

Usporedba citotoksične aktivnosti hidrolata biljke dragoljub (Tropaeolum majus L.) izoliranih naprednim tehnikama ekstrakcije potpomognutim mikrovalovima

Šestić, Loriana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:922550>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

Odjel za biologiju

Loriana Šestić

**USPOREDBA CITOTOKSIČNE
AKTIVNOSTI HIDROLATA BILJKE
DRAGOLJUB (*Tropaeolum majus* L.)
IZOLIRANIH NAPREDNIM TEHNIKAMA
EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTIM
MIKROVALOVIMA**

Diplomski rad

Split, 2023

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam diplomski rad s naslovom „**USPOREDBA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI HIDROLATA IZ BILJKE DRAGOLJUB (*Tropaeolum majus* L.) IZOLIRANIH NAPREDNIM TEHNIKAMA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTIM MIKROVALOVIMA**“ izradila samostalno pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Željane Fredotović. U radu sam primijenio/la metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristio/la literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tude spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo/la u završnom radu na uobičajen, standardan način citirao/la sam i povezao/la s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Loriana Šestić

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željane Fredotović, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Željani Fredotović na strpljivosti, izdvojenom vremenu i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Čast mi je što sam imala priliku s Vama surađivati kako na završnom tako i na diplomskom radu.

Hvala dr. sc. Ivani Vrci na prijedlozima i uzorcima bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvek čuvali leđa i trpjeli moje jadikovke.

Temeljna dokumentacijska kartica

Diplomski rad

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za Biologiju
Rudera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

USPOREDBA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI HIDROLATA IZ BILJKE DRAGOLJUB (*Tropaeolum majus* L.) IZOLIRANIH NAPREDNIM TEHNIKAMA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTIM MIKROVALOVIMA

Loriana Šestić

SAŽETAK

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je jestiva autohtona biljka Južne Amerike. Taksonomski se svrstava u porodicu Tropaeolaceae. *T. majus* u sebi sadrži vitamin C, mineralne tvari, masne kiseline, flavonoide, tertacicličke triterpene i glukozinolate. Popularnost ovih kemijskih spojeva izravno je povezana sa mnogim prednostima za ljudsko zdravlje, poput protuupalne aktivnosti, održavanja kardiovaskularnog zdravlja i prevencije nekih oblika raka. U ovom radu analizirana je citotoksična aktivnost hidrolata vrste *T. majus* bogatim razgradnim produktima glukozinolata (benzil izotiocijanat i benzil cijanid), na stanice raka debelog crijeva (HCT116), osteosarkoma (U2OS) i raka grlića maternice (HeLa) s naglaskom na usporedbu aktivnosti hidrolata dobivenih dvjema naprednim tehnikama ekstrakcije. Hidrolati vrste *T. majus* izolirani dvjema tehnikama ekstrakcije: destilacijom potpomognutom mikrovalovima (MAD) i mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG), pokazali su umjerenu do slabu citotoksičnu aktivnost na sve tri testirane stanične linije. Nije utvrđena statistički značajna razlika u citotoksičnoj aktivnosti između hidrolata *T. majus* izoliranog metodama ekstrakcije: destilacijom potpomognutom mikrovalovima (MAD) i mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG). S obzirom na dobivene rezultate, hidrolati dragoljuba izolirani naprednim tehnikama ekstrakcije potpomognutim mikrovalovima, mogu se smatrati sigurnim prirodnim proizvodom koji bi mogao naći svoju primjenu u medicinske svrhe te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Ključne riječi: veliki dragoljub (*Tropaeolum majus* L.), hidrolat, citotoksičnost, destilacija potpomognuta mikrovalovima (MAD), mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (MHG)

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 46 stranica, 12 slika, 2 tablice, 74 literaturnih navoda

Mentor: izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, *izvanredni profesor*

Ocjjenjivači: izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, *izvanredni profesor*

izv. prof. dr. sc. Elma Vuko, *izvanredni profesor*

dr. sc. Ivana Vrca, *viši asistent*

Rad prihvaćen: rujan, 2023.

Basic documentation card

Graduating thesis

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

COMPARISON OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF HYDROSOLS FROM GARDEN NASTURTIUM (*Tropaeolum majus* L.) ISOLATED BY ADVANCED MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TECHNIQUES

Loriana Šestić

ABSTRACT

Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) is an edible plant native to South America. Taxonomically, it belongs to the Tropaeolaceae family. *T. majus* contains vitamin C, minerals, fatty acids, flavonoids, tertacyclic triterpenes and glucosinolates. The popularity of these chemical compounds is directly related to many benefits for human health, such as anti-inflammatory activity, maintenance of cardiovascular health and prevention of some forms of cancer. In this paper, the cytotoxic activity of *T. majus* hydrosols rich in glucosinolate degradation products (benzyl isothiocyanate and benzyl cyanide) was analyzed on colon cancer cells (HCT116), osteosarcoma (U2OS) and cervical cancer (HeLa) with an emphasis on comparing the activity of hydrosols obtained by two advanced extraction techniques. *T. majus* hydrosols isolated by two extraction techniques: microwave-assisted distillation (MAD) and microwave hydrodiffusion and gravity (MHG), showed moderate to weak cytotoxic activity on all three tested cell lines. A statistically significant difference in cytotoxic activity between *T. majus* hydrosols isolated by extraction methods: microwave assisted distillation (MAD) and microwave hydrodiffusion and gravity (MHG), was not determined. In view of the obtained results, the hydrosols of garden nasturtium, isolated by advanced microwave assisted extraction techniques can be considered a safe natural product that could find its application for medical purposes and in the cosmetic and pharmaceutical industry.

Key words: garden nasturtium, *Tropaeolum majus*, hydrosols, cytotoxic activity, microwave assisted distillation (MAD), microwave hydrodiffusion and gravity (MHG)

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 46 pages, 12 figures, 2 tables and 74 references

Original language: Croatian

Mentor: Željana Fredotović, *Associate Professor, PhD*

Reviewers: Željana Fredotović, *Associate Professor, PhD*

Elma Vuko, *Associate Professor, PhD*

Ivana Vrca, *Senior Assistant, PhD*

Thesis accepted: September, 2023.

Sadržaj

1 UVOD	1
1.1 Cilj istraživanja	3
2 LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1 <i>Tropaeolum majus</i> L.....	4
2.1.1 Sistematska pripadnost i morfološka obilježja.....	4
2.1.2 Geografska rasprostranjenost i ekološki uvjeti	6
2.1.3 Kemijski sastav i biološka aktivnost	8
2.1.3.1 Glukozinolati.....	8
2.1.3.1.1 Izotiocijanati	9
2.2 Tehnike ekstrakcije biljnih spojeva	10
2.2.1 Mikrovalna ekstrakcija hlapljivih spojeva	11
2.2.1.1 Ekstrakcija hlapljivih spojeva destilacijom potpomognutom mikrovalovima (MAD).....	11
2.2.1.2 Ekstrakcija hlapljivih spojeva mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG).....	11
2.3 Rak	12
2.3.1 Nastanak i uzroci raka	12
2.3.2 Svojstva stanica raka	13
3 MATERIJALI I METODE	15
3.1 Materijali	15
3.1.1 Hidrolat vrste <i>Tropaeolum majus</i>	15
3.1.2 Stanične linije.....	15
3.1.2.1 Stanična linija raka grlića maternice (HeLa)	15
3.1.2.2 Stanična linija ljudskog osteosarkoma (U2OS)	16
3.1.2.3 Stanična linija raka debelog crijeva (HCT116).....	16
3.1.3 Kemikalije	16
3.2 Metode.....	17
3.2.1 Kultiviranje i propagacija stanica	17
3.2.2 Određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom.....	18
3.2.3 Statistička analiza	20
4 REZULTATI	21
4.1 Usporedba citotoksične aktivnosti hidrolata dragoljuba izoliranih MHG i MAD tehnikama ekstrakcije	21
5 RASPRAVA	23
6 ZAKLJUČAK	26

7	LITERATURA.....	27
8	POPIS SLIKA.....	34
9	POPIS TABLICA	35
	METODIČKI DIO	36

1 UVOD

Tropaeolum majus L., tradicionalno poznata i kao veliki dragoljub, jestiva je autohtona biljka Južne Amerike. Taksonomski se svrstava u porodicu Tropaeolaceae. U Europu je unesena u 16. stoljeću iz Perua i uspješno je kultivirana kao jednogodišnja, dekorativna biljka [1, 2]. Svi dijelovi biljke su jestivi. Tako se na primjer listovi i cvjetovi u kulinarstvu koriste kao sastojci raznih salata i drugih prehrambenih proizvoda, dok se sjeme *T. majus* koristi kao zamjena za papar [3]. Bogata je vitaminom C i izvor mineralnih tvari poput cinka, željeza, bakra, magnezija, stroncija i kalija [4]. Posljednjih godina jestive biljke sve više okupiraju interes znanstvenika upravo zbog njihovog potencijalnog blagotvornog djelovanja na ljudsko zdravlje.

Cvjetovi koji se koriste u ljudskoj prehrani moraju biti jestivi što bi značilo netoksični te time biljke koje su tretirane pesticidima ne udovoljavaju ovakvoj primjeni [5]. Jestivi cvjetovi sadrže velik broj različitih fitokemikalija koje doprinose njihovom vanjskom izgledu (boje poput antocijanina i karotenoida) i bioaktivne spojeve poput fenola. Popularnost ovih spojeva izravno je povezana sa mnogim prednostima za ljudsko zdravlje; antioksidativnim potencijalom i bioaktivnosti, poput protupalne aktivnosti, održavanja kardiovaskularnog zdravlja i prevencije nekih oblika raka [6].

Mediteranska makrobioklima i njeni ekosustavi pokazuju visok stupanj raznovrsnosti kada je u pitanju heterogenost biljaka. Ova biološka raznolikost uključuje i samonikle biljke koje se koriste u prehrambene i terapeutске svrhe. Za mnoge takve biljke do izraza dolazi njihova periodičnost tj. mogu biti korištene samo u određenim godišnjim dobima. Biljke s blagotvornim učincima često ostaju skrivene široj masi ljudi te se njima koristi tek mali dio lokalnog stanovništva [7].

Hidrolati su nusprodukti vodene izolacije eteričnih ulja. Sastoje se od destilirane vode u kojoj je u vrlo malim količinama disperzirano eterično ulje. Svoju primjenu nalaze u kozmetici, industriji parfema, proizvodnji pića i dezinfekciji hrane. Istraživanja pokazuju i mogućnost njihova korištenja u inhibiciji razvoja patoloških mikroorganizama i otklanjanje biofilmova koji predstavljaju prijetnju u hrani i farmaceutskim proizvodima [8]. Njihovo korištenje u budućnosti bi moglo doprinijeti smanjenju korištenja antibiotika i suprotstaviti se rezistenciji na iste [9]. Zahvaljujući bogatom kemijskom sastavu i sigurnoj upotrebi hidrolati su danas široko rasprostranjeni, no unatoč tome njihov kemijski sastav i svojstva nisu

dovoljno istraženi. Tako znanstvenici često stavljaju naglasak na eterična ulja „popularnih“ biljaka, dok s druge strane jako je malo istraživanja koja obuhvaćaju antioksidativna svojstva i kemijski sastav hidrolata drugih ljekovitih biljnih vrsta [10].

1.1 Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati i usporediti citotoksični učinak hidrolata biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) izoliranih dvjema metodama mikrovalne ekstrakcije; MAD i MHG na stanične linije raka grlića maternice (HeLa), osteosarkoma (U2OS) te karcinoma debelog crijeva (HCT116).

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 *Tropaeolum majus* L.

2.1.1 Sistematska pripadnost i morfološka obilježja

Odjeljak: Spermatophyta
(sjemenjače)

Pododjeljak: Magnoliophytina
(kritosjemenjače)

Razred: Magnoliopsida (dvosupnice)

Red: Brassicales (bročike)

Porodica: Tropaeolaceae (dragoljubi)

Rod: *Tropaeolum* (dragoljub)

Vrsta: *Tropaeolum majus* L.

Sinonimi: *Tropaeolum elatum* Salisb., *Tropaeolum repandifolium* Stockes, *Tropaeolum schillingii* Vilmorin

Hrvatski i narodni nazivi: veliki dragoljub, artičoka, dragoljub, dragoljub štitkasti, kapucinka, dragoljub veći, ljubidrag, penjalica

Tropaeolum majus L. jednogodišnja je zeljasta biljka. Stabljika je razgranata puzajuća i može narasti do 3 metra (**Slika 1**). Listovi su zeleni, jednostavnji, okrugli i mrežaste nervature. Veličine su 5 do 25 cm (**Slika 2**) [11]. Cvjetovi su asimetrični, zvonoliki, mesnati i zigomorfni. Čaška izgleda kao jednodijelna, ali je zapravo sastavljena od 5 lapova od kojih je jedan izdužen te formira hipantij koji sadrži nektar. Pentamerni vjenčić varira bojom od žute do crvene (**Slika 3**). Cvjetovi su hermafrođiti. Andrecej u *T. majus* ima osam antera različite veličine. Ginecej, koji može biti od zelenkaste do žukaste boje, predstavlja plodnica koja je trogradna, nadrasla i sinkarpna. Placentacija je apikalna [12]. Plod *T. majus* je šizokarpan i dijeli se na tri merikarpa žuto-zelene boje koji prelaze u žuto-sivu boju. Zbog svog porijekla, *T. majus* je osjetljiv na niske temperature, pa se sađenje obavlja sredinom mjeseca svibnja. Sjemenki treba 15-20 dana kako bi prokljala, a cvjeta nakon 8-10 tjedana. Pretjerano

korištenje nitratnih gnojiva prilikom sađenja pruža negativan utjecaj na samu biljku i dovodi do stvaranja više listova, a manje cvjetova [1].



Slika 1. Dragoljub (*Tropaeolum majus L.*) [13]



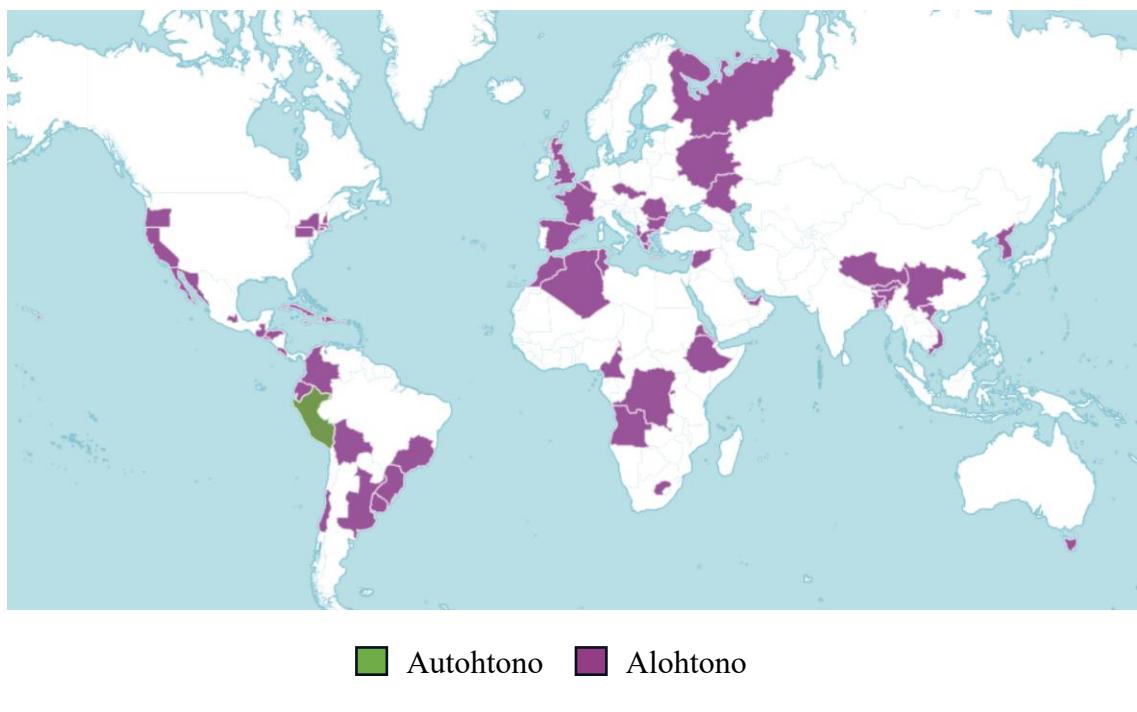
Slika 2. Listovi biljke dragoljub (*Tropaeolum majus L.*) [14]



Slika 3. Cvijet biljke dragoljub (*Tropaeolum majus L.*) [15]

2.1.2 Geografska rasprostranjenost i ekološki uvjeti

Tropaeolum majus autohtona je vrsta u Peruu, gdje se smatra kultigenom. Vrsta je unesena i naturalizirana u Australiju, Novi Zeland, Ameriku, Afriku, Aziju i Europu (Slika 4). U Hrvatskoj se kao samonikla biljka može naći duž Jadranske obale te na sunčanim i toplim mjestima kontinentalnog djela (Slika 5). Uzgaja se širom svijeta kao ukrasna i jestiva biljka. *T. majus* je terofit odnosno biljka koja preživljava nepogodne periode u obliku sjemena.



Slika 4. Geografska rasprostranjenost vrste *Tropaeolum majus* u svijetu [16].



Slika 5. Geografska rasprostranjenost vrste *Tropaeolum majus L.* u Hrvatskoj [17].

2.1.3 Kemski sastav i biološka aktivnost

U cvjetovima *T. majus* nađeni su karotenoidi i fenolni spojevi. Zastupljenost različitih fenolnih spojeva ovisi o boji samih cvjetova. Tako crveni cvjetovi sadržavaju najviše miricetina, narančasti cvjetovi kampferola, dok je kod žutih cvjetova najzastupljenija hidroksicinamična kiselina. Listovi i sjeme *T. majus* sadrže masne kiseline, flavonoide, tertacikličke triterpene i glukozinolate (benzil glukozinolat i sinalbin) [1]. Cvjetovi i listovi *T. majus* pokazali su visoku razinu vitamina C i fenola [18]. Antioksidativna aktivnost *T. majus* testirana je mjerenjem sposobnosti uklanjanja DPPH i ABTS radikala [19] i u uskoj je vezi s visokim vrijednostima vitamina C i fenola [18]. Upravo zbog visoke koncentracije vitamina C (300 mg na 100 g biljnog materijala) *T. majus* se posebno u 18 st. kultivirala duž obala i na oceanskim otocima kao pomoć pomorcima protiv skorbuti [20]. Pronađeno je kako izokvercitrin (flavonoid) pokazuje značajnu diuretsku aktivnost; povećanje volumena mokraće i izlučivanje natrija [21]. Ekstrakt *T. majus* bogat izokvercitrinom pokazao je i hipotenzivni učinak u ovisnosti o dozi [22].

Kod ispitivanja antimikrobne aktivnosti utvrđeno je kako ekstrakt *T. majus* ne posjeduje antimikrobnu aktivnost za ispitivane bakterije (*S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. bronchiseptica*) što je pripisano niskoj koncentraciji benzil izotiocijanata u ekstraktima korištenima u istraživanju [23]. Drugo istraživanje uključivalo je frakcije etanolnog ekstrakta *T. majus*. Frakcije heksana i kloroform-a pokazale su antimikrobnu aktivnost za sve ispitivane bakterije [24].

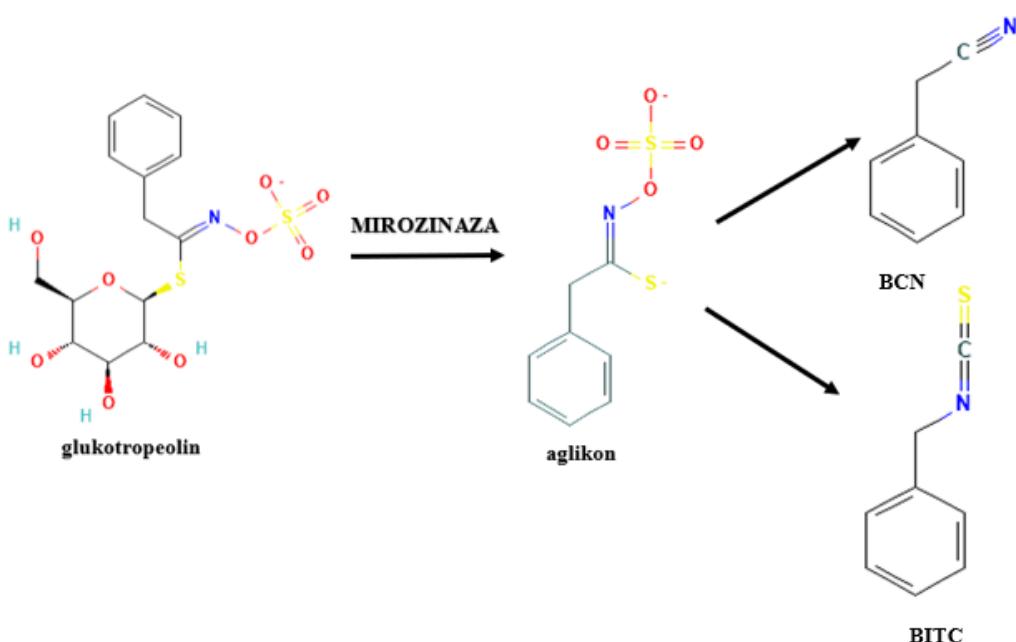
Velik broj istraživanja pokazuje ne toksičnost i sigurnu upotrebu vodenog i etanolnog ekstrakta *T. majus*. S druge strane, istraživanje embriogeneze u gravidnih štakora kojima je davan hidroetanolni ekstrakt provedeno od strane Lourenca i suradnika pokazalo je povećanje razine dehidroepiandrosterona (DHEA) i estradiola u krvnoj plazmi. Zbog toga što ekstrakt *T. majus* podiže razinu DHEA dovodi ga se u vezu sa neispravnom implantacijom embrija u ranim stadijima trudnoće [25].

2.1.3.1 Glukozinolati

Glukozinolati (GSL) su derivati aminokiselina i sekundarni biljni metaboliti. Svi glukozinolati imaju istu osnovnu strukturu: tioglukozid u kojima je glikonski dio najčešće glukoza i aglikonski dio tj. bočni lanac koji potječe od prekursorske aminokiseline [26].

Sjeme *T. majus* sadrži otprilike 5 mg glukotropeolina (benzil glukozinolata). Listovi su također veliko skladište benzil glukozinolata i služe kao primarno mjesto njihove sinteze [27].

Glukozinolati mogu biti hidrolizirani mirozinazom (tioglukozid glukohidrolaza), enzimom koji postaje aktivan kada se biljna tkiva oštete ili bivaju probavljena. Struktura produkata nastalih hidrolizom ovisi o više faktora, ali najčešće nastaju izotiocijanati, nitrili i tiocijanati koji su od najvećeg interesa kao bioaktivni spojevi [28]. Mirozinaza i glukozinolati skladište se u biljnim tkivima odvojeno. Oštećenje biljnih tkiva omogućava njihovo miješanje što rezultira nastankom prije spomenutih produkata [29]. Hlapljive komponente iz benzil GSL sakupljene nakon ekstrakcije hlapljivih spojeva mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG) iz sjemena *T. majus* identificirane su GC-MS analizom koja je pokazala kako su glavne hlapljive komponente u ekstraktu: benzil izotiocijanat (BITC) i benzil cijanid (BCN) [30] (**Slika 6**).



Slika 6. Hidroliza glukotropeolina. Reakciju katalizira enzim mirozinaza [31-34].

2.1.3.1.1 Izotiocijanati

Toksičnost se ne pripisuje samim glukozinolatima, već biološki aktivnim produktima poput izotiocijanata (ITC) koji su nastali enzimatskom hidrolizom GSL-a pomoću enzima mirozinaze. Izotiocijanati su mali hlapljivi spojevi sa oporim okusom i mirisom funkcijeske skupine R-N=C=S. U senfu i hrenu prepoznatljiv okus upravo daje propenil ITC, pa se ponekad ITC naziva „ulje senfa“. ITC je relativno reaktiv, a zbog svoje poznate toksičnosti često je i kandidat za pesticidnu aktivnost [29].

Naglasak je stavljen na ciljano djelovanje izotiocijanata na stanice raka različitih organa i na puteve apoptoze što za posljedicu ima kontroliranu proliferaciju i smrt stanica raka [35]. ITC zaustavlja staničnu proliferaciju inhibirajući inicijacijske proteine i puteve proliferacije. Isto tako, tretman ITC-om stimulira reaktivne kisikove jedinke (ROS), prekid staničnog ciklusa, programiranu staničnu smrt i autofagiju. Zabilježeno je kako više od 20 vrsta ITC-a posjeduje antikancerogena svojstva [36]. U istraživanju provedenom na miševima s transgeničnim adenokarcinomom prostate (TRAMP), dokazano je kako prehrana s dodatkom BITC-a utječe na inhibiciju razvoja raka prostate [37]. Drugo istraživanje pokazuje kako BITC inducira oštećenje DNA u humanim stanicama gušterače što za posljedicu ima zaustavljanje G2/M staničnog ciklusa i poticanje apoptoze [38].

2.2 Tehnike ekstrakcije biljnih spojeva

Biljke proizvode primarne metabolite koji su zajednički gotovo svim organizmima (masti, bjelančevine, ugljikohidrati). Osim primarnih biljke proizvode i razne sekundarne metabolite. Upravo su sekundarni metaboliti način na koji se biljka brani od utjecaja bakterija, virusa, herbivora i slično. Služe i za regulaciju simbioze, kontroliraju kljanje sjemena i inhibiraju rast drugih kompetitivnih biljaka. Sekundarni metaboliti su raznovrsni kemijski spojevi zaslužni za prilagodbu biljaka njihovom okolišu. Tako u biljkama možemo pronaći različite alkaloide, amine, cijanogene glukozide, glukozinolate, ne proteinske aminokiseline, poliacetilene i peptide [39]. Za razliku od primarnih metabolita oni nisu dio primarnih biokemijskih puteva staničnog rasta i razmnožavanja [40]. Danas se koriste različite metode za ekstrakciju sekundarnih metabolita iz biljnih organizama.

Ekstrakcija biljnih spojeva je izdvajanje određenih sastojaka iz ishodišnog biljnog materijala uz korištenje otapala prema određenoj standardnoj proceduri [41]. Postoji više metoda koje se koriste za ekstrakciju: destilacija (direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodom i parom), ekstrakcija otapalima (ekstrakcija otapalom, maceracija, ekstrakcija s uljima), hladno prešanje i nekonvencionalne tehnike (ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo-ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom) [42]. Kako interes za zelenom tehnologijom raste tako ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) posljednjih godina biva sve više korištena. U nastavku više o tehnici ekstrakcije MAE.

2.2.1 Mikrovalna ekstrakcija hlapljivih spojeva

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi valne duljine od 1 do 300 nm. Elektromagnetski val je periodična promjena električnog i magnetskog polja koja titraju u fazi. Mogu se koristiti kao prijenosnici informacija ili kao energetski vektori. Djelovanjem valova kao energetskih vektora na tvar, tvar upija dio elektromagnetskog zračenja i pretvara ga u toplinu.

Iako je isprva upotrebljavana kao metoda digestije za različite uzorke, danas je mikrovalna ekstrakcija široko prihvaćena metoda ekstrakcije hlapljivih spojeva iz biljnih materijala. Mikrovalna ekstrakcija omogućava brzu ekstrakciju spojeva iz krutog materijala efikasno poput drugih „tradicionalnih“ metoda. Prednosti MAE je korištenje smanjene količina otapala, a s tim u vezi i manje količine otpadnih tvari odlaze u okoliš. Dodatna poboljšanja metode uvedena su eliminiranjem otapala i korištenje takozvane suhe ekstrakcije [43]. Upravo upotreba mikrovalne ekstrakcije poboljšava izdvajanje sekundarnih metabolita biljaka [44]. Kako se velike količine sekundarnih metabolita prirodno nalaze u staničnoj stijenci ili citoplazmi, razaranje stanice mikrovalnim zračenjem može doprinijeti uspješnijoj ekstrakciji [45].

2.2.1.1 *Ekstrakcija hlapljivih spojeva destilacijom potpomognutom mikrovalovima (MAD)*

Mikrovalna „suga“ destilacija ili destilacija potpomognuta mikrovalovima metoda je u kojoj se kombinira zagrijavanje mikrovalovima i suha destilacija pri atmosferskom tlaku. Način na koji se izvodi takva ekstrakcija relativno je jednostavan. Svježi biljni materijal stavi se u mikrovalni reaktor bez dodatka vode i otapala. Voda koja se nalazi unutar samih stanica biljnog materijala biva zagrijavana i dovodi do pucanja same stanice. Taj proces oslobađa eterična ulja i ona kao takva isparavaju s vodom iz biljnog materijala. Sistem hlađenja koji se nalazi izvan mikrovalnog reaktora neprekidno kondenzira destilat. Višak vode vraća se natrag u reaktor kako bi se očuvala količina vode u biljnom materijalu [46].

2.2.1.2 *Ekstrakcija hlapljivih spojeva mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG)*

Ovaj zeleni proces ekstrakcije spoj je mikrovalnog zagrijavanja i gravitacijske sile pri atmosferskom tlaku. MHG razvijen je za laboratorijsku i industrijsku implikaciju u ekstrakciji eteričnih ulja iz aromatičnih biljaka. Ova metoda isto kao i MAD obuhvaća stavljanje biljnog

materijala u mikrovalni reaktor, bez dodatka ikakvog otapala ili vode. Zagrijavanje pomoću mikrovalova oslobađa eterična ulja i vodu koje izlaze van biljne stанице. Fizikalni fenomen, poznat kao hidrodifuzija, omogućava ekstrakciju eteričnog ulja i vode te njihovu difuziju izvan biljnog materijala pod utjecajem gravitacijske sile. Sustav hlađenja koji se nalazi izvan mikrovalnog reaktora neprekidno kondenzira ekstrakt. Eterično ulje i hidrolat bivaju sakupljeni zajedno u tikvicu, potom se lako odvajaju budući da se uočavaju dva sloja. Prednost ove metode je ekstrakcija bez destilacije i isparavanja što ovu metodu čini energetski povoljnijom. MHG nije MAE jer ne koristi organska otapala, a nije ni MAD koja koristi vodu u biljnim stanicama kako bi isparila eterična ulja [47].

2.3 Rak

Prvi zapis o raku pronađen je u egipatskom papirusu iz oko 3000.g.pr.Kr. Vjeruje se kako je naziv rak osmislio Hipokrat, moguće zato što ga je oblik tumora podsjećao na raka pa je u opisivanju same bolesti upotrijebio grčku riječ *karcinos*, koja se odnosi na tu skupinu životinja. Rak je genetska bolest koju karakterizira ubrzana i nekontrolirana proliferacija stanica koje imaju mogućnost širenja po čitavom organizmu. Onkogeni su geni koji u pretjeranoj ekspresiji dovode do maligne transformacije stanica. Uglavnom su to mutirane verzije normalnih staničnih gena (protoonkogena) zaduženih za kontrolu stanične diobe, inhibiciju apoptoze i diferencijaciju. Proteini eksprimirani od strane onkogena imaju ulogu u signalnoj transdukciji ili pak kao transkripcijski faktori aktivirani tim procesom. Signalna transdukcija je proces u kojem stanica signal koji primi prevodi u promjenu genske ekspresije koja rezultira staničnim odgovorom. Prvi dokaz da su onkogeni usko povezani s nastankom tumorskih tvorbi dao je pokus prijenosa gena Coopera i Weinberga 1981.godine [48]. Aktivacija onkogena samo je jedna od dviju različitih vrsta genskih promjena važnih za nastanak raka. Druga vrsta je inaktivacija tumor-supresorskih gena. Oni imaju suprotnu ulogu od onkogena to jest u normalnim uvjetima inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak tumora. Dva prva otkrivena tumor-supresorska gena su: Rb čija mutacija dovodi do nastanka retinoblastoma i p53 koji je mutiran u 60% slučajeva raka kod ljudi [49].

2.3.1 Nastanak i uzroci raka

Stanice raka karakterizira nekontrolirani rast i dijeljenje čime proliferiraju u okolina normalna tkiva i organe te naposljetku metastaziraju po čitavom tijelu. Pojam rak odnosi se

samo na zločudne tumore dok s druge strane imamo i dobroćudne tumore koji zapravo ostaju ograničeni na mjesto na kojem su i nastali. Glavno svojstvo raka je sama klonalnost tumora to jest nastanak tumora iz samo jedne stanice koja počinje nenormalnu proliferaciju.

Tvari koje uzrokuju rak nazivaju se kancerogeni. Prema provedenim istraživanjima zračenje i kemijski kancerogeni dovode do oštećenja DNA što naposljetu uzrokuje mutacije. Neki od poznatih kancerogena u ljudi su: sunčevu ultraljubičasto zračenje, kancerogeni prisutni u duhanskom dimu i aflatoksin. Osim kancerogena koji uzrokuju mutacije postoje i takozvani promotori tumora koji potiču proliferaciju stanica. Rak u ljudi također može biti uzrokovani i nekim virusima i bakterijama [50].

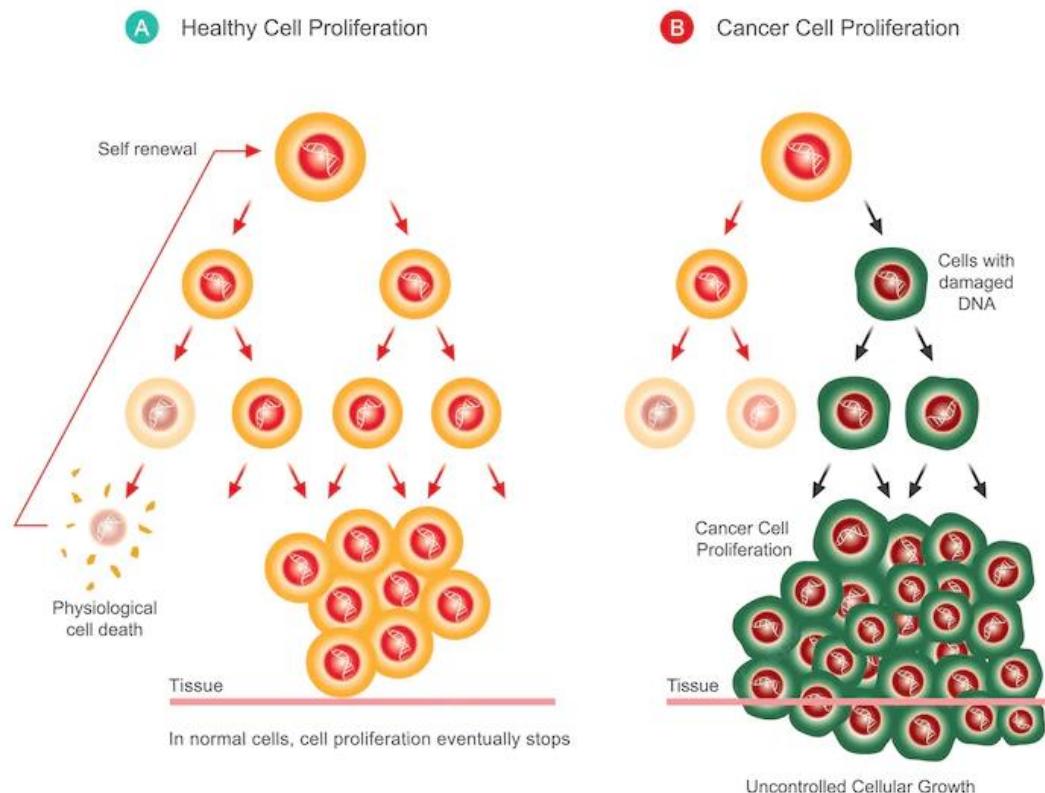
2.3.2 Svojstva stanica raka

Kod normalnih stanica u kulturi dolazi do inhibicije proliferacije stanica u ovisnosti o gustoći, dok tumorske stanice nastavljaju proliferirati neovisno o gustoći. Tumorske stanice imaju manju potrebu za faktorima rasta i ponekad ih same stvaraju što se naziva autokrina simulacija rasta. Još jedna velika razlika između normalnih stanica i tumorskih stanica vidljiva je u takozvanoj dodirnoj inhibiciji. Normalne stanice u kulturi nakon dodira sa susjednim stanicama prekidaju svoju proliferaciju i tvore jedan sloj stanica, no tumorske stanice su neosjetljive na dodirnu inhibiciju i rastu neuredno, u više slojeva.

Važnu ulogu u širenju stanica raka imaju proteaze. Stanice raka izlučuju proteaze koje razgrađuju sastojke izvan staničnog matriksa što omogućava stanicama raka širenje u okolna tkiva [51]. Stanice raka imaju i sposobnost angiogeneze to jest stvaranja novih krvnih žila što zadovoljava njihovu potrebu za kisikom i hranjivim tvarima. Proces angiogeneze može inhibirati endostatin što podupire dokaz kako osobe s Downovim sindromom pokazuju nižu stopu razvitka tumora zbog veće količine endostatina u krvnom serumu [52].

Većina stanica raka pokazuje izostanak normalne diferencijacije stanica (**Slika 7**). One ostaju u ranoj fazi diferencijacije i u toj fazi se neprekidno dijele i umnažaju. Više istraživanja provedeno je kako bi se dokazalo da su upravo telomere na krajevima kromosoma ono što doprinosi njihovoj „besmrtnosti“. Sastavni dio diferencijacije stanica je i programirana stanična smrt ili apoptoza. Bcl2 protein središnji je regulatorni protein koji inhibira apoptozu i programiranu staničnu smrt, dok BH i BH3 proteini induciraju aktivaciju kaspaza (izvršitelji apoptoze) i potiču staničnu smrt. Stanice raka često imaju mehanizme kojima izbjegavaju apoptozu što povećava otpornost samih stanica na tretmane liječenja kojima se podvrgavaju

oboljeli. Izbjegavanje apoptoze može biti uzrokovano raznim čimbenicima poput: poremećene ravnoteže između pro-apoptoznih i anti-apoptoznih regulatora, smanjena funkcija kaspaze te oslabljena funkcija i signalizacija receptora za apoptozu [53].



Slika 7. Nekontrolirani rast i dioba stanica raka u usporedbi s normalnim stanicama [54].

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Hidrolat vrste *Tropaeolum majus*

Hidrolat je dobiven kao nusprodukt MHG (mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija) i MAD (destilacija potpomognuta mikrovalovima) tehnika ekstrakcija. Hidrolati su nakon izolacije pohranjeni u hladnjak na temperaturu od 4 °C. Koncentracija hidrolata izoliranog MHG metodom ekstrakcije bila je 3,95 mg/mL, a koncentracija hidrolata izoliranog MAD metodom ekstrakcije 1,05 mg/mL (uzorci su prethodno pripremljeni od strane dr. sc. Ivane Vrce u laboratoriju za botaniku Odjela za biologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Splitu).

3.1.2 Stanične linije

In vitro stanične linije raka koriste se u svrhu istraživanja i otkrivanja novih lijekova [55]. Budući da kulture stanica raka karakterizira besmrtnost, one omogućavaju neiscrpan izvor biološkog materijala za istraživanja poput ovoga [56]. Uspostavljanje nove stanične linije vrlo je zahtjevan proces s malim postotkom uspješnosti. U obzir treba uzeti velike razlike između *in vivo* i *in vitro* mikro okoliša poput ovisnosti o faktorima rasta, postotak kisika, komunikacija sa stromom i imunološkim stanicama i tako dalje. Upravo zbog toga se, na primjer, u *in vitro* uvjetima ne može uzgojiti stanična linija kronične mijeloidne leukemije budući da stanice umiru nakon nekoliko tjedana [57]. U svrhu utvrđivanja citotoksičnosti hidrolata *T. majus* korištene su humane stanične linije HeLa, U2OS i HCT116.

3.1.2.1 Stanična linija raka grlića maternice (HeLa)

HeLa stanice su prva besmrtna humana stanična linija. Stanice su dobivene iz raka grlića maternice pacijentice Henriette Lacks. 1953. su Theodore Puck i Philip Marcus prvi puta klonirali HeLa stanice i donirali uzorke drugim znanstvenicima [58]. Kako su HeLa stanice prve uzgojene u laboratoriju i uz to sa svojstvom neprestane diobe korištene su za mnoge eksperimenete te su dale poticaj mnogim kliničkim i biološkim istraživanjima. Bile su ključne u razvoju polio cjepiva protiv dječje paralize i u otkrivanju „enigmi“ raka, virusa i

utjecaja zračenja. Doprinijele su i poboljšanju u *in vitro* oplodnji, kloniranju i mapiranju gena [59]. Problem s HeLa stanicama je što one nemaju normalan humani kariotip pa je time ograničena njihova upotreba. HeLa genom je hipertriploidan i sastoji se od 76 do 80 kromosoma. Dodatni kromosomi dolaze od infekcije normalnih stanica humanim papiloma virusom (HPV) što je naposlijetku i dovelo do nastanka stanica raka [60].

3.1.2.2 Stanična linija ljudskog osteosarkoma (*U2OS*)

U2OS stanična linija, prvotno nazvana 2T linija, kultivirana je iz koštanog tkiva petnaestogodišnje djevojčice oboljele od osteosarkoma. *U2OS* jedna je od prvih humanih staničnih linija koja potiče iz mezenhimalnog tumora [60].

3.1.2.3 Stanična linija raka debelog crijeva (*HCT116*)

HCT 116 stanična linija izolirana je iz debelog crijeva 46ogodišnjeg muškarca koji je bolovao od raka debelog crijeva. *HCT116* stanice imaju mutaciju na kodonu 13 (G13D) u KRAS genu i ta se mutacija povezuje sa tumorogenozom. *HCT116* izgledaju kao epitelne stanice, 70% stanica posjeduje 45 kromosoma, te im nedostaje Y kromosom. Jako dobro podnose transfekciju, posebno virusnim vektorima i to ih čini podobnima za istraživanja u genskoj terapiji. Posebno su zastupljeni kao *in vitro* model u proučavanju raka debelog crijeva. Pomažu otkriti mehanizme i signalne puteve uključene u proliferaciju, migraciju i invaziju stanica raka [61]. Tako je jedno istraživanje provedeno na *HCT116* staničnoj liniji pokazalo kako regulacija NOX2 i Nrf2 gena uzrokuje kemorezistenciju stanica raka. Ta spoznaja se može upotrijebiti kako bi se prevladao razvoj rezistencije kod tretmana liječenja ljudi oboljelih od raka [62]. Stanice su osjetljive na promjene u temperaturi, pH vrijednosti i količini hraničivih tvari što može utjecati na same rezultate istraživanja.

3.1.3 Kemikalije

- ❖ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- ❖ Penicilin/ streptomycin antibiotik (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)
- ❖ FBS (Fetal Bovine Serum) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)

- ❖ Trypsin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- ❖ MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolijeva sol)) (Promega, Madison, WI, USA)

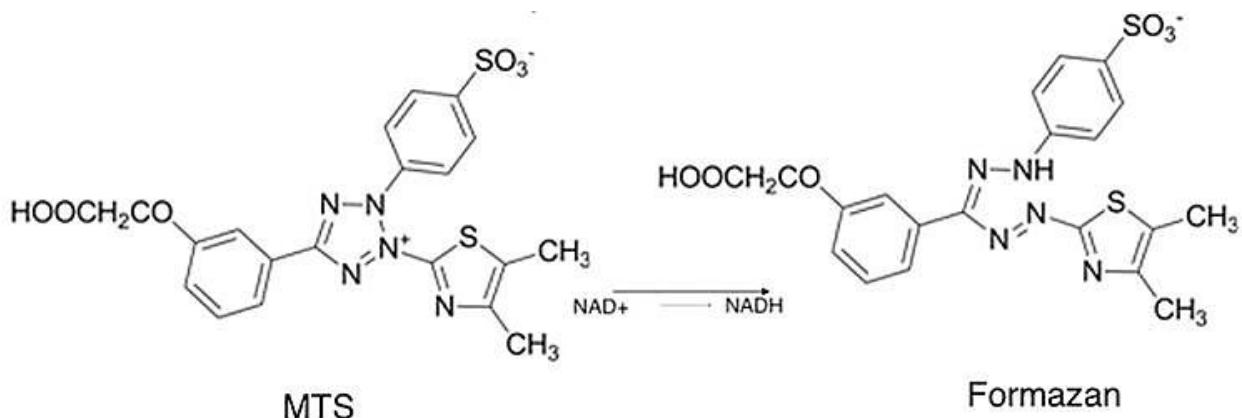
3.2 Metode

3.2.1 Kultiviranje i propagacija stanica

Nakon odmrzavanja, stanične linije uzgojene su u vlažnom inkubatoru na 37 °C uz 5% CO₂, u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju. U DMEM mediju dodano je 5 ml penicilin/streptomicin antibiotika, kako bi se spriječila kontaminacija bakterijama i 50 ml fetalnog goveđeg seruma (FBS) koji služi kao izvor hormona i faktora rasta. Kod kultiviranja i propagacije stanica bitno je sve površine i opremu unesenu u laminar prebrisati 70% etanolom kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka. Prije samog rasađivanja stanica potrebno je staviti grijati DMEM medij i tripsin u inkubator kako bi bili na istoj temperaturi kao i stanične linije. Nakon što se kultura stanica izvadi iz inkubatora potrebno je pogledati pod invertnim mikroskopom. Kultura je spremna za rasađivanje ukoliko je ploča 80-100% konfluentna. Prvo je potrebno odsisati stari mediji vakuum sisaljkom na koju je stavljen sterilni nastavak. Nakon odsisavanja na ploču je potrebno dodati 2 ml tripsina i pipetom lagano pokušati odlijepiti stanice sa ploče. Ukoliko odlijepljivanje ne ide lako ploča se može staviti u inkubator na 5 minuta. Vrijeme izlaganja stanica tripsinu ne smije biti duže zbog toksičnosti tripsina za stanice. Kada su sve stanice odlijepljene s ploče dodaje se 8 ml DMEM medija u istu ploču kako bi došlo do neutralizacije tripsina i kako bi se stanice resuspendirale. Nakon toga se pripremi nova ploča sa 8 ml svježeg DMEM medija. Iz prvotne ploče usiše se 2 ml suspenzije i nasadi se na novo pripremljenu ploču te se sadržaj lagano promiješa kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile. Prije odlaganja stanica u inkubator potrebno je novu ploču pogledati pod mikroskopom. Stanice bi trebale biti malene i okrugle te plivati po ploči. Ostavi ih se u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂ u trajanju od 48 sati nakon čega se ponovno mogu propagirati.

3.2.2 Određivanje metaboličke aktivnosti (vijabilnosti) stanica MTS metodom

MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje citotoksičnosti određene tvari. Metoda se zasniva na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksidenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojeni formazanski produkt (**Slika 8**).

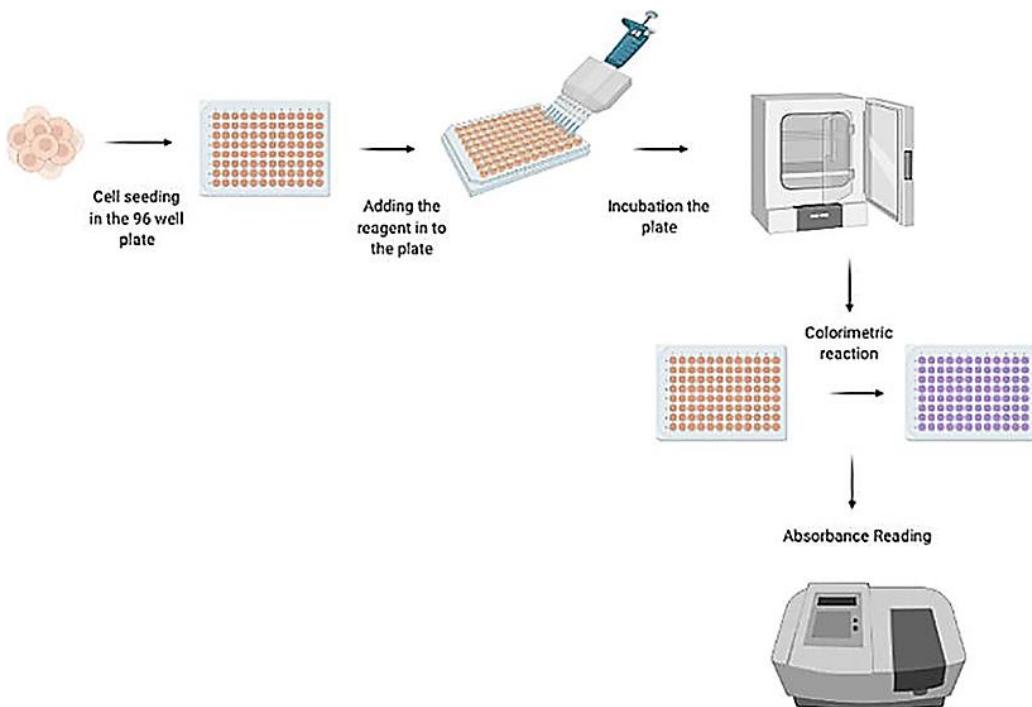


Slika 8. Reakcija redukcije MTS-a u formazan [63].

Temelj kolorimetrijske metode počiva na pojavi boje kao rezultatu metaboličke aktivnosti stanica. Kada MTS dođe u dodir sa živim stanicama mijenja boju iz žute u ljubičastu. Promjena boje se lako opaža i može se izmjeriti i kvantificirati spektrofotometrijskim mjeranjem apsorbancije pri 490 nm (**Slika 9**). Prikupljeni podaci odražavaju vijabilnost stanica koja se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih stanica to jest stanica ne tretiranih MTS-om. Preživljavanje stanica odnosno njihova vijabilnost iskazuje se IC_{50} vrijednošću koja se izračuna kao srednja vrijednost triju neovisnih eksperimenata.

Za određivanje citotoksičnosti hidrolata vrste *T. majus* stanice se nacjepljuju na mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Stanice je prije same provedbe eksperimenta potrebno odlijepiti s ploče koristeći tripsin po ranije opisanom postupku propagacije stanica, rasaditi 2 ml supstrata u novu ploču a ostatak prebaciti u falcon tubicu od 15 ml. Mali uzorak stanica uzet je kako bi se stanice prebrojale. Stanice su prebrojane pomoću automatskog ručnog brojača stanica (Scepter 3.0 Handheld Cell Counter, Millipore) kako bi ih razrijedili na koncentraciju od 1×10^5 st/ml (**Slika 10**). Nakon toga potrebno je označiti mikrotitarsku ploču i pripremiti eksperiment. U jažice prvog stupca ploče stavi se po 100 μ l hidrolata. U ovom eksperimentu u gornje četiri jažice prvog reda nanesen je hidrolat dobiven MHG tehnikom, a

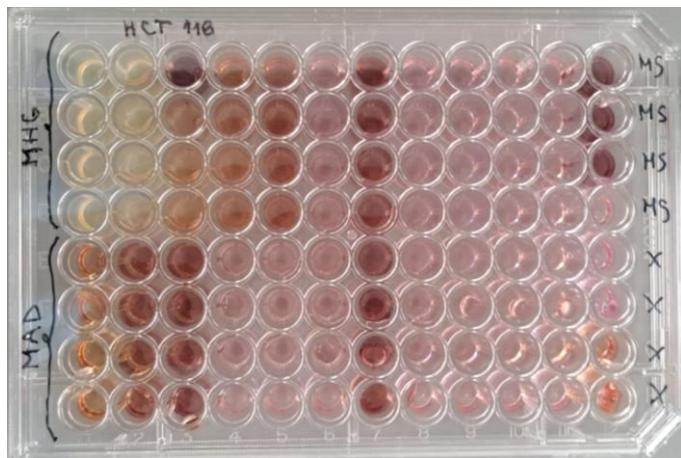
u donje četiri jažice hidrolat dobiven MAD tehnikom ekstrakcije. U donje četiri jažice posljednjeg stupca ploče potrebno je dodati 100 µl DMEM medija, a u četiri gornje jažice posljednjeg stupca 50 µl DMEM medija. Nakon toga potrebno je dodati 50 µl DMEM medija u svaku jažicu izuzev prvog i zadnjeg stupca. Nadalje, potrebno je napraviti serijsko razrjeđenje hidrolata. Uzeti 50 µl hidrolata iz prvog stupca i prebaciti ga u idući, dobro resuspendirati te usisati 50 µl i prebaciti u treći stupac i tako sve do predzadnjeg gdje se usiše 50 µl i ne prebacuje u zadnji stupac već se baca. Sljedeći korak je nasijavanje stanica na mikrotitarsku ploču. Razrijeđene stanice potrebno je izliti u petrijevu zdjelicu uz stalno miješanje tako da se uvijek uzima otprilike isti broj stanica u svaku jažicu. 50 µl stanica treba staviti u prve 4 gornje jažice zadnjeg stupca, a potom stavljamo u sve jažice od predzadnjeg do prvog stupca. U posljedne četiri jažice zadnjeg stupca nalazi se samo DMEM medij. Tako pripremljena ploča se stavi u inkubator 48 sati na 37 °C i 5% CO₂. Nakon inkubacije u jažice se doda po 20 µl MTS reagensa te se stanice dodatno inkubiraju 3 sata na 37°C i 5% CO₂ (**Slika 11**). Kada inkubacija završi, na čitaču mikrotitarskih pločica mjeri se apsorbancija pri 490 nm.



Slika 9. Kolorimetrijska metoda za određivanje citotoksičnosti- Nakon nasijavanja stanica na mikrotitarsku ploču dodaje se MTS reagens, slijedi inkubacija i mjerjenje apsorbancije [57].



Slika 10. Brojač stanica (vlastita fotografija)



Slika 11. Mikrotitarska pločica nakon nanošenja MTS reagensa i inkubacije. Do promjene boje iz žute u ljubičastu u jažicama s dodanim MTS reagensom dolazi kod stanica koje su metabolički aktivne (vlastita fotografija).

3.2.3 Statistička analiza

Provedena su tri neovisna eksperimenta, dobiveni podaci su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom (SD). Excel program korišten je za analizu dobivenih podataka. Proведен je Mann-Whitney U test kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u citotoksičnoj aktivnosti hidrolata izoliranih MHG i MAD tehnikama ekstrakcije. Podaci su značajni ukoliko je $p < 0.05$.

4 REZULTATI

4.1 Usporedba citotoksične aktivnosti hidrolata dragoljuba izoliranih MHG i MAD tehnikama ekstrakcije

Za usporedbu citotoksičnog djelovanja hidrolata dragoljuba izoliranih MHG i MAD tehnikama ekstrakcije, provedena su tri neovisna eksperimenta na tri humane stanične linije, raka grlića maternice (HeLa), osteosarkoma (U2OS) i karcinoma debelog crijeva (HCT116). Metabolička aktivnost stanica određena je MTS metodom. Nakon inkubacije stanica s dodanim MTS reagensom izmjerena je apsorbancija pri 490 nm. Citotoksična aktivnost hidrolata određena je IC₅₀ vrijednošću (**Tablica 1** i **Tablica 2**) (**Slika 12**). IC₅₀ vrijednost dobivena je kao srednja vrijednost triju neovisnih eksperimenata i predstavlja koncentraciju hidrolata koja dovodi do smanjenja vijabilnosti stanica za 50%.

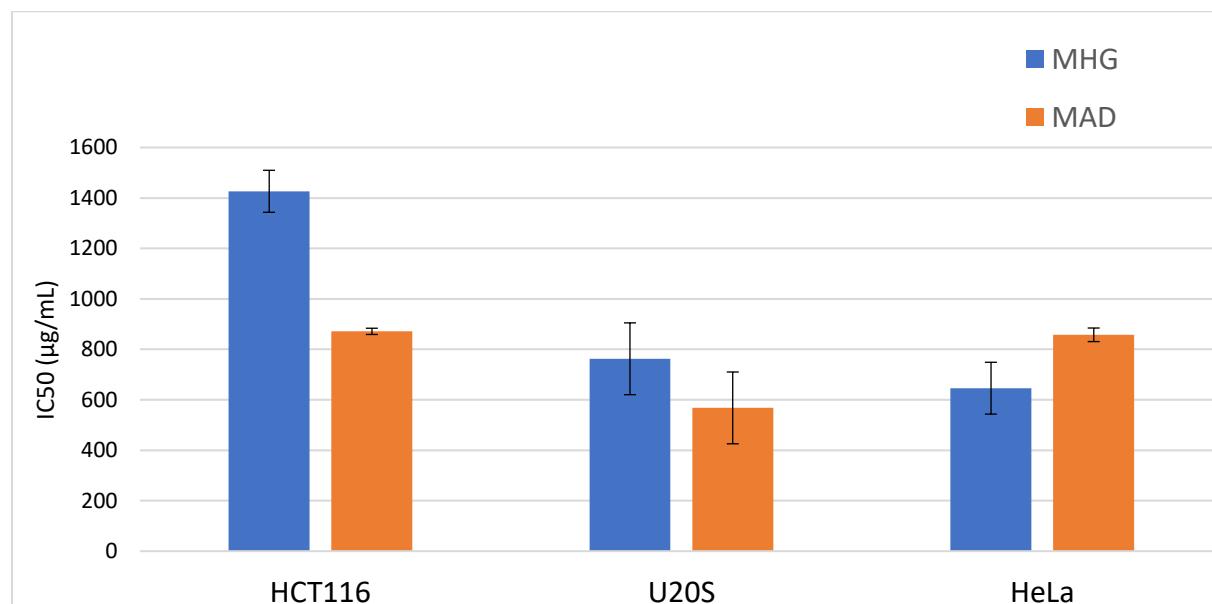
Tablica 1. IC₅₀ ± SD vrijednosti hidrolata izoliranog **MHG** metodom ekstrakcije za tri testirane stanične linije.

	IC ₅₀ (µg/ml) ± SD
HCT116	1426,49 ± 83,23
U2OS	762,61 ± 142,35
HeLa	646,08 ± 102,64

Tablica 2. IC₅₀ ± SD vrijednosti hidrolata izoliranog **MAD** metodom ekstrakcije za tri testirane stanične linije.

	IC ₅₀ (µg/ml) ± SD
HCT116	871,33 ± 12,41
U2S	567,93 ± 142,31
HeLa	857,61 ± 26,91

Prema dobivenim rezultatima uočava se da najveću citotoksičnu aktivnost s IC_{50} vrijednošću od 567,93 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na stanice osteosarkoma (U2OS) ima hidrolat dobiven MAD tehnikom. Nešto slabiju aktivnost na stanice osteosarkoma imao je hidrolat dobiven MHG tehnikom ($IC_{50} = 762,61 \mu\text{g}/\text{ml}$). Sličnu sposobnost inhibicije rasta stanica raka grlića maternice (HeLa) pokazao je hidrolat dobiven MHG-om ($IC_{50} = 646,08 \mu\text{g}/\text{ml}$), dok je na iste stanice hidrolat dobiven MAD-om imao nešto slabiju sposobnost inhibicije rasta s IC_{50} vrijednošću od 857,61 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Najslabiji učinak oba hidrolata su imala na stanice raka debelog crijeva (HCT116) (IC_{50} (hidrolat dobiven MHG tehnikom) = 1426,49 $\mu\text{g}/\text{ml}$; IC_{50} (hidrolat dobiven MAD tehnikom) = 871,33 $\mu\text{g}/\text{ml}$).



Slika 12. Citotoksična aktivnost hidrolata biljke dragoljub izoliranog MHG i MAD tehnikama ekstrakcije. Prikazane IC_{50} vrijednosti su srednje vrijednosti koncentracija dobivenih iz triju neovisno provedenih eksperimenata s pripadajućom standardnom devijacijom (■).

Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u citotoksičnoj aktivnosti između hidrolata izoliranih MHG i MAD tehnikama ekstrakcije provedena je statistička analiza. Analizom je utvrđeno kako ne postoji statistički značajna razlika između citotoksične aktivnosti hidrolata izoliranih dvjema različitim metodama ekstrakcije za sve tri ispitivane humane stanične linije.

5 RASPRAVA

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je jednogodišnja jestiva zeljasta biljka sistematski svrstana u porodicu Tropaeolaceae. Autohtona je vrsta u južnoj Americi, a dospjela je na gotovo svaki kontinent. *T. majus* odlikuje bogatstvo vitaminom C i mineralnim tvarima [4], a u listovima i sjemenu nalaze se masne kiseline, flavonoidi, tertaciklički triterpeni i glukozinolati (benzil glukozinolat i sinalbin) [1]. Prema istraživanju Vrca i sur. [25] pokazalo je kako su glavne hlapljive komponente ekstrakta *T. majus* benzil izotiocijanat (BITC) i benzil cijanid (BCN). Prisutnost ovih spojeva zaslužno je za biološku aktivnost koja se pripisuje velikom dragoljubu. Mnogo istraživanja pokazalo je kako BITC, enzimatski hidroliziran iz glukotropeolina (benzil glukozinolata), ima protuupalno, antioksidativno, antiangiogensko te antikancerogeno djelovanje na različite oblike raka [64, 65]. Posljednjih godina sve više raste svijest o korištenju proizvoda i lijekova na prirodnoj bazi, bilo da je povezano s mnogim bolestima poput raka, dijetalnim režimima ili pak dodatcima prehrani. Trenutne mogućnosti liječenja oboljelih od raka imaju niz prepreka poput visoke toksičnosti za normalne stanice i mnoge druge nuspojave popraćene takvim liječenjem. S druge strane, biomolekule dobivene iz prirodnih proizvoda kao što je BITC pružaju veliki potencijal kao suplementi u liječenju raka. Hidrolati, kao i eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba bogati su razgradnim produktima glukozinolata glukotropeolina (BITC i BCN), ali naravno, u manjoj količini. U ovom radu se analizirala upravo citotoksična aktivnost dvaju hidrolata *T. majus* na HCT116, U2OS i HeLa humanim staničnim linijama s naglaskom na usporedbu njihova djelovanja dobivenih dvjema različitim tehnikama ekstrakcije (MAD i MHG). Veliki broj istraživanja opisuje i ukazuje na citotoksično djelovanje BITC-a. Tako su Han i suradnici [66] otkrili kako BITC aktivira signalne puteve apoptoze koji su uključeni u ROS simuliranu mitohondrijsku disfunkciju u stanicama gastričnog adenokarcinoma. BITC je pokazao citotoksičnost u malim molarnim koncentracijama na humane stanične linije karcinoma jajnika (SKOV-3, 41-M-CHI, CHIcicR), tumora pluća (H-69) i na leukemiju (L-1210) i plazmocitom (PC6) kod miševa [67]. Owis i suradnici pripremili su alkoholni ekstrakt iz lišća *T. majus* te *in vivo* ispitali potencijalnu aktivnost protiv dietilnitrozamin induciranih karcinoma jetre (HCC). Oralna primjena ekstrakta značajno je smanjila vrijednosti upalnog markera NF-κB i suprimirala progresiju HCC-a. Oralnu terapiju kombinirali su s 0.5 Gy gama zračenjem preko EGF-HER-2 signalnog puta. Histopatološka analiza pokazala je obnovljenu jetrenu strukturu dok je imunohistokemijska analiza pokazala povećanje proapoptoznih markera i inhibiciju

antiapoptoznog faktora [68]. U istraživanju Espinoza Silve [69] postignut je sinergistički učinak na MCF-7 stanicama raka dojke kombinacijom ekstrakta *T. majus* sa 5-FU; citotoksičnim lijekom koji se koristi kod kemoterapije. Na albino miševima (BALB/c) kao modelnim organizmima Kim i suradnici ubrizgali su 4T1 stanice karcinoma dojke kako bi proučili učinak oralne primjene BITC na rast i metastaze novotvorine. Zabilježeno je značajno smanjenje rasta tumora, sadržaja hemoglobina i ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) u tumorskom tkivu. BITC je doveo i do smanjenja Bcl-2 proteina, inhibitora apoptoze [70]. Istraživanje antimetastatskog učinka BITC provedeno je na humanim stanicama raka debelog crijeva (HT29). BITC imao je učinak na smanjenje koncentracije matriks metaloproteinaze-2 (MMP-2), matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i urokinazni tip aktivatora plazminogena (u-PA) [71]. Istraživanje na humanim staničnim linijama raka dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) pokazalo je učinak BITC-a na zaustavljanje staničnog ciklusa u G2-M fazi i nastupanje apoptoze što je dovelo do suzbijanja rasta stanica raka [72]. Što se tiče sigurnosti primjene ekstrakta *T. majus*, Gomes i suradnici [73] ispitali su subkroničnu toksičnost hidroetanolnog ekstrakta na štakorima i nisu zabilježili nikakve značajne biokemijske, hematološke ni druge promjene. Vrca i suradnici [30] prvi su ispitali antiproliferacijsku aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta *T. majus* kao i BITC i BCN spojeva na HeLa, HCT116 i U2OS staničnim linijama raka. U usporedbi sa ekstraktom *T. majus*, eterično ulje pokazalo je bolji učinak na sve tri stanične linije raka. Također, BITC je pokazao veći inhibicijski učinak od BCN na svim testiranim stanicama, što se i poklapa s činjenicom kako BITC posjeduje antikancerogeni učinak. Napravljena je i usporedba između MAD i MHG tehnika ekstrakcije eteričnog ulja i ekstrakta koja je pokazala veći antiproliferacijski učinak eteričnog ulja nakon MAD ekstrakcije u odnosu na ekstrakt nakon MHG tehnike ekstrakcije. U ovom istraživanju uspoređivala se citotoksična aktivnost hidrolata *T. majus* izoliranog MAD i MHG tehnikama ekstrakcije. Statistička analiza pokazala je nepostojanost statistički značajne razlike između citotoksične aktivnosti hidrolata dobivenih dvjema različitim metodama ekstrakcije. Oba hidrolata su pokazala umjerenu do slabu citotoksičnu aktivnost na sve tri testirane stanične linije karcinoma. Tome u prilog može ići sama činjenica kako se radi o hidrolatu pa količina BITC-a ovisi o njegovoj topljivosti u vodi. Osim što je BITC slabo topljiv u vodi [74], hidrolati općenito sadrže manje sastojaka ili pak manje koncentracije samih sastojaka od eteričnih ulja [9] što je mogući razlog ovakvih rezultata istraživanja. S druge strane, hidrolati su znatno manje toksični od eteričnih ulja i zbog toga je sve veći broj istraživanja usmjeren na ispitivanje različitih aspekata njihove biološke aktivnosti i mogućnosti šire primjene. Velik se broj hidrolata iz različitih biljnih vrsta koristi u

komercijalne svrhe, bilo kao sastojci kozmetičkih proizvoda, parfema ili u prehrambenoj industriji. Zasigurno je popularnost ovih proizvoda prirode sve veća i pruža vrijedne izvore biološki aktivnih spojeva sa značajnim farmakološkim potencijalom.

6 ZAKLJUČAK

- Hidrolati vrste *T. majus* dobiveni MAD i MHG tehnikama ekstrakcije pokazali su umjerenu do slabu citotoksičnu aktivnost na stanice raka grlića maternice (HeLa), osteosarkoma (U2OS) i raka debelog crijeva (HCT116).
- Hidrolat vrste *T. majus* dobiven MAD tehnikom ekstrakcije pokazao je najveći citotoksični učinak na stanice osteosarkoma s IC₅₀ vrijednošću od 567,93 µg/ml.
- Analizom svih podataka dobivenih eksperimentalnim postupkom nije utvrđena statistički značajna razlika u citotoksičnoj aktivnosti između hidrolata *T. majus* izoliranog MAD i MHG metodama ekstrakcije.

7 LITERATURA

- [1] K. Jakubczyk, K. Janda, K. Watychowicz, J. Łukasiak i J. Wolska, Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds, Rocznik Państw Zakł Hig., 2018, pp. 119-126.
- [2] T. C. Okoye, P. Uzor, C. A. Onyeto i E. K. Okereke, »Toxicological Survey of African Medicinal Plants,« w *Safe African Medicinal Plants for Clinical Studies*, Amsterdam, Elsevier, 2014, pp. 535-555.
- [3] O. B. da Silva, A. Goelzer, F. H. M. dos Santos, T. d. O. Carnevali, M. d. C. Vieira i N. A. H. Zárate, »Increased yield and nutrient content of *Tropaeolum majus* L. with use of chicken manure 1,« w *Revista Ceres* 68, 2021, pp. 379-389.
- [4] R. González-Barrio, V. García-Valverde, M. J. Periago, A. B. Bautista-Ortíz i I. Navarro-González, »Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn,« *International journal of molecular sciences*, svez. 16, pp. 805-22, 2015.
- [5] J. Mlcek, A. Plaskova, T. Jurikova, J. Sochor, M. Baron i S. Ercisli, »Chemical, Nutritional and Sensory Characteristics of Six Ornamental Edible Flowers Species,« *Foods*, svez. 10, 2021.
- [6] E. Pires Jr, F. Di Gioia, Y. Rouphael, I. Ferreira, C. Caleja, L. Barros i S. Petropoulos, »The Compositional Aspects of Edible Flowers as an Emerging Horticultural Product,« *Molecules*, svez. 26, p. 6940, November 2021.
- [7] T. Fukalova-Fukalova, M. Martínez i M. Raigón, »Five undervalued edible species inherent to autumn-winter season: Nutritional composition, bioactive constituents and volatiles profile,« *PeerJ*, svez. 9, p. e12488, November 2021.
- [8] M. Acimovic, V. Tešević, K. Smiljanic, M. Cvetkovic, J. Stankovic, B. Kiprovska i V. Sikora, »Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses,« *Advanced Technologies*, svez. 9, pp. 54-70, December 2020.
- [9] D. Šilha, K. Švarcová, T. Bajer, K. Královec, E. Tesařová, K. Moučková, M. Pejchalová i P. Bajerová, »Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on Arcobacter-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms,« *Molecules*, svez. 25, 2020.
- [10] K. Jakubczyk, A. Tuchowska i K. Janda-Milczarek, »Plant hydrolates – Antioxidant properties, chemical composition and potential applications,« *Biomedicine & Pharmacotherapy*, svez. 142, p. 112033, October 2021.

- [11] M. G. Simpson, Plant Systematics, Elsevier Science, 2010.
- [12] M. Silva, R. M. M. Mussury, M. Vieira, V. Vieira, Z. Pereira i S. Scalon, »Floral biology of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) and its relation with *Astylus variegatus* activity (Germar 1824) (Coleoptera: Melyridae),« *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, svez. 83, pp. 1251-1258, December 2011.
- [13] https://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder>Show_1083.aspx (datum pristupa: 28.07.2023).
- [14] https://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder>Show_1083.aspx (datum pristupa: 28.07.2023).
- [15] <https://www.happybotanist.com/modifications-of-leaves/> (datum pristupa: 28.07.2023)
- [16] POWO (2023), "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 28 July 2023.").
- [17] Nikolić T. ur. (2015 - nadalje): Rasprostranjenost *Tropaeolum majus* L. u Hrvatskoj, Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 28.07.2023).
- [18] L. Silva, D. Correa de Souza, L. Resende, R. Nassur, C. A. R. O. L. I. N. A. SAMARTINI i W. Gonçalves, »Nutritional Evaluation of Non-Conventional Vegetables in Brazil,« *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, svez. 90, April 2018.
- [19] G. A. Garzón i R. E. Wrolstad, »Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*),« *Food Chemistry*, svez. 114, pp. 44-49, 2009.
- [20] M. J. Christenhusz, »*Tropaeolum majus*,« *Curtis's Botanical Magazine*, svez. 29, pp. 331-340, 2012.
- [21] A. Gasparotto Junior, F. Gasparotto, M. Boffo, E. Lourenço, M. É. Stefanello, M. Salvador, J. Silva-Santos, M. Marques i C. Kassuya, »Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin-An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L.,« *Journal of ethnopharmacology*, svez. 134, pp. 210-5, December 2010.
- [22] A. Gasparotto Junior, F. M. Gasparotto, E. L. B. Lourenço, S. Crestani, M. E. A. Stefanello, M. J. Salvador, J. E. da Silva-Santos, M. C. A. Marques i C. A. L. Kassuya, »Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme,« *Journal of Ethnopharmacology*, svez. 134, pp. 363-372, 2011.
- [23] A. Bazylko, S. Granica, A. Filipek, J. Piwowarski, J. Stefańska, E. Osińska i A. Kiss, »Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L.,« *Industrial Crops and Products*, svez. 50, pp. 88-94, October 2013.

- [24] »Toxicidade Aguda e Atividade Antibacteriana,« *Acta Farm. Bonaerense* 22, pp. 159-162, 2003.
- [25] E. Lourenço, J. Müller, A. Boareto, C. Gomes, A. Lourenço, R. Palozi, T. Prando, A. Gasparotto Junior i P. Dalsenter, »Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Derived from *Tropaeolum majus* L. in Rat Preimplantation Embryos: Evidence for the Dehydroepiandrosterone and Estradiol Role,« *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, svez. 2014, p. 209207, March 2014.
- [26] U. Wittstock i B. A. Halkier, »Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the Conversion of L-Phenylalanine to Phenylacetaldoxime in the Biosynthesis of Benzylglucosinolate*,« *Journal of Biological Chemistry*, svez. 275, pp. 14659-14666, 2000.
- [27] J. Lykkesfeldt i B. Møller, »Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. (Isothiocyanates as Potent Enzyme Inhibitors),« *Plant physiology*, svez. 102, pp. 609-613, July 1993.
- [28] W. M. F. Jongen, »Glucosinolates in Brassica: Occurrence and significance as cancer-modulating agents,« *Proceedings of the Nutrition Society*, svez. 55, p. 433–446, 1996.
- [29] J. Brown i M. J. Morra, »Glucosinolate-Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pests: 2000-2002,« July 2005.
- [30] I. Vrca, D. Ramić, Ž. Fredotović, S. Smole Možina, I. Blažević i T. Bilušić, »Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oil and Extract from the Seeds of *Tropaeolum majus* L. var. *altum*,« *Food Technology and Biotechnology*, svez. 60, October 2022.
- [31] National Center for Biotechnology Information, »PubChem Compound Summary for CID 123131578, Benzylglucosinolate aglycone,« [Mrežno]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzylglucosinolate-aglycone>. [Pokušaj pristupa 11 8 2023].
- [32] National Center for Biotechnology Information, »PubChem Compound Summary for CID 21600402, Benzyl glucosinolate,« [Mrežno]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzyl-glucosinolate>. [Pokušaj pristupa 11 8 2023].
- [33] National Center for Biotechnology Information, »PubChem Compound Summary for CID 2346, Benzyl Isothiocyanate.,« [Mrežno]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzyl-Isothiocyanate>. [Pokušaj pristupa 11 8 2023].
- [34] National Center for Biotechnology Information, »PubChem Compound Summary for CID 8794, Phenylacetonitrile,« [Mrežno]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylacetonitrile>. [Pokušaj pristupa 11. 8. 2023].

- [35] A. Arumugam i A. F. Abdull Razis, »Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates: a Review,« *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, svez. 19, pp. 1439-1448, June 2018.
- [36] P. Soundararajan i J. S. Kim, »Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers,« *Molecules*, svez. 23, 2018.
- [37] H. J. Cho, D. Y. Lim, G. T. Kwon, J. H. Kim, Z. Huang, H. Song, Y. S. Oh, Y. H. Kang, K. W. Lee, Z. Dong i J. H. Park, »Benzyl Isothiocyanate Inhibits Prostate Cancer Development in the Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate (TRAMP) Model, Which Is Associated with the Induction of Cell Cycle G1 Arrest,« *Int J Mol Sci*, svez. 17, p. 264, February 2016.
- [38] R. Zhang, S. Loganathan, I. Humphreys i S. K. Srivastava, »Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells,« *J Nutr*, svez. 136, p. 2728–2734, November 2006.
- [39] M. Wink, »Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction?,« *Front Physiol*, svez. 9, p. 364, 2018.
- [40] H. P. Makkar, P. Siddhuraju i K. Becker, »Plant secondary metabolites,« *Methods Mol Biol*, svez. 393, p. 1–122, 2007.
- [41] A. Nn, »A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation,« *Medicinal and Aromatic plants*, svez. 4, pp. 1-6, 2015.
- [42] M. Blekić, A. Režek Jambrak i F. Chemat, »Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva,« *Croatian Journal of Food Science and Technology*, svez. 3, September 2004.
- [43] E. Destandau, T. Michel i C. Elfakir, »Microwave-Assisted Extraction,« 2013, pp. 113-156.
- [44] D. A. J. Starmans i H. H. Nijhuis, »Extraction of secondary metabolites from plant material: A review,« *Trends in Food Science & Technology*, svez. 7, pp. 191-197, 1996.
- [45] M. Gao, W. Huang, M. RoyChowdhury i C. Liu, »Microwave-assisted extraction of scutellarin from Erigeron breviscapus Hand-Mazz and its determination by high-performance liquid chromatography,« *Anal Chim Acta*, svez. 591, p. 161–166, May 2007.
- [46] N. Tigrine-Kordjani, B. Y. Meklati i F. Chemat, »Microwave ‘dry’ distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils,« *International Journal of Aromatherapy*, svez. 16, pp. 141-147, 2006.
- [47] M. A. Vian, X. Fernandez, F. Visinoni i F. Chemat, »Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils,« *J Chromatogr A*, svez. 1190, p. 14–17, May 2008.
- [48] R. Todd i K. Munger, *Oncogenes*, eLS, 2006.

- [49] S. M. Picksley i D. P. Lane, »p53 and Rb: their cellular roles,« *Curr Opin Cell Biol*, svez. 6, p. 853–858, December 1994.
- [50] G. M. Cooper i R. E. Hausman, Stanica, *Molekularni pristup*, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, pp. 725-730.
- [51] J. E. Koblinski, M. Ahram i B. F. Sloane, »Unraveling the role of proteases in cancer,« *Clin Chim Acta*, svez. 291, p. 113–135, February 2000.
- [52] H. Hasle, I. H. Clemmensen i M. Mikkelsen, »Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome,« *Lancet*, svez. 355, p. 165–169, January 2000.
- [53] R. Wong, »Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment,« *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, svez. 30, p. 87, September 2011.
- [54] https://de.freepik.com/vektoren-premium/proliferation-von-gesunden-zellen-und-krebszellen-vergleichsdarstellung-der-normalen-zellproliferation-und-der-krebszellproliferation-im-koerper_8227026.htm (datum pristupa: 02.08.2023.)
- [55] J. R. Masters, »Human cancer cell lines: fact and fantasy,« *Nat Rev Mol Cell Biol*, svez. 1, p. 233–236, December 2000.
- [56] R. M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J. P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W. L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar i J. W. Gray, »A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes,« *Cancer Cell*, svez. 10, p. 515–527, December 2006.
- [57] H. G. Drexler, A. Y. Matsuo i R. A. MacLeod, »Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research,« *Leuk Res*, svez. 24, p. 881–911, November 2000.
- [58] A. M. Helmenstine, »What HeLa Cells Are and Why They Are Important,« 17 2 2021. [Mrežno]. Available: <https://www.thoughtco.com/hela-cells-4160415>. [Pokušaj pristupa 2023].
- [59] R. Skloot, The immortal life of Henrietta Lacks, Picador.
- [60] E. Saksela i J. Ponten, »Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours,« *Int J Cancer*, svez. 2, p. 434–447, September 1967.
- [61] ATCC, »HCT 116,« [Mrežno]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-247.aspx>. [Pokušaj pristupa 20. 8. 2023.].
- [62] B. N. Waghela, F. U. Vaidya i C. Pathak, »Upregulation of NOX-2 and Nrf-2 Promotes 5-Fluorouracil Resistance of Human Colon Carcinoma (HCT-116) Cells,« *Biochemistry (Mosc)*, svez. 86, p. 262–274, March 2021.

- [63] E. Ustun Karatop, C. Eren Cimenci i A. Aksu, »Colorimetric Cytotoxicity Assays,« 2022.
- [64] W. Lee, G. Song i H. Bae, »Glucotropaeolin Promotes Apoptosis by Calcium Dysregulation and Attenuates Cell Migration with FOXM1 Suppression in Pancreatic Cancer Cells,« *Antioxidants*, svez. 12, 2023.
- [65] A. P. Lawson, M. J. C. Long, R. T. Coffey, Y. Qian, E. Weerapana, F. El Oualid i L. Hedstrom, »Naturally Occurring Isothiocyanates Exert Anticancer Effects by Inhibiting Deubiquitinating Enzymes,« *Cancer Res*, svez. 75, p. 5130–5142, December 2015.
- [66] K. W. W. Han, W. W. Po, U. D. Sohn i H. J. Kim, »Benzyl Isothiocyanate Induces Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Initiated Mitochondrial Dysfunction and DR4 and DR5 Death Receptor Activation in Gastric Adenocarcinoma Cells,« *Biomolecules*, svez. 9, December 2019.
- [67] A. M. Pintão, M. S. Pais, H. Coley, L. R. Kelland i I. R. Judson, »In vitro and in vivo antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*,« *Planta Med*, svez. 61, p. 233–236, June 1995.
- [68] A. I. Owis, N. H. Sherif, A. A. Hassan, E. B. El-Naggar, I. H. El-Khashab i E. S. El-Ghaly, »L. and low dose gamma radiation suppress liver carcinoma development via EGFR-HER2 signaling pathway,« *Nat Prod Res*, svez. 37, p. 1030–1035, March 2023.
- [69] C. R. Espinoza Silva, »Evaluacion ' invitro de la citotoxicidad de extractos fenolicos ' de p'etalos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus* L en línneas celulares cancerígenas de mama,« Universidad Peruana Los Andes, 2019.
- [70] E. J. Kim, J. E. Hong, S. J. Eom, J. Y. Lee i J. H. Park, »Oral administration of benzyl-isothiocyanate inhibits solid tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice,« *Breast Cancer Res Treat*, svez. 130, p. 61–71, November 2011.
- [71] K. C. Lai, A. C. Huang, S. C. Hsu, C. L. Kuo, J. S. Yang, S. H. Wu i J. G. Chung, »Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human colon cancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway,« *J Agric Food Chem*, svez. 58, p. 2935–2942, March 2010.
- [72] D. Xiao, V. Vogel i S. V. Singh, »Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak,« *Mol Cancer Ther*, svez. 5, p. 2931–2945, November 2006.
- [73] C. Gomes, E. L. o, B. Liuti, A. O. Duque, F. Nihi, A. C. o, T. C. Mendes, A. Gasparotto Junior i P. R. Dalsenter, »Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats,« *J Ethnopharmacol*, svez. 142, p. 481–487, July 2012.
- [74] S. Uppal, P. Sharma, R. Kumar, K. Kaur, A. Bhatia i S. K. Mehta, »Effect of benzyl isothiocyanate encapsulated biocompatible nanoemulsion prepared via ultrasonication on

microbial strains and breast cancer cell line MDA MB 231, «*Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, svez. 596, p. 124732, 2020.

8 POPIS SLIKA

Slika 1. Dragoljub (<i>Tropaeolum majus</i> L.) [13]	5
Slika 2. Listovi biljke dragoljub (<i>Tropaeolum majus</i> L.) [14].....	5
Slika 3. Cvijet biljke dragoljub (<i>Tropaeolum majus</i> L.) [15]	6
Slika 4 Geografska rasprostranjenost vrste <i>Tropaeolum majus</i> u svijetu [16].	7
Slika 5. Geografska rasprostranjenost vrste <i>Tropaeolum majus</i> L. u Hrvatskoj [17].	7
Slika 6. Hidroliza glukotropeolina. Reakciju katalizira enzim mirozinaza [31-34].	9
Slika 7. Nekontrolirani rast i dioba stanica raka u usporedbi s normalnim stanicama [54]. ...	14
Slika 8. Reakcija redukcije MTS-a u formazan [63].	18
Slika 9. Kolorimetrijska metoda za određivanje citotoksičnosti- Nakon nasijavanja stаница na mikrotitarsku ploču dodaje se MTS reagens, slijedi inkubacija i mjerjenje apsorbancije [57].	19
Slika 10. Brojač stаница (vlastita fotografija)	20
Slika 11. Mikrotitarska pločica nakon nanošenja MTS reagensa i inkubacije. Do promjene boje iz žute u ljubičastu u jažicama s dodanim MTS reagensom dolazi kod stаница koje su metabolički aktivne (vlastita fotografija).	20
Slika 12. Citotoksična aktivnost hidrolata biljke dragoljub izoliranog MHG i MAD tehnikama ekstrakcije. Prikazane IC ₅₀ vrijednosti su srednje vrijednosti koncentracija dobivenih iz triju neovisno provedenih eksperimenata s pripadajućom standardnom devijacijom (■).	22

9 POPIS TABLICA

Tablica 1 IC ₅₀ ± SD vrijednosti hidrolata izoliranog MHG metodom ekstrakcije za tri testirane stanične linije.	21
Tablica 2 IC ₅₀ ± SD vrijednosti hidrolata izoliranog MAD metodom ekstrakcije za tri testirane stanične linije.	21

METODIČKI DIO

Mentor:
Dr.sc. Mirko Ruščić, izv. prof.

Ime i prezime učitelja Loriana Šestić	Predmet Biologija	Razred 3.
Nastavna tema <i>Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikuluma (GIK).</i>	Datum	
Poremećaji u kontroli diobe stanica i nastanak tumora		Rujan 2023.

Cilj nastavne teme <i>Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.</i> Uočiti važnost preventivnih pregleda kako bi na vrijeme otkrili postojanje tumora.	
Ključni pojmovi <i>Pojmovi koje učenik treba usvojiti uz poučavanje.</i>	Temeljni koncepti <i>Ideje koje učenici trebaju usvojiti na razini razumijevanja i/ ili primjene (uz pomoć konceptualnog okvira poučavanja biologije).</i>
tumori, nekontrolirana dioba, okolišni i unutarnji čimbenici, oštećenje gena-mutacija, dobroćudni (benigni) tumori, metastaze, zloćudni (maligni) tumori, preventivni pregled,	Tumori nastaju kada dođe do neprestane i nekontrolirane diobe stanica. Do poremećaja u diobi stanica može doći zbog okolišnih čimbenika poput UV zračenja, duhanskog dima ali i zbog unutarnjih čimbenika koji dovode do oštećenja gena to jest do mutacije. Razlikujemo dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne) tumore. Glavna razlika je što je za maligne tumore karakteristično nakupljanje mutacija i širenje u druge dijelove organa krvlju i limfom što nazivamo metastaze. Najvažnije za uspješno liječenje tumora je rano otkrivanje što se može postići odlaskom na preventivne preglede kako bi se utvrdile rane maligne promjene u organizmu. Danas postoje i cijepiva pomoću kojih se možemo braniti od virusnih uzročnika tumora. Liječenje tumora odvija se kirurški, kemoterapijom i radioterapijom, a u novije vrijeme i pametnim lijekovima.
Kontekst poučavanja koncepta <i>Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).</i>	
Pomoću animacije učenici uočavaju razliku u diobi normalnih i tumorskih stanica. Pomoću slike učenici uočavaju razliku između dobroćudnih i zloćudnih tumora. Pomoću QR koda učenici istražuju o pametnim lijekovima i njihovoj primjeni u liječenju tumora. Pretraživanjem mrežnih stranica uočavaju važnost preventivnih pregleda i provođenje preventivnih programa.	

Odgojno-obrazovni ishodi <i>Odabrat i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i>	
BIO SŠ B.3.2.	Analizira posljedice narušavanja homeostaze.
BIO SŠ B.3.3.	Analizira životne cikluse stanica povezujući ih s tijekom života organizma.
BIO SŠ D.3.1.	Primjenjuje osnovna načela i metodologiju znanstvenoga istraživanja kritički prosuđujući rezultate i analizira posljedice razvoja znanstvene misli tijekom povijesti.

Primjeri:

OŠ PRI A.5.1. Učenik objašnjava temeljnu gradu prirode
 BIO OŠ B.8.4. Povezuje različite načine razmnožavanja organizama s nasljedivanjem roditeljskih osobina i evolucijom.
 BIO SŠ C.3.2. Analizira principe iskorištavanja energije na razini stanice.

Očekivanja međupredmetnih tema *Odabrat i preslikati iz Kurikulum u oznaku (šifru) ishoda.*

odr C.5.2	Predlaže načine unapređenja osobne i opće dobrobiti
osr A.5.1.	Razvija sliku o sebi.
osr A.5.3.	Razvija svoje potencijale.
osr B.5.2.	Suradnički uči i radi u timu
pod B.5.2.	Planira i upravlja aktivnostima.
zdr A.5.2.	Opisuje i primjenjuje zdrave stilove života koji podrazumijevaju pravilnu prehranu i odgovarajuću tjelesnu aktivnost.
zdr C.5.3.A	Povezuje važnost sistematskih i preventivnih pregleda s očuvanjem zdravlja.
zdr A.5.2.	Opisuje i primjenjuje zdrave stilove života koji podrazumijevaju pravilnu prehranu i odgovarajuću tjelesnu aktivnost.
goo C.5.3.	Promiče kvalitetu života u zajednici.

Br. Ishoda u razradi(RI/IA)	Razrada ishoda <i>Koristiti prema Kurikulumu.</i> Ishodi aktivnosti <i>Prema potrebi dodati i specifično razraditi ishod iz razrade ishoda.</i>	Zadatak/ primjer pitanja za provjeru <i>Pitanja trebaju polaziti od razine propisane Kurikulumom (minimum), ali treba planirati i pitanja više razine usvojenosti.</i>	KR	PU
BIO SŠ B.3.2.	<ul style="list-style-type: none"> • Objasnjava razvoj bolesti i imunosni odgovor organizma ukazujući na važnost prevencije i liječenja. • Analizira utjecaj okolišnih čimbenika i patogena na razvoj bolesti. 	<p>Kako i zašto dolazi do nastanka tumora? Kako možemo utjecati na rano otkrivanje i liječenje tumora? Istraži koje cjepivo može prevenirati tumorsku bolest. Istraži koji je najučestaliji oblik tumora u Hrvatskoj.</p> <p>Kako okolišni čimbenici utječu na nastanak tumora? Istraži kojim su tumorima, osim tumora pluća, skloniji pušači.</p>	I. I. III. III.	+ + +/- +

	te da su prirodne pojave objašnjive i predvidljive, ali i da su znanstvena objašnjenja, teorije i modeli podložni promjenama i nadopunama.		
--	--	--	--

Kognitivna razina (KR): I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema

Procjena uspješnosti učenja (PU): – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika

Br. ishoda u razradi (RI): dodati prema odgovarajućem broju iz dokumenta Kurikulum Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda(npr. OŠ PRI A.5.1.2 Uočava na temelju praktičnih radova da su tvari gradene od sitnih čestica; BIO OŠ B.8.4.9. Povezuje mitozu s razmnožavanjem jednostaničnih te s rastom i obnavljanjem višestaničnih organizama; BIO SŠ C.3.2.2. Analizira prijenos tvari kroz membranu/membranom s aspekta korištenja energije)

(IA): broj ishoda aktivnosti generirati prema nadređenom broju (RI) ishoda u razradi (npr. OŠ PRI A.5.1.2.1.Zaključuje na temelju praktičnog rada da je u morskoj vodi otopljena sol.)

Tijek

Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata) - Kratki tablični pregled strukture nastavnog sata s iskazanim dominantnim aktivnostima i sociološkim oblicima rada te predviđenim trajanjem za svaki strukturalni element sata (po potrebi dodati retke tablice). Uz svaku aktivnost obavezno navesti oznaku ishoda u razradi (prema Kurikulum Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda) koji se njome ostvaruje.

Tip sata	Obrada novog nastavnog sadržaja	Trajanje	Jedan sat
BR.NASTAVNOG SATA	STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	BR.ISHODA IMPT OČEKIVANJA	KORISTITI METODA OBLIK RADA TRAJANJE (min)
Početni dio	<p style="text-align: center;">DOMINANTNA AKTIVNOST</p> <p>Pozdravljam učenike i predstavljam im se. Učenicima pokazujem sliku na kliznici koja opisuje promjene u fizičkom izgledu tijekom života. Koja je stanična dioba odgovorna za vaš rast? (mitoza, R1)</p> <p>Mitoza nije savršena i mogu se dogoditi neke greške u koracima. Do čega mogu dovesti te greške? (nasljedne bolesti, TUMORI, R1) Upravo ćemo danas pričati o poremećajima u kontroli diobe stanica i nastanku tumora. Najavljujem cilj sata, zapisujem naslov na ploči NASTANAK TUMORA te dijelim učenicima radne listove koji će biti korišteni na ovom satu.</p>	BIO SŠ B.3. 2.	PP, P
Središnji dio	Učenicima pokazujem sliku diobe normalnih i tumorskih stanica i tražim od njih da mi svojim riječima objasne karakteristike tumorskih stanica. (Neprestana i nekontrolirana dioba, R1) Zapis na ploči. Pokazujem učenicima i kratki animirani videozapis popraćen mojim komentiranjem kako bi	BIO SŠ B.3. 2.	PP, A

	<p>što bolje shvatili tu razliku. Zbog čega uopće dolazi do poremećaja u diobi stanica? (pušenje, zračenje, pesticidi, genetika, R1) Čimbenike možemo podijeliti na vanjske i unutarnje, a ti čimbenici dovode do oštećenja gena. Koji je naziv za oštećenje gena? (mutacija,R1) Zapis na ploči. Čuli ste sigurno da postoje opasniji i manje opasni tumori. Kako ih nazivamo? (benigni i maligni, R1) Pokazujem učenicima sliku koja prikazuje razliku između benignih i malignih tumora i tražim od njih da mi kažu glavnu razliku. (maligni tumori imaju sposobnost širenja po tijelu, R2) Kako nazivamo te tumorske stanice koje su se proširile po tijelu od ishodišnog tumora? (Metastaze, R1) Zapis na ploči. Učenicima pokazujem sliku normalnog tkiva debelog crijeva i tkiva zahvaćenog tumorskom bolesti. Učenici opisuju razlike u izgledu. Na koji način se provodi liječenje tumora? (kemoterapija, radioterapija, kirurški zahvati, R1) Znate li možda neke nuspojave koje se javljaju tijekom i nakon provođenja liječenja? (povraćanje, gubitak kose, pad imuniteta... R3) Zapis na ploči. Pokazujem učenicima sliku na kliznici i trebaju mi odgonetnuti što slika ilustrira. (pametni lijek). Učenike upućujem na radni list i skeniranje QR koda. Zadatak im je napisati sve što su istražili pametnim lijekovima (R3). Prozivam nekoliko učenika da podijele s razredom svoja opažanja i pokrećem razgovor. Jeste gledajući televiziju ikad naišli na reklame o preventivnim programima? Kako uopće možemo prevenirati tumore? (cjepivo, nepušenje, zdrav život, odlazak na preventivne preglede, R1) Upućujem učenike na rješavanje petog i šestog zadatka u radnom listu koristeći mrežne stranice. Moraju istražiti za koji tumor postoji cjepivo (R3) i istražiti koji preventivni programi za tumore postoje u Hrvatskoj (R3). Nakon toga slijedi analiza učeničkih odgovora i kratka diskusija.</p>	BIO SŠ B.3. 3.	BIO SŠ D.3. 1.	RL M O	T ,	RL T ,	
Završni dio	U završnom dijelu sata učenici rješavaju ostatak zadataka iz radnog lista. Nakon toga zajednički provjeravamo ispravnost učeničkih odgovora i razgovaramo o potencijalnim pitanjima koje učenici imaju na ovu temu.			RL R	T R I	1 0 m i	

										n
	<p>Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)</p> <p>Koristiti u izvedbi: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodnji materijal, E – pokus/ekperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, VL – video lekcija, APP – digitalni alat, P/SU – platforma/sustav učenja na daljinu, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU –igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi)</p> <p>Metode: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje</p> <p>Oblici rada: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno</p>									

Materijalna priprema Popis nastavnog materijala, izvora znanja, sredstva i pomagala, odnosno svega što je potrebno pripremiti za uspješno odvijanje nastave prema postavljenom cilju i zamišljenom planu. Treba biti uključena izvora stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.

Nastavna sredstva: Powerpoint prezentacija, radni list, živa riječ nastavnika,

Nastavna pomagala: ploča, kreda, računalo, LCD projektor

Plan učeničkog zapisa Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.

NASTANAK TUMORA

- neprestana i nekontrolirana dioba stanica
- okolišni i unutarnji čimbenici —→ oštećenje gena (mutacija)
- dobroćudni (benigni) tumori
- zloćudni (maligni) tumori: metastaze
- liječenje tumora: kirurški
 - kemoterapija
 - radioterapija
 - pametni lijekovi

Vrednovanje Različiti pristupi vrednovanju.

Vrednovanje za učenje	Vrednovanje kao učenje	Vrednovanje naučenog
Kroz pitanja i metodu razgovora provjeravam razumijevanje učenika o nastavnoj temi.	Na kraju nastavnog sata tražim povratnu informaciju od učenika o mogućim nejasnoćama i potrebi dodatnih pojašnjenja.	U završnom dijelu sata učenici rješavaju list za ponavljanje sa problemskim zadatcima. Učenike prozivam i provjeravam točnost njihovih odgovora.

Prilagodba za učenike s teškoćama u učenju Nавести način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.

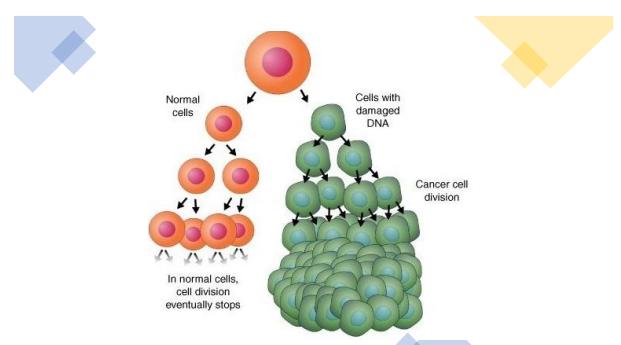
Nema učenika s teškoćama u učenju.

Prilagodba za darovite učenike *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema darovitih učenika.

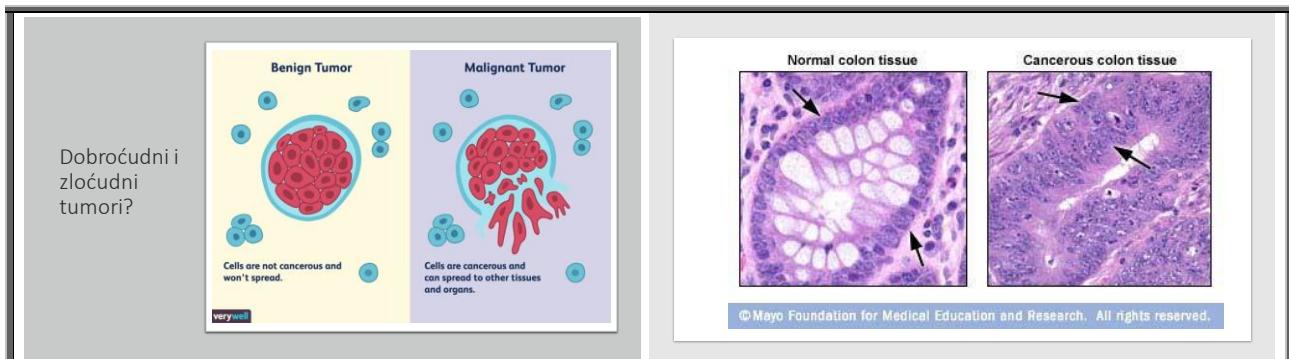
Prilozi *Popis materijala koji će se koristiti u nastavi (radni listovi, ispis PP prezentacije i ostali materijal).*

PRILOG 1: PP prezentacija



OKOLIŠNI I UNUTARNJI ČIMBENICI

❖ oštećenje gena- MUTACIJA



Liječenje tumora

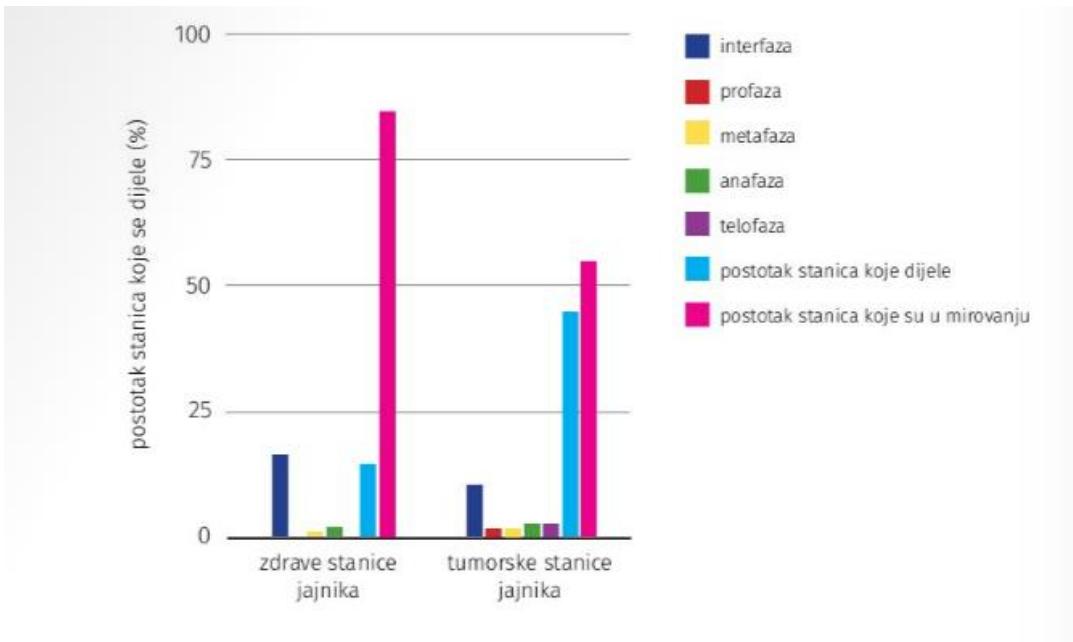


PRILOG 2: Radni list

RADNI LIST

- Objasni razlike između benignih i malignih tumora.

2. Graf prikazuje postotak diobe stanica jajnika tijekom staničnog ciklusa u zdrave žene i žene koja ima tumor jajnika.



- a) Koje razlike uočavate između zdravih i tumorskih stanica jajnika?
-
- b) Tijekom proučavanja diobe stanica u uzorcima tkiva znanstvenici često izračunavaju indeks mitoze (omjer broja stanica koje su u diobi naspram ukupnog broja stanica u uzorku). Koja bi vrsta tkiva imala viši indeks mitoze; normalno ili tumorsko tkivo?
-
-
- c) Navedi neke čimbenike koji mogu dovesti do poremećaja u kontroli dioba stanica.
-
-

3. Liječenje tumora provodi se kirurški, kemoterapijom i radioterapijom. Istraži koje se sve nuspojave javljaju u liječenju tumora.
-
-
-

4. Skeniranjem QR koda istražite što su pametni lijekovi.



5. Koje cjepivo može prevenirati tumorsku bolest? Potraži na mrežnim stranicama kolika je procijepljenost tim cjepivom u svijetu, a koliko u Hrvatskoj.

Istraži koja je država cijepljenjem uspjela smanjiti pojavu tog tumora u svojoj populaciji.

6. Istraži na koji se način i koji se preventivni programi za tumorske bolesti provode u Hrvatskoj.

Literatura Izvori za učenike i izvori koje je učitelj koristio za pripremu poučavanja.

Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M.(2020.) Biologija 3, udžbenik iz biologije za 3. razred gimnazije. Profil klett, Zagreb

Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M. (2020.) Biologija 3, radna bilježnica iz biologije za 3. razred gimnazije. Profil klett, Zagreb