-a i

ponovno centrifugirane pri istim uvjetima. Ispiranje i centrifugiranje ponovljeno je 2 puta. Na talog stanica dodano je zatim 200 μ l otopine RNaze (0,1 μ g/ μ l) koja se s uzorkom pomiješa resuspendiranjem te se smjesa inkubira u kupelji pri 37 °C. Smjesi se nakon 30 min doda 200 μ l otopine propidij jodida (PI) (50 μ g/ml) uz resuspendiranje nakon čega se sve prebaci u epruvete za mjerenje koje su stavljene u led i inkubirane minimalno 15 min u mraku. Uzorci su analizirani na protočnom citometru i obrađeni korištenjem računalnog programa FACScalibur.

3.2.4 Analiza smrti stanica

U Petrijeve zdjelice promjera 6 cm nasađeno je 1×10^5 stanica u 5 ml medija, u slučaju netretiranog uzorka (kontrole), odnosno $1,7 \times 10^5$ stanica u 5 ml medija u slučaju tretiranih kultura. Nakon 24 sata od nasađivanja stanice su tretirane različitim koncentracijama ispitivanog spoja. Nakon perioda od 24 do 72 sata od tretmana medij je prebačen u označene plastične epruvete od 15 ml. Stanice su tripsinom odvojene od podloge, resuspendirane u prethodno odvojenom mediju te centrifugirane 10 minuta na 1100 rpm-a. Nakon dekantiranja supernatanta, talog stanica je resuspendiran u PBS-u te ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak je ponovljen dva puta. Stanice su izbrojene korištenjem automatskog brojača stanica. U minimalno 10^5 stanica dodano je 0,5 ml otopine 1x pufera za vezanje aneksina (1xABB) (90 ml deH₂O + 10 ml 10xABB (2,38 g 100 mM HEPES pH 7,4; 8,18 g 1,4 M NaCl; 0,36 g 25 mM CaCl₂; 1,0 g 1 % BSA)). Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 1100 rpm-a. U mraku su, paralelno s centrifugiranjem, pripremljene otopine Annexin-a V označenog fluorescein izotiocijanatom (FITC) i PI prema Tablici 5. Supernatant je uklonjen dekantiranjem, a na stanični talog je dodano 100 μ l otopina Annexin V-FITC i PI. Nakon inkubacije od 15 minuta u mraku, dodano je 400 μ l 1xABB u epruvetu s uzorkom, a mjerenje je napravljeno na protočnom citometru. S obzirom na razliku u fluorescenciji Annexin V-FITC i PI, stanice u ranoj apoptozi bit će smještene u donjem desnom kvadrantu (Annexin V-FITC pozitivne, PI negativne). Stanice pozitivne na PI i Annexin V-FITC (u kasnoj apoptozi ili nekrozi) smještene su u gornjem desnom kvadrantu. Žive stanice su smještene u donjem

lijevom kvadrantu i negativne su na obje probe (Nykky *i sur*, 2010). Rezultati su analizirani u programu FACScalibur.

Tablica 5. Priprema uzoraka za mjerenje smrti stanica korištenjem protočne citometrije

| | Oznaka uzorka | Smjesa |
|----------------------|---------------|---|
| Netretirana kontrola | 0 (+ABB) | 100 μ l 1xABB |
| | A (+ABB) | 2,5 μ l Annexin V-FITC + 97,5 μ l 1xABB |
| | PI (+ABB) | 10 μ l PI + 90 μ l 1xABB |
| | A + PI (+ABB) | 2,5 μ l Annexin V-FITC + 10 μ l PI + 87,5 μ l 1xABB |
| Tretman (1 do n) | A + PI (+ABB) | 2,5 μ l Annexin V-FITC + 97,5 μ l 1xABB |

3.2.5 Analiza ekspresije proteina

Stanice su nasađene u koncentraciji 3×10^5 stanica u 2 ml medija u bunarić pločice. Tretman stanica različitim koncentracijama ispitivanog spoja uslijedio je 24 sata nakon nasađivanja. Nakon perioda od 24 do 72 sata od tretmana, medij iznad stanica je prikupljen u označene epruvete, centrifugiran 10 min na 1100 rpm-a i dekantiran. Postupak je ponovljen još jednom. Ostatak stanica u bunariću je ispran s 2 ml PBS-a. Na isprane stanice dodano je 150 μ l zagrijanog 6x koncentriranog pufera za uzorke (2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 ml glicerol; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 ml 2-merkaptoetanol u 10 ml biH₂O). Stanice su sastrugane grebalicom i prebačene u epruvete s prethodno centrifugiranim stanicama istog bunarića.

Koncentracija donjeg akrilamid-bisakrilamidnog gela definirana je molekularnom težinom proteina od interesa. Destilirana voda, 30 % mješavina akrilamida i bisakrilamida, Tris, 10 % SDS i 10 % APS pomiješani su u epruvetu u zadanim omjerima (Tablica 6.), dok je TEMED dodan kratko prije nanošenja smjese u aparaturu, kako bi pravovremeno pokrenuo proces polimerizacije. Nakon izlijevanja donjeg gela u aparaturu, gel je naslojen vodom, kako bi došlo do polimerizacije, te

ostavljen da polimerizira. Nakon 30 minuta, na donji gel izliven je gornji "sabijajući" gel (Tablica 6.) s postavljenim "češljicom" za jažice. Nakon 45 minuta, gelovi su u potpunosti polimerizirani.

Tablica 6. Priprema gelova za SDS elektroforezu

| | Gornji ("sabijajući") gel (ml) | Donji ("razdvajajući") gel (ml) |
|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | 5 % | 10 % |
| H ₂ O | 5,5 | 7,9 |
| 30 % smjesa akrilamida-bisakrilamida | 1,3 | 6,7 |
| Tris | 1,0** | 5,0*** |
| 10 % SDS | 0,08 | 0,2 |
| 10 % APS | 0,08 | 0,2 |
| TEMED | 0,008 | 0,008 |

** pH (Tris) =6,8

*** pH (Tris) =8,8

U jažice gela su nanesen prikupljeni uzorci pomiješani s puferom za uzorke. Do ulaska uzoraka u gel za odvajanje, elektroforeza se provodi pri jakosti struje od 60 V da bi nakon toga jakost struje povećala na 90 V u 1x Tris-glicinskom puferu (10x pufer: 15,1 g Tris; 72,1 g glicin; 5 g SDS u 500 ml biH₂O).

Nakon završene elektroforeze proteini su preneseni električnim transferom u transfer puferu (50 ml Tris-glicinski pufer pH 8,3; 350 ml biH₂O; 100 ml etanol) pri 400 mA tijekom 1,5 sati na nitroceluloznu membranu. Nakon transfera proteina membrana je isprana u TBS puferu (0,6 g 10 mM Tris; 4,38 g 150 mM NaCl u 500 ml biH₂O).

Proteini na membrani su najprije inkubirani u nemasnom mlijeku kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela. Nakon sat vremena membrana je inkubirana dva sata pri sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4 °C s antitijelom, prema uputama proizvođača. Nakon ispiranja membrane tri puta po pet minuta s TBS-T puferom (0,788 g 10 mM Tris-HCl; 4,38 g 150 mM NaCl; 0,5 ml 0,1 % Tween-20 u 500 ml biH₂O) dodano je sekundarno antitijelo. Nakon inkubacije od dva sata, membrana je ponovno isprana, a proteini su vizualizirani reagensom *Western Lightning[®] Plus*

ECL reagens, osvjetljavanjem fotografskog filma signalima s membrane i razvijanjem u tamnoj komori.

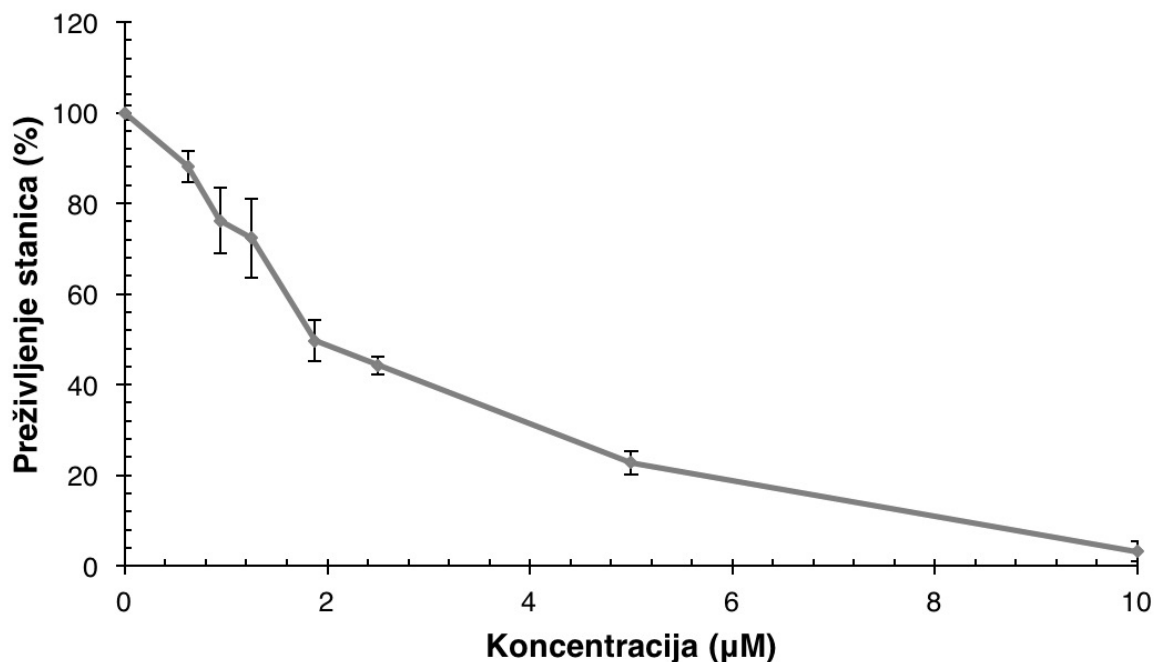
3.2.6 Statistička analiza

Rezultati metode MTT su izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, \pm vrijednost standardne devijacije. Korištenjem student T-testa izračunata je statistička značajnost razlike između vijabilnosti tretiranih i kontrolnih stanica. Rezultati su smatrani značajnima kad su P vrijednosti bile manje od 0,05 te su na slikama označene kao $*=P < 0,05$ ili $**=P < 0,01$.

4 REZULTATI

4.1 Citotoksičnost raguzinina

Mehanizam biološkog djelovanja raguzinina ispitan je na stanicama HeLa. U svrhu ispitivanja mogućeg toksičnog djelovanja raguzinina korišten je MTT test. Stanice su tretirane koncentracijama raguzinina od 0,625 do 10 μM tijekom 72 sata. Rezultati pokazuju da raguzinin ima toksično djelovanje na stanice te da je njegov IC_{50} 2,184 μM (Slika 8).

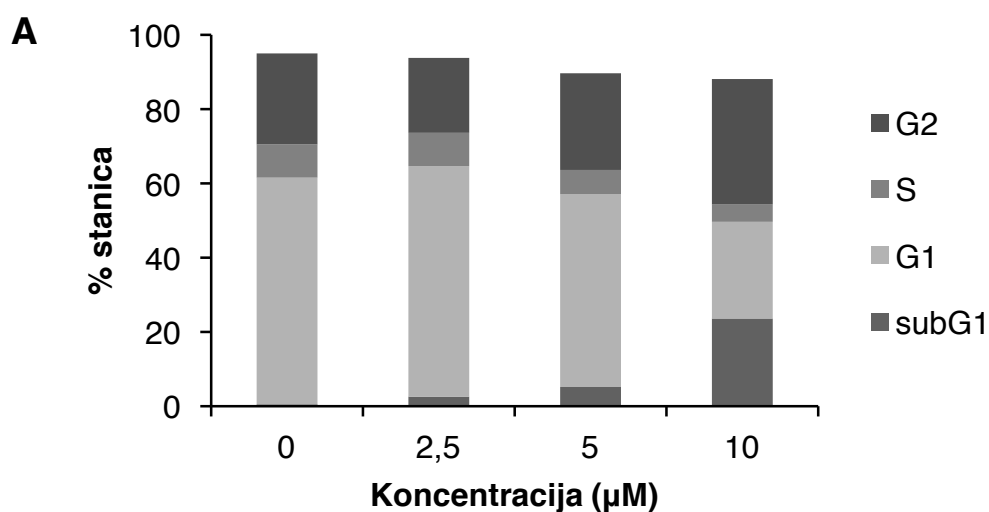


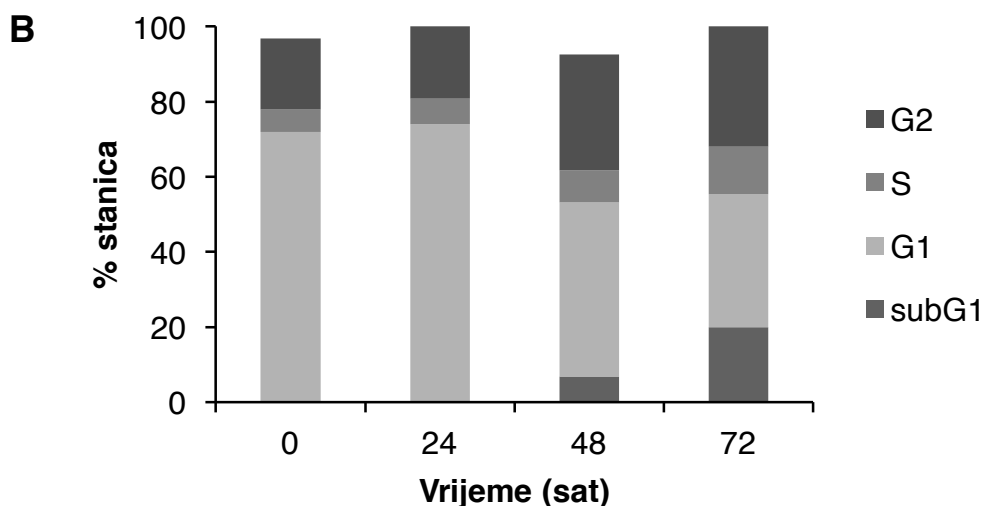
Slika 8. Citotoksičnost raguzinina. Stanice HeLa su tretirane različitim koncentracijama raguzinina 24 sata nakon nasađivanja. Preživljenje stanica je mjereno testom MTT 72 sata nakon tretmana. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, \pm SD vrijednost. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.2 Raguzinin zaustavlja stanice u fazi G2 ciklusa stanice

Kako bi se bolje shvatio mehanizam smrti stanice potaknute raguzininom, mjereno je ciklus stanica. Stanice HeLa su tretirane ili s različitim koncentracijama raguzinina 2,5-10 μM tijekom 48 sati (Slika 9.A) ili s 10 μM tijekom perioda od 24-72 sata (Slika 9.B). Rezultati pokazuju da raguzinin zaustavlja stanice HeLa u fazi G2 ciklusa stanice (Slika 9.A), što je potvrđeno i tretmanom stanica s 10 μM raguzininom tijekom 24-72 sata (Slika 9.B). Nadalje, rezultati pokazuju da se proporcionalno porastu koncentracije raguzinina (Slika 9.A), odnosno tijekom vremena (Slika 9.B), smanjuje broj stanica u fazi S ciklusa stanica.

Prije nego se stanice oboje propidij jodidom, prvo se fiksiraju etanolom. Ta fiksacija, odnosno permeabilizacija, dovodi do otvaranja pora na membranama stanica pri čemu mali fragmenti DNA (182 bp i multimeri istih), koji nastaju tijekom apoptoze, izlaze van. Nadalje, dio DNA se gubi stvaranjem apoptotskih tjelešaca koje se tijekom ispiranja uzorka „prosipaju“. Na taj se način smanjuje količina DNA u stanicama. Manja količina propidij jodida u tim stanicama smješta se bliže y-osi te definira subG1 populaciju stanica, odnosno mrtve stanice. Naši rezultati pokazuju da raguzinin potiče smrt stanice u ovisnosti o koncentraciji (Slika 9.A) i duljini trajanja tretmana (Slika 9.B).



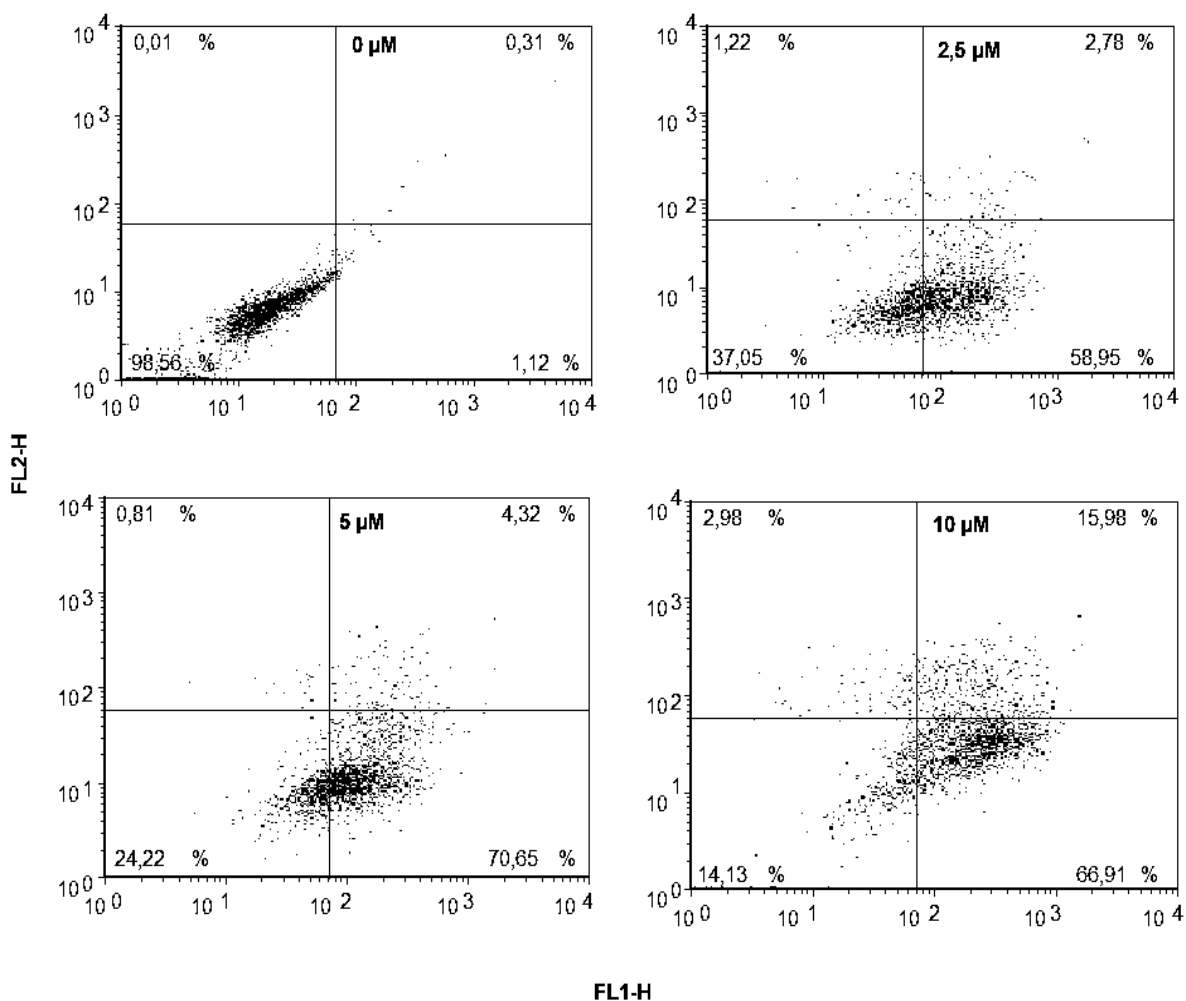


Slika 9. Djelovanje raguzinina na ciklus stanica. Stanice HeLa su tretirane različitim koncentracijama raguzinina (2,5-10 μM) tijekom 48 sati (A) ili 10 μM tijekom 24-72 sata (B). Ciklus stanica analiziran je na protočnom citometru mjerenjem fluorescencije propidij jodida. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.3 Raguzinin aktivira programiranu smrt stanice

Da bi se novosintetizirani ili novoizolirani spoj mogao smatrati potencijalnim antitumorskim spojem mora biti aktivan u niskim koncentracijama, biti selektivno toksičan za tumorske stanice te poticati programiranu smrt stanice bez pratećih procesa upale (Green i Llambi, 2015; Kiraz *i sur*, 2016). Da bismo utvrdili koji tip smrti stanice potiče raguzinin, stanice HeLa su nakon tretmana raguzininom obojane Annexin V-FITC-om (FL1-H) i PI-om (FL2-H) te je fluorescencija ovih dvaju spojeva mjerena protočnim citometrom. Stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina (2,5-10 μM) u trajanju od 48 sati i nakon toga su analizirane na protočnom citometru detekcijom fosfatidilserina pomoću Annexin V-FITC-a te mrtvih, odnosno živih stanica pomoću propidij jodida.

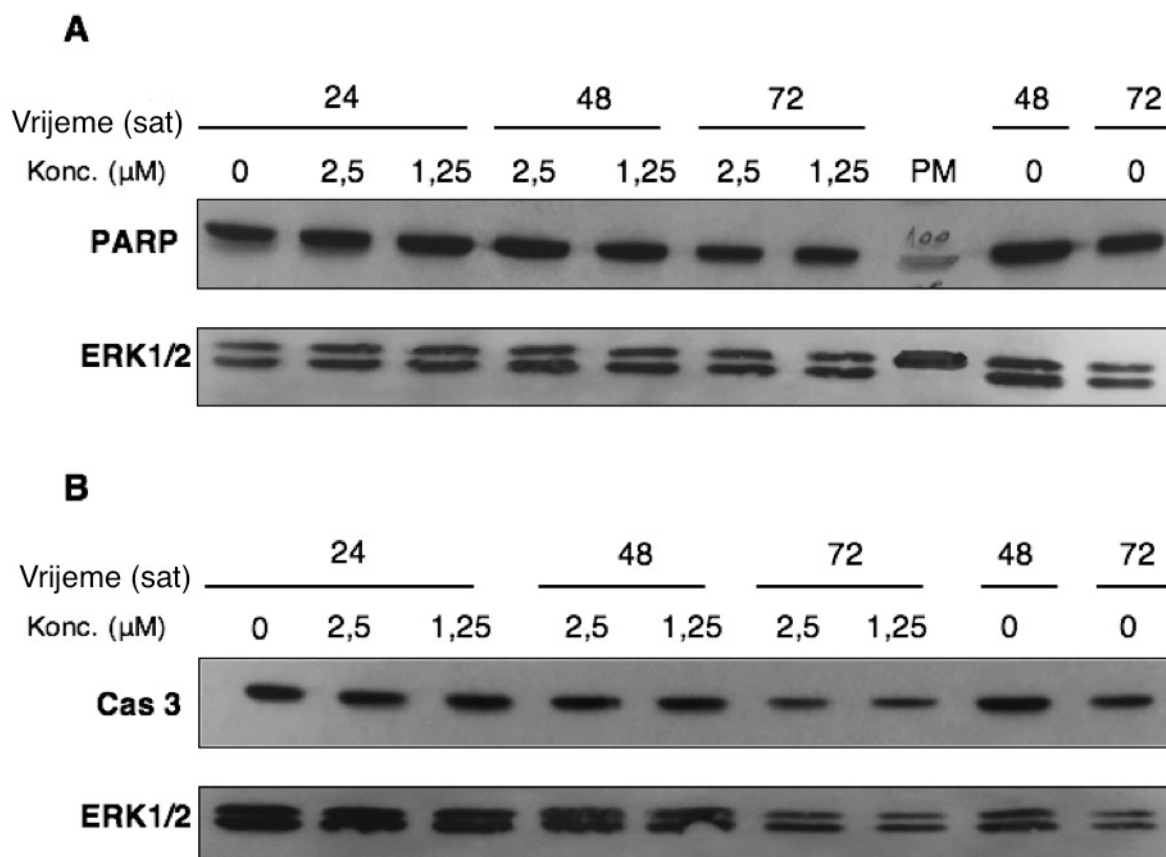
Naši rezultati pokazuju da proporcionalno porastu koncentracije raguzinina (2,5-10 μM) raste postotak stanica u apoptozi (Slika 10.).



Slika 10. Analiza smrti stanica tretiranih raguzininom. Stanice HeLa su tretirane različitim koncentracijama raguzinina (2,5-10 μM). Nakon 48 sati od tretmana stanice su prikupljene i obojane Annexin V-FITC-om i PI-om. Apsorbancija boja je mjerena protočnim citometrom. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta. FL1-H: laser koji detektira stanice obojane Annexin V-FITC-om; FL2-H: laser koji detektira stanice obojane PI-om. C: 2,5 μM , 5 μM , 10 μM .

Da bi se dodatno potvrdila smrt stanice apoptozom potaknutom raguzininom, korištena je *Western blot* metoda vizualizacije proteina kojom je mjeran izražaj pocijepanog proteina poli(ADP-riboze) polimeraze (PARP) i kaspaze 3 (Cas 3) kao prihvaćenih markera apoptoze (Hoffmann *i sur*, 2011). Stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina (1,25-2,5 μM). Uzorci su prikupljani tijekom 24-72 sata, a ukupni stanični proteini su inkubirani s anti-PARP-1 ili anti-Cas 3 protutijelom. Proteini su vizualizirani *Western Lightening[®] Plus ECL reagens*-om u tamnoj komori.

Rezultati pokazuju da raguzinin ne dovodi do cijepanja PARP i kaspaze 3 u stanicama HeLa s obzirom da su antitijela detektirala samo nepocijepane oblike oba proteina (Slika 11.A i 11.B). Neaktivnost kaspaze 3 nakon tretmana stanica raguzininom potvrđena je i mjerenjem aktivnosti kaspaze 3 i 7 korištenjem seta (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Cat.No. G8090, Promega, USA) (rezultati nisu prikazani).



Slika 11. Ekspresija proteina PARP i kaspaze 3 (Cas 3) nakon tretmana stanica HeLa raguzininom. Stanice HeLa su tretirane različitim koncentracijama raguzinina (1,25-2,5 µM). Uzorci su prikupljeni tijekom 24-72 sata, a ukupni stanični proteini su inkubirani s anti-PARP-1 (A) ili anti-Cas 3 (B) protutijelom. Ekspresija ERK1/2 proteina je korištena kao kontrola nanošenja iste količine uzoraka na gel. Pokus je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta. PM, proteinski marker.

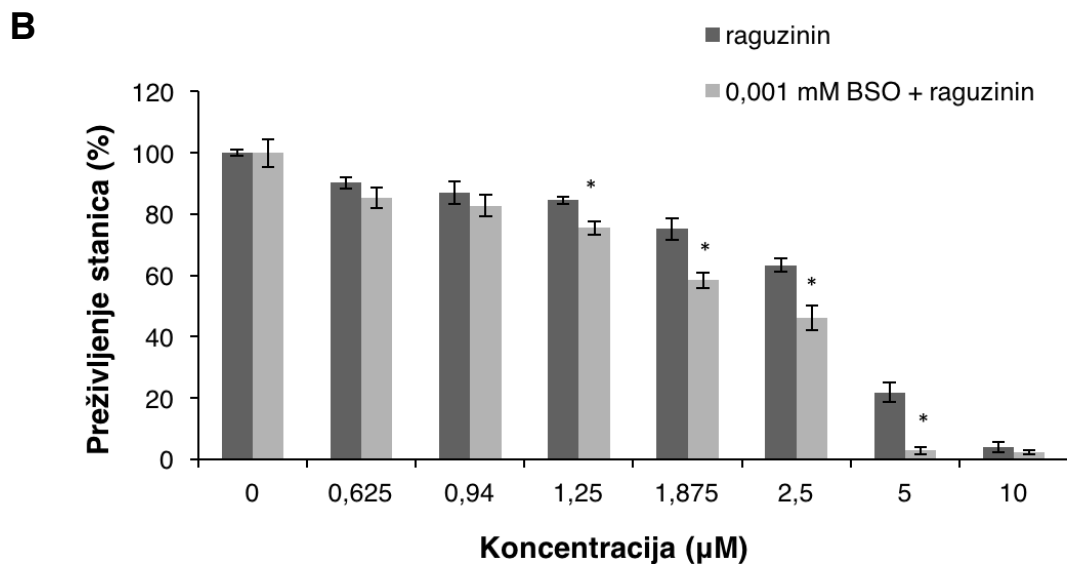
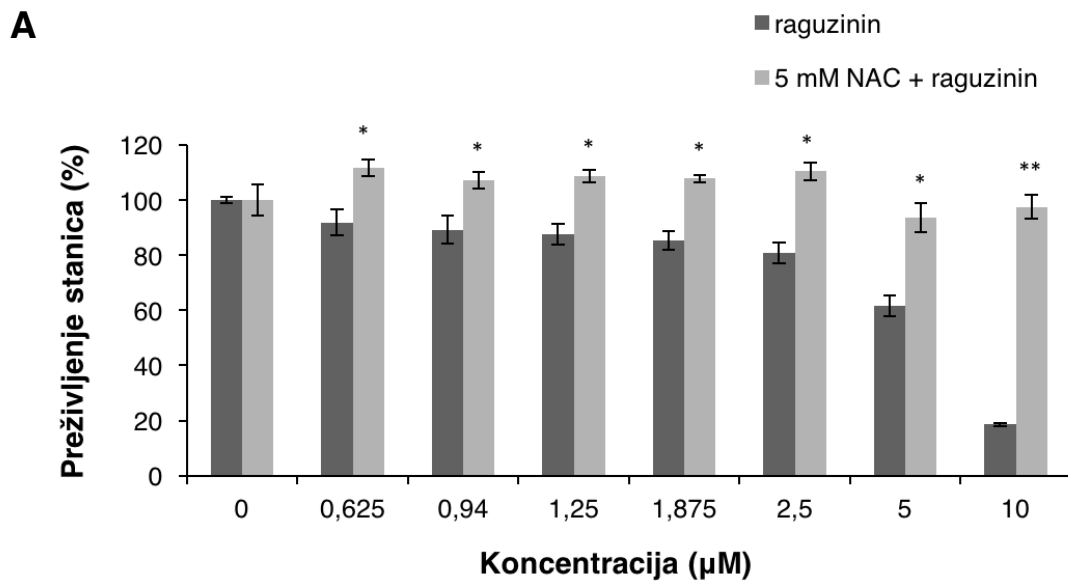
4.4 Citotoksični učinak raguzinina ovisi o koncentraciji glutationa u stanicima

Glutathion igra važnu ulogu u održavanju redoks statusa stanice i metabolizmu ksenobiotika. Kako bi se provjerilo uključuje li mehanizam citotoksičnog djelovanja raguzinina interakciju s glutathionom, stanice su predtretirane s prekursorom u sintezi, odnosno inhibitorom sinteze GSH, čime se mijenja količina konstitutivno prisutnog GSH unutar stanice.

NAC je cisteinski prekursor, supstrat u sintezi GSH te svojim prisustvom povećava razinu GSH u stanicama. S druge strane, BSO smanjuje koncentraciju dostupnog GSH inhibicijom γ -glutamylcistein sintetaze (γ -GCS), enzima koji sudjeluje u sintezi GSH (Atkuri *i sur*, 2007; Schmitt *i sur*, 2015). Prije tretmana s naznačenim koncentracijama raguzinina stanice HeLa su predtretirane dva sata s 5 mM NAC-om ili preko noći s 0,001 mM BSO-om. Preživljenje stanica je mjereno MTT testom 72 sata nakon tretmana.

Rezultati pokazuju da stanice predtretirane NAC-om preživljavaju tretman raguzininom bolje u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom (Slika 12.A). Dakle, povećana količina GSH u stanicama smanjuje toksičan učinak raguzinina. U uvjetima kad je količina GSH u stanicama smanjena uslijed inhibicije njegove sinteze predtretmanom stanica s BSO, preživljenje stanica je slabije u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom (Slika 12. B).

Dakle, GSH je važan dio odgovora stanica na tretman raguzininom s obzirom da mijenjanje količine GSH u stanicama djeluje na njihovo preživljenje.



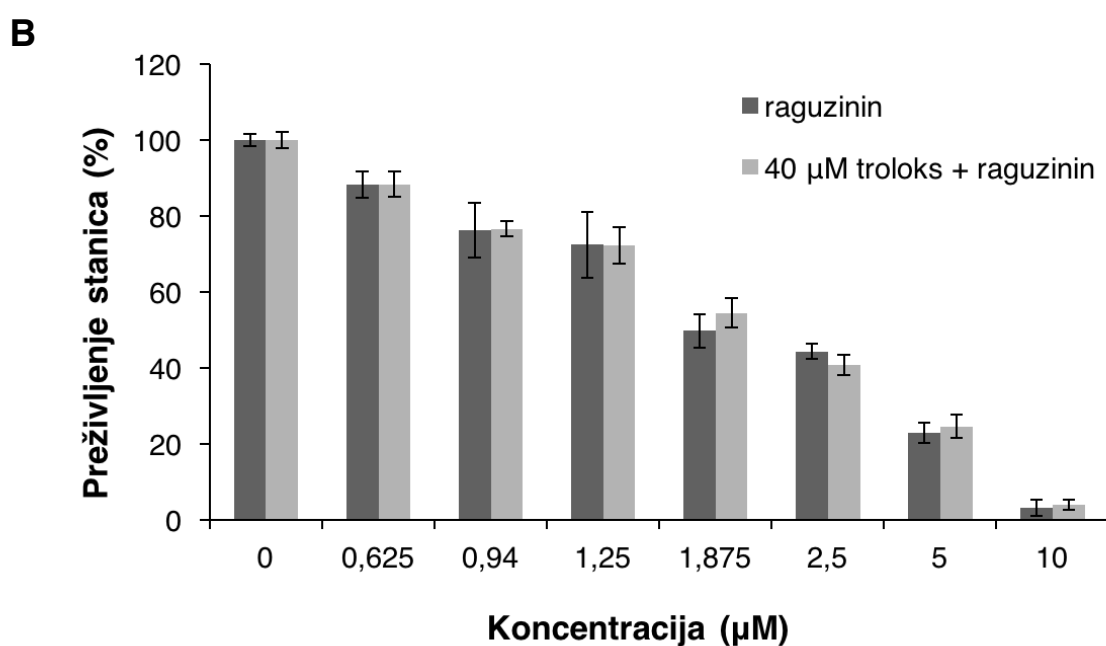
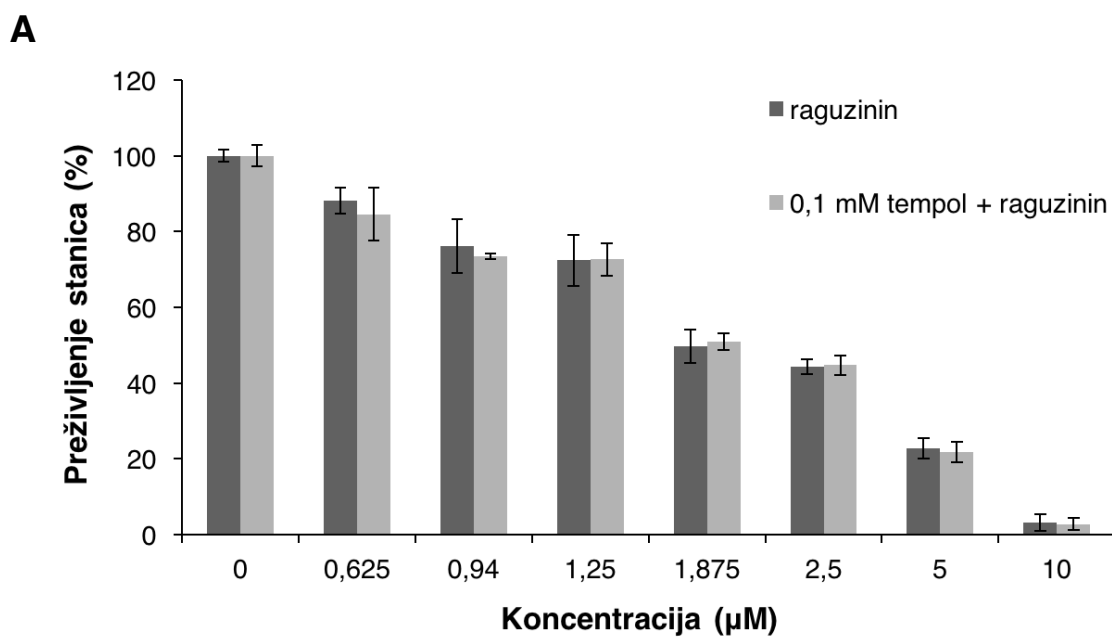
Slika 12. Analiza uloge glutationa u citotoksičnom učinku raguzinina. Prije tretmana s naznačenim koncentracijama raguzinina stanice HeLa su predtretirane dva sata s 5 mM NAC-om (A) ili preko noći s 0,001 mM BSO-om (B). Preživljenje stanica je mjereno MTT testom 72 sata nakon tretmana. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.5 Glutation nema ulogu stabilizatora oksidativno-reduktivnog sustava stanica HeLa tretiranih raguzininom

Reaktivne kisikove vrste iz mitohondrija i drugih organela smatraju se toksičnim nusproduktima metabolizma stanice. Međutim, različiti ksenobiotici mogu dovesti do poticanja stvaranja ROS-a prolaskom kroz staničnu membranu, kao rezultat oštećenja DNA i slično (Yoshikawa i Naito, 2002). Kemijska struktura raguzinina ukazuje da se radi o spoju koji ulaskom u stanicu može potaknuti stvaranje ROS-a (neobjavljeni rezultati). U svrhu provjere uloge GSH u stabilizaciji oksidativno-reduktivnog sustava nakon tretmana raguzininom, stanice HeLa su predtretirane s antioksidansima različita mehanizma djelovanja u stanici, tempolom i troloksom (Alzoubi *i sur*, 2014; Hamad *i sur*, 2010; Mariappan *i sur*, 2007; Wilcox, 2010). Tempol je mimetik superoksid dismutaze, enzima koji inhibira stres, najčešće oksidacijom Fe(II) (Yoshikawa i Naito, 2002). Troloks je analog vitamina E koji blokira peroksidaciju lipida i apoptozu izazvanu aktivnošću citokroma P450 i uspješno neutralizira slobodne radikale (Hamad *i sur*, 2010).

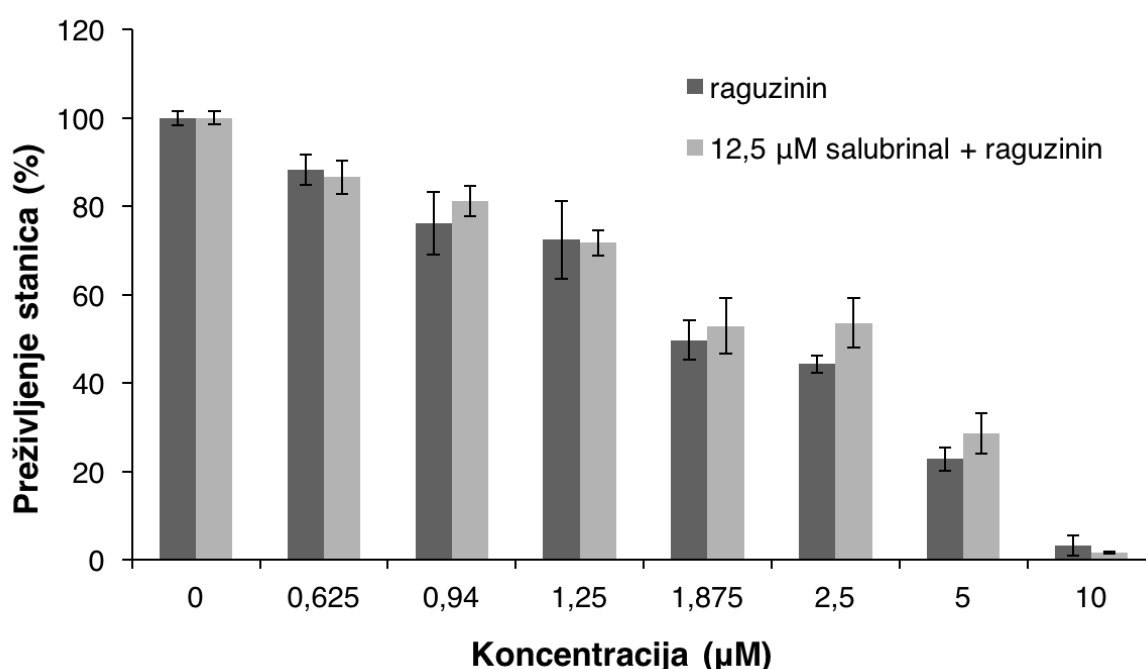
Dva sata nakon predtretmana s 0,1 mM tempolom ili 40 μ M troloksom, stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina (0,625-10 μ M). Preživljenje stanica je mjereno MTT testom 72 sata nakon tretmana.

Rezultati su pokazali da predtretman HeLa stanica tempolom (Slika 13.A) ne povećava preživljenje stanica nakon tretmana raguzininom u usporedbi sa stanicama tretiranim samo raguzininom. Isti rezultat je dobiven predtretmanom stanica s troloksom (Slika 13.B). Rezultati indirektno ukazuju da raguzinin najvjerojatnije ne potiče stvaranje ROS-a.



Slika 13. Analiza uloge glutationa u stabilizaciji oksidativno-reduktivnog sustava stanice. Stanice HeLa su predtretirane s 0,1 mM tempolom (A) ili 40 μM troloksom (B). Dva sata nakon početka predtretmana, stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina. Nakon 72 sata od tretmana preživljenje stanica je mjereno MTT testom. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

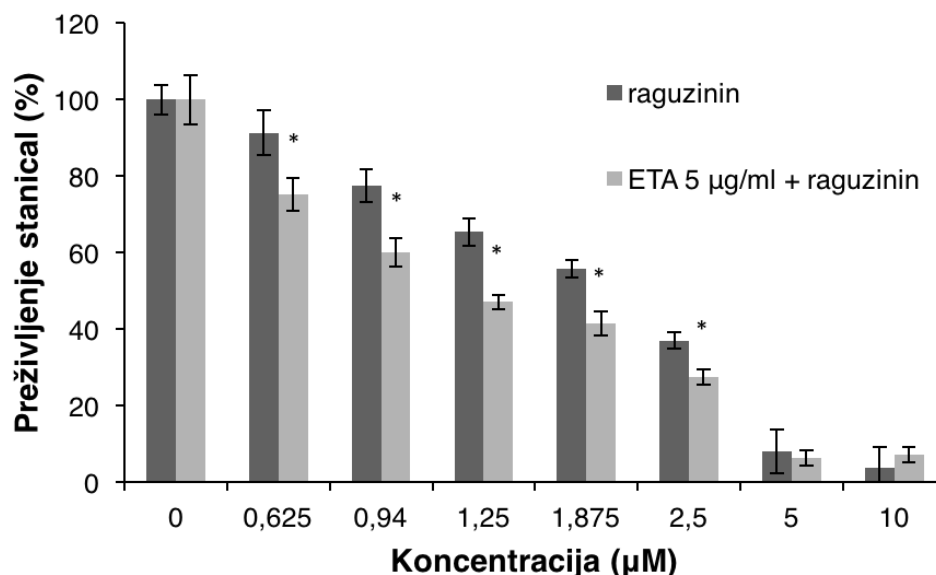
U svrhu dodatne indirektno potvrde da raguzinin ne dovodi do stvaranja ROS-a, odnosno da stanice ne troše GSH u svrhu stabilizacije oksidativno-reduktivnog sustava, stanice su predtretirane salubrinalom. Salubrinal je inhibitor stresa endoplazmatskog retikuluma koji je potaknut ROS-om. Salubrinal selektivno inhibira komplekse fosfataza koji defosforiliraju eIF-2 α i tako štiti stanicu od apoptoze potaknute stresom endoplazmatskog retikuluma. Rezultati pokazuju da predtretman stanica HeLa salubrinalom ne povećava preživljenje stanica u usporedbi sa stanicama tretiranim samo raguzininom (Slika 14).



Slika 14. Analiza uloge glutationa u stabilizaciji oksidativno-reduktivnog sustava stanice. Stanice HeLa su predtretirane s 12,5 μM salubrinala. Dva sata nakon početka predtretmana, stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina. Nakon 72 sata od tretmana, preživljenje stanica je mjereno testom MTT. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.6 Glutation je uključen u detoksikaciju raguzinina

Važna uloga GSH u uklanjanju toksičnog učinka ksenobiotika u stanici je detoksikacija. Kako bi se provjerila moguća uloga u detoksikaciji raguzinina u stanicama HeLa, stanice su predtretirane etakrinom kiselinom, a zatim izložene djelovanju raguzinina. Etakrina kiselina (ETA) inhibira glutathion-S-transferazu, enzim koji je uključen u povezivanje GSH sa ksenobiotikom, odnosno stvaranje konjugata. Posljedica stvaranja konjugata je inhibiranje toksičnog učinka ksenobiotika. Rezultati pokazuju da stanice predtretirane s ETA-om lošije preživljavaju tretman raguzininom u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom (Slika 15). Dobiveni rezultat ukazuje na moguću ulogu GSH u detoksikaciji raguzinina enzimatskim putem.

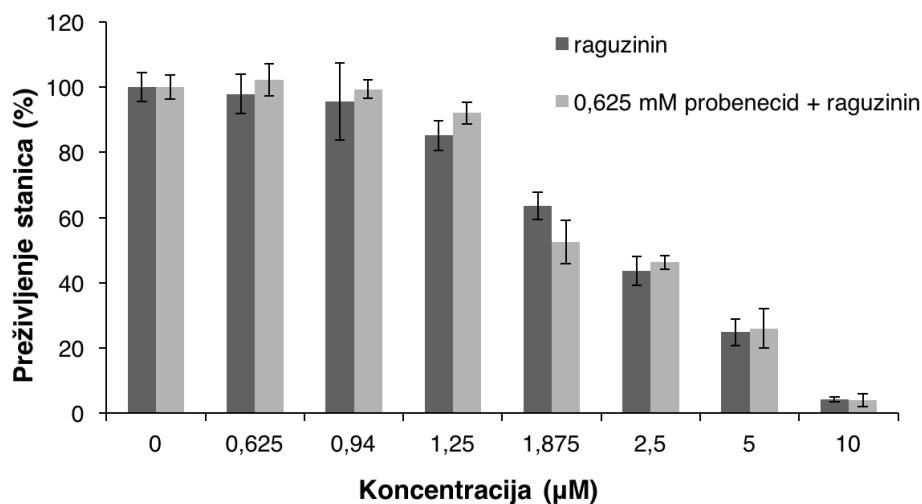


Slika 15. Analiza uloge glutathiona u detoksikaciji raguzinina. Stanice su predtretirane s 5 µg/ml etakrine kiseline. Dva sata nakon početka predtretmana, stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina. Nakon 72 sata od tretmana, preživljenje stanica je mjereno testom MTT. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

Poznato je da određeni membranski transporteri iz skupine MRP sudjeluju u izbacivanju konjugata GSH i ksenobiotika iz stanice. Probenecid ili p-

(dipropilsulfamoil) benzoična kiselina je inhibitor nekoliko ABC-transportera iz subobitelji MRP za koje je poznato da sudjeluju u izbacivanju GSH konjugata iz stanice te su stoga poznati i pod nazivom GSH pumpe (Homolya *i sur*, 2003). Kako bi se utvrdilo sudjeluju li transporteri MRP u izbacivanju konjugata GSH i raguzinina iz stanica HeLa, stanice su predtretirane probenecidom. Dva sata nakon predtretmana stanica s 0,625 mM probenecidom, stanice su tretirane različitim koncentracijama raguzinina. Nakon 72 sata od tretmana preživljenje stanica je mjereno MTT testom.

Rezultati su pokazali da ne postoji razlika u preživljenju stanica tretiranih raguzininom kod kojih je probenecidom inhibirana aktivnost MRP transportera u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom (Slika 16). Iz ovih rezultata je zaključeno da MRP transporteri ne sudjeluju u izbacivanju GSH-raguzinin konjugata iz stanica.



Slika 16. Analiza uloge MRP transportera u detoksikaciji raguzinina. Stanice su predtretirane s 0,625 mM probenecidom. Dva sata nakon početka predtretmana, stanice HeLa su tretirane različitim koncentracijama raguzinina. Nakon 72 sata od tretmana, preživljenje stanica je mjereno MTT testom. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta.

Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta.

5 RASPRAVA

Unatoč štetnim učincima na zdrave stanice i razvoju otpornosti na korištene citostatike, kemoterapija je, uz kirurški zahvat, još uvijek najučinkovitija metoda liječenja zloćudnih tumora (Miller *i sur*, 2016). Spojevi s metalima, poput cisplatine i karboplatine, jedni su od najčešće korištenih kemoterapeutika (Brozovic, 2017). Ipak, u posljednje vrijeme znanost i farmaceutska industrija ulažu sve veća financijska sredstva u istraživanje i ispitivanje novih specifičnijih i učinkovitijih lijekova. Naime, cisplatina i karboplatina pokazuju izvrstan rezultat u liječenju solidnih tumora. Međutim, vrlo često tumor metastazira i tada njegovo liječenje postaje pravi izazov. Također je nerijetka pojava rezistencije tumorskih stanica na primjenjivani citostatik, zbog čega su liječnici primorani koristiti koktel kemoterapeutika kako bi pokušali postići željene rezultate. Čak i ako se tumor dijagnosticira i lokalizira na vrijeme i liječenje bude naizgled uspješno, velika je šansa pojave recidiva i oštećenja drugih tkiva kao posljedica nespecifičnosti primijenjenih kemoterapeutika i drugih lijekova. Stoga je potreba za novim spojevima, bilo novosintetiziranim ili izoliranim iz biljaka, veće učinkovitosti u odnosu na kemoterapeutike, konstantna (Cragg i Newman, 2005; Duan *i sur*, 2010; Zhang *i sur*, 2005).

Uz prvijence skupine biljnih kemoterapeutika - vinka alkaloida, danas se u liječenju zloćudnih tumora još koriste i taksani, terpeni, artemizini i drugi. U našem istraživanju, provedenom zajedno s Zavodom za farmakognozu Sveučilišta Beč i Laboratorijem za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković, karakteriziran je spoj izdvojen iz ekstrakta biljke *Centaurea ragusina* L. sakupljene na području Katalinić briga i Sustipana, Split, Hrvatska. Napravljene su analize kemijskih svojstava ekstrakata te određene pojedine kemijske frakcije (neobjavljeni rezultati). Točnije, iz ekstrakata su izolirana tri flavonoida i tri seskviterpen laktona pri čemu su u rodu *Centaurea* prvi puta nađeni seskviterpen laktoni hemistepsin A (Jang *i sur*, 1999) i 3aR,4S,6aR,8S,9aR,9bR)-[dodekahidro-8-dihidroksi-3,6,9-tris(metilen)-2-okso-2(3H)-azuleno[4,5-b]furanil]-3-metil-butanoat, imenovan u ovom istraživačkom radu raguzinin. Navedena biljka spada u porodicu *Asteraceae*, koja je već stoljećima poznata u narodnoj, ali i klasičnoj medicini. Sve pripadnike skupine SL-a karakterizira

peteročlani laktonski prsten sa karbonilnom grupom, koja se ujedno smatra djelomično odgovornom za njihovo citotoksično djelovanje (Cragg i Newman, 2005; Zhang *i sur*, 2005).

Raguzinin je SL koji spada u skupinu guaianoida. O njegovim kemijskim i biološkim karakteristikama u ovom trenutku postoje samo podaci priopćeni u obliku sažetaka na skupovima (Vujčić *i sur*, 2016). Korištenjem TTC (TTC-BD) antibakterijske metode serijskih razrjeđenja je pokazano da raguzinin ima selektivni antibakterijski učinak. Korištenjem ABTS metode antioksidativne aktivnosti, je pokazano da ima vrlo slab ili nikakav oksidativni učinak. Ispitivanjem interakcija spojeva s DNA korištenjem UV/Vis, CD spektroskopije i izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC) pokazano je da se spoj ne veže na DNA (neobjavljeni podaci).

Spojevi koji se razmatraju kao potencijalni kemoterapeutici karakterizirani su IC_{50} vrijednostima u μM ili još bolje nM količinama. IC_{50} vrijednost raguzinina iznosila je 2,184 μM . U svom istraživanju, Quintero *i sur*, 1999. su ispitivali učinak modificiranih SL-a na stanicama HeLa te dobili vrijednosti IC_{50} 16,4 i 30,3 mM. U istom istraživanju, IC_{50} paklitaksela iznosila je 0,025 mM, dok je u sličnom istraživanju iz 1993. na osam različitih tumorskih stanica ona iznosila između 2,5 i 7,5 nM (Liebmann *i sur*, 1993). Cisplatina, poznati i često korišteni kemoterapeutik, ima IC_{50} između 1,2 i 18 μM (HeLa) (Dhar i Lippard, 2009; Larasati *i sur*, 2014). Dakle, raguzinin je pokazao dobar citotoksični učinak na stanice HeLa u usporedbi s poznatim kemoterapeutcima. U danjim eksperimentima predviđeno je ispitivanje toksičnog učinka raguzinina korištenjem većeg broja različitih tumorskih i normalnih linija stanica.

Kemoterapeutici imaju zajedničko svojstvo da djeluju na ciklus stanica. Naši neobjavljeni rezultati pokazuju da se raguzinin ne veže na DNA, ali prema kemijskoj strukturi ima sposobnost vezanja na proteine stanice. Mjerenjem utjecaja raguzinina na ciklus stanica utvrdili smo da zaustavlja stanice HeLa u fazi G2 ciklusa stanice. Nadalje, postotak stanica zaustavljenih u fazi G2 se povećavao proporcionalno vremenu tretmana i koncentraciji raguzinina, dok se broj stanica u fazi S smanjivao. Naši rezultati su slični rezultatima iz literature gdje je pokazano da spojevi koji zaustave ciklus stanica u fazi G2 dovode do apoptotske smrti (Ko *i sur*, 2005; Lohberger *i sur*, 2013). Također, proporcionalno koncentraciji raguzinina i trajanju

tretmana, povećavao se i postotak stanica u populaciji subG1, koja je karakterizirana stanicama s količinom DNA manjom od one u G1, nastalom tijekom apoptoze.

S obzirom da je jedna od važnih karakteristika potencijalnog kemoterapeutika vrsta smrti stanice koju potiče, naš daljnji korak je bio odrediti koji tip smrti stanice raguzinin aktivira u stanicama HeLa. Nekroza je tip smrti prilikom koje dolazi do pojave upalnih procesa koji mogu narušiti stanje tkiva i organizma (Shewach i Kuchta, 2009; Žlender, 2004). Naši rezultati pokazuju da raguzinin potiče dominantno apoptozu što je u skladu s rezultatima istraživanja na drugim SL-a poput kostunolida, dehidrokostulaktona (Kretschmer *i sur*, 2012), partenolida (Amorim *i sur*, 2013) i helenalina (Hoffmann *i sur*, 2011).

Kako bismo potvrdili da se zaista radi o apoptozi, iz stanica HeLa tretiranih raguzininom izolirani su ukupni proteini i mjerena je ekspresija literaturno prihvaćenih markera apoptoze, PARP-a i kaspaze 3. Naime, PARP je jedan od brojnih supstrata kaspaza. *In vitro* istraživanja su pokazala da gotovo sve poznate kaspaze cijepaju PARP, pa se taj događaj smatra sigurnim znakom apoptoze (Chaitanya *i sur*, 2010; Lohberger *i sur*, 2013; Tait *i sur*, 2014). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da apoptoza u našem slučaju nije posredovana kaspazama (specifičnije, kaspazom 3) niti smo mogli potvrditi cijepanje PARP-a. Signali na fotografskom filmu u slučaju tretmana raguzininom u koncentracijama 1,25 i 2,5 μM nakon 72 sata inkubacije, vrlo su slabi. Tu pojavu objašnjavamo kao početak razgrađnje proteina zbog dugotrajnog i snažnog tretmana citotoksičnom tvari. Navedeni rezultati navode nas na činjenicu da raguzinin potiče apoptozu neovisnu o kaspazama. Taj rezultat je dodatno potvrđen mjerenjem aktivnosti kaspaze 3 i 7 korištenjem komercijalnog seta (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega, SAD). Aktivnost kaspaze 3 i 7 bila je slična u stanicama HeLa tretiranim raguzininom u odnosu na netretirane stanice (neprikazani rezultati). Slični rezultati dobiveni su sa SL-om partenolidom i izokostunolidom u ispitivanjima na ljudskim stanicama osteosarkoma i melanoma (Chen *i sur*, 2007; D'Anneo *i sur*, 2013).

Jedna od važnih molekula koja sudjeluje u obrani stanice od stresa izazvanog ksenobioticima je glutation (Marí *i sur*, 2009). Ukoliko molekularni mehanizam citotoksičnog učinka raguzinina ovisi o koncentraciji dostupnog GSH u stanici, bilo na način da GSH stabilizira oksidativno-reduktivni sustav stanice uslijed stvaranja ROS-

a potaknutog raguzininom ili detoksificira raguzinin uslijed vezanja na njega i stvaranja konjugata, postotak preživjelih stanica trebao se promijeniti mijenjanjem stope sinteze GSH. Predtretmanom stanica cisteinskim prekursorom - NAC-om, povećava se stopa sinteze GSH (Atkuri *i sur*, 2007; Schmitt *i sur*, 2015). Rezultat MTT testa pokazao je da NAC povećava postotak preživjelih stanica u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom. Upravo suprotno, predtretman s BSO-om, inhibitorom sinteze GSH, smanjio je preživljenje stanica u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom. Rezultati pokazuju da GSH ima ulogu u odgovoru stanica na tretman raguzininom. Slični rezultati, koji potvrđuju uključenost GSH-a u mehanizam aktivnosti pojedinih SL-a, dobiveni su u ispitivanjima na ljudskim limfocitima tretiranim SL-om glaukolidom B (Burim *i sur*, 1999), ljudskim stanicama leukemije HL60 tretiranim eupalininom A (Itoh *i sur*, 2009) i tretmanom mišjih stanica Lewisovog fibrosarkoma pluća (FIO 26) eupatoriopikrinom (Woerdenbag *i sur*, 1989).

Iz literature je poznato da GSH ima ulogu u stabilizaciji oksidativno-reduktivnog sustava stanice (Aquilano *i sur*, 2014; Marí *i sur*, 2009). Kako bismo sa sigurnošću utvrdili koja je uloga GSH u odgovoru stanica HeLa na raguzinin, stanice su predtretirane s dva antioksidansa različita mehanizma djelovanja, tempolom i troloksom. Naši rezultati su pokazali da predtretman stanica bilo tempolom ili troloksom ne poboljšava preživljenje stanica u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom. GSH pri ispitanim eksperimentalnim uvjetima ne djeluje nužno kao stabilizator oksidativno-reduktivnog sustava s obzirom da isti nije raguzininom destabiliziran. Ti rezultati indirektno ukazuju da raguzinin vjerojatno ne potiče stvaranje ROS-a, stoga dodatak antioksidansa nema nikakav efekt na stanice HeLa. Zabilježeno je da alkilirajući SL-i često potiču nakupljanje ROS-a ometajući antioksidativni aparat stanice. Njihova akumulacija može rezultirati oštećenjima DNA, lipida i proteina, koji često vode u smrt (Chadwick *i sur*, 2013; Thannickal i Fanburg, 2000). Da bismo dodatno pokazali da raguzinin ne dovodi do stvaranja ROS-a, stanice su predtretirane salubrinalom, inhibitorom stresa endoplazmatskog retikuluma (ER) (Brozovic *i sur*, 2013). Rezultati su pokazali da salubrinal ne povećava preživljenje stanica u odnosu na stanice tretirane samo raguzininom. Može se zaključiti da raguzinin ne dovodi do stresa ER-a.

S obzirom da naši rezultati pokazuju važnu ulogu GSH u odgovoru stanica HeLa na raguzinin, a raguzinin ne potiče stvaranje ROS-a, sljedeći korak nam je bio ispitati drugu značajnu ulogu GSH-a, detoksikacijsku. Prilikom detoksikacije, GSH se veže na ksenobiotik enzimatski i/ili neenzimatski (Housman *i sur*, 2014; Marí *i sur*, 2009). Podaci kemijske analize raguzinina pokazali su da se spoj može vezati na proteine (neobjavljeni podaci). Nas je zanimalo može li se GSH i enzimatski vezati na raguzinin te tako stvoriti konjugate koji smanjuju toksično djelovanje spoja. U literaturi prihvaćen inhibitor GSH-S-transferaze, etakrinu kiselinu (Lacreta *i sur*, 1994), koristili smo za predtretman stanica HeLa. Naši rezultati pokazuju da etakrina kiselina smanjuje preživljenje stanica u odnosu na one tretirane samo raguzininom. Dakle, može se zaključiti da GSH i raguzinin stvaraju konjugat kojim se toksično djelovanje raguzinina smanjuje. No, ono što je interesantno je činjenica da predtretman probenecidom (inhibitor ABC-pumpi iz obitelji MRP transportera) ne smanjuje preživljenje stanica tretiranih raguzininom. Rezultat je neočekivan s obzirom da su proteini transporteri iz obitelji MRP iz literature poznati kao tzv. GSH pumpe koje među ostalim imaju ulogu u izbacivanju GSH-ksenobiotik konjugata iz stanice van (Homolya *i sur*, 2003). Daljnja istraživanja će biti usmjerena na razumijevanje mehanizma detoksikacije raguzinina GSH-om.

Seskviterpen laktone su već dugo vremena vrlo interesantan izvor potencijalno učinkovitih spojeva u kemoterapiji. U našem istraživanju smo prvi puta opisali biološke efekte raguzinina. Nadalje, bez obzira što je točna ciljna molekula raguzinina ostala nepoznata, pokazali smo da se spoj deaktivira glutationom čime se smanjuje njegova citotoksičnost. Dakle, bilo kakva buduća primjena raguzinina samostalno ili eventualno u kombinaciji s postojećom terapijom mora uzeti u obzir ulogu GSH u njegovoj detoksikaciji.

6 ZAKLJUČCI

1. Raguzinin je pokazao toksični učinak na stanice raka vrata maternice (HeLa) ($IC_{50} = 2,184 \mu M$) 72 sata nakon tretmana.
2. Raguzinin zaustavlja stanice HeLa u fazi G2 ciklusa i potiče apoptozu.
3. Glutation je uključen u obrambeni sustav stanica HeLa tretiranih raguzininom.
4. Uloga glutaciona u odgovoru stanica HeLa na tretman raguzininom je detoksikacija, a ne stabilizacija oksidativno-reduktivnog sustava stanice, s obzirom da raguzinin najvjerojatnije ne potiče stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta.

7 LITERATURA

- Alzoubi KH, Khabour OF, Jaber AG, Al-Azzam SI, Mhaidat NM, Masadeh MM (2014). Tempol Prevents Genotoxicity Induced by Vorinostat: Role of Oxidative DNA Damage. *Cytotechnology* **66**: 449–455.
- Amorim MHR, Gil da Costa RM, Lopes C, Bastos MMSM (2013). Sesquiterpene Lactones: Adverse Health Effects and Toxicity Mechanisms. *Crit Rev Toxicol* **43**: 559–579.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR (2014). Glutathione: New Roles in Redox Signaling for an Old Antioxidant. *Front Pharmacol* **5**: 196.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2007). N-Acetylcysteine— a Safe Antidote for Cysteine/glutathione Deficiency. *Curr Opin Pharmacol* **7**: 355–359.
- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci* **9**: 193–199.
- Bouligand J, Deroussent A, Simonnard N, Opolon P, Morizet J, Connault E, *i sur* (2007). Induction of Glutathione Synthesis Explains Pharmacodynamics of High-dose Busulfan in Mice and Highlights Putative Mechanisms of Drug Interaction. *Drug Metab Dispos* **35**: 306–314.
- Brozovic A (2017). The Relationship Between Platinum Drug Resistance and Epithelial–mesenchymal Transition. *Arch Toxicol* **91**: 605–619.
- Brozovic A, Vuković L, Polančac DS, Arany I, Köberle B, Fritz G, *i sur* (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in the Response of Human Laryngeal Carcinoma Cells to Carboplatin but Is Absent in Carboplatin-resistant Cells. *PLoS One* **8**: e76397.
- Burim R V., Canalle R, Lopes JLC, Takahashi CS (1999). Genotoxic Action of the Sesquiterpene Lactone Glaucolide B on Mammalian Cells In Vitro and In Vivo. *Genet Mol Biol* **22**: 401–406.
- Capdevila J, Rojo F, González-Martín A, Grande E, Martín-Algarra S, Puente J, *i sur*

- (2017). Molecular Profiling for Clinical Decision Making in Advanced Cancer: A Clinical Appraisal. *J Cancer Res Treat* **5**: 77–85.
- Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C (2013). Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int J Mol Sci* **14**: 12780–12805.
- Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP (2010). PARP-1 Cleavage Fragments: Signatures of Cell-death Proteases in Neurodegeneration. *Cell Commun Signal* **8**: 31.
- Chen C-N, Huang H-H, Wu C-L, Lin CPC, Hsu JTA, Hsieh H-P, *i sur* (2007). Isocostunolide, a Sesquiterpene Lactone, Induces Mitochondrial Membrane Depolarization and Caspase-dependent Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Cancer Lett* **246**: 237–252.
- Cragg GM, Newman DJ (2005). Plants as a Source of Anti-cancer Agents. *J Ethnopharmacol* **100**: 72–79.
- Cuzick J, Sestak I, Cawthorn S, Hamed H, Holli K, Howell A, *i sur* (2015). Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Extended Long-term Follow-up of the IBIS-I Breast Cancer Prevention Trial. *Lancet Oncol* **16**: 67–75.
- D’Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, Emanuele S, Fiore R Di, Vento R, *i sur* (2013). Parthenolide Induces Caspase-independent and AIF-mediated Cell Death in Human Osteosarcoma and Melanoma Cells. *J Cell Physiol* **228**: 952–967.
- Dhar S, Lippard SJ (2009). Mitaplatin, a Potent Fusion of Cisplatin and the Orphan Drug Dichloroacetate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 99–204.
- Dieterich M, Stubert J, Reimer T, Erickson N, Berling A (2014). Influence of Lifestyle Factors on Breast Cancer Risk. *Breast Care* **9**: 407–414.
- Drew R, Miners JO (1984). The Effects of Buthionine Sulphoximine (BSO) on Glutathione Depletion and Xenobiotic Biotransformation. *Biochem Pharmacol* **33**: 2989–2994.
- Duan J-A, Hou P, Tang Y, Liu P, Su S, Liu H (2010). A New Sesquiterpene and Other Constituents from *Saussurea lappa* Root. *Nat Prod Commun* **5**: 1531–1534.

- Elmore S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**: 495–516.
- Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N (2010). What Made Sesquiterpene Lactones Reach Cancer Clinical Trials? *Drug Discov Today* **15**: 668–678.
- Green DR, Llambi F (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a006080.
- Griffith OW, Meister A (1979). Potent and Specific Inhibition of Glutathione Synthesis by Buthionine Sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**: 7558–7560.
- Haaften C van, Boot A, Corver WE, Eendenburg JDH van, Trimbos BJMZ, Wezel T van (2015). Synergistic Effects of the Sesquiterpene Lactone, EPD, with Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer Cells. *J Exp Clin Cancer Res* **34**: 38.
- Hamad I, Arda N, Pekmez M, Karaer S, Temizkan G (2010). Intracellular Scavenging Activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Nat Sci Biol Med* **1**: 16–21.
- Hanahan D, Weinberg AR (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646–674.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed Res Int* **2014**: 23.
- Heilmann J, Wasescha MR, Schmidt TJ (2001). The Influence of Glutathione and Cysteine Levels on the Cytotoxicity of Helenanolide Type Sesquiterpene Lactones Against KB Cells. *Bioorg Med Chem* **9**: 2189–2194.
- Hoffmann R, Schwarzenberg K Von, López-Antón N, Rudy A, Wanner G, Dirsch VM, *i sur* (2011). Helenalin Bypasses Bcl-2-mediated Cell Death Resistance by Inhibiting NF-kappaB and Promoting Reactive Oxygen Species Generation. *Biochem Pharmacol* **82**: 453–463.
- Homolya L, Váradi A, Sarkadi B (2003). Multidrug Resistance-associated Proteins: Export Pumps for Conjugates with Glutathione, Glucuronate or Sulfate.

BioFactors **17**: 103–114.

- Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, *i sur* (2014). Drug Resistance in Cancer: an Overview. *Cancers (Basel)* **6**: 1769–1792.
- Itoh T, Ohguchi K, Nozawa Y, Akao Y (2009). Intracellular Glutathione Regulates Sesquiterpene Lactone-Induced Conversion of Autophagy to Apoptosis in Human Leukemia HL60 Cells. *Anticancer Res* **29**: 1449–1457.
- Ivanescu B, Miron A, Corciova A (2015). Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J Anal Methods Chem* **2015**: 247685.
- Jang D-S, Park K-H, Lee J-R, Ha T-J, Park Y-B, Nam S-H, *i sur* (1999). Antimicrobial Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. *Appl Biol Chem* **42**: 176–179.
- Kaye SB (1998). New Antimetabolites in Cancer Chemotherapy and Their Clinical Impact. *Br J Cancer* **78 Suppl 3**: 1–7.
- Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y (2016). Major Apoptotic Mechanisms and Genes Involved in Apoptosis. *Tumor Biol* **37**: 8471–8486.
- Ko SG, Kim H-P, Jin D-H, Bae H-S, Kim SH, Park C-H, *i sur* (2005). *Saussurea Lappa* Induces G2-growth Arrest and Apoptosis in AGS Gastric Cancer Cells. *Cancer Lett* **220**: 11–19.
- Kretschmer N, Rinner B, Stuendl N, Kaltenecker H, Wolf E, Kunert O, *i sur* (2012). Effect of Costunolide and Dehydrocostus Lactone on Cell Cycle, Apoptosis, and ABC Transporter Expression in Human Soft Tissue Sarcoma Cells. *Planta Med* **78**: 1749–1756.
- Lacreta FP, Brennan JM, Nash SL, Comis RL, Tew KD, O'Dwyer PJ (1994). Pharmacokinetics and Bioavailability Study of Ethacrynic Acid as a Modulator of Drug Resistance in Patients with Cancer. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 1186–1191.
- Larasati YA, Putri DDP, Rohmad Yudi U, Hermawan A, Meiyanto E (2014).

- Combination of Cisplatin and Cinnamon Essential Oil Inhibits HeLa Cells Proliferation through Cell Cycle Arrest. *J Appl Pharm Sci* **4**: 14–19.
- Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB (1993). Cytotoxic Studies of Paclitaxel (Taxol) in Human Tumour Cell Lines. *Br J Cancer* **68**: 1104–1109.
- Lohberger B, Rinner B, Stuendl N, Kaltenecker H, Steinecker-Frohnwieser B, Bernhart E, *i sur* (2013). Sesquiterpene Lactones Downregulate G2/M Cell Cycle Regulator Proteins and Affect the Invasive Potential of Human Soft Tissue Sarcoma Cells. *PLoS One* **8**: e66300.
- Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC (2009). Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2685–2700.
- Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J (2007). TNF-alpha-induced Mitochondrial Oxidative Stress and Cardiac Dysfunction: Restoration by Superoxide Dismutase Mimetic Tempol. *AJP Hear Circ Physiol* **293**: H2726–H2737.
- Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, *i sur* (2016). Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**: 271–289.
- Mitra AK, Agrahari V, Mandal A, Cholkar K, Natarajan C, Shah S, *i sur* (2015). Novel Delivery Sproaches for Cancer Therapeutics. *J Control Release* **219**: 248–268.
- Nykký J, Tuusa JE, Kirjavainen S, Vuento M, Gilbert L (2010). Mechanisms of Cell Death in Canine Parvovirus-infected Cells Provide Intuitive Insights to Developing Nanotools for Medicine. *Int J Nanomedicine* **5**: 417–428.
- Politeo O, Skocibusic M, Carev I, Burcul F, Jerkovic I, Sarolic M, *i sur* (2012). Phytochemical Profiles of Volatile Constituents from *Centaurea ragusina* Leaves and Flowers and their Antimicrobial Effects. *Nat Prod Commun* **7**: 1087–1090.
- Quintero A, Pelcastre A, Dolores Solano J, Guzman A, Diaz E (1999). Antitumoral Activity of New Pyrimidine Derivatives of Sesquiterpene Lactones. *J Pharm Sci* **108**–112.

- Radić S, Peharec Štefanić P, Lepeduš H, Roje V, Pevalek-Kozlina B (2013). Salt tolerance of *Centaurea ragusina* L. is Associated with Efficient Osmotic Adjustment and Increased Antioxidative Capacity. *Environ Exp Bot* **87**: 39–48.
- Ramaswami R, Harding V, Newsom-Davis T (2013). Novel Cancer Therapies: Treatments Driven by Tumour Biology. *Postgrad Med J* **89**: 652–658.
- Saeed M, Jacob S, Sandjo LP, Sugimoto Y, Khalid HE, Opatz T, *i sur* (2015). Cytotoxicity of the Sesquiterpene Lactones Neoambrosin and Damsin from *Ambrosia maritima* Against Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Front Pharmacol* **6**: 267.
- Schmitt B, Vicenzi M, Garrel C, Denis FM (2015). Effects of N-acetylcysteine, Oral Glutathione (GSH) and a Novel Sublingual Form of GSH on Oxidative Stress Markers: A Comparative Crossover Study. *Redox Biol* **6**: 198–205.
- Seaman FC (1982). Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae. *Bot Rev* **48**: 121–594.
- Shewach DS, Kuchta RD (2009). Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chem Rev* **109**: 2859–2861.
- Sun C-M, Syu W-J, Don M-J, Lu J-J, Lee G-H (2003). Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from the Root of *Saussurea lappa*. *J Nat Prod* **66**: 1175–1180.
- Tait SWG, Ichim G, Green DR (2014). Die Another Way - Non-apoptotic Mechanisms of Cell Death. *J Cell Sci* **127**: 2135–2144.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive Oxygen Species in Cell Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L1005–L1028.
- Trump BE, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC (1997). The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol Pathol* **25**: 82–88.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW, *i sur* (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* **339**: 1546–1558.
- Vujčić V, Radić Brkanac S, Radić Stojković M, Žilić I, Tolić S, Krivohlavek A, *i sur* (Poreč, Hrvatska, 2016). Biological Activity of Isolated Compounds from *Centaurea ragusina* L. *5th Croat Congr Toxicol with Int Particip CROTOX 2016*

- Warwick GP (1963). The Mechanism of Action of Alkylating Agents. *Cancer Res* **23**: 1315–1333.
- Wen J, You K-R, Lee S-Y, Song C-H, Kim D-G (2002). Oxidative Stress-mediated Apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 38954–38964.
- Wilcox CS (2010). Effects of Tempol and Redox-cycling Nitroxides in Models of Oxidative Stress. *Pharmacol Ther* **126**: 119–145.
- Woerdenbag HJ, Lemstra W, Malingré TM, Konings AW (1989). Enhanced Cytostatic Activity of the Sesquiterpene Lactone Eupatoriopicrin by Glutathione Depletion. *Br J Cancer* **59**: 68–75.
- Yoshikawa T, Naito Y (2002). What Is Oxidative Stress? *Japan Med Assoc J* **45**: 271–276.
- Zaghloul AM, Yusufoglu HS, Salkini MAA, Alam A (2014). New Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Anthemis scrobicularis*. *J Asian Nat Prod Res* **16**: 922–929.
- Zdero C, Bohlmann F, King RM, Robinson H (1989). Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from Australian Helipterum Species. *Phytochemistry* **28**: 517–526.
- Zhang S, Won Y-K, Ong C-N, Shen H-M, Han-Ming S (2005). Anti-cancer Potential of Sesquiterpene Lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **5**: 239–249.
- Žlender Vi (2004). Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol* **54**: 267–274.

8 ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, upisao sam Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga u Zagrebu. U sklopu srednjoškolskog obrazovanja sudjelovao sam u provjerama znanja iz biologije te osvojio 3. mjesto u sklopu Županijskog natjecanja iz biologije u kategoriji istraživačkih radova. Dodatno motiviran od strane profesora biologije, 2012. godine sam upisao preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon tri godine, završene odličnim uspjehom, upisao sam diplomski studij molekularne biologije na istom fakultetu. Održavajući odličan uspjeh, dobio sam i iskoristio priliku biti dio Erasmus+ programa studentske razmjene. Dobio sam Erasmus+ stipendiju i proveo 6 mjeseci na Tehničkom sveučilištu u Madridu studirajući na biotehnološkom smjeru Agronomskog fakulteta. To iskustvo mi je pomoglo steći nova znanja i iskustva rada i života u međunarodnom okruženju. U cijelom iskustvu puno mi je pomogla i stipendija za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno sam student apsolvantske godine i ovim diplomskim radom namjeravam uspješno završiti jednu etapu života. Pritom se nadam vrlo brzo otvoriti i drugu, puno specifičniju etapu doktorskog studija u području istraživanja raka ili bioinformatiki.

Tokom svog života radio sam brojne poslove i tako stekao radne navike i zavidan stupanj organiziranosti. Sukladno tome, čim sam upisao fakultet, pridružio sam se Udruzi studenata biologije (BIUS) i sudjelovao na više znanstvenih projekata. Također sam proveo semestar kao demonstrator iz kolegija Histologija i histokemija te Histologija i embriologija gdje sam usavršio svoje predavačke sposobnosti. Svoje organizacijske, komunikacijske i podučavalačke vještine imao sam priliku dokazati prvo kao sudionik, a dvije godine kasnije i kao voditelj radionica na projektu „Noć biologije“. Željnan laboratorijskog iskustva, odradio sam šest mjeseci stručne prakse u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada 2015. godine. Krajem 2015. godine javio sam se u Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković kako bih odradio stručnu praksu od šest mjeseci. Nakon isteka tog perioda odlučio sam ostati raditi diplomski rad u istom laboratoriju, jer mi se svidjela tematika i atmosfera. Danas, skoro dvije godine nakon

mog prvog posjeta Institutu Ruđer Bošković, završavam studij i nadam se nastaviti raditi u području istraživanja raka.