

# Ispitivanje citotoksičnog djelovanja koloidnog srebra proizvedenog u medu na stanice karcinoma grlića maternice

---

**Mađor, Dora**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:531580>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Dora Mador**

**ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA KOLOIDNOG SREBRA  
PROIZVEDENOG U MEDU NA STANICE KARCINOMA GRLIĆA MATERNICE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor: Prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2024.**

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:** Medicinska biokemija  
**Tema rada** odobrena je na 84. sjednici Vijeća studija Farmacije, 11. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 2. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

## ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA KOLOIDNOG SREBRA PROIZVEDENOG U MEDU NA STANICE KARCINOMA GRLIĆA MATERNICE

Dora Mađor, broj indeksa 201915

**Naslov rada:** Ispitivanje citotoksičnog djelovanja koloidnog srebra proizvedenog u medu na stanice karcinoma grlića maternice

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak koloidnog srebra, dobivenog u medu, na stanice karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa).

**Materijali i metode:** Citotoksičnost je ispitivana MTT metodom, kojom se procjenjuje udio metabolički aktivnih stanica nakon tretmana koloidnim srebrom dobivenim iz meda. Uzorci su pripremljeni u različitim koncentracijama: 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. Učinci tretmana procjenjivani su nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost uzoraka određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 570 nm.

**Rezultati:** Grafički su prikazani rezultati koji prikazuju odnos između postotka metabolički aktivnih stanica i vremena inkubacije te koncentracije uzoraka. Istraživanje je potvrdilo da koloidno srebro proizvedeno u medu ima značajan citotoksični učinak na stanice karcinoma grlića maternice, posebno na staničnu liniju HeLa, dok je učinak na SiHa stanice bio nešto slabiji. Kod HeLa stanica, najizraženiji citotoksični učinak zabilježen je nakon 72 sata tretmana s 20%-tnom otopinom koloidnog srebra, pri čemu daljnje povećanje koncentracije nije značajno smanjilo broj metabolički aktivnih stanica. S druge strane, kod SiHa stanica najveći pad broja metabolički aktivnih stanica zabilježen je nakon 72 sata primjene 50%-tne otopine. Vrijednosti IC<sub>50</sub> mogle su se odrediti za vremenske intervale od 24, 48 i 72 sata.

**Zaključci:** *In vitro* izlaganje stanica karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) koloidnom srebrom rezultira smanjenjem njihove održivosti. Citotoksičnost je ovisila o koncentraciji koloidnog srebra i duljini inkubacije, pri čemu su najjači učinci zabilježeni nakon 72 sata tretmana i primjene većih koncentracija. Potencijal citotoksičnog djelovanja je potvrđen, no potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdila učinkovitost.

**Ključne riječi:** karcinom grlića maternice, MTT metoda, citotoksičnost, koloidno srebro

**Rad sadrži:** 58 stranica, 15 slika, 3 tablice, 50 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Dario Leskur – predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Jasminka Omerović – član
3. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić – član – mentor

**Datum obrane:** 23.listopada 2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnicama 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 Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Course title:** Medicinal biochemistry

**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.84 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 11 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 2

**Mentor:** Professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD

**Technical assistance:** Sandra Marijan, PhD, mag. for. chem. mol. biol.

### EXAMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF COLLOIDAL SILVER PRODUCED USING HONEY ON CERVICAL CANCER CELLS

Dora Mađor, index N<sup>o</sup> 201915

**Diploma theses title:** Examination of the Cytotoxic Effect of Colloidal Silver Produced Using Honey on Cervical Cancer Cells

**Objectives:** The aim of this study was to examine the cytotoxic effect of colloidal silver, produced using honey, on cervical cancer cells (HeLa and SiHa).

**Materials and methods:** Cytotoxicity was assessed using the MTT assay, which evaluates the proportion of metabolically active cells after treatment with colloidal silver derived from honey. Samples were prepared in different concentrations: 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. The effects of treatment were evaluated after 4, 24, 48, and 72 hours. The effectiveness of the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at a wavelength of 570 nm.

**Results:** The results are presented graphically, showing the relationship between the percentage of metabolically active cells and the incubation time and the concentration. The study confirmed that colloidal silver produced using honey exhibits significant cytotoxic effects on cervical cancer cells, especially the HeLa cell line, while the effect on SiHa cells was somewhat weaker. In HeLa cells, the most pronounced cytotoxic effect was observed after 72 hours of treatment with a 20% colloidal silver solution, where further increases in concentration did not significantly reduce the number of metabolically active cells. On the other hand, in SiHa cells, the greatest decrease in the number of metabolically active cells was observed after 72 hours of treatment with a 50% solution. IC50 values were determined for the time intervals of 24, 48, and 72 hours.

**Conclusions:** *In vitro* exposure of cervical cancer cells (HeLa and SiHa) to colloidal silver resulted in a reduction in their viability. Cytotoxicity depended on the concentration of colloidal silver and the incubation time, with the strongest effects observed after 72 hours of treatment and at higher concentrations. The potential cytotoxic effect was confirmed, but further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to verify its effectiveness.

**Key words:** cervical cancer, MTT assay, cytotoxicity, colloidal silver

**Thesis contains:** 58 pages, 15 figure, 3 tables, 50 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Asst. prof., Dario Leskur, PhD – chair person
2. Asst. prof., Jasminka Omerović, PhD - member
3. Professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD – member - supervisor

**Defence date:** October 23rd, 2024

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

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Vedrani Čikeš Čulić, na neizmjernom znanju, savjetima i strpljenju koji su mi pomogli da ovaj rad privedem kraju.*

*Posebnu zahvalnost dugujem i svojoj obitelji na beskrajnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.*

*Na kraju, jedno veliko hvala mojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene kroz ovih pet godina i učinili ih nezaboravnima.*

# SADRŽAJ:

1. UVOD .....	8
1.1. Rak .....	9
1.2. Onkogeni .....	11
1.3. Tumor supresorski geni .....	15
1.4. Rak grlića maternice.....	17
1.5. Terapija raka grlića maternice .....	20
1.6. Epidemiologija raka grlića maternice u svijetu .....	22
1.7. Epidemiologija raka grlića maternice u Hrvatskoj.....	23
1.8. Srebro .....	24
1.9. Med.....	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	27
2.1. Cilj istraživanja .....	28
2.2. Hipoteza .....	28
3. MATERIJALI I METODE .....	29
3.1. Stanične linije.....	30
3.1.1. HeLa .....	30
3.2.2. SiHa.....	32
3.2. Zelena sinteza koloidnog srebra .....	34
3.3. Postupak .....	34
3.5. Statistička analiza .....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1. Stanična linija HeLa .....	40
4.2. Stanična linija SiHa .....	41
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČAK .....	46
7. LITERATURA.....	48
8. SAŽETAK.....	53
9. SUMMARY .....	55
10. ŽIVOTOPIS .....	57

## POPIS KRATICA:

ABL – protoonkogen koji kodira protein tirozin-kinazu, a kojeg u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji aktivira kromosomskom translokacijom

BRCA 1, BRCA2 – (engl. *BReast CAncer gene*); geni čije su mutacije odgovorne za nasljednu sklonost za rak dojke

C-MYC – protoonkogen koji kodira transkripcijski čimbenik i koji se često aktivira kromosomskim translokacijama ili umnažanjem gena u ljudskim tumorima

DNA – (engl. *deoxyribonucleic acid*); deoksiribonukleinska kiselina

EGFR – (engl. *epidermal growth factor receptor*); receptor za epidermalni čimbenik rasta

ERK – (engl. *extracellular signal-regulated kinases*); kinaza regulirana izvanstaničnim signalom

MAP-kinaza – (engl. *mitogen-activated protein kinase*); mitogenom aktivirana protein kinaza

MEK – (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase enzyme*); enzim koji fosforilira protein kinazu aktiviranu mitogenima

HPV – humani papiloma virus

mTOR – (engl. *the mammalian target of rapamycin*); meta rapamicina kod sisavaca

P53 – gen za protein p53

p53 – tumor supresorski protein

Raf – (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma* ); serin/treonin-kinaza

Ras – (engl. *rat sarcoma*; protoonkogen); nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma

RB – (engl. *retinoblastoma protein*); transkripcijski regulacijski protein kojega kodira gen supresor tumora

VEGF – (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*); vaskularni endotelni čimbenik rasta

RSV- Rousov sarkomski virus - prvi opisani onkovirus, izoliran iz pilećeg sarkoma

## **1. UVOD**



## 1.1. Rak

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema etiologiji, biologiji i kliničkoj slici, a posljedično i po načinu liječenja. Zajedničko svim vrstama raka jest da nastaju od zdravih stanica organizma procesom zloćudne pretvorbe. Zbog određenih promjena, stanice gube sposobnost adekvatnog odgovora na signale koji kontroliraju njihovo ponašanje i usklađuju ga s potrebama organizma. To rezultira nekontroliranom diobom zloćudno preobraženih stanica, koja se šire u zdrava tkiva i organe, a naposljetku i cijelom tijelu. Dokazi upućuju na to da rak ima monoklonalno podrijetlo, što znači da se razvija iz zloćudne transformacije samo jedne stanice. Promjene koje uzrokuju ovu pretvorbu stanica uglavnom su genske mutacije zbog čega se rak može smatrati genskom bolešću (1).

Tumor je pojam za nenormalnu proliferaciju stanica, koja može biti dobroćudna ili zloćudna. Dobroćudni tumori, poput kožnih bradavica, ostaju ograničeni na mjesto nastanka i ne šire se. Zloćudni tumori, s druge strane, mogu napadati susjedna tkiva i širiti se po tijelu putem krvi ili limfe (metastaze) (2). Karakteristike zloćudnih tumora uključuju izbjegavanje apoptoze, konstantnu proliferaciju, neoangiogenezu, kolonizaciju udaljenih organa, izbjegavanje imunološkog odgovora i promjene u staničnom metabolizmu (3). Pojam "rak" odnosi se isključivo na zloćudne tumore koji, zbog metastaza, ne mogu biti izliječeni lokalnim metodama, dok se dobroćudni tumori mogu kirurški ukloniti. Tumori se klasificiraju prema vrsti stanica iz kojih su nastali i većina ih pripada jednoj od tri skupine: karcinomi, sarkomi i leukemije ili limfomi. Karcinomi, koji čine 90% slučajeva raka, su zloćudne bolesti epitelnih stanica. Sarkomi su solidni tumori vezivnog tkiva poput mišića, kostiju i hrskavice, dok leukemije i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i stanica imunološkog sustava (2).

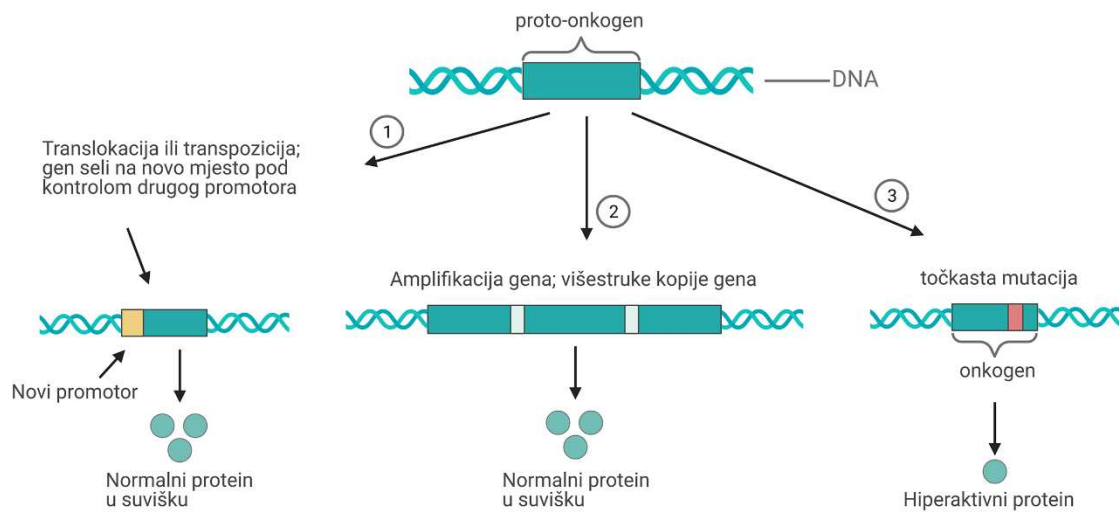
Rak nastaje uslijed mutacija koje se mogu naslijediti, ali najčešće nastaju u somatskim stanicama zbog djelovanja mutagena ili slučajnih grešaka pri umnažanju DNA (engl. *deoxyribonucleic acid* - deoksiribonukleinska kiselina). Ove mutacije dijelimo na pokretačke (engl. *driver*) i usputne (engl. *passenger*). Pokretačke mutacije događaju se u genima povezanim s rakom i uzročno su povezane s njegovim nastankom, dok usputne mutacije nisu bitne za razvoj raka te su posljedica genomske nestabilnosti (1). Klonalnost tumora, odnosno razvoj tumora iz jedne stanice koja abnormalno proliferira, temeljan je proces u nastanku raka. Ovaj proces uključuje inicijaciju tumora, kada genetičke promjene pokreću proliferaciju jedne stanice, te progresiju, gdje dodatne mutacije omogućuju brži rast tumorskih stanica (2).

Ključno otkriće u razumijevanju tumorske progresije su matične stanice raka, koje čine manji dio stanica s obilježjima matičnih stanica - sposobnost samoobnavljanja i diferenciranja u druge stanice raka. Otkriće matičnih stanica raka ima značajne implikacije za liječenje raka. Ako terapija uspije uništiti sve matične stanice raka, moguće je postići izlječenje, čak i ako neki drugi dijelovi tumora prežive. Međutim, ako matične stanice raka nisu uništene, postoji velika vjerojatnost da će se rak obnoviti. Osim mutacija u DNA, nastanak i progresija raka povezani su s epigenetičkim promjenama poput metilacije DNA i modifikacije histona. Te promjene su nasljedne i utječu na ekspresiju gena bez promjena u slijedu baza DNA. Također, skraćivanje telomera, krajeva kromosoma, igra ključnu ulogu u kontroli stanične diobe. Kada se telomere previše skrate, stanice se prestaju dijeliti. Međutim, stanice raka izbjegavaju ovaj mehanizam, omogućujući im neograničenu diobu (4).

## 1.2. Onkogeni

Istraživanja tumorskih virusa otkrila su postojanje gena, nazvanih onkogenima, koji mogu transformirati stanice i dati prvi uvid u molekularne osnove raka (5). Onkogeni su promijenjene verzije normalnih staničnih gena, poznatih kao protoonkogeni. Protoonkogeni sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije te su važni za prijenos signala unutar stanice. Ovi geni su evolucijski očuvani, što naglašava njihovu važnost u temeljnim staničnim procesima. Putovi prijensa signala u stanici omogućuju usklađivanje rasta, diobe, diferencijacije i preživljavanja stanica s uvjetima iz okoliša. Signali iz okoliša, poput čimbenika rasta, vežu se na receptore na staničnoj membrani, aktivirajući signalni prijenos kroz stanicu do transkripcijskih čimbenika koji reguliraju ekspresiju gena. Fosforilacija proteina, često posredovana tirozin-kinazama, ključna je u ovom procesu (6). Iako su virusni onkogeni prvi otkriveni u virusu RSV (Rousov sarkomski virus), koji uzrokuje sarkome kod pilića, većina slučajeva raka u ljudi nije uzrokovana virusima, već zračenjem, kemijskim karcinogenima i drugim čimbenicima. Istraživanja virusnih onkogenata bila su ključna za otkriće staničnih onkogenata, koji igraju važnu ulogu u razvoju raka neovisnog o virusnim infekcijama (5).

Kada se protoonkogeni modificiraju, oni postaju onkogeni, što dovodi do razvoja stanica raka. Ovaj proces, poznat kao aktivacija onkogenata, obično ima dominantni učinak, što znači da je dovoljna promjena u samo jednom alelu da bi se očitavao učinak onkogenata. Proces aktivacije protoonkogenata može se dogoditi kroz kromosomsku translokaciju (premještanje dijela kromosoma na drugi kromosom), točkaste mutacije ili gensku amplifikaciju (povećanje broja kopija gena) (Slika 1) (7).



**Slika 1.** Protoonkogeni postaju onkogeni: translokacijom ili transpozicijom (1); amplifikacijom (2); točkastom mutacijom (3)

Preuzeto s: <https://www.genetika.biol.pmf.hr/docs/sadrzaj/16-poglavlje/translacijska-i-posttranslacijska-kontrola/>

Datum preuzimanja: 9.9.2024.

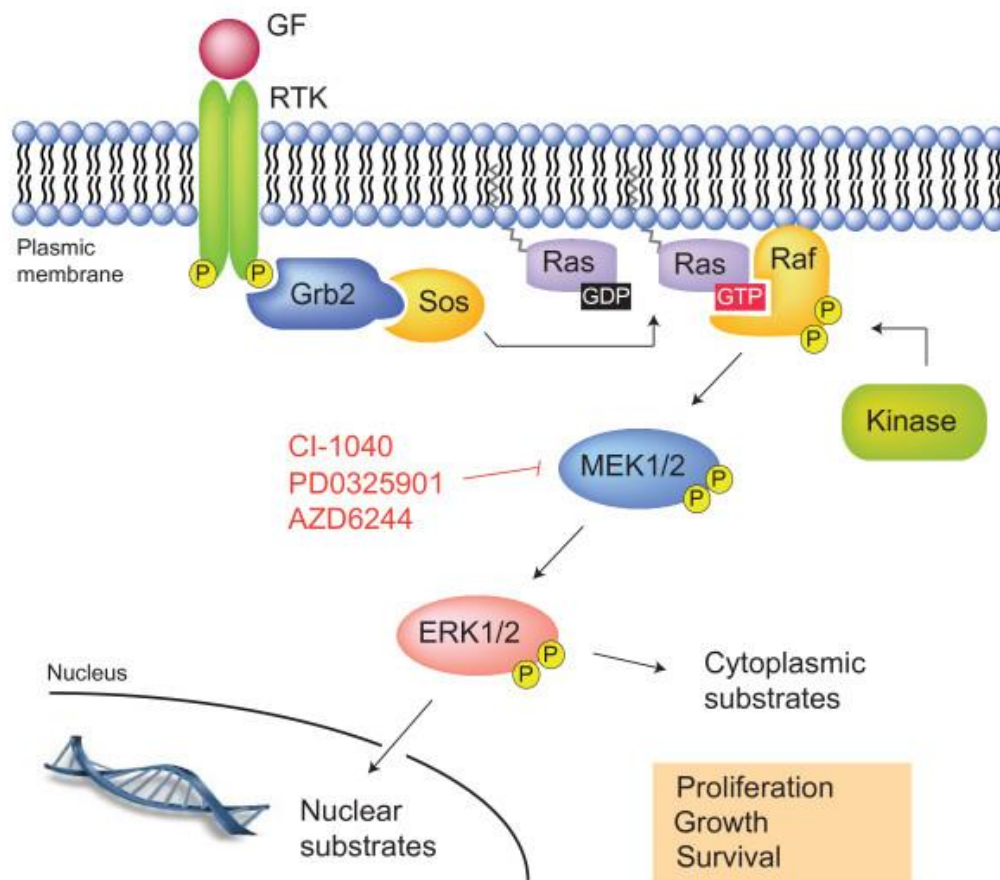
Neki onkogeni otkriveni u ljudskim tumorima su homolozi onkogeni pronađenih u retrovirusima, dok su drugi prvi put identificirani u ljudskim slučajevima raka. Ljudski onkogen otkriven testom prijenosa gena kasnije se pokazao homolognim onkogenom *rasH* iz Harveyevog sarkomskog virusa. Najčešći onkogeni u ljudskim tumorima pripadaju porodici gena *ras* (*rasH*, *rasK* i *rasN*), koji su povezani s nastankom oko 20% svih malignoma, uključujući 50% slučajeva raka debelog crijeva i 25% slučajeva raka pluća (8).

Onkogeni *ras* nisu prisutni u normalnim stanicama; u tumorskim stanicama nastaju uslijed mutacija koje mijenjaju protoonkogene *ras*. Ove mutacije obično uključuju zamjenu pojedinačnih aminokiselina, poput prve otkrivene mutacije gdje je glicin zamijenjen valinom na 12. mjestu. Eksperimenti su pokazali da kemijski karcinogeni mogu pretvoriti protoonkogene *ras* u onkogene, potvrđujući vezu između mutagenih učinaka karcinogena i transformacija stanica. Geni *ras* kodiraju proteine koji vežu gvaninske nukleotide i sudjeluju u prijenosu mitogenih signala od receptora za faktore rasta. Aktivnost proteina Ras ovisi o vezanju GTP-a (aktivno stanje) ili GDP-a (neaktivno stanje). Mutacije karakteristične za onkogene *ras* održavaju protein Ras stalno aktivnim, s vezanim GTP-om, zbog nefunkcionalnog GAP-a (proteina koji aktivira GTPazu). To smanjuje GTPaznu aktivnost, što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica (8).

Onkogeni se mogu aktivirati i kromosomskom translokacijom, pri čemu se dio kromosoma "odlomi" i premjesti na drugi kromosom. Burkittov limfom je tumor B limfocita, gdje dolazi do translokacije onkogenog C-MYC s 8. na 14. (ili rjeđe 2. ili 22. kromosom), u regiji gena za imunoglobuline. Ova translokacija uzrokuje nekontroliranu staničnu proliferaciju. Philadelphia kromosom, prisutan kod bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom, nastaje kao rezultat translokacije između 9. i 22. kromosoma. Kao rezultat toga, dio protoonkogenog ABL spoji se s dijelom gena BCR, stvarajući BCR-ABL fuzijski protein, što uzrokuje abnormalni rast stanica (9).

Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala igra ključnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije, što se može ilustrirati njihovom aktivnošću nakon stimulacije čimbenicima rasta. Aktivacija ovog puta započinje kada receptorske protein-tirozin-kinaze, poput EGFR-a (engl. *Epidermal growth factor receptor* - receptor epidermalnog faktora rasta), aktiviraju Ras, koji potom aktivira serin/treonin-kinazu Raf, a Raf aktivira MEK-kinazu. MEK-kinaza aktivira ERK-kinazu (poznatu i kao MAP-kinaza, od engl. *mitogen activated protein kinase* - mitogenom-aktivirane proteinske kinaze), koja na kraju aktivira različite transkripcijske čimbenike i druge proteine, kontrolirajući tako staničnu proliferaciju (Slika 2). Mutacije u

različitim komponentama ovog signalnog puta često su prisutne u raznim vrstama raka, što je dovelo do razvoja bioloških lijekova koji ciljano djeluju na te specifične mutacije. Mutacije gena *ras* mogu uzrokovati rezistenciju na terapije poput cetuksimaba i panitumumaba. Ras također sudjeluje u drugim signalnim putevima, uključujući aktivaciju proteina mTOR, što je cilj lijekova temsirolimusa i everolimusa. Razumijevanje onkogenih proteina i signalnih puteva omogućilo je razvoj ciljanih terapija, uključujući monoklona protutijela (trastuzumab, cetuksimab, panitumumab) i inhibitore protein-kinaza (imatinib, sorafenib, lapazinib) i mnogi drugi (10).



**Slika 2.** Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala

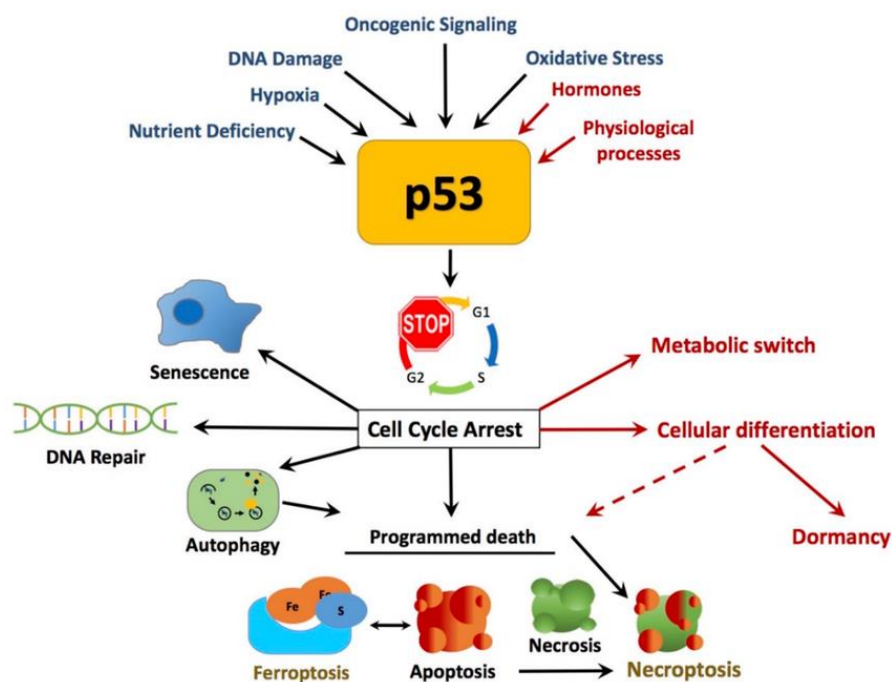
Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2830959/>

Datum preuzimanja: 10.9.2024.

### 1.3. Tumor supresorski geni

Aktivacija staničnih onkogenih i inaktivacija tumor supresorskih gena dvije su ključne vrste genskih promjena koje doprinose razvoju tumora. Dok onkogeni potiču stanični rast, tumor supresorski geni imaju suprotnu ulogu: inhibiraju staničnu proliferaciju i sprječavaju nastanak tumora. U mnogim tumorima dolazi do gubitka ili inaktivacije ovih gena, čime prestaje djelovati negativna regulacija stanične proliferacije, što vodi do nekontroliranog rasta tumorskih stanica (11). Mutacije u ovim genima obično imaju recesivni učinak, što znači da je potrebno inaktivirati oba alela da bi se ispoljio njihov učinak. Pored mutacija, inaktivacija može nastati i epigenetičkim mehanizmima, poput metilacije promotora. Prvi otkriveni tumor supresorski gen, *RB*, povezan je s retinoblastomom, rakom mrežnice. Retinoblastom je nasljedan u 40% slučajeva, dok se u 60% pojavljuje sporadično. U oba oblika, rak nastaje inaktivacijom oba alela gena *RB*. Kod nasljednog oblika, jedna mutacija se nasljeđuje, dok druga nastaje u somatskoj stanici. Kod sporadičnog oblika, obje mutacije nastaju u somatskoj stanici. Gubitak heterozigotnosti na genetskom lokusu često prati gubitak drugog alela. Sličan mehanizam djeluje i kod drugih tumor supresorskih gena, povezanih i sa sporadičnim i nasljednim oblicima raka (12).

Tumor supresorski gen *p53* ključan je za sprječavanje razvoja raka, a često je mutiran u različitim vrstama tumora kod ljudi. Njegov proteinski produkt, transkripcijski čimbenik p53, aktivira se kao odgovor na oštećenje DNA ili stanični stres (12). Normalni p53 prepoznaje oštećenu DNA i aktivira niz odgovora, uključujući zaustavljanje mitoze i popravak DNA, ili ako je oštećenje nepopravljivo, inducira apoptozu ili stanično starenje (Slika 3). U stanicama s mutiranim *p53* genom, kontrola prijelaza iz G1-faze u S-fazu izostaje, pa se stanice s oštećenom DNA nekontrolirano dijele, što dovodi do neoplastičnih promjena. Mutirani p53 je otporan na degradaciju i zadržava se u zloćudnim stanicama dulje nego u normalnim, pridonoseći razvoju tumora (13). Također, inaktivacija p53 povezana je s tumorskom angiogenezom i otpornosti na kemoterapiju i radioterapiju (12).



**Slika 3.** Uloge tumor supresorskog gena *p53*

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/p53-canonical-and-non-canonical-tumor-suppressor-roles-of-p53-p53-is-activated-by-a\\_fig1\\_325657277](https://www.researchgate.net/figure/p53-canonical-and-non-canonical-tumor-suppressor-roles-of-p53-p53-is-activated-by-a_fig1_325657277)

Datum preuzimanja: 12.9.2024.

Velik broj mutacija u stanicama raka, od kojih su mnoge slučajne, posljedica su genomske nestabilnosti uzrokovane poremećajima u mehanizmima koji osiguravaju nisku razinu mutacija. Ključni su mehanizmi popravka DNA, koji ispravljaju pogreške nastale tijekom replikacije ili zbog djelovanja mutagena. Oštećenje tih mehanizama zbog mutacija u genima koji u njima sudjeluju dovodi do genomske nestabilnosti koja se smatra bitnim obilježjem raka. Geni bitni za očuvanje genomske stabilnosti igraju važnu ulogu u sprječavanju nastanka raka i poznati su pod nazivom geni skrbnici (engl. *caretakers*). Jedan od primjera su geni *BRCA1* i *BRCA2*, povezani s nasljednim rakom dojke i jajnika. Oni sudjeluju u popravku DNA homolognom rekombinacijom i kada se ti geni mutiraju stanice raka se oslanjaju na alternativne mehanizme popravka DNA. Inhibicijom tih mehanizama, primjerice PARP-inhibitorima, stanice postaju nesposobne popraviti oštećenja i umiru, kroz mehanizam poznat kao kombinirana ubojitost (12).



## 1.4. Rak grlića maternice

Rak grlića maternice četvrti je najčešći rak među ženama širom svijeta a najviše pogađa zemlje s niskim i srednjim prihodima. Ova razlika proizlazi iz nedostatka resursa. Dok razvijene zemlje imaju učinkovite programe cijepljenja i probira te pristup liječenju, siromašnije zemlje često nemaju potrebnu infrastrukturu i resurse za takve programe (14). Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) igra ključnu ulogu u razvoju ovog raka, ali sama po sebi ne uzrokuje bolest jer može biti prolazna. Međutim kod trajnih infekcija, razvoj raka može potrajati desetljećima (15). Dugotrajna infekcija visokorizičnim HPV-om je glavni rizični čimbenik za razvoj predstadija i raka grlića maternice, odgovorna za 99,7% slučajeva. Dodatni rizični čimbenici uključuju pušenje, dugotrajnu uporabu oralne hormonske kontracepcije, veliki broj poroda, prisutnost drugih spolno prenosivih infekcija (poput genitalnog herpesa ili HIV-a); genetsku predispoziciju (obiteljsku povijest raka vrata maternice) i nepravilnu prehranu s deficitom određenih hranjivih tvari (16).

Rak grlića maternice najčešće je uzrokovan HPV tipovima 16 i 18. Onkoproteini iz rane regije (E) HPV-a igraju ključnu ulogu u razvoju i progresiji raka (17). HPV onkoproteini E6 i E7 ključni su u pokretanju onkogeneze, potičući replikaciju virusnog genoma i stvaranje svih karakteristika stanica raka, uključujući nekontroliranu proliferaciju, angiogenezu, invaziju, metastaze, neograničenu aktivnost telomerase te izbjegavanje apoptoze i supresora rasta (18). Oni su odgovorni za početne promjene u epitelnim stanicama. Inaktiviraju dva glavna tumor supresora, p53 i RB, čime ometaju mehanizme popravka DNA i apoptozu, što dovodi do brže proliferacije stanica raka (19).

Za dijagnosticiranje raka grlića maternice važni su redoviti ginekološki pregledi i PAPA-test, koji omogućuju rano otkrivanje promjena na stanicama i povećavaju šanse za pravovremenu dijagnozu. PAPA-test je citološka pretraga kojom se analiziraju stanice uzete s površine vrata maternice kako bi se utvrdila prisutnost upalnih ili abnormalnih promjena u izgledu i strukturi stanica. Ako PAPA-test pokaže abnormalnosti, koploskopija se koristi za detaljan pregled vrata maternice i identifikaciju mjesta promjena (16).

Cijepljenje protiv HPV-a jedno je od najučinkovitijih sredstava za prevenciju raka grlića maternice. Važno je naglasiti da su ova cjepiva profilaktička, što znači da ne djeluju na već postojeće infekcije HPV-om. Najbolji rezultati postižu se kada se cjepivo primijeni prije stupanja u spolne odnose (20). Istraživanja pokazuju da je najučinkovitije cijepiti mlade djevojke u dobi od 9 do 14 godina (21). Postoje različite vrste cjepiva: četverovalentno, koje pruža zaštitu protiv HPV tipova 16, 18, 6 i 11, te dvovalentno koje djeluje na tipove 16 i 18

(22). Najnovije cjepivo nudi zaštitu protiv čak devet tipova HPV-a, pružajući široku pokrivenost i bolju zaštitu (20).

Predinvazivni tumor i rani invazivni rak obično nemaju vidljive simptome i mogu se otkriti isključivo putem ginekološkog pregleda i PAPA-testa. Kako tumor napreduje, mogu se javiti simptomi poput neobjašnjivog vaginalnog krvarenja i iscjetka neugodnog mirisa. U uznapređevaloj fazi bolesti mogu se pojaviti bol u području zdjelice, anemija, oticanje nogu te hidronefroza, koja nastaje uslijed blokade mokraćnog sustava, a može dovesti do uremije. Ako se tumor proširi na rektum, mogući su simptomi poput krvi u stolici, opstrukcije crijeva i proljeva. Širenje na mokraćni mjehur može uzrokovati hematuriju (krv u mokraći). U metastatskoj fazi, tumor se često širi na pluća, jetru, kosti i paraaortalne limfne čvorove. Kod pacijentica s rakom grlića maternice obavezno je napraviti MR zdjelice radi procjene lokalnog širenja bolesti. U slučaju sumnje na metastaziranje tumora u mokraćni mjehur ili rektum, preporučuje se provođenje cistoskopije i rektoskopije. Za procjenu zahvaćenosti zdjelice, jetre i drugih trbušni organa, moguće je koristiti PET-CT ili MSCT abdomena i zdjelice. Rast i invazija tumora mogu uzrokovati opstrukciju protoka mokraće, što se potvrđuje intravenskom urografijom, a bolest se tada svrstava u FIGO stadij IIIb (Tablica 1). U sklopu kompletne dijagnostike potrebni su i nalazi kompletne krvne slike, diferencijalne krvne slike, biokemijske pretrage te klirens kreatinina (23).

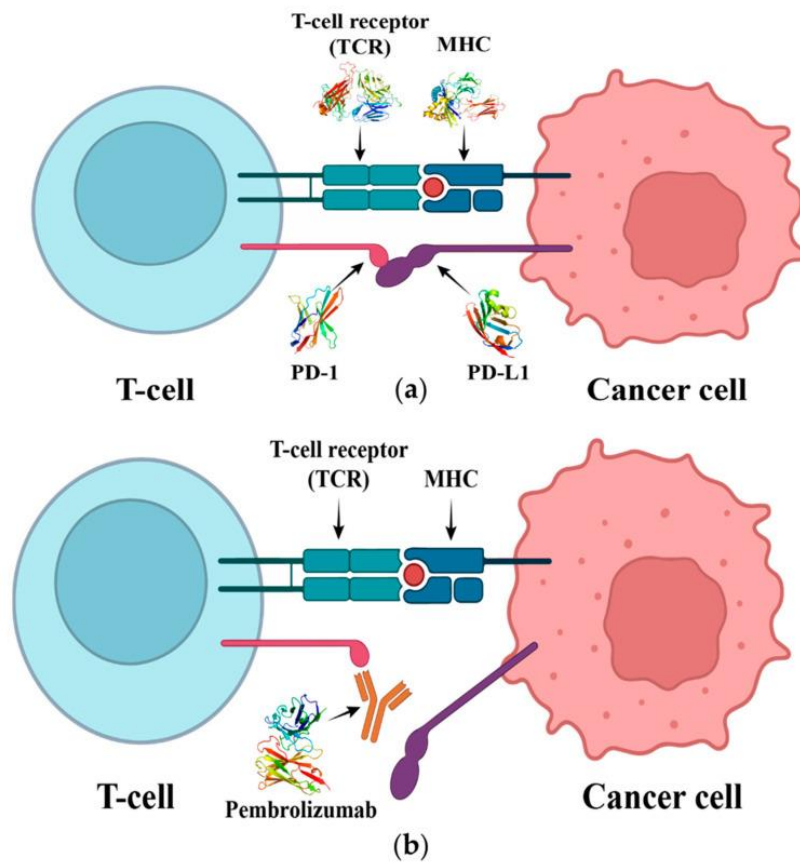
**Tablica 1.** FIGO klasifikacija raka grlića maternice (23).

<b>Stadij 0</b>	<b>tumor in situ</b>
<b>Stadij I</b>	rak grlića maternice ograničen na grlić maternice
<b>Stadij I a</b>	mikroskopski vidljiva lezija ograničena na grlić maternice
<b>Stadij I a1</b>	stromalna invazija 3 mm i manje (prodor u dubinu) i promjer lezije 7 mm i manje (horizontalno širenje)
<b>Stadij I a2</b>	stromalna invazija veća od 3 mm, a manja od 5 mm i promjer lezije veći od 7 mm
<b>Stadij I b</b>	klinički vidljiva lezija ograničena na grlić maternice
<b>Stadij I b1</b>	klinički vidljiva lezija velika 4 cm i manje u najvećoj dimenziji
<b>Stadij I b2</b>	klinički vidljiva lezija veća od 4 cm u najvećoj dimenziji
<b>Stadij II</b>	rak grlića maternice širi se izvan grlića maternice, ali ne do zdjeličnih kostiju ni donje trećine rodnice
<b>Stadij II a</b>	bez kliničkog zahvaćanja parametrija
<b>Stadij II a1</b>	klinički vidljiva lezija velika 4 cm i manje u najvećoj dimenziji
<b>Stadij II a2</b>	klinički vidljiva lezija veća od 4 cm u najvećoj dimenziji
<b>Stadij II b</b>	klinički zahvaćeni parametriji
<b>Stadij III</b>	rak grlića maternice širi se do zdjeličnih kostiju i/ili zahvaća donju trećinu rodnice i/ili pak uzrokuje hidronefroziju ili zatajenje rada bubrega
<b>Stadij III a</b>	rak grlića maternice zahvaća donju trećinu rodnice, ali bez širenja do zdjelične stjenke
<b>Stadij III b</b>	rak grlića maternice širi se do zdjelične stjenke i/ili uzrokuje hidronefroziju ili afunkciju bubrega
<b>Stadij IV</b>	rak grlića maternice širi se na susjedne organe i/ili postoje udaljene presadnice
<b>Stadij IV a</b>	širenje na sluznicu mokraćnoga mjehura ili rektuma
<b>Stadij IV b</b>	postojanje udaljenih presadnica

## 1.5. Terapija raka grlića maternice

Primarne opcije liječenja za pacijentice s rakom grlića maternice mogu uključivati operaciju ili istovremeni režim kemoradioterapije, koji se sastoji od kemoterapije na bazi cisplatine uz vanjsku radioterapiju i brahiterapiju (24). Dodavanje kemoterapije uz radioterapiju značajno poboljšava preživljavanje kod nemetastaskog raka. U metastatskim slučajevima, kemoterapija poboljšava preživljavanje i kvalitetu života, pri čemu se koristi kemoterapija na bazi platine, s ili bez bevacizumaba, što je dovelo do boljih ishoda za pacijentice (25). Postoje dvije vrste metastaza koje se razlikuju po vrsti terapije i stopama preživljavanja: hematogena i limfatična metastaza. Pacijenti s hematogenom metastazom imaju veći rizik od smrtnog ishoda u usporedbi s onima s limfatičnom metastazom. Istodobna kemoradioterapija i naknadna kemoterapija dobro se podnose i učinkovite su u liječenju limfatičnih metastaza (26).

Unatoč tim standardnim metodama liječenja, one imaju ograničenu učinkovitost u uznapređovalim stadijima bolesti i izazivaju značajne nuspojave. Opcije za rekurentne ili metastatske slučajeve su ograničene, no imunoterapija pruža novu nadu. Nedavno je odobreno antitijelo koje blokira PD-1 protein za liječenje metastatskog raka, a može se kombinirati s antigen-specifičnim terapijama poput cjepiva ili prijenosa stanica kako bi se pojačao imunološki odgovor na HPV-pozitivne tumore (Slika 4) (27). Imunoterapija koja cilja tumore zahvaćene limfocitima poboljšava proces liječenja i često se kombinira s kemoterapijom i radioterapijom za brže rezultate. Inhibicija poli-ADP-riboze aktivira PD-1 i CTLA-1 kontrolne točke, što pokazuje učinkovitost u inhibiciji tumorskih stanica. Lijekovi poput pembrolizumaba, durvalumaba i atezolizumaba koriste se u kliničkim ispitivanjima, dok se očekuje razvoj cjepiva koja će smanjiti osjetljivost na bolesti i ojačati imunološki sustav (28).



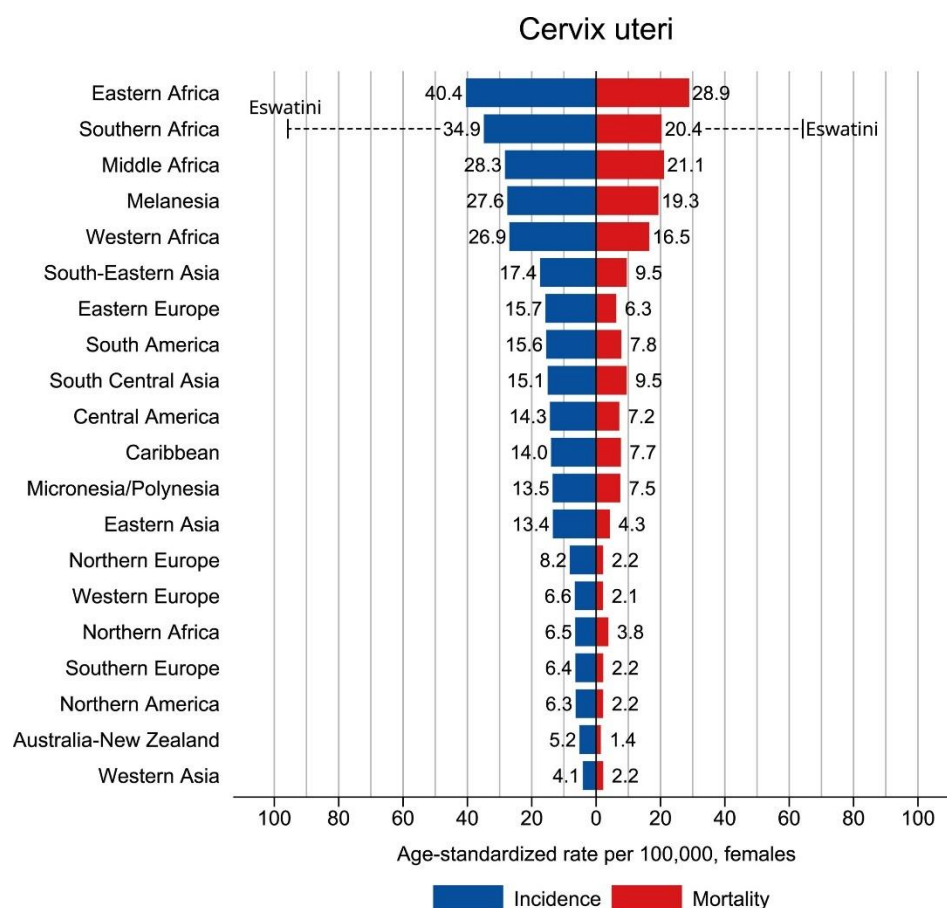
**Slika 4.** Način djelovanja pembrolizumaba

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10341962/>

Datum preuzimanja: 14.9.2024.

## 1.6. Epidemiologija raka grlića maternice u svijetu

Rak grlića maternice četvrti je najčešći oblik raka među ženama u svijetu, s procijenjenih 660 000 novih slučajeva i 350 000 smrtnih slučajeva u 2022. Većina novih slučajeva i smrti u svijetu zabilježena je u zemljama s niskim i srednjim prihodima (29). Rak grlića maternice najčešći je oblik raka u 25 zemalja svijeta, a vodeći je uzrok smrti od raka u 37 zemalja, naročito u Africi, Južnoj Americi i jugoistočnoj Aziji (Slika 5). Stope incidencije i smrtnosti variraju, pri čemu su najviše u subsaharskoj Africi i Melaneziji, a najniže u Sjevernoj Americi, Australiji/Novom Zelandu i Zapadnoj Aziji. Država Esvatini ima najveću svjetsku incidenciju i stopu mortaliteta. Pad incidencije raka grlića maternice posljednjih desetljeća povezan je s rastom razine ljudskog razvoja, boljom higijenom i manjim brojem spolno prenosivih bolesti. Programi probira ubrzali su smanjenje stope raka, iako u nekim zemljama mlađe žene imaju veći rizik zbog promjena u spolnom ponašanju i prijenosu HPV-a (30).



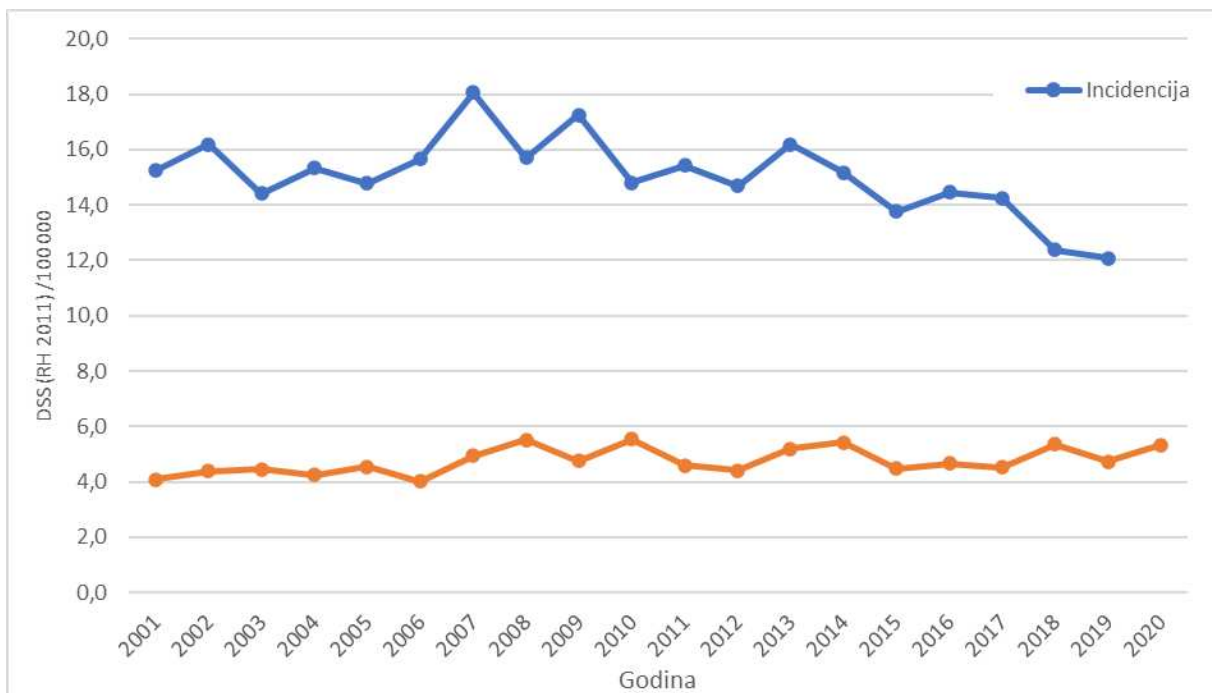
**Slika 5.** Dobno standardizirane stope incidencije i mortaliteta raka grlića maternice u 2022.

Preuzeto s: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21834>

Datum preuzimanja: 16.9.2024.

## 1.7. Epidemiologija raka grlića maternice u Hrvatskoj

Prema podacima Registra za rak iz 2019. godine, u Hrvatskoj je dijagnosticirano 268 slučajeva raka grlića maternice, a trećina novooboljelih žena bila je mlađa od 50 godina. U 2020. godini od ovog raka preminulo je 126 žena, od kojih je 37% bilo mlađe od 60 godina. Iako se posljednjih godina bilježi pad incidencije raka grlića maternice, stopa smrtnosti ostaje stabilna. Prema međunarodnoj studiji o preživljenju od raka (CONCORD-3), Hrvatska je na 20. mjestu od 28 europskih zemalja (31).



**Slika 6.** Trend incidencije i mortaliteta raka vrata maternice u Hrvatskoj, 2001.-2020.

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/>

Datum preuzimanja: 16.9.2024.

## 1.8. Srebro

Srebro je poznato kao antimikrobno sredstvo još od davnina. S porastom multirezistentnih bakterija, ponovno je postalo predmetom istraživanja, a ionski i nano-oblici proučavaju se u laboratorijskim i kliničkim ispitivanjima (32). Srebro je biološki aktivno u svojoj monoatomskoj ionskoj formi ( $\text{Ag}^+$ ), kada je topivo u vodenim okruženjima. Ovaj se oblik srebra koristi u spojevima poput srebrova nitrata i srebrova sulfadiazina, koji se često primjenjuju za liječenje rana. Drugi oblik srebra je njegov nanokristalni oblik ( $\text{Ag}^0$ ), koji se zajedno s njegovim ionskim oblikom može naći u kombinaciji s drugim elementima poput kisika ili metala, stvarajući kovalentne veze ili koordinacijske komplekse. Poznata su tri mehanizma djelovanja srebra na bakterije:

- a) Kationi srebra stvaraju pore i probijaju staničnu stijenku bakterija reagirajući s peptidoglikanom,
- b) Ioni srebra unutar stanice ometaju disanje i metaboličke procese te stvaraju reaktivne kisikove spojeve,
- c) Srebro unutar stanice ometa DNA i njezinu replikaciju.

Moderna medicina koristi medicinske oblike srebra, poput srebrova nitrata, sulfadiazina i koloidnog srebra. Koloidno srebro definira se kao smjesa iona srebra i nanočestica srebra suspendiranih u vodenom mediju. Obično se sintetizira elektrolizom pomoću seta srebrnih katoda. Srebro treba koristiti samo kad je nužno, poput medicinskih intervencija, i to u kontroliranim uvjetima, jer ispuštanje u okoliš može imati štetne dugoročne posljedice (33).

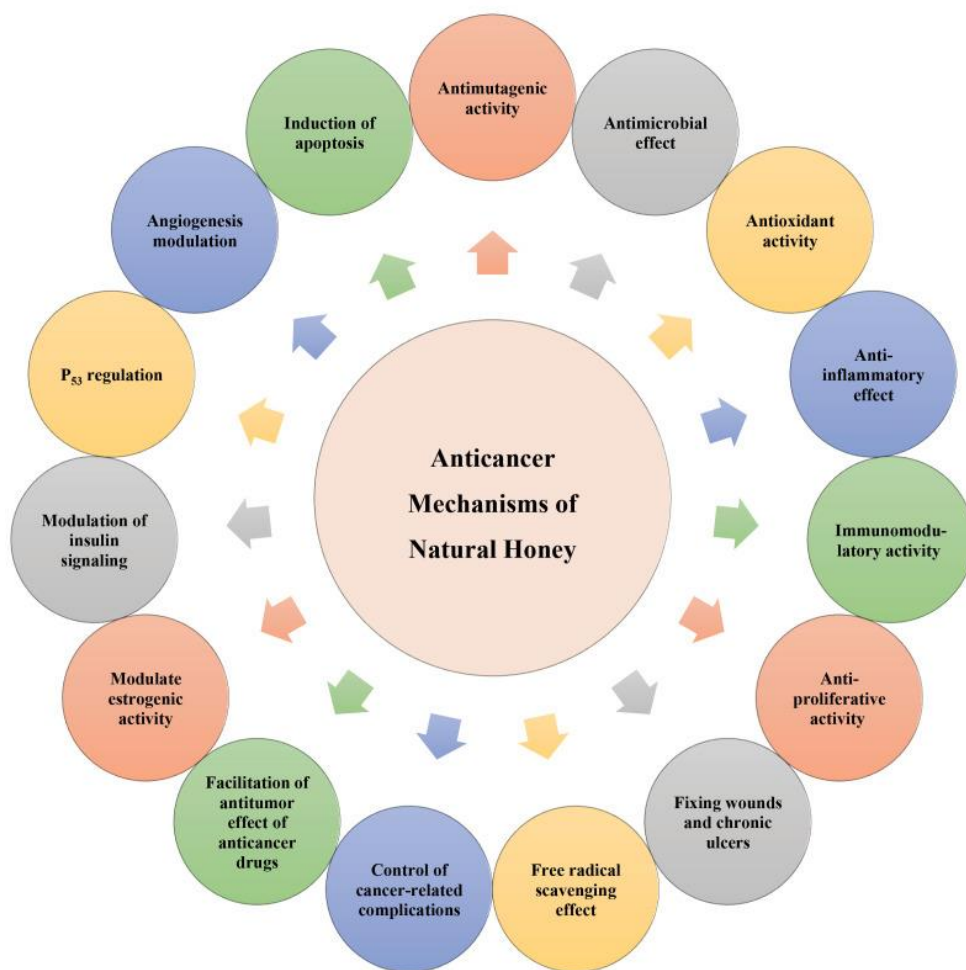
Razvoj ekološki prihvatljivih metoda sinteze doveo je do proizvodnje biokompatibilnih srebrnih nanočestica za primjenu u medicini (34). Posebno se ističe pristup zelene sinteze, koji je ekološki prihvatljiv, neškodljiv, a dobivene nanočestice pokazuju poboljšanu biokompatibilnost za primjenu u zdravstvu (35). Nanočestice srebra dobivene zelenom sintezom, koristeći ljekovite biljke, privukle su veliku pažnju zbog širokog spektra i snažnog antimikrobnog djelovanja. One se intenzivno istražuju kao potencijalno rješenje za otpornost bakterija na antibiotike te kao alternativni antikancerogeni agens u terapiji raka (34).



## 1.9. Med

Posljednjih godina raste interes za razvoj protukancerogenih sredstava iz prirodnih izvora, poput hrane. Zbog njihove sigurnosti, prirodni spojevi postaju atraktivna alternativa konvencionalnim lijekovima za liječenje raka. Med je privukao posebnu pozornost istraživača zbog svojih brojnih terapijskih svojstava. Dugo se koristi kao lijek i hranjiva tvar, a istraživanja su potvrdila njegova antioksidativna, antibakterijska, antivirusna, protugljivična, antidijabetička i protuupalna svojstva, kao i njegovu učinkovitost u zacjeljivanju rana, zaštiti jetre i regulaciji krvnog tlaka (36). Med sadrži flavonoide (kaempferol, katehin, kvercetin) i fenolne kiseline (kavena i galna kiselina), koji djeluju protuupalno, antioksidativno, antiproliferativno, apoptotski, imunomodulatorno, antimetastatski i antikancerogeno (37). Propolis, prirodni proizvod pčela, ima antibakterijska, protugljivična i protuupalna svojstva te djeluje na stanične signalne puteve. Istraživanja sugeriraju da propolis može inhibirati proliferaciju, angiogenezu i metastazu stanica raka, poticati apoptozu te utjecati na tumorske mikrookoliše i otpornost raka na lijekove (38). Imunološki sustav igra važnu ulogu u razvoju raka, no neke tumorske stanice mogu izbjeći ili inhibirati procese urođene i stečene imunosti. Znanstveni dokazi pokazuju da mnoge vrste meda te neki izolirani proteini povećavaju oslobađanje reaktivnih kisikovih spojeva i citokina (uglavnom IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) iz stanica urođene imunosti, dok također, potiču proliferaciju i funkciju T-limfocita, ključnih za stečeni imunološki odgovor. Ova istraživanja ukazuju na to da med može poticati i urođenu i stečenu imunost (39).

Med pokazuje citotoksično djelovanje prema tumorskim ili karcinomskim stanicama, ali ne prema normalnim stanicama. Postoje različiti mehanizmi kojima med može inhibirati rast i proliferaciju tumorskih stanica, a neka od njih su regulacija staničnog ciklusa, aktivacija mitohondrijskog puta, indukcija permeabilizacije vanjske membrane mitohondrija, indukcija apoptoze, modulacija oksidativnog stresa, ublažavanje upale, modulacija inzulinskog signaliziranja i inhibicija angiogeneze (Slika 7) (40).



**Slika 7.** Glavni mehanizmi antikancerogenog djelovanja meda (36)

Studijom se istraživao antikancerogeni potencijal Tualang meda na stanicama ljudskog raka dojke (MCF-7 i MDA-MB-231) i grlića maternice (HeLa), kao i na normalnim stanicama epitela dojke (MCF-10A). Stanice su tretirane s povećavajućim dozama Tualang meda (1-10%) do 72 sata. Povećanje curenja laktat dehidrogenaze iz staničnih membrana pokazalo je da je Tualang med citotoksičan za sve tri vrste stanica, s učinkovitim koncentracijama od 2,4-2,8%, ali nije bio citotoksičan za normalne stanice MCF-10A. Dodatne analize pokazale su stimulaciju apoptoze i uključenost u mitohondrijski put (41).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje koloidnog srebra, dobivenog zelenom sintezom kemijskom redukcijom pomoću cvjetnog meda, na stanične linije humanih karcinoma.

Potencijalni citotoksični učinak ispitan je na stanicama karcinoma grlića maternice HeLa i SiHa.

## **2.2. Hipoteza**

Koloidno srebro proizvedeno u medu ima citotoksično djelovanje na stanice karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa), smanjujući njihovu vitalnost i potičući staničnu smrt.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Stanične linije

Citotoksičnost je ispitivana *in vitro* na humanim staničnim linijama karcinoma grlića maternice HeLa i SiHa. Obilježja ovih staničnih linija prikazana su u tablicama.

#### 3.1.1. HeLa

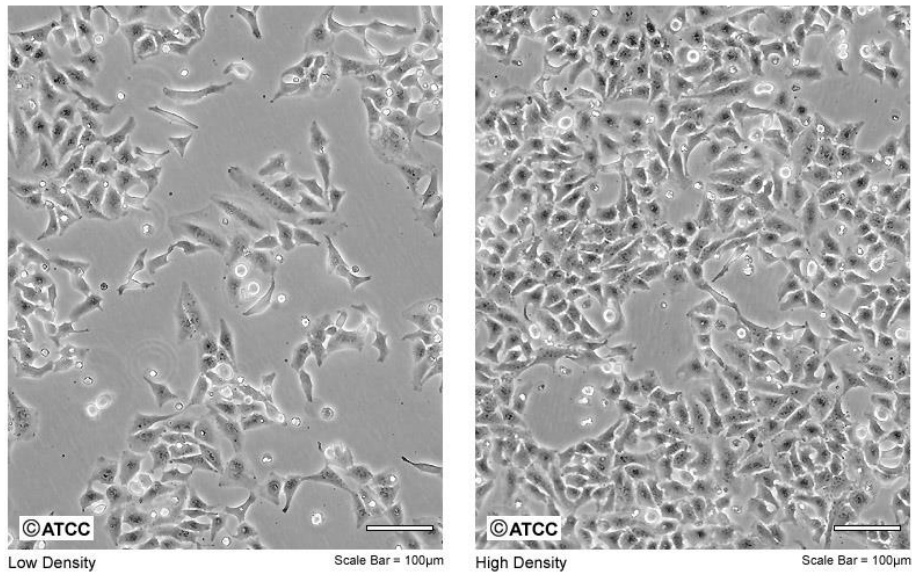
**Tablica 2.** Karakteristike stanične linije HeLa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/ccl-2>

Datum preuzimanja: 30.9.2024.

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tip stanica</b>	Epitelne stanice
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Tkivo</b>	Maternica, cerviks
<b>Bolest</b>	Adenokarcinom
<b>Dob</b>	31 godina
<b>Spol</b>	Ženski
<b>Etnicitet</b>	Crna rasa
<b>Primjena</b>	3D kultura stanica, bioproizvodnja
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Uvjeti čuvanja</b>	Parna faza tekućeg dušika

ATCC Number: **CCL-2**  
Designation: **HeLa**



**Slika 8.** Stanice karcinomske linije HeLa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/ccl-2>

Datum preuzimanja: 30.9.2024.

### 3.2.2. SiHa

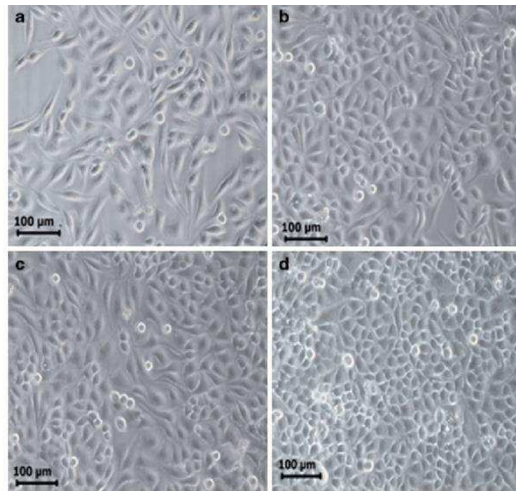
**Tablica 3.** Karakteristike stanične linije SiHa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-35>

Datum preuzimanja: 30.9.2024.

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tip stanica</b>	epitelne stanice
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Tkivo</b>	maternica, cerviks
<b>Bolest</b>	karcinom pločastih stanica
<b>Dob</b>	55 godina
<b>Spol</b>	Ženski
<b>Etnicitet</b>	Azijski
<b>Primjena</b>	3D kultura stanica, istraživanje raka, istraživanje zaraznih bolesti, istraživanje spolno prenosivih bolesti
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Uvjeti čuvanja</b>	parna faza tekućeg dušika





**Slika 9.** Stanice karcinomske linije SiHa

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with\\_fig5\\_225977369](https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with_fig5_225977369)

Datum preuzimanja: 30.9.2024.

## 3.2. Zelena sinteza koloidnog srebra

Za sintezu koloidnog srebra pripremljene su otopine srebrova nitrata i cvjetnog meda. Izvagano je 0,0171 g srebrovog nitrata, koji je otopljen u 100 mL ultra čiste vode. Zatim je izvagano 30,0527 g domaćeg meda i otopljeno u 80 mL ultra čiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici. Otopini meda izmjereni su pH vrijednost i specifična električna provodnost ( $\text{pH} = 4,53$ ,  $\sigma = 133,9 \mu\text{S/cm}$ ).

Sinteza koloidnog srebra provedena je reakcijom kemijske redukcije srebrovog nitrata uz pomoć meda.

## 3.3. Postupak

### 3.3.1 Stanična kultura

Stanične linije, nakon odmrzavanja, uzgajane su u DMEM mediju (*Dulbecco`s Modified Eagle Medium*) u inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  uz 5%  $\text{CO}_2$  i visoku vlažnost. DMEM medij sadrži važne hranjive tvari poput aminokiselina, minerala, ugljikohidrata i vitamina, te FBS (*Fetal bovine serum*, hrv. goveđi serum) koji osigurava čimbenike rasta. Također, dodano je 1% antibiotika (penicilin/streptomycin) kako bi se spriječila kontaminacija, dok fenolno crvenilo, prisutno u mediju, služi kao indikator zasićenja, mijenjajući boju u žutu kada je potrebno promijeniti medij.

Stanice su nakon inkubacije ostavljene preko noći kako bi se adherirale za podlogu. Kad su se stanice uhvatile za podlogu, medij je uklonjen, a stanice isprane pomoću PBS-a (puferirana otopina fosfatnih soli), te su tretirane tripsinom, enzimom koji cijepa peptidne veze i omogućava njihovo odvajanje jednih od drugih, kao i od podloge na kojoj rastu, nakon čega se tripsin inaktivira dodatkom svježeg medija u kojem se stanice resuspendiraju.

### 3.3.2 Određivanje broja živih (varijabilnih) stanica u kulturi

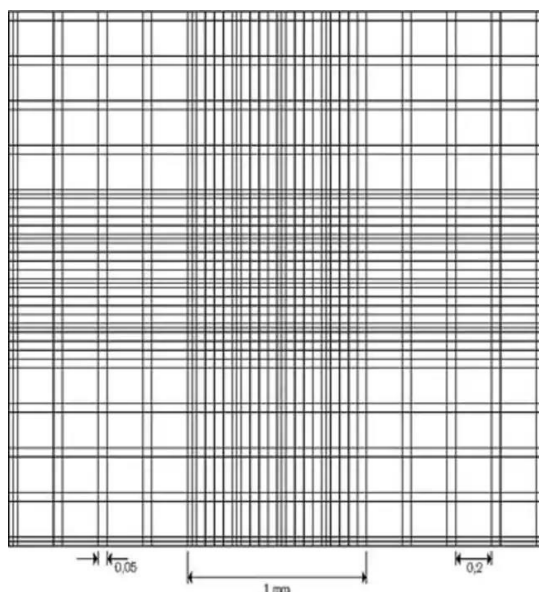
Brojanje stanica provedeno je pomoću Bürker-Türkove komorice (Slika 10), gdje se 10  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije miješa s 90  $\mu\text{L}$  Trypan Blue boje, koja selektivno boja mrtve stanice. Žive stanice ostaju nebojene zbog neoštećenog integriteta membrane, dok su mrtve stanice plavo obojene, omogućujući precizno brojanje pod mikroskopom. Nakon što je stanična suspenzija s bojom nanescena na komoricu, žive stanice broje se unutar pet kvadratića (Slika 11), a ukupan broj vijabilnih stanica izračunava se prema formuli:  $N \times 10 \times 10^4$  stanica/mL (N je broj živih stanica u kvadratićima, 10 je faktor razrjeđenja,  $10^4$  je volumen komorice).



**Slika 10.** Bürker - Türkova komorica

Preuzeto s: <https://www.stemcell.com/products/hausser-scientific-bright-line-hemocytometer.html>

Datum preuzimanja: 1.10.2024.



**Slika 11.** Komorica za brojanje stanica

Preuzeto s: <https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/10297390>

Datum preuzimanja: 1.10.2024.

### **3.3.3      Tretiranje stanica karcinoma otopinama koloidnog srebra proizvedenog u medu**

Jednak broj stanica presađuje se u 96 jažica u tri replikata i ostavlja preko noći kako bi se stanice prihvatile za podlogu. Nakon 24 h, medij se uklanja, a stanice se tretiraju ekstraktom koloidnog srebra proizvedenog u medu, u različitim razrjeđenjima: 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50%. Tri jažice samo s medijem služe kao kontrola. Stanice se potom inkubiraju u trajanju od 4, 24, 48 i 72 sata.

### 3.4. Test citotoksične aktivnosti (MTT)

MTT je poznata metoda za određivanje broja živih stanica u istraživanjima proliferacije i citotoksičnosti. Ova metoda temelji se na tome da mitohondrijski enzimi pretvaraju žutu tetrazolijsku sol (MTT) u topljivi ljubičasti formazan (42). Žive stanice s aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u ljubičasti formazanski produkt, dok mrtve stanice ne sudjeluju u tom procesu (Slika 12). Mehanizam redukcije MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH koji prenosi elektrone do MTT-a (43). Količina nastalog formazana izravno je proporcionalna broju živih stanica prisutnih tijekom izlaganja MTT-u, što čini ovaj test praktičnom i ekonomičnom metodom za kvantifikaciju stanica u kulturi (42).

Nakon dodavanja MTT otopine, stanice se inkubiraju na 37°C tijekom 2 sata, pri čemu nastaje ljubičasti formazan unutar stanica koji se mjeri spektrofotometrijski. Nakon uklanjanja medija, nastali formazan se otapa u DMSO (dimetil sulfoksid) kako bi se mogla izmjeriti apsorbancija pri 570 nm. Pločice se zatim inkubiraju 10 minuta na 37°C uz treskanje.

Citotoksična aktivnost ispitivanih uzoraka koloidnog srebra proizvedenog u medu izražava se omjerom apsorbancija stanica tretiranih uzorcima vodenih ekstrakata koloidnog srebra i apsorbancija stanica koje nisu tretirane (kontrolna skupina).



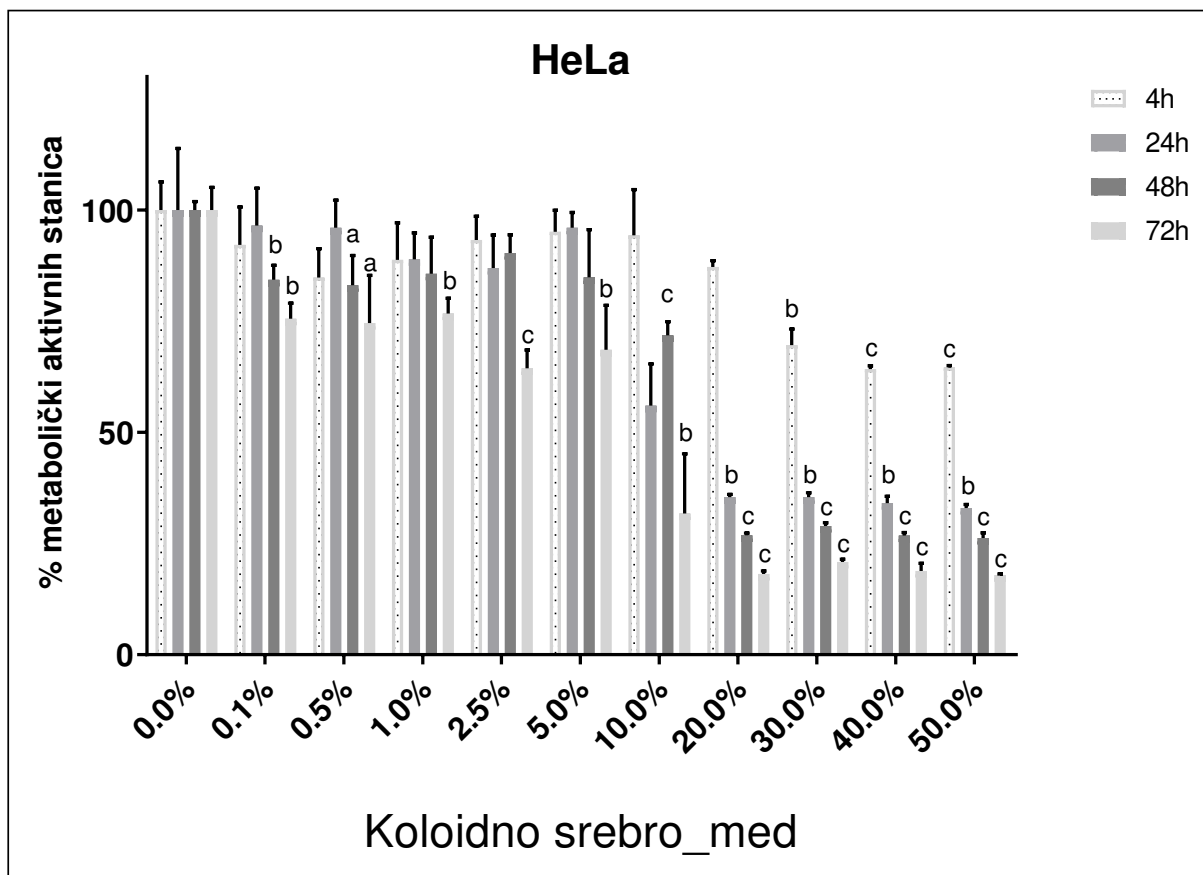
**Slika 12.** Obojenje stanica ljubičastim formazanom

### **3.5. Statistička analiza**

Izmjerene su apsorbancije kontrolnih uzoraka (stanice karcinoma u mediju) i ispitivanih skupina (stanice tretirane otopinom koloidnog srebra proizvedenog u medu). Nakon 4, 24, 48 i 72 sata izračunate su srednje vrijednosti apsorbancije za kontrolne i ispitivane skupine, te su određeni omjeri između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju korištenih ekstrakata u navedenim vremenskim intervalima. Za izračun IC50 vrijednosti i statističku analizu korišten je program GraphPad Prism 8.0, a rezultati su prikazani grafički.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Stanična linija HeLa



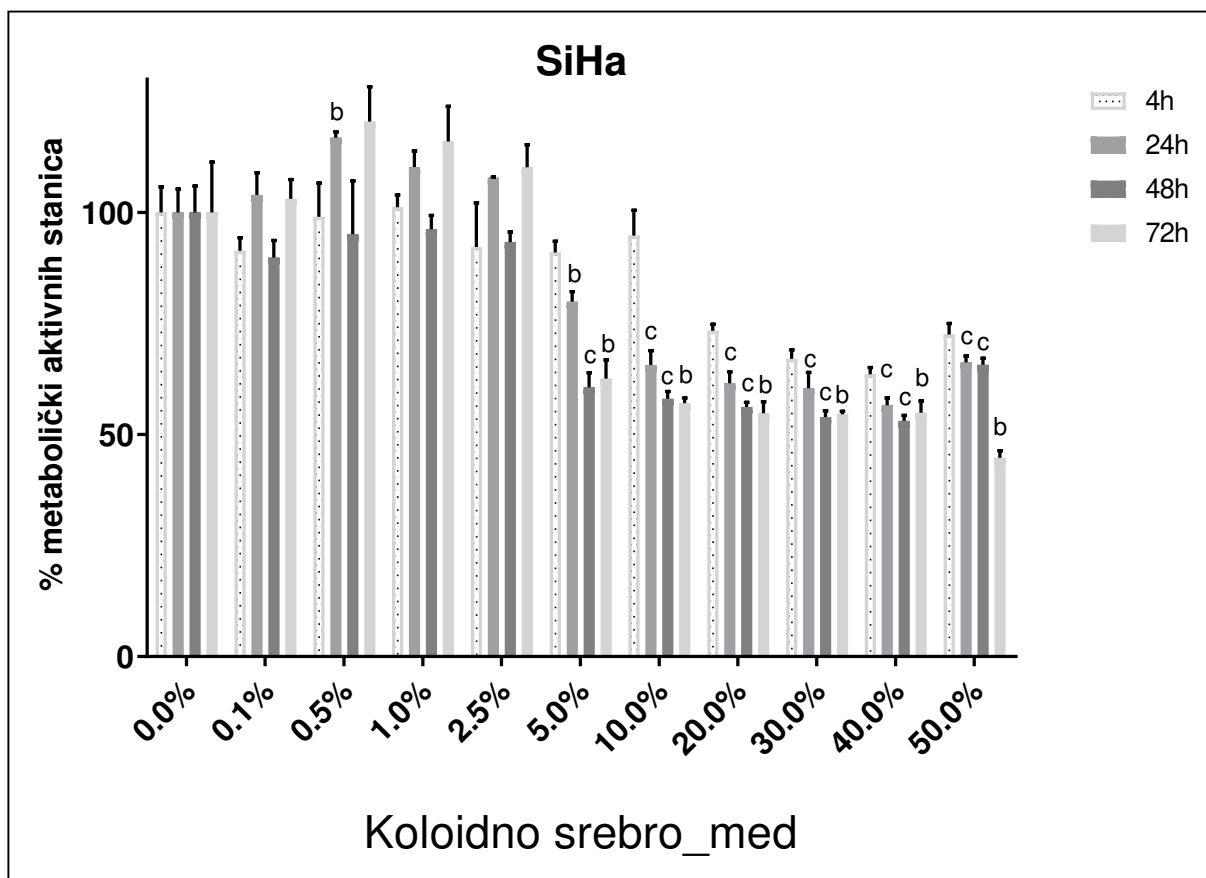
	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	17,51	14,92	5,782

**Slika 13.** Citotoksična aktivnost koloidnog srebra na HeLa stanice, (IC50, postotak koji inhibira rast stanica za 50%; ND, ne može se odrediti; statistički značajna razlika: a,  $P < 0,05$ ; b,  $P < 0,01$ ; c,  $P < 0,001$ ).

Citotoksična aktivnost primijećena je u svim ispitivanim koncentracijama, a značajna citotoksičnost uočena je nakon 24, 48 i 72 sata izloženosti. Vrijednost IC50, koja predstavlja koncentraciju potrebnu za smanjenje metabolizma stanica za 50% iznosila je 17,51%, nakon 24 sata, 14,92% nakon 48 sati te 5,782% nakon 72 sata. IC50 vrijednost nije se mogla odrediti za vremenski interval od 4 sata, jer citotoksični učinak nije bio dovoljno izražen. Najveća citotoksična aktivnost zabilježena je nakon 72 sata pri koncentraciji od 20%, nakon čega daljnje povećanje koncentracije nije rezultiralo značajnim dodatnim smanjenjem metabolizma stanica.



## 4.2. Stanična linija SiHa

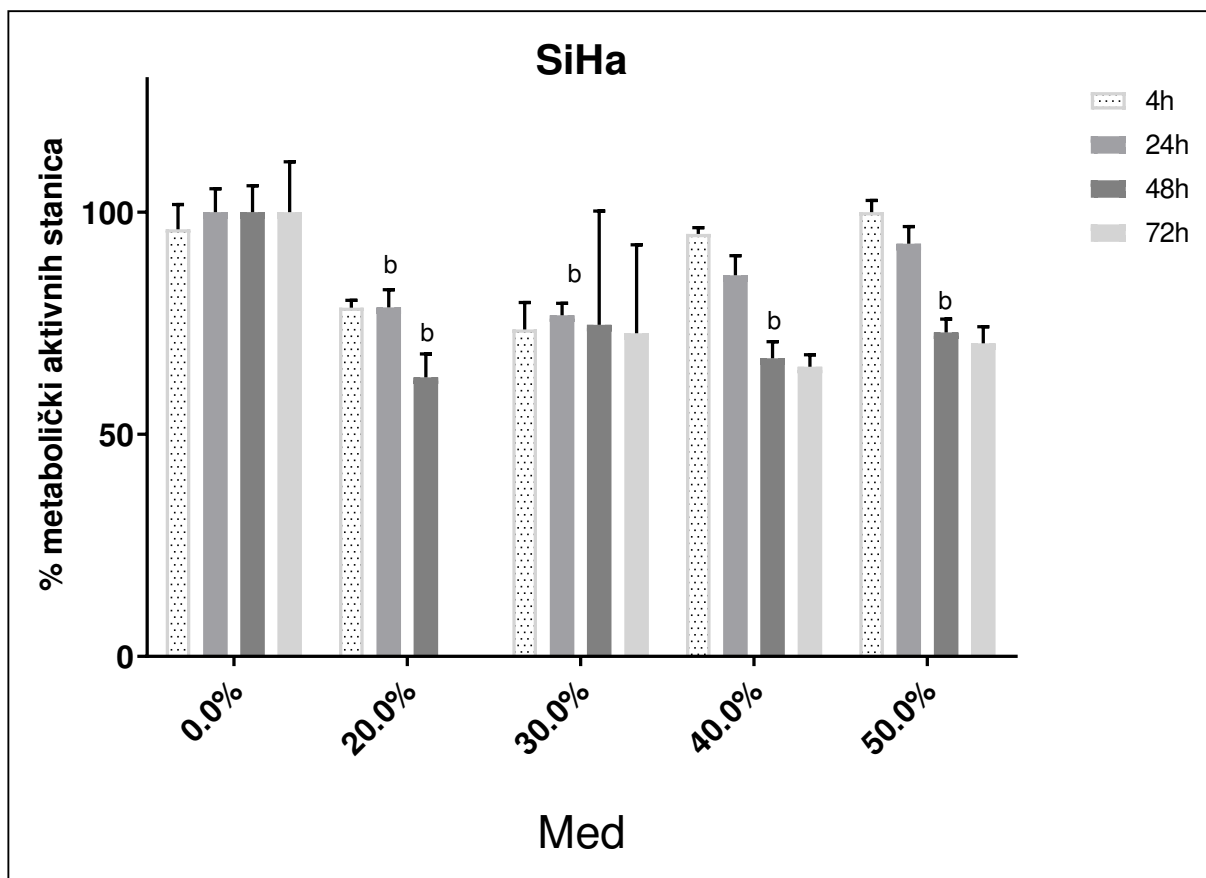


	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	48,77	34,08	30,54

**Slika 14.** Citotoksična aktivnost koloidnog srebra na SiHa stanice, (IC50, postotak koji inhibira rast stanica za 50%; ND, ne može se odrediti; statistički značajna razlika: b,  $P < 0,01$ ; c,  $P < 0,001$ ).

Citotoksični učinak primijećen je pri svim ispitivanim koncentracijama. Značajna citotoksična aktivnost zabilježena je nakon 24, 48 i 72 sata izlaganja. Vrijednost IC50 iznosila je 48,77% nakon 24 sata, 34,08% nakon 48 sati te 30,54% nakon 72 sata. IC50 vrijednost nije se mogla odrediti za vremenski interval od 4 sata, jer citotoksični učinak nije bio dovoljno izražen. Značajna citotoksičnost zabilježena je pri koncentracijama od 20%, 30% i 40% nakon 48 i 72 sata, dok je najveća citotoksična aktivnost opažena pri koncentraciji od 50% nakon 72 sata.

Na staničnoj liniji SiHa proveden je kontrolni eksperiment u kojem su stanice tretirane samo otopinom meda u različitim razrjeđenjima (Slika 15).



	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	ND	ND	ND

**Slika 15.** Citotoksična aktivnost meda na SiHa stanicama, (IC50, postotak koji inhibira rast stanica za 50%; ND, ne može se odrediti; statistički značajna razlika: b, P <0,01).

Citotoksična aktivnost meda zapažena je nakon 48 i 72 sata, s najizraženijim učinkom pri korištenju 40%-tne otopine. Iako med pokazuje inhibicijski učinak na metaboličku aktivnost stanica, pri nijednom razrjeđenju ili vremenskom intervalu njegov učinak nije toliko izražen da bi nadmašio citotoksičnost koloidnog srebra. To sugerira da, iako med ima određeni potencijal za smanjenje stanične aktivnosti, koloidno srebro je učinkovitije u tom pogledu.

## **5. RASPRAVA**

Rak predstavlja vodeći uzrok smrti diljem svijeta. Blizu 20 milijuna novih slučajeva raka zabilježeno je u 2022. godini, uz 9,7 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom. Rak pluća bio je najčešće dijagnosticiran rak u 2022. godini, odgovoran za gotovo 2,5 milijuna novih slučajeva (12,4% svih karcinoma globalno), a slijede ga rak dojke kod žena (11,6%), rak debelog crijeva (9,6%), rak prostate (7,3%) i rak želuca (4,9%). Rak pluća također je bio vodeći uzrok smrti od raka s procijenjenih 1,8 milijuna smrtnih slučajeva. Rak dojke kod žena i rak pluća kod muškaraca bili su najčešći oblici raka, kako po broju dijagnoza, tako i po broju smrtnih slučajeva. Predviđanja temeljena na demografskim trendovima pokazuju da će broj novih slučajeva raka doseći 35 milijuna do 2050. godine. Ulaganje u prevenciju, uključujući ciljanje ključnih čimbenika rizika za razvoj raka (poput pušenja, prekomjerne tjelesne težine, pretilosti i infekcija), moglo bi spriječiti milijune budućih dijagnoza raka i spasiti mnoge živote diljem svijeta, donoseći pritom značajne ekonomske i društvene koristi zemljama u narednim desetljećima (30).

Perzistentne HPV infekcije glavni su faktor rizika za rak grlića maternice. Od preko 200 identificiranih genotipova, HPV tipovi 16 i 18 odgovorni su za 70% slučajeva. Sustavni probir temeljen na citologiji, HPV testiranje i cijepljenje značajno su smanjili incidenciju raka grlića maternice, osobito u razvijenim zemljama (44). PAPA-test je glavna metoda probira za otkrivanje prekanceroznih promjena i ranog stadija raka grlića maternice. Ženama s abnormalnim PAPA-testom preporučuje se kolposkopija, a u slučaju abnormalnih nalaza, i biopsija (45).

Srebrne nanočestice imaju izvanredna fizičko-kemijska i biološka svojstva, što ih čini korisnima u terapiji i dijagnostici raka (46). Biološki sintetizirane srebrne nanočestice iz ljekovitih biljaka sigurne su za ljude i okoliš te mogu zamijeniti štetne terapije poput kemoterapije, zbog njihovih ozbiljnih nuspojava (47). Zeleni pristup sintezi srebrnih nanočestica donosi dodatne prednosti, uključujući poboljšanu obnovu tkiva, isporuku lijekova, dijagnostiku i ekološku prihvatljivost (48).

Med, kao prirodni zaslađivač bogat antioksidansima, pomaže u sprječavanju antioksidativnog stresa, povezanog s brojnim bolestima. Njegova ljekovitost dolazi iz biokemijskih spojeva poput vitamina, fenolnih kiselina i flavonoida (49). Osim toga, med pokazuje antimikrobna, antioksidativna i antitumorska svojstva, inhibirajući rast stanica raka kroz proapoptičke i antiproliferativne mehanizme. Također, med potiče imunološki sustav djelujući protuupalno i imunostimulirajuće, što ga čini važnim u alternativnoj medicini (50).

Cilj ovog istraživanja je ispitati citotoksični učinak koloidnog srebra dobivenog iz meda na stanične linije HeLa i SiHa. *In vitro* istraživanje provedeno na stanicama HeLa i SiHa otkrilo je citotoksične učinke koloidnog srebra. Kod HeLa stanica, već i najniže koncentracije pokazale su blagi učinak. Značajne promjene primijećene su nakon 72 sata izlaganja 10%-tnoj otopini. Najjači učinak zabilježen je nakon najdužeg perioda primjene 20%-tne otopine, dok daljnje povećanje koncentracije nije uzrokovalo bitne razlike u rezultatima.

Rezultati su pokazali da su SiHa stanice imale slabiji odgovor na tretman u usporedbi s HeLa stanicama. Prva značajnija citotoksična aktivnost uočena je primjenom 10%-tne otopine, dok je najveći pad zabilježen pri najvišoj koncentraciji nakon najdužeg vremenskog intervala. Također je testirano djelovanje čistog meda u različitim razrjeđenjima na SiHa stanicama, no učinci nisu bili izraženiji u usporedbi s koloidnim srebrom.

*In vitro* ispitivanja su pokazala da koloidno srebro ima citotoksični učinak na stanične linije karcinoma grlića maternice, pri čemu je citotoksičnost ovisila o koncentraciji koloidnog srebra i trajanju inkubacije. Posebno snažan učinak zabilježen je na HeLa stanicama, što ukazuje na značajan potencijal ovog spoja za daljnja biomedicinska istraživanja u kontekstu liječenja karcinoma. Rezultati su potvrdili početnu hipotezu i ukazali na moguću primjenu koloidnog srebra kao terapijskog sredstva. Iako su rezultati ohrabrujući, nužno je provesti dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se citotoksični učinci koloidnog srebra temeljito potvrdili te razmotrila njegova upotreba u terapiji karcinoma.

## **6. ZAKLJUČAK**

- a) *In vitro* izlaganja stanica karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) koloidnom srebru, proizvedenom uz korištenje meda, rezultiralo je smanjenjem udjela metabolički aktivnih stanica.
- b) Citotoksičnost je bila ovisna o koncentraciji koloidnog srebra i trajanju inkubacije.
- c) Kod HeLa stanica, najizraženiji citotoksični efekt zabilježen je nakon 72 sata pri primjeni 20%-tne otopine koloidnog srebra, dok povećanje koncentracije nije imalo značajan utjecaj na broj metabolički aktivnih stanica.
- d) Slabiji citotoksični učinak primijećen je na SiHa stanicama, s najjačim učinkom nakon 72 sata korištenjem 50%-tne otopine.
- e) Med sam po sebi nije pokazao izraženiji citotoksični učinak u usporedbi s koloidnim srebrom na testiranim stanicama.
- f) Rezultati potvrđuju citotoksični učinak koloidnog srebra, no potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se detaljno proučili mehanizmi djelovanja te potvrdila njegova primjena u kliničkom okruženju.
- g) Istraživanje otvara mogućnost upotrebe koloidnog srebra u kombiniranoj terapiji, no sigurnost i učinkovitost treba dodatno procijeniti.

## **7. LITERATURA**



1. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. *Biologija raka U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 2-3.*
2. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; *Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 726-728.*
3. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Novotvorine. U: Raić A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 164.*
4. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. *Biologija raka U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 4.*
5. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; *Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 739.*
6. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. *Biologija raka: Onkogeni. U: Raić A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 4-5.*
7. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garpis N, i sur. *Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. Anticancer Res. 2020;40(11):6009-6015.*
8. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; *Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 743-745.*
9. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; *Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 745-747.*
10. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. *Biologija raka: Onkogeni. U: Raić A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 7-8.*
11. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; *Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 752-754.*
12. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. *Biologija raka: Tumorsupresorski geni. U: Raić A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 8–11.*
13. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Novotvorine. U: Raić A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 186-187.*

14. Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. *Curr Probl Cancer*. 2018;42:457-465.
15. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med*. 2018;7:5217-5236.
16. <https://necurak.hzjz.hr/za-zene/papa-test/> , datum pristupa: 12.9.2024.
17. Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, Nath A, Das D, Basu A, Malik S, Kumar L, Kar S, Singh SK, Upadhye VJ, Iqbal D, Almojam S, Roychoudhury S, Ojha S, Ruokolainen J, Jha NK, Kesari KK. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2022;174:103675.
18. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020;10:3116.
19. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)*. 2019;5:384.
20. HPV infekcija – simptomi, liječenje i cijepljenje [Internet]. [pristupljeno 14.9.2024.]. Dostupno na: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/10129/HPV-infekcija-simptomi-lijecenje-i-cijepljenje.html#13203>
21. Ellingson MK, Sheikha H, Nyhan K, Oliveira CR, Niccolai LM. Human papillomavirus vaccine effectiveness by age at vaccination: A systematic review. *Hum Vaccin Immunother*. 2023;19:2239085
22. Sankaranarayanan R. HPV vaccination: The most pragmatic cervical cancer primary prevention strategy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;131 Suppl 1:S33-5.
23. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori ženskog spolnog sustava: Rak vrata maternice. U: Raič A, urednik. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 178.
24. Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, i sur. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017;123:2404-2412.
25. Gopu P, Antony F, Cyriac S, Karakasis K, Oza AM. Updates on systemic therapy for cervical cancer. *Indian J Med Res*. 2021;154:293-302.
26. Li H, Wu X, Cheng X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. 2016;27:e43.
27. Ferrall L, Lin KY, Roden RBS, Hung CF, Wu TC. Cervical Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2021;27:4953-4973.

28. Yadav A, Yadav S, Alam MA. Immunotherapies landscape and associated inhibitors for the treatment of cervical cancer. *Med Oncol*. 2023;40:328.
29. World Health Organisation - Cervical cancer [Internet]. [pristupljeno 16.9.2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Overview,-%20and%20middle-income%20countries>
30. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74:229-263.
31. Rak vrata maternice – epidemiološki podaci [Internet]. [pristupljeno 16.9.2024.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/>
32. Abram SL, Fromm KM. Handling (Nano)Silver as Antimicrobial Agent: Therapeutic Window, Dissolution Dynamics, Detection Methods and Molecular Interactions. *Chemistry*. 2020;26:10948-10971.
33. Sim W, Barnard RT, Blaskovich MAT, Ziora ZM. Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–2017). *Antibiotics (Basel)*. 2018;7:93.
34. Wani IA, Ahmad T, Khosla A. Recent advances in anticancer and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using phytochemicals and organic polymers. *Nanotechnology*. 2021;32.
35. Hembram KC, Kumar R, Kandha L, Parhi PK, Kundu CN, Bindhani BK. Therapeutic prospective of plant-induced silver nanoparticles: application as antimicrobial and anticancer agent. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46:S38-S51.
36. Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Uses of Natural Honey in Cancer: An Updated Review. *Adv Pharm Bull*. 2022;12:248-261.
37. Waheed M, Hussain MB, Javed A, Mushtaq Z, Hassan S, Shariati MA, Khan MU, Majeed M, Nigam M, Mishra AP, Heydari M. Honey and cancer: A mechanistic review. *Clin Nutr*. 2019;38:2499-2503.
38. Forma E, Bryś M. Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. *Nutrients*. 2021;13:2594.
39. Chan-Zapata I, Segura-Campos MR. Honey and its protein components: Effects in the cancer immunology. *J Food Biochem*. 2021;45:e13613.
40. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*. 2014;19:2497-522.

41. Fauzi AN, Norazmi MN, Yaacob NS. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:871-8.
42. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol.* 2011;716:157-68.
43. Cell Viability Assays [Internet]. [pristupljeno 3.10.2024.].  
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
44. Viveros-Carreño D, Fernandes A, Pareja R. Updates on cervical cancer prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 2023;33:394-402.
45. Sachan PL, Singh M, Patel ML, Sachan R. A Study on Cervical Cancer Screening Using Pap Smear Test and Clinical Correlation. *Asia Pac J Oncol Nurs.* 2018;5:337-341.
46. Li Y, Chang Y, Lian X, Zhou L, Yu Z, Wang H, An F. Silver Nanoparticles for Enhanced Cancer Theranostics: *In Vitro* and *In Vivo* Perspectives. *J Biomed Nanotechnol.* 2018;14:1515-1542.
47. Sharma R, Srivastava N. Plant Mediated Silver Nanoparticles and Mode of Action in Cancer Therapy: A Review. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021;21:1793-1801.
48. Mishra V, Nayak P, Singh M, Tambuwala MM, Aljabali AA, Chellappan DK, Dua K. Pharmaceutical Aspects of Green Synthesized Silver Nanoparticles: A Boon to Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021;21:1490-1509.
49. Zawawi N, Chong PJ, Mohd Tom NN, Saiful Anuar NS, Mohammad SM, Ismail N, Jusoh AZ. Establishing Relationship between Vitamins, Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities in Various Honey Types. *Molecules.* 2021;26:4399.
50. Masad RJ, Haneefa SM, Mohamed YA, Al-Sbiei A, Bashir G, Fernandez-Cabezudo MJ, Al-Ramadi BK. The Immunomodulatory Effects of Honey and Associated Flavonoids in Cancer. *Nutrients.* 2021;13:1269.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak koloidnog srebra, dobivenog u medu, na stanice karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa).

**Materijali i metode:** Citotoksičnost je ispitivana MTT metodom, kojom se procjenjuje udio metabolički aktivnih stanica nakon tretmana koloidnim srebrom dobivenim iz meda. Uzorci su pripremljeni u različitim koncentracijama: 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. Učinci tretmana procjenjivani su nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost uzoraka određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 570 nm.

**Rezultati:** Grafički su prikazani rezultati koji prikazuju odnos između postotka metabolički aktivnih stanica i vremena inkubacije te koncentracije uzoraka. Istraživanje je potvrdilo da koloidno srebro proizvedeno u medu ima značajan citotoksični učinak na stanice karcinoma grlića maternice, posebno na staničnu liniju HeLa, dok je učinak na SiHa stanice bio nešto slabiji. Kod HeLa stanica, najizraženiji citotoksični učinak zabilježen je nakon 72 sata tretmana s 20%-tnom otopinom koloidnog srebra, pri čemu daljnje povećanje koncentracije nije značajno smanjilo broj metabolički aktivnih stanica. S druge strane, kod SiHa stanica najveći pad broja metabolički aktivnih stanica zabilježen je nakon 72 sata primjene 50%-tne otopine. Vrijednosti IC50 mogle su se odrediti za vremenske intervale od 24, 48 i 72 sata.

**Zaključci:** *In vitro* izlaganje stanica karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) koloidnom srebrom rezultira smanjenjem njihove održivosti. Citotoksičnost je ovisila o koncentraciji koloidnog srebra i duljini inkubacije, pri čemu su najjači učinci zabilježeni nakon 72 sata tretmana i primjene većih koncentracija. Potencijal citotoksičnog djelovanja je potvrđen, no potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdila učinkovitost.

## **9. SUMMARY**

**Diploma theses title:** Examination of the Cytotoxic Effect of Colloidal Silver Produced Using Honey on Cervical Cancer Cells

**Objectives:** The aim of this study was to examine the cytotoxic effect of colloidal silver, produced using honey, on cervical cancer cells (HeLa and SiHa).

**Materials and methods:** Cytotoxicity was assessed using the MTT assay, which evaluates the proportion of metabolically active cells after treatment with colloidal silver derived from honey. Samples were prepared in different concentrations: 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. The effects of treatment were evaluated after 4, 24, 48, and 72 hours. The effectiveness of the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at a wavelength of 570 nm.

**Results:** The results are presented graphically, showing the relationship between the percentage of metabolically active cells and the incubation time and the sample concentration. The study confirmed that colloidal silver produced using honey exhibits significant cytotoxic effects on cervical cancer cells, especially the HeLa cell line, while the effect on SiHa cells was somewhat weaker. In HeLa cells, the most pronounced cytotoxic effect was observed after 72 hours of treatment with a 20% colloidal silver solution, where further increases in concentration did not significantly reduce the number of metabolically active cells. On the other hand, in SiHa cells, the greatest decrease in the number of metabolically active cells was observed after 72 hours of treatment with a 50% solution. IC<sub>50</sub> values were determined for the time intervals of 24, 48, and 72 hours.

**Conclusions:** *In vitro* exposure of cervical cancer cells (HeLa and SiHa) to colloidal silver resulted in a reduction in their viability. Cytotoxicity depended on the concentration of colloidal silver and the incubation time, with the strongest effects observed after 72 hours of treatment and at higher concentrations. The potential cytotoxic effect was confirmed, but further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to verify its effectiveness.



## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Dora Mađor

**Datum rođenja:** 17.1.2000.

**Mjesto rođenja:** Zagreb, Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:**

**e-mail:** [↓](#)

## **OBRAZOVANJE:**

- 2006. – 2014. Osnovna škola Dinka Šimunovića, Hrvace
- 2014. – 2018. Zdravstvena škola Split, Split
- Kolovoz 2018. – Kolovoz 2019. Pripravnički staž u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Solin
- 2019. – 2024. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, studij Farmacija
- Veljača 2024. – Kolovoz 2024. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Sućidar

## **RADNO ISKUSTVO:**

- Svibanj 2020. – veljača 2024. Ispomoć u proizvodnji – Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, Galenski laboratorij

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik - C2 razina

**Vozačka dozvola:** B kategorija