

# Ispitivanje citotoksičnog djelovanja koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju na stanične linije humanog karcinoma

---

Šeravić, Ivana

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:171:875522>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Šeravić**

**ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA KOLOIDNOG SREBRA  
PROIZVEDENOG U ZELENOM ČAJU NA STANIČNE LINIJE HUMANOG  
KARCINOMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

**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** 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:** prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

### ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA KOLOIDNOG SREBRA PROIZVEDENOG U ZELENUM ČAJU NA STANIČNE LINIJE HUMANOG KARCINOMA

Ivana Šeravić, broj indeksa 201924

#### Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati potencijalno citotoksično djelovanje koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju na humane stanice karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) i mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP). Sve stanične linije tretirane su otopinama koloidnog srebra različitog razrjeđenja: 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5%, 10.0%, 20.0%, 30.0%, 40.0% i 50.0%. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata korištenjem MTT metode. Pokazatelj citotoksične aktivnosti je omjer između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju korištenih otopina. Na svim linijama opažen je citotoksični učinak, ali različitog inteziteta. Najjači citotoksični učinak ostvaren je na staničnim linijama HeLa i T24 tijekom 72 sata inkubacije primjenom 10%-tnih i koncentriranijih otopina. Kod SiHa stanica također je došlo do smanjenja metabolički aktivnih stanica no ne u tolikom razmjeru kao kod prethodne dvije linije, a na TCCSUP liniji rezultati su neznatni. Ispitivani uzorci pokazuju citotoksični učinak ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji, no ipak njihov učinak nije uvijek proporcionalan povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do povećanja broja metabolički aktivnih stanica. Citotoksični učinak koloidnog srebra je potvrđen i potrebna su daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja.

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

**Rad sadrži:** 60 stranica, 30 slika, 6 tablica, 33 reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:** 1. izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić, prof., član  
2. doc. dr. sc. Jasminka Omerović, prof., član  
3. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

**Datum obrane:** 17.10.2024.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

### Faculty of Medicine

Integrated Undergraduate and Graduate Study Program in Pharmacy

University of Split, Republic of Croatia

Scientific Area: Biomedical Sciences

Scientific Field: Pharmacy

Course: Medical 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

**Tehnnical asistence:** Prof. Vedrana Čikeš Čulić, Phd

### TESTING THE CYTOTOXIC EFFECTS OF COLLOIDAL SILVER PRODUCED IN GREEN TEA ON HUMAN CARCINOMA CELLS

Ivana Šeravić, index number 201924

#### Abstract:

The aim of the research was to examine the potential cytotoxic effect of colloidal silver produced in green tea on human cervical cancer cells (HeLa and SiHa) and bladder cancer cells (T24 and TCCSUP). All cell lines were treated with colloidal silver solutions of various dilutions: 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5%, 10.0%, 20.0%, 30.0%, 40.0%, and 50.0%. Cytotoxicity was determined after 4, 24, 48, and 72 hours using the MTT method. The indicator of cytotoxic activity is the ratio between the mean values of the experimental and control groups for each concentration of the solutions used. Cytotoxic effects were observed in all cell lines, but with varying intensity. The strongest cytotoxic effect was achieved on HeLa and T24 cell lines during 72 hours of incubation using 10% and more concentrated solutions. In SiHa cells, there was also a decrease in metabolically active cells, but not to the same extent as in the previous two lines, while in the TCCSUP line, the results were negligible. The tested samples show a time and concentration dependent cytotoxic effect, but their effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time, and in some cases, there is an increase in the number of metabolically active cells. The cytotoxic effect of colloidal silver has been confirmed, and further in vitro and in vivo studies are required.

**Keywords:** colloidal silver, cancer, cytotoxicity, MTT method

**The thesis contains:** 60 pages, 30 images, 6 tables, 33 references

**Original language:** Croatian

**Defense Committee Composition:** 1. Assoc.prof. Nikolina Režić Mužinić, Phd, member  
2. Asst. prof. Jasminka Omerović, Phd, member  
3. Prof. Vedrana Čikeš Čulić, Phd, supervisor - member

**Defense date:** 17.10.2024.

**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 2.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. TUMORI.....	2
1.2. KARCINOMI .....	3
1.3. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI .....	5
1.4. KARCINOM GRLIĆA MATERNICE .....	7
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	7
1.4.2. PATOHISTOLOGIJA I KLASIFIKACIJA .....	9
1.4.3. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA.....	10
1.4.4. PREVENCIJA I LIJEČENJE .....	11
1.5. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA.....	12
1.5.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA.....	12
1.5.2. PATOHISTOLOGIJA I KLASIFIKACIJA .....	14
1.5.3. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA.....	15
1.5.4. LIJEČENJE.....	16
1.6. ZELENI ČAJ.....	17
1.6.1. KARAKTERISTIKE I STANIŠTE .....	17
1.6.2. DOBIVANJE ZELENOG ČAJA.....	18
1.6.3. AKTIVNI SPOJEVI I NJIHOVA LJEKOVITOST.....	18
1.7. SREBRO .....	22
1.7.1. SREBRO .....	22
1.7.2. KOLOIDNO SREBRO.....	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	23
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3.1. STANIČNE LINIJE.....	26
3.2. ZELENA SINTEZA KOLOIDNOG SREBRA .....	31
3.3. STANIČNA KULTURA .....	32
3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT).....	34
3.5. STATISTIČKA ANALIZA .....	35
4. REZULTATI .....	36
4.1. STANIČNA LINIJA HeLa .....	37
4.2. STANIČNA LINIJA T24 .....	38

4.3. STANIČNA LINIJA SiHa .....	39
4.4. STANIČNA LINIJA TCCSUP .....	41
5. RASPRAVA .....	43
6. ZAKLJUČAK .....	46
7. LITERATURA .....	48
8. SAŽETAK .....	53
9. SUMMARY .....	56
10. ŽIVOTOPIS .....	59

## **Zahvala**

*Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi tijekom cijelog školovanja bili najveća podrška i ohrabrenje.*

*Hvala mom Luki i mojim prijateljicama na svakom saslušanom problemu i svakom savjetu. Hvala vam što ste vjerovali u mene!*

*Hvala mojim kolegama s fakulteta s kojima sam stvorila predivne uspomene na studentski život.*

*Posebno hvala, mojoj mentorici, profesorici Vedrani Čikeš Čulić na ukazanoj prilici za provođenje istraživanja na kojem se temelji ovaj diplomski rad.*

## **1. UVOD**

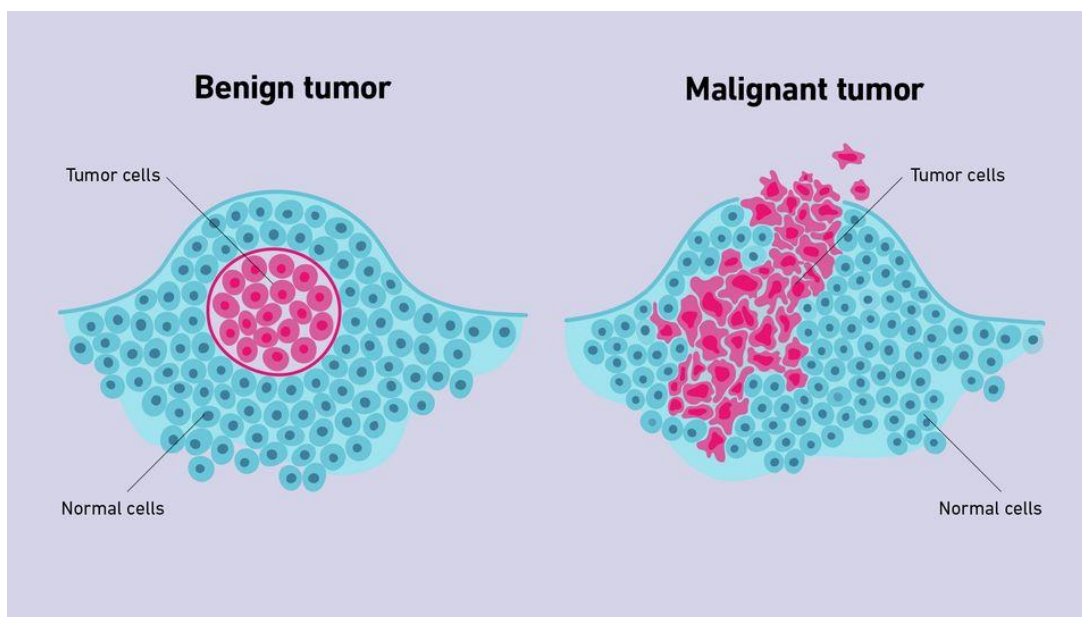


## 1.1. TUMORI

Tumori (lat. *tumor* - oteklina) ili novotvorine su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Rast novotvorina karakterizira: nesvrhovitost, autonomnost, parazitarnost, nepravilnost i neorganiziranost. Prema kliničkoj klasifikaciji tumori se dijele u dvije skupine: dobroćudni (benigni) i zloćudni (maligni) tumori. Dobroćudni tumori rastu polagano te ograničeno na organ u kojem su nastali, ne ugrožavaju bitno zdravlje i imaju povoljan klinički ishod. Maligni tumori rastu mnogo brže, razaraju normalno tkivo organa u kojem su nastali te se krvlju ili limfom šire u druge dijelove tijela tj. metastaziraju (grč. *metastasis* - promjena mjesta). Mogu biti opasni po život izazivajući sistemske simptome, kao što su opća slabost, gubitak tjelesne mase te smrt (1).

Makroskopski, benigni tumori su oštro ograničeni od normalnog tkiva i dobro opskrbljeni krvlju, dok su maligni tumori nepravilnog oblika i neoštih rubova (Slika 1). Mikroskopski, benigni tumori su građeni od dobro diferenciranih stanica, koje nalikuju na stanice normalnih tkiva u kojima je tumor nastao dok su zloćudni tumori građeni od atipičnih stanica koje ne nalikuju na tkivo iz kojeg su nastali (1).

Rizični čimbenici pogoduju nastanku tumora. Mogu se podijeliti na one koji su predodređeni i ne mogu se mijenjati, kao što su: dob, spol, genetička predispozicija, i na varijabilne, tj. na one na koje se može utjecati kao što su: prehrana, okoliš, infekcije, lijekovi i radioterapija (2).



**Slika 1.** Razlika benignog i malignog tumora

Preuzeto:

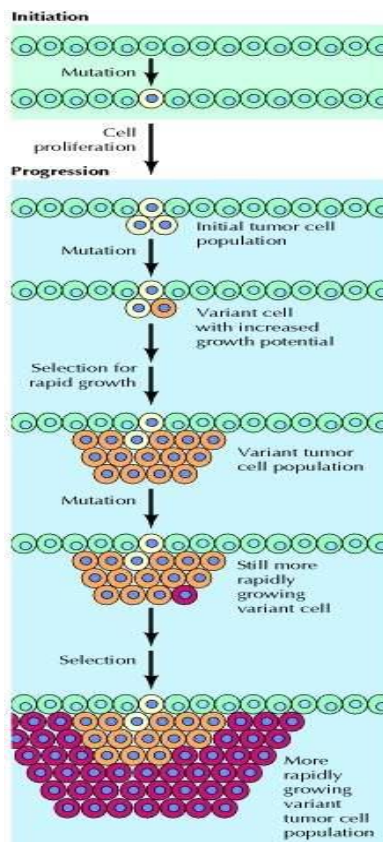
<https://assets.technologynetworks.com/production/dynamic/images/content/364765/benign-vs-malignant-tumors-364765-1280x720.webp?cb=12746434>

## 1.2. KARCINOMI

Maligni epitelni tumori nazivaju se karcinomi (lat. *carcinoma*). Budući da zadržavaju značajke epitela iz kojeg su nastali dijele se na: karcinome pločastog epitela, karcinome prijelaznog epitela mokraćnog mjehura (urotelni karcinomi) i adenokarcinome (karcinomi žljezdanog podrijetla). Zloćudni tumori solidnih unutarnjih organa nose nazive organa u kojima su nastali, npr. karcinom kore nadbubrežne žlijezde. Karcinomi su invazivni tumori koji se razvijaju postepeno iz preinvazivnih promjena u pločastom ili žljezdanom epitelu iz kojeg tumor potječe (3).

Postoje četiri stadija raka. Stadij 1 obično znači da je rak mali i da se nalazi unutar organa u kojem je započeo. Stadij 2 označava da je tumor veći nego u stadiju 1, ali se rak nije počeo širiti u okolna tkiva. Stadij 3 obično znači da je rak veći. Možda se počeo širiti u okolna tkiva i u obližnjim limfnim čvorovima postoje stanice raka. Stadij 4 znači da se rak proširio s mjesta gdje je započeo na drugi tjelesni organ, na primjer u jetru ili pluća. To se također naziva sekundarni ili metastatski rak (4).

Razvoj tumora počinje kada jedna mutirana stanica počne nenormalno proliferirati (Slika 2). Dodatne mutacije, nakon kojih u populaciji dolazi do selekcije brže rastućih stanica, dovode do progresije tumora koji rastu brže i postaju zloćudniji (5).



**Slika 2.** Stadiji razvoja tumora

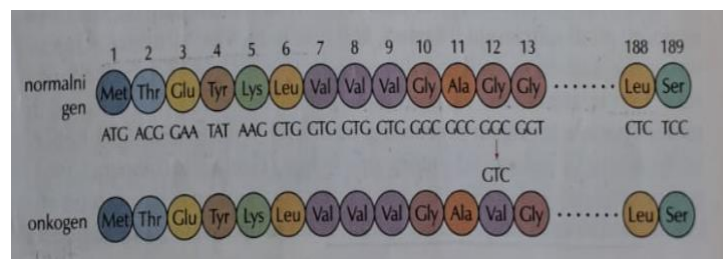
Preuzeto: <https://www.slideserve.com/manjit/oncogenes-and-cancer>

### 1.3. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI

Rak nastaje zbog promjena u najvažnijim regulacijskim genima koji kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje (6).

Najvažnije su promijene gena koji se svrstavaju u sljedeće četiri kategorije: onkogeni, tumor-supresorski geni, geni koji sudjeluju u apoptozi i geni koji sudjeluju u popravku DNA. Onkogeni, odnosno geni koji uzrokuju zloćudne novotvorine, mutacija su protoonkogeni koji sudjeluju u regulaciji normalnog staničnog rasta i diobe. Protoonkogeni su: čimbenici rasta, receptori za čimbenike rasta, signalne molekule, molekule koje se vežu na DNA, regulatori mitotičkog ciklusa. Protoonkogeni se mogu pretvoriti u onkogene mutacijom, ali mogu i bez mutacije djelovati kao onkogeni u abnormalnim uvjetima. Procesi koji dovode do nastanka funkcionalnih onkogeni su: točkasta mutacija, prekomjerno izražavanje, translokacija, insercija virusnog gena (7).

Onkogeni koji se najčešće susreću u ljudskim tumorima su članovi porodice gena *RAS* (*rasH*, *rasK*, *rasN*). Oni imaju ulogu u nastanku 20% svih ljudskih malignoma uključujući 50% slučajeva raka debelog crijeva i 25% slučajeva raka pluća. Onkogeni *RAS* nastaju točkastim mutacijama. Od odgovarajućih protoonkogeni razlikuju se zamjenom pojedinačnih aminokiselina na ključnim mjestima. Prva otkrivena mutacija bila je zamjena glicina valinom na 12. mjestu (Slika 3). Mutacije karakteristične za onkogene *ras* održavaju protein RAS konstitutivno u aktivnoj konformaciji s vezanim GTP-om (8).

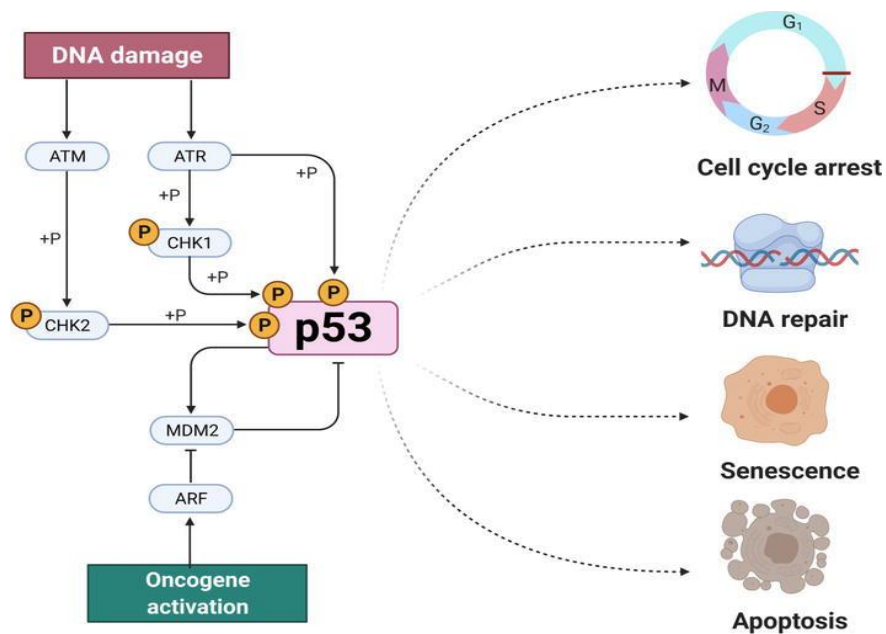


**Slika 3.** Točkaste mutacije u onkogenima *ras*.

Preuzeto: Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada,

2010

Geni koji zaustavljaju rast novotvorina nazivaju se tumor-supresorski geni. Oni djeluju kao onkogeni i suprimiraju prekomjernu proliferaciju stanica. Neoplastična pretvorba stanica nastaje ako se ovi geni izgube delecijom ili prestanu normalno funkcionirati zbog mutacije. Gubitak tumor-supresorskog gena očituje se kao gubitak heterozigotnosti. Prvi otkriveni tumor-supresorski gen je *RB-1*, koji su znanstvenici identificirali istraživanjem retinoblastoma. Vjerojatno najvažniji tumor-supresorski gen nazvan je *p53*. Normalni p53 protein suprimira djelovanje protoonkogeni, a ujedno ima ključnu ulogu u regulaciji mitotičkog ciklusa. p53 protein je glavni kontrolor koji dopušta prelazak stanica iz G1-faze u S-fazu. Ima sposobnost da prepozna oštećenu DNA; stanicama koje imaju normalnu DNA omogućiti prelazak u S-fazu, dok onima kojima je DNA oštećena blokira taj prelazak (9). Protein p53 djeluje na oštećenu DNA, nakon čega dolazi do aktivacije jednog od nekoliko mogućih efektor (Slika 4).



**Slika 4.** Djelovanje tumor-supresorskog gena *p53*

Preuzeto: <https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-02396-8>

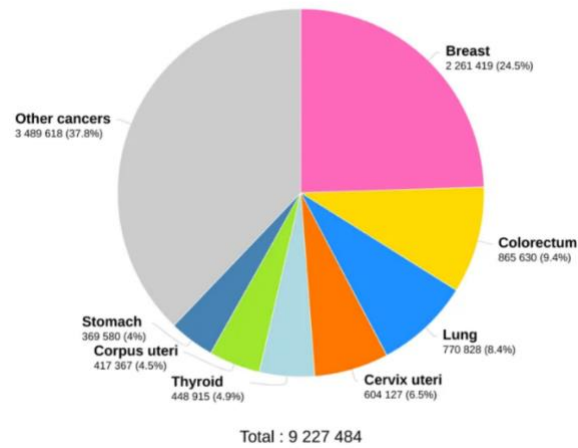
## 1.4. KARCINOM GRLIĆA MATERNICE

### 1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Globalno, karcinom grlića maternice je četvrti najčešći karcinom kod žena (Slika 5), s oko 660 000 novih slučajeva u 2022. godini. Iste godine, oko 94% od 350 000 smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomom grlića maternice dogodilo se u zemljama s niskim i srednjim prihodima. Najviše stope incidencije i smrtnosti od karcinoma grlića maternice nalaze se u podsaharskoj Africi, Srednjoj Americi i jugoistočnoj Aziji. Regionalne razlike u učestalosti karcinoma grlića maternice povezane su s nejednakostima u pristupu cijepljenju, pregledima i uslugama liječenja, čimbenicima rizika poput prevalencije HIV-a te društvenim i ekonomskim odrednicama kao što su spol, rodne predrasude i siromaštvo (10). Neki od čimbenika koji su povezani s perzistentnom infekcijom HPV-om te razvojem maligne bolesti uslijed iste, su pušenje, pretilost, dugotrajna upotreba oralne kontracepcije, visok paritet, te koinfekcija virusom herpes simplex tip 2, ili virusom HIV-a (11). Žene koje žive s HIV-om šest puta češće oboljevaju od karcinoma grlića maternice u usporedbi s općom populacijom, a procjenjuje se da je 5% svih slučajeva uzrokovano HIV-om (10).

U Hrvatskoj je posljednjih 10-ak godina zabilježeno oko 310 slučajeva i oko 120 smrti od raka grlića maternice godišnje. Za razliku od većine drugih sijela raka, ovaj se javlja u nešto mlađoj dobi, prema posljednjim podacima Registra za rak, u 2021. je trećina novooboljelih žena bila mlađa od 50 godina. Prema podacima o smrtnosti, u 2022. godini od karcinoma grlića maternice u Hrvatskoj je umrlo 109 žena (stopa 5,5/100 000), od kojih je trećina bila mlađa od 60 godina. U posljednjih 10 godina u Hrvatskoj bilježimo trend pada standardizirane stope incidencije raka grlića, dok je mortalitet stabilan (Slika 6). Prema procjenama Europske komisije za 2022. godinu, u usporedbi s zemljama članicama EU, Hrvatska se nalazi na 11. mjestu po incidenciji te 12. mjestu po smrtnosti od karcinoma grlića maternice (11)

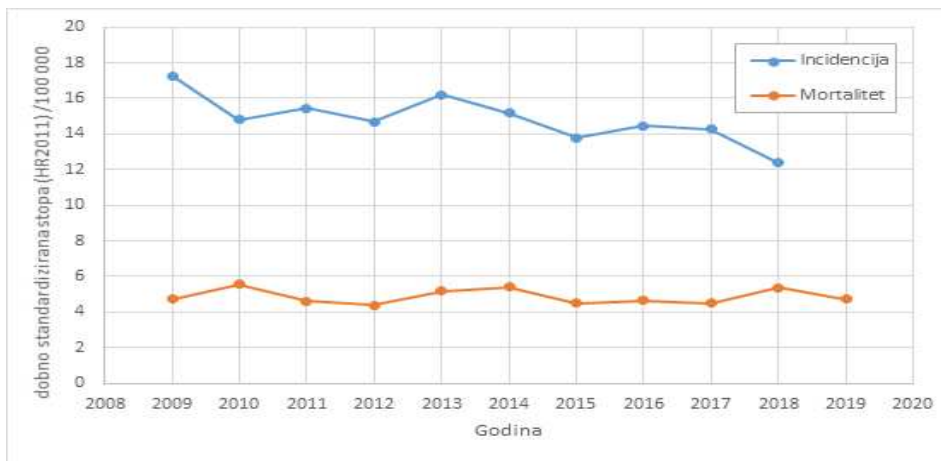
Estimated number of new cases in 2020, worldwide, females, all ages



Slika 5. Zastupljenost karcinoma kod žena, u svijetu, 2020.

Preuzeto:

[https://www.uicc.org/sites/default/files/styles/original\\_extra\\_large/public/thumbnails/image/Women%27s%20cancer%202020.png.webp?itok=OP3NyavE](https://www.uicc.org/sites/default/files/styles/original_extra_large/public/thumbnails/image/Women%27s%20cancer%202020.png.webp?itok=OP3NyavE)



Slika 6. Stopa incidencije i mortaliteta od 2009.-2019. godine u Hrvatskoj

Preuzeto: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/01/ceviks-graf-1.png>

## 1.4.2. PATOHISTOLOGIJA I KLASIFIKACIJA

U najvećem broju oboljelih žena karcinom grlića maternice je planocelularni (karcinom pločastih stanica). Vrlo rijetko, u manje od 10% oboljelih, riječ je o adenokarcinomu. Samo iznimno riječ je o anaplastičnom ili o raku malih stanica (12).

Karcinom grlića maternice lokalno se širi pretežno lateralno i anteroposteriorno. Širenje u limfne čvorove događa se relativno rano i smatra se da u 15% tumora prvog stadija već postoji zahvaćenost limfnih čvorova (13).

Za dijagnozu, liječenje i praćenje pacijentica liječnici se vode FIGO klasifikacijom karcinoma grlića maternice (Tablica 1).

**Tablica 1.** FIGO klasifikacija karcinoma grlića maternice

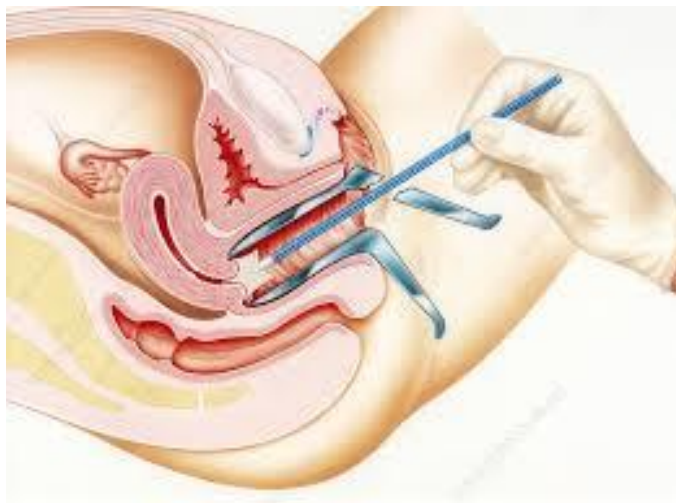
Stadij 0	Tumor <i>in situ</i>
Stadij I	Karcinom ograničen na vrat maternice
Stadij I a	Mikroskopski vidljiva lezija ograničena na grlić maternice
Stadij I a1	Stromalna invazija 3 mm i manje (prodor u dubinu) i promjer lezije 7 mm i manje (horizontalno širenje)
Stadij I a2	Stromalna invazija veća od 3 mm, a manja od 5 mm i promjer lezije veći od 7 mm
Stadij I b	Klinički vidljiva lezija ograničena na grlić maternice
Stadij I b1	Klinički vidljiva lezija velika 4 cm i manje u najvećoj dimenziji
Stadij I b2	Klinički vidljiva lezija veća od 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadij II	Karcinom grlića maternice širi se izvan vrata maternice, ali ne do zdjeličnih kostiju ni donje trećine rodnice
Stadij II a	Bez kliničkog zahvaćanja parametrija
Stadij II a1	Klinički vidljiva lezija velika 4 cm i manje u najvećoj dimenziji
Stadij II a2	Klinički vidljiva lezija veća od 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadij II b	Klinički zahvaćeni parametriji
Stadij III	Karcinom grlića maternice širi se do zdjeličnih kostiju i/ili zahvaća donju trećinu rodnice i/ili uzrokuje hidronefrozu ili zatajenje rada bubrega
Stadij III a	Karcinom grlića maternice zahvaća donju trećinu rodnice, ali bez širenja do zdjelične stijenke
Stadij III b	Karcinom grlića maternice širi se do zdjelične stijenke i/ili uzrokuje hidronefrozu ili afunkciju bubrega
Stadij IV	Karcinom grlića maternice širi se na susjedne organe i/ili postoje udaljene presadnice
Stadij IV a	Širenje na sluznicu mokraćnog mjehura ili rektuma
Stadij IV b	Postojanje udaljenih presadnica



### 1.4.3. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

Predinvazivni i rani invazivni tumori nemaju simptome. Otkrivaju se isključivo ginekološkim pregledom i PAPA-testom. Prvi simptom invazivnog karcinoma grlića maternice jest nepravilno vaginalno krvarenje, najčešće postkoitalnog tipa. U uznapredovanijim stadijima bolesti pojavljuje se jači iscjedak, najčešće neugodna mirisa. Znakovi uznapredovale bolesti jesu bol u maloj zdjelici, anemija, hidronefroza i posljedična uremija te otekline nogu. Kao posljedica širenja bolesti u mokraćni mjehur može se razviti hematurija, a kao posljedica širenja bolesti u rektum može doći do opstrukcije, proljeva ili krvi u stolici. Kod metastatske bolesti klinička slika ovisi o sijelu presadnica. Presadnice se najčešće nalaze u paraaortalnim limfnim čvorovima, kostima, jetri i plućima (14).

Ginekološki pregled uz PAPA test osnova je za postavljanje dijagnoze predinvazivnih stadija bolesti. Bimanualni ginekološki pregled praćen uzimanjem bioptičkog materijala najvažniji je test za postavljanje dijagnoze uznapredovalog karcinoma grlića maternice. Kolposkopija može pomoći u postavljanju dijagnoze ranih stadija invazivnog raka (Slika 7). U svrhu provjere lokoregionalne proširenosti bolesti, obvezno je u pacijentice s karcinomom grlića maternice napraviti MR zdjelice te u slučaju sumnje na invaziju rektuma ili mokraćnog mjehura uraditi rektoskopiju i cistoskopiju. U svrhu bolje definicije stupnja proširenosti bolesti obvezno je napraviti MSCT abdomena i zdjelice/ MSCT toraksa, ili eventualno PET-CT. Svrha je tih pregleda definirati moguću zahvaćenost zdjeličnih i paraaortalnih limfnih čvorova tumorom te moguće širenje u jetru i u druge trbušne i izvantrbušne organe. Intravenska urografija je dijagnostički test kojemu je cilj prepoznati moguću tumorom izazvanu opstrukciju protoka mokraćne, što do vodi do klasificiranja bolesti u FIGO stadij IIIb. Navedenu slikovnu dijagnostiku potrebno je nadopuniti nalazima kompletne krvne slike, diferencijalne krvne slike i biokemijskim pretragama krvi te klirensom kreatinina (14).



**Slika 7.** Ginekološki pregled s uzimanjem obriska.

Preuzeto: <https://www.sciencephoto.com/media/1156288/view/cervical-smear-test-illustration>

#### 1.4.4. PREVENCIJA I LIJEČENJE

Primarna prevencija karcinoma grlića maternice je sprječavanje nastanka infekcije HPV-om koja je nužan uzročnik raka. Kao i kod drugih spolno prenosivih infekcija, najvažniji oblik zaštite je odgovorno spolno ponašanje i korištenje kondoma pri spolnom odnosu. Protiv infekcije HPV-om, koja je nužan preduvjet za razvoj karcinoma grlića maternice, postoji cjepivo za zaštitu od određenih tipova HPV-a. Cijepljenje protiv HPV-a je u redovitom programu cijepljenja u Hrvatskoj za učenice i učenike osmih razreda osnovnih škola (15).

Glavni terapijski modalitet u liječenju početnih stadija karcinoma grlića maternice, odnosno *in situ* raka i invazivnog raka FIGO stadija Ia i Ib, jest kirurško liječenje. Kod preinvazivnih lezija primjenjuje se konizacija s gotovo 100%-tnom razinom uspješnosti u liječenju. U slučaju invazivnih tumora primjenjuje se radikalni kirurški zahvat - radikalna histerektomija s adnektomijom i lim- fadenektomijom. Kod mladih bolesnica radi održavanja fertiliteta, može se predložiti radikalna trahelektomija koje je indicirana za tumore veličine do 2 cm. Konkomitantna radiokemoterapija zlatni je standard u liječenju lokalno uznapredovalih stadija

bolesti, odnosno stadija FIGO 1b2-IVa. Usporedno ordiniranje vanjskoga zračenja i cisplatine, u usporedbi sa samom radioterapijom, znatno povećava vjerojatnost izlječenja, odnosno smanjuje rizik od smrtnosti za 40% s procijenjenim 5-godišnjim preživljenjem oko 60-70%. Konkomitantna kemoradioterapija prvenstveno poboljšava lokalnu kontrolu bolesti no svjedoči visoku pojavnost diseminiranog recidiva. Primjena konkomitantne brahiradiokemoterapija (usporedna primjena brahiradioterapije niske brzine doze i kemoterapije s ifosfamidom i cisplatinom) praćena primjenom konsolidacijske kemoterapije ifosfamidom i cisplatinom, postiže najbolje rezultate u liječenju lokalno uznapredovalog, inoperabilnog karcinoma grlića maternice. Metastatski karcinom grlića maternice je neizlječiva bolest koja se liječi kemoterapijom temeljenoj na cisplatinu uz dodatak paklitaksela, topotekana, ifosfamida ili gemcitabina (16).

## **1.5. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA**

### **1.5.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA**

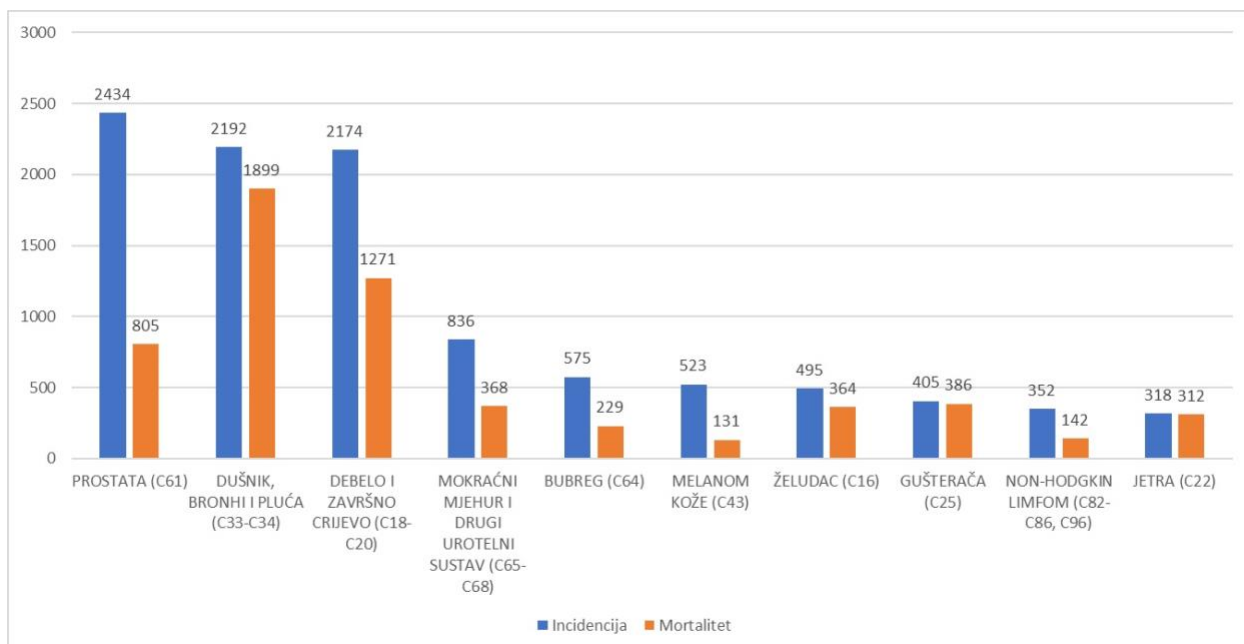
Rak mokraćnog mjehura je deveta najčešća vrsta raka u svijetu. Godine 2022. u svijetu je više od 600 000 ljudi oboljelo od raka mokraćnog mjehura, a više od 220 000 ljudi umrlo je od te bolesti (17).

Rak mjehura javlja se uglavnom kod starijih ljudi. Otprilike 9 od 10 osoba s ovim karcinomom starije je od 55 godina. Prosječna dob ljudi kada im se dijagnosticira rak mokraćnog mjehura je 73 godine. Vjerojatnost da će muškarci razviti ovaj rak tijekom života su 1 prema 28. Za žene, vjerojatnost je 1 prema 89. Međutim, šanse svake osobe da dobiju rak mokraćnog mjehura mogu biti veće ili manje od ovoga, ovisno o njihovim čimbenicima rizika (18).

Pušenje je glavni čimbenik rizika za razvoj raka mokraćnog mjehura. Ljudi koji puše imaju 3 puta veću vjerojatnost da će dobiti rak mokraćnog mjehura od ljudi koji ne puše. Određene industrijske

kemikalije također se povezuju s rakom mokraćnog mjehura. Kemikalije koje se nazivaju aromatski amini, poput benzidina i beta-naftilamina, koje se ponekad koriste u industriji boja, mogu uzrokovati rak mjehura (19).

Najčešća sijela raka kod muškaraca u 2021. godini bila su rak prostate (2434 slučaja; 18% svih dijagnoza raka u muškaraca), rak dušnika, bronha i pluća (2192; 17%), rak debelog i završnog crijeva (2174; 16%), rak mokraćnog mjehura i drugog urotelnog sustava (836; 6%) i rak bubrega (575; 4%) (20). To je prikazano na Slici 8.



**Slika 8.** Najčešća sijela raka u muškaraca u 2021. godini.

Preuzeto: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2024/01/1a.jpg>

## 1.5.2. PATOHISTOLOGIJA I KLASIFIKACIJA

Rak mokraćnog mjehura najčešće potječe iz prijelaznog epitela (90%). Ostali patohistološki oblici su: rak pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i rak malih stanica (1%). Za procjenu stadija proširenosti karcinoma koristi se TNM sustav (Tablica 2) Američkog združenog odbora za rak (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*). T opisuje koliko je primarni tumor narastao te njegovu invazivnost, odnosno prodor u okolna tkiva, N označava širenje tumora u limfne čvorove, a M metastaze (21).

**Tablica 2.** TNM klasifikacija raka mokraćnog mjehura

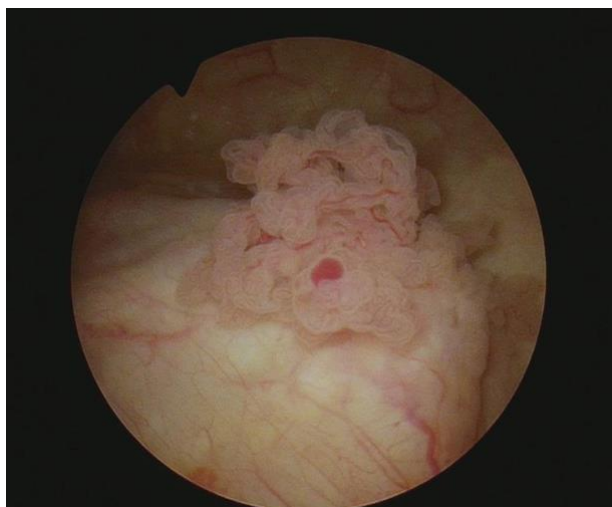
Primarni tumor (T)	
Tx	primarni se tumor ne može opisati
T0	nema dokaza primarnog tumora
Ta	neinvazivni papilarni karcinom
Tis	karcinom <i>in situ</i> : 'flat tumor'
T1	tumor invadira subepitelno vezivno tkivo
T2	tumor invadira mišićni sloj
T2a	tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
T2b	tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	tumor invadira perivezikalno tkivo
T3a	mikroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
T3b	makroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
T4	tumor invadira jedno od navedenoga: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, zdjelična stijjenka, trbušna stijjenka
T4a	tumor invadira jedno od navedenoga: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina
T4b	tumor invadira zdjeličnu stijjenku, trbušnu stijjenku
Limfni čvorovi (N)	
Tx	limfni čvorovi ne mogu biti određeni
N0	nema zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova
N1	jedan zahvaćeni regionalni limfni čvor u zdjelici
N2	više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici
N3	metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima
Udaljene presadnice (M)	
M0	nema udaljenih presadnica
M1	udaljene presadnice

Od novodijagnosticiranih zloćudnih tumora mokraćnoga mjehura njih oko 70% pripada tzv. ne-mišićno invazivnim tumorima. Od njih pak 70-75% čine egzofitični papilarni tumori ograničeni na sluznicu (stadij Ta), oko 20-25% invadira submukozu (stadij T1), a u oko 5-10% nalazimo ravne, tumore koji dopiru do bazalne membrane (Tis). Ovi tumori imaju sklonost recidiviranju te će 10-70% bolesnika s Ta tumorom doživjeti povratak bolesti u mjehuru unutar 5 godina. Mišićno invazivni tumori su oni koji invadiraju mišićni sloj stijenke (T2), proširili se ekstravezikalno (T3) ili invadiraju susjedna tkiva i organe (T4).

### 1.5.3. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

U 90% bolesnika rak mokraćnoga mjehura očituje se bezbolnom hematurijom, mikroskopskom ili makroskopskom. Također, pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja su hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Kod uznapredovale bolesti pojavljuju se simptomi vezani uz sijela presadnica. Urotelni rak najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća i kosti (21).

Ako se pojavi hematurija, bolesniku je potrebno napraviti intravensku urografiju te cistoskopiju (Slika 9). Ako cistoskopija pokaže tumor, potrebno je učiniti transuretralnu resekciju tumora u mjehuru. Za potvrdu dijagnoze tumora gornjeg dijela urotrakta izvode se retrogradna pijelografija te ureteroskopija. Kao pomoć u dijagnostici služi citološki pregled mokraće. Za procjenu proširenosti bolesti služimo se MSCT-om ili MR-om abdomena i male zdjelice te RDG-om pluća. U slučaju povišene vrijednosti alkalne fosfataze ili prisutnih drugih simptoma vezanih uz koštani sustav, potrebno je učiniti scintigrafiju kostiju (21).



**Slika 9.** Cistoskopski prikaz papilarnog karcinoma mokraćnog mjehura iznad lijevog ušća uretre.

Preuzeto: <https://www.bladdercancerjournal.com/case-17>

#### 1.5.4. LIJEČENJE

Primarni oblik liječenja površinskog raka mokraćnoga mjehura jest transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog povratka bolesti, nakon resekcije potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju. Adjuvantno se intravezikalno aplicira imunoterapija ili kemoterapija. U imunoterapiji površinskog raka mokraćnoga mjehura primjenjuje se BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), dok se od citostatika najčešće primjenjuje mitomicin C (mora se aplicirati unutar 24 sata nakon transuretralne resekcije te potom, prema potrebi, ponoviti aplikaciju). Rjeđe se primjenjuje doksorubicin. Nakon aplikacije citostatika bolesnik ne mokri jedan sat te hoda, kako bi se zadržao kontakt lijeka s endotelom (21).

Svi su invazivni karcinomi mokraćnoga mjehura visokoga stupnja zloćudnosti. Osnovni oblik liječenja mišićno invazivnog raka mokraćnoga mjehura jest radikalna cistektomija, s neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenom na cisplatinu (CG ili MVAC protokol). Metastatska se bolest liječi kemoterapijom i imunoterapijom. Od citostatika rabe se cisplatin, metotreksat, doksorubicin, vinblastin, gemcitabin i paklitaksel. Danas je standardna prvolinijska kemoterapija kombinacija cisplatine i gemcitabina (CG-protokol). Za pacijente koji ne mogu podnijeti liječenje

cisplatinom u 1. liniji liječenja može se primijenti imunoterapija atezolizumabom ili pembrolizumabom. U drugoj liniji liječenja anti-PD1 ili anti-PDL1 imunoterapija je preferirana terapijska opcija pred citostatskom terapijom (vinflunin, taksani). Imunoterapija anti-PD1 i anti-PDL1 protutijelima je upravo kod raka mokraćnog mjehura pokazala izuzetnu djelotvornost i zasad je ovaj rak sijelo s najvećim odobrenim brojem imunoterapijskih opcija (21).

## 1.6. ZELENI ČAJ

### 1.6.1. KARAKTERISTIKE i STANIŠTE

Čajevac (*Camellia*) je otporan zimzeleni grm ili malo stablo koje je vjerojatno najčešće uzgajana vrsta *Camellie* na svijetu, tradicionalno korištena za proizvodnju čajeva s kofeinom (Slika 11). Listovi se beru kada počnu rasti početkom proljeća, a zatim se različito obrađuju kako bi se stvorili bijeli, zeleni, oolong i crni čaj. Postoje dvije glavne vrste. *Camellia sinensis* var. *sinensis* je kineska sorta s malim listovima koja je otpornija na hladnoću. *C. sinensis* var. *assamica* dolazi iz regije Assam na sjeveru Indije i ima veće listove. Razlike u okusu, boji i aromi između ovih čajeva postižu se variranjem sorte, klime, berbe, oksidacije i obrade (22).



**Slika 11.** Kineski čajevac (lat. *Camellia sinensis*)

Preuzeto: <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2023/11/kineski-cajevac-9-1170x650.jpg>



## 1.6.2. DOBIVANJE ZELENOG ČAJA

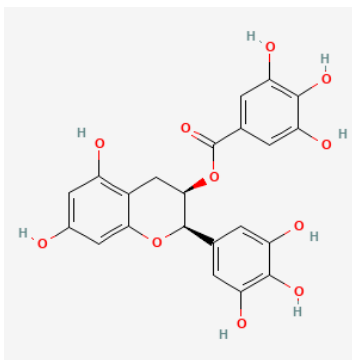
Manji mladi listovi i pupoljci koriste se za proizvodnju zelenog čaja, dok se stariji, veći listovi koriste za oolong i crni čaj, a pupoljci za bijeli čaj (22).

Za konzumaciju sakupljaju se mladi, svijetlozeleni listovi, ručno se sakupljaju svakih 7-14 dana. Razlika između zelenog i crnog čaja je u procesu pripreme. Zeleni čaj je neobrađen dok su listovi crnog čaja fermentirani. Listovi se ne smiju kuhati, treba ih samo popariti ključalom vodom, poklopiti i nakon nekoliko minuta procijediti. Ako se ostavi duže vrijeme da se listovi namaču, čaj bude gorak. Jedan svježi list sadrži oko 4% kofeina (23).

## 1.6.3. AKTIVNI SPOJEVI I NJIHOVA LJEKOVITOST

Zdravstvene prednosti zelenog čaja proizlaze iz prisutnosti prirodnih antioksidansa, poput polifenola: široke skupine spojeva koji čine čak 30% suhe težine zelenog čaja. Vjeruje se da su polifenoli iznimno snažni antioksidansi, s učinkom poput vitamina C i E, karotena i tokoferola. Količina zdravih aktivnih tvari u čajevima ovisi o vrsti čaja, količini listova po porciji, temperaturi i vremenu kuhanja (24).

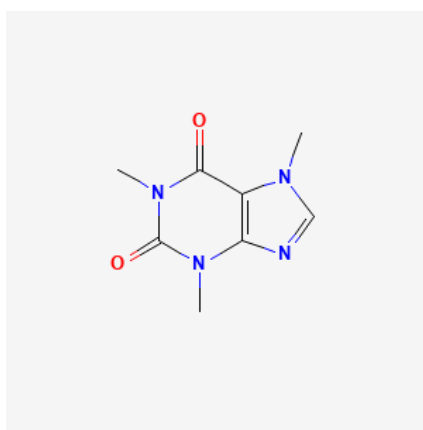
Istraživanja koja potvrđuju visok antioksidativni potencijal čajeva tvrde da on potječe od znatne količine katehina, vrste fenolnog spoja s pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje. Zeleni čaj sadrži četiri glavna katehina: epikatehin (EC), epikatehin-3-galat (ECG), epigalokatehin (EGC) i epigalokatehin-3-galat (EGCG), pri čemu je EGCG najaktivniji i najzastupljeniji (Slika 12). Katehini iz čaja pokazuju izvanrednu antioksidativnu aktivnost zahvaljujući svojoj sposobnosti neutraliziranja slobodnih radikala i jačanju aktivnosti enzima detoksikacije (24).



**Slika 12.** Struktura epigalokatehin-3-galata

Preuzeto: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65064#section=Structures>

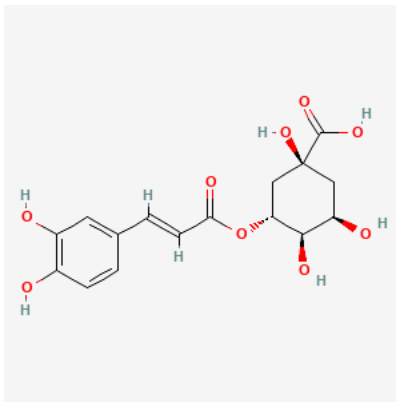
Kofein je bitna komponenta čajeva i odgovoran je za njihov karakterističan i ugodan okus (Slika 13). Istovremeno, snažan je antioksidans koji doprinosi antioksidativnom potencijalu napitka. Njegova razina ovisi o vremenu berbe i starosti listova, što su listovi stariji, to je manji sadržaj kofeina. Kofein ovisi i o sorti čaja, vremenskim uvjetima tijekom vegetacije, kao i metodi kuhanja. Učinak kofeina temelji se na njegovom antioksidativnom potencijalu, neutralizirajući reaktivne kisikove vrste i pojačavajući aktivnost enzima antioksidansa te ukupne razine glutaciona. U redovitim dozama kofein može smanjiti trajni oksidativni stres, čime smanjuje učestalost bolesti povezanih s slobodnim radikalima. Osim toga, kofein može inhibirati izlučivanje proinflamatornih citokina, pokazujući protuupalne učinke (24).



**Slika 13.** Struktura kofeina.

Preuzeto: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519#section=Structures>

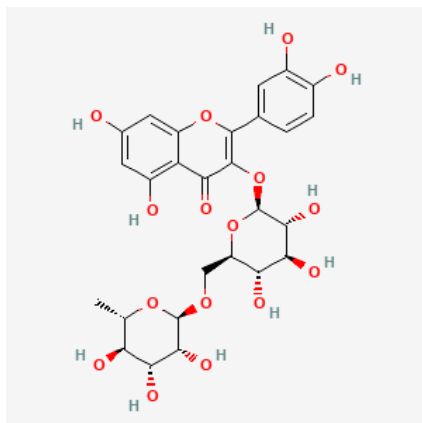
Fenolne kiseline su sekundarni biljni metaboliti, poznati po svom visokom antioksidativnom i protuupalnom potencijalu, uz neuroprotektivne i hipoglikemijske učinke. Također je utvrđeno da inhibiraju rast stanica raka i sprječavaju metastaze. Neke fenolne kiseline, moduliranjem metabolizma lipida i ugljikohidrata, mogu podržati regulaciju metaboličkih poremećaja. Jedan od najčešćih spojeva iz ove skupine u hrani je klorogenska kiselina (Slika14).



**Slika 14.** Struktura klorogenske kiseline

Preuzeto:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427#section=Structures>

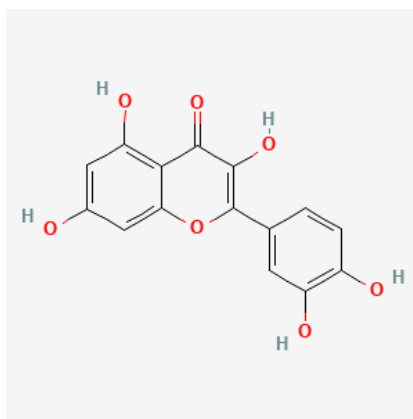
Rutin, koji je polifenolni spoj, snažan je antioksidans (Slika 15). Njegova sinergijska interakcija s askorbinskom kiselinom može pojačati zaštitne učinke obje tvari na kardiovaskularni sustav, jačajući krvne žile. Također ima antidijabetička i protuupalna svojstva, sprječavajući patologije povezane s dijabetesom. Njegova antioksidativna i protuupalna aktivnost nudi potencijal za sprječavanje stanja uzrokovanih slobodnim radikalima ili upalnim procesima, uključujući neurodegenerativne bolesti (24).



**Slika 15.** Struktura rutina

Preuzeto: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805#section=Structures>

Kvercetin je fitokemikalija s antioksidativnim i neuroprotektivnim djelovanjem (Slika 16). Osim toga, opaženo je da normalizira metabolizam ugljikohidrata inhibiranjem apsorpcije glukoze iz probavnog trakta, regulira izlučivanje inzulina i poboljšava osjetljivost na inzulin u tkivima. Štoviše, kombinacija kvercetina s epigalokatehin-3-galatom (EGCG) može pojačati antikancerogene učinke oba spoja (24).



**Slika 16.** Struktura kvercetina

Preuzeto: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=Structures>

## 1.7. SREBRO

### 1.7.1. SREBRO

Srebro je mekan i sjajan prijelazni metal koji je poznat po tome što ima najveću reflektivnost od svih metala. Među mnogim korisnim svojstvima, srebro je prepoznato po svom antimikrobnom djelovanju. Poznato je da srebro postaje biološki aktivno kada se rasprši u svoj monoatomske ionski oblik ( $\text{Ag}^+$ ).

Do danas su poznata tri mehanizma pomoću kojih srebro djeluje na mikrobe. Prvo, srebrni kationi mogu stvoriti pore i probiti bakterijsku staničnu stijenku reakcijom s komponentom peptidoglikana. Drugo, srebrni ioni mogu ući u bakterijsku stanicu, inhibirajući stanično disanje i ometajući metaboličke puteve, što dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva. Na kraju, srebro unutar stanice može također ometati DNA i njezin replikacijski ciklus (25).

### 1.7.2. KOLOIDNO SREBRO

Koloidno srebro je mješavina srebrnih iona i srebrnih nanočestica suspendiranih u vodenom mediju. Sintetizira se elektrolizom koristeći set srebrnih katoda. Koloidno srebro prvi je put upotrijebio 1891. godine kirurg po imenu B.C. Crede za sterilizaciju rana. Upotreba srebra postajala je sve popularnija između 1900. i 1940. godine. Nakon toga, antibiotici su zamijenili upotrebu srebra. Danas se mnogi proizvodi nude ne samo kao otopine koloidnog srebra, već i kao osobni uređaji prikladni za kućnu upotrebu, koji sintetiziraju koloidno srebro. Međutim, komercijalizacija koloidnog srebra popraćena je nedosljednostima u proizvodnji i svojstvima, kao i slučajevima neočekivanih nuspojava. Stoga je Agencija za hranu i lijekove (FDA) isključila bilo koje komercijalizirano koloidno srebro koje tvrdi da ima zdravstvene koristi bez znanstvenih dokaza. Slične mjere poduzeli su Therapeutic Goods Administration (TGA) u Australiji i Europska komisija (EC). Komercijalna prodaja koloidnog srebra nije zabranjena, ali tvrdnje o zdravstvenim prednostima bez znanstvene potpore nisu dopuštene (25).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju na stanične linije humanih karcinoma.

Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnosti ispitivana je na staničnim linijama karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) i karcinoma mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP).

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



### 3.1. STANIČNE LINIJE

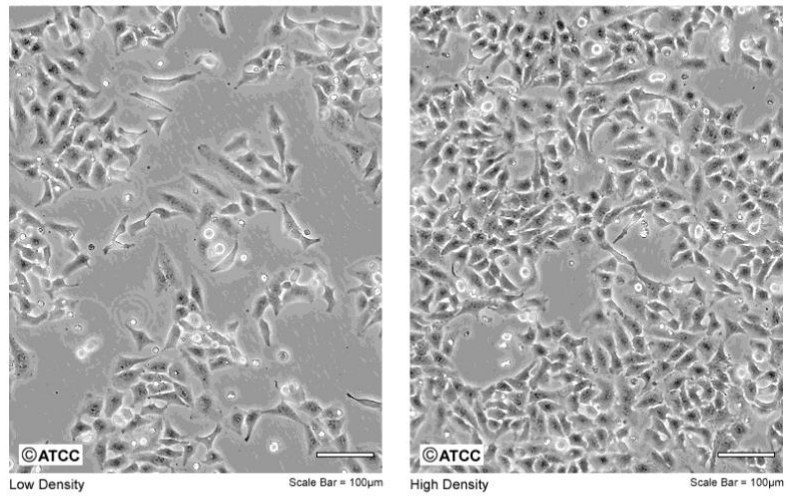
*In vitro* ispitivanje citotoksičnosti provodilo se na humanim staničnim linijama karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) te karcinoma mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP). Karakteristike navedenih staničnih linija prikazane su u tablicama 3, 4, 5, 6.

**Tablica 3.** Karakteristike stanične linije HeLa

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

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

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



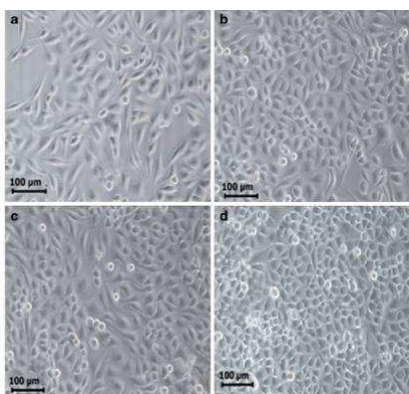
**Slika 17.** Stanice karcinomske linije HeLa

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

**Tablica 4.** Karakteristike stanične linije SiHa

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

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Vrsta stanica</b>	Epitelne
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Tkivo</b>	Maternica, cerviks
<b>Bolest</b>	Karcinom pločastih stanica
<b>Dob</b>	55 godina
<b>Spol</b>	Žensko
<b>Etnicitet</b>	Azijski
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Uvjeti čuvanja</b>	Parna faza tekućeg dušika
<b>Primjena</b>	3D kultura stanica Istraživanje raka Istraživanje zaraznih bolesti Istraživanje spolno prenosivih bolesti



**Slika 18.** Stanice karcinomske linije SiHa

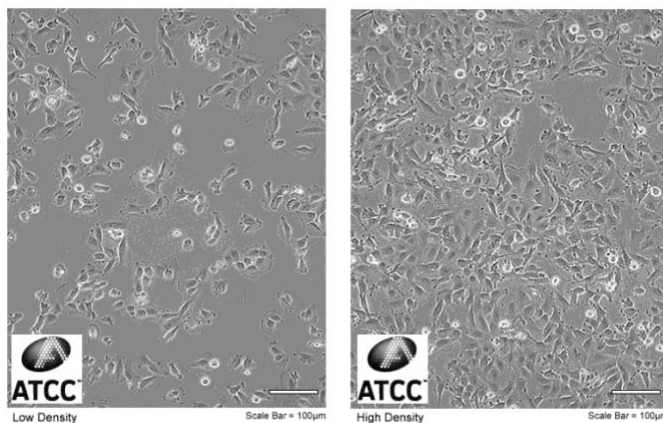
Preuzeto: [https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with\\_fig5\\_225977369](https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with_fig5_225977369)

**Tablica 5.** Stanice karcinomske linije T24

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

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Vrsta stanica</b>	Epitelne
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Tkivo</b>	Mokraćni mjehur
<b>Bolest</b>	Karcinom prijelaznog epitela
<b>Dob</b>	81 godina
<b>Spol</b>	Žensko
<b>Etnicitet</b>	Bijela rasa
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Primjena</b>	Ova stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju

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



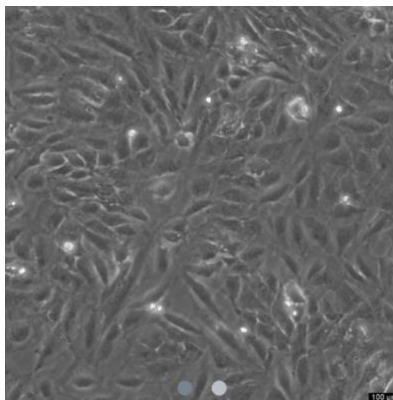
**Slika 19.** Stanice karcinomske linije T24

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

**Tablica 6.** Stanice karcinomske linije TCCSUP.

Preuzeto: <https://www.atcc.org/products/htb-5>

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Vrsta stanica</b>	Epitelne
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Tkivo</b>	Mokraćni mjehur
<b>Bolest</b>	Karcinom prijelaznog epitela
<b>Dob</b>	67 godina
<b>Spol</b>	Žensko
<b>Etnicitet</b>	Bijela rasa
<b>Format proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Primjena</b>	3D kulture stanica, istraživanje raka



**Slika 20.** Stanice karcinomske linije TCCSUP

Preuzeto: <https://www.cytion.com/TCCSUP-Cells/305073>

### 3.2. ZELENA SINTEZA KOLOIDNOG SREBRA

Za zelenu sintezu koloidnog srebra prethodno je bilo potrebno pripremiti otopinu zelenog čaja, otopinu natrijevog karbonata koncentracije 0,1 M za naknadno podešavanje pH vrijednosti otopina (6, 7, 8, 9) i otopinu srebrovog nitrata koncentracije 0,0001 M koji se koristio za dokapavanje u rashlađenu i profiltriranu otopinu čaja. Otopina zelenog čaja je pripravljena miješanjem suhog eko zelenog čaja s proključalom destiliranom vodom. Zeleni čaj je kuhan u periodu od 20 minuta na temperaturi 90 – 95 °C uz korištenje magnetske mješalice. Vruća otopina profiltrirana je kroz filter papir, a nakon hlađenja na sobnoj temperature filtracija je provedena pomoću vakuum filter pumpe sa staklenim vlaknima veličina pora 1 μm.

Nakon što su pripravljene otopine srebrovog nitrata koncentracije 0,001 M, natrijevog karbonata koncentracije 0,1 M i zelenog čaja koji je dvostruko filtriran, sinteza se provodi na način da se u otopinu zelenog čaja dokapava otopina srebrova nitrata brzinom 1 kap/s uz miješanje na magnetskoj mješalici brzinom 700 o/min. Naknadno podešavanje pH vrijednosti otopinom provodilo se otopinom natrijeva karbonata.

Potrebno je 45 mL otopine  $\text{AgNO}_3$  i 15 mL otopine čaja za jedan uzorak odnosno sinteza se provodila u omjeru 3:1 u korist otopine  $\text{AgNO}_3$ . Sintetizirano je 4 uzorka koloidnog srebra (pH vrijednosti 6, 7, 8 i 9).

Nakon sinteze uzoraka koloidnog srebra i naknadnog podešavanja pH vrijednosti otopinom natrijeva karbonata koncentracije 0,1 M izvršeno je centrifugalno taloženje svakog sintetiziranog uzorka pomoću centrifalnog taložnika.

Taloženje svakog od uzoraka provodilo se u vremenu od 10 min brzinom od 3000 o/s. Centrifugalno taloženje je omogućilo smanjenje mutnosti dobivenih suspenzija (26).

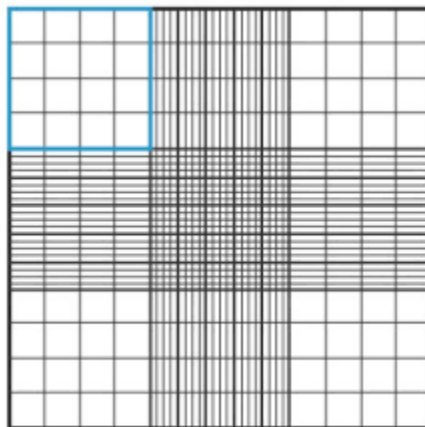
### 3.3. STANIČNA KULTURA

Stanične linije su nakon odmrzavanja uzgojene u DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mediju u vlažnom inkubatoru na 37°C, uz 5% CO<sub>2</sub>. DMEM je široko korištena bazalna podloga za potporu rastu mnogih stanica sisavaca. Sadrži hranjive tvari (aminokiseline i minerale), glukoze i FBS (*Fetal bovine serum*, hrv. goveđi serum). U njemu se nalaze i antibiotici te fenolno crvenilo (indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je potrebna promjena medija jer su ga stanice prerasle). Adherirane stanice na podlozi, nakon uklanjanja DMEM-a PBS-om (*phosphate buffer saline*, hrv. puferirana otopina fosfatnih soli), tretiramo tripsinom, proteolitičkim enzimom koji cijepanjem peptidnih veza omogućava odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje.

Potom slijedi brojanje stanica pomoću Bürker - Türkove komorice (Slika 21) pri čemu se 10 µL stanica pomiješa s 90 µL Trypan Blue boje koja boja mrtve stanice te tako omogućava brojanje živih stanica koje nisu obojane. U komoricu prenesemo pripravljenu staničnu suspenziju te pomoću mikroskopa izbrojimo žive stanice unutar pet kvadratića (Slika 22), a konačan broj izračunamo po formuli:  $N \times 10 \times 10^4$  stanica/mL ( $N$  = broj živih stanica u kvadratićima, 10 = faktor razrjeđenja,  $10^4$  = volumen komorice).

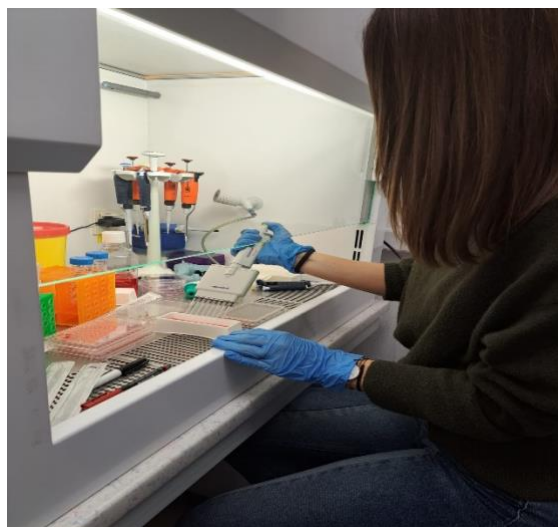


**Slika 21.** Bürker - Türkova komorica



**Slika 22.** Komorica za brojanje stanica

Jednak broj stanica presađuje se u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu (Slika 23).



**Slika 23.** Presađivanje stanica u jažice

Nakon 24 sata isisamo medij sa stanica i tretiramo sa ekstraktom koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju. Na stanice grlića maternice djelujemo u različitim razrjeđenjima: 0,1%, 0,5%, 1%,



2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50%. Tri jažice, koje sadrže samo medij predstavljaju kontrolu. Stanice se potom ostave u inkubatoru tijekom 4, 24, 48 i 72 sata.

### 3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT)

MTT je uspostavljena metoda za određivanje broja održivih stanica u istraživanjima proliferacije i citotoksičnosti. Ovaj test temelji se na cijepanju žutog tetrazolina (MTT) pomoću mitohondrijskih enzima. Kao produkt reakcije nastaje topljivi ljubičasti formazan, a količina proizvedenog formazana izravno je proporcionalna broju živih stanica, prisutnih tijekom izlaganja MTT-u (27).

Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u formazan, dok mrtve stanice gube tu sposobnost (Slika 24). Mehanizam pretvorbe MTT-a uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a (28).

Nakon dodatka otopine MTT-a, stanice se inkubiraju na 37°C kroz 2 sata. Ljubičasti formazan koji nastaje u stanici se mjeri spektrofotometrijski. Nakon uklanjanja medija, novonastali formazan se otopi u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) kako bi se mogla očitati njegova apsorbancija na 570 nm. Pločice se potom inkubiraju 10 min na 37°C uz treskanje.

Citotoksična aktivnost ispitivanih uzoraka koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju se iskazuje omjerom izmjerenih apsorbancija stanica tretiranih uzorcima vodenih ekstrakata koloidnog srebra te apsorbancija onih koje nisu tretirane (kontrolne skupine).



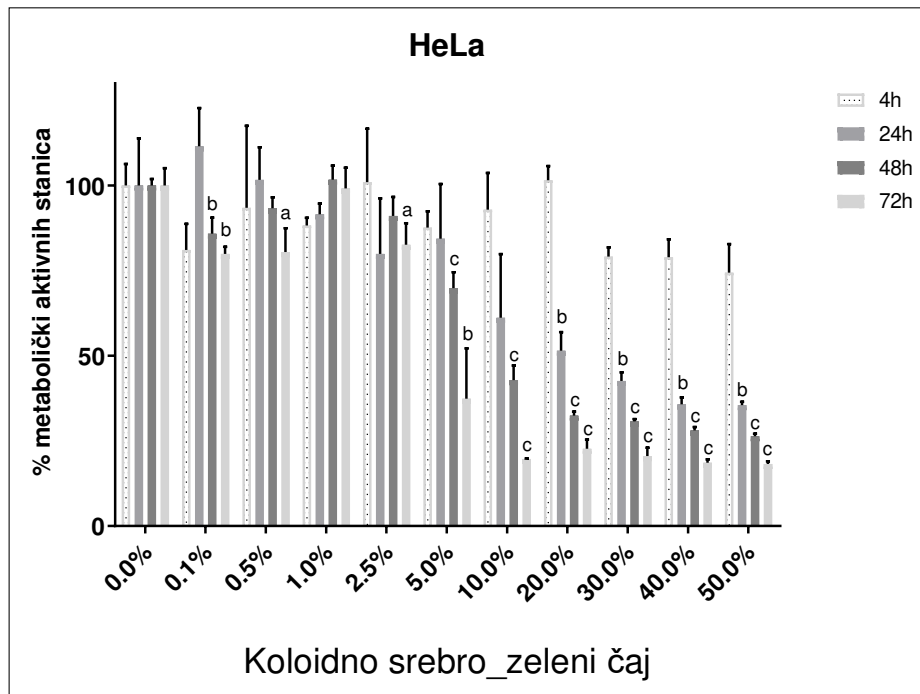
**Slika 24.** Obojenje stanica ljubičastim formazanom

### 3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Izmjerene su apsorbancije kontrolnih (stanice karcinoma u mediju) te ispitivanih skupina (stanice tretirane otopinom koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju). Izračunate su srednje vrijednosti apsorbancije kontrolnih i ispitivanih skupina nakon 4, 24, 48 i 72 sata te vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju korištenih ekstrakata nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Za irračunavanje IC50 vrijednosti te za statističku analizu korišten je program GraphPad Prism 8.0. Dobiveni rezultati su prikazani grafički.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. STANIČNA LINIJA HeLa

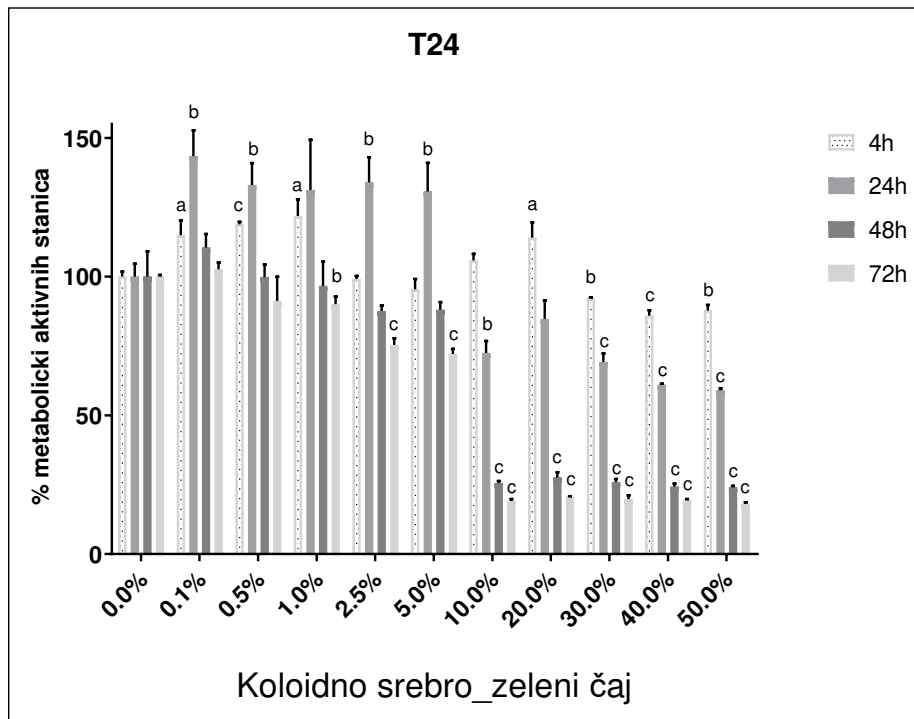


	<b>4h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>IC50 (%)</b>	<b>ND</b>	<b>21,12</b>	<b>11,93</b>	<b>5,21</b>

**Slika 25.** Citotoksična aktivnost koloidnog srebra, (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 ostvarena je u svim koncentracijama. Značajna citotoksična aktivnost uočena je nakon 24, 48 i 72 sata, pri čemu je IC50 vrijednost nakon 24 sata 21,12%, 48 sati 11,93%, a nakon 72 sata 5,21%. IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenski interval od 4 sata. Najznačajnija citotoksična aktivnost uočena je nakon 72 sata pri postotku od 10% i primjenom koncentriranijih otopina se značajno ne uvećava.

## 4.2. STANIČNA LINIJA T24

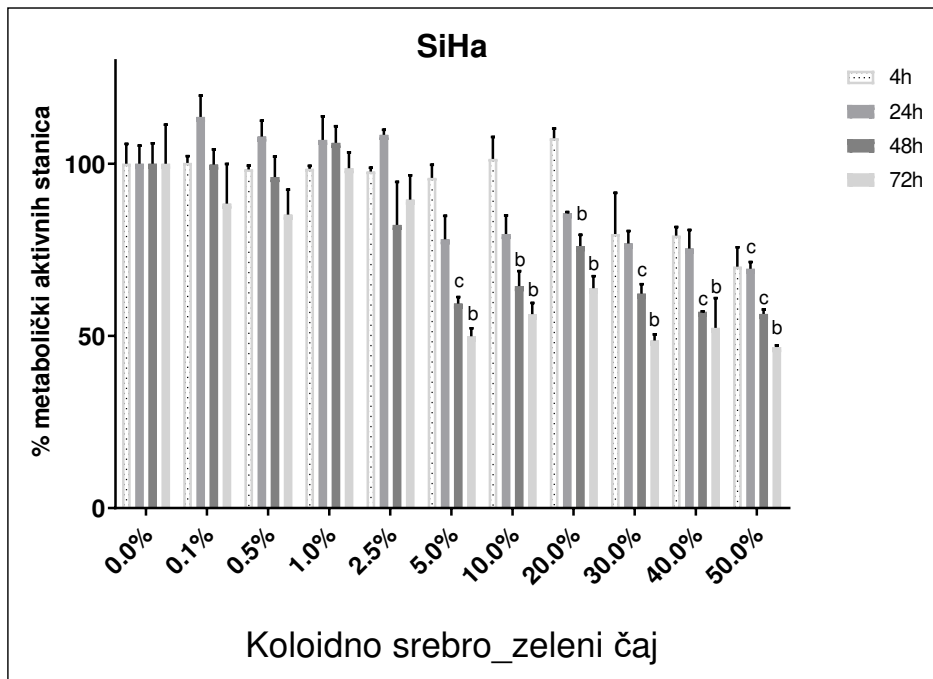


	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	ND	10,45	6,72

**Slika 26.** Citotoksična aktivnost koloidnog srebra, (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,  $P < 0,001$ ).

Značajna citotoksična aktivnost uočena je nakon 48 i 72 sata, pri čemu je IC50 vrijednost nakon 48 sati 10,45%, a nakon 72 sata 6,72%. IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenske intervale od 4 i 24 sata. Najznačajnija citotoksična aktivnost uočena je nakon 72 sata pri postotku od 10% i primijenom koncentriranijih otopina se značajno ne uvećava.

### 4.3. STANIČNA LINIJA SiHa

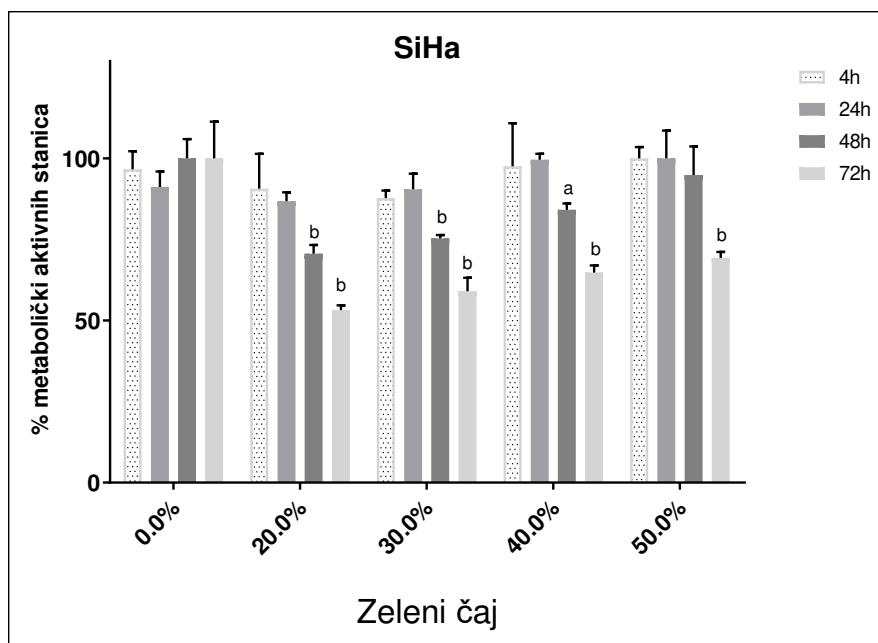


	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	ND	43,95	26,2

**Slika 27.** Citotoksična aktivnost koloidnog srebra, (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 je uočena pri svim koncentracijama. Značajna citotoksična aktivnost uočena je nakon 48 i 72 sata, pri čemu je IC50 vrijednost nakon 48 sati 43,95%, a nakon 72 sata 26,2%. IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenske intervale od 4 i 24 sata. Najznačajnija citotoksična aktivnost uočena je nakon 72 sata pri upotrebi 5%, 30% i 50%-tnih otopina. Kod primjene koncentracija od 10% i 20% došlo je do neznatnog pada citotoksične aktivnosti i porasta broja metabolički aktivnih stanica u odnosu na 5%-tnu otopinu.

Na staničnoj liniji SiHa proveden je i kontrolni eksperiment gdje su stanice tretirane otopinom samo zelenog čaja u različitim razrjeđenjima (Slika 28).

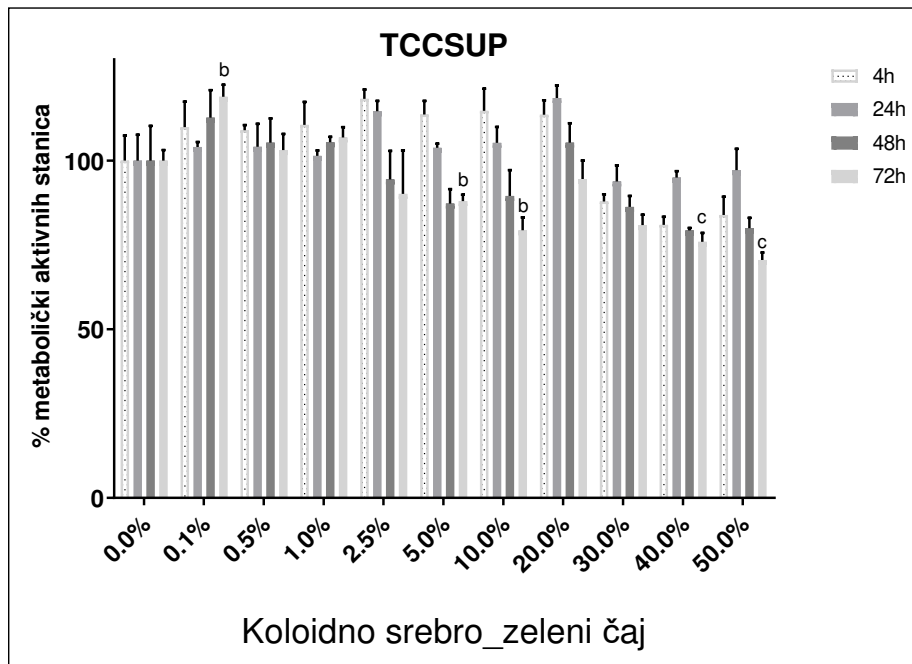


	<b>4h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>IC50 (%)</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

**Slika 28.** Citotoksična aktivnost zelenog čaja, (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 zapažena je u intervalima od 48 i 72 sata, a najvidljivija je korištenjem 20%-tne otopine. Iako zeleni čaj pokazuje citotoksičnu aktivnost, pri nijednom razrijeđenju i u nijednom intervalu ona nije značajno izražena da bi mogla nadmašiti učinak koloidnog srebra.

#### 4.4. STANIČNA LINIJA TCCSUP



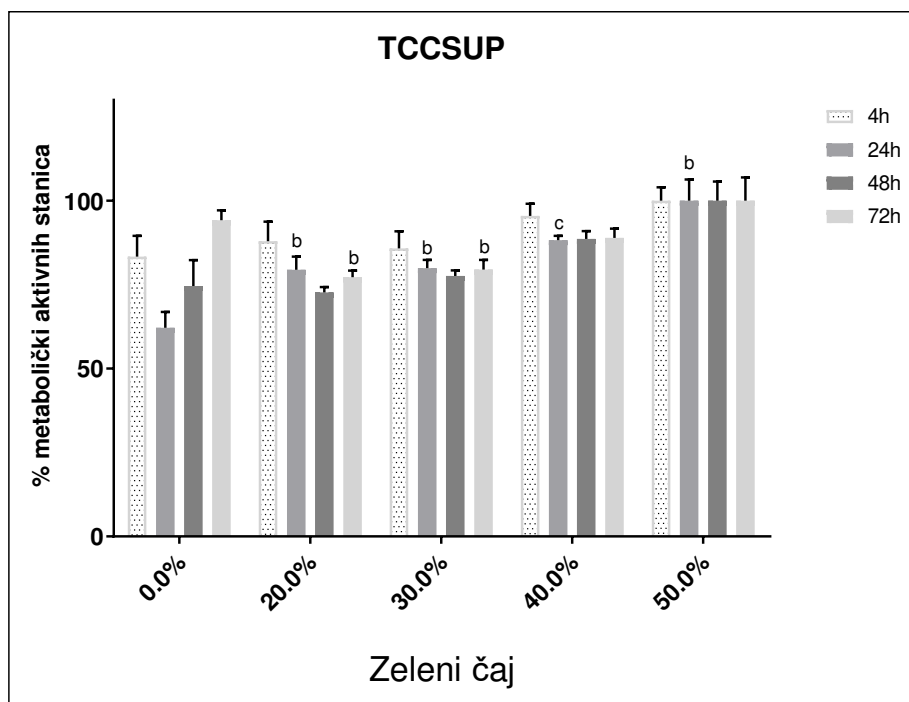
	4h	24h	48h	72h
IC50 (%)	ND	ND	ND	ND

**Slika 29.** Citotoksična aktivnost koloidnog srebra, (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 je najveća nakon 72 sata uz korištenje 50%-tne otopine, no nije značajna, IC50 se ne može odrediti za nijedan vremenski interval. Možemo zaključiti da koloidno srebro ne ostvaruje zapažen učinak na TCCSUP stanice.

Na staničnoj liniji TCCSP proveden je i kontrolni eksperiment gdje su stanice tretirane otopinom samo zelenog čaja u različitim razrjeđenjima (Slika 30).





	<b>4h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>IC50 (%)</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

**Slika 30.** Citotoksična aktivnost zelenog čaja, (IC<sub>50</sub>, 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 nije značajna, no zapažena je pri nižim koncentracijama, dok je pri najvišoj koncentraciji skoro uopće nema. Koloidno srebro proizvedeno uz pomoć zelenog čaja ostvaruje bolji učinak od čistog zelenog čaja.

## **5. RASPRAVA**

Rak je jedna od najstrašnijih bolesti 20. stoljeća, a širi se dalje uz stalni porast učestalosti i u 21. stoljeću. Svi oblici raka su izlječivi ako se otkriju dovoljno rano. Stanice raka nastavljaju rasti osim ako se ne dogodi jedna od četiri stvari: kancerogena masa se kirurški ukloni, korištenje kemoterapije ili neke druge vrste specifičnog lijeka za rak (poput hormonske terapije), korištenje terapije zračenjem ili se stanice raka smanjuju i nestanu same od sebe (29).

U 2022. godini bilo je 9,7 milijuna smrtnih slučajeva (9,96 milijuna zabilježeno je 2020. godine) te 20 milijuna novih slučajeva raka (19,6 milijuna u 2020. godini). Predviđa se da će broj slučajeva raka porasti na 35 milijuna do 2050. godine (30).

Između 30-50% svih slučajeva raka je moguće spriječiti. Prevencija predstavlja najisplativiju dugoročnu strategiju za kontrolu raka. Osnova prevencije je izbjegavanje čimbenika rizika kao što su: pušenje, alkohol, prekomjerna tjelesna težina, infekcije. Infekcije koje uzrokuju rak, kao što su hepatitis i humani papiloma virus (HPV), odgovorne su za do 25% slučajeva raka u zemljama s niskim i srednjim prihodima. Dostupna su cjepiva za virus hepatitisa B i neke vrste HPV-a, koja mogu smanjiti rizik od raka jetre i raka grlića maternice (31).

Koloidno srebro i zeleni čaj pokazuju citotoksičan učinak na karcinomske stanice i ta saznanja potaknula su ovo istraživanje.

Poznato je da stanice raka povećavaju stopu glikolize u kojoj laktat dehidrogenaza sudjeluje u kataliziranju pretvorbe piruvata u laktat, što troši NADH i regenerira NAD<sup>+</sup>. U studiji je pokazano da su MCF-7 stanice raka dojke tretirane koloidnim srebrom značajno smanjile aktivnost dehidrogenaze, što je rezultiralo smanjenjem omjera NADH/NAD<sup>+</sup>, što posljedično inducira staničnu smrt zbog smanjenja mitohondrijskog membranskog potencijala (32).

EGCG, glavni katehin koji se nalazi u zelenom čaju (*Camellia sinensis*), ima potencijal utjecati na niz ljudskih bolesti. Velik dio svojstava zelenog čaja za rak posredovan je EGCG-om koji inducira apoptozu i potiče zaustavljanje rasta stanica. Studije *in vitro* pokazale su da EGCG blokira karcinogenezu utječući na široku lepezu putova prijenosa signala uključujući JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT, Wnt i Notch. Različite kliničke studije otkrile su da liječenje EGCG-om inhibira pojavu i množinu tumora na različitim mjestima organa kao što su jetra, želudac, koža, pluća, mliječne žlijezde i debelo crijevo (33).

Predmet ovoga istraživanja je citotoksični utjecaj koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju na stanične linije HeLa, SiHa, T24 i TCCSUP.

*In vitro* ispitivanjem na HeLa i T24 stanicama utvrđen je citotoksični učinak koloidnog srebra. Kod HeLa stanica umjeren učinak je vidljiv već pri najnižim koncentracijama. Značajna promjena se očituje nakon 72 sata, primjenom 5%-tne otopine. Najizraženiji učinak je svakako vidljiv nakon najdužeg intervala, uz primjenu 10%-tne otopine te se primjenom većih koncentracija rezultat značajno ne mijenja.

Kod T24 stanica najizraženiji učinak je također vidljiv nakon 72 sata primjenom 10%-tne otopine i daljnom primjenom viših koncentracija ne dolazi do značajnijih razlika.

Na SiHa i TCCSUP stanicama ostvareni učinak je manji, posebno na TCCSUP stanicama gdje je skoro pa zanemariv.

Za SiHa stanice prva značajnija citotoksična aktivost je primjetna primjenom 5%-tne otopine, potom broj stanica ponovno kreće rasti uz malo veće koncentracije i na kraju ipak dolazi do najznačajnijeg pada pri najvećoj koncentraciji u najdužem intervalu.

Na TCCSUP stanice koloidno srebro djeluje slabo citotoksično i IC50 mu nigdje nije mjerljiv, a najznačajnija citotoksična aktivnost, koja je i dalje jako slaba, je pri najvišoj koncentraciji (50%-tna otopina) i najdužem intervalu (72h).

Na SiHa i TCCSUP stanicama je također provedeno djelovanje sa čistim zelenim čajem u različitim razrijeđenjima i nije postignut učinak značajniji od učinka koloidnog srebra.

*In vitro* ispitivanjem dobiveni rezultati pokazuju citotoksično djelovanje koloidnog srebra na stanične linije karcinoma grlića maternice i mokraćnog mjehura upotrebom različitih koncentracija kroz određeni period inkubacije. Dokazana je i ovisnost citotoksične aktivnosti, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica, o koncentraciji ispitivanih uzoraka i vremenu izlaganja. Posebno izražen učinak je ostvaren na staničnim linijama HeLa i T24. Iz svega navedenog možemo zaključiti da koloidno srebro ima potencijal za daljnja biomedicinska ispitivanja u svrhu liječenja karcinoma, stoga su potrebna dodatna *in vitro* ispitivanja kojima bi se moglo potvrditi njegovo citotoksično djelovanje.

## **6. ZAKLJUČAK**

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) i mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP) koloidnom srebru, proizvedenom pomoću zelenog čaja, dovelo je do smanjenja preživljenja tih stanica, odnosno smanjuje se postotak metabolički aktivnih stanica.
- 2) Ispitivani uzorci uglavnom su pokazali citotoksičan učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- 3) Djelovanje koloidnog srebra je slično na staničnim linijama HeLa i T24. Najvažniji citotoksičan učinak ostvaren je nakon 72 sata primjenom 10%-tne otopine i potom povećanjem koncentracije nema većih promjena u broju metabolički aktivnih stanica.
- 4) Značajan učinak primjenom tih i koncentriranijih otopina vidljiv je i nakon 24 i 48 sati.
- 5) Djelovanje srebra na SiHa i TCCSUP stanice puno je manje izraženo iako je pri najvećoj koncentraciji (50%-tna otopina) u najduljem intervalu (72h) najizraženiji citotoksični učinak.
- 6) Na TCCSUP stanice koloidno srebro ima najslabiji učinak i najviše je metabolički aktivnih stanica ostalo prisutno.
- 7) Zeleni čaj nema bolji citotoksični utjecaj od koloidnog srebra na SiHa i TCCSUP stanice.
- 8) Citotoksično djelovanje koloidnog srebra je potvrđeno prema navedenim rezultatima. Za daljnju analizu i potvrdu dobivenih rezultata potrebna su dodatna *in vitro* istraživanja 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; 2017. str. 149-152.
2. Uzroci raka - Onkologija [Internet]. Onkologija. 2022 [cited 2024 Sep 11]. Available from: <https://www.onkologija.hr/uzroci-raka/>
3. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 175.
4. Cancer research UK. Stages of cancer [Internet]. Cancer Research UK. CRUK; 2017. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/stages-of-cancer>
5. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 728.
6. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 739.
7. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 183.
8. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 744.
9. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 184-186.
10. World Health Organization. Cervical cancer [Internet]. World Health Organization. 2019. Available from: [https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1)
11. Nacionalni dan mimoza i Europski tjedan prevencije raka vrata maternice 2024. [Internet]. Hzzj.hr. 2024 [cited 2024 Sep 30]. Available from: <https://www.hzzj.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/nacionalni-dan-mimoza-i-europski-tjedan-prevencije-raka-vrata-maternice-2024/>
12. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 178.
13. Hoskin P. Klinička onkologija- Temeljna načela i praksa. 5. IZDANJE. Zagreb: Medicinska naklada; 2022. str. 180.



14. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 178.
15. Prevencija raka vrata maternice - Nacionalni preventivni program ranog otkrivanja raka vrata maternice [Internet]. Nacionalni preventivni program ranog otkrivanja raka vrata maternice. 2020 [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://necurak.hzjz.hr/za-zene/prevencija-raka-vrata-maternice/>
16. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 178.-180.
17. Bladder cancer – IARC [Internet]. [www.iarc.who.int](http://www.iarc.who.int). Available from: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/bladder-cancer/>
18. Key Statistics for Bladder Cancer [Internet]. [www.cancer.org](http://www.cancer.org). 2023. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/about/key-statistics.html>
19. Bladder Cancer Risk Factors | Risk for Bladder Cancer [Internet]. [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.htm>
20. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2021. godini [Internet]. [www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr). Available from: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/>
21. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 156.-158.
22. Camellia sinensis (Assam Tea, Tea Camellia, Tea Plant, Tea Tree Camellia) | North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox [Internet]. [plants.ces.ncsu.edu](http://plants.ces.ncsu.edu). Available from: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/camellia-sinensis/>
23. Uredništvo. Kineski čajevac [Internet]. [Plantea](http://www.plantea.com). 2023 [cited 2024 Sep 10]. Available from: <https://www.plantea.com.hr/kineski-cajevac/>

24. Kochman J, Jakubczyk K, Antoniewicz J, Mruk H, Janda K. Health Benefits and Chemical Composition of Matcha Green Tea: A Review. *Molecules* [Internet]. 2020 Dec 27;26(1):85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7796401/>
25. 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* [Internet]. 2018 Oct 26 [cited 2020 Feb 25];7(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315945/>
26. Lukaček A. Zelena sinteza koloidnog srebra kemijskom redukcijom pomoću zelenog čaja [Internet]. [cited 2024 Sep 24]. Available from: <https://repozitorij.ktf-split.hr/islandora/object/ktfst%3A1327/datastream/PDF/view>
27. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2011;716:157–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21318905/>
28. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays [Internet]. Nih.gov. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
29. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer* [Internet]. 2016;53(3):441–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28244479>
30. . GLOBOCAN 2022: Latest global cancer data shows rising incidence and stark inequities UICC [Internet]. [www.uicc.org](http://www.uicc.org). Available from: <https://www.uicc.org/news/globocan-2022-latest-global-cancer-data-shows-rising-incidence-and-stark-inequities>
31. WHO. Preventing cancer [Internet]. Who.int. 2019. Available from: <https://www.who.int/activities/preventing-cancer>
32. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Gómez-Flores RA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, et al. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2010 Nov 16;29

33. Bn S, S S, Rk S. Green Tea Catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, Perspectives and Clinical Applications [Internet]. Biochemical pharmacology. 2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21827739/>

## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje koloidnog srebra proizvedenog u zelenom čaju na humane stanice karcinoma glijca maternice (HeLa i SiHa) i mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP).

### **Materijali i metode:**

Citotoksičnost se ispitivala MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja koloidnim srebrom proizvedenim u zelenom čaju. Uzorci su pripremljeni u različitim razrijeđenjima: 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50%. Učinak je mjeren nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost uzoraka određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

### **Rezultati:**

Rezultati koji predstavljaju odnos postotka metabolički aktivnih stanica i vremena inkubacije su prikazani grafički.

Kod karcinoma glijca maternice koloidno srebro je ostvarilo visok citotoksični učinak na HeLa staničnu liniju. Najznačajniji pad metabolički aktivnih stanica dogodio se u najdužem intervalu (72 sata) uz primjenu 10%-tne otopine, te se primjenom većih koncentracija nije značajno smanjivao broj aktivnih stanica. IC50 se mogao odrediti za vremenske intervale od 24, 48 i 72 sata. Kod SiHa stanične linije IC50 mogao se odrediti samo za 48 i 72 sata, a citotoksični učinak je slabiji nego na HeLa liniju. Najizraženiji pad broja aktivnih stanica uočen je nakon 72 sata uz primjenu najkoncentriranije otopine (50%-tne).

Kod karcinoma mokraćnog mjehura koloidno srebro je na T24 liniju ostvarilo sličan učinak kao i na HeLa liniju karcinoma glijca maternice. Najznačajniji pad metabolički aktivnih stanica dogodio se u najdužem intervalu (72 sata) uz primjenu 10%-tne otopine, te se primjenom većih koncentracija nije značajno smanjivao broj aktivnih stanica. IC50 se mogao odrediti nakon 48 i 72 sata. Najslabiji učinak koloidno srebro ostvarilo je na TCCSUP staničnu liniju. IC50 se nije mogao izmjeriti, a citotoksična aktivnost, iako mala, najizraženija je bila nakon 72 sata uz najvišu koncentraciju.

**Zaključci:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) i mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP) koloidnom srebru dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak uglavnom je ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Najjači citotoksični učinak zabilježen je kod primjene 10%-tnih i koncentriranijih otopina tijekom 72 sata na HeLa i T24 stanice. Potencijalno citotoksično djelovanje je dakle potvrđeno, a potrebna su daljnja *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdilo djelovanje i na životinjskim modelima.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Testing the cytotoxic effects of colloidal silver produced in green tea on human carcinoma cells

**Research Objective:**

The objective of the study was to examine the potential cytotoxic effects of colloidal silver produced in green tea on human cervical cancer cells (HeLa and SiHa) and bladder cancer cells (T24 and TCCSUP).

**Materials and Methods:**

Cytotoxicity was tested using the MTT method, which determines the percentage of metabolically active cells after treatment with colloidal silver produced in green tea. Samples were prepared in various dilutions: 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%. The effect was observed after 4, 24, 48, and 72 hours. The efficacy of the extracts was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 570 nm.

**Results:**

The results are presented graphically in terms of the percentage of metabolically active cells and incubation time.

In cervical cancer, colloidal silver showed a high cytotoxic effect on the HeLa cell line. The most significant drop in the number of metabolically active cells occurred in the longest interval (72 hours) with the application of a 10% solution, and using higher concentrations did not significantly reduce the number of active cells. IC<sub>50</sub> was determined for the 24, 48, and 72-hour intervals. For the SiHa cell line, IC<sub>50</sub> could only be determined at 48 and 72 hours, and the cytotoxic effect was not so good as on the HeLa line. The most visible drop in the number of active cells was observed after 72 hours with the application of the most concentrated solution (50%).

In bladder cancer, colloidal silver showed a similar effect on the T24 line as on the HeLa cervical cancer line. The most significant drop in metabolically active cells occurred in the longest interval (72 hours) with the application of a 10% solution, and using higher concentrations did not significantly reduce the number of active cells. IC<sub>50</sub> could be determined after 48 and 72 hours. The weakest effect of colloidal silver was observed on the TCCSUP cell line. IC<sub>50</sub> could not be determined, and although cytotoxic activity was low, it was most visible after 72 hours with the highest concentration.



**Conclusions:**

*In vitro* exposure of cervical cancer cells (HeLa and SiHa) and bladder cancer cells (T24 and TCCSUP) to colloidal silver leads to a reduction in the survival of these cells. The cytotoxic effect is mostly dependent on the incubation time and concentration. The strongest cytotoxic effect was observed with the application of 10% and more concentrated solutions during 72 hours on HeLa and T24 cells. The potential cytotoxic effect is confirmed, but further *in vivo* studies are needed to confirm the effect in animal models.

## **10.ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Ivana Šeravić

**Datum rođenja:** 27.09.2000.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**OBRAZOVANJE:**

- 2007. - 2015. Osnovna škola "Manuš", Split
- 2015. - 2019. V. gimnazija "Vladimir Nazor", Split
- 2019. - 2024. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, smjer: farmacija

**RADNO ISKUSTVO:**

- II. 2024. - VIII. 2024. Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Lučac

**AKTIVNOSTI:**

- Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA)

**POSEBNE VJEŠTINE:**

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

**Vozačka dozvola:** B kategorija

**Strani jezici:** engleski jezik, talijanski jezik