

Ispitivanje citotoksičnog djelovanja koloidnog srebra proizvedenog u medu na stanice karcinoma mokraćnog mjehura

Dadić, Anita

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:171:768531>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anita Dadić

**ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA KOLOIDNOG
SREBRA PROIZVEDENOG U MEDU NA STANICE KARCINOMA
MOKRAĆNOG MJEHURA**

Diplomski rad

Akadska godina:

2023./2024.

Mentor:

Prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2024.

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija
Tema rada prihvaćena je na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 24. sjednici Fakultetskog 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 mokraćnog mjehura
Anita Dadić, broj indeksa 201905

Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksično djelovanje koloidnog srebra proizvedenog u medu na staničnim linijama humanih karcinoma mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP linijama). Korištene su otopine srebra u koncentracijama od 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50%, kojima su se tretirale stanice karcinoma u različitim vremenskim intervalima od 4, 24, 48 i 72 sata. Citotoksičnost se određivala MTT metodom. Omjer apsorbancije stanica tretiranih otopinama srebra i apsorbancije stanica koje nisu tretirane, pokazuje citotoksičnu aktivnost koloidnog srebra. Najveći citotoksični učinak na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura imaju otopine srebra u koncentracijama od 10%, 20%, 30%, 40% i 50% nakon 72 sata inkubacije. Najveći citotoksični učinak na staničnu liniju TCCSUP karcinoma mokraćnog mjehura uočen je pri koncentraciji srebra od 50% nakon 24 sata inkubacije. Djelovanje koloidnog srebra nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije te u nekim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Dobivenim rezultatima potvrđen je citotoksični učinak koloidnog srebra, a sljedeći korak je potvrda tih učinaka u *in vivo* ispitivanjima na karcinomima mokraćnog mjehura kod životinjskih modela.

Ključne riječi: koloidno srebro, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

Rad sadrži: 47 stranica, 13 slika, 3 tablice i 45 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr.sc. Doris Rušić, predsjednik
2. doc. dr.sc. Jasminka Omerović, član
3. prof. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 24.10.2024.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University of Split School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject: was accepted at the session of the Pharmacy Study Council and confirmed at the 35th session of the Faculty Council of the Faculty of Chemical Technology and the 24th session of the Faculty Council of the Faculty of Medicine.

Mentor: Prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD
Technical assistance: Sandra Marijan, PhD, mag. for. chem. mol. biol.

Investigation of the cytotoxic effects of colloidal silver generated in honey on bladder carcinoma cells
Anita Dadić, index number 201905

Summary:

The aim of the research was to examine the cytotoxic effect of colloidal silver produced in honey on human bladder cancer cell lines (T24 and TCCSUP lines). Solutions of silver were used in concentrations of 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%, which treated the cancer cells at different time intervals of 4, 24, 48, and 72 hours. Cytotoxicity was determined using the MTT method. The ratio of absorbance of cells treated with silver solutions to the absorbance of untreated cells shows the cytotoxic activity of colloidal silver. The highest cytotoxic effect on the T24 bladder cancer cell line was observed with silver solutions at concentrations of 10%, 20%, 30%, 40%, and 50% after 72 hours of incubation. The highest cytotoxic effect on the TCCSUP bladder cancer cell line was noted at a silver concentration of 50% after 24 hours of incubation. The effect of colloidal silver is not always proportional to the increase in concentration and incubation time, and in some cases, recovery of cells occurs. The results confirm the cytotoxic effect of colloidal silver, and the next step is to validate these effects in *in vivo* studies on bladder cancers in animal models.

Keywords: colloidal silver, cancer, cytotoxicity, MTT assay

Thesis contains: 47 pages, 13 figures, 3 tables, 45 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assist. Prof. Doris Rušić, PhD, chair person
2. Assist. Prof. Jasminka Omerović, PhD, member
3. Prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member – supervisor

Defence date: 24.10.2024.

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 2A.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. TUMORI	2
1.2. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI	2
1.3. EPIDEMIOLOGIJA RAKA.....	4
1.4. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	5
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	5
1.4.2. KLINIČKA SLIKA	7
1.4.3. DIJAGNOZA	8
1.4.4. KLASIFIKACIJA	9
1.4.5. LIJEČENJE	9
1.5. KOLOIDNO SREBRO	10
1.6. MED	11
1.7. FLAVONOIDI I FENOLNI SPOJEVI.....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. STANIČNE LINIJE.....	17
3.1.1. T24 STANIČNA LINIJA	17
3.1.2. TCCSUP STANIČNA LINIJA.....	18
3.2. KOLOIDNO SREBRO PROIZVEDENO U MEDU.....	19
3.3. POSTUPAK.....	19
3.3.1. STANIČNA KULTURA.....	19
3.3.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA	20
3.3.3. TRETIRANJE STANICA KARCINOMA KOLOIDNIM SREBROM.....	21
3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)	21
3.5. STATISTIČKA ANALIZA.....	22
4. REZULTATI	23
4.1. STANIČNA LINIJA T24.....	24
4.1.1. KOLOIDNO SREBRO PROIZVEDENO U MEDU.....	24
4.2. STANIČNA LINIJA TCCSUP	26
4.2.1. KOLOIDNO SREBRO PROIZVEDENO U MEDU.....	26

4.2.2.	MED	28
5.	RASPRAVA.....	30
6.	ZAKLJUČAK	34
7.	LITERATURA	36
8.	SAŽETAK	41
9.	SUMMARY.....	43
10.	ŽIVOTOPIS	45

ZAHVALA

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, bratu i sestri na pruženoj ljubavi i bezrezervnoj podršci koju mi pružaju čitav moj život, što su me uvijek poticali i podržavali u svim mojim odlukama i usmjeravali me na ispravan put. Hvala na svakom savjetu i potpori, što ste me dizali nakon svakog mogeg pada, bili uz mene i bili moj izvor snage i ljubavi.

Zahvaljujem svojim prijateljima što su mi obogatili i razveselili studentske dane i uvijek mi bili podrška. Hvala vam što ste bili moje sunce i moj blagoslov.

Zahvaljujem i svojoj mentorici, profesorici Vedrani Čikeš Čulić, na prenesenom znanju koje je nesebično dijelila i što me svojom strpljivošću, pomoći i razumijevanjem pratila pri pisanju ovog diplomskog rada.

Naposljetku, zahvaljujem Onome bez koga ništa od ovog ne bi bilo moguće. Onome koji je moja hrid i utjeha.

„Prepusti Gospodinu putove svoje, u Njega se uzdaj i On će sve voditi.“

(Ps 37, 5)

1. UVOD

1.1. TUMORI

Tumori (lat. *tumor*- oteklina) ili neoplazme patološke su tvorbe nastale prekomjernom proliferacijom abnormalnih stanica. Njihov rast nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a karakteriziraju ga nesvrhovitost, autonomnost, nepravilnost, neorganiziranost te je parazitski. Tumori se klinički klasificiraju na dobroćudne i zloćudne [1]. Dobroćudni (benigni) tumori rastu ekspanzivno i ograničeni su na organ u kojem su nastali ne šireći se po tijelu. Svojim rastom pritišću okolno tkivo i dovode do stvaranja čahure. Dobro su opskrbljeni krvlju, stoga nemaju područja nekroze ili površinske ulceracije. Građeni su od dobro diferenciranih stanica nalik na zdrave stanice tkiva ili organa u kojem su nastali. Dobroćudni tumori ne uzrokuju sistavne simptome, bitno ne ugrožavaju zdravlje i imaju povoljan klinički ishod. Zloćudni (maligni) tumori nepravilnog su oblika i oštih rubova. Rast im je infiltrativan i mnogo brži od rasta benignih tumora. Razaraju tkivo organa u kojem nastaju i prodiru u okolna tkiva. Krvlju ili limfom mogu se proširiti i na druge dijelove tijela, odnosno metastaziraju (grč. *metastasis*-promjena mjesta). Zloćudni su tumori građeni od atipičnih stanica i ne nalikuju na stanice tkiva ili organa u kojima je tumor nastao. Često se ne mogu u cijelosti kirurški ukloniti pa zato recidiviraju nakon operacije. Mogu izazvati sistemske simptome, ugrožavaju zdravlje, a naposljetku mogu dovesti i do smrti [1].

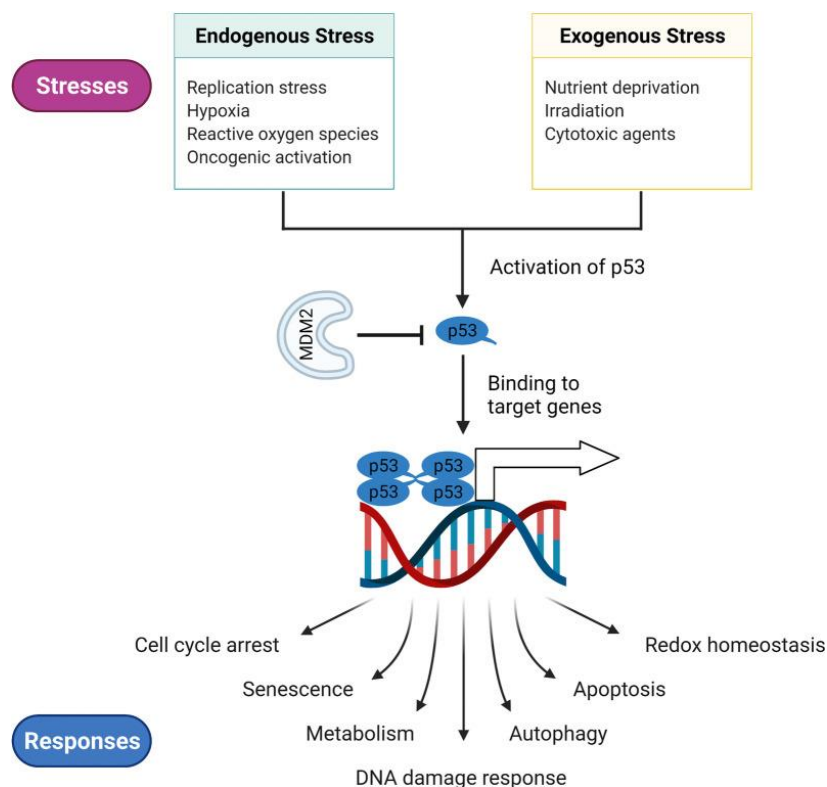
Glavne karakteristike progresije od normalne do maligne stanice su neprestana stanična proliferacija, nedostatak usporavanja proliferacije, smanjena funkcija apoptoze, nedostatak ograničenosti proliferacije, novonastali krvotok (neoangiogeneza), sposobnost invazije, metastaziranja i kolonizacije udaljenih organa [2].

1.2. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI

Onkogeni su geni koji uzrokuju zloćudne novotvorine. Celularni su onkogeni mutacije normalnih staničnih gena nazvanih protoonkogenima. Protoonkogeni proteini, nastali od aktiviranih protoonkogeni, dijele se na čimbenike rasta (EGF, FGF), receptore za čimbenike rasta (R-EGF), signalne molekule (RAS, SRC), molekule koje se vežu za DNA (FOS-JUN) i regulatore mitotičkog ciklusa (ciklin D). Protoonkogeni mogu djelovati kao

onkogeni u abnormalnim uvjetima ili se mutacijom pretvoriti u onkogene. Do nastanka funkcionalnih onkogenata dovode točkaste mutacije (mutacija gena *RAS* porodice), prekomjerno izražavanje, translokacija (prijelomi kromosoma koji dovode do translokacije odlomljenih dijelova) i insercija virusnog gena [3].

Geni koji zaustavljaju rast tumora djelujući kao antionkogeni i suprimirajući prekomjernu proliferaciju stanica nazivaju se tumor-supresorskim genima. Ako se ovi geni izgube delecijom ili izgube svoju funkciju uzrokovanu mutacijom dolazi do neoplastične pretvorbe stanica. Dva najvažnija tumor-supresorska gena su *RB-1* i *TP53*. *RB-1* gen ima značajne regulatorne funkcije i koči staničnu diobu. Nakon mutacije ili inaktivacije jednog *RB-1* gena ništa se ne dogodi. No ako dođe do inaktivacije drugog alela ili njegove delecije na kromosomu razvije se tumor [3]. *TP53* je tumor-supresorski gen koji je mutiran u više od polovice svih vrsta tumora kod ljudi. Mutacije ovoga gena umanjuju njegovu antitumorsku aktivnost i daju mu onkogenata svojstva (Slika 1) [4].

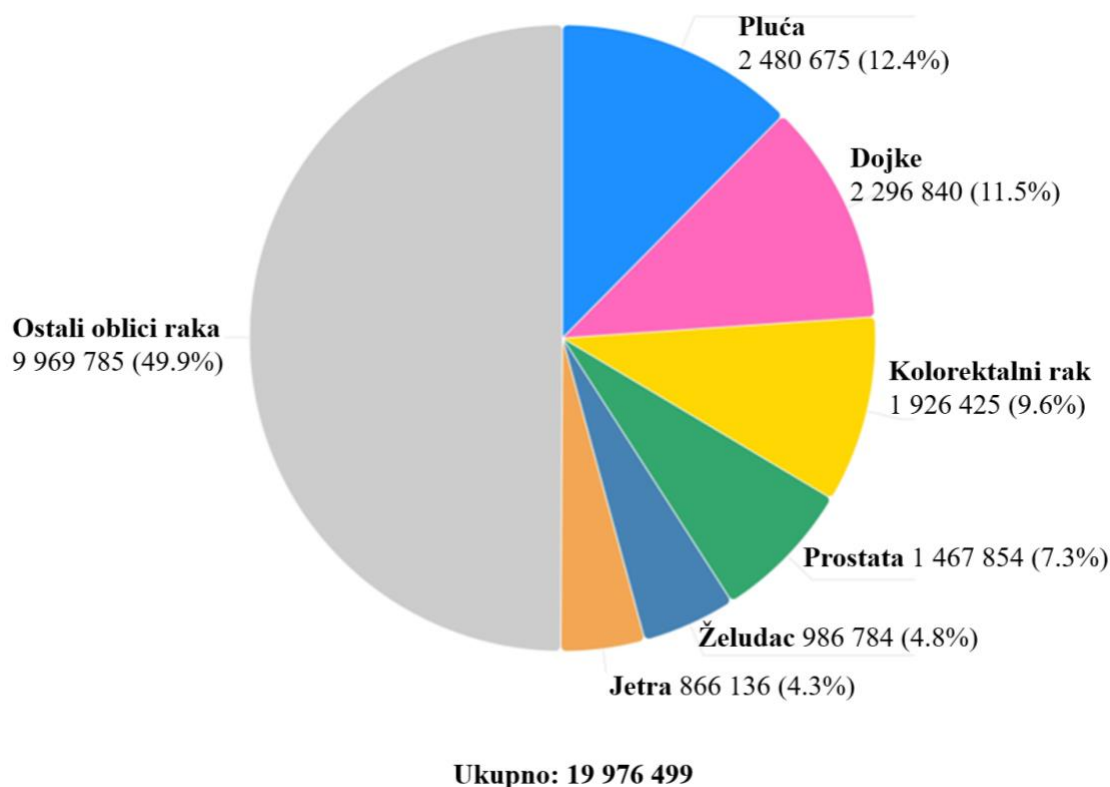


Slika 1. Funkcija TP53 u normalnim stanicama

Preuzeto s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34583722/>

1.3. EPIDEMIOLOGIJA RAKA

Rak pluća najčešće je dijagnosticiran rak u svijetu u 2022. godini. Slijedi rak dojke, kolorektalni rak i rak prostate (Slika 2). Najčešći uzroci smrti bili su rak pluća (18,7%), kolorektalni rak (9,3%), rak jetre (7,8%), rak dojke (6,8%) i rak želudca (6,8%) [5]. U Hrvatskoj je u 2021. godini zabilježeno 23834 novih dijagnoza raka pri čemu se radi o 5,2% većem broju nego u 2020. godini. Najčešća sijela raka kod muškaraca u 2020. godini u Hrvatskoj bila su rak prostate (18%), rak dušnika, bronha i pluća (17%), rak debelog i završnog crijeva (16%), rak mokraćnog mjehura i drugog dijela urotelnog sustava (6%) i rak bubrega (4%). Kod žena najčešća sijela bila su rak dojke (25%), rak debelog i završnog crijeva (13%), rak dušnika, bronha i pluća (10%), rak tijela maternice (6%) i rak štitnjače (5%) [6].



Slika 2. Incidencija raka u svijetu u 2022. godini

Preuzeto i modificirano s: <https://gco.iarc.who.int/today/en>

1.4. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

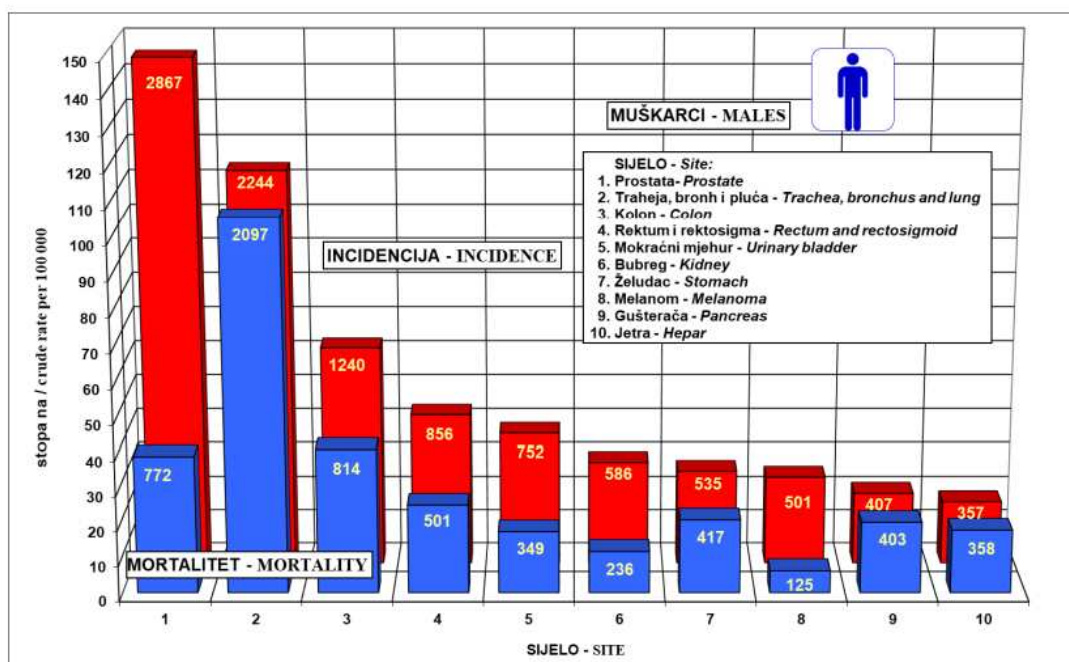
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Rak mokraćnog mjehura 9. je najčešće dijagnosticiran rak u svijetu. Šesti je najčešći rak kod muškaraca i 17. najčešći rak kod žena. U 2022. godini dijagnosticirano je više od 614298 slučajeva raka mokraćnog mjehura. Incidencija i stopa raka mokraćnog mjehura u 2022. godini prikazane su u Tablici 1 [7]. U 2018. godini u Hrvatskoj je dijagnosticirano 1019 novih slučajeva oboljelih od raka mokraćnog mjehura. Rak mokraćnog mjehura predstavlja 5% ukupne incidencije od malignih bolesti u muškoj populaciji u Hrvatskoj, dok kod žena čini 2% ukupne incidencije (Slika 3) [8]. Oko 82% slučajeva raka mokraćnog mjehura može se pripisati promjenjivim čimbenicima rizika. Čimbenici rizika koji utječu na nastanak tumora su duhanski dim, spol, dob, genetika, infekcije i patogeni, profesionalna izloženost i izloženost okolišu, dijeta, medicinska bolest i pretilost [9].

Tablica 1. Incidencija i stopa raka mokraćnog mjehura u 2022. godini

Preuzeto i modificirano s: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/>

Rang	Zemlja	Broj	ASR/100.000
	Svijet	614,298	5.6
1	Kina	92,883	3.4
2	Sjedinjene Američke Države	80,404	10.5
3	Italija	34,580	18.1
4	Japan	34,568	7.0
5	Njemačka	29,035	12.4
6	Velika Britanija	23,643	13.4
7	Indija	22,548	1.6
8	Španjolska	21,418	19.3
9	Francuska (metropolitanska)	19,733	10.1
10	Ruska Federacija	19,352	6.9



Slika 3. Najčešća sijela raka u hrvatskoj 2018. godine prema spolu

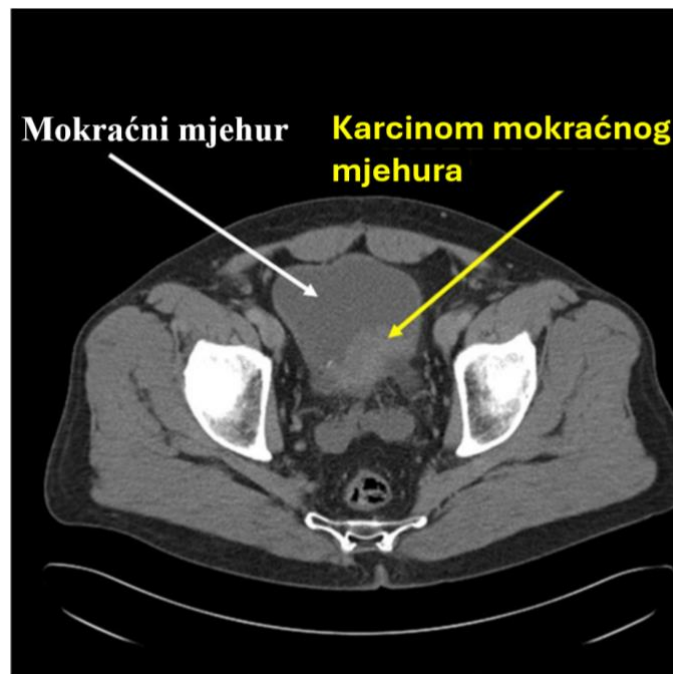
Preuzeto s: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/12/Bilten_2018_final.pdf

1.4.2. KLINIČKA SLIKA

Najčešća klinička prezentacija tumora mokraćnog mjehura je asimptomatska hematurija koja bi trebala potaknuti procjenu cistoskopijom, testiranje bubrežne funkcije i pregled gornjih dijelova urinarnog trakta kod osoba starijih od 35 godina [10]. Ostali najčešći simptomi tumora mokraćnog mjehura su učestalo mokrenje, bol i peckanje tijekom mokrenja, nagon za mokrenjem i kada mjehur nije pun i učestalo mokrenje tijekom noći. Kada se tumor proširi na okolna tkiva ili metastazira drugdje po tijelu često se javlja bol u abdomenu, nemogućnost mokrenja, bol u donjem dijelu leđa na jednoj strani tijela, bol ili osjetljivost kostiju, nenamjeren gubitak težine i gubitak apetita, oticanje stopala i osjećaj umora [11].

1.4.3. DIJAGNOZA

Jedan od načina testiranja raka mokraćnog mjehura je provjera krvi u mokraći (hematurija). Krv u urinu obično je uzrokovana problemima nepovezanim sa rakom, poput infekcija, ali može biti i jedan od prvih znakova raka. Analiza urina može otkriti i male količine krvi u urinu i može pomoći u ranom otkrivanju nekih vrsta raka mokraćnog mjehura [12]. Također, neki testovi urina se mogu koristiti za otkrivanje specifičnih tvari koje proizvode stanice raka (biomarkeri) koji zajedno sa citologijom urina pomažu u dijagnosticiranju raka [13]. No rak mokraćnog mjehura se obično identificira teleskopskom provjerom mokraćnog mjehura (cistoskopijom) [14]. Cistoskopija pomaže u dijagnosticiranju, a ponekad i liječenju raka i drugih stanja. Tijekom cistoskopije moguće je izvršiti i biopsiju, odnosno uzeti uzorak stanica ili tkiva iz mokraćnog mjehura kako bi patolog mogao provjeriti postoje li znakovi raka. Za vrijeme biopsije moguće je ukloniti i cijeli tumor [15]. Nadalje, rak mokraćnog mjehura moguće je dijagnosticirati i CT urografijom (Slika 4) [16], magnetnom rezonancijom, ultrazvukom i intravenskim pijelogramom [13].



Slika 4. Rak mokraćnog mjehura prikazan CT urografijom

Preuzeto i modificirano s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28786480/>

1.4.4. KLASIFIKACIJA

Urotelni karcinom, nazvan i karcinom prijelaznih stanica, je rak koji počinje u urotelnim stanicama koje oblažu uretru, mjehur, uretere, bubrežnu zdjelicu i neke duge organe. Gotovo svi karcinomi mokraćnog mjehura su ovoga tipa. Budući da urotelne stanice mogu mijenjati svoj oblik rastežući se ili skupljajući ovisno o napunjenosti mjehura urinom, još se nazivaju i prijelazne stanice. Ostali manje česti karcinomi mokraćnog mjehura su karcinom skvamoznih stanica, adenokarcinom i karcinom malih stanica. Karcinome mokraćnog mjehura moguće je opisati i kao neinvazivne ili mišićno-invazivne. Neinvazivni rak mokraćnog mjehura je rak koji nije dosegao mišićnu stjenku i većina karcinoma su neinvazivnog tipa. Mišićno-invazivni rak je rak koji se proširio kroz sluznicu mokraćnog mjehura do mišićne sluznice ili izvan nje [17].

1.4.5. LIJEČENJE

Prije započinjanja liječenja raka mokraćnog mjehura, kako bi se odabrao najbolji način liječenja, u razmatranje se uzimaju čimbenici kao što su stadij i stupanj raka, cjelokupno zdravlje pacijenta i njegove sklonosti. Jedan od glavnih načina liječenja raka je operacija. Operacije koje se provode u liječenju raka su transuretralna resekcija (uklanjanje tumora), djelomična cistektomija (uklanjanje dijela mokraćnog mjehura) i radikalna cistektomija s urinarnom diverzijom (uklanjanje mjehura i svih limfnih čvorova i obližnjih organa koji sadrže rak) [18]. Liječenje raka može se provoditi i terapijom zračenjem koja koristi zračenje visoke energije za ubijanje stanica raka. Terapija zračenjem može se koristiti kao dio liječenja ranih stadija raka mokraćnog mjehura, kao dio liječenja za osobe koje ne mogu imati (ili ne žele) cistektomiju, kao dio liječenja uznapredovalog karcinoma koji se proširio izvan mjehura i za sprječavanje ili liječenje simptoma uznapredovalog karcinoma [19]. Budući da proizvodi dugoročnu kontrolu bolesti uz očuvanje normalne funkcije mokraćnog mjehura, radioterapija je učinkovit tretman za odabrane pacijente. Suvremene tehnike liječenja radioterapijom nude potencijal za poboljšanje stope izlječenja i smanjenje nuspojava [20]. Terapija zračenjem može imati značajnu ulogu u liječenju neinvazivnog raka mokraćnog mjehura smanjenjem vjerojatnosti lokalnog recidiva i sprječavanjem ili odgađanjem cistektomije [21]. Nadalje, rak je moguće liječiti i kemoterapijom, odnosno upotrebom lijekova. Kemoterapija se može dati

intravezikalno ili sistemski. Intravezikalnom terapijom lijek se stavlja u mokraćni mjehur. Ova vrsta kemoterapije se najčešće koristi za rak mokraćnog mjehura koji nije duboko zahvatio sluznicu mjehura. Sistemska kemoterapija obuhvaća primjenu lijeka u obliku tablete, ubrizgavanjem u venu ili ubrizgavanjem u mišić zbog čega može djelovati na stanice raka bilo gdje u tijelu. Sistemska kemoterapija se može koristiti prije operacije kao neoadjuvantna terapija kako bi se pokušalo smanjiti tumor i olakšati njegovo uklanjanje i kao adjuvantna terapija nakon operacije ili zračenja s ciljem da ubije sve stanice raka koju mogu ostati nakon drugih tretmana i time smanjiti vjerojatnost da rak kasnije recidivira. Sistemska kemoterapija se daje u ciklusima, a nakon svakog razdoblja liječenja slijedi razdoblje odmora kako bi se tijelu dalo vremena za oporavak. Neki od najčešćih lijekova koji se koriste za liječenje karcinoma mokraćnog mjehura su gemcitabin, cisplatin, karboplatin, paklitaksel, docetaksel, metotreksat, vinblastin i 5-fluorouracil [22]. Kombinacija lijekova za kemoterapiju s inhibitorima imunoloških kontrolnih točaka, konjugatima protutijelo-lijek i inhibitorima VEGF potencijalno povećava stopu odgovora i preživljenje [23].

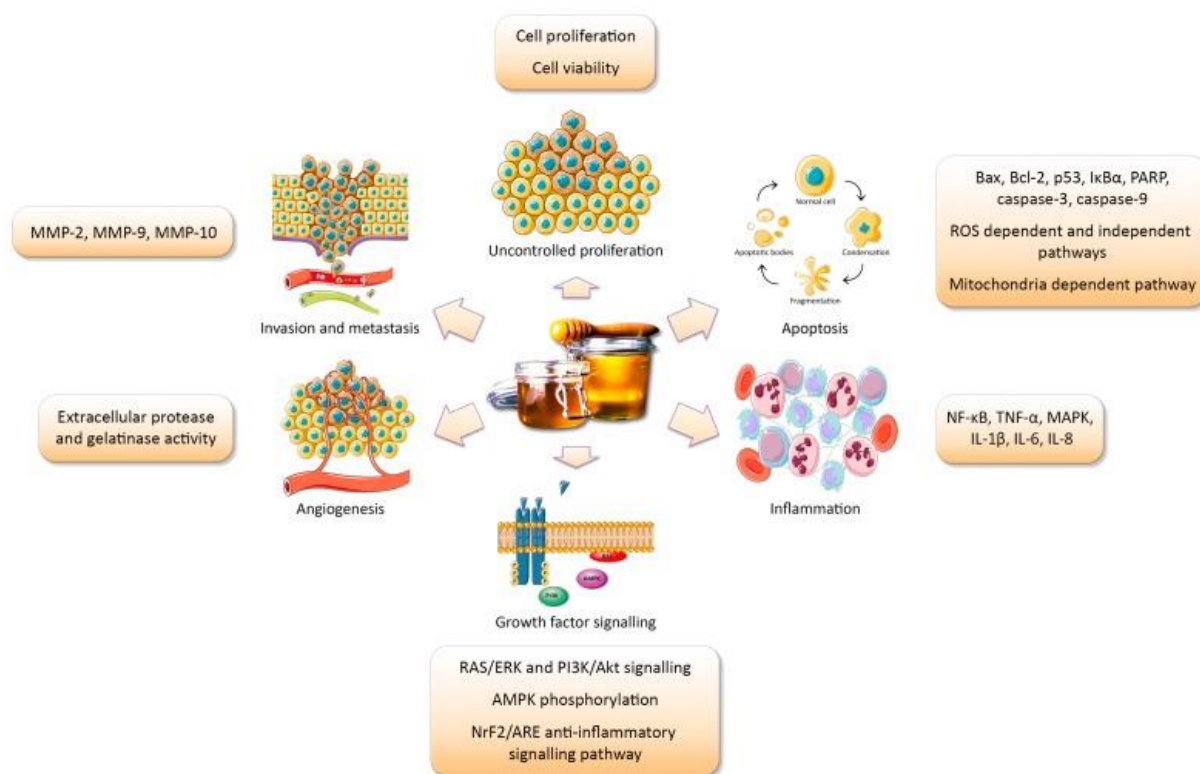
1.5. KOLOIDNO SREBRO

Srebro se već dugo koristi kao antimikrobno sredstvo za zacjeljivanje rana, kako u krutom stanju tako i s otopinama soli za čišćenje rana. Srebro pokazuje vrlo zanimljiva svojstva zbog svoje kemijske stabilnosti, dobre vodljivosti, katalitičkog i antibakterijskog djelovanja [24]. Antimikrobno djelovanje srebra ili spojeva srebra proporcionalno je oslobađanju bioaktivnog srebrnog iona (Ag^+) i njegovoj dostupnosti za interakciju s bakterijskim ili gljivičnim staničnim membranama. Ion srebra je biološki aktivan i lako stupa u interakciju s proteinima, aminokiselinskim ostacima, slobodnim anionima i receptorima na membranama stanica sisavaca. Srebro pokazuje nisku toksičnost u ljudskom tijelu, a očekuje se minimalan rizik zbog kliničke izloženosti udisanjem, gutanjem, dermatološkom primjenom ili urološkim ili krvnim putem [25]. Od 1990. godine došlo je do oživljavanja uporabe koloidnog srebra kao alternativnog lijeka zbog povećane otpornosti bakterija na antibiotike i stalne potrage za novim i pristupačnim antimikrobnim sredstvima. Koloidno srebro je suspenzija submikroskopskih čestica metalnog srebra veličine oko 0,001 mikrona. Koloidno srebro djeluje tako što onemogućuje enzime metabolizma kisika u bakterijama što u konačnici ubija mikroorganizme.

Iako je uporaba koloidnog srebra kao antimikrobnog sredstva priznata, malo je izvješća o njegovoj uporabi kao antitumorskom agensu [26].

1.6. MED

Zbog mogućih opasnih nuspojava uobičajenih tretmana raka kao što su operacija, zračenje i kemoterapija, istraživači su sve više zainteresirani za pronalaženje novih i manje rizičnih terapija. Posljednjih godina postoji veliki interes za razvoj sredstava protiv raka dobivenih iz hrane ili prirodnih proizvoda. Prirodni med dugo se koristi kao lijek i hranjiva tvar, a njegovi su korisni učinci na različite bolesti proučavani na životinjskim i ljudskim modelima. Utvrđeno je da ima širok raspon terapeutskih svojstava, uključujući antioksidativna, antibakterijska, antivirusna, antigljivična, antidijabetička, protuupalna, antihipertenzivna, antiaritmička svojstva, potiče zacjeljivanje rana i zaštitu jetre. Prirodni med ima inhibicijski učinak na oko 60 vrsta aerobnih i anaerobnih, gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Razne studije pokazale su kako protuupalne i antioksidativne funkcije meda mogu spriječiti početak, poticanje i napredovanje raka. Učinak meda proučavan je u *in vivo* modelu raka mokraćnog mjehura. Rezultati istraživanja su pokazali da intralezijaska i oralna primjena meda (6% i 12%) značajno suzbijaju rast tumora [27]. *In vivo* studije su pokazale učinkovitost pčelinjeg meda kao sredstva za inhibiciju rasta T24, RT4, 253J i MBT-2 staničnih linija raka mokraćnog mjehura [28]. Smatra se da med ima višestruke učinke na stanice raka (Slika 5) [29]. Dok je med selektivno toksičan za stanice tumora ili raka, nije citotoksičan za normalne stanice, stoga se med može koristiti kao terapeutsko sredstvo protiv raka ili kao nadopuna konvencionalnom liječenju raka [30].



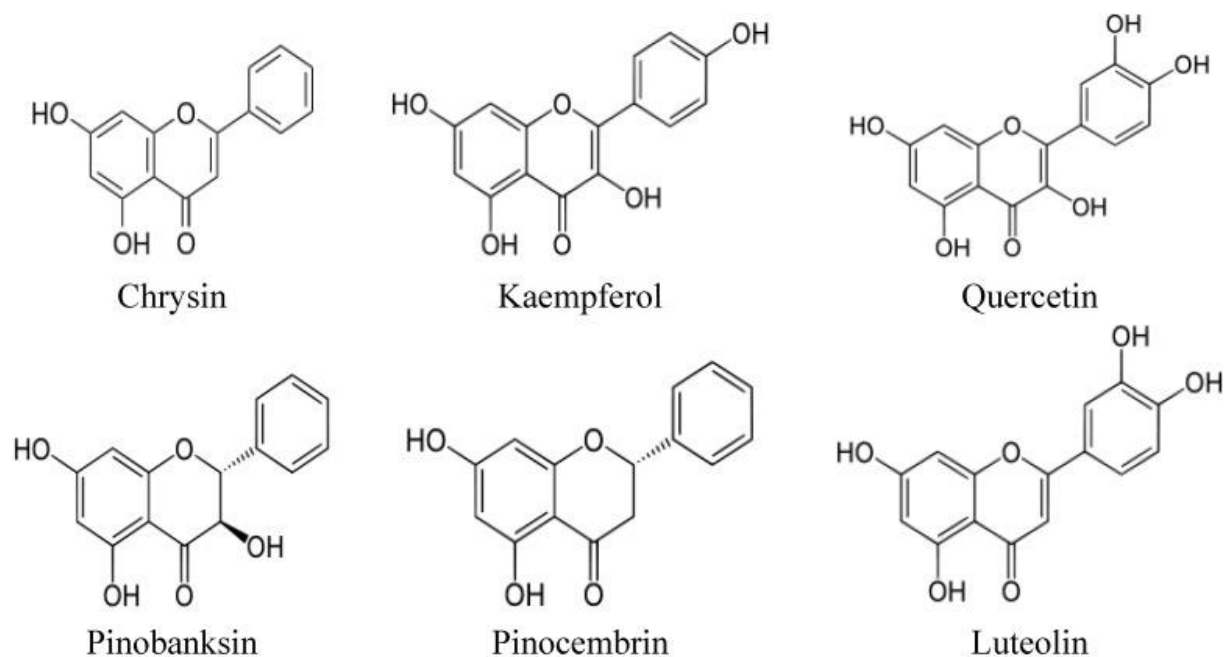
Slika 5. Kancerogeni procesi za koje se smatra da su ciljani medom

Preuzeto s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28933410/>

1.7. FLAVONOIDI I FENOLNI SPOJEVI

Flavonoidi i fenolni spojevi neki su od farmakoloških aktivnih sastojaka kojima je med bogat, a kojima se pripisuju njegove dobrobiti na zdravlje. Flavonoidi pripadaju skupini biološki aktivnih spojeva sa strukturom od 15 ugljikovih atoma (C6-C3-C6) [30]. Sveukupni podaci iz *in vivo* i *in vitro* laboratorijskih studija i kliničkih ispitivanja na ljudima pokazuju da su fenolni spojevi korisni za ljudsko zdravlje. Imaju široki spektar povoljnih učinaka kao što su antialergijski, protuupalni, antivirusni, antiproliferativni i antikancerogeni učinak [31]. Neki od flavonoida i fenolnih spojeva koji su identificirani u medu uključuju krizin, kempferol, kvercetin, pinobanksin i pinocebrin (Slika 6) [30]. Istraživanje provedeno na linijama raka mokraćnog mjehura, koje su bile tretirane kempferolom, pokazuje njegovo značajno inhibiranje rasta stanica raka [32]. Nadalje, neki flavonoidi pokazuju i antiangiogeno i antimetastatsko

djelovanje inhibirajući VEGF receptor i aktivator plazminogena urokinaze. Mnoge studije su pokazale značajna svojstva flavonoida kao kemopreventivnih sredstava što upućuje na njihovu pozitivnu korelaciju između manjeg rizika od raka i prehrane bogate flavonoidima [33]. No unatoč opsežnim podacima o njihovom antikancerogenom učinku, njihova primjena u liječenju raka je ograničena [34].



Slika 6. Kemijske strukture nekih flavonoida u medu

Preuzeto i modificirano s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270987/>

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje koloidnog srebra proizvedenog u medu na stanične linije humanog karcinoma mjereno MTT metodom. Hipoteza o potencijalnom citotoksičnom djelovanju ispitivana je na staničnim linijama T24 i TCCSUP karcinoma mokraćnog mjehura.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE

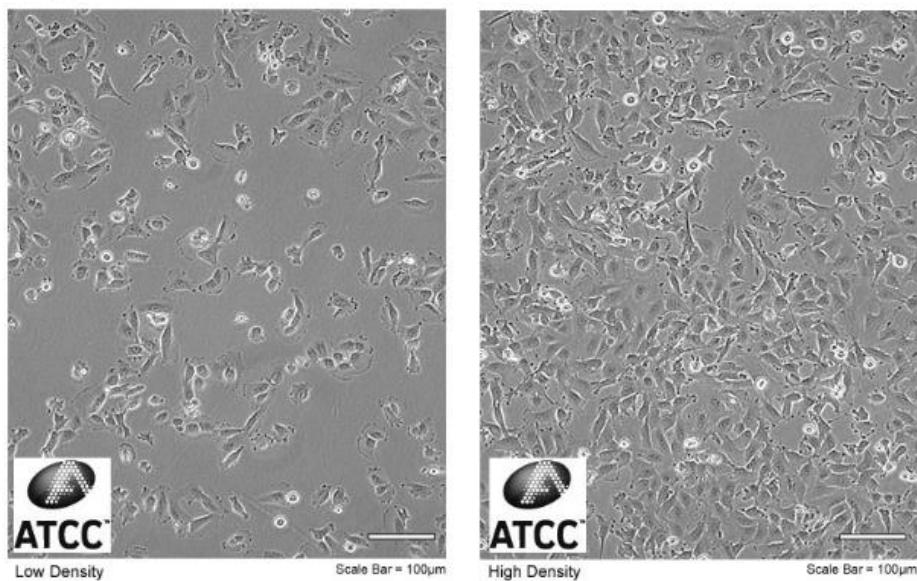
In vitro ispitivanje djelovanja koloidnog srebra proizvedenog u medu provodilo se na staničnim linijama T24 i TCCSUP humanih karcinoma mokraćnog mjehura. Obilježja tih staničnih linija prikazana su u tablicama 2 i 3, a stanice karcinoma T24 linije prikazane su na slici 7 [35].

3.1.1. T24 STANIČNA LINIJA

Tablica 2. Obilježja T24 stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura [35]

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Forma proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježje kulture	Adherentna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica
Dob	81 godina
Spol	Ženski
Etnitet	Bijeli
Uvjeti pohrane	Tekući dušik

ATCC Number: **HTB-4**™
Designation: **T24**



Slika 7. Stanice linije T24 karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-4>

3.1.2. TCCSUP STANIČNA LINIJA

Tablica 3. Obilježja TCCSUP stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura [35]

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Mokraćni mjehur
Forma proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježje kulture	Adherentna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica, IV stadij
Dob	67 godina
Spol	Ženski
Uvjeti pohrane	Tekući dušik

3.2. KOLOIDNO SREBRO PROIZVEDENO U MEDU

Sinteza koloidnog srebra provedena je pripremom otopine srebrova nitrata i cvjetnog meda. Izvagano je 0,0171 g srebrovog nitrata i otopljeno u 100 mL ultra čiste vode. Zatim se izvagalo 30,0527 g domaćeg meda i otopilo u 80 mL ultra čiste vode miješanjem na magnetskoj miješalici. Sinteza koloidnog srebra provedena je reakcijom kemijske redukcije srebrovog nitrata uz pomoć meda.

3.3. POSTUPAK

3.3.1. STANIČNA KULTURA

Postupak uzgoja stanica proveden je u laboratoriju s kabinetima za sterilan rad uz laminarni protok zraka kako bi se spriječila kontaminacija staničnih kultura. Kako bi se izbjegao mogući utjecaj kontaminacije na rezultate pokusa, svi korišteni reagensi, pribor i posuđe moraju također biti sterilni.

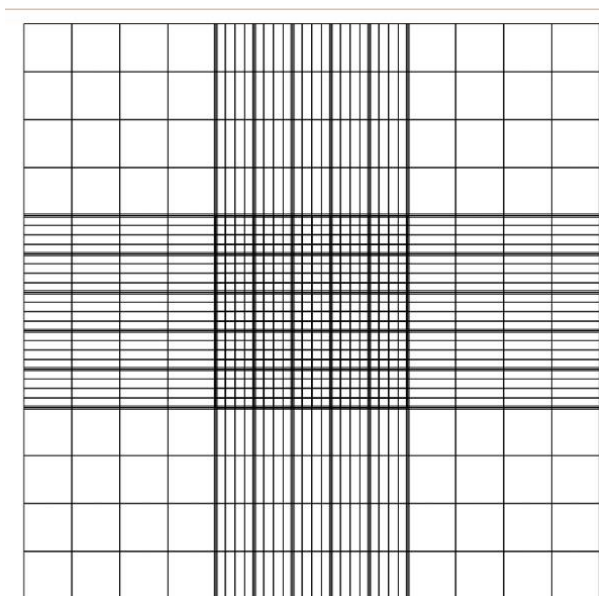
Adherentne stanične linije su odmrznute i uzgojene u inkubatoru u DMEM mediju koji sadrži 4,5 g/L glukoze, 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1% antibiotika, na temperaturi od 37°C uz 5% CO₂ i visoku vlažnost zraka. DMEM sadrži hranjive tvari potrebne stanicama i fenolno crvenilo, kao indikator, koje ukazuje na to da je medij potrebno promijeniti. Nakon dodatka DMEM medija, pločice sa stanicama ostavljene su preko noći kako bi se stanice prihvatile za podlogu.

Stanične linije se ispiru PBS-om (*phosphate buffer saline*, hrv. puferirana otopina fosfatnih soli) kako bi se uklonio zaostali DMEM medij. Stanice koje su se adherirale na podlogu se zatim tretiraju s tripsinom koji svojim proteolitičkim djelovanjem omogućuje međusobno odvajanje stanica i odvajanje stanica od podloge na kojoj rastu. Nakon svoga djelovanja, tripsin se inaktivira dodatkom svježeg medija u kojemu se stanice resuspendiraju.

3.3.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA

Brojanje stanica provodi se pomoću Bürker - Türkove komorice (Slika 8). U jažice se prenese 10 μL resuspendiranih stanica i doda 90 μL Trypan Blue boje. Žive stanice, čija je membrana netaknuta, neće se obojiti, dok će mrtve stanice, čija je membrana oštećena, poprimiti tamnoplavo obojenje [36]. Na taj način je omogućeno brojanje samo živih stanica koje se provodi pomoću mikroskopa.

Staničnu suspenziju s bojom preneseemo na Bürker – Türkovu komoricu i stavimo pod mikroskop kako bismo izbrojali žive stanice unutar pet kvadratića. Konačan broj stanica izračunamo po formuli: N (broj živih stanica) \times (faktor razrjeđenja) $\times 10^4$ /mL.



Slika 8. Bürker – Türkova komorica

Preuzeto s: <https://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>

Datum pristupa: 30.9.2024.

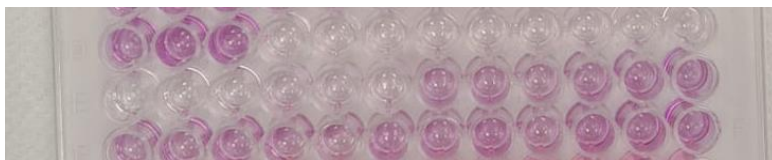
3.3.3. TRETIRANJE STANICA KARCINOMA KOLOIDNIM SREBROM

Jednak broj stanica presađuje se u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu. Zatim se stanice karcinoma tretiraju prethodno pripremljenim otopinama koloidnog srebra u koncentracijama 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50% te se ostave u inkubatoru tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Budući da tri jažice predstavljaju kontrolu, u njih nije dodana otopina koloidnog srebra već se stanice nalaze samo u mediju.

3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)

Citotoksična aktivnost koloidnog srebra ispituje se MTT metodom koja mjeri preživljenje i proliferaciju stanica. MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u formazan u mitohondrijima metabolički aktivnih stanica zbog kojega one poprimaju ljubičasto obojenje dok mrtve stanice nemaju tu sposobnost. Redukcija je vjerojatno posredovana NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. U jažice, u kojima se nalaze stanice, doda se otopina MTT-a nakon čega se stanice inkubiraju na 37°C 2 sata. Nakon uklanjanja medija u jažicama ostaju kristali formazana koji se moraju otopiti kako bi se mogla očitati njihova apsorbancija na 570 nm. Dodatkom otopine DMSO-a (dimetil sulfoksida), dolazi do otapanja kristala koji daju otopini ljubičasto obojenje. Pločice su zatim inkubirane na 37°C 10 minuta uz treskanje. Intenzitet ljubičastog obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica (Slika 9).

MTT metodom određuje se postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja otopinama koloidnog srebra različitih koncentracija. Omjer apsorbancije stanica tretiranih koloidnim srebrom i apsorbancije onih koje nisu tretirane, pokazatelj je citotoksične aktivnosti koloidnog srebra na stanice karcinoma mokraćnog mjehura.



Slika 9. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO-a u jažice stanične linije T24 tretiranih koloidnim srebrom nakon 24 sata

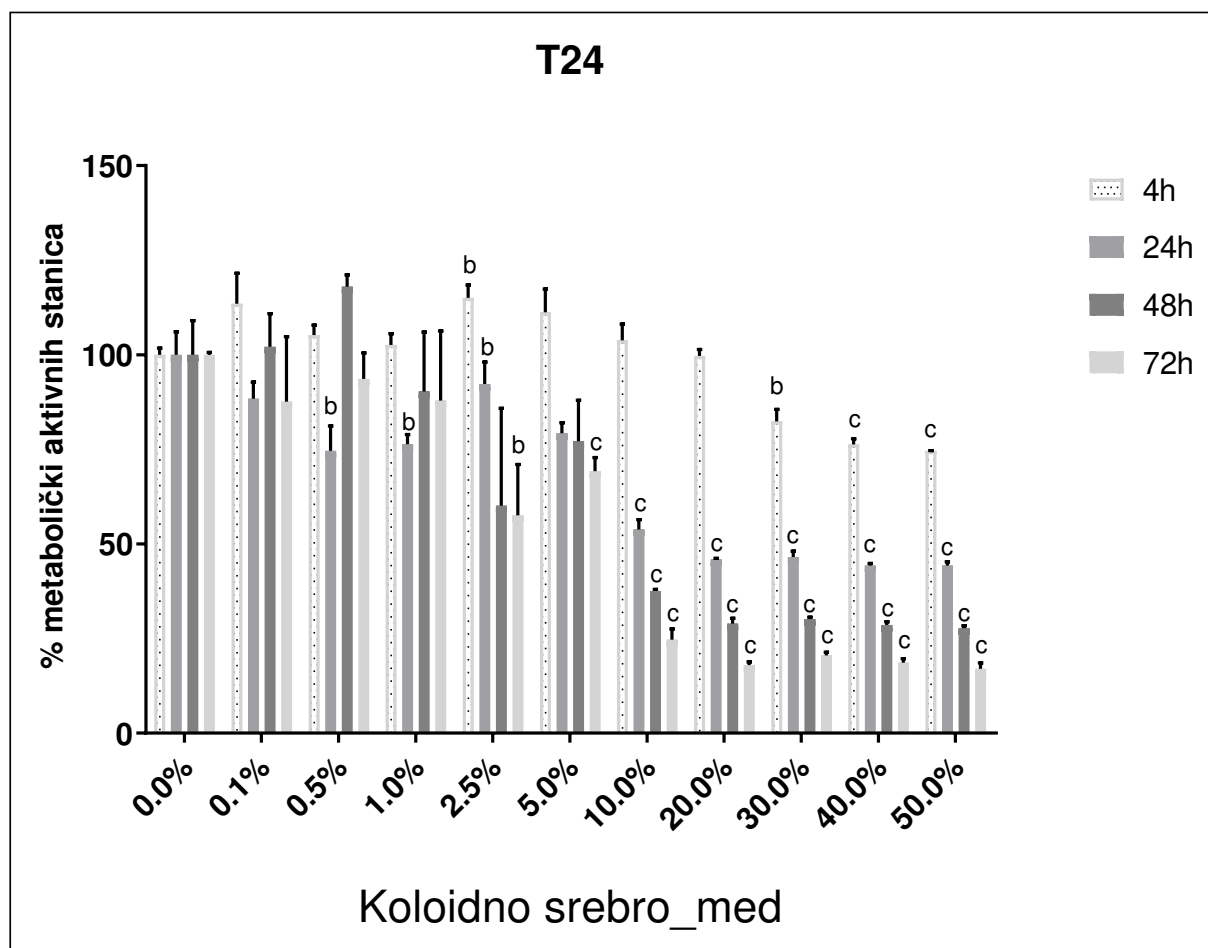
3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Izmjerene su apsorbancije kontrolnih (stanice karcinoma u mediju) i ispitivanih skupina (stanice tretirane otopinama koloidnog srebra). Zatim su izračunate srednje vrijednosti apsorbancija kontrolnih i ispitivanih skupina nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Također, izračunate su vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti kontrolnih i ispitivanih skupina za svaku koncentraciju korištenih otopina koloidnog srebra nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Dobiveni rezultati prikazani su grafički i statistički analizirani u programu GraphPadPrism v.7.0.

4. REZULTATI

4.1. STANIČNA LINIJA T24

4.1.1. KOLOIDNO SREBRO PROIZVEDENO U MEDU



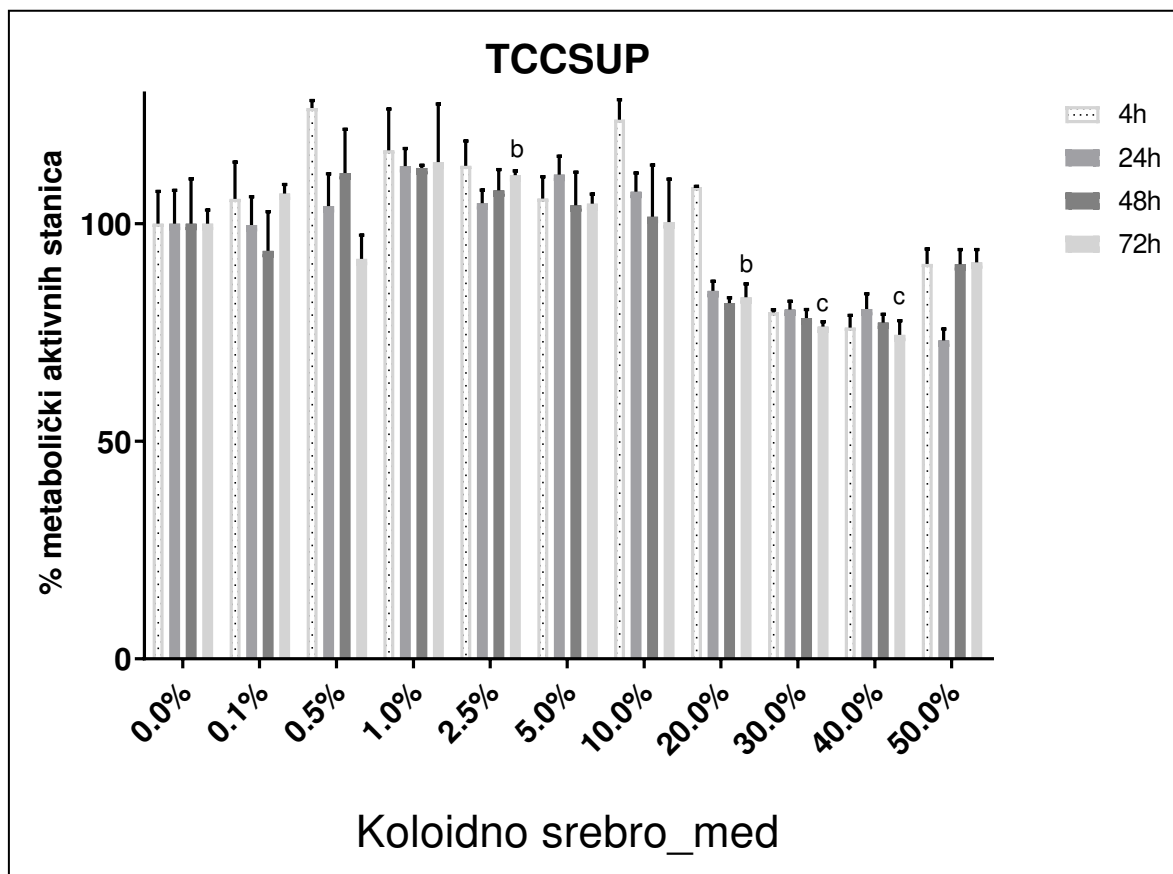
	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	21,73	9,984	5,758

Slika 10. Citotoksična aktivnost koloidnog srebra proizvedenog u medu na T24 stanice (IC50 - koncentracija koloidnog srebra koji inhibira rast stanica za 50%, ND - ne može se odrediti, statistički značajna razlika: b - $P < 0,01$, c - $P < 0,001$)

Značajna citotoksična aktivnost koloidnog srebra na stanice linije T24 uočena je pri koncentracijama od 0,5% i 1% nakon 24 sata te pri koncentracijama od 2,5% i 5% nakon 48 i 72 sata. Najveće citotoksično djelovanje zapaženo je pri većim koncentracijama od 10%, 20%, 30%, 40% i 50% u intervalima od 24 do 72 sata pri čemu bilježimo najveće smanjenje broja živih stanica nakon 72 sata. Nakon 4 sata niti jedna koncentracija nije uzrokovala smanjenje broja stanica na 50% dok se nakon 24, 48 i 72 sata bilježi njihovo smanjenje ispod 50% pri čemu je u intervalu od 72 sata bila potrebna najmanja koncentracija koloidnog srebra da bi se njihov broj spustio ispod te razine (Slika 10).

4.2. STANIČNA LINIJA TCCSUP

4.2.1. KOLOIDNO SREBRO PROIZVEDENO U MEDU

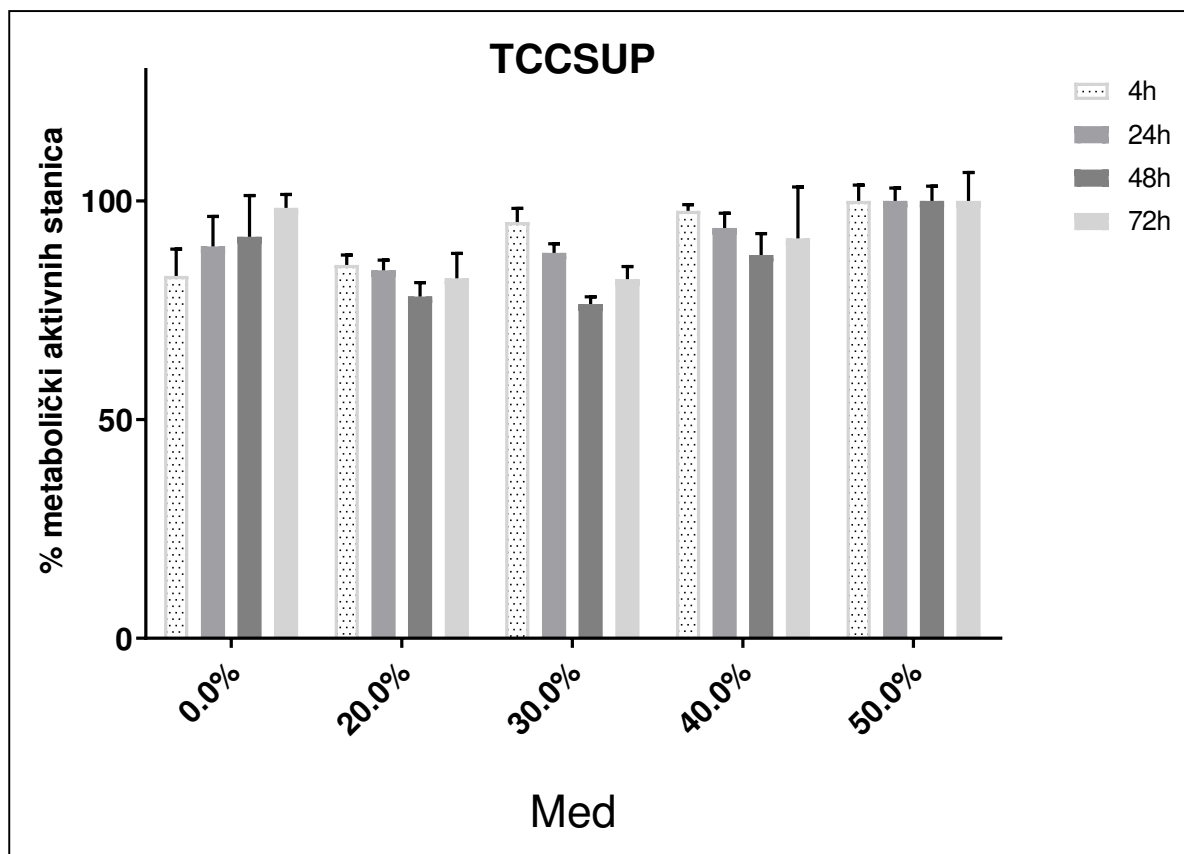


	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	ND	ND	ND

Slika 11. Citotoksična aktivnost koloidnog srebra proizvedenog u medu na TCCSUP stanice (IC50 - koncentracija koloidnog srebra koji inhibira rast stanica za 50%, ND - ne može se odrediti, statistički značajna razlika: b - $P < 0,01$, c - $P < 0,001$)

Citotoksičnu aktivnost koloidnog srebra na TCCSUP stanice uočavamo pri koncentraciji od 0,1% nakon 48 sati i pri koncentraciji od 0,5% nakon 72 sata. Najveće citotoksično djelovanje uočeno je pri većim koncentracijama od 20%, 30%, 40% i 50% tijekom intervala od 24 do 72 sata. Niti jedna koncentracija koloidnog srebra u niti jednom vremenskom intervalu nije uzrokovala smanjenje broja stanica ispod 50%, stoga se IC50 vrijednost nije mogla odrediti (Slika 11).

4.2.2. MED



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

Slika 12. Citotoksična aktivnost meda na T24 stanice (IC50 - koncentracija koloidnog srebra koji inhibira rast stanica za 50%, ND - ne može se odrediti)

Citotoksičnu aktivnost meda na stanicama T24 linije uočavamo pri koncentracijama od 20% i 30% u intervalima od 4 do 72 sata. Niti jedna koncentracija u niti jednom vremenskom intervalu nije uzrokovala pad broj stanica ispod 50%, stoga se IC50 vrijednost nije mogla odrediti. Zanimljivo je uočiti da se bilježi pad broja stanica koje nisu tretirane medom, stoga njegova citotoksična aktivnost nije značajna (Slika 12).

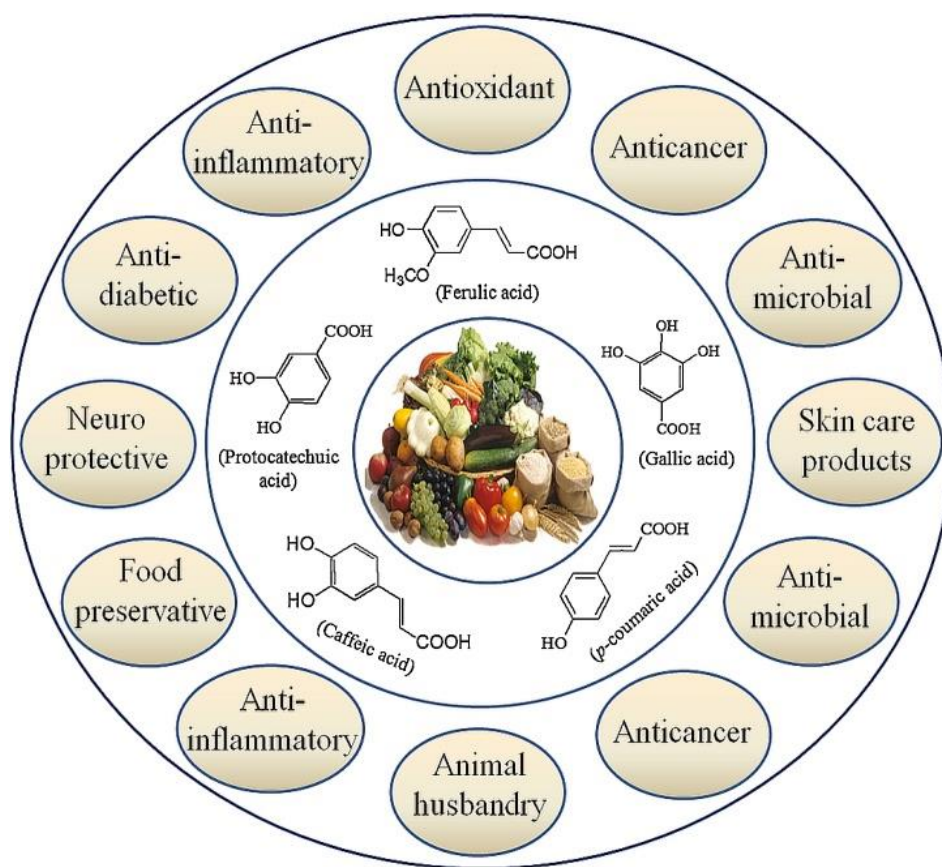
5. RASPRAVA

Karcinom mokraćnog mjehura jedna je od najčešćih uroloških zloćudnih bolesti u svijetu [37]. Najčešće se javlja kod starijih ljudi. Prosječna dob ljudi pri dijagnosticiranju raka mokraćnog mjehura je 73 godine. Sveukupno, šanse da će muškarci razviti ovaj rak tijekom života su oko 1 prema 28 dok su za žene šanse oko 1 prema 89 [38]. Najčešći način liječenja raka mokraćnog mjehura je operacijom pri čemu se može ukloniti samo karcinom ili odstraniti čitav mokraćni mjehur. Ostali načini liječenja su terapija zračenjem, imunoterapija, kemoterapija ili lijekovi za ciljanu terapiju [39].

Upotreba srebra za liječenje ili prevenciju infekcija dobro je dokumentirana u medicinskoj literaturi tijekom 17. i 18. stoljeća. Srebro pokazuje baktericidno djelovanje tako što se snažno veže za membrane i proteine stanične stjenke vjerojatno zbog njegove interakcije s tiolnim skupinama na enzimima. Baktericidno djelovanje srebra ovisi o veličini čestica. Čestice od 10 nm pokazuju potpunu interakciju s bakterijama, dok veće čestice ne pokazuju, što sugerira da nanočestice imaju veće baktericidne učinke [40]. Također, *in vitro* citotoksična i antioksidativna studija otkrila je da biljne i biosintetizirane nanočestice srebra pokazuju značajan antikancerogeni i antioksidativni potencijal ovisan o dozi i vremenu [41].

Med je prirodna tvar cijenjena zbog svojih terapijskih sposobnosti od davnina. Njegov sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina igra ključnu ulogu u ljudskom zdravlju, zahvaljujući visokim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima koja imaju. Med posjeduje antimikrobni kapacitet i antikancerogeno djelovanje protiv različitih vrsta tumora, djelujući na različite molekularne puteve koji su uključeni u staničnu proliferaciju. Med također ima zaštitni učinak u kardiovaskularnom sustavu, gdje uglavnom sprječava oksidaciju lipoproteina niske gustoće, u živčanom sustavu, u dišnom sustavu protiv astme i bakterijskih infekcija te u gastrointestinalnom sustavu [42].

Fenolni spojevi su prirodne bioaktivne molekule koje se nalaze uglavnom u biljnim tkivima i koje su pokazale zanimljiva bioaktivna svojstva poput antioksidativnog, antimikrobnog, protuupalnog i antiproliferativnog djelovanja [43]. Svojim kemopreventivnim svojstvima izazivaju apoptozu zaustavljanjem staničnog ciklusa, reguliranjem metabolizma karcinogena i ekspresije u ontogenezi, inhibicijom vezanja DNA i staničnom adhezijom, migracijom, proliferacijom ili diferencijacijom i blokiranjem signalnih putova [44]. Fenoli smanjuju inicijaciju tumora i djeluju na različite točke kako bi izliječila ili inhibirala različite vrste raka. Različite primjene fenolnih spojeva prikazane su na Slici 13 [45].



Slika 13. Shematski prikaz različitih primjena fenolnih kiselina

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6734135/>

Kao predmet našeg istraživanja korišteno je koloidno srebro proizvedeno u medu, odnosno, njegovo citotoksično djelovanje na dvije stanične linije humanih karcinoma mokraćnog mjehura: T24 linije i TCCSUP linije.

Utjecaj na stanice karcinoma T24 linije je značajan je već pri koncentracijama otopine koloidnog srebra od 0,5%, 1%, 2,5% i 5%. Najveći citotoksični učinak uočen je pri višim koncentracijama 10%, 20%, 30%, 40% i 50% u intervalima od 24 do 72 sata.

Istraživanje na TCCSUP staničnoj liniji pokazuje skroman citotoksični učinak koloidnog srebra pri koncentracijama od 0,1% i 0,5%. Najveće citotoksično djelovanje uočeno je pri koncentracijama od 20%, 30%, 40% i 50% u intervalima od 24 do 72 sata. Također, provedeno je ispitivanje o učinku samoga meda na TCCSUP staničnu liniju koje pokazuje da

med ima određeni učinak pri koncentracijama od 20% i 30%, ali značajno niže nego koloidno srebro proizvedeno u medu.

Dobiveni rezultati *in vitro* ispitivanja pokazuju citotoksično djelovanje koloidnog srebra na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura. Citotoksični učinak ovisi o koncentraciji otopina srebra i vremenu inkubacije, stoga je hipoteza potvrđena i ostvaren je cilj istraživanja. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da koloidno srebro ima potencijal za daljnja istraživanja u svrhu otkrivanja novih antitumorskih lijekova i lijekova za liječenje različitih bolesti, stoga je potrebno provesti dodatna *in vitro* ispitivanja kako bi se njegovo citotoksično djelovanje potvrdilo.

6. ZAKLJUČAK

- I. *In vitro* izlaganje stanica mokraćnog mjehura T24 linije i TCCSUP linije otopinama koloidnog srebra dobivenog uz pomoć meda dovodi do smanjenja broja metabolički aktivnih stanica.
- II. Ispitivane otopine uglavnom pokazuju citotoksičan učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- III. U tretiranju stanica čistim medom nije zabilježeno proporcionalno povećanje citotoksične aktivnosti s porastom koncentracije te dolazi do blagog porasta broja živih stanica pri najvećim koncentracijama.
- IV. Na obje stanične linije koloidno srebro pokazuje citotoksičan učinak, premda je njegovo djelovanje na stanicama karcinoma T24 linije veće nego na TCCSUP staničnoj liniji.
- V. Ovim istraživanjem je potvrđeno citotoksično djelovanje koloidnog srebra na stanice karcinoma mokraćnog mjehura. Za potvrdu dobivenih rezultata potrebna su daljnja *in vitro* ispitivanja kao i *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima.

7. LITERATURA

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 149.-152.
2. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 164.
3. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 183.-186.
4. Hu J, Cao J, Topatana W, Juengpanich S, Li S, Zhang B i sur. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. J Hematol Oncol. 2021;14(1):157.
5. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dostupno na: <https://gco.iarc.who.int/today>. Datum pristupa: 9.9.2024.
6. <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/> Datum pristupa: 10.9.2024.
7. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/> Datum pristupa: 10.9.2024.
8. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018., Bilten 43, Zagreb, 2020.
9. Halaseh SA, Halaseh S, Alali Y, Ashour ME, Alharayzah MJ. A Review of the Etiology and Epidemiology of Bladder Cancer: All You Need To Know. Cureus. 2022;14(7):e27330.
10. DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician. 2017;96(8):507-14.
11. <https://www.cancer.gov/types/bladder/symptoms> Datum pristupa: 13.9.2024.
12. <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html> Datum pristupa: 13.9.2024.
13. <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html> Datum pristupa: 14.9.2024.
14. National Collaborating Centre for Cancer (UK). Bladder Cancer: Diagnosis and Management. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2015 Feb. (NICE Guideline, No. 2.) 3, Diagnosing and staging bladder cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK356296/>
15. <https://www.cancer.gov/types/bladder/diagnosis> Datum pristupa: 14.9.2024.

16. Garapati SS, Hadjiiski L, Cha KH, Chan HP, Caoili EM, Cohan RH i sur. Urinary bladder cancer staging in CT urography using machine learning. *Med Phys.* 2017;44(11):5814-23.
17. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Bladder Cancer Treatment: Patient Version. 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66044/>
18. <https://www.cancer.gov/types/bladder/treatment#top> Datum pristupa: 16.9.2024.
19. <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/treating/radiation.html> Datum pristupa: 16.9.2024.
20. Milosevic M, Gospodarowicz M, Zietman A, Abbas F, Haustermans K, Moonen L i sur. Radiotherapy for bladder cancer. *Urology.* 2007;69(1 Suppl):80-92.
21. Sandler HM, Mirhadi AJ. Current role of radiation therapy for bladder cancer. *Semin Oncol.* 2012;39(5):583-7.
22. <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/treating/chemotherapy.html> Datum pristupa: 16.9.2024.
23. Liu S, Chen X, Lin T. Emerging strategies for the improvement of chemotherapy in bladder cancer: Current knowledge and future perspectives. *J Adv Res.* 2022;39:187-202.
24. Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R i sur. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(2):292.
25. Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol.* 2006;33:17-34.
26. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Gómez-Flores RA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P i sur. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29(1):148.
27. Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Uses of Natural Honey in Cancer: An Updated Review. *Adv Pharm Bull.* 2022;12(2):248-61.
28. Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *Int J Urol.* 2003;10(4):213-9.
29. Porcza LM, Simms C, Chopra M. Honey and Cancer: Current Status and Future Directions. *Diseases.* 2016;4(4):30.

30. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*. 2014 Feb 21;19(2):2497-522
31. Kyselova Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdiscip Toxicol*. 2011;4(4):173-83.
32. Xie F, Su M, Qiu W, Zhang M, Guo Z, Su B i sur. Kaempferol promotes apoptosis in human bladder cancer cells by inducing the tumor suppressor, PTEN. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21215-26.
33. Kikuchi H, Yuan B, Hu X, Okazaki M. Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *Am J Cancer Res*. 2019;9(8):1517-35.
34. Safe S, Jayaraman A, Chapkin RS, Howard M, Mohankumar K, Shrestha R. Flavonoids: structure-function and mechanisms of action and opportunities for drug development. *Toxicol Res*. 2021;37(2):147-62.
35. <https://www.atcc.org/products/htb-4> Datum pristupa: 29.9.2024.
36. Chan LL, Rice WL, Qiu J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227950.
37. Zhang Y, Rungay H, Li M, Yu H, Pan H, Ni J. The global landscape of bladder cancer incidence and mortality in 2020 and projections to 2040. *J Glob Health*. 2023;13:04109.
38. <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/about/key-statistics.html> Datum pristupa: 1.10.2024.
39. <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/treating.html> Datum pristupa: 1.10.2024.
40. Politano AD, Campbell KT, Rosenberger LH, Sawyer RG. Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surg Infect (Larchmt)*. 2013;14(1):8-20.
41. Ahmed MJ, Murtaza G, Rashid F, Iqbal J. Eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles and their potential applications as antioxidant and anticancer agents. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019;45(10):1682-1694.
42. Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparri M, Reboredo-Rodríguez P, Manna PP i sur. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2018;23(9):2322.

43. Albuquerque BR, Heleno SA, Oliveira MBPP, Barros L, Ferreira ICFR. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct.* 2021;12(1):14-29.
44. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer.* 2010;62(1):1-20.
45. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst).* 2019;24:e00370.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje koloidnog srebra na humane stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 linije i TCCSUP linije. Pretpostavka je da će se, tretiranjem otopina koloidnog srebra, broj metabolički aktivnih stanica smanjiti u usporedbi sa kontrolnom skupinom.

Materijali i metode:

Citotoksičnost se ispitivala MTT metodom koja određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja otopinama koloidnog srebra različitih koncentracija pripremljenih u medu. Otopine su pripravljene u koncentracijama od 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50%, a učinak je gledan nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost koloidnog srebra određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

Rezultati:

Rezultati su prikazani grafički kao odnos postotka metabolički aktivnih stanica i vremena inkubacije te koncentracije uzoraka. Koloidno srebro pokazuje značajan citotoksični učinak na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 linije pri koncentracijama od 10%, 20%, 30%, 40% i 50% u intervalima od 24 do 72 sata pri čemu je najveća citotoksična aktivnost uočena nakon 72 sata inkubacije. Na stanice karcinoma mokraćnog mjehura TCCSUP linije, koloidno srebro pokazuje citotoksičan učinak pri koncentracijama od 20%, 30%, 40% i 50% u intervalima od 24 do 72 sata inkubacije. Koloidno srebro bilježi veći citotoksični učinak na T24 staničnoj liniji, za razliku od TCCSUP stanične linije koja bilježi manji pad broja metabolički aktivnih stanica.

Zaključak:

In vitro izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 i TCCSUP stanične linije otopinama koloidnog srebra različitih koncentracija, dovodi do smanjenja broja metabolički aktivnih stanica. Koloidno srebro pokazuje citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije. Citotoksični učinak koloidnog srebra na stanične linije humanih karcinoma, što je ujedno i hipoteza ovog ispitivanja, je potvrđen. Potrebna su daljnja *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima kako bi se citotoksičan učinak srebra potvrdio.

9. SUMMARY

Title: Investigation of the cytotoxic effects of colloidal silver generated in honey on bladder carcinoma cells

The aim of the research:

The aim of the research was to examine the potential cytotoxic effect of colloidal silver on human bladder cancer cell lines, specifically T24 and TCCSUP lines. The hypothesis was that treatment with colloidal silver solutions will reduce the number of metabolically active cells compared to the control group.

Materials and methods:

Cytotoxicity was assessed using the MTT method, which measures the percentage of metabolically active cells after treatment with colloidal silver solutions of varying concentrations prepared in honey. The solutions were prepared at concentrations of 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%, and the effects were observed after 4, 24, 48, and 72 hours. The effectiveness of colloidal silver was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 570 nm.

Results:

Results are presented graphically as the relation of the percentage of metabolically active cells and the incubation time and the concentration. Colloidal silver shows a significant cytotoxic effect on T24 bladder cancer cells at concentrations of 10%, 20%, 30%, 40%, and 50% during intervals of 24 to 72 hours, with the highest cytotoxic activity observed after 72 hours of incubation. Colloidal silver also exhibits cytotoxic effects on TCCSUP bladder cancer cells at concentrations of 20%, 30%, 40%, and 50% in intervals from 24 to 72 hours of incubation. Colloidal silver demonstrates a greater cytotoxic effect on the T24 cell line, in contrast to the TCCSUP cell line, which shows a smaller decrease in the number of metabolically active cells.

Conclusion:

In vitro exposure of T24 and TCCSUP bladder cancer cells to colloidal silver solutions of varying concentrations leads to a reduction in the number of metabolically active cells. Colloidal silver exhibits a cytotoxic effect that is dependent on concentration and incubation time. The cytotoxic effect of colloidal silver on human cancer cell lines, which is also the hypothesis of this study, has been confirmed. Further *in vivo* testing on animal models is necessary to validate the cytotoxic effect of silver.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Anita Dadić

Državljanstvo: Hrvatsko

E-mail: anitadadic02@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2015. – 2019. V. gimnazija „Vladimir Nazor“, Split
- 2019. – 2024. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

RADNO ISKUSTVO:

- veljača, 2024. – kolovoz, 2024. - Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Brda

AKTIVNOSTI

- Od 2021. članica Hrvatskog nadzemlja

POSEBNE VJEŠTINE

Vozačka dozvola: B kategorija

Strani jezici: engleski jezik, talijanski jezik (osnove)