Djelovanje oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline na apoptozu različitih staničnih linija humanih karcinoma

Jerinić, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:114214

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

I

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

Robert Jerinić

DJELOVANJE OLEUROPEINA IZ EKSTRAKTA LISTA DIVLJE MASLINE NA APOPTOZU RAZLIČITIH STANIČNIH LINIJA HUMANIH KARCINOMA

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor: izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

I

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

Robert Jerinić

DJELOVANJE OLEUROPEINA IZ EKSTRAKTA LISTA DIVLJE MASLINE NA APOPTOZU RAZLIČITIH STANIČNIH LINIJA HUMANIH KARCINOMA

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor: izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.

Split, rujan 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: diplomski rad
Tema rada je prihvaćena na __ sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na __ sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i __ sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.
Pomoć pri izradi:

DJELOVANJE OLEUROPEINA IZ EKSTRAKTA LISTA DIVLJE MASLINE NA APOPTOZU RAZLIČITIH STANIČNIH LINIJA HUMANIH KARCINOMA

Robert Jerinić, broj indeksa 82.

Sažetak:
Ispitati učinak apoptoze na staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235. Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih staničnih linija oleuropeinom smanjiti stupanj preživljavanja stanica. Učinak oleuropeina na stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235 praćen je protočnom citometrijom. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235 ekstraktom oleuropeina dovelo je do smanjenja preživljavanja ispitivanih stanica karcinoma. Stupanj apoptoze kod karcinoma stanica dojke MDA-MB-231 nije proporcionalno s koncentracijom oleuropeina. Stupanj apoptoze kod karcinoma stanica glioblastoma A1235 proporcionalno je s koncentracijom oleuropeina. Najveći stupanj apoptoze uočen je na stanicama glioblastoma A1235 pri koncentraciji oleuropeina 0,5 μM. Najmanji stupanj apoptoze uočen je na stanicama mokraćnog mjehura T-24 pri koncentraciji oleuropeina 0,1 μM. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdili točni mehanizmi učinka oleuropeina na karcinomske stanice.

Ključne riječi: rak, apoptoza, protočna citometrija, divlja maslina, oleuropein

Rad sadrži: 71 stranica, 19 slika, 6 tablice, 61 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med. (MEFST) - predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med. (MEFST) član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.(MEFST) - član-mentor

Datum obrane: rujan 2017.
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: graduate thesis
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. __ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. __ and Faculty Council of School of Medicine, session no. __
Mentor: Assoc.prof. Vedrana Čikeš Čulić, PHD,
Technical assistence:

EFFECTS OF OLEUROPEIN EXTRACTED FROM WILD OLIVE´S LEAF ON APOPTOSIS OF VARIUS CELL LINES OF HUMAN CANCERS

Robert Jerinić, index N^0 82

Summary:
The effect of oleuropein on apoptosis of breast cancer cell lines MDA-MB-231, bladder cancer T-24 and glioblastoma A1235. The assumption is that exposure to carcinoma cell line with oleuropein reduces the survival of cells. The effects of oleuropeina on breast cancer cell line MDA-MB-231, bladder cancer T-24 and glioblastoma A-1235 cell lines were estimated by the flow cytometry. *In vitro* exposure of MDA-MB-231, T24 and A1235 cells to oleuropein decreased a survival of cancer cells. The degree of apoptosis in MDA-MB-231 cells is not in proportion with the concentration of oleuropein. The degree of apoptosis in A1235 cells is in proportion with the concentration of oleuropein. The highest effect of oleuropein was found in A1235 cells treated with 0.5 μM oleuropein. In the other hand, the minimum degree of apoptosis was observed in T24 cell treated by oleuropein at the concentration of 0.1 μM. To summarize this, additional research is required to elucidate a precise mechanism of oleuropein effects on cancer cells.

Key words: cancer, apoptosis, flow cytometry, wild olive, oleuropein

Thesis contains: 71 pages, 19 figures, 6 tables, 61 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: September 2017.

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

Zahvala

Zahvale kolegama i prijateljima Anti Rogošiću i Anti Begonji na potpori, savjetima i prijedlozima tijekom akademskog obrazovanja.

Neizostavan je zahvala kolegici Mirni Župić koja je svojom sugestijom učinila ovaj rad još boljim.

Veliko hvala kolegama Goranu Gajskom i Josipu Maduniću na potrebnim materijalima.

Velika hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc Vedrani Čikeš Čulić na potpori tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Posveta

Ovo istraživanje, pisanje rada i njegovu obranu posvećujem mojoj voljenoj baki Ani Arnugi i rodici Nikici Račić.

Hvala

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. RAK 2

1.2. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI 3

1.3. APOPTOZA 5

1.4. EPIDEMIOLOGIJA RAKA 9

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U SVIJETU 9

1.4.2. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ 10

1.5. RAK DOJKE 12

1.6. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA 13

1.7. GLIOBLASTOM 14

1.8. DIVLJA MASLINA *Olea europaea L. subsp. oleaster* 14

1.9. OLEUROPEIN 16

1.9.1. SINTETSKI PUT 16

1.9.2. FARMAKOLOŠKI UČINCI OLEUROPEINA 18

1.9.2.1 ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE OLEUROPEINA 18

1.9.2.2. PROTUUPALNO DJELOVANJE OLEUROPEINA 18

1.9.2.3. ANTIATEROGENO DJELOVANJE OLEUROPEINA 18

1.9.2.4. ANTITUMORSKO DJELOVANJE OLEUROPEINA 19

1.9.2.5. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE OLEUROPEINA 19

1.9.2.6. ANTIVIRUSNO DJELOVANJE OLEUROPEINA 19

1.9.2.7. NEUROPROTEKTIVNO DJELOVANJE OLEUROPEINA 20

1.9.2.8. OSTALA FARMAKOLOŠKA DJELOVANJA OLEUROPEINA 21

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 22

2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA 23

2.2. HIPOTEZA 24

3. MATERIJALI I METODE 25
3.1. STANIČNE LINIJE 26
3.1.1. MDA-MB-231 26
3.1.2. T24 27
3.1.3. A1235 28
3.2. POSTUPAK 29
3.3. PROTOČNA CITOMETRIJA 31
4. REZULTATI 32
4.1. MDA-MB-231 33
4.2.T24 34
4.3. A1235 35
5. RASPRAVA 36
6. ZAKLJUČAK 39
7. LITERATURA 41
8. SAŽETAK 48
9. SUMMARY 50
10. KAZALO POJMOVA 52
11. ŽIVOTOPIS 55

POPIS KRATICA

8

8-izo-PGF2α (eng. 8-iso-prostaglandin F2): 8-iso-prostagladin F2, prostanoid.....18

A

AIP (eng. apoptosis inducing factor): faktor indukcije apoptoze 7

Apaf1 (eng. apoptotic protease activating factor 1): faktor aktivacije proteaze u apoptozi 5

ATF-2 (eng. activating transcription factor 2): faktor aktivacije transkripcije.....37

ATM : serin/ treonin protein kinaza koja aktivira p53 .....3, 46

ATR: serin/ protein kinaza koja aktivira p53.....3, 46

B

Bcl-2 (eng. B-cell lymphoma 2): protein gena BCL-2..... 5, 8, 31, 37, 46

BCL2 (eng. B-cell lymphoma 2): gen koji kodira Bcl-2 3

C

ced (eng.cell death protease): kaspaze koje aktiviraju apoptozu 5, 8, 12, 14, 37

Chk1 (eng. checkpoint kinase 1): serin/ treonin protein kodiran genom CHK1.....3

Chk2 (eng. checkpoint kinase 2): serin/ treonin protein kodiran fenom CHK2 3

COX (eng. cyclooxygenase): enzim ciklooksigenaza 21, 38

Cyc (eng. cycline): ciklini, kontrolori staničnog ciklusa 4

D

DNA (eng. Deoxyribonucleic acid): deoksiribonukleinska kiselina.... 2, 3, 5, 12, 14, 46, 47, 50

E

EGFR (eng. epidermal growth factor receptor): epidermalni faktor rasta, kinaza..... 3, 14, 28

ERK1/2 (eng. extracellular signal–regulated kinases): vanstanična kinaza tipa 1 i 2.....38,46, 47

F

Fas: receptor za FasL; jedan od promotora apoptoze.....5, 31

FasL: transmembranski protein tip II iz obitelji TNF 31

FOS: onkogen, kodira protein fos 3

G

gp41 (eng.glycoprotein41):glikoprotein 41.....19

GPER/GPR30 (eng. G protein-coupled estrogen receptor 1/ G protein-coupled receptor 30): gonadotropni receptor 38

H

HER2/neu (eng. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) tirozin-kinaza receptor.....3

HIV (eng. human immunodeficiency virus): virus humane imunodeficijencije.....19

I

IAP (eng. inhibitor of apoptosis); inhibitor apoptoze.....5

J

JNK (eng. c-Jun N- terminal kinase): kinaza.....37

JNK/SAPK: tirozin kinaza.....38

JUN (eng. c-Jun- terminal kinase): gen za protein c-Jun.....3

K

KIT: onkogen.....3

L

lncRNAs (long non-coding RNAs): duga nekodirajuća RNA.....12

M

MAPK (eng.mitogen-activated protein kinase): protein kinaza 12, 13

miRNA (eng. microRNA): mala nekodirajuća RNA 2

MIT: onkogen.....3

MOS: onkogen 3

MYC: onkogen.....3

N

NF-κB (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer): nuklearni faktor kappa B ... 14,37, 48

P

p21 :kinazni inhibitor ciklina CDK2 37
p53 : tumor supresorski protein..... 3, 31, 37, 46, 50
P53: gen za protein p53: 3
PARP-1 (eng. Poly [ADP-ribose] polymerase 1): polimeraza kodirana genom *PARP-1* 7
PGE2 (eng. prostagladin E2): prostagladin E2 ili dinoproston..... 38
PI3K/Akt: jedan od unutarstaničnih puteva aktivacije 12, 14, 48

R

RAA: onkogen 3
RAF: onkogen 3
ROS (eng.reactive oxygen species): slobodni radikali 7, 8, 37, 46

S

Smac/Diablo: mitohondrijski protein 5
SRC: gen za Src tirozin- kinazu 3

T

TNF (tumor necrosis factor): faktor tumorske nekroze, citokin 5, 38, 50

1. UVOD

1.1. RAK

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji, kliničkoj slici i po načinu liječenja. Svim vrstama raka je zajedničko da nastaju od zdravih stanica koje su izgubile sposobnost adekvatnog odgovora na brojne signale, što za posljedicu ima nekontroliranu diobu preobražene stanice. Tumorska progresija dugotrajan je i složen proces nastanka raka koji se odigrava u više koraka (1).

Sažimanje slike o raku je dosta kompleksno te postoje brojni modeli po kojima se zdrava stanica razlikuje od stanice raka. Prema posljednjem modelu Hanahan-Weinerga, deset je ključnih razlika:

a) samodostatnost s obzirom na signale rasta

b) neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast

c) tkivna invazija i presađivanje

d) neograničeni potencijal umnažanja

e) tumorska angiogeneza

f) izmicanje apoptozi

g) poremećen metabolizam

h) sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora

i) genomska nestabilnost

j) upala

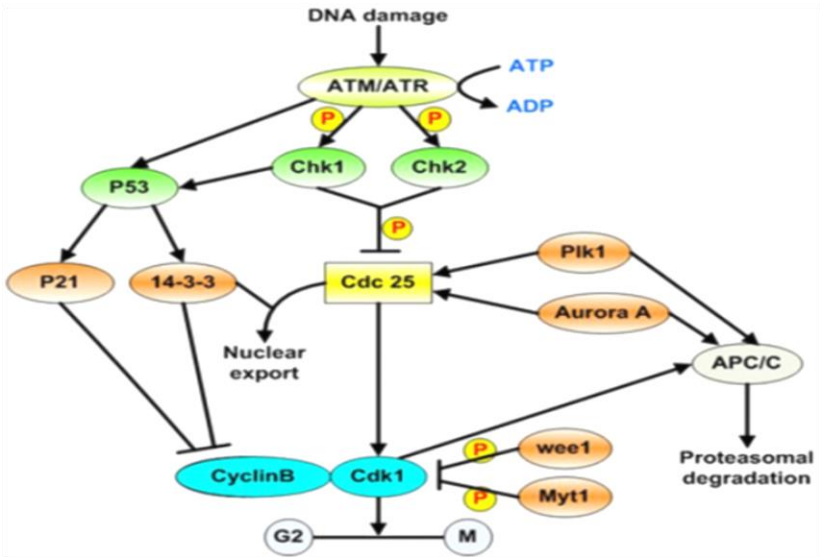
Osim mutacije, za nastanak i progresiju raka važnu ulogu ima metilacija DNA (epigenetska promjena), miRNA i aktivnost telomeraza (1).

1.2. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI

Evolucijsko stablo prema srodnosti s protein kinazama nazivamo ljudskim kinomom. Oko 518 gena kodira različite protein kinaze, od toga je 90 za tirozin kinaze. Putevi prijenosa signala u stanici načini su kako stanica vrši stanični rast, diobu, diferencijaciju i preživljavanje, usklađeno s uvjetima u okolišu. Ako se protoonkogeni ili/i njihovi proteinski produkti promijene te postanu aktivni, nastaju onkogeni, što dovodi do nekontroliranog rasta i diobe stanice. Različiti onkogeni kao EGFR, HER2/neu, KIT, MIT i drugi, geni su za čimbenike rasta koji spadaju u skupinu receptora s tirozin-kinaznom aktivnošću. Onkogeni kao RAA, RAF, MOS, SRC i drugi, geni su za molekule koje sudjeluju u prijenosu signala kao protein kinaze i G-proteini (proteini koji vežu gvanozin trifosfat). Neki onkogeni kao JUN, FOS, MYC i drugi su geni za transkripcijske čimbenike (2).

Geni čija inaktivacija ili gubitak dovodi do nastanka raka nazivamo tumor supresorskim genima. Osim genetski uzrokovanog nastanka raka, on može nastati i zbog metilacije promotora (epigenetski). Posebno je važan tumor supresorski gen P53, odnosno njegov proteinski produkt p53. On zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i popravlja oštećenu DNA te potiče apoptozu. Za nastajanje raka potrebna je mutacija u genu P53 ili BCL2 (3).

Zaustavljanje ciklusa na kontrolnim točkama staničnog ciklusa u G1, S i G2 fazi potiču proteinski kompleksi koji djeluju kao senzori za oštećenu ili neoštećenu DNA. Oni pokreću senzorne putove aktivacije ATM i ATR protein kinaze (Slika 1.). Njihovom aktivacijom aktiviraju se Chk2 (za ATM) i Chk1 (za ATR) protein kinaze koje fosforiliraju p53 i dovode do njegove stabilizacije (4).



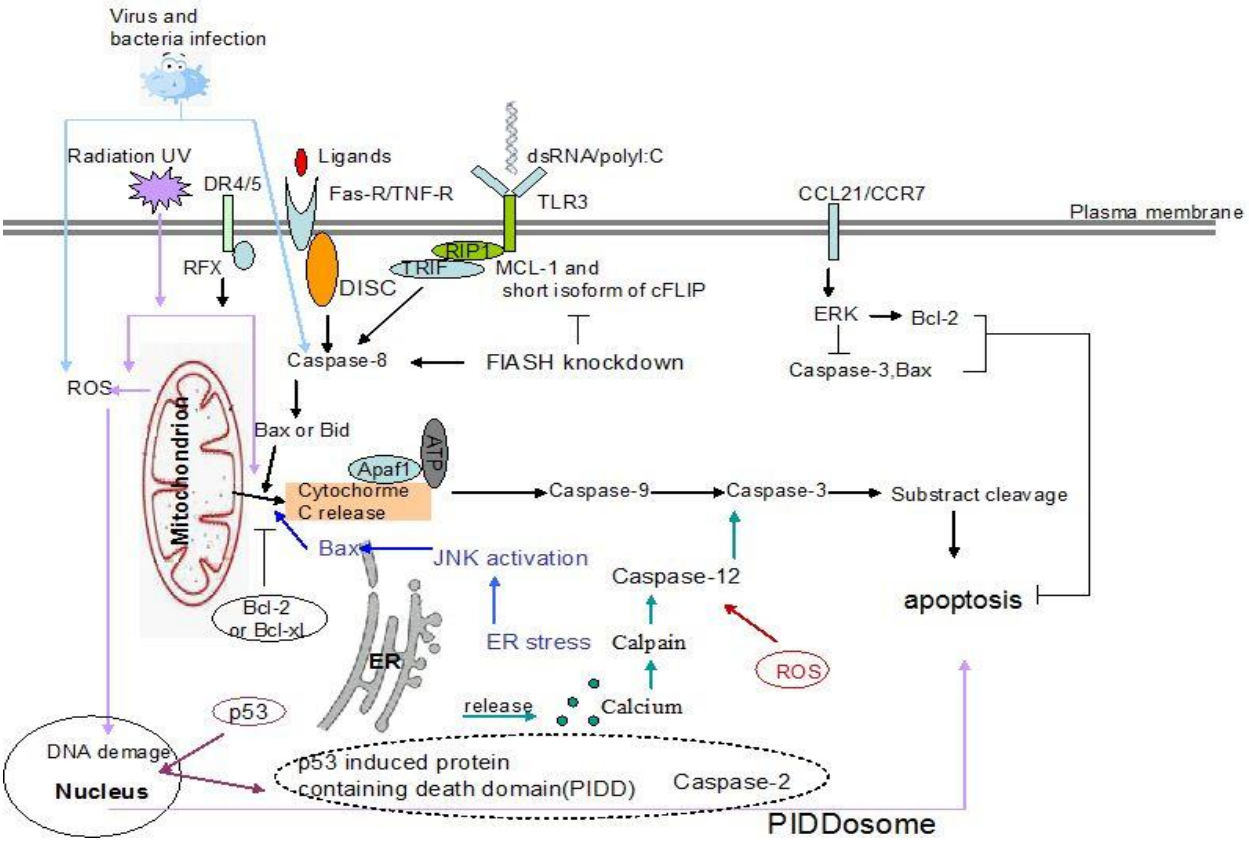
Slika 1. Aktivacija ATM i ATR protein kinaza.
(Preuzeto s: http://www.suggest-keywords.com/YXRyIHBhdGh3YXk/)

Prolazak stanice kroz stanični ciklus kontroliran je ciklinima (Cyc), kinazama ovisnim o ciklinima (Cdk) i inhibitorima kinaze ovisne o ciklinima (CKI), čiji se kompleks smatra regulatorom napredovanja kroz stanični ciklus. Tri su točke koje Cdk i Cyc kontroliraju: G_1, G_2 i G_2-S, dok četvrtu točku kontrolira kompleks Mad/Bub koji razgrađuje ciklin koji pripada obitelji CycB (5). Mnoge obitelji Cdk udružene su s određenim Cyc kako bi stanica napredovala u različitima fazama staničnog ciklusa. Negativna mutacija Cdk1 zaustavlja stanični ciklus u G2-M fazi, dok negativna mutacija Cdk2 inhibira prijelaz u S fazu. (6). Aktivnost Cdk tijekom napredovanja kroz stanični ciklus reguliraju četiri molekularna mehanizma: 1. stvaranje kompleksa Cdk/Cyc, 2. fosforilacija Cdk na treoninu 160 (Thr160), 3. inhibitorna fosforilacija Cdk na treoninu 14 i tirozinu 15 (Thr14 i Tyr15) i 4. vezanje Cdk inhibitora. Kombinirani učinci na Cdk odgovori su na unutarstanični i izvanstanični podražaj te reguliraju proliferaciju stanice (5)

1.3. APOPTOZA

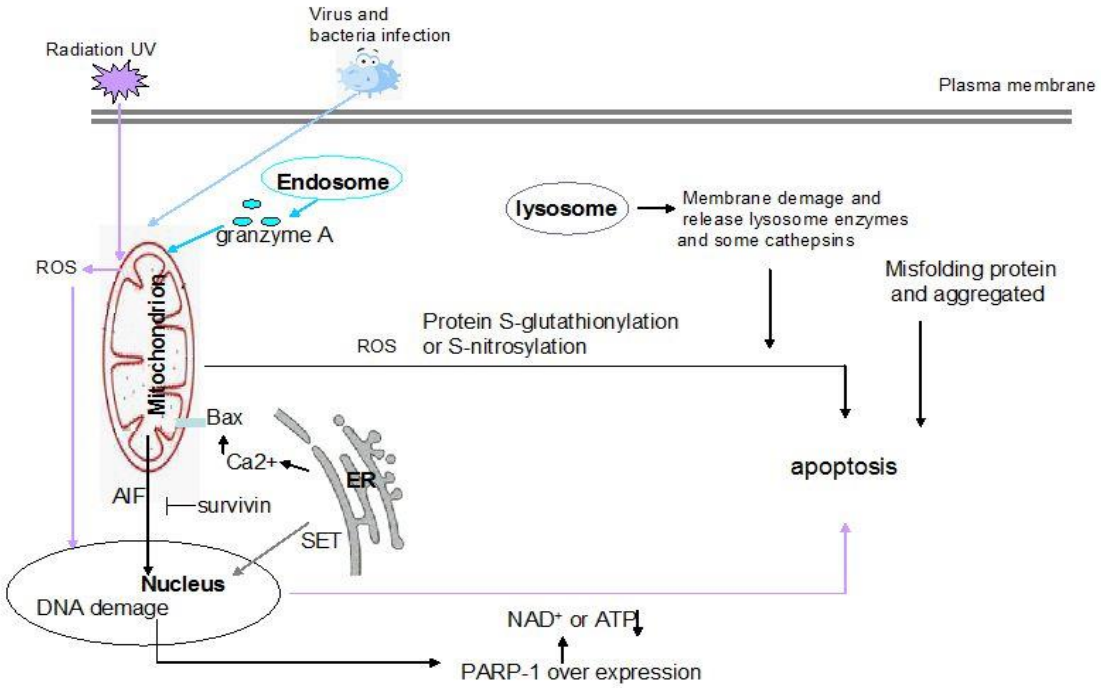
Riječ "apoptoza" dolazi iz grčke riječi *"απόπτωσις",* koje ima značenje „stabla na kojima ispada lišće u jesen“. Apoptoza ili programirana stanična smrt (eng. *programmed cell death*; PCD) je normalan fiziološki oblik stanične smrti. Kaspaze su proteaze bogate cisteinom (Cys) koje kidaju na aspartatskim ostacima (Asp) svoj proteinski supstrat. One kidaju jezgrinu laminu, što uzrokuje fragmentaciju jezgrine DNA, membrana bubri, a stanica se raspada na komadiće. Neki od ključnih proteina u procesu apoptoze su: Bcl-2, Smac/Diablo, IAP, kaspaza-3 (ced-3), kaspaza-4 (ced-4), kaspaza-8 (ced-8), kaspaza-9 (ced-9), TNF, Fas i brojni drugi koji nizom signalnih puteva aktiviraju nizvodne puteve koji će dovesti do stanične smrti. Dvije su vrste apoptoze: ovisna o kaspazama i neovisna o kaspazama (7).

Apoptoza ovisna o kaspazama (Slika 2.) uvjetovana je aktivnošću kaspaza kao što su ced-3, ced-4, ced-7, ced-8, ced-9 i ced-12 (7). Kalcijevi kanali mogu sudjelovati u apoptozi kao posljedica depolarizacije unutrašnje membrane, što dovodi do izlaska citokroma c iz mitohondrija koji se veže s Apaf1 dovodeći do aktivacije ced-9. Potom aktivna kaspaza ced-9 aktivira nizvodne kaspaze koje dovode do stanične smrti. Neki polipeptidi kao TNF ili Smac/Diablo prenose poruke za programiranu staničnu smrt (8). Kaskadni putevi aktivacije kaspaza mogu se aktivirati i X zračenjem, virusima (npr. *Herpes virus* koji aktivira ced-8), bakterijama (*Mycobacterium tuberculosis* koji aktivira ced-12), slobodnim radikalima (aktiviraju ced-12) i brojnim drugim čimbenicima (9). Apoptoza je kontrolirana inhibitorima apoptoze (iAP) i proteinskim kompleksom Bcl-2. Kompleks Bcl-2 ima dualnu ulogu: može kočiti ili poticati apoptozu (7).



Slika 2. Apoptoza ovisna o kaspazama.
(Preuzeto s: http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review)

Apoptoza neovisna o kaspazama (Slika 3.) posljedica je promjene potencijala na membrani mitohondrija, a zatim povećanja proizvodnje slobodnih radikala (eng. *reactive oxygen species*; ROS) (7). Čimbenik indukcije apoptoze (eng. *apoptosis inducing factor*; AIP) je flavoprotein koji ima ulogu u fragmentaciji stanice neovisne o kaspazama. Nedavno su pronađeni neki spojevi koji mogu inducirati AIP, koji dovodi do smrti stanice: simvastatin, staurosporin, kadmij i drugi. Ti spojevi pokreću apoptozu neovisnu o kaspazama. Osim API, ROS također sudjeluju u ovom načinu smrti stanice. ROS može aktivirati PARP-1 koji dovodi do izlaska API iz stanice (10). Reducirani glutation (GSH) i dušikov monoksid (NO) mogu blokirati neke tiolne skupine. Do sada je proučavanje mehanizma apoptoze neovisne o kaspazama ostavilo brojna neriješena pitanja i omogućio budućim generacijama znanstvenika uzbudljivo putovanje u traženju konačnog mehanizma.



Slika 3. Apoptoza neovisna o kaspazama.
Preuzeto s: http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review)

Znanstvenici su otkrili da neki hormoni mogu regulirati apoptozu kao npr. leptin, hormon adipocita, koji regulira cijepanje ced-3 i Bcl-2. Ako je razina hormona normalna, neće doći do apoptoze, međutim, ako je razina hormona smanjena, doći će do apoptoze (11).

Vitamin E povoljno djeluje na staničnu održivost blokirajući ced-3 (12). Učinak ljubičastog slatkog krumpira *Ipomea batatas* kod mišjih timocita je smanjenje količine ROS-a (13).

Likopen (rhodopurpurin) kao antioksidans može spriječiti apoptozu kod epitelnih stanica želudca zaraženih s *Helicobacter pylori* (14).

Biljni aktivni sastojci poput fisetina mogu biti okidači apoptoze. Fisetin je flavonoid koji aktivira ced-8 /ced-3 ovisni apoptozni put (15). Wongonin, O-metiliran flavonoid, ima anksiolitičku aktivnost, a također ima sposobnost aktivacije apoptoze nekih stanica raka povećavajući razinu PARP-a i aktivnost pro-ced-3 (15) (16).

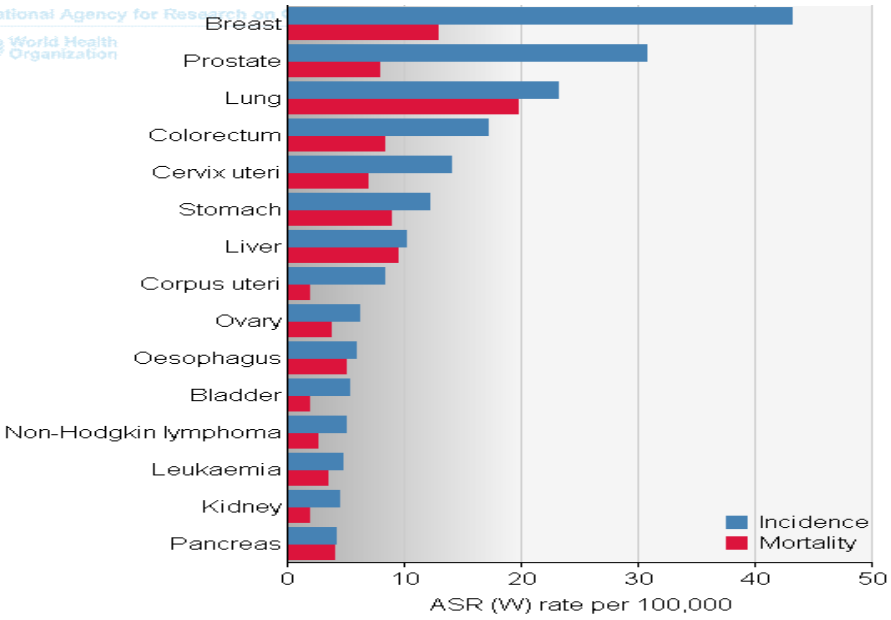
1.4. EPIDEMIOLOGIJA RAKA

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U SVIJETU

Rak je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, u 2012. godini prijavljeno je 8,2 milijuna novih slučajeva (17). Najveća smrtnost prisutna je kod raka pluća, jetre, želudca, kolorektalnog raka, raka dojke i jednjaka (Slika 4.).

Ukupna stopa smrtnosti u 20. stoljeću porasla je, zbog pušenja, na 215 umrlih od raka na 100 000 osoba. Od 1991. do 2012. godine, stopa je pala za 23% zbog smanjenja pušenja, kao i poboljšanja u ranom otkrivanju i liječenju. Ovaj pad doveo je do smanjenja za više od 1,7 milijuna smrtnih ishoda raka. Smanjuje se stopa smrtnosti za četiri najčešće vrste raka - pluća, debelog crijeva, dojke i prostate (18).

Agencija za istraživanje zdravlja i kvalitete (eng. *Agency for Healthcare Research and Quality*; AHRQ) procjenjuje da su izravni troškovi zdravstvene zaštite za rak u SAD-u 2013. bili 74,8 milijarde dolara. Procjenjuje se da je 44% tih troškova bilo namijenjeno za bolničko liječenje, a 40% za boravak u bolnici. Procjene se temelje na nizu istraživanja koje je provela agencija Medical Expenditure Panel Survey (MEP). Podaci su također vidljivi i na Internetskoj stranici: *meps.ahrq. gov / mepsweb /* (18).

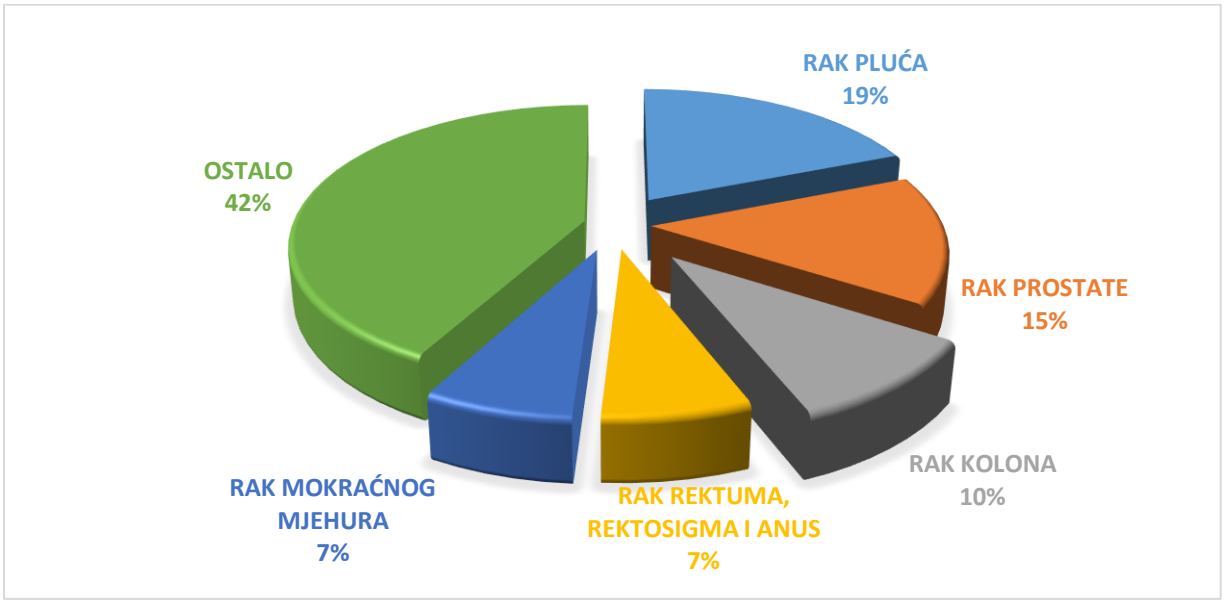


Slika 4. Epidemiologija raka u svijetu. Incidencija i mortalitet.
(Preuzeto s: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)

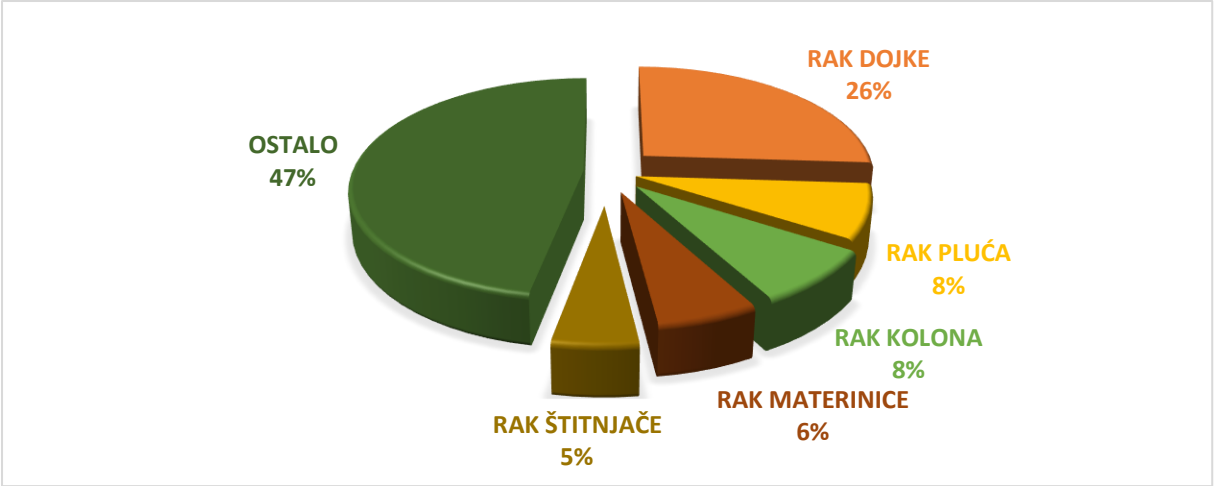
1.4.2. EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ

Ukupan broj novo dijagnosticiranih bolesnika s invazivnim rakom (bez raka kože) bio je 21 434. Stopa incidencije je iznosila 500,2/100 000. Odnos M:Ž je 53:47. U Hrvatskoj je 2014. godine od raka umrlo 13 939 osoba. Stopa mortaliteta bila je 325,3/100 000. Odnos M:Ž bio je 57:43 (19).

Pet najčešćih sijela raka u Hrvatskoj kod muškaraca su (Slika 5.): pluća (19%), prostata (15%), kolon (10%), rektum, rektosigma i anus (7%) i mokraćni mjehur (7%). Pet najčešćih sijela raka u Hrvatskoj kod žena su (Slika 6.): dojka (26%), pluća (8%), kolon (8%), tijelo maternice (6%) i štitnjača (5%) (19).



Slika 5. Najčešća sijela raka kod muškaraca u Hrvatskoj.
(Podaci preuzeti s: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.)



Slika 6. Najčešća sijela raka kod žena u Hrvatskoj.
(Podaci preuzeti s: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.)

1.5. RAK DOJKE

Rak dojke je drugi najčešći rak u ukupnom poretku po zastupljenosti i prvi po incidenciji kod žena. Procjenjuje se da je u 2012. godini bilo 1,67 milijuna novih slučajeva (21). U Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira oko 2500 novih slučajeva, a oko 800 žena umre od raka dojke. Upravo te brojke svrstavaju Hrvatsku u zemlje s visokom incidencijom (100/100 000 žena). Različiti čimbenici rizika utječu na pojavnost raka dojke: dob, pozitivna obiteljska anamneza, starija životna dob prvorotkinje, nerotkinje, rana menarha, kasna menopauza, zračenje, debljina, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija, dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke i brojni drugi čimbenici rizika. Odgovarajuća adjuvantna terapija povećava vjerojatnost petogodišnjeg preživljenja za 30 - 70% (22). Osim standardne terapije, koja ovisi o vrsti i prognozi raka, javljaju se novi terapijski ciljevi, koji su pronašli odobrenje znanstvenih stručnjaka, a time i regulatornih tijela.

Jedan od novijih pristupa liječenju raka dojke je primjena inhibitora DNA metil transferaze (npr. DNMTi) ili histon deacetilaze (npr. HDACi), odobreni od strane Američke agencije za lijekove i hranu (eng. *US Food and Drug Agency*; FDA), a koji su pokazali veliki potencijal u borbi protiv raka dojke (23). Osim toga, uočeno je da promjena membranskog potencijala tumorske stanice ima ulogu u progresiji i proliferaciji tumorske stanice. Velika važnost usmjerila se na promjenu koncetrancije kalcija, što je dovelo do zaključka da neki inhibitori kalcija (npr. verapamil) mogu promijeniti membranski potencijal tumorske stanice i aktivirati ced-3 koja dovodi do stanične smrti (24).

Razlozi nastanka rezistencije na primijenjenu terapiju su različiti. Ona može biti stečena ili naslijeđena. Dosadašnja istraživanja mehanizma nastanka rezistencije su pokazala da signalni putevi MAPK i PI3K/Akt (25) te promjena u lancu lncRNA igraju bitnu ulogu u pojavi rezistencije (26).

1.6. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

Incidencija raka mokraćnog mjehura je četiri puta veća kod muškarca nego kod žena te dva puta veća u pripadnika crne rase u odnosu na bijelu rasu. U muškaraca zauzima četvrto mjesto po pojavnosti. Prema američkom udruženju za rak (eng. *American Cancer Society*; ACS) u 2016. godini prijavljeno je približno 76 960 novih slučajeva. U većini bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura u kliničkoj slici je prisutna hematurija (najčešće bezbolna), učestalo mokrenje i urinoinfekcija. Čimbenici rizika za nastanak raka jesu: izloženost azo bojama, aluminiju, arsenu, citostaticima, upale mokraćnog mjehura i razne promjene na mokraćnom mjehuru (18).

Liječenje se temelji na stupnju proširenosti bolesti. Razlikuje se pristup kod neinvazivnog i invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura ili metastatske bolesti. Kod neinvazivnog oblika primjenjuje se *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) cjepivo ili mitomicin C.

U invazivnom obliku karcinoma osnovni oblik liječenja je radikalna cistektomija s neoadjuvatnom kemoterapijom temeljenom na cisplatinu uz adjuvatnu kemoterapiju, ovisno o patohistološkoj slici, statusu limfnih čvorova i stadiju bolesti. Metastatska bolest liječi se kemoterapijom i to prvom linijom gemcitabinom i cisplatinom, a od ostalih paklitakselom, doksorubicinom, metotreksatom i vinblastinom. U slučaju prisutnih koštanih presadnica primjenjuju se i bifosfonati (28). Usprkos velikom znanstvenom napretku koji je napravljen u liječenju raka, pojedini lijekovi pokazuju smanjenje učinkovitosti. Pridodaje se važnost mTOR inhibitorima (everelimus, sirolimus) u kombinaciji s gemcitabinom (29).

Receptor melastatin 7 (TRPM7) je ionotropni receptor za Mg^{2+} / Ca^{2+} koji se fuzira s domenom kinaznih receptora. Izmjena dvovaletnih iona pokreće MAPK koja ima ulogu u apoptozi stanice (30).

Prehrana bogata betacianinom (BC) i viteksinom (XVX) iz *Beta vulgaris L.* (cikla) smanjuje pojavnost karcinoma mokraćnog mjehura te se predlaže prehrana bogata ovim bioaktivnim molekulama (31).

1.7. GLIOBLASTOM

Novotvorine središnjeg živčanog sustava su zloćudne po lokalizaciji, bez obzira na svoj potencijal jer bilo koji ekspanzivni proces unutar koštanog oklopa u kojem je smješten središnji živčani sustav može uzrokovati pojedinačne neurološke ispade, poremećaj svijesti, komu, smrt i brojna druga stanja. Najčešći tumori mozga su zapravo presadnice iz drugih, primarnih žarišta, koje se pojavljuju oko 10 puta češće nego primarni tumori. Prema histološkoj klasifikaciji glioblastom spada u gliome: astrocitom četvrtog stupnja (glioblastom; G IV). Gliomi čine 50% svih tumora mozga, a glioblastom 80% svih glioma. Ovisno o stupnju astrocitoma, različit je terapijski pristup: kirurško liječenje, radioterapija i kemoterapija uz potporno liječenje (32).

Procjenjuje se da je u SAD-u u 2016. dijagnosticirano 24 790 novih slučajeva. Oko 50% glioma su glioblastomi s 12,120 novih slučajeva. Pojavljuju se u dobi od 40 do 65 godina života. U većini glioblastoma preživljenje je 15 mjeseci, a prijavljeno je preživljenje 36 mjeseci kod 5% slučajeva glioblastoma (33). Prema dostupnim podacima za Republiku Hrvatsku za 2014. godinu, od svih ukupnih tumora, tumori mozga čine 2% (19).

Molekularni biomarkeri kao O-(6)-metilgvanin-DNA-metiltransferaza (MGMT), mutacija izocitrat dehidrogenaze (IDH), aktivnost epidermalnog faktora rasta (EGFR) i vaskularnog faktora rasta (VEGF), latrofilin, gena za citokrom c oksidazu (CCO), fosfolipidni metaboliti, aktivnost mRNA i miRNA (hTERT) dovode se u vezu s dijagnozom i prognozom glioblastoma (34).

Istražuje se učinak apoptoze na C6 stanica glioblastoma aktiviranjem kaspaza ced-9 i ced-3 (35). Brojni biološki spojevi potiču apoptozu aktiviranjem NF-kB puta. Istražuju se i mehanizmi aktivacije PI3K/Akt i Smad2/3 signalnih kaskada u stanicama glioblastoma (36).

1.8. DIVLJA MASLINA *Olea europaea L. subsp. oleaster*

Stablo masline je kulturno obilježje zemalja Sredozemlja. Ono je važan izvor jestivog ulja kako tijekom proteklih stoljeća, tako i danas. Palinološki i antrakološki dokazi upućuju korištenje divlje masline (tzv. *oleaster* maslina) u razdoblju paleolitika i neolitika na području Save. Genetske varijacije brojnih vrsta *oleaster* populacije distribuirane su po cijelom Sredozemlju. Razlika među populacijama *oleaster* masline posljedica je različitih klimatskih i habitalnih uvjeta (37).

Divlja maslina (Slika 7.) prisutna je u zemljama duž Mediterana kao trnovit grm s malim plodovima, za razliku od kultivirane vrste *Oleae europaeae L. subsp. europaeae* koje nemaju trnje i proizvode mesnati plod bogat uljem. Pojavljuje se kao zimzelen i razgranati grm. Raste na suhim i kamenitim područjima. Ima manje listove, jake trnovite grane. Plodovi su sitni i gotovo crni (38). Vjerojatno divlja maslina nije pravi predak kultivirane vrste, iako imaju vrlo slične genetske i kromosomske karakteristike. Moguće je pretpostaviti da divlja maslina potječe iz dviju različitih vrsta: *Olea africana* (vrste koja ima duguljaste listove) i vrste koja ima bogate plodove.



Slika 7. Grana, list i plod divlje masline.
(Preuzeto s: http://media.eol.org/content/2014/08/15/04/65032_orig.jpg)

Kemijski sastojci maslinovog lista:

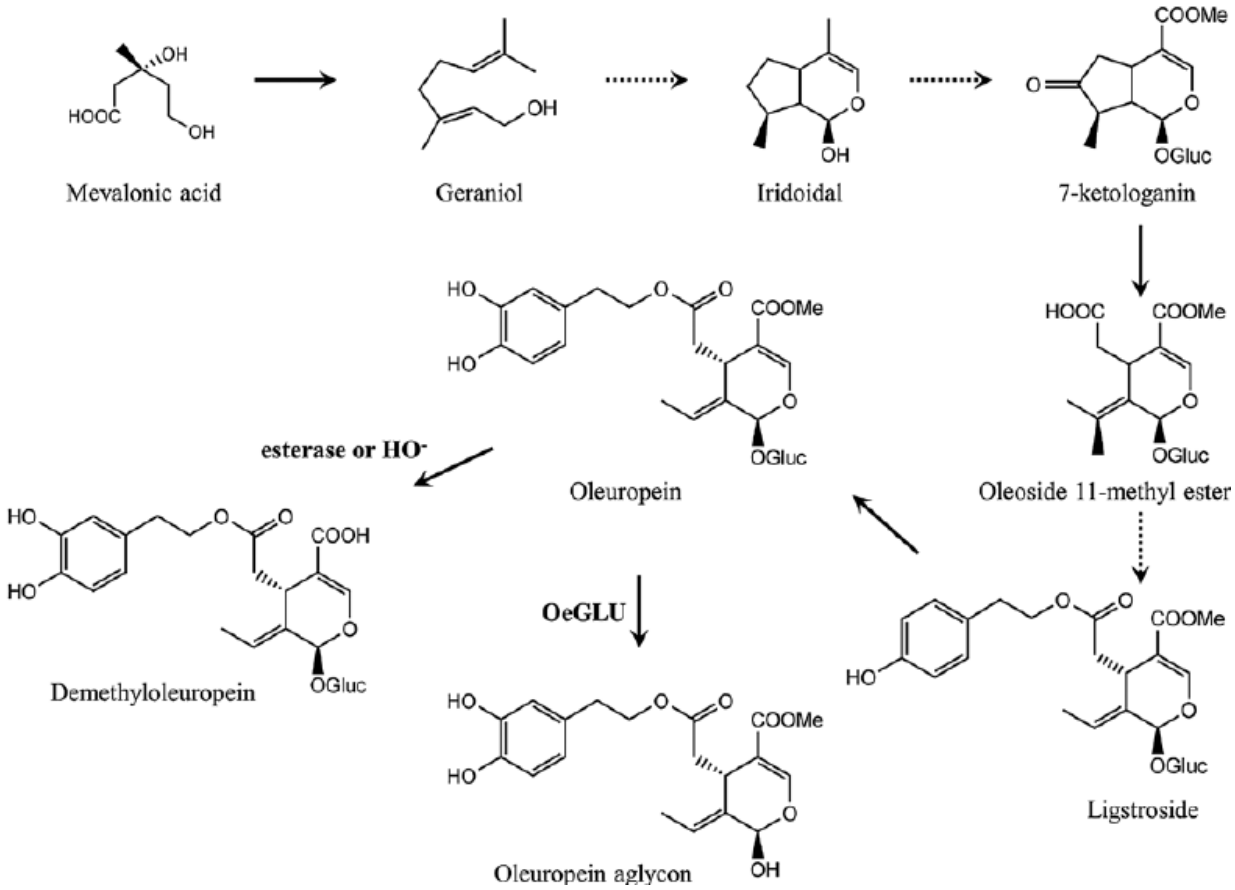
a) iridoidi: oleuropein (kao 6-O-glikolizirani i aglikon; 5-9%), ligstrozid, oleorozid;
b) triterpeni: oleanolična kiselina, maslinska kiselina;
c) flavonoidi: luteolin, kempferol, krisoeriol i derivati apigenina;
d) kalkoni: olivin, olivin-4-o-diglukozid;
e) fenolne kiseline: kumarinska kiseline, kafeinska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

List masline se koristi za očuvanje imunološkog sustava, pokazuje znatna antimikrobna i antivirusna svojstva. Dobar je antioksidans, a pored toga djeluje na smanjenje razine glukoze u krvi i dilataciju arterija. Liofilizirani ekstrakt povećava razinu trijodtironina (T_3) te dovodi do inhibicije tireotropnog hormona (TSH). Flavonoidi kao apigenin i njegovi derivati te luteolin pokazuju proupalno djelovanje inhibirajući sustav komplemenata (39).

1.9. OLEUROPEIN

1.9.1. SINTETSKI PUT

Oleuropein su otkrili Bourquelot i Vintilesco 1908. godine. To je ester elenolične kiseline i dihidroksifeniletanola, empirijske formule $C_{25}H_{32}O_{13}$. Fitokemijski pripada skupini iridoida, točnije sekoiridoida. Iridoidi su derivati ciklopentanopirana, a kod sekoiridoida dolazi do otvaranja ciklopentanskog prstena. Derivat je mevalonskog puta u biljkama (Slika 8.). U maslini, prvenstveno u listu, prisutni su razni derivati oleuropeina kao demetiloleuropein, metilni ester oleozida, ligstrozid, dimetilni ester oleozida, oleurozid i brojni drugi (39).



Slika 8. Sintetski put oleuropeina.
(Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/272518204_fig1_Fig-1-A-simplified-scheme-of-the-oleuropein-biosynthesis-and-degradation-pathway)

U razvoju maslinova ploda razlikuju se tri faze rasta: faza rasta tijekom koje dolazi do akumulacije oleuropeina; faza sazrijevanja (ili zelena faza) koja se podudara sa smanjenjem razine klorofila i oleuropeina; i crna faza koja je karakterizirana pojavom antocijana i tijekom koje razina oleuropeina i dalje opada. Dakle, oleuropein je vrlo zastupljen u ranim fazama: u mladim plodovima može doseći do 14% suhe tvari. Neke vrste crne masline kao *Olea europea var. Leccino* tijekom sazrijevanja potpuno gube oleuropein. Elenolična kiselina i demetiloleuropein, derivati oleuropeina, pojavljuju se na početku zelene faze kada razina oleuropeina počinje opadati. Kod crne sorte, demetiloleuropein je glavni sastojak. Moguće je da su ta dva spoja nastala iz oleuropeina djelovanjem esteraze, jer se esterazna aktivnost značajno povećava u fazi sazrijevanja, a doseže maksimum u crnoj fazi. U plodu *Oleae europaeae* se akumuliraju samo glikozidni derivati oleuropeina. Nasuprot tome, dihidroksitirozol i neglikozidni sekoiridoidi pronađeni su u listu. Opadanje količine oleuropeina se također poklapa s opadanjem količine drugih sekoiridoida poput ligstrozida i povećanjem količine fenolnih spojeva. Fenolni spojevi iz djevičanskog maslinovog ulja pokazuju značajnu bioraspoloživost. Apsorpcija aglikona ligostrozida, hidroksitirozola, tirozola i oleuropein-aglikona je 55-60%. Studije su pokazale da oleuropein postiže maksimalnu koncentraciju u plazmi nakon 2 sata. Metabolizira se do hidroksitirozola i tirozola. Oba spoja se izlučuju u urinu, uglavnom, kao glukoronidi ili kao nekonjugirani spojevi (40).

1.9.2. FARMAKOLOŠKI UČINCI OLEUROPEINA

Oleuropein ima nekoliko farmakoloških djelovanja kao antioksidativno, protuupalno, antiaterogeno, protutumorsko, antimikrobno i antivirusno djelovanje, te je iz tih razloga komercijalno dostupan kao dodatak prehrani u zemljama Sredozemlja. Osim toga, oleuropein je pokazao kardioprotektivni učinak kod primjene doksorubicina. Pokazao je dodatni hipolipemijski i antiishemijski učinak (40).

1.9.2.1 ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Primjena sekoiridoida, oleuropeina iz maslinovog ulja, dovela je do smanjenja izlučivanja derivata eikozanoida, 8-izo-PGF2α, što znači nižu *in vivo* peroksidaciju lipida. Istodobno dolazi do smanjenja ukupnog, slobodnog i esterificiranog kolesterola (40).

1.9.2.2. PROTUUPALNO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Oleuropein povećava proizvodnju dušikovog oksida (NO) u makrofazima povećavajući aktivnost inducibilnog oblika sintaze dušikovog oksida (iNO). Inhibira aktivnost lipooksigenaze i proizvodnju leukotriena B_4 (41).

1.9.2.3. ANTIATEROGENO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Antiaterogeno djelovanje se zasniva na smanjenju adhezije monocita na stimulirane endotelne stanice. U ishemijskim srčanim stanicama prethodno tretiranih oleuropeinom, smanjena je razina oksidiranog oblika glutationa (GSSH) i peroksidacija lipida što dovodi do smanjenja aktivnosti lipooksigenaze (40).

1.9.2.4. ANTITUMORSKO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Sastojci u maslinovom ulju su identificirani kao djelotvorna sredstva u ublažavanju inicijacije, promocije i progresije tumorske stanice.

Aglikoni sekoiridoida: deacetoksioleuropein, ligstrozid i oleuropein induciraju apoptozu kod adenokarcinoma dojke (MCF-7). Sirovi ekstrakti maslinovog lista inhibiraju staničnu proliferaciju adenokarcinoma dojke (MCF-7) i karcinoma mokraćnog mjehura (T-24) i endotel stanica goveđeg mozga (BBCE) (42).

1.9.2.5. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Fenolne strukture derivata iridoida (ili sekoiridoida) pridonose antimikrobnom učinku. Pretpostavljaju se različiti mehanizmi djelovanja oleuropeina na bakterijsku stanicu: narušavanje sloja peptidoglikana, inhibicija sinteze aminokiselina potrebnih za rast bakterija ili poticanje fagocitoze (43).

Glikozilirani oleuropein i njegov aglikon mogu inhibirati proizvodnju enterotoksina B koji proizvodi *Staphylococcus aureus*. Inhibira razvoj *Salmonelae enteridis*, *Bacilli cerei* i *Mycoplasmae*. Potpuno inhibira razvoj *Klebsiellae pneumoniae*, *Escherichiae colis* i *Bacilli cerei*. Listovi ekstrakta masline pokazali su antimikrobni učinak protiv *Campylobacter jejuni, Helicobacter pylori* i metilin rezistetni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (44, (45).

1.9.2.6. ANTIVIRUSNO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Oleuropein ima snažno antivirusno djelovanje protiv: herpesa mononukleoze, hepatitisa, rotavirusa, respiratornog sincicijskog virusa, parainfluenca virusa, goveđeg rinovirusa, pasjeg parvovirusa i virusa mačje leukemije (46).

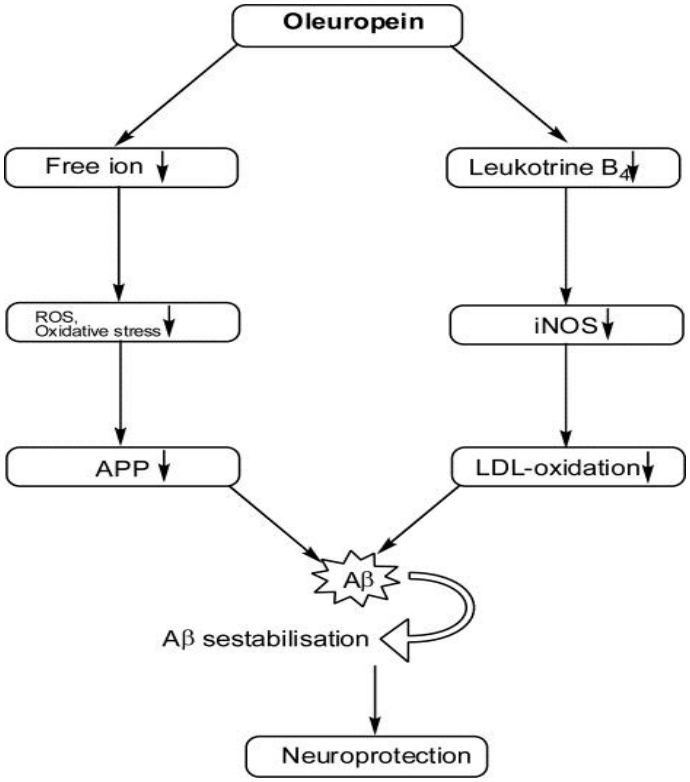
Pokazano je značajno djelovanje na virus humanoimunodeficijencije (HIV) koje je ovisno o dozi oleuropeina. Pretpostavlja se da je oleuropein djeluje na gp-41, molekulu koja se nalazi na površini HIV stanice i odgovorna je za ulazak u zdravu stanicu (47).

1.9.2.7. NEUROPROTEKTIVNO DJELOVANJE OLEUROPEINA

Prema jednoj od teoriji starenja, ono je rezultat oksidativnog oštećenja membrane mitohondrija što dovodi do stanične disfunkcije. Membrana mitohondrija je osjetljiva na slobodne radikale zbog prisutnih ugljikovih (C-C) veza u lipidnom lancu fosfolipida, što posljedično dovodi do neurodegenerativnih i kognitivnih bolesti (40).

Oleuropein se nekovaletno veže za amiloid stvarajući zaštitni sloj koji smanjuje ili sprječava agregaciju β-amiloida (Aβ), protein koji se nakuplja kod Alzheimerove bolesti. Pokazalo se da oleuropein djeluje kao inhibitor tau (τ) proteina koji inhibira stvaranje amiloidnih agregata (48).

Dijagram neuroprotektivne uloge oleuropeina prikazan je na Slici 9. (40).



Slika 9. Dijagram neuroprotektivnog djelovanja oleuropeina.
(Preuzeto iz: Omar SH. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Scientia Pharmaceutica. 2010;78(2):133-154. doi:10.3797/scipharm.0912-18.)

1.9.2.8. OSTALA FARMAKOLOŠKA DJELOVANJA OLEUROPEINA

Pokazalo se da list masline i oleuropein imaju protektivni učinak na stanice kože. UVB zrake koje dopiru do razine epidermisa kože mogu inducirati povišenje razine ciklooksigenaze tipa 2 (COX-2), dok oleuropein na toj razini smanjuje aktivnost COX-2 (49).

Učinkovit je u uklanjanju slobodnih radikala, pa se redoviti koristi u „antiaging“ kremama (40).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi djelovanje oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline *Olea europea L. subsp. oleaster* na apoptozu različitih linija humanih karcinoma.

Učinak oleuropeina na apoptozu humanih staničnih linija ispitivat će se na staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231, karcinoma mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235.

2.2. HIPOTEZA

Oleuropein ima pro-apoptotski učinak na ispitivane human stanične linije:

MDA-MB-231, T24 i A1235.

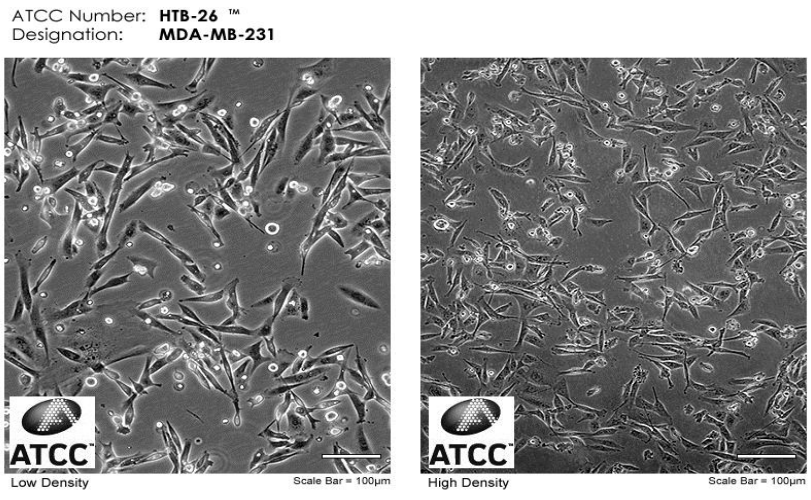
3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

3.1.1. MDA-MB-231

Tablica 1. Karakteristike MDA-MB-231 stanične linije.
Podaci preuzeti s: www.lgcstandards-atcc.org

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	dojka: mliječna žlijezda
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	adenokarcinom
Etnitet	Europljanka
Dob i spol	51., žena

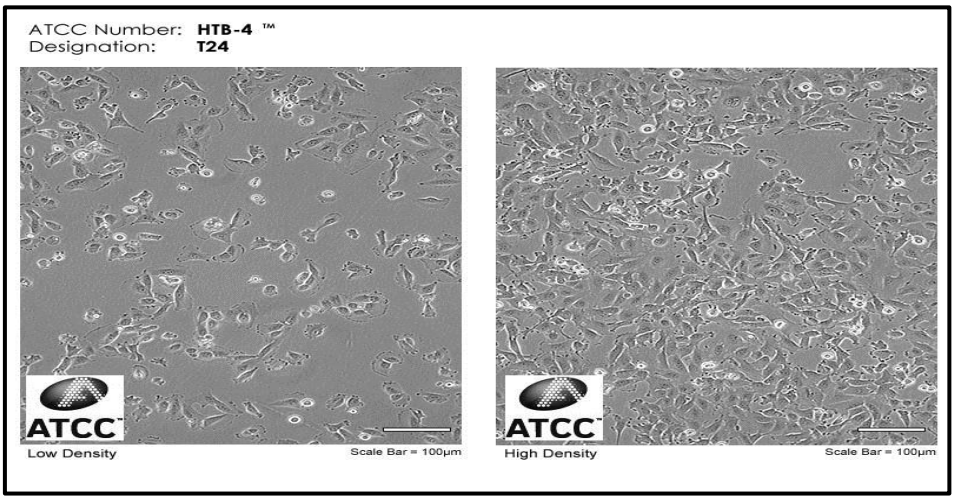


Slika 10. Stanice karcinomske linije MDA-MB-231.
Slika preuzeta sa: www.lgcstandards-atcc.org

3.1.2. T24

Tablica 2. Karakteristike T24 stanične linije.
Podaci preuzeti s: www.lgcstandards-atcc.org

Organizam	*Homo sapiens*, čovjek
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Etnitet	Europljanka
Dob i spol	81., žena

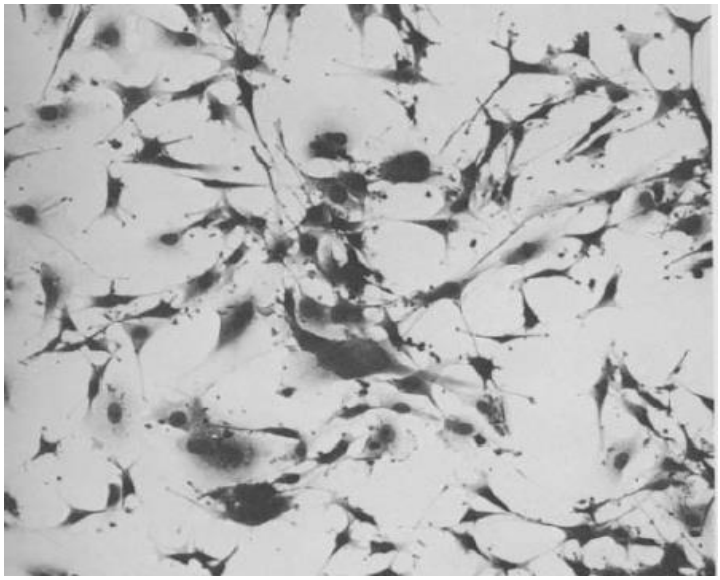


Slika 11. Stanice karcinomske linije T24.
Slika preuzeta s: www.lgcstandards-atcc.org

3.1.3. A1235

Tablica 3. Karakteristike A1235 stanične linije.
Preuzeto s: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698499

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mozak
Forma proizvoda	smrznuto
Bolest	glioblastom
Genetska specifičnost	EGFR gen; EGFR divlji tip

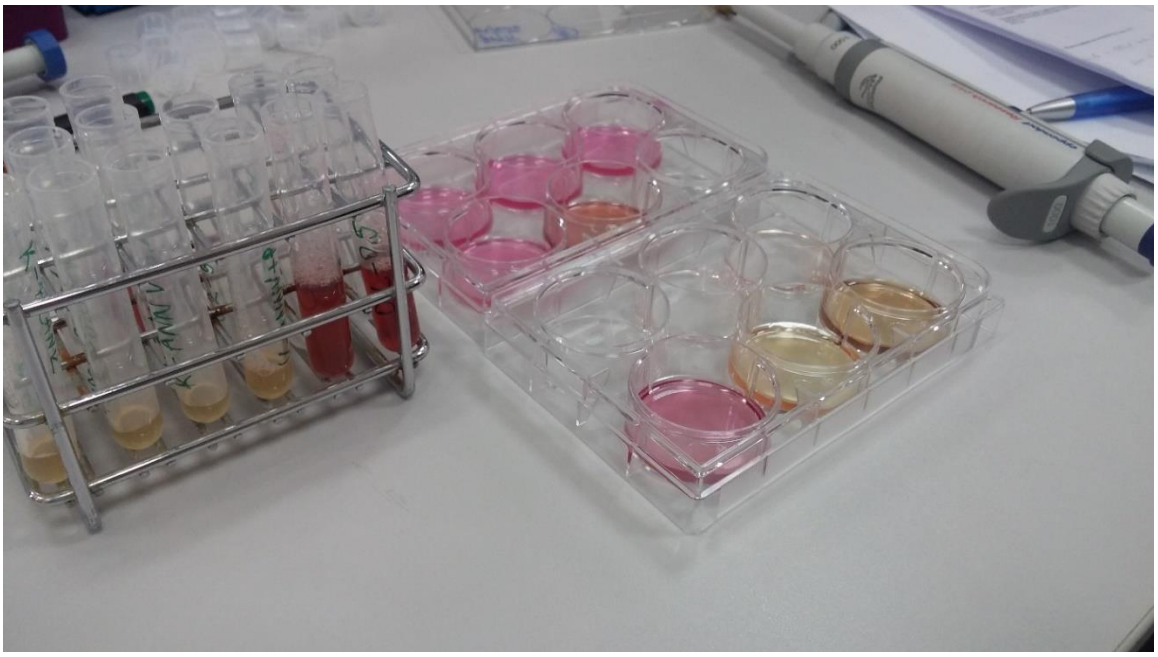


Slika 12. Stanice karcinomske linije A1235.
Slika preuzeta s: http://jnci.oxfordjournals.org.gate2.inist.fr/content/51/5/1417.short

3.2. POSTUPAK

Nakon odmrzavanja, stanične linije su uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO_2, u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju. U pločice sa 6 jažica dodan je DMEM medij i sve ostavljeno preko noći za prihvat na podlogu. Zatim su stanice tretirane standardom oleuropeina (Oleuropein, purity 98%, Sigma Aldrich) tijekom 48 sati. Tijekom apoptoze dolazi do promjena u sastavu stanične membrane, odnosno do prebacivanja fosfolipida s unutarnje na vanjsku stranu membrane. Annexin V se veže na negativno nabijeni fosfatidilserin, koji se kod apoptoze stanica prebacuje na vanjsku stranu membrane. Propidij jodid se selektivno veže na nukleinske kiseline unutar stanice nakon gubitka integriteta stanične membrane. Kombinacija bojanja aneksinom V konjugiranim s fluorescein izotiocijanatom (FITC) i propidij jodidom omogućuje razlikovanje između živih stanica (Annexin-V-/ PI-), rane (Annexin-V+/ PI-) i kasne (Annexin-V+/PI+) apoptoze stanica. (50).

Nakon obrade s oleuropeinom i ekstraktom lista divlje masline stanice su odvojene od podloge tripsinom, isprane s fosfatnim puferom (PBS) i resuspendirane u 100 ml pufera za vezanje koji sadrži kalcij, te je dodano 5 µl Annexin V-FITC i 5 µl propidij jodida (Annexin V FITC-Apoptoza Detection Kit I, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Stanice su inkubirane tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i nakon toga analizirane pomoću protočnog citometra (BD Accuri C6, BD Biosciences). Postotak apoptotskih stanica je izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100% (51).



Slika 13. Stanice MDA-MB-231 linije.



Slika 14. Stanice A1235 tretirane oleuropeinom u koncentracijama 0,1 μM i 0,5 μM.

3.3. PROTOČNA CITOMETRIJA

Citometrija je jednostavna, kvantitativna i visokoinformativna metoda za određivanje apoptoze na razini pojedinačnih stanica, pri čemu je dovoljan relativno malen broj stanica u ispitivanom uzorku. Različite morfološke i biokemijske promjene u apoptozi stanice mogu se iskoristiti za citometrijsko određivanje, počevši od plazmolize stanice preko aktivacije kaspaza (cistein aspartil proteaze), gubitka mitohondrijskoga membranskog potencijala, aktivacije endogenih endonukleaza, pa do konačnog gubitka integriteta stanice i formiranja apoptotskih tijela.
Prednost ove metode je mogućnost kombiniranja rezultata dobivenih pomoću prednjeg i bočnoga svjetlosnog snopa (zbog promjene promjera apoptotskih stanica i konformacije unutrašnjih staničnih struktura) s rezultatima analize staničnih markera, tj. specifičnih fluorescentnih protutijela za pojedine apoptotske molekule kao što su Fas, FasL, Bcl-2, p53, fosfatidil serin itd. (52).

4. REZULTATI

4.1. MDA-MB-231

Tablica 4. Učinak oleuropeina na apoptozu stanične linije MDA-MB-231 u odnosu na kontrolu.

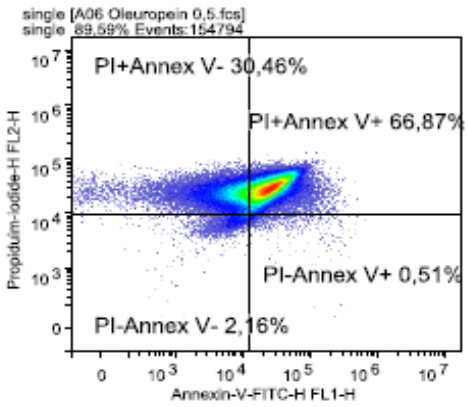
Skupina	PI+/Annex-V- %	PI+/Annex-V+ %	PI-/Annex-V+ %	PI–/Annex-V– %
Kontrola	12,40	1,95	17,04	68,61
Oleuropein 0,1	60,99	6,63	6,94	25,44
Oleuropein 0,5	30,46	2,16	0,51	66,87

Kontrola – stanice koje nisu tretirane
Oleuropein 0,1 - stanice koje su tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 µM
Oleuropein 0,5 - stanice koje su tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 µM

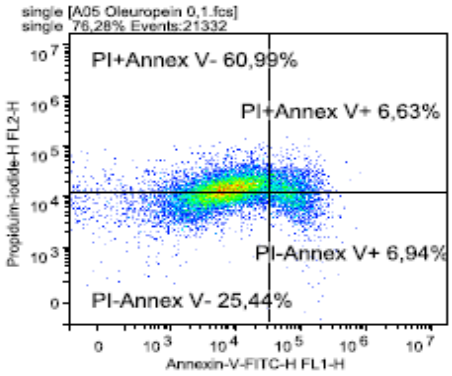
U netretiranom (kontrolnom) uzorku 12,40% stanica je u fazi tzv. sekundarne nekroze, 18,99% stanica ušlo u apoptozu, dok je živih 68,61% stanica.

Od stanica MDA-MB-231 tretiranih 0,1 µM standardom oleuropeina 60,99% je sekundarno nekrotično, 13,97% stanica ušlo u apoptozu i 25,44% živih stanica.

Od stanica MDA-MB-231 tretiranih 0,5 µM standardom oleuropeina 27,68% stanica sekundarno nekrotično, 4,29% stanica ušlo u apoptozu i 68,03% živih stanica.



Slika 15. Točkasti dijagram stanica tretiranih 0,5 µM otopinom oleuropeina



Slika 16. Točkasti dijagram stanica tretiranih 0,1 µM otopinom oleuropeina.

4.2.T24

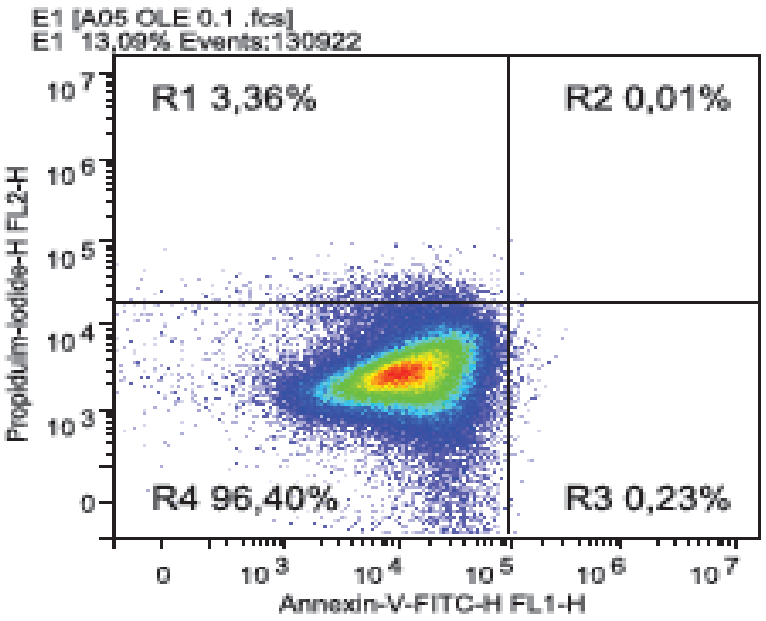
Tablica 5. Učinak oleuropeina na apoptozu stanične linije T24 u odnosu na kontrolu.

Skupina	PI+/Annex-V- %	PI+/Annex-V+ %	PI-/Annex-V+ %	PI–/Annex-V– %
Kontrola	3,45	0,02	0,65	95,88
Oleuropein 0,1	3,36	0,01	0,23	96,40

Kontrola – stanice koje nisu tretirane
Oleuropein 0,1 - stanice koje su tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 µM

U netretiranom (kontrolnom) uzorku 3,45% stanica je sekundarno nekrotično, 0,67% stanica ušlo u apoptozu i 95,88% živih stanica.

Od stanica T24 koje su tretirane 0,1 µM standardom oleuropeina 3,46% stanica je sekundarno nekrotično, 0,24% stanica ušlo u apoptozu, a 96,40% živih stanica.



Slika 17. Točkasti dijagram stanica tretiranih 0,1 µM otopinom oleuropeina.

4.3. A1235

Tablica 6. Učinak oleuropeina na apoptozu stanične linije A1235 u odnosu na kontrolu.

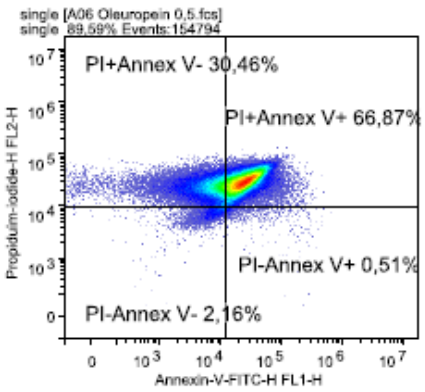
Skupina	PI+/Annex-V- %	PI+/Annex-V+ %	PI-/Annex-V+ %	PI–/Annex-V– %
Kontrola	41,11	3,16	7,81	47,92
Oleuropein 0,1	72,74	15,31	1,13	10,82
Oleuropein 0,5	30,46	66,87	0,51	2,16

Kontrola – stanice koje nisu tretirane
Oleuropein 0,1 - stanice koje su tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 µM
Oleuropein 0,5 - stanice koje su tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 µM

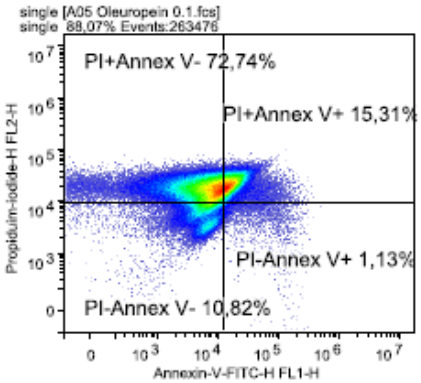
U netretiranom (kontrolnom) uzorku 41,11% A1235 stanica je sekundarno nekrotično, 10,79% stanica ušlo u apoptozu, dok je živih 47,92% stanica.

Kod stanica A1235 koje su tretirane 0,1 µM standardom oleuropeina, 72,74% stanica je sekundarno nekrotično, 16,44% stanica ušlo u apoptozu, dok je živih 10,82% stanica.

Od stanica koje su tretirane 0,5 µM standardom oleuropeina 30,46% je sekundarno nekrotično, čak 67,38% stanica ušlo u apoptozu, dok je živih svega 2,16% stanica.



Slika 18. Točkasti dijagram stanica tretiranih 0,5 µM otopinom oleuropeina.



Slika 19. Točkasti dijagram stanica tretiranih 0,1 µM otopinom oleuropeina.

5. RASPRAVA

Rak predstavlja uzrok jednog od šest smrtnih ishoda u svijetu. Svake se godine više od 14 milijuna ljudi dijagnosticira rak. U 2015. godini oko 8,8 milijuna ljudi je umrlo od raka. Oko dvije trećine oboljelih nalaze se u manje razvijenim zemljama, najvjerojatnije zbog kasne dijagnoze i manje dostupnih sredstava za liječenje (53). Prema sadašnjim saznanjima, između 30% i 50% smrtnih ishoda raka može se spriječiti izmjenom ili izbjegavanjem čimbenika rizika, uključujući izbjegavanje duhanskih proizvoda i alkohola, održavanje tjelesne težine i redovito vježbanje (54).

Tijekom evolucije višestanični organizmi uspjeli su razviti različite mehanizme zaštite od djelovanja štetnih utjecaja iz okoline. Apoptozu ili "programiranu staničnu smrt" možemo promatrati kao fiziološki ili/i patofiziološki odgovor na vanjske i/ili unutrašnje čimbenike koji mogu dovesti do poremećaju u organizmu, u ovom slučaju do pojavnosti raka (55). Unutrašnji mehanizam aktivacije apoptoze predstavljaju kaspaze: ced-3, ced-4, ced-7, ced-8, ced-9, ced-12, koje aktiviraju niz kaskadnih reakcija u sinergiji s inhibitorima apoptoze (iAP) i proteinskim kompleksom Bcl-2 (7). Vanjski put aktivacije pretpostavlja se da ide putem slobodnih radikala kisika (ROS). Mehanizam aktivacije ostao je nerazriješen i ostavlja znanstvenicima prostora za daljnja istraživanja (10).

Listovi masline su sirovina koja se nalazi u izobilju u mediteranskom bazenu. Epidemiološke studije ukazuju da je konzumiranje maslinovog ulja povezano sa smanjenim rizikom od raka. Kemoprotektivno djelovanje maslinovog ulja je pripisano djelovanju fenolnih spojeva, kao hidroksitirozolu i parahidroksifeniletanolu, te derivatima sekoiridioida, kao oleuropeinu, ligstrozidu i olepkantalu. Nekoliko istraživanja je pokazalo da ti spojevi mogu inhibirati proliferaciju i inducirati apoptozu u raznim tumorskim staničnim linijama. Većina studija na životinjama potvrđuju sposobnost tih spojeva da inhibiraju proces karcinogeneze tijekom faze inicijacije i promocije (56). Brojni su pretpostavljeni mehanizmi indukcije apoptoze posredovani oleuropeinom. Aktivacija gena Bcl-2 i Bax dovodi do pojačane ekspresije proteina p53 (57). Nadalje, oleuropein inhibira proliferacijski i proapoptotski faktor NF-κB (58).

U pilot studiji istraživana su djelovanja aktivnih komponenti lista masline te je pokazano da imaju antioksidacijski učinak na genotoksični agens vodikov peroksid. Za procjenu citotoksične aktivnosti ekstrakta korištene su ljudske promijelocitne stanice HL60. Oleuropein i luteolin su pokazali citotoksični učinak ovisan o dozi u koncetracijama 10 μM, 40 μM i 170μM. Zaključeno je da oleuropein i luteolin aktiviraju put apoptoze (58).

Western blot analiza pokazala je da su fosforilirani ATF-2, JNK , p53, p21, Bax i citokrom c protein u citoplazmi značajno povećani u prisustvu oleuropeina. Uočena je korelacija doze

oleuropeina i aktivnosti mitohondrijskih proteina. Putem JNK/SAPK signalizacije aktiviraju se apoptotska tjelešca (59).

Oleuropein i hidroksitirozol smanjuju aktivnost proliferacije posredovane 17β-estradiolom na MCF-7 stanicama raka dojke aktivirajući ERK1/2 put. Pretpostavlja se da ova inhibicija može biti posredovana G-proteinom nazvanim GPER/GPR30 (60).

Četiri spoja sadržana u ekstraktu djevičanskog maslinovog ulja: oleuropein, tirozol, hidroksitirozol i oleinska kiselina mogu inhibirati aktivnost faktora nekroze tumora (TNF) i ciklooksigenaze (COX). Nađeno je da tirozoli i oleinska kiselina značajno inhibiraju TNF-α inducirane COX-2 genom, kao i izlučivanje PGE2 (61).

Na temelju dostupne literature mogu zaključiti da pojedini spojevi iz biljaka pridonose apoptotskim učincima na ispitivanim stanicama. *In vitro* ispitivanja pokazuju ulazak stanica u ranu i kasnu apoptozu. Ulazak stanica u apoptozu pri istim koncentracijama različit je kod stanica MDA-MB- 231, A-1235 i T24. Postotak preživjelih stanica MDA-MB-231 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 μM je neočekivano 2,62 puta viši u odnosu na stanice tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM, te gotovo jednak kao i kod netretiranih stanica. Postotak preživjelih stanica A1235 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 μM je oko 5 puta niži u odnosu na stanice tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM, te oko 4,5 puta niži u odnosu na netretirane stanice. Nema značajne razlike u postotku preživjelih stanica T24 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM u odnosu na netretirane stanice. Najveći učinak oleuropeina na stupanj apoptoze uočen je kod stanica glioblastoma A1235, a najmanji učinak na stanicama mokraćnog mjehura T-24. Jedan od vjerojatnih razloga boljeg djelovanja oleuropeina na stanice A1235 je struktura oleuropeina. Kako je potvrđen učinak apoptoze na stanice MDA-MB-231 i A1235, a na stanice T24 neznatan, sljedeći korak je ponoviti cjelokupno ispitivanje kako bih potvrdio rezultate te nakon toga i*n vivo* ispitivanje na modelima dojke, glioblastoma i mokraćnog mjehura kod životinja.

6. ZAKLJUČAK

a) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A-1235 oleuropeinu dovodi do smanjenja preživljenja ispitivanih stanica karcinoma.
b) Postotak apoptotskih stanica MDA-MB-231 tretiranih oleuropeinom ne korelira s koncentracijom spoja.
c) Postotak apoptotskih stanica A1235 tretiranih oleuropeinom korelira s koncentracijom spoja.
d) Postotak preživjelih stanica MDA-MB-231 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 μM je neočekivano 2,62 puta viši u odnosu na stanice tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM, te gotovo jednak kao i kod netretiranih stanica.
e) Nema značajne razlike u postotku preživjelih stanica T24 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM u odnosu na netretirane stanice.
f) Postotak preživjelih stanica A1235 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 μM je oko 5 puta niži u odnosu na stanice tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM, te oko 4,5 puta niži u odnosu na netretirane stanice.
g) Najveći učinak apoptoze uočen je na stanicama glioblastoma A-1235 pri koncentraciji oleuropeina 0,5 μM u odnosu na ostale stanice ispitivane pri istoj koncentraciji.
h) Najmanji učinak apoptoze uočen je na stanicama mokraćnog mjehura T24 pri koncentraciji oleuropeina 0,1 μM u odnosu na ostale stanice ispitivane pri istoj koncentraciji.
i) Potrebna su dodatna istraživanja kako bi proizašla valjana znanstvena tvrdnja o učinku oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline.

7. LITERATURA

1. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Biologija raka: Genska osnova raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 1–2.

2. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Biologija raka: Onkogeni. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 2–6.

3. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Biologija raka: Tumorsupresorski geni. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 6–10.

4. Cooper, M.G. HER. Regulatori napredovanja kroz stanični ciklus. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 599–606.

5. Cooper, M.G. HER. Stanični ciklus: Događaji u M- fazi. In: Medicinska naklada, editor. Stanica. 3rd ed. Zagreb: Gordan Lauc; 2004. p. 611–3.

6. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(11):910–6.

7. Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review [Internet]. Apoptosis and Medicine. 2012 [cited 2016 Sep 19]. Available from: http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review

8. Cooper, M.G. HER. Stanični ciklus: Regulacija programirane stanične smrti. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 580–2.

9. Lim YJ, Choi JA, Choi HH, Cho SN, Kim HJ, Jo EK, et al. Endoplasmic reticulum stress Pathway-Mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of Mycobacterium tuberculosis. PLoS One. 2011 Dec 14;6(12).

10. Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, Kang CM, et al. Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerise-1 activation signals apoptosis-inducing factor

release from mitochondria. Cancer Res. 2004;64(24):8960–7.

11. Wendrenmaire M, Bardou M PC. Effects of leptin on lipopolysaccharideinduced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis. Am J Obs Gynecol. 2011;205:1–363.

12. Wang J, Sun P, Bao Y, Dou B, Song D, Li Y. Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walled carbon nanotubes. Toxicol In Vitro [Internet]. 2012;26(1):32–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020378

13. Han YT, Chen XH, Xie J, Zhan SM et al. Purple Sweet Potato Pigments Scavenge ROS, Reduce p53 and Modulate Bcl-2/Bax to Inhibit Irradiation-induced Apoptosis in Murine Thymocytes. Cell Physiol Biochem. 2011;28:865–72.

14. Jang SH, Lim JW, Morio T KH. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. Free Radic Biol Med. 2012;52(3):607–15.

15. Ying TH, Yang SF, Tsai SJ, Hsieh SC, Huang YC, Bau DT, et al. Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8-/caspase-3-dependent pathway. Arch Toxicol. 2012 Feb;86(2):263–73.

16. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL CY. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase-3 and Ca2＋-dependent endnuclease. Biochem Pharmacol. 2002;63(2):225–36.

17. Stewart, B. and Wild, C.P. (eds.), International Agency for Research on Cancer W. World Cancer Report 2014. 2014.

18. American Cancer Society. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. 2016.

19. Šekerija Mario, Bubanović L, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. 2014.

20. HZJZ. Odsjek za zloćudne bolesti s registrom za rak [Internet]. 2016. Available from:

http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-nadzor-i-istrazivanje-ne-zaraznih-bolesti/odsjek-za-zlocudne-bolesti-s-registrom-za-rak/.

21. IARC. CANCER FACT SHEETS: BREAST CANCER [Internet]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/data/pdf/fact-sheets/cancers/cancer-fact-sheets-15.pdf

22. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Biologija raka: Rak dojke. In: A.Raič, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 193–202.

23. Cai F-F, Kohler C, Zhang B, Wang M-H, Chen W-J, Zhong X-Y. Epigenetic therapy for breast cancer. Int J Mol Sci. 2011;12:4465–87.

24. Berzingi S, Newman M YH. Altering bioelectricity on inhibition of human breast cancer cells. Cancer Cell Int. 2016;16(72):8.

25. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol [Internet]. 2011 May;125(1–2):13–22. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076011000331

26. Majidinia M, Yousefi B. Long non-coding RNAs in cancer drug resistance development. DNA Repair. 2016 Jun 13;

27. T. N. Development of a Drug Delivery System for Cancer Immunotherapy. Yakugaku Zasshi. 2016;136(11):1477–84.

28. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Tumori mokraćnog sustava. Tumori bubrežne nakapnice, mokraćovoda i mokraćnog mjehura. In: Anđa Raič, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 146–8.

29. Pinto-Leite R, Arantes-Rodrigues R, Sousa N, Oliveira PA, Santos L. mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. Tumour Biol. 2016 Sep;37(9):11541–51.

30. Cao R, Meng Z, Liu T, Wang G, Qian G, Cao T, et al. Decreased *TRPM7* inhibits activities and induces apoptosis of bladder cancer cells via ERK1/2 pathway. Oncotarget [Internet]. 2016 Nov 7; Available from: http://www.oncotarget.com/abstract/12146

31. Scarpa ES, Emanuelli M, Frati A, Pozzi V, Antonini E, Diamantini G, et al. Betacyanins enhance vitexin-2-O-xyloside mediated inhibition of proliferation of T24 bladder cancer cells. Food Funct [Internet]. 2016; Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C6FO01130F

32. Vrdoljak, E., Šamija, M., Kusić, Z., Petković, Marija., Gugić, D., Krajina Z. Tumori središnjeg živčanog sustava. In: Anđa Raič, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 105–11.

33. Sarkar A, Chiocca EA. Glioblastoma and Malignant Astrocytoma. Brain Tumors. 2012;384–407.

34. McNamara MG, Sahebjam S, Mason WP. Emerging Biomarkers in Glioblastoma. Vol. 5, Cancers. 2013. p. 1103–19.

35. Li J, Tang H, Zhang Y, Tang C, Li B, Wang Y, et al. Saponin 1 Induces Apoptosis and Suppresses NF-κB-Mediated Survival Signaling in Glioblastoma Multiforme (GBM). Ganti AK, editor. Vol. 8, PLoS ONE. San Francisco, USA; 2013.

36. Zhang Z, Wu L, Wang J, Li G, Feng D, Zhang B, et al. Opposing Effects of PI3K/Akt and Smad-Dependent Signaling Pathways in NAG-1-Induced Glioblastoma Cell Apoptosis. Hotchin NA, editor. Vol. 9, PLoS ONE. San Francisco, USA; 2014.

37. Lumaret R, Ouazzani N, Michaud H, Vivier G, Deguilloux M-F, Di Giusto F. Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (Olea europaea L.) in the Mediterranean Basin. Heredity (Edinb) [Internet]. 2004 Apr 25;92(4):343–51. Available from: http://www.nature.com/hdy/journal/v92/n4/full/6800430a.html

38. Maslina [Internet]. Available from: www.plante.com.hr/maslina/

39. European Medicines Agency. Assessment report on Olea europaea L ., folium. 2011;44:1–32.

40. Omar SH. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Vol. 78, Scientia Pharmaceutica. 2010. p. 133–54.

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

42. Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. Mol Nutr Food Res. 2009 May;53(5):600–8.

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

44. Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios. 1998;93(374):43–54.

45. Fleming HP, Walter WMJ, Etchells JL. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. Appl Microbiol. 1973 Nov;26(5):777–82.

46. Ma SC, He ZD, Deng XL, But PP, Ooi VE, Xu HX, et al. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of Ligustrum lucidum as antiviral agents. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2007 Mar;49(11):872–8.

47. Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. fusion [corrected] inhibition. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar;354(4):872–8.

48. Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, et al. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. Neurochem Int. 2011 May;58(6):700–7.

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

50. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods. 1995 Jul;184(1):39–51.

51. BD Pharmingen. Technical Data Sheet. BD Pharmingen; p. 1–3.

52. Žlender V. DETECTION OF APOPTOSIS. Arh Hig Rada Toksikol. 2006;57:229–36.

53. World Health Organisation. Guide To Cancer Early Diagnosis [Internet]. Geneva: WHO Document Production Services; 2017. 1-48 p. Available from: http://apps.who.int/iris.

54. World Health Organisation. Cancer Prevention [Internet]. 2017. Available from: http://www.who.int/cancer/en/

55. Vilim Žlender. Apoptoza – programirana smrt stanice. Arh Hig Rada Toksikol. 2003;54:267–74.

56. Fabiani R. Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies. Food Funct. 2016 Oct;7(10):4145–59.

57. Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, Daghestani MH, Al-Olayan ES, Elobeid MA, et al. Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2014 Jan;14(11):6739–42.

58. Anter J, Fernandez-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millan M, Alonso-Moraga A, et al. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. Mutat Res. 2011 Aug;723(2):165–70.

59. Aaronson SA, Todaro GJ, Freeman AE. Human sarcoma cells in culture. Exp Cell Res [Internet]. 1970;61(1):1–5. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482770902508

60. Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De Luca A, Campana C, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. Mol Nutr Food Res. 2014 Mar;58(3):478–89.

61. Lamy S, Ben Saad A, Zgheib A, Annabi B. Olive oil compounds inhibit the paracrine regulation of TNF-alpha-induced endothelial cell migration through reduced glioblastoma cell cyclooxygenase-2 expression. J Nutr Biochem. 2016 Jan;27:136–45.

8. SAŽETAK

Cilj: Ispitati učinak oleuropeina na apoptozu u staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235. Pretpostavka je da će se nakon tretiranja karcinomskih staničnih linija oleuropeinom smanjiti stupanj preživljenja stanica.

Materijali i metode: Učinak oleuropeina na stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235 praćen je protočnom citometrijom.

Rezultati: Prikazani su kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica.

Koncentracije oleuropeina za stanične linije:

a) MDA-MB-231: 0,1 μM i 0,5 μM
b) T24: 0,1 μM
c) A1235: 0,1 μM i 0,5 μM

Zaključci:

In vitro izlaganje stanica karcinoma dojke MDA-MB-231, mokraćnog mjehura T24 i glioblastoma A1235 oleuropeinu dovodi do smanjenja preživljenja ispitivanih stanica karcinoma. Učinak apoptoze kod stanica A1235 korelira s koncentracijom, dok kod stanica MDA-MB-231 ne korelira s koncentracijom oleuropeina. Postotak preživjelih stanica MDA-MB-231 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 μM je neočekivano 2,62 puta viši u odnosu na stanice tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM, te gotovo jednak kao i kod netretiranih stanica. Postotak preživjelih stanica A1235 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,5 μM je oko 5 puta niži u odnosu na stanice tretirane oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM, te oko 4,5 puta niži u odnosu na netretirane stanice. Nema značajne razlike u postotku preživjelih stanica T24 tretiranih oleuropeinom u koncentraciji od 0,1 μM u odnosu na netretirane stanice. Najveći učinak apoptoze uočen je na stanicama glioblastoma A1235 pri koncentraciji oleuropeina 0,5 μM u odnosu na ostale stanice ispitivane pri istoj koncentraciji. Najmanji učinak uočen je na stanicama mokraćnog mjehura T24 pri koncentraciji 0,1 μM u odnosu na ostale ispitivane stanice pri istoj koncentraciji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi proizašla valjana znanstvena tvrdnja o učinku oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline.

9. SUMMARY

Objective: The effect of oleuropein on apoptosis of breast cancer cell lines MDA-MB-231, bladder cancer T-24 and glioblastoma A1235.

Materials and methods: The assumption is that exposure to carcinoma cell line with oleuropein reduces the survival of cells. The effects of oleuropeina on breast cancer cell line MDA-MB-231, bladder cancer T-24 and glioblastoma A-1235 cell lines were estimated by the flow cytometry.

Results: Displayed as a percentage of the necrosis, apoptosis and cell survivors. Concetrations of oleuropein which are used in cell lines were: MDA-MB-231: 0.1μM and 0.5 μM T-24:0.1 μM A1235:0,1 μM and 0.5 μM.

Conclusions: *In vitro* exposure of MDA-MB-231, T24 and A1235 cells to oleuropein decreased a survival of cancer cells. The degree of apoptosis in MDA-MB-231 cells is not in proportion with the concentration of oleuropein. The degree of apoptosis in A1235 cells is in proportion with the concentration of oleuropein. The highest effect of oleuropein was found in A1235 cells treated with 0.5 μM oleuropein. In the other hand, the minimum degree of apoptosis was observed in T24 cell treated by oleuropein at the concentration of 0.1 μM. To summarize this, additional research is required to elucidate a precise mechanism of oleuropein effects on cancer cells.

10. KAZALO POJMOVA

8

8-izo-PGF2α 18

A

A1235 ..... 3, 1, 23, 24, 28, 35, 38, 40, 49, 51, 57, 58
AIP 7
annexin V 29
antiaterogeno 18
antimikrobno 18
antioksidativno 18
antivirusno 18, 19
Apaf1 5
apigenin 15
apoptoza 3, 5
ATF-2 37
ATM 3, 43
ATR 3, 43

B

Bacillus cerei 19
Bacillus Calmette-Guerin 13
BBCE 19
Bcl-2 ..... 5, 8, 31, 37, 43
BCL2 3

C

Campylobacter jejuni 19
ced 5, 8, 12, 14, 37
ced-12 ..... 5, 37
ced-3 ..... 5, 8, 12, 14, 37
ced-4 ..... 5, 37
ced-7 ..... 5, 37
ced-8 ..... 5, 8, 37
ced-9 ..... 5, 14, 37
Chk1 3
Chk2 3
ciklini 4
citokrom c 5
citometrija 31
COX 21, 38
Cyc 4

D

divlja maslina 14
DNA 2, 3, 5, 12, 14, 43, 44, 47

E

EGFR 3, 14, 28
ERK1/2 ..... 38, 43, 44

F

Fas 5, 31
FasL 31
fenolne kiseline 15
fisetin 8, 43
fisetina 8
flavonoidi 15
FOS 3

G

glioblastom 14, 28
glutationa 18
gp-41 19
GPER/GPR30 38

H

Helicobacter pylori 8, 19, 43
HER2/neu 3
hidroksitirozol 17, 38
HL60 37

I

IAP 5
inhibitori apoptoze 5, 37
iridoidi 15

J

JNK 37
JNK/SAPK 38
JUN 3

K

kalcijevi kanali 5
kalkoni 15
kaspaza 5
kemoterapija 13
KIT 3
Klebsiella pneumonia 19
kumarini 15

L

leukotrien B_4 18
ligostrozid 17

likopen 8
list divlje masline.....1, 2, 3, 23, 29, 40, 49, 58
lncRNAs..... 12

Lj

ljudski kinom..... 3

M

MAPK.....12, 13
MCF-7.....19, 38
MDA-MB-231..... 3, 1, 23, 26, 33, 38, 40, 49, 51
melastatin 13
miRNA..... 2
MIT..... 3
model Hanahan-Weinerg..... 2
MOS..... 3
mTOR inhibitori 13
MYC 3
Mycoplasma 19

N

NF-kB
eng. nuclear factor kappa B subunit 1 14
NF-κB 37, 45

O

Olea europaea L. subsp. europaea 14
Olea africana..... 14
Olea europaea 17
Olea europaea L. subsp. europaea 14
Olea europea L. subsp. oleaster 14
Olea europea var. Leccino 17
Oleuropein 16, 18, 19, 20, 24, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 45, 46, 47

P

p21 37
p53.....3, 31, 37, 43, 47
P53..... 3
PARP-1 7
PGE2..... 38
PI3K/Akt..... 12, 14, 45
propidij jodid 29
protein kinaze 3
protoonkogen 3
protutumorsko..... 18
protuupalno..... 18

R

RAA 3
RAF..... 3
rak 3, 9, 12, 13, 37, 43
Rak..... 2, 9, 37, 44
rak dojke..... 12
rak mokraćnog mjehura..... 13
ROS..... 7, 8, 37, 43

S

Salmonela enteridis..... 19
sekoiridoid..... 16, 17, 18, 19
Smac/Diablo 5
Smad2/3..... 14
SRC..... 3
stanični ciklus
G1, S, G2..... 3, 4
Staphylococcus aureus 19

T

T24.....3, 1, 23, 24, 27, 34, 38, 40, 45, 49, 51
telomeraza 2
tirozol 17
TNF.....5, 38, 47
trijodtironin..... 15
triterpeni 15

V

vitamin E 8, 43

W

wongonin..... 8

B

β-amiloid 20

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

IME I PREZIME: Robert Jerinić

DATUM ROĐENJA: 20.06.1993.

MJESTO ROĐENJA: Dubrovnik, 20 000

DRŽAVLJANSTVO: Hrvat

MAIL: jerinic-du@hotmail.com;

robert.jerinic93@gmail.com

ŠKOLOVANJE:

FAKULTET: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko- tehnološki fakultet, smjer: integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA (2012- 2017)

SREDNJA ŠKOLA: Gimnazija Dubrovnik, opći smjer (2008-2012)

OSNOVNA ŠKOLA: OŠ Ivana Gundulića, Dubrovnik (2000-2008)

VANNASTAVNE AKTIVNOSTI:

predstavnik studenata u Studentskom zboru 2013.-2017.

predstavnik studenata u Fakultetskom vijeću 2013.-2017.

studentski pravobranitelj 2013.-2016.

povjerenik za promidžbu i sponzorstvo (udruga CPSA; 2015./2016.)

suorganizator Natjecanja u kliničkim vještinama u Splitu (2015./2016.)

suorganizator Natjecanje u kliničkoj suradnji studenata farmacije i medicine u Splitu (2016./2017.)

suorganizator 3. studentskog kongresa „Razumjeti mozak – izazovi i terapija psihičkih poremećaja" (2015./2016.)

volonter u Domu za starije i nemoćne Dubrovnik (2014.-)

SUDJELOVANJA:

EPSA's Summer University (Covilhã, Portugal, 2017.)

6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije. Predavanje na temu: DJELOVANJE LISTA DIVLJE MASLINE I OLEUROPEINA NA APOPTOZU STANICA GLIOBLASTOMA A1235 (Farmaceutsko- biokemijski fakultet, Zagreb, 27. svibnja 2017);

6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije. Plakat na temu: DJELOVANJE LISTA DIVLJE MASLINE I OLEUROPEINA NA APOPTOZU STANICA GLIOBLASTOMA A1235 (Farmaceutsko- biokemijski fakultet, Zagreb, 27. svibnja 2017);

CPSA's congress: "Understanding the brain - challenges and therapy of mental disorders" (Zagreb, 2016.);

CPSA's congress : "Children at the center of health care" (Zagreb, 2015);

EPSA's webinars : "Learn more about Oncology Pharmacy";

EPSA-EPIG's webinars : "Introduction of GVP Modules III and IV, and practical experiences with best practices on pharmacovigilance audits and inspections", "The importance of continuing professional development", "The subjection on pharma"and "Regulatory affairs- the coordination center of the pharma industry";

EPSA- IPSF's webinars: "Patient-centered care";

IPSF's webinars : "Global Regulatory Affairs- an Introduction";

FIP's webinars: "Childhood helath";

CPSA's Virtual congress : "Dose of pharmaceutical future";.

STRUČNA PRAKSA:

Srbija, Beograd, javno ljekarništvo, 4.9-16.9.2017.

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

Ljekarne Splitsko- dalmatinske županije, ljekarna Varoš

Galenski laboratorij Split

Analitički laboratorij Split

Bolnička ljekarna

Trajanje: 6 mjeseci (01.03.2017.-01.09.2017.)

PUBLIKACIJE:

Robert Jerinić: Djelovanje lista divlje masline i oleuropeina na apoptozu stanicama glioblastoma A1235. In: Knjiga sažetaka 6 simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije. Zagreb: Farmaceutsko- biokemijski fakultet; 2017. p. 17. ISSN 978-953-6256-88-4

Ante Begonja; **Robert Jerinić**; Ante Rogošić; Anamarija Tegeltija; Daniela Veljačić; Matea Dragun. Glansik Medicinskog fakulteta u Splitu: Natjecanje u kliničkim vještinama u Splitu. Split: Slobodna Dalmacija; 2016. p. 13–5. ISSN 1846- 7946.

Robert Jerinić; Ante Rogošić. Stručna praksa na studentskoj razmjeni u Splitu. Vol. 71, Farmaceutski glansik. Zagreb: Hrvatsko farmaceutsko društvo; 2015. p. 645–8. ISSN 0014-8202.

Ante Begonja; **Robert Jerinić**. Recipe: Ebola- virus godine. Recipe. Zagreb: Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatska; 2015. p. 22–5. ISSN 1847- 4543.

ČLANSTVO:

Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA)
Studentska sekcija Pharmaliella (Medicinski fakultet u Splitu)

NAGRADE:

Rektorova nagrada za projekt Natjecanje u kliničkim vještinama za 2016. godinu;
Studentski zbor Sveučilišta u Splitu za studenta volontera za 2016. godinu;
Rektorova nagrada za akademski uspjeh za 2015. godinu;
Dekanova nagrada za akademski uspjeh za 2015. godinu.

HOBI:

vaterpolo;
plivanje;
čitanje

CITAT:

„Svijet je lijep kada se promatra bez želje za traganjem, jednostavno, kao dijete.“

OSTALO:

vozačka dozvola B kategorije